



**EKSPRESI OSTEOPROTEGERIN (OPG) PADA DAERAH
TARIKAN TULANG ALVEOLAR GIGI TIKUS WISTAR
JANTAN YANG DIINDUKSI GAYA MEKANIK
ORTODONTI DENGAN APLIKASI
NATRIUM FLUORIDA (NaF)**

SKRIPSI

Oleh

**Nabilah Dzakiyatul Fakhirah
NIM 141610101004**

**BAGIAN HISTOLOGI DAN ORTODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**EKSPRESI OSTEOPROTEGERIN (OPG) PADA DAERAH
TARIKAN TULANG ALVEOLAR GIGI TIKUS WISTAR
JANTAN YANG DIINDUKSI GAYA MEKANIK
ORTODONTI DENGAN APLIKASI
NATRIUM FLUORIDA (NaF)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

oleh

**Nabilah Dzakiyatul Fakhirah
NIM 141610101004**

**BAGIAN HISTOLOGI DAN ORTODONSIA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Dengan penuh rasa syukur dan ketulusan hati, skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Allah SWT dan Rasulullah Muhammad SAW, atas segala limpahan rahmat, kasih sayang dan karunia-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini dan saya diberi kesempatan sehingga dapat menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. Yang tersayang kedua orang tua saya, Bapak Sulaiman dan Ibu Pusfita yang tiada henti memberi do'a, kasih sayang, dukungan, motivasi dan segala hal yang mereka miliki untuk keberhasilan dan kebahagiaan saya;
3. Kakakku Febri dan adik-adikku Rena dan Haidir;
4. Pahlawan tanpa tanda jasaku sejak TK Persis, SDN Pogar 2, SMPN 1 Bangil dan SMAN 1 Bangil yang telah bersedia mendidik, mengajari dan berbagi ilmu; dan
5. Almamaterku tercinta Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

“Allah tidak membebani seseorang melainkan kesanggupannya.”

(QS. Al-Baqarah ayat 286)¹

“Sesungguhnya Allah tidak mengubah keadaan suatu kaum sehingga mereka mengubah keadaan yang ada pada diri mereka sendiri.”

(QS. Ar-Ra'd ayat 11)*

“Pray Hard, Work Hard”

(Mom Solikhah)

¹) Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: PT. Syaamil Cipta Media

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nabilah Dzakiyatul Fakhirah

NIM : 141610101004

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah yang berjudul “Ekspresi Osteoprotegerin (OPG) pada Daerah Tarikan Tulang Alveolar Tikus Wistar Jantan yang diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti dengan Aplikasi Natrium Fluorida (NaF)” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 04 April 2018

Yang menyatakan,

Nabilah Dzakiyatul Fakhirah

NIM 141610101004

SKRIPSI

**EKSPRESI OSTEOPROTEGERIN (OPG) PADA DAERAH
TARIKAN TULANG ALVEOLAR GIGI TIKUS WISTAR
JANTAN YANG DIINDUKSI GAYA MEKANIK
ORTODONTI DENGAN APLIKASI
NATRIUM FLUORIDA (NaF)**

Oleh

Nabilah Dzakiyatul Fakhirah

NIM 141610101004

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yenny Yustisia, M. Biotech

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Rudy Joelianto, M. Biomed

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Ekspresi Osteoprotegerin (OPG) pada Daerah Tarikan Tulang Alveolar Tikus Wistar Jantan yang diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti dengan Aplikasi Natrium Fluorida (NaF)” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 04 April 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

Dr. drg. Rina Sutjiati, M. Kes
NIP 196510131994032001

Dr. drg. Tecky Indriana, M. Kes
NIP 196811261997022001

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,

drg. Yenny Yustisia, M. Biotech
NIP 197903252005012001

drg. Rudy Joelianto, M. Biomed
NIP 197207151998021001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Pros
NIP 196901121996011001

RINGKASAN

Ekspresi Osteoprotegerin (OPG) pada Daerah Tarikan Tulang Alveolar Tikus Wistar Jantan yang diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti dengan Aplikasi Natrium Fluorida (NaF); Nabilah Dzakiyatul Fakhirah, 141610101004; 2018; 72 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Perawatan ortodonti berhubungan dengan pengaturan gigi geligi yang tidak teratur dengan cara menggerakkan gigi geligi ke tempat yang ideal. Mendapatkan daerah stabil pada tempat yang ideal setelah gigi digerakkan dalam lengkung yang benar, dibutuhkan suatu alat retensi yang bertujuan untuk mempertahankan hasil perawatan supaya gigi tidak relaps. Relaps diduga terjadi karena kepadatan tulang pada daerah tarikan saat proses remodeling belum optimal. Pematatan pada daerah tarikan ini dipicu oleh proses osteogenesis. Apabila relaps tidak diatasi, maka gigi dapat kembali ke posisi awal atau bisa terjadi suatu maloklusi baru. Sehingga dikatakan bahwa relaps adalah *long-term problem and long-term follow-up* bagi dokter gigi dan pasien. Sehingga para ortodontis banyak melakukan penelitian agar dapat mencegah terjadinya relaps, salah satunya adalah dengan menggunakan bahan fluor, yaitu Natrium Fluorida (NaF) untuk memadatkan daerah tarikan dengan meningkatkan proses aposisi. Fluor diduga dapat meningkatkan proses aposisi dengan meningkatkan proliferasi sel osteoblas. Fluor dapat meningkatkan pembentukan tulang baru melalui sitokin anti-inflamasi, faktor pertumbuhan, sel osteoklas dan sel osteoblas. Sel osteoblas mensekresikan *Osteoprotegerin* (OPG). OPG adalah inhibitor alami untuk menghambat ikatan *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β ligand* (RANKL) dengan *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β* (RANK), sehingga tidak terjadi pembentukan osteoklas dan yang terjadi adalah inaktivasi osteoklas sehingga tidak terjadi resorpsi tapi terjadi osteogenesis. Sehingga OPG ikut berperan dalam proses osteogenesis, maka peneliti tertarik untuk meneliti ekspresi

OPG pada daerah tarikan tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti dengan aplikasi Natrium Fluorida (NaF) secara topikal.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris yang dilaksanakan pada bulan Oktober-Februari 2018. Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember, laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Populasi penelitian adalah hewan coba tikus Wistar jantan sebanyak 4 ekor untuk setiap kelompok. Kelompok terdiri atas 5 kelompok yaitu A, B, C, D dan E. Kelompok yang tidak diinduksi gaya mekanik ortodonti (kelompok A), diinduksi gaya mekanik ortodonti selama 7 dan 14 hari (B dan C) dan diinduksi gaya mekanik ortodonti dan fluor selama 7 dan 14 hari (kelompok D dan E). Penelitian diawali dengan mengadaptasikan hewan coba dengan lingkungan kandang dan makanan. Kemudian melakukan pemasangan *ni-ti closed coil spring* dan pemberian fluor secara topikal selama 7 dan 14 hari. Dosis fluor yang digunakan adalah 11,75 ppm. Setelah proses perlakuan selesai, hewan coba dieuthanasia dengan menggunakan ketamin overdosis, kemudian bagian insisivus rahang atas dipotong dan dilakukan pemrosesan jaringan.

Hasil penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa ekspresi OPG ditemukan lebih tinggi pada kelompok gigi yang diinduksi gaya mekanik ortodonti dan pemberian fluor daripada kelompok gigi yang diinduksi gaya mekanik ortodonti tetapi tanpa pemberian fluor. Ekspresi OPG pada kelompok yang diinduksi gaya mekanik ortodonti selama 14 hari cenderung lebih tinggi daripada kelompok yang hanya diinduksi gaya mekanik ortodonti selama 7 hari. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa Natrium Fluorida 11,75 ppm secara topikal dapat meningkatkan ekspresi OPG pada daerah tarikan tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti.

PRAKATA

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat, kasih sayang dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekspresi Osteoprotegerin (OPG) pada Daerah Tarikan Tulang Alveolar Tikus Wistar Jantan yang diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti dengan Aplikasi Natrium Fluorida (NaF)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada jurusan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Pros. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember beserta jajarannya;
2. drg. Yenny Yustisia, M. Biotech selaku Dosen Pembimbing Utama, dan drg. Rudy Joelianto, M. Biomed selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah memberikan bimbingan, saran, motivasi serta meluangkan waktu sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
3. Dr. drg. Rina Sutjiati, M. Kes selaku Dosen Penguji Ketua dan Dr. drg. Tecky Indriana, M. Kes selaku Dosen Penguji Anggota. Terima kasih telah memberikan ilmu yang bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini;
4. Ibu Pusfita dan ayah Sulaiman. Berjuta ucapan terima kasih rasanya tak cukup mewakili segala hal yang sudah dilakukan. Terima kasih atas setiap tetes keringat, setiap untaian do'a, setiap pengorbanan dan kasih sayang yang tak terhitung selama ini;
5. Mbak Yah, yang merawatku sedari kecil yang sudah seperti ibu keduaku. Terima kasih atas segala kasih sayang dan doanya selama ini;
6. Adekku Rena dan Haidir serta Masku Febri. Terima kasih telah menjadi saudara yang selalu saling menyayangi.

7. Teknisi Lab Fisiologi FKG Universitas Jember mas Agus, teknisi Lab Histologi FKG Universitas Jember mbak wahyu, teknisi Lab Farmasi ibu Wayan. Terima kasih atas bantuannya selama proses penelitian berlangsung;
8. Staf Laoratorium Biokimia FK Universitas Brawijaya Malang, mas Wibi Riawan, S.Si, mbak Fitri dan pak Seno yang telah memberikan bantuan dan ilmu selama pewarnaan IHC dan pengamatan.
9. Teman-teman penelitian fluor Arie, Dini dan Shinta. Terima kasih telah menjadi penyemangat dan penghibur dikala sedih serta selalu ada di saat pahit dan manisnya penelitian.
10. Sahabat nim Dempet Nanik, Shinta, Dini, Arie, Irsa, Fika, Umil dan Rusella, sahabat yang tak pernah lupa saling memberi dukungan satu sama lain, Terima kasih tiada tara untuk kalian. Atas setiap waktu, kenangan dan kebersamaan selama ini;
11. Sahabat KKN desa Petung kelompok 75 UMD Lina, Firman, Bayu, Esthi, Pandu, Fina, Rofi, Nafthah dan Mira.
12. Seluruh teman FKG 2014 Leci tercinta yang telah mewarnai hari-hari perkuliahan;
13. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 04 April 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
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 Fluor	5
2.1.1 Definisi Fluor	5
2.1.2 Kelebihan Fluor	5
2.1.3 Kekurangan Fluor	6
2.2 Metabolisme Fluor	7
2.2.1 Metabolisme Absorpsi pada Fluorida	7
2.2.2 Metabolisme Distribusi pada Fluorida.....	7
2.2.3 Metabolisme Eskresi pada Fluorida.....	7
2.3 Teori Pergerakan Gigi	8
2.4 Pergerakan Gigi Ortodonti	9

2.5 Relaps	11
2.6 Osteoprotegerin (OPG)	12
2.7 Sel Osteoblas	13
2.8 Tulang Alveolar	14
2.9 Proses Remodeling Tulang	15
2.10 Deteksi Bahan Aktif dengan Metode <i>Immunohistochemistry</i>	18
2.10.1 Antibodi	19
2.10.2 Kromogen	20
2.10.3 <i>Counterstain</i>	20
2.11 Gambaran Histologi Sel Osteoblas Jaringan Periodontal dengan Pewarnaan IHC	21
2.12 <i>ImmunoRatio</i> (IRS)	21
2.13 Kerangka Konsep Penelitian	23
2.14 Hipotesis	24
BAB 3. METODE PENELITIAN	25
3.1 Jenis Penelitian	25
3.2 Rancangan Penelitian	25
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.3.1 Tempat Penelitian	25
3.3.2 Waktu Penelitian	25
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	26
3.4.1 Populasi Penelitian	26
3.4.2 Sampel Penelitian	26
3.5 Identifikasi Variabel Penelitian	27
3.5.1 Variabel Bebas	27
3.5.2 Variabel Terikat	27
3.5.3 Variabel Terkendali	27
3.6 Definisi Operasional	27
3.6.1 Natrium Fluorida	27
3.6.2 Kekuatan Mekanik Ortodonti	27
3.6.3 Ekspresi <i>Osteoprotegerin</i> (OPG)	28

3.7 Bahan dan Alat Penelitian	28
3.8.1 Bahan Penelitian	28
3.8.2 Alat Penelitian.....	29
3.8 Prosedur Penelitian	30
3.8.1 Perijinan <i>Ethical Clearence</i>	30
3.8.2 Persiapan Hewan Coba	30
3.8.3 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	30
3.8.4 Persiapan Gel Natrium Fluorida	31
3.8.5 Perlakuan Hewan Coba.....	31
3.8.6 <i>Euthanasia</i> Hewan Coba	32
3.8.7 Pembuatan Preparat Jaringan.....	32
3.9 Prosedur Pengamatan Ekspresi OPG	35
3.10 Analisis Data	36
3.11 Alur Penelitian	38
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	39
4.1 Hasil Penelitian	39
4.2 Analisis Data	41
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

	Halaman
4.1 Hasil perhitungan rata-rata jumlah ekspresi OPG	40
4.2 Hasil uji LSD (<i>Least Significance Difference</i>) ekspresi OPG.....	42



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Proses Osteoklastogenesis.....	13
2.2 Struktur Tulang	14
2.3 Tahapan Proses Remodeling Tulang.....	18
2.4 Gambaran <i>Immunostaining</i> OPG	21
2.5 Tampilan <i>ImmunoRatio</i> secara <i>online</i>	22
2.6 Skema Kerangka Konsep	23
3.1 Pemasangan <i>closed coil spring</i>	32
3.2 Gambaran pemotongan jaringan	36
3.3 Bagan Alur Penelitian	38
4.1 Gambaran histologis gigi tikus Wistar jantan	39
4.2 Diagram batang jumlah rerata ekspresi OPG.....	41

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
LAMPIRAN A. Perhitungan Dosis Bahan Anastetikum	53
LAMPIRAN B. Rerata Hasil Jumlah Ekspresi OPG	54
LAMPIRAN C. Hasil Uji Analisis Data.....	55
LAMPIRAN D. Alat dan Bahan Penelitian	57
LAMPIRAN E. Foto Preparat <i>Immunostaining</i> OPG	63
LAMPIRAN F. Ethical Cleareance	70
LAMPIRAN G. Surat Ijin Penelitian Pembuatan Preparat Jaringan	71
LAMPIRAN H. Surat Ijin Penelitian Pengecatan IHC.....	72

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perawatan ortodonti adalah salah satu jenis perawatan yang dilakukan di bidang kedokteran gigi yang bertujuan mendapatkan penampilan dentofasial yang menyenangkan secara estetika (William, 2000). Perawatan ortodonti berhubungan dengan pengaturan gigi geligi yang tidak teratur dengan cara menggerakkan gigi geligi tersebut ke tempat yang ideal (Krishnan dan Davidovitch, 2006). Mendapatkan daerah stabil pada tempat yang ideal setelah gigi digerakkan dalam lengkung yang benar, dibutuhkan suatu alat retensi yang bertujuan untuk mempertahankan hasil perawatan supaya gigi tidak *relaps* (Indriana, 2016).

Berdasarkan penelitian Ren *et al.* (1999) menyatakan bahwa 50% pada pasien yang dilakukan perawatan ortodonti setelah 2 tahun masa retensi mengalami *relaps*, 28% *relaps* setelah 5 tahun masa retensi, dan 67% mengalami *relaps* setelah 10 tahun masa retensi. Penelitian lain oleh Danz *et al.* (2012) yang dilakukan dengan pengukuran radiografi cephalometri lateral pada kasus *deep bite* menunjukkan bahwa 10% dari 61 sampel menunjukkan terjadinya *relaps*. Apabila *relaps* tidak diatasi, maka gigi yang sudah berada didalam lengkungnya akan kembali ke posisi awal atau bisa terjadi suatu maloklusi baru. Sehingga dikatakan bahwa *relaps* adalah *long-term problem and long-term follow-up* bagi dokter gigi dan pasien. Pencegahan *relaps* dengan cara retensi yaitu dengan pemberian piranti retensi yang disebut *retainer* dilakukan dalam durasi waktu tertentu sekitar 6-12 bulan (Shawesh *et al.*, 2010). *Retainer* merupakan alat pasif ortodonti yang membantu dalam menangani dan menstabilisasi gigi dalam waktu yang lama untuk memberikan kesempatan reorganisasi struktur-struktur pendukung setelah tahap aktif dalam perawatan ortodonti (Iswari, 2012).

Perawatan ortodonti selalu menggunakan kekuatan mekanik untuk menggerakkan gigi. Kekuatan ortodonti yang diaplikasikan pada mahkota akan diteruskan ke akar, ligamen periodontal dan tulang alveolar, akibatnya akan terjadi perubahan pada fungsi dan sel-sel tulang alveolar. Perubahan tersebut meliputi proses remodeling yaitu pembentukan tulang pada daerah tarikan dan

resorpsi tulang pada daerah tekanan, sehingga gigi akan bergerak pada arah baru (Pudyani *et al.*, 2008). *Relaps* terjadi karena kepadatan tulang pada daerah tarikan saat proses remodeling belum optimal, oleh karena itu diperlukan suatu bahan untuk memadatkan daerah tarikan. Pematatan pada daerah tarikan ini dipicu oleh proses osteogenesis (Indriana, 2016). Beberapa penelitian tentang proses remodeling tulang, terutama tentang peningkatan proses aposisi atau pembentukan tulang telah banyak dilakukan, antara lain oleh Collins (1988) dengan mengkonsumsi vitamin D. Penelitian lain yaitu, dengan pemberian gel teripang emas oleh Rahardjo *et al.* pada tahun 2014 dan pemberian ikan teri oleh Indriana pada tahun 2016 dapat meningkatkan proses aposisi. Adapun cara lain untuk meningkatkan proses aposisi dengan meningkatkan proliferasi sel osteoblas adalah dengan pemberian fluor (Sutjiati, 2016).

Fluor adalah salah satu zat gizi mikro yang dibutuhkan oleh tubuh jika dikonsumsi dalam jumlah cukup dan bermanfaat untuk mencegah karies gigi dan juga berperan penting dalam pembentukan enamel gigi pada anak-anak. Pada tulang, fluor dapat mengaktifasi osteoblas maupun osteoklas baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Fluor dapat menghambat aktivitas osteoklas dengan konsentrasi sebesar 15 – 30 mg/L. Fluor yang terkandung dalam Natrium Fluorida berfungsi mempertahankan tulang dan melindungi lapisan enamel gigi sehingga mencegah karies gigi. Namun, fluor juga memiliki efek samping yang cukup berbahaya terutama jika dikonsumsi melebihi batas tertentu. Kelebihan fluor dapat menyebabkan fluorosis gigi, osteoporosis, masalah persendian dan kerusakan sistem saraf terutama pada penggunaan yang salah (Aoba *et al.*, 2002; Putri, 2009; Mardiana, 2014).

Penelitian yang dilakukan oleh Sakallioglu *et al.* (2014) secara *in vitro* menunjukkan bahwa fluor meningkatkan proliferasi sel di dalam tulang. Mardiana (2014) melaporkan bahwa secara statistik terdapat hubungan positif antara asupan mineral fluor dalam air minum dengan jaringan periodontal. Efek pemberian Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm secara topikal pada pergerakan gigi ortodonti efektif meningkatkan ekspresi TGF- β 1, Runx2, Sox2, ALP, Kolagen tipe 1 serta luas rata-rata *Woven Bone* (Sutjiati, 2016). Fluor dapat meningkatkan

pembentukan tulang baru melalui sitokin anti-inflamasi, faktor pertumbuhan, sel osteoklas dan sel osteoblas. Sel osteoblas memproduksi ALP dan osteokalsin yang mengakibatkan peningkatan aposisi. Sel osteoblas juga mensekresikan *Osteoprotegerin* (OPG). OPG adalah inhibitor alami untuk menghambat ikatan *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β ligand* (RANKL) dengan *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β* (RANK), sehingga tidak terjadi pembentukan osteoklas. Reseptor RANK terdapat pada pre-osteoklas maupun pada osteoklas. OPG dapat menghambat proses osteoklastogenesis, memicu apoptosis sel osteoklas sehingga menurunkan proses resorpsi tulang, yaitu melalui kemampuan OPG sebagai reseptor umpan (*decoy receptor*) (Bartold *et al.*, 2010). Disamping itu, sitokin anti-inflamasi yaitu IL-10 akan menyebabkan peningkatan jumlah OPG yang selanjutnya juga akan menghalangi ikatan RANKL dengan RANK, sehingga akan terjadi proses osteogenesis (Indriana, 2016).

Berdasarkan uraian diatas, OPG ikut berperan dalam proses osteogenesis maka peneliti tertarik untuk meneliti efek pemberian Natrium Fluorida (NaF) secara topikal terhadap ekspresi OPG pada daerah tarikan tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut didapatkan rumusan masalah apakah Natrium Fluorida (NaF) secara topikal dapat meningkatkan ekspresi OPG pada daerah tarikan tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek Natrium Fluorida (NaF) secara topikal terhadap ekspresi OPG pada daerah tarikan tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan:

1. Bagi peneliti

Mengetahui efek Natrium Fluorida (NaF) secara topikal terhadap ekspresi OPG pada daerah tarikan tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti.

2. Bagi masyarakat

Memberi informasi tentang manfaat Natrium Fluorida.

3. Bagi institusi

- a. Dapat meningkatkan keberhasilan dalam perawatan ortodonti.
- b. Hasil dari penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fluor

2.1.1 Definisi Fluor

Fluor adalah mineral alamiah yang terdapat di semua sumber air termasuk laut. Fluor tidak pernah ditemukan dalam bentuk bebas di alam. Fluor bergabung dengan unsur lain membentuk senyawa Fluorida (Yanti, 2005). Senyawa fluor merupakan senyawa sangat reaktif. Sifat-sifat lain senyawa fluor adalah: (a) Merupakan racun terhadap aktivitas enzimatik, (b) Dapat mengganti gugus hidroksi dari hidroksiapatit (HAP) menjadi fluor apatit (FAP) yang lebih tahan terhadap karies, (c) Menstimulasi pembentukan tulang (Baylink *et al.*, 1983).

Widjijono (2001) menyatakan bahwa fluor pada jaringan lunak terletak dalam cairan intersisial, sedangkan fluor pada jaringan terkalsifikasi dideposisi melalui sirkulasi darah dan cairan jaringan fluor yang terdapat dalam jaringan keras berturut-turut makin besar kandungan fluornya adalah sementum, tulang, dentin, enamel. Fluor dapat dilepas kembali ke darah akibat dekalsifikasi karena adanya mekanisme remodeling dinamis tulang dan berlangsung secara berkesinambungan.

2.1.2 Kelebihan Fluor

Terapi fluor dengan konsentrasi yang tepat dapat berperan dalam menghambat proses demineralisasi dan mempercepat remineralisasi enamel dan dentin, baik digunakan secara topikal, bentuk obat kumur, varnish, maupun kegunaan lain seperti pada pasta gigi (Eakle *et al.*, 2004). Penambahan fluor pada permukaan gigi yang mengalami karies permulaan atau karies dini dapat meningkatkan proses remineralisasi. Tetapi walaupun fluor mendorong proses remineralisasi, namun yang paling utama adalah permukaan gigi secara teratur harus dibersihkan dari plak dengan menggunakan bahan yang mengandung fluor (Panjaitan, 1997).

Pada tulang, fluor dapat mengaktifasi osteoblas maupun osteoklas baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Fluor dapat menghambat aktivitas osteoklas

dengan konsentrasi sebesar 15 – 30 mg/L. Natrium Fluorida dapat meningkatkan masa tulang, meskipun mekanismenya masih belum jelas. Sedangkan Natrium fluorida meningkatkan pembentukan tulang baru dengan struktur kekuatan yang normal. Fluor secara langsung dapat berinteraksi dengan mineral matriks tulang secara fisikokimia. Secara *in vitro* fluor juga berperan untuk mengganti karbonat hidroksiapatit menjadi karbonat fluorapatit, dalam hal ini merubah kristalnya dan mengurangi kekuatan mekanis. Fluorapatit ini lebih stabil dan resisten terhadap larutan asam dari pada hidroksiapatit (Everett, 2011).

2.1.3 Kekurangan Fluor

Fluorida memiliki efek yang bermanfaat terhadap pencegahan karies gigi pada konsentrasi tertentu, namun pada keterpaparan yang berlebihan dapat meningkatkan terjadinya efek yang tidak diinginkan. Efek buruk tersebut dapat bervariasi dari fluorosis gigi ringan (keadaan dimana gigi menjadi kekuningan atau kecoklatan dan terdapat bintik bintik pada email gigi hingga skeletal fluorosis), seiring dengan meningkatnya kadar dan lamanya paparan. Oleh karena itu, asupan fluorida haruslah dibatasi agar dapat mencegah karies namun tidak menimbulkan terjadinya fluorosis (Fawell *et al.*, 2006; Astriningnum, 2011). Fluorosis merupakan penyakit akibat asupan Fluorida berlebihan yang menyebabkan hiperkalsifikasi disertai berbagai kerusakan tulang dan paralisis. Bahaya fluorosis terbesar terjadi pada masyarakat yang bertempat tinggal di daerah yang tanahnya mengandung Fluorofosfat dengan kadar tinggi atau dekat dengan pabrik yang mengakibatkan pencemaran fluorida pada lingkungan (Makfoeld *et al.*, 2002). Sedangkan, skeletal fluorosis terjadi karena tingginya paparan fluorida dapat mengakibatkan kalsifikasi ligamen dan tendon, serta kelainan bentuk tulang yang parah (Fawell *et al.*, 2006).

Berdasarkan penemuan Shivarajashankara *et al.* (2001) didapati bahwa fluor menyebabkan disfungsi neuronal dan cedera pada sinap dengan mekanisme yang melibatkan produksi radikal bebas dan peroksidasi lipid. Selain itu, penelitian oleh Lu *et al.* (2000) di China juga mengkaji mengenai efek kadar fluor yang tinggi didalam air minum terhadap IQ anak-anak telah menunjukkan hasil

yang signifikan yaitu anak-anak yang minum air yang kadar fluornya tinggi mempunyai IQ yang lebih rendah berbanding anak-anak yang minum air dengan kandungan fluor yang rendah.

2.2 Metabolisme Fluor

2.2.1 Metabolisme Absorpsi pada Fluorida

Sekitar 75-90% dari fluorida yang diserap akan dicerna. Dalam asam lambung, fluorida akan diubah menjadi hidrogen fluorida (HF) dan sampai sekitar 40% fluorida yang tertelan akan diserap oleh lambung sebagai HF, pH lambung yang tinggi akan mengurangi penyerapan lambung dengan cara menurunkan penyerapan konsentrasi HF. Fluorida yang tidak diserap dalam lambung akan diserap dalam usus dan dipengaruhi oleh pH disekitar (Whitford, 1997; IPCS, 2002; WHO, 2006).

2.2.2 Metabolisme Distribusi pada Fluorida

Setelah diabsorpsi ke dalam darah, fluorida didistribusikan secara cepat ke seluruh tubuh dan hingga 99% fluorida bertahan pada daerah yang kaya kalsium seperti tulang dan gigi (dentin dan enamel). Pada bayi, sekitar 80-90% dari fluorida yang diabsorpsi akan tersimpan namun pada orang dewasa hanya sekitar 60% fluorida dapat menembus plasenta dan juga ditemukan pada ASI dengan kadar rendah (Fawell *et al.*, 2006). Tingkatan fluorida yang dapat ditemukan di tulang bervariasi tergantung usia, jenis kelamin dan individu. Tulang yang memiliki kandungan fluorida akan dianggap sebagai refleksi dari paparan jangka panjang fluorida (IPCS, 2002).

2.2.3 Metabolisme Ekskresi pada Fluorida

Tiga jalan utama pengeluaran fluorida dari tubuh ialah melalui urin, tinja, dan keringat. Kebanyakan fluor di ekskresi lewat urin, sebagian kecil di ekskresi lewat keringat. Ekskresi fluor dalam jumlah sangat kecil dapat terjadi lewat susu, air ludah dan cairan air mata. Dalam usus adanya ion kalsium, magnesium, aluminium dapat mengganggu penyerapan fluor karena akan membentuk

senyawa tidak dapat larut (Widjijono, 2001). Senyawa fluorida yang tidak dapat larut dan tidak bisa diserap di saluran cerna akan dikeluarkan dalam keadaan tidak berubah yaitu melalui tinja (Andajani, 1995).

2.3 Teori Pergerakan Gigi

Menurut Adilah *et al.* (2010) bahwa ada dua teori yang menerangkan tentang pergerakan gigi ortodonti. Teori yang pertama berkaitan dengan aliran listrik dan teori yang kedua mengenai tekanan dan tarikan yang berhubungan dengan aliran darah dalam ligamen periodontal. Teori aliran listrik atau bioelektrik menghubungkan gerakan pada metabolisme tulang yang dikontrol oleh sinyal listrik yang dihasilkan oleh perubahan tulang alveolar. Sedangkan teori tekanan dan tarikan menghubungkan gerakan gigi pada perubahan seluler akibat produksi senyawa kimia yang disebabkan perubahan aliran darah pada ligamen periodontal. Tekanan atau tarikan pada ligamen periodontal akan mempengaruhi aliran darah.

Sinyal elektrik yang merangsang pergerakan gigi disebut *piezoelectric*. Bila suatu gaya diberikan pada gigi dan dapat menyebabkan pelengkungan tulang, maka sinyal tersebut dapat terlihat. Bila matriks jaringan tulang mengalami distorsi karena pemberian tekanan, polaritas negatif dan positif akan terlihat di permukaan tulang. Aliran negatif akan menghasilkan osteoblas dan osteoklas akan memberikan respon terhadap aliran positif. Aposisi dan resorpsi akan terjadi sesuai dengan jenis listrik yang terjadi dan hasil akhir berupa remodeling tulang untuk mengantisipasi gaya mekanis yang dibebankan pada tulang. Teori tekanan dan tarikan dapat menerangkan proses terjadinya pergerakan gigi yang berhubungan dengan aliran darah. Aliran darah akan berkurang bila ligamen periodontal mendapat tekanan dan akan bertambah bila mendapat tarikan. Perubahan pada aliran darah akan mengubah keadaan kimia darah. Level oksigen akan berkurang pada daerah tekanan dan akan bertambah pada daerah tarikan. Proporsi relatif metabolit yang lain juga akan mengalami perubahan selama proses pergerakan gigi, perubahan seluler ini akan menyebabkan gigi dapat berpindah dari tempatnya. Perubahan kimia yang terjadi, bekerja secara langsung ataupun

secara tidak langsung dengan cara menstimulasi agen aktif yang lain sehingga terjadi diferensiasi dan aktivasi seluler. Pergerakan gigi dapat di bagi dalam 3 tahapan yaitu: (1) perubahan aliran darah akibat tekanan pada ligamen periodontal, (2) pembentukan dan pelepasan dari senyawa kimia, (3) aktivasi sel-sel (Adilah *et al.*, 2010).

2.4 Pergerakan Gigi Ortodonti

Pergerakan gigi terjadi sebagai akibat langsung dari remodeling jaringan di sekitar akar gigi oleh karena adanya gaya yang diberikan. Terjadinya remodeling tulang berawal dari sebuah keretakan mikro yang terjadi pada tulang akibat adanya suatu pembebanan misalnya aplikasi piranti ortodonti, trauma tulang yang kemudian merangsang sel osteosit untuk mensekresikan molekul bioaktif ke matriks ekstraseluler (Yi *et al.*, 2012). Remodeling memerlukan adanya sel-sel yang dapat meresorpsi dan membentuk matriks ekstraseluler dari ligamen periodontal dan tulang alveolar (Cardaropoli *et al.*, 2007).

Gigi-gigi dapat digerakan tanpa mengakibatkan kerusakan baik pada gigi-gigi tersebut maupun perlekatannya pada tulang apabila tekanan diberikan secara tepat. Tekanan yang diaplikasikan di mahkota akan diteruskan ke akar, ligamen periodontal, dan tulang alveolar yang mengakibatkan terbentuknya daerah tekanan dan daerah tarikan pada struktur pendukung gigi. Gigi dapat digerakkan jika terjadi proses resorpsi tulang di daerah tekanan sebagai respon terhadap gaya mekanis ortodonti, dan untuk mempertahankan mekanisme perlekatan gigi agar tetap erat harus diikuti proses aposisi tulang di daerah tarikan. Fenomena inilah yang disebut dengan remodeling tulang. Soket gigi seperti bergerak sejalan dengan pergerakan gigi pada tulang alveolar (Foster, 1999; Sartika *et al.*, 2013).

Daerah yang tertekan akan terjadi sesuai dengan arah kekuatan yang dikenakan, kekuatan akan menekan gigi ke dinding tulang alveolus dan membrana periodontalis akan terjepit diantara gigi dan dinding alveolus. Daerah yang berlawanan, gigi akan menjauhi dinding alveolus. Melebarnya ruang membrana periodontalis akan menimbulkan tarikan di daerah itu (Ardhana, 2010). Mekanisme biologi molekular pada tekanan mekanik yang diterima gigi pada

perawatan ortodonti ditandai dengan adanya proses inflamasi pada jaringan periodontal. Mediator inflamasi akan memicu proses biologi sehubungan dengan resorpsi dan aposisi tulang alveolar. Mekanisme biologis yang menstimulasi resorpsi tulang alveolar secara fisiologis berhubungan dengan sitokin. Sitokin merupakan suatu kumpulan mediator untuk kerusakan jaringan, dan berperan penting dalam pergerakan gigi ortodonti (Henneman *et al.*, 2008; Kaya *et al.*, 2010). Tekanan mekanik juga mengaktifasi sel radang terutama makrofag dan neutrofil sehingga menghasilkan berbagai mediator kimiawi antara lain: *Prostaglandins*, *Interleukin-1*, *Interleukin-6*, *tumor necrosis factor-alpha* dan diferensiasi osteoklas oleh *receptor activator of nuclear factor kappa β ligand* serta *Osteoprotegerin* yang dapat diidentifikasi pada pemeriksaan *Gingival Crevicular Fluid* (Krishnan dan Davidovitch, 2009; Nayak, 2013). Selanjutnya merangsang terjadinya resorpsi tulang alveolar (Narmada, 2010).

Resorpsi tulang ditandai dengan peningkatan aktifitas osteoklas yang dikendalikan oleh sitokin yaitu: IL-1, IL-6 dan TNF α yang menstimulasi osteoklastogenesis dalam meresorpsi tulang melalui RANKL, RANK dan OPG (Andrade *et al.*, 2011; Lerner, 2012). RANK yang apabila berikatan dengan RANKL pada prekursor osteoklas, maka terjadi diferensiasi pre-osteoklas menjadi osteoklas. Interaksi antara RANK dan RANKL ini dapat dihambat oleh OPG (Fracon *et al.*, 2008). OPG adalah inhibitor alami untuk menghambat ikatan RANKL dengan RANK. Reseptor RANK terdapat pada preosteoklas maupun pada osteoklas. OPG merupakan pecahan dari TNF *receptor-like molecule* dengan bertindak sebagai perangkap dan memblokir ikatan RANKL dan RANK mencegah osteoklastogenesis. OPG diproduksi oleh sel-sel ligamen periodontal, fibroblas gingiva dan sel-sel epitel dan ekspresi OPG di modulasi oleh sitokin inflamasi. Hambatan ikatan RANKL dengan RANK oleh OPG dapat memicu apoptosis dari osteoklas sehingga menurunkan proses resorpsi tulang (Bartold *et al.*, 2010). Setelah proses resorpsi berjalan, sebagai respon terhadap sistem homeostasis tulang, maka di daerah tarikan ada peningkatan proliferasi sel fibroblas, osteoblas, dan sel perkusor sementoblas. Pada daerah tarikan juga

ditemukan beberapa sel inhibitor resorpsi tulang dan sel stimulator pembentukan tulang (Ruth, 2010).

2.5 Relaps

Menurut *British Standard Institute Relaps* adalah kembali ke bentuk awal maloklusi setelah dikoreksi. Menurut Moyers *relaps* adalah suatu istilah yang digunakan pada suatu keadaan hilangnya koreksi yang telah dicapai dalam perawatan ortodonti. *Relaps* dalam perawatan ortodontik merupakan masalah yang kompleks dengan banyak faktor yang berpotensi mempengaruhi hasil perawatan. Beberapa literature menyatakan bahwa stabilitas dan *relaps* setelah perawatan ortodontik tidak dapat diprediksi, dengan kecenderungan *relaps* 33-90% setelah kira kira 10 tahun paska perawatan (Olive dan Basford, 2003). Penyebab detail *relaps* belum diketahui karena merupakan suatu proses yang kompleks. Faktor-faktor yang diduga sebagai penyebab *Relaps* yaitu:

1. Kegagalan dalam menghilangkan penyebab maloklusi.
2. Diagnosis yang tidak tepat dan kegagalan menyusun rencana perawatan yang baik.
3. Interdigitasi cups yang kurang normal.
4. Ekspansi rahang ke arah lateral dan / atau anterior
5. Ukuran rahang dan harmoni yang tidak tepat.
6. Inklinasi aksial yang tidak tepat.
7. Gagal mengontrol rotasi.
8. Kontak yang tidak baik.
9. Disharmoni ukuran gigi

Beberapa faktor yang dapat menyebabkan *relaps* menurut Bhalajhi (2001) antara lain:

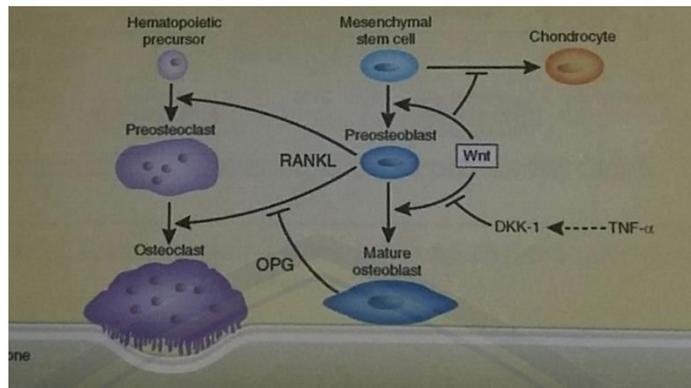
1. Tarikan pada ligamen periodontal
2. *Relaps* karena perubahan pertumbuhan
3. Adaptasi tulang
4. Tekanan otot
5. Kegagalan menghilangkan faktor penyebab

6. Peranan gigi molar ketiga
7. Peranan oklusi

2.6 Osteoprotegerin (OPG)

OPG merupakan protein yang melindungi tulang dari penyerapan. Nama lainnya adalah OCIF (*Osteoclastogenesis Inhibiting Factor*). OPG merupakan anggota superfamili TNF yang berfungsi sebagai reseptor umpan (*decoy receptor*) terhadap RANKL. OPG berkompetisi dengan reseptor RANK yang terdapat pada membran osteoklas sehingga tidak membentuk ikatan RANK-RANKL (Menezes, *et al.*, 2006; Nayak *et al.*, 2013).

OPG ditemukan dalam organ paru-paru, jantung, hati, ginjal, timus, kelenjar getah bening, dan sintesis oleh beberapa sel termasuk sel-sel stroma, osteoblas, sel otot polos pembuluh darah, limfosit B, limfosit T, serta kondrosit artikular. OPG merupakan glikoprotein yang dibentuk oleh osteoblas dan dihasilkan oleh berbagai macam sel dan menghambat diferensiasi osteoklas dan prekusornya. OPG bertindak sebagai reseptor RANKL yang bersaing dengan RANK untuk menghindari interaksi dengan RANK, dengan demikian terjadi penghambatan osteoklastogenesis. OPG menghambat aktivitas osteoklas, dengan cara berikatan langsung pada RANKL, melalui interaksi dengan reseptor masih dalam tahap awal pembentukan osteoklas. Efek biologis dari OPG pada sel tulang sebagai penghambatan, tahap terminal dari diferensiasi osteoklas, penekanan aktivasi osteoklas dewasa dan apoptosis. Ekspresi OPG diatur dalam osteoblas oleh berbagai sitokin, hormon dan faktor pertumbuhan dan oleh Wnt yang juga mengatur pembentukan tulang (Huang *et al.*, 2014; Menezes *et al.*, 2006).



Gambar 2.1 Proses Osteoklastogenesis (Sumber: Murray, 2006)

2.7 Sel Osteoblas

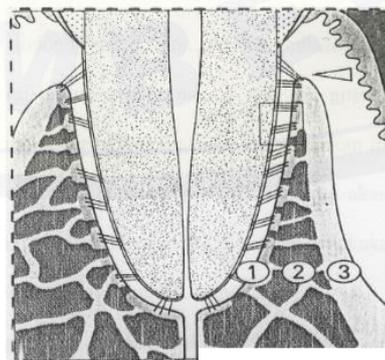
Osteoblas adalah sel mononuklear yang berasal dari sel mesenkim yang mensintesis protein matriks tulang kolagenous dan nonkolagenous. Deposisi komponen anorganik dari tulang juga bergantung pada adanya osteoblas aktif. Osteoblas hanya terdapat pada permukaan tulang, dan letaknya bersebelahan mirip epitel selapis. Bila osteoblas aktif mensintesis matriks, osteoblas memiliki bentuk kuboid sampai silindris dengan sitoplasma basofilik. Bila aktivitas sintesisnya menurun sel tersebut menjadi gepeng dan sifat basofilik pada sitoplasmanya akan berkurang (Junqueira dan Carneiro, 2007). Pada tulang normal, dimana lapisan osteoblas menyelimuti permukaan tulang ini berbentuk kuboid, datar dan saling berdekatan yang menyebabkan sel osteoblas sering disebut *bone lining cells* (Hand, 2015).

Osteoblas berfungsi untuk mensintesis komponen organik dari matriks tulang (kolagen tipe I, proteoglikan dan glikoprotein) mengendapkan unsur organik matriks tulang baru yang disebut osteoid. Osteoid adalah matriks tulang yang belum terkalsifikasi serta belum mengandung mineral namun tidak lama setelah deposisi osteoid akan segera mengalami mineralisasi dan menjadi tulang (Guyton dan Hall, 2012). Sel osteoblas juga mempunyai respon terhadap faktor pertumbuhan dan sitokin (Kini dan Nandeesh, 2012).

2.8 Tulang Alveolar

Tulang alveolar merupakan bagian dari tulang mandibula dan maksila sebagai dasar struktur pendukung gigi. Tulang alveolar berasal dari sel-sel folikel gigi dan tulang membranous yang terbentuk langsung di jaringan ikat (Sodeket *et al.*, 2000). Tulang alveolar terbentuk pada saat gigi erupsi untuk menyediakan perlekatan tulang pada ligamen. Tulang alveolar dapat dibagi menjadi daerah yang terpisah dari basis anatomi, tetapi fungsinya merupakan satu kesatuan dengan semua bagian yang saling berhubungan diantara jaringan pendukung gigi. Tulang alveolar menurut Carranza (2002) terdiri dari :

1. Keping kortikal eksternal yang dibentuk oleh tulang *Haver's* dan lamella tulang *compact*. Keping kortikal eksternal menutupi tulang alveolar dan lebih tipis pada bagian fasial. Keping kortikal eksternal berjalan miring ke arah koronal untuk bergabung dengan tulang alveolar sejati dan membentuk dinding alveolar dengan ketebalan sekitar 0,1-0,4 mm. Dinding alveolar dilalui oleh pembuluh darah dan pembuluh lymph serta saraf yang masuk ke dalam ruang periodontal melalui sejumlah kanal kecil (Kanal Volkmann).
2. Dinding soket yang tipis pada bagian dalam tulang *compact* disebut tulang alveolar sejati.
3. Trabekula *cancellous* berada diantara lapisan tulang *compact* dan tulang alveolar sejati. Septum interdental terdiri dari trabekula *cancellous* yang mendukung tulang dan menutupi bagian dalam *border* tulang *compact*.



Gambar 2.2 Struktur tulang alveolar : 1. Tulang alveolar sejati, 2. Trabekula tulang, dan 3. Keping kortikal eksternal (Sumber: Klaus *et al.*, 1989)

Tulang alveolar terdiri dari komponen seluler dan ekstraseluler yang terdiri dari matriks kolagen dan non-kolagen. Komponen seluler terdiri dari osteoblas, osteosit, dan osteoklas. Osteoblas merupakan sel berbentuk kuboid sebagai sel pembentuk tulang pada permukaan tulang. Osteosit adalah sel osteoblas yang telah tertanam dalam matriks tulang yang menempati lacuna. Osteoklas merupakan sel multinukleus yang bertanggung jawab dalam meresorpsi tulang. Diferensiasi osteoklas diatur oleh molekul *membrane-bound* yang diekspresikan oleh osteoblas dan sel stroma. Komposisi dari matriks ekstraseluler dari tulang alveolar sama dengan komponen pada tulang lainnya (Niinomi *et al.*, 2014).

Substansi interstisial tulang terdiri atas dua komponen utama, matriks organik 35% (kolagen yang merupakan 90% dari bagian organik matriks tulang, terutama tipe-1) dan garam-garam anorganik 65% dari berat keringnya. Matriks organik terdiri atas serat-serat kolagen yang terbenam dalam substansi dasar kaya proteoglikan (Bloom dan Fawcett, 2002). Komponen anorganik tulang adalah kristal karbon hidroksiapatit $(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Pembentukan dan remodeling tulang merupakan mekanisme yang mengatur pertumbuhan dan perkembangan dari jaringan tulang (Niinomi *et al.*, 2014).

2.9 Proses Remodeling Tulang

Remodeling tulang yang terjadi selama pergerakan gigi ortodonti adalah proses biologis yang melibatkan respon inflamasi akut pada jaringan periodontal. Penelitian histologis menunjukkan bahwa tahap pertama resorpsi terjadi dalam 3-5 hari diikuti dengan pemulihan dalam 5-7 hari. Hal ini diikuti oleh tahap akhir remodeling tulang antara 7 dan 14 hari (Alfaqeeh *et al.*, 2011). Remodeling adalah proses regenerasi yang terjadi secara terus menerus dengan mengganti tulang yang lama (*old bone*) dengan tulang yang baru (*new bone*) (Monologas, 2000).

Proses remodeling meliputi dua aktivitas yaitu: proses pembongkaran tulang (*bone resorption*) yang diikuti oleh proses pembentukan tulang baru (*bone formation*), proses yang pertama dikenal sebagai aktivitas osteoklas sedang yang

kedua dikenal sebagai aktivitas osteoblas (Murray, 2003). Proses remodeling melibatkan dua sel utama yaitu osteoblas dan osteoklas, dan kedua sel tersebut berasal dari sumsum tulang (*bone marrow*) (Raisz, 1999; Monologas, 2000). Proses remodeling tulang ini terjadi karena adanya kerjasama antara mediator-mediator. Dalam proses remodeling ini mediator yang terlibat antara lain sel osteoklas, osteoblas, RANK, dan OPG (osteoprotegerin). Dimana osteoklas merupakan satu-satunya sel yang mampu menyerap tulang yang berasal dari penyatuan sel-sel progenitor homopoietik atau darah yang termasuk turunan makrofag mononuklearis-monosit di sumsum tulang. Sedangkan sel osteoblas dirangsang untuk memperbaharui tulang dengan meningkatkan massa tulang melalui peningkatan sekresi osteosit dan menghambat osteoklas untuk meresorpsi tulang. Peningkatan osteosit ini dirangsang oleh sekresi hormon pertumbuhan oleh hipofisis, hormon tiroid, hormon esterogen dan hormon androgen (Kini dan Nandeesh, 2012).

Hubungan osteoklas dan osteoblas dalam remodeling tulang dikendalikan oleh sejumlah faktor kimia baik secara sistemik maupun lokal. Secara sistemik terdapat beberapa hal yang dapat mempengaruhi proses remodeling tulang seperti faktor genetik, aliran darah, nutrisi, serta faktor hormonal. Faktor hormonal ini meliputi hormon kalsitonin dan esterogen untuk menurunkan resorpsi tulang, hormon paratiroid, hormon tiroid, glukokortikoid untuk meningkatkan regulasi dalam meresorpsi tulang. Dalam proses pembentukan tulang dapat meningkat dengan adanya hormon pertumbuhan, vitamin D, androgen, progesteron dan insulin, sedangkan glukokortikoid selain dapat merangsang peningkatan resorpsi tulang yang juga dapat menurunkan proses pembentukan tulang baru (Kini dan Nandeesh, 2012).

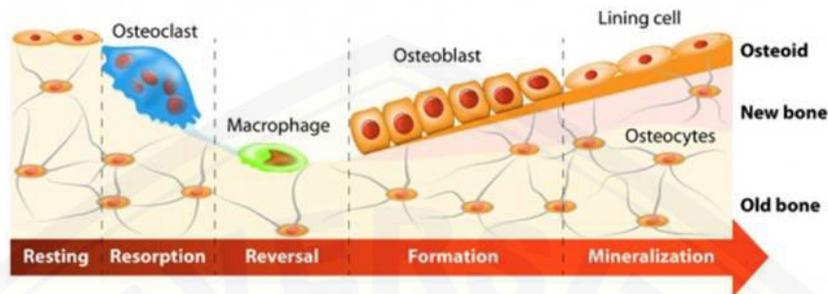
Faktor lokal yang mengatur proses remodeling tulang ini ada sitokin dan faktor pertumbuhan. Dimana sitokin merupakan polipeptida yang disintesis dalam sel limfosit dan monosit. Sitokin ini berperan penting dalam beberapa fungsi seluler, seperti respon imunologi, peradangan, dan hematopoiesis. Faktor pertumbuhan merupakan polipeptida yang dihasilkan oleh sel tulang itu sendiri atau di jaringan ekstraoseus yang bertindak sebagai modulator dari fungsi seluler,

diferensiasi, proliferasi dalam pertumbuhan (Kini dan Nandeesh, 2012).

Raisz (1999) dan Monologas (1995) menyatakan bahwa proses remodeling tulang merupakan suatu siklus yang meliputi tahapan yang kompleks yaitu:

1. Tahap aktivasi (*activation phase*) adalah tahap interaksi antara prekursor osteoblas dan osteoklas, kemudian terjadi proses diferensiasi, migrasi, dan fusi multinucleated osteoclast dan osteoklas yang terbentuk kemudian akan melekat pada permukaan matrik tulang dan akan dimulai tahap berikutnya yaitu tahap resorpsi. Sebelum migrasi ke matrik tulang osteoklas tersebut akan melewati sederetan *lining* sel osteoblas pada permukaan tulang untuk dapat mengeluarkan enzim proteolitik. Interaksi sel antara *stromal cell* (sel stroma) dan *hematopoietik cell* (sel hematopoietik) menjadi faktor penentu perkembangan osteoklas. Perkembangan osteoklas dari prekursor hematopoietik tidak bisa diselesaikan jika tidak ada kehadiran sel stroma. Oleh karena itu hormon sistemik dan lokal yang mempengaruhi perkembangan osteoklas disediakan oleh *stromal-osteoblastic lineage* (sel stroma).
2. Tahap resorpsi (*resorption phase*) adalah tahap pada waktu osteoklas akan mensekresi ion hydrogen dan enzim lisosom terutama *cathepsin K* dan akan mendegradasi seluruh komponen matriks tulang termasuk kolagen. Setelah terjadi resorpsi maka osteoklas akan membentuk lekukan atau cekungan tidak teratur yang biasa disebut *lakuna howship* pada tulang trabekular dan saluran haversian pada tulang kortikal.
3. Tahap reversal (*reversal phase*), adalah tahap pada waktu permukaan tulang sementara tidak didapatkan adanya sel kecuali beberapa sel mononuclear yakni makrofag, kemudian akan terjadi degradasi kolagen lebih lanjut dan terjadi deposisi *proteoglycan* untuk membentuk *coment line* yang akan melepaskan faktor pertumbuhan untuk dimulainya tahap formasi.
4. Tahap formasi (*formation phase*), adalah tahap pada waktu terjadi proliferasi dan diferensiasi prekursor osteoblas yang dilanjutkan dengan pembentukan matrik tulang yang baru dan akan mengalami mineralisasi.

Tahap formasi akan berakhir ketika defek (cekungan) yang dibentuk oleh osteoklas telah diisi. Proses remodeling tersebut secara skematis disajikan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Tahapan Proses Remodeling Tulang (Sumber: Ammerman, 2017)

Berdasarkan uraian diatas dapat disimpulkan bahwa proses remodeling adalah aktivitas yang meliputi pembentukan tulang dan resorpsi tulang. Faktor pengatur pembentukan dan resorpsi tulang dilaksanakan melalui dua proses yang selalu berada dalam keadaan seimbang yang disebut *coupling*. Proses *coupling* ini memungkinkan aktivitas pembentukan tulang sebanding dengan resorpsi tulang (Raisz, 1999).

2.10 Deteksi Bahan Aktif Dengan Metode *Immunohistochemistry* (IHC)

Immunohistochemistry (IHC) merupakan gabungan histologi/sitologi dan imunologi. IHC adalah suatu metode pewarnaan substansi/bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti-bahan aktif tersebut yang disebut antibodi. Hasil reaksi antigen dan antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen karena antibodi diikat oleh suatu penanda yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut di dalam jaringan. IHC ini biasanya digunakan untuk penelitian dasar dalam rangka mengetahui distribusi dan lokasi biomarker ataupun protein terekspresi pada berbagai macam jaringan pada tubuh. Pengamatan IHC dilakukan dengan menggunakan mikroskop optik maupun mikroskop elektron. Dengan menggunakan mikroskop optik, keberadaan antigen di dalam sel dapat dideteksi,

baik di dalam sitoplasma, inti sel dan axon pada sel-sel syaraf, juga pada jaringan ekstraseluler. Oleh karena itu, IHC sangat sesuai dipergunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu bahan aktif di dalam jaringan, sel-sel mana saja yang menghasilkan, juga dapat mendeteksi dimana bahan aktif tersebut diakumulasikan. Selain dapat mendeteksi dan melokalisasi bahan-bahan aktif tersebut, sekaligus dapat memperlihatkan keadaan jaringan di tempat keberadaan bahan aktif tersebut secara utuh (Nurhidayat, 2002).

2.10.1 Antibodi

Antibodi adalah pusat dari teknik IHC dalam deteksi suatu bahan aktif. Molekul antibodi berbentuk seperti huruf Y, dimana dua tangannya mempunyai sisi ikat dari antibodi yaitu Fab. Antibodi monoklonal adalah suatu antibodi yang murni mengandung satu jenis antibodi untuk satu sisi antigenik (epitop) yang khas dari antigen tersebut. Antibodi monoklonal biasa dipergunakan untuk reagen diagnostik dan untuk keperluan penelitian IHC dengan spesifitas yang sempit, sehingga tidak memungkinkan terjadinya reaksi silang dengan antigen yang lain. Jenis antibodi ini mempunyai spesifitas yang tinggi karena hanya akan mengikat satu epitop saja dari antigen tersebut, sehingga penggunaan antibodi monoklonal ini sangat rawan terhadap kehilangan epitop pada antigen yang akan diikat. Proses fiksasi preparat, yang umumnya menggunakan formalin dapat mempengaruhi keberadaan epitop yang dapat bereaksi dengan antibodi tersebut, sehingga bila epitop yang spesifik terhadap antibodi tersebut hilang karena proses fiksasi, maka ikatan antara antibodi dan antigen tidak dapat terjadi. Biasanya penggunaan antibodi monoklonal untuk pewarnaan IHC, titer antibodi yang digunakan lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan antibodi poliklonal (Nurhidayat, 2002).

Sedangkan antibodi poliklonal mempunyai spesifitas yang lebih rendah dibandingkan dengan antibodi monoklonal, namun afinitasnya dalam berikatan dengan antigen lebih tinggi. Antibodi poliklonal merupakan campuran antibodi-antibodi yang berasal dari beberapa epitop spesifik dari suatu antigen, sehingga antibodi ini lebih toleran terhadap kehilangan satu atau lebih epitop spesifik akibat proses yang dilalui oleh preparat tersebut. Ikatan antara antigen dan antibodi masih mungkin terjadi dengan epitop yang masih tersisa pada antigen tersebut.

Proses pembuatan antibodi poliklonal ini relatif lebih mudah dan murah dibandingkan dengan antibodi monoklonal, dan umumnya lebih stabil terhadap perubahan pH dari medianya. Namun, karena antibodi poliklonal ini berasal dari beberapa epitop spesifik dari antigen maka kemungkinan terjadinya reaksi silang dengan antigen lain tetap ada, hal ini bertolak belakang dengan antibodi monoklonal, dimana antibodi ini tidak memungkinkan terjadinya reaksi silang dengan antigen yang lain (Nurhidayat, 2002).

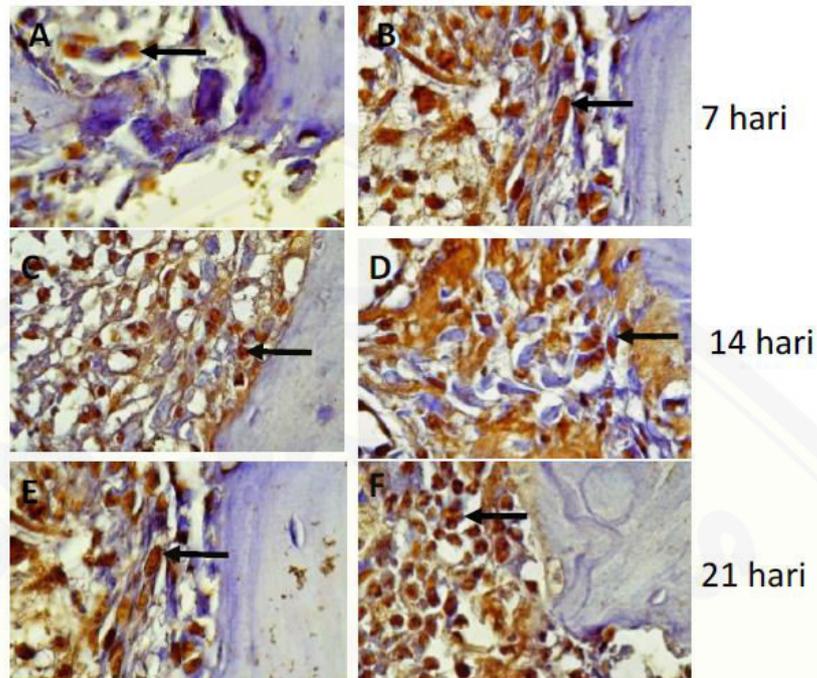
2.10.2 Kromogen

Kromogen adalah suatu zat yang dapat mem-visualisasikan substansi penanda pada ikatan immunokompleks pada pewarnaan IHC. Zat ini biasanya dicampurkan dengan substrat dari enzim penanda sebelum digunakan. Diantara banyak kromogen, DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) adalah kromogen yang paling banyak digunakan. Kromogen ini dapat mem-visualisasikan warna coklat pada penggunaan penanda peroksidase. Kromogen ini juga mempunyai ikatan yang sangat kuat dengan peroksida, sehingga dengan proses dehidrasi dan *clearing* tidak akan mengalami perubahan warna. Tetapi kromogen ini memiliki sifat karsinogenik, untuk itu perlu hati-hati dalam penggunaannya. Zat kromogen lain adalah *3-amino-9-ethylcarbazol* yang memberikan kesan warna merah, sedangkan *4-chloro-1-naphtol* memberikan kesan warna biru tua (Nurhidayat, 2002).

2.10.3 Counterstain

Counterstain ini bertujuan untuk mem-visualisasikan detil jaringan selain bagian yang terwarnai secara IHC. Jika bagian sitoplasma sel yang terwarnai dengan IHC, maka inti sel yang perlu di-*counterstain*, *haematoxilin* biasa digunakan untuk mewarnai inti sel. Sedangkan bila bagian sel yang terwarnai dengan IHC adalah inti sel, maka yang perlu di-*counterstain* adalah sitoplasmanya. Dengan demikian, pewarnaan IHC yang disertai dengan *counterstain* dapat menunjukkan detil lokasi immunopositif disertai detil jaringan sekitarnya (Nurhidayat, 2002).

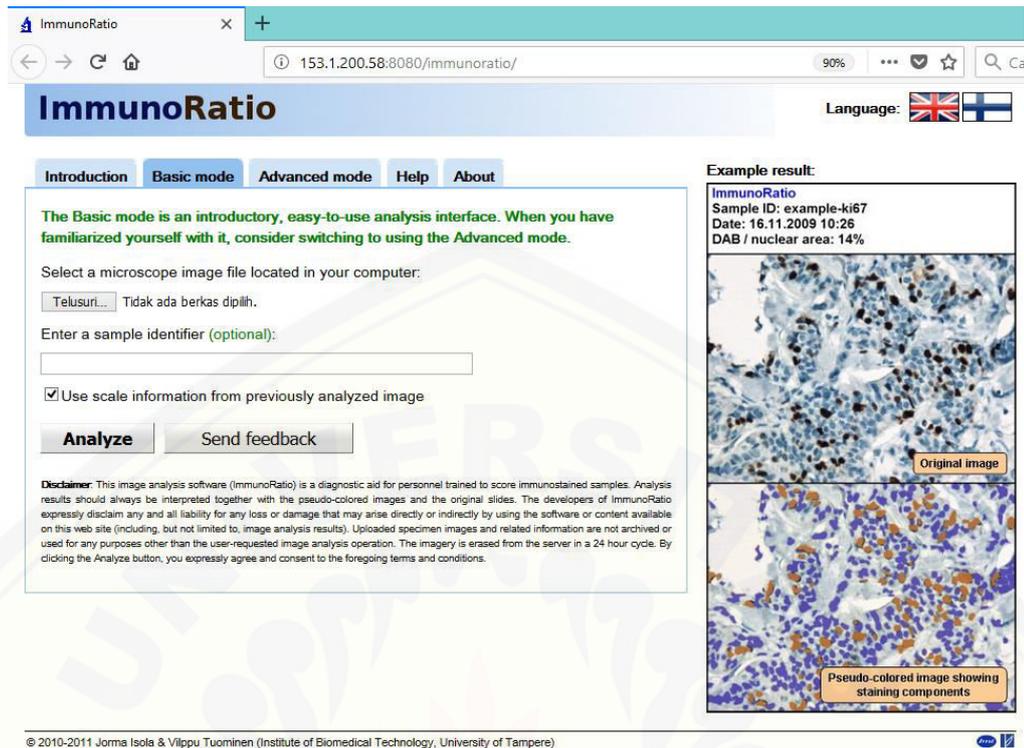
2.11 Gambaran Histologi Sel Osteoblas Jaringan Periodontal dengan Pewarnaan IHC



Gambar 2.4 *Immunostaining* OPG pada tulang alveolar di daerah tarikan pergerakan gigi ortodonti hari ke-7, 14, dan 21. Sel osteoblas jaringan periodontal (berwarna kecoklatan pada panah) di masing-masing kelompok A-E (perbesaran 400x) (Sumber: Indriana, 2016)

2.12 *ImmunoRatio* (IRS)

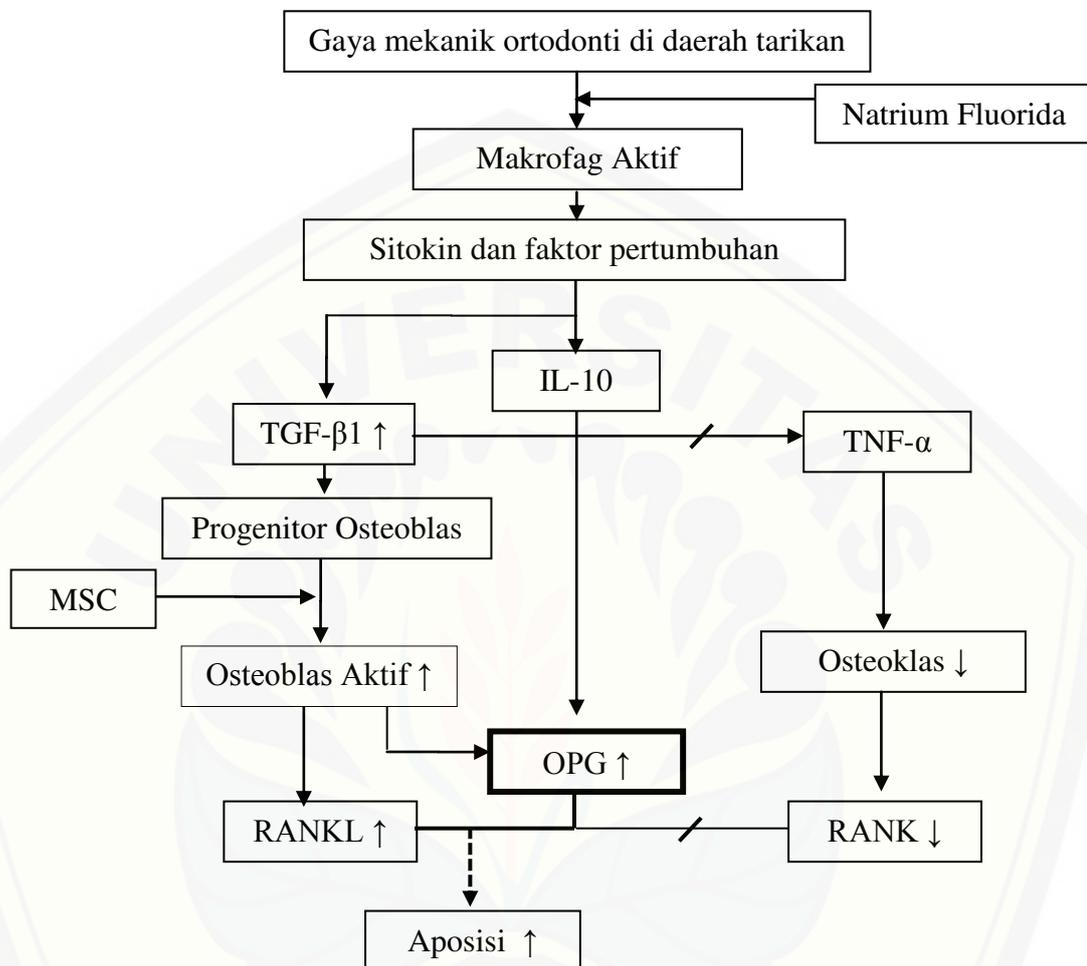
ImmunoRatio adalah suatu metode analisis yang dapat diterapkan pada pewarnaan *Immunohistochemistry* (IHC), dimana melalui analisis IRS ini dapat diketahui ekspresi marker tertentu sesuai keinginan peneliti melalui warna coklat yang terlihat saat dilakukan identifikasi preparat IHC. IRS ini dapat digunakan secara bebas dengan cara *online* melalui internet (Gambar 2.5). Selain itu IRS juga dapat diakses *offline* sebagai *plugin* dari perangkat lunak pengolahan citra ImageJ 1.46 yang merupakan perangkat lunak pengolahan citra yang dapat digunakan oleh semua sistem operasi komputer (Ferreira T A dan Rasband W, 2012).



Gambar 2.5 Tampilan *ImmunoRatio* secara online

Namun metode IRS ini memiliki kekurangan yaitu bila pewarnaan IHC tidak homogen maka akan terjadi bias pada perhitungan marker yang diinginkan. Selain pewarnaan yang tidak homogen, adanya artefak-artefak yang terbentuk akibat pewarnaan yang tidak baik juga dapat mempengaruhi hasil perhitungan IRS. Maka dari itu, dalam melakukan pewarnaan IHC harus dilakukan dengan metode yang benar agar warna dapat homogen serta menghindari terbentuknya artefak yang dapat mengganggu keakuratan saat dilakukan analisis dengan *ImmunoRatio* (Fedchecenko N dan Reifenrath, 2014).

2.13 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

: Parameter yang diperiksa

—/— : Menghambat

- - - - - : Tidak dibahas secara mendalam

Gambar 2.6 Skema kerangka konsep

2.14 Hipotesis

Natrium Fluorida (NaF) secara topikal dapat meningkatkan ekspresi OPG pada daerah tarikan tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Penelitian jenis ini merupakan suatu penelitian yang bertujuan untuk mencari hubungan sebab akibat dengan memanipulasi atau mengintervensi variabel dalam satu atau lebih kelompok dan mengendalikan faktor yang dapat mempengaruhi hubungan sebab akibat, kemudian membandingkannya dengan kelompok kontrol yang tidak dilakukan perlakuan atau dimanipulasi (Notoatmodjo, 2010).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *randomized post test only control group design*, yaitu melakukan pengamatan atau pengukuran setelah dilakukan perlakuan dan hasilnya dibandingkan dengan kontrol (Notoatmodjo, 2010).

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

3.3.1 Tempat Penelitian

- a. Proses perlakuan hewan coba dilakukan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- b. Pembuatan gel Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm dilakukan di laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- c. Pembuatan preparat jaringan tulang alveolar dilakukan di laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- d. Pengecatan dengan metode *Immunohistochemistry* (IHC) dan perhitungan jumlah ekspresi OPG dilakukan di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober-Februari 2018.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian adalah hewan coba tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan.

3.4.2 Sampel Penelitian

a. Kriteria Sampel Penelitian

Kriteria sampel dalam penelitian ini meliputi:

- 1) Tikus jenis Wistar (*Rattus norvegicus*)
- 2) Jenis kelamin jantan
- 3) Umur 3-4 bulan
- 4) Berat badan 200-250 gram
- 5) Kondisi sehat ditandai dengan gerakan yang aktif dari tikus dan tidak ada cacat fisik (Sutjiati, 2016).

b. Besar Sampel Penelitian

Besar sampel ditentukan berdasarkan jumlah ulangan yang dianggap telah cukup baik dengan menggunakan rumus (Daniel, 2005):

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

Keterangan :

n = jumlah sampel tiap kelompok

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

σ = Standar deviasi sampel

d = kesalahan yang masih dapat ditoleransi

Dengan asumsi bahwa kesalahan yang masih dapat diterima (σ) sama besar dengan (d) maka :

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

$$n \geq (1,96)^2$$

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan rumus diatas, diperoleh besar sampel setiap kelompok adalah 4 ekor tikus.

3.5 Identifikasi Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Natrium Fluorida secara topikal.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah OPG (*Osteoprotegerin*).

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah :

- a. Kriteria hewan coba meliputi umur, berat badan, jenis kelamin, jenis tikus.
- b. Pemeliharaan tikus selama masa adaptasi dan perlakuan meliputi pemberian makan dan minum, jenis makanan dan minuman yang diberikan dan kebersihan kandang.
- c. Gigi yang diamati dan arah pergerakan gigi.
- d. Cara pemberian dan dosis bahan perlakuan.
- e. Prosedur penelitian.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Natrium Fluorida

Natrium Fluorida adalah berupa bubuk Natrium Fluorida yang dibuat menjadi bentuk gel 11,75 ppm, diberikan secara topikal ke dalam sulkus gingiva tikus Wistar (Sutjiati, 2016).

3.6.2 Gaya mekanik ortodonti

Gaya mekanik ortodonti adalah besar kekuatan tekanan yang diberikan pada gigi insisif sentral untuk menggerakkan gigi insisif ke arah distal dengan *ni-*

ti closed coil spring dengan diameter 0,010 inch sebesar 10 gram/cm² yang diukur dengan menggunakan *tension gauge* (Sutjiati, 2016).

3.6.3 Ekspresi *Osteoprotegerin* (OPG)

Ekspresi *Osteoprotegerin* (OPG) adalah jumlah ekspresi pada daerah tarikan tulang alveolar melalui pewarnaan *Immunohistochemistry* (IHC) dan perhitungan menggunakan aplikasi *ImmunoRatio* (IRS) dengan perbesaran 400x. Hasil berupa persentase (%) berdasarkan perbandingan sel yang terwarnai coklat oleh DAB dengan total luas area seluruh lapang pandang.

3.7 Bahan dan Alat Penelitian

3.7.1 Bahan Penelitian

- a. Pakan standar hewan coba (Turbo, Indonesia) dan air minum
- b. Bubuk Natrium Fluorida
- c. Carbopol 1%, TEA 3%, dan propilen glikol 3%
- d. Semen Glass Ionomer Tipe IX (Fuji IX)
- e. Larutan *buffer* formalin 10% (Makmur Jaya, Indonesia)
- f. EDTA 10%
- g. Ketamin
- h. Xylazine
- i. Bahan *embedding*
- j. Paraffin
- k. Alkohol 100%, 95%, 80%, 75%, 70%
- l. Alkohol absolut (Novapharin, Indonesia)
- m. *Xylol*
- n. Akuades steril (Aditama Raya Farmino, Indonesia)
- o. Entellan
- p. *Blocking serum* (kit)
- q. *Diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB)
- r. *Hematoxyllin Eosin*
- s. Etanol

- t. *Phosphate buffer saline* (PBS) (pH 7,6)
- u. Asam nitrat, Asam sitrat, HCL, NaCl DAN NaOH
- v. Hidrogen peroksida 3%
- w. Antibodi primer OPG dan Antibodi sekunder biotin
- x. Bahan sterilisasi yaitu, kapas, *cotton bud*

3.7.2 Alat Penelitian

- a. Kandang peliharaan hewan coba
- b. Tempat makan dan tempat minum hewan coba
- c. Timbangan berat badan hewan coba (Camry EK 3650, China)
- d. Timbangan analitik
- e. Mortar dan alu
- f. Kotak kaca
- g. Gunting
- h. Tabung reaksi
- i. *Ni-ti closed coil spring*
- j. *Stainless steel ligature wire*
- k. *Tension gauge* (Ormco, Europa)
- l. *Disposable syringe* 1 ml (Onemed, Indonesia)
- m. Excavator, sonde setengah lingkaran, *scalpel*, *arteri clamp*, pinset
- n. Pot jaringan (Makmur Jaya, Indonesia)
- o. Mikromotor *contra angle low speed*
- p. *Diamond round bur* no.1 (Edents, Switzerland)
- q. Kuas, kertas saring, label identitas
- r. Mesin *processing* jaringan
- s. *Tissue cassette*
- t. *Block mould*
- u. Pisau mikrotom *Microtome Holder*
- v. *Waterbath*
- w. *Slide warmer*
- x. *Deck glass* dan *Object glass*

- y. Wadah baskom
- z. *Staining jar*
- aa. Mikroskop cahaya
- bb. Kamera mikroskop optilab

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Perijinan *Ethical Cleareance*

Sebelum penelitian, dilakukan pengurusan *ethical cleareance* di Komisi Etik dan Advokasi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.8.2 Persiapan hewan coba

Sebanyak 20 ekor tikus wistar jantan diadaptasikan dalam kandang selama 7 hari. Selama proses adaptasi, tikus diberi makanan standar dan diberi minum secara bebas setiap hari. Hal ini bertujuan untuk mengurangi stres hewan coba dan memperoleh keseragaman sebelum dilakukan penelitian (homogenitas) serta memenuhi kriteria penelitian.

3.8.3 Pembagian kelompok perlakuan

Hewan coba yang sudah diadaptasikan akan dikelompokkan menjadi 5 kelompok, yaitu:

- a. Kelompok A (4 ekor) merupakan kelompok tanpa induksi gaya mekanik ortodonti dan tanpa fluor.
- b. Kelompok B (4 ekor) merupakan kelompok yang diberi induksi gaya mekanik ortodonti selama 7 hari.
- c. Kelompok C (4 ekor) merupakan kelompok yang diberi induksi gaya mekanik ortodonti selama 14 hari.
- d. Kelompok D (4 ekor) merupakan kelompok yang diberi induksi gaya mekanik ortodonti dan fluor selama 7 hari.
- e. Kelompok E (4 ekor) merupakan kelompok yang diberi induksi gaya mekanik ortodonti dan fluor selama 14 hari.

3.8.4 Persiapan gel Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm

Natrium Fluorida (NaF) diperoleh dalam bentuk bubuk berwarna putih yang diproses menjadi bentuk gel di laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember. Dosis Natrium Fluorida yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 11,75 ppm. Sediaan fluor sebesar 11,75 ppm merupakan sediaan fluor yang tidak mengakibatkan apoptosis sel (Sutjiati, 2016). Pembuatan gel dilakukan dengan cara dicampurkan NaF sebanyak 11,75 mg, carbopol sebanyak 1%, TEA sebanyak 3%, dan propilen glikol sebanyak 3% dalam 1 liter aquades steril menggunakan mortar dan alu.

3.8.5 Perlakuan hewan coba

a. Pemasangan *coil spring*

- 1) Selama prosedur pemasangan dan aktivasi *ni-ti closed coil spring*, dilakukan injeksi intramuskuler. Bahan anastesi yang digunakan berupa campuran ketamin dan xylazine. Ketamin dan xylazine sebesar 0,15 – 0,18 ml.
- 2) Sebelum dipasang kekuatan *ni-ti closed coil spring* diukur dengan menggunakan *tension gauge* untuk menghasilkan kekuatan sebesar 10 gr/cm².
- 3) Sebuah *ni-ti closed coil spring* diletakkan di antara gigi insisif sentral rahang atas dan molar pertama kiri rahang atas untuk menggerakkan insisif ke arah distal. Piranti ini difiksasi dengan 0,1 mm *stainless steel ligature wire* yang dipasang mengelilingi gigi insisif sentral rahang atas melalui sebuah lubang yang dibuat dengan *round bur* pada sisi disto vertical dengan 0,1 mm *stainless steel ligature wire* yang dipasang mengelilingi gigi molar pertama kiri rahang atas. Untuk meningkatkan retensi, diaplikasikan *glass ionomer cement* (Sella, 2012).



Gambar 3.1 Pemasangan *closed coil spring* (Sumber: Seifi *et al.*, 2013)

- b. Hewan coba pada kelompok D dan E, hewan coba diberikan gel NaF 11,75 ppm secara topikal ke dalam sulkus gingiva dengan *syringe* modifikasi sebanyak 0,5 ml dua kali sehari yaitu, saat pagi dan sore hari.

3.8.6 *Euthanasia* hewan coba

- a. Hewan coba kelompok A, B dan D dikorbankan pada hari ke-8 dan kelompok C dan E dikorbankan pada hari ke-15, sebanyak 4 ekor tikus dari tiap kelompok dilakukan *euthanasia*.
- b. *Euthanasia* hewan coba dilakukan dengan menggunakan injeksi ketamin over dosis secara intramuskular.
- c. Rahang atas dipotong dengan melakukan insisi mulai dari sudut mulut ke sudut mulut sampai rahang atas terlepas dari rahang bawah.

3.8.7 Pembuatan preparat jaringan

Tahap pemrosesan jaringan menurut Syafriadi *et al.* (2008) adalah sebagai berikut:

- a. Pengambilan sampel sediaan

Pemotongan rahang atas dengan menggunakan *knable* tang, gunting dan *scalpel*. Pemotongan jaringan ini dilakukan di atas papan gabus. Jaringan yang diambil untuk penelitian harus segar artinya, jaringan diambil secepat mungkin setelah hewan coba di *euthanasia* (Muntiha, 2001). Jaringan difiksasi dengan menggunakan larutan *buffer* formalin 10% selama 24 jam untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi dan mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Setelah difiksasi jaringan

dicuci dengan air mengalir selama 1,5 jam untuk menghilangkan sisa bahan fiksasi.

b. Dekalsifikasi

Dekalsifikasi dengan tujuan untuk melepaskan bahan anorganik dalam tulang tanpa merusak protein yang ada. Dekalsifikasi dilakukan dengan memakai larutan EDTA 10% selama 30 hari. Proses dekalsifikasi telah selesai ditandai dengan jaringan yang ada sudah lunak (Muntiha, 2001).

c. Pemrosesan Jaringan

Tahapan pemrosesan jaringan adalah sebagai berikut:

1) Dehidrasi

Dehidrasi merupakan penarikan air dari dalam jaringan dengan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi. Dehidrasi dimulai dengan alkohol 70% selama ± 15 menit, 80% selama 1 jam, 95% selama 2 jam, dan 100% selama 3 jam.

2) *Clearing*

Clearing merupakan proses penjernihan jaringan menggunakan bahan *xylol* sebanyak 3 kali pada 3 tabung yang berbeda dengan ketentuan waktu 1 jam pada tabung pertama dan 2 jam pada tabung kedua dan ketiga.

3) Impegnasi

Impegnasi merupakan proses infiltrasi bahan *embedding* ke dalam jaringan pada suhu 56-60° C. Caranya jaringan dibungkus dengan kertas saring kemudian dimasukkan ke dalam bahan *embedding* yaitu parafin 56-60° C selama 2x3 jam.

4) *Embedding*

Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding* yaitu parafin. Tahapan antara lain:

- a) Mempersiapkan alat cetak blok parafin (*base mould*), letakkan alat diatas permukaan yang rata. Alat dan alas diolesi gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dan kaca dengan blok parafin yang sudah beku.

- b) Menuangkan parafin cair kedalam alat cetak blok, kemudian masukkan jaringan yang telah diimpregnasi pada posisi yang sesuai sehingga nantinya didapatkan potongan dengan penampang bukal dan lingual. Ditunggu beberapa menit sampai parafin beku.
- c) Parafin blok siap dipotong setelah dilepas dari alat cetakan.

5) Pemotongan

Pemotongan blok parafin dengan menggunakan mikrotom. Sebelum pemotongan jaringan dengan mikrotom, sebelumnya dilakukan beberapa persiapan, yaitu mengolesi *obyek glass* dengan *meyer egg albumin*, dan selanjutnya menempelkan blok parafin pada *block holder* mikrotom dengan bantuan pemanasan. Setelah itu, dilakukan proses pemotongan jaringan dengan tahap sebagai berikut :

- a) Pisau mikrotom dibersihkan terlebih dahulu dengan kasa atau kertas saring yang dibasahi dengan *xylol* arah tegak lurus.
- b) Mengatur ketebalan sayatan mikrotom antara 4-6 mikron atau sesuai kebutuhan. Pemotongan jaringan ini dilakukan dengan arah mesio-distal pada jaringan yang telah diletakkan pada holder mikrotom. Potongan jaringan yang diperlukan adalah terdapat bentukan gigi dan tulang alveolar utuh pada bagian tarikan dan regangan.
- c) Potongan jaringan yang telah memenuhi kriteria, diambil dengan menggunakan kuas dan diletakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan temperatur 56°-58°C hingga sayatan jaringan mekar.
- d) Sayatan yang telah mekar diambil dengan obyek glass yang telah di olesi dengan *meyer egg albumin*, kemudian dikeringkan di atas hot plate, dan dimasukkan dalam oven dengan suhu sekitar 30°-35°C minimal selama 12 jam.

d. Pengecatan Jaringan dengan *Immunohistochemistry* (IHC)

Prosedur pewarnaan dengan *immunohistochemistry* yang dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya adalah sebagai berikut:

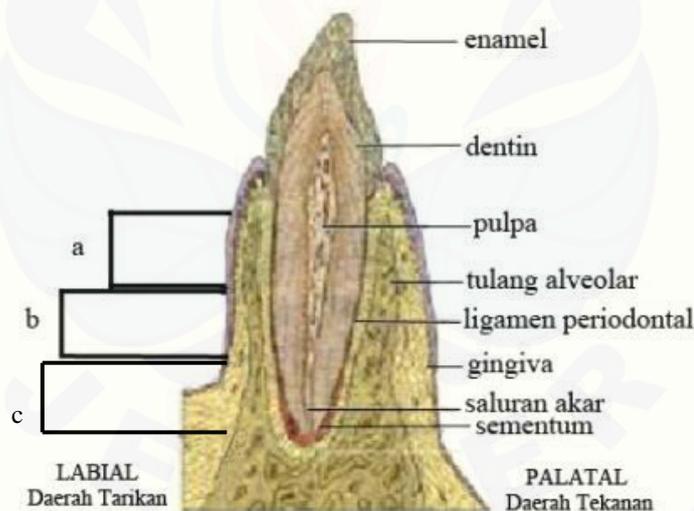
- 1) Deparafinisasi dan rehidrasi slide
 - a) Deparafinisasi dengan *xylene* sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 menit.
 - b) Rehidrasi dengan alkohol 100%, 95%, dan 70% masing-masing selama 2 menit, 2 menit, satu menit, dan terakhir dengan air selama 1 menit.
- 2) Slide direndam dalam larutan 3% hidrogen peroksida selama 10 menit pada suhu ruangan.
- 3) Slide direndam pada *prediluted blocking serum* selama 10 menit pada suhu ruangan.
- 4) Slide diinkubasi dengan antibodi primer OPG pada suhu 4°C selama 1 malam, atau pada suhu 37°C selama 1,5 jam.
- 5) Slide dibilas dengan *phosphate buffer saline* (PBS) selama 5 menit.
- 6) Slide diinkubasi dengan antibodi sekunder biotin selama 10 menit pada suhu ruangan.
- 7) Slide dibilas dengan PBS selama 5 menit.
- 8) Slide diinkubasi dengan *peroxidase* selama 10 menit pada suhu ruangan.
- 9) Slide dibilas dengan PBS selama 5 menit.
- 10) Slide diinkubasi dengan larutan *diaminobenzinidase* (DAB) selama 10 menit.
- 11) Slide diberi *counterstain* dengan *Haematoxylin* selama 3-5 menit.
- 12) Slide dicuci dengan air mengalir.
- 13) Slide dibersihkan dan ditetesi dengan *mounting media*.
- 14) Slide ditutup dengan *coverslip*.

3.9 Prosedur Pengamatan Ekspresi OPG

Pengamatan dan perhitungan jumlah ekspresi OPG dilakukan di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4-6 μm , kemudian dideteksi immunohistokimia terhadap ekspresi OPG untuk melihat jumlah ekspresi dari

protein OPG tersebut. Pengamatan sediaan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x untuk menentukan daerah perhitungan, kemudian untuk melakukan perhitungan jumlah ekspresi OPG dilakukan perbesaran 400x. Perhitungan jumlah ekspresi OPG dilakukan menggunakan program *ImmunoRatio* (IRS). IRS merupakan software yang dapat diakses secara *online* untuk pemeriksaan preparat yang menggunakan pewarnaan immunohistokimia (IHC). Ekspresi OPG dapat terhitung melalui gambaran warna coklat yang terekspresi pada preparat. Hasil dari penghitungan ekspresi OPG menggunakan IRS berupa persen.

Pengamatan dilakukan pada 3 lapang pandang pada daerah tarikan, yaitu pada daerah sepertiga servikal, sepertiga tengah dan sepertiga apikal. Setiap sediaan terdapat 3 hasil perhitungan jumlah ekspresi OPG, yang kemudian dijumlahkan dan dibagi 3 untuk mendapatkan rata-rata jumlah ekspresi OPG dalam satu sediaan.



Gambar 3.2 Pemotongan jaringan dengan arah mesio-distal (a) daerah 1/3 servikal, (b) daerah 1/3 tengah dan (c) daerah 1/3 apikal tulang alveolar

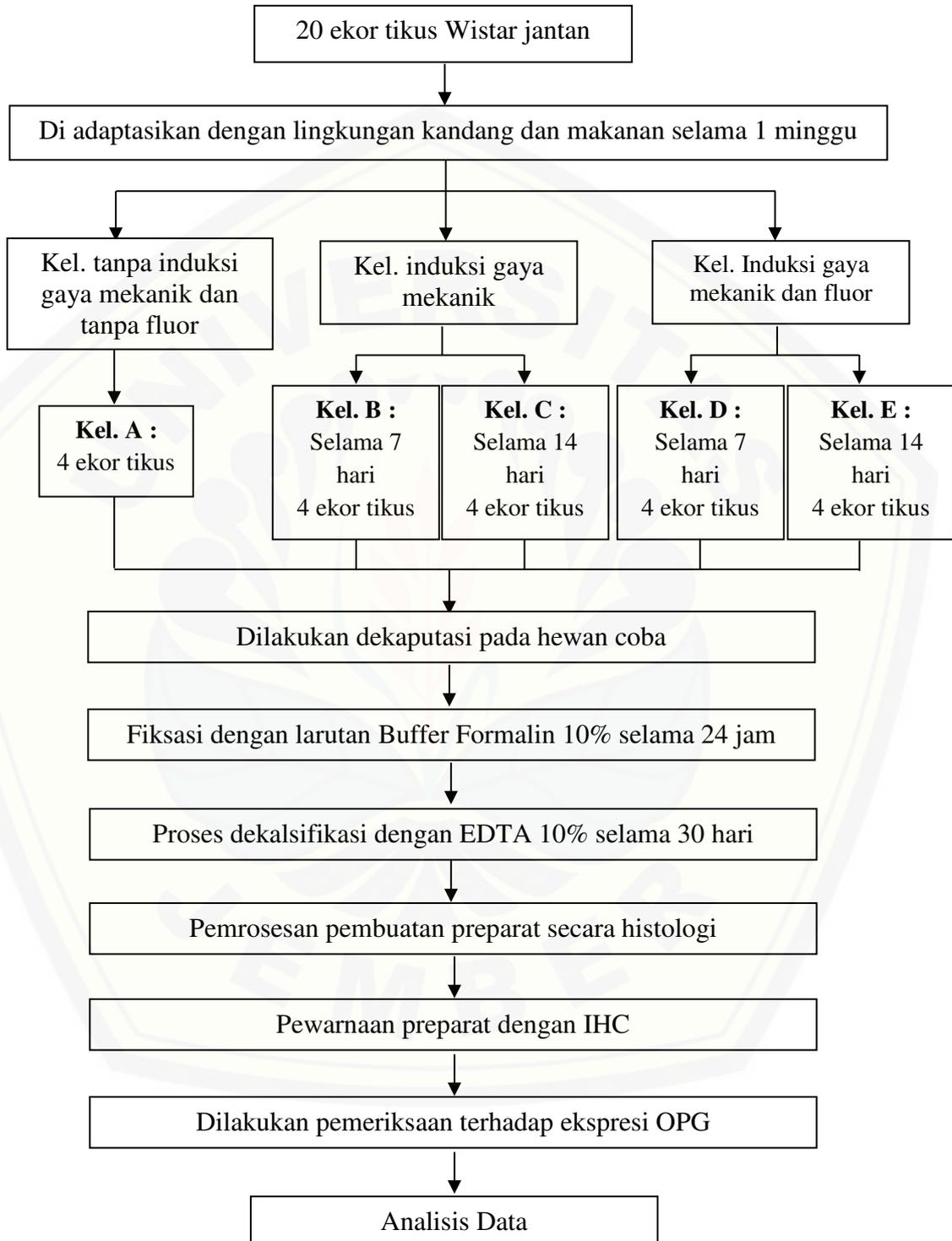
3.10 Analisis Data

Data hasil penelitian ini akan ditampilkan dalam bentuk tabel yang berisi besarnya rata-rata dan standart deviasinya serta foto-foto. Data hasil penelitian ini

akan diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan diuji homogenitasnya dengan uji *Levene* untuk mengetahui keseragaman data penelitian. Kemudian dianalisis menggunakan uji parametrik, *One Way Anova* yaitu uji parametrik lebih dari 2 sampel bebas untuk menganalisa rata-rata jumlah ekspresi OPG. Selanjutnya, dilanjutkan dengan uji beda lanjut (*post hoc test*) yaitu *least significance difference* (LSD) untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan dari antar kelompok perlakuan.



3.11 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa Natrium Fluorida 11,75 ppm secara topikal dapat meningkatkan ekspresi *Osteoprotegerin* (OPG) pada daerah tarikan tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti sebesar 10 gram/cm².

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka peneliti dapat memberikan saran sebagai berikut :

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan waktu penelitian yang lebih lama agar proses remodeling tulang dapat terlihat lebih jelas dan untuk mengetahui hubungan lama pemberian durasi gaya mekanik terhadap ekspresi OPG.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan dosis fluor yang lebih bervariasi, untuk mengetahui potensi fluor dalam mempengaruhi proses remodeling tulang pada perawatan ortodonti.

DAFTAR PUSTAKA

- Adilah, S. M. A. Mieke, T. Hamid. 2010. Proses Fisiologis Pergerakan Gigi Ortodonti. *Ortho Dent J.* 1(1): 8-13.
- Alfaqeeh, S.A. dan S. Anil. 2011. Lactate dehydrogenase activity in gingival crevicular fluid as a marker in orthodontic tooth movement. *Open Dent Journal.* 5: 105-109.
- Ammerman, J. M. 2017. Solid Growth: Bone Grafts' Role in Spine Surgery and Fusion Success. <https://www.spineuniverse.com/treatments/surgery/solid-growth-bone-grafts-role-spine-surgery-fusion-success>. [Diakses pada 4 April 2017].
- Andajani, L. 1995. Metabolisme Fluor dan Hubungannya dengan Kesehatan Umum. *Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi Universitas Trisakti.* (28): 35-43.
- Andrade, I., S. Taddei, dan P. Souza . 2012. Inflammation and Tooth Movement: The Role Movement. *The Scientific World Journal.* 11: 1788-1803.
- Aoba, T. dan O. Fejerskov. 2002. Centers for Disease Control and Prevention. 2001. Recommendation for Using Fluoride to Prevent and Control Dental Caries in United States. *Dental Fluorosis: Chemistry and Biology, Crit Rev Oral Biol Med.* 13: 155–171.
- Ardhana, W. 2010. *Biomekanika Ortodontik.* Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Ariffin, S. H. Z., Z. Yamamoto, I. Z. Z. Abidin, R. M. A. W. Wahab, Z. Z., dan Ariffin. 2011. Cellular and molecular changes in orthodontic tooth movement. *The Scientific World Journal.* 11: 1788-1803.
- Astriningnum, Y. 2011. Analisis Kandungan Ion Fluorida pada Sampel Air Tanah dan Air PAM secara Spektrofotometri. *Skripsi.* Jakarta: Program Studi Farmasi Universitas Indonesia.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 2003. *Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride, and Fluorine.* U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Ayoob, S., dan A. K. Gupta. 2006. Fluoride in Drinking Water: A Review on the Status and Stress Effects. *Crit. Rev. Environ. Sci. Techno* 36: 433–497.
- Bartold, P.M., M. D. Cantley, dan D. R. Haynes. 2010. Mechanism and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000.* 53: 55-69.

- Baylink, J. W., P. B., Duane, S. M., Farley, J. R., Farley. 1983. Monofluorophosphate Physiology The Effects of Fluoride on Bone. *Caries Res* 17 (Suppl 1). 56-76.
- Boyce, B. F., dan L. Xing. 2007. Biology of RANK, RANKL, and Osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy* h. 9.
- Bhalajhi, S. I. 2001. *Otrhodontics: The art and science, 4th ed.* Edinburgh: Mosby.
- Bhawal, U. K., L. Hye-Jin, A. Kazumune, S. Michiharu, S. Masatoshi, T. Toshizo, S. Takenori, K. Ryota, T. Chieko, H. Nobushiro, N. Ikuo, A. Hirohisa, dan S. Koh. 2015. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. *Int J Oral Sci.* 7(4): 242–249.
- Cardaropoli, D. dan L. Gaveglio. 2007. The influence of orthodontic movement on periodontal tissues level. *Semin Orthod.* 13: 234-245.
- Collins, M. K. dan P. M. Sinclair. 1988. The local use of vitamin D to increase the rate of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 94(40): 278-284.
- Daniel, W. 2005. *Biostatica Foundation for Analysis in The Health Science 6 th edition.* Canada: John Wiley and Sons. Inc.
- Danz, J. C., Greuter C., Sifakakis, Fayed M., Pandis N., dan Katsaros C. 2012. Stability and Relapse After Orthodontic Treatment of Deep Bite Cases—a Long-Term Follow-Up. *Study.European Journal of Orthodontics* 36(5): 522-530.
- Everett, E. T. 2011. Fluoride's Effects on the Formation of Teeth and Bones, and the Influence of Genetics. *J. Dent. Res.* 90(5): 552-560.
- Fawell, J., K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, L. Fewtrell, dan Y. Magan. 2006. *Fluoride in Drinking Water.* London: Iwa Publishing. (Published on behalf of the WHO).
- Fedchenko, N. dan J. Reifenrath. 2014. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis result in the bone tissue – a review. *Creative Commons Attribution License.* 29(9): 221.
- Ferreira, T. A. dan W. Rasband. 2012. *The ImageJ User Guide, Version 1.43.* Maryland, USA: National Institute of Mental Health.
- Foster, D. T. 1999. *Buku Ajar Ortodontisi.* Terjemahan. Edisi III. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.

- Fracon, N. Ricardo, Teofilo, M. Juliana, Satin, B. Rafaela, Lamano, dan Teresa. 2008. Prostaglandin and Bone: Potential Risk and Benefits Related to the Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Clinical Dentistry. *Journal of Oral Sci.* 50(3) : 247-252.
- Hand, R. Arthur, Frank, dan E. Marion. 2015. *Fundamentals of Oral Histology and Physiology*. New Jersey: Wiley.
- Henneman, S., J. W. V. den Hoff, dan J. C. Maltha. 2008. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod.* 30: 299-306.
- Herniyati. 2016. Mekanisme Pergerakan Gigi Ortodonti dan Proses Remodeling Tulang Alveolar Yang Diinduksi Gaya Mekanis Ortodonti Akibat Pemberian Seduhan Kopi. *Disertasi*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Herschel, S. 2007. The need for toothpaste with lower than konvensional fluoride constretations for preschool-aged children. *Journal of Public Health Dentistry.* 52(4): 216-221.
- Huang, H., R. C. Williams, dan S. Kyrkanides. 2014. Accelerated orthodontic tooth movement: Molecular mechanism. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Othopedics.* 146:620-632.
- Indriana, T. 2016. Pemberian Asupan Ikan Teri (*stolephorus sp*) Terhadap Proses Osteogenesis Melalui Ekspresi Osteoprotegerin dan Kolagen Tipe I pada Daerah Tarikan Pergerakan Gigi Ortodonti. *Disertasi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- IPCS. 2002. Fluorides. *Environmental Health Criteria 227*. Geneva: World Health Organization.
- Iswari, H. 2012. Relaps dan Pencegahannya Dalam Ortodonti. *Dent. J. (Maj. Ked. Gigi)*. 319: 53-58.
- Junqueira, L. C. dan J. Carneiro. 2007. *Histologi Dasar: Teks & Atlas*. Ed 10, 134 - 6. Terjemahan oleh J. Tambayong. Jakarta: EGC.
- Kasagi, S. dan C. Wanjun. 2013. TGF- β 1 on osteoimmunology and the bone component cells. *Kasagi and Chen Cell & Bioscience.* 3:4.
- Kaya, F. A., N. Hamamci, G. Basaran, M. Dogree, dan T. T. Yildirim. 2010. TNF- α , IL-1 β and IL-18 levels in tooth early levelling movement Orthodontic Treatment. *Journal of International Dental And Medical Research.* 3(3): 116-121.

- Kini, U. dan B. N., Nandeesh. 2012. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism., dalam Radionuclide and Hybrid Bone Imaging. *Verlag Berlin Heidelberg: Springer*. 29-57.
- Klaus H, dkk. 1989. Color Atlas of Dental Medicine 1 : *Periodontology 2nd ed.* Theme Medical Publisher Inc. New York.
- Krishnan, V. dan Z. Davidovitch. 2006. Cellular, Molecular, and Tissue-level Reactions to Orthodontic Force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 129: 469e.1-2.
- Lerner, U. H. 2012. Osteoblast, Osteoclast, and Osteocytes: Unveiling Their Intimate-Associated Responses to Applied Orthodontic Forces. *Seminars in Orthodontics* 18: 237-248.
- Liu, D., S. Yao, dan G. E. Wise. 2006. Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci*. 114: 42-49.
- Lu, Y. 2000. Effect of High Fluoride On Water Intelligence In Children. <http://www.fluoridealert.org/epa08/lu-2000.pdf>. [Diakses 17 Oktober 2014].
- Mardiana, A. A. 2014. Hubungan Paparan Mineral Fluor Dalam Air Minum dengan Terjadinya Kelainan Periodontal. *Disertasi*. Makassar: Universitas Hasanuddin.
- Makfoeld, dkk. 2002. *Kamus Istilah Pangan dan Nutrisi*. Yogyakarta: Kanisius.
- Monologas, S. C. 2000. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications For the Pathogenesis and treatment of Osteoporosis. *Endocrin Reviews*. 21(2): 115-137.
- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksin dan Eosin (HE)*. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti. Bogor: Balai Penelitian Veteriner.
- Murray, R. K. 2003. Hormone Action And Signal Transduction in Harper's Illustrated Biochemistry. *Mc Grow Hill*. 456-473.
- Narmada, I. B. 2010. Efek Low Lower Lasser Therapy pada percepatan pergerakan gigi. *Disertasi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Nayak, B. N. 2013. Molecular Biology of Orthodontic Tooth Movement. *Journal of Dentistry and Oral Health*. 1:1-12.

- Niinomi, M., T. Narushima, Nakai, dan Masaaki. 2015. *Advances in Metallic Biomaterials-Tissue, Materials and Biological Reaction*. Berlin: Springer.
- Notoatmojo, S. 2010. *Metodologi Penelitian*. (Edisi Revisi). Jakarta: PT. Rineka Pustaka.
- Nurhidayat. 2002. *Deteksi Bahan Aktif dengan Metode Immunohistokimia*. Institut Pertanian Bogor: Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan.
- Olive, R. J. dan K. E. Basford. 2003. A longitudinal index study of orthodontic stability and relapse. *Australian Orthodontic Journal*. 19: 47–55.
- Panjaitan, M. 1997. *Ilmu Pencegahan Karies Gigi. Ed 1st*. Medan: USU.
- Pudyani, P. S., D. Sutantyo, dan S. Suparwitri. 2008. Morphological Changes of Alveolar Bone Due To Orthodontic Movement of Maxillary and Mandibular Incisors. *Dent. J. (Maj. Ked. Gigi)*. 41(1): 21-24.
- Putri, T. 2009. *Flour, Flouridasi Air Minum dan Flourosis*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Perumal, E., V. Paul, V. Govindarajan, dan L. Pannerselvam. 2013. A brief review on experimental fluorosis. *Toxicol. Lett*. 223: 236-251.
- Rahardjo, C., N. Prameswari, dan P. Rahardjo. 2014. Pengaruh Gel Teripang Emas Terhadap Fibroblas di Daerah Tarikan pada Relaps Gigi Setelah Perawatan Ortodonti. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 8(1) :17-25.
- Ren, Y., Kuijpers-Jagtman, AM, Van't Hof, MA. 1999. Stability of orthodontic treatment outcome: follow-up until 10 years postretention. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 115(3): 300-304.
- Ruth dan M. A. Mieke Sylvania. 2004. Pergerakan Biomekanik Gigi dalam Perawatan Ortodontia. *Maj. Ked. Gigi (Dent. J)*. 37(1): 12-14.
- Sakallioglu, E. E., M. Muglali, B. Bas, M. Y., dan Gulbahar. 2014. Effects of excessive fluoride on bone turnover in mandible: An Immunohistochemical Study In Rabbits. *Research Report Fluoride*. 47(1): 23-30.
- Sartika, N., Narmada, I. Bagus, Sjamsudin, dan Jusuf. 2013. Efek Ekstrak Propolis terhadap Jumlah Osteoblas Tulang Alveolar Cavia cobaya pada Pergerakan Gigi Ortodonti. *Ortho Dent J*. 4(1): 5-9.
- Seifi, M., M. R. Badiee, Z. Abdolazimi, P. Amdjadi. 2013. Effect of basic fibroblast growth factor on orthodontic tooth movement in rats. *Cell Journal*. 15(3): 230-237.

- Sella, R. C., M. R. deMendoca, O. A. Osmar, dan T. Li. 2012. Histomorphologic evaluation of periodontal compression and tension sides during orthodontic tooth movement in rats. *Dental Press J Orthod.* 17 (3): 108-117.
- Sodek, Jaro, McKee, dan D. Marc. 2000. Molecular and Cellular Biology of Alveolar Bone. *Perio Journal.* 24(1): 99-126.
- Sutjiati, R. 2016. Mekanisme Hambatan Relaps Pergerakan Gigi Ortodonti Pemberian Natrium Fluorida (Studi Eksperimental Pada Tikus Wistar). *Disertasi.* Surabaya: Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Shawesh, M., B. Bhatti, T. Usmani, N. Mandall. 2010. Hawley retainers full- or part-time? A randomized clinical trial. *European Journal of Orthodontics.* 32: 165–170.
- Shivarajashankara, Y. M., A. R., Shivashankara, B. P., Gopalakrishna, S. H., Rao. 2001. Effect of Fluoride Intoxication on the Lipid Peroxidation and the Antioxidant System in Rats. *Journal Fluoride.* 34: 108–113.
- Syafriadi, S, Setyorini, dan Joelijanto. 2008. *Patologi Anatomi: Degenerasi dan Radang.* Tidak Dipublikasikan. Petunjuk Praktikum. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Walsh, L. J. 2006. Home care self applied fluoride product : current concepts for maximal effectiveness. *Dental Practice.* 17(6):66-67
- Widjijono. 2001. Penggunaan Implan Polilaktat-natrium monofluorofosfat dengan kajian Availibilitas fluor sediaan, Biokompabilitas dan Bioavailibilitas fluor dalam darah dan gigi pada tikus putih. *Disertasi.* Surabaya: Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- William, J. K. 2000. *Prinsip dan Praktik Alat-alat Ortodonti Cekat.* Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Whitford, G.M. 1997. Determinants and Mechanisms of Enamel Fluorosis. *Ciba Foundation Symposium.* 205: 226–241.
- WHO. 2006. *Fluoride in Drinking Water.* London.
- Yanti, G. N. dan L. Natahamiharja. 2005. Pemilihan dan Pemakaian Sikat Gigi pada Murid-murid SMA di Kota Medan. *Dentika Dental Journal.* 10(1): 28-30.

LAMPIRAN

LAMPIRAN A. Perhitungan Dosis Bahan Anestetikum

Bahan anastesi yang digunakan berupa campuran ketamin dan xylazine. Ketamin 10 % (dosis 50 mg/kg, Pantex Holland) dan Xylazine 2 % (dosis 5 mg/kg, Pantex Holland) secara intramuskuler (Hartiningsih dan Anggraeni, 2015)

- a. Dosis ketamin yang digunakan:

Konsentrasi 10% Ketamin

$$= 10 \text{ gr} / 100 \text{ ml} = 10.000 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 100 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Berat badan hewan coba } 200 - 250 \text{ gr} = 0,2 - 0,25 \text{ kg}$$

Rumus = (Dosis x Berat) : Konsentrasi

$$= (50 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}) : 100 \text{ mg/ml} ; (50 \text{ mg} \times 0,25 \text{ kg}) : 100 \text{ mg/ml}$$
$$= 0,1 \text{ ml} ; 0,125 \text{ ml}$$

Jadi dosis ketamin yang digunakan adalah 0,1 – 0,125 ml

- b. Dosis Xylazine yang digunakan :

Konsentrasi 2 % Xylazine

$$= 2 \text{ gr} / 100 \text{ ml} = 2000 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = 20 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Berat badan hewan coba } 200 - 250 \text{ gr} = 0,2 - 0,25 \text{ kg}$$

Rumus = (Dosis x Berat) : Konsentrasi

$$= (5 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}) : 20 \text{ mg/ml} ; (5 \text{ mg} \times 0,25 \text{ kg}) : 20 \text{ mg/ml}$$
$$= 0,05 \text{ ml} ; 0,0625 \text{ ml}$$

Jadi dosis xylazine yang digunakan adalah 0,05 – 0,0625 ml

Lampiran B. Rerata Hasil Jumlah Ekspresi OPG (Daerah Tarikan) pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan

Kelompok A	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	28	38	67,7	44,57
2	37,4	45,2	48,5	43,70
3	41,3	42	42,9	42,07
4	52,5	42,5	48,3	47,77
Rerata jumlah ekspresi OPG				44,53
Kelompok B Hari ke-7	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	39,5	59,2	48,1	48,93
2	55	51,4	44,6	50,33
3	55,6	50,2	55,8	53,87
4	45,2	58,3	47,1	50,20
Rerata jumlah ekspresi OPG				50,83
Kelompok C Hari ke-14	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	58,1	43,5	43,5	48,37
2	50,1	55,2	60,1	55,13
3	55,7	53,8	61	56,83
4	55,7	57,4	60,8	57,97
Rerata jumlah ekspresi OPG				54,58
Kelompok D Hari ke-7	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	77,1	66,9	36,1	60,03
2	56	60,9	47,9	54,93
3	45,5	47,3	77,7	56,83
4	74,9	77,7	73,7	75,43
Rerata jumlah ekspresi OPG				61,81
Kelompok E Hari ke-14	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	83,1	84,7	83,8	83,87
2	75,8	60,2	80,3	72,10
3	76	75,2	70,4	73,87
4	50,7	50,8	56,4	52,63
Rerata jumlah ekspresi OPG				70,62

*dalam satuan persen

Lampiran C. Hasil Uji Analisis Data

C.1 Uji Normalitas *Shapiro Wilk* Ekspresi OPG

Tests of Normality

Kelompok Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi OPG	Kelompok A	.243	4	.957	4	.761
	Kelompok B	.344	4	.865	4	.278
	Kelompok C	.301	4	.854	4	.240
	Kelompok D	.325	4	.820	4	.142
	Kelompok E	.295	4	.925	4	.566

a. Lilliefors Significance Correction

C.2 Uji Homogenitas *Levene-Test* Ekspresi OPG

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi OPG

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.290	4	15	.108

C.3 Uji *One-Way Anova* Ekspresi OPG

ANOVA

Ekspresi OPG

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1625.307	4	406.327	7.098	.002
Within Groups	858.663	15	57.244		
Total	2483.971	19			

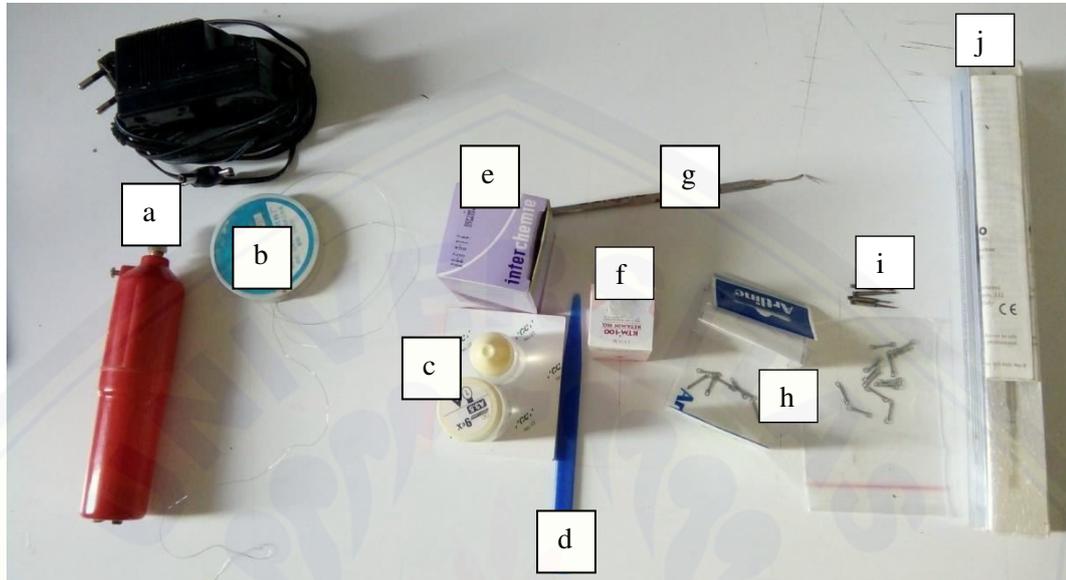
C.4 Uji LSD (*Least Significant Difference*) Ekspresi OPG

Multiple Comparisons

Ekspresi OPG
LSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok A	Kelompok B	-6.30500	5.34996	.257	-17.7082	5.0982
	Kelompok C	-10.04750	5.34996	.080	-21.4507	1.3557
	Kelompok D	-17.27750 [*]	5.34996	.006	-28.6807	-5.8743
	Kelompok E	-26.08000 [*]	5.34996	.000	-37.4832	-14.6768
Kelompok B	Kelompok A	6.30500	5.34996	.257	-5.0982	17.7082
	Kelompok C	-3.74250	5.34996	.495	-15.1457	7.6607
	Kelompok D	-10.97250	5.34996	.058	-22.3757	.4307
	Kelompok E	-19.77500 [*]	5.34996	.002	-31.1782	-8.3718
Kelompok C	Kelompok A	10.04750	5.34996	.080	-1.3557	21.4507
	Kelompok B	3.74250	5.34996	.495	-7.6607	15.1457
	Kelompok D	-7.23000	5.34996	.197	-18.6332	4.1732
	Kelompok E	-16.03250 [*]	5.34996	.009	-27.4357	-4.6293
Kelompok D	Kelompok A	17.27750 [*]	5.34996	.006	5.8743	28.6807
	Kelompok B	10.97250	5.34996	.058	-.4307	22.3757
	Kelompok C	7.23000	5.34996	.197	-4.1732	18.6332
	Kelompok E	-8.80250	5.34996	.121	-20.2057	2.6007
Kelompok E	Kelompok A	26.08000 [*]	5.34996	.000	14.6768	37.4832
	Kelompok B	19.77500 [*]	5.34996	.002	8.3718	31.1782
	Kelompok C	16.03250 [*]	5.34996	.009	4.6293	27.4357
	Kelompok D	8.80250	5.34996	.121	-2.6007	20.2057

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

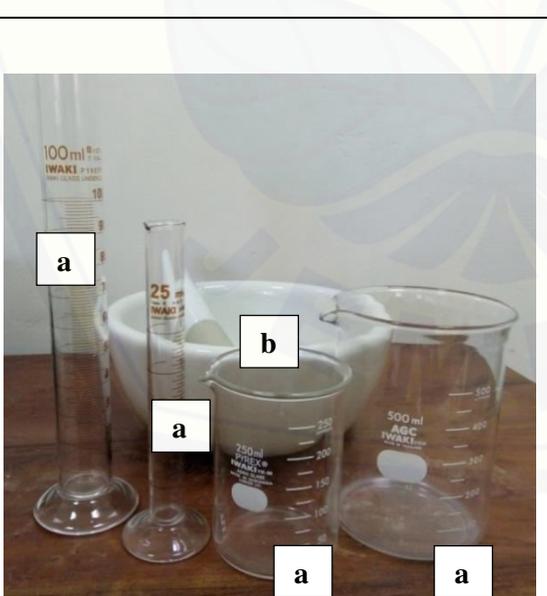
Lampiran D. Alat dan Bahan Penelitian**D.1 Alat dan Bahan untuk Pemasangan *Ni-Ti Closed Coil Spring* pada Gigi Tikus Wistar**

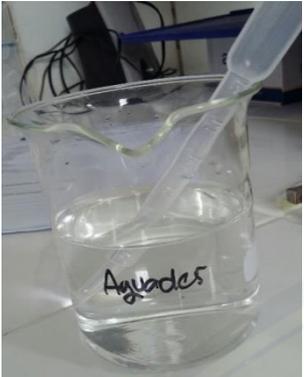
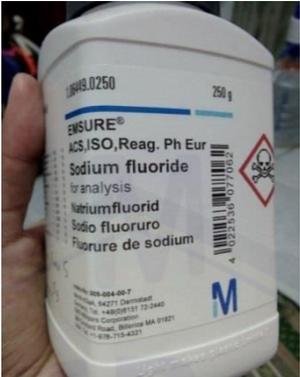
Keterangan gambar:

- A. Minidrill
- B. Ligature Wire
- C. Glass Ionomer
- D. Spatula Agate
- E. Xylazine
- F. Ketamine
- G. Sonde Lurus
- H. NiTi Closed Coil Spring
- I. Mata Bur
- J. Tention Gauge Ormco

Gambar	
	
Syringe modifikasi	Tikus wistar jantan
	
Pot jaringan	

D.2 Alat dan Bahan Pembuatan Gel Natrium Fluorida 11,75 ppm

Gambar	
	
<p>a. Gelasukur b. Mortar danalu</p>	Timbangan analitik

 <p>Aquadest</p>	 <p>Bubuk Natrium Fluorida</p>	 <p>Propilenglikol, TEA, Carbopol</p>
---	---	--

D.3 Alat dan Bahan Pengenceran EDTA

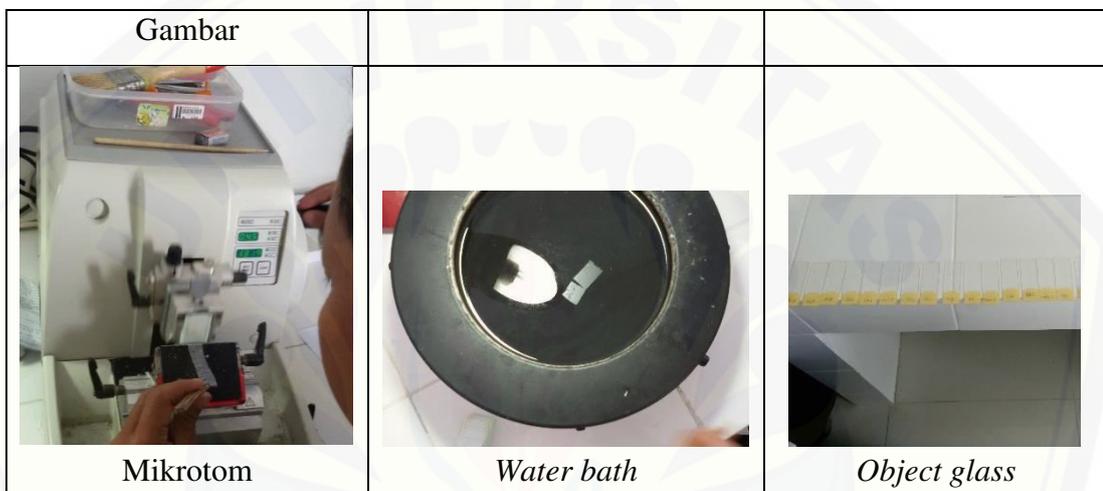
Gambar		
 <p>EDTA</p>	 <p>Timbangan analitik</p>	 <p>Magnetic Stirrer</p>

D.4 Alat dan Bahan Pembuatan Parafin Blok

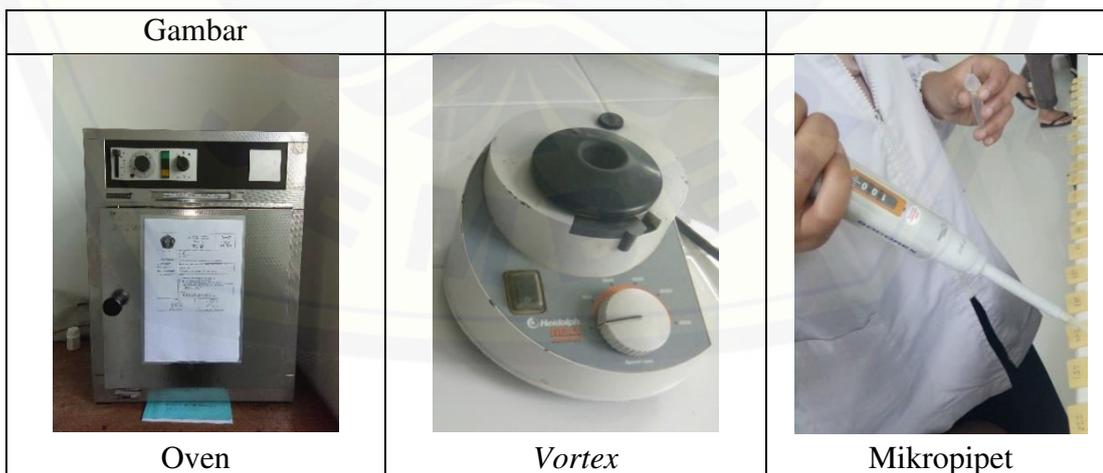
Gambar	
 <p>Xylol dan Alkohol</p>	 <p>Parafin Cair</p>



D.5 Alat dan Bahan Pembuatan Preparat



D.6 Alat dan Bahan Pewarnaan Immunohistokimia





Deck glass



Hematoxylin



Diaminobenzinidine(DAB)



Enzym



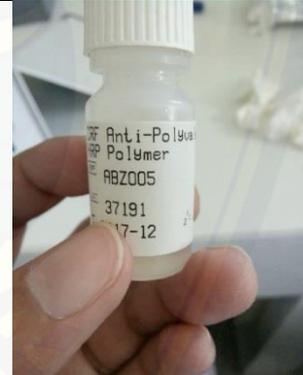
Background Blocker



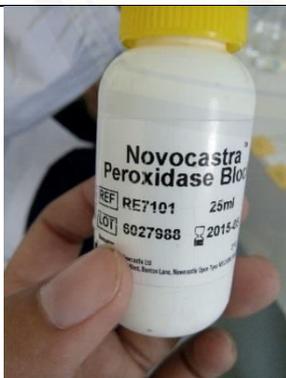
Antibodi primer OPG



Sterile water



Antibodi sekunder



Peroxidase Blocker



Pristine

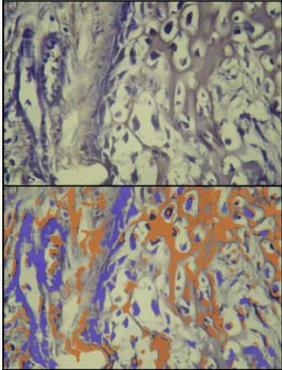
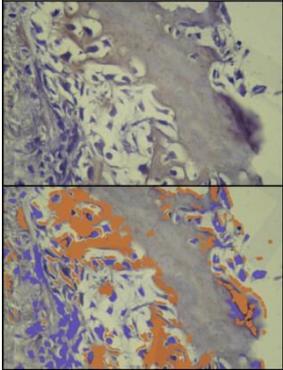
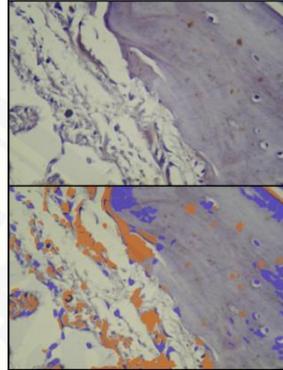
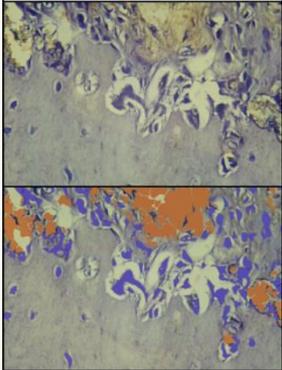
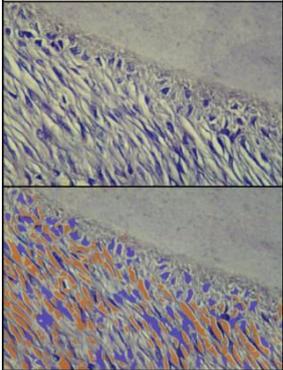
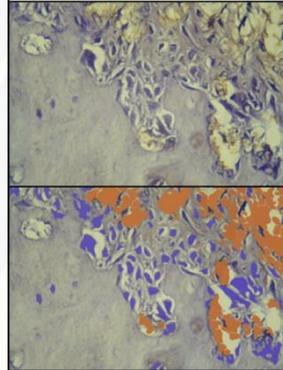
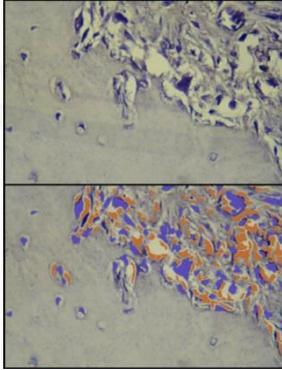
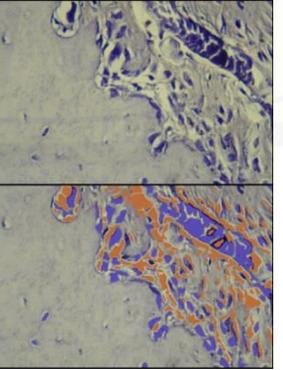
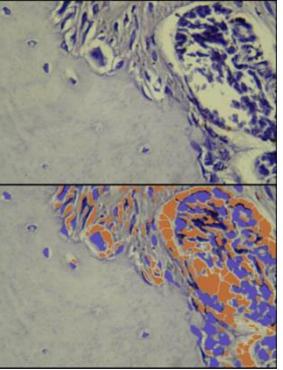
D.7 Alat Pemeriksaan

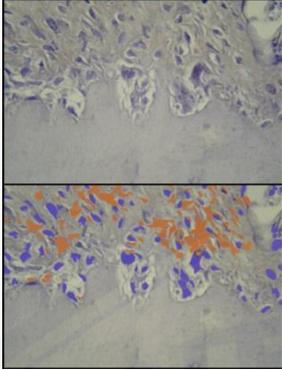
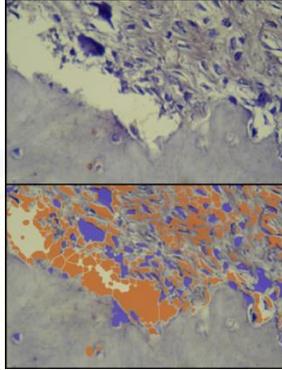
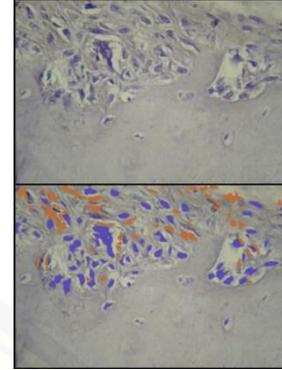
Gambar	
 <p>Mikroskop Olympus</p>	 <p>Kamera mikroskop optilab</p>



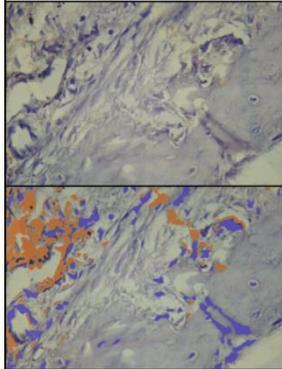
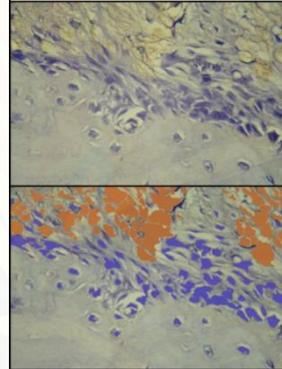
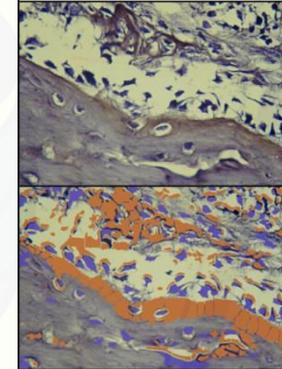
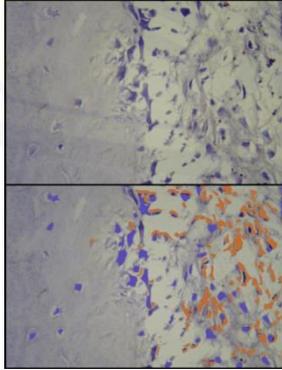
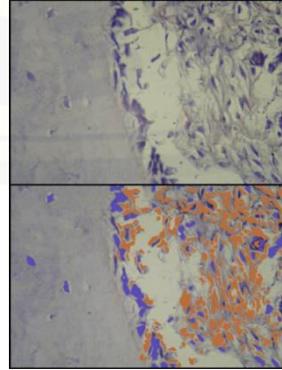
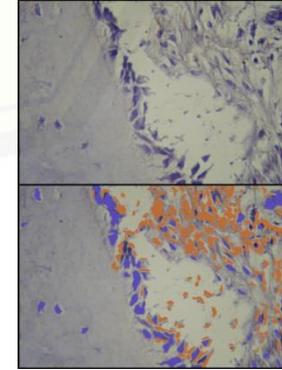
Lampiran E. Foto Preparat *Immunostaining* OPG (Daerah Tarikan) dan Hasil Pemeriksaan *ImmunoRatio*

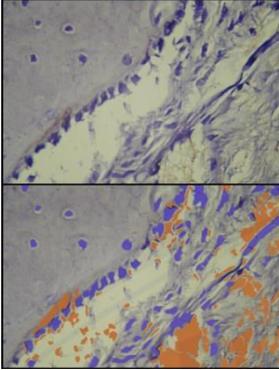
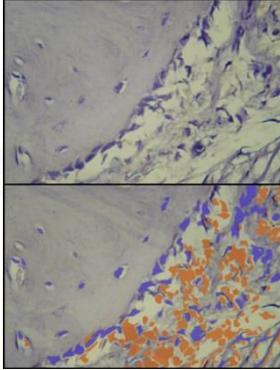
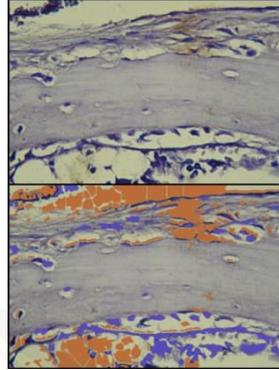
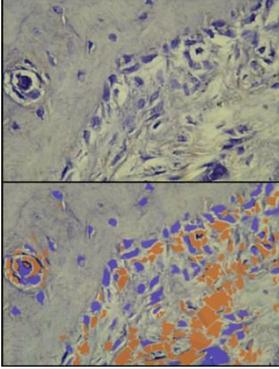
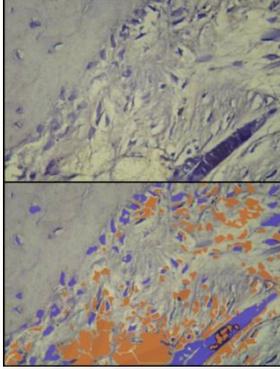
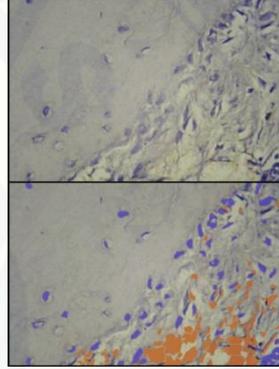
E.1 Kelompok A dengan perbesaran 400x

Sampel	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3
1.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1733 Date: 8.2.2018 07:08 DAB / nuclear area: 48.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1727 Date: 8.2.2018 07:06 DAB / nuclear area: 52.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1731 Date: 8.2.2018 07:07 DAB / nuclear area: 42.5%</p> 
2.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5467 Date: 1.3.2018 05:46 DAB / nuclear area: 37.4%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1689 Date: 8.2.2018 07:10 DAB / nuclear area: 45.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5466 Date: 1.3.2018 05:46 DAB / nuclear area: 48.5%</p> 
3.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1693 Date: 8.2.2018 07:13 DAB / nuclear area: 41.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1694 Date: 8.2.2018 07:13 DAB / nuclear area: 42.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1698 Date: 8.2.2018 07:15 DAB / nuclear area: 42.9%</p> 

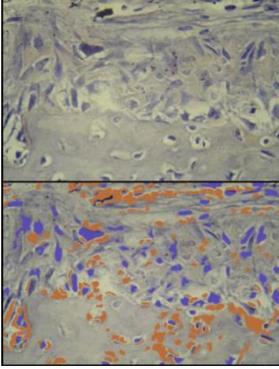
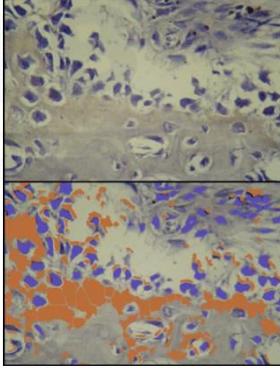
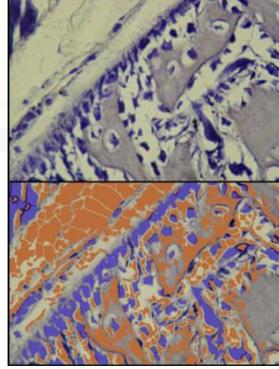
4.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5622 Date: 1.3.2018 06:18 DAB / nuclear area: 38.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1710 Date: 8.2.2018 07:18 DAB / nuclear area: 67.7%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5532 Date: 1.3.2018 06:19 DAB / nuclear area: 28.0%</p> 
----	---	--	---

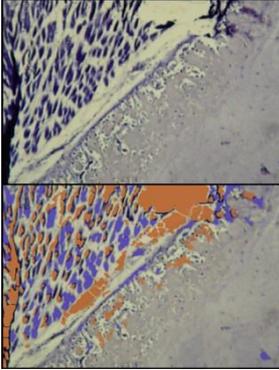
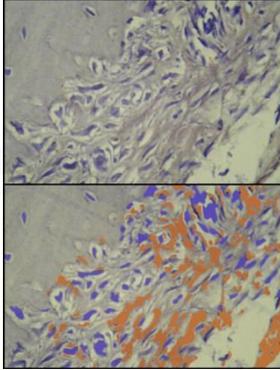
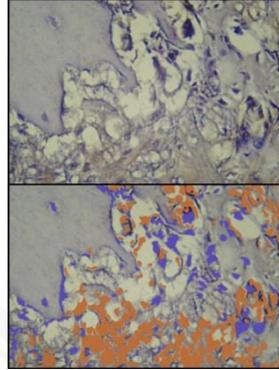
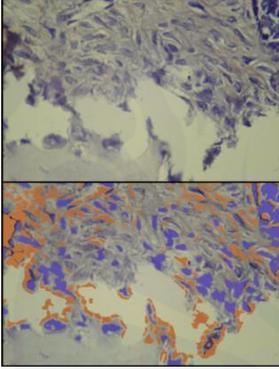
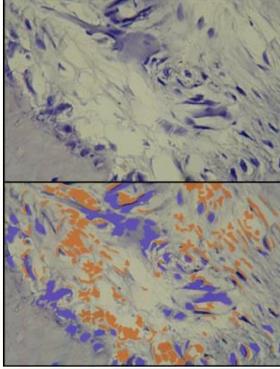
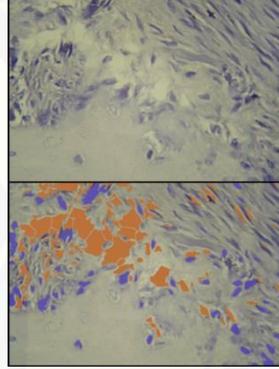
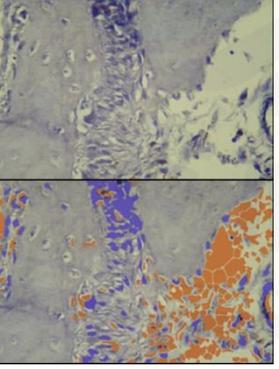
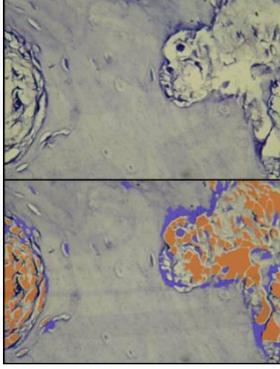
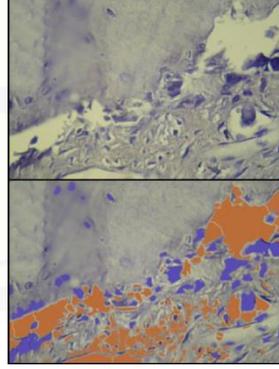
E.2 Kelompok B hari ke-7 dengan perbesaran 400x

Sampel	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3
1.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1762 Date: 8.2.2018 07:26 DAB / nuclear area: 39.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1763 Date: 8.2.2018 07:27 DAB / nuclear area: 48.1%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0329 Date: 7.2.2018 05:55 DAB / nuclear area: 59.2%</p> 
2.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5564 Date: 1.3.2018 06:23 DAB / nuclear area: 50.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5548 Date: 1.3.2018 05:34 DAB / nuclear area: 65.8%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5550 Date: 1.3.2018 06:38 DAB / nuclear area: 55.8%</p> 

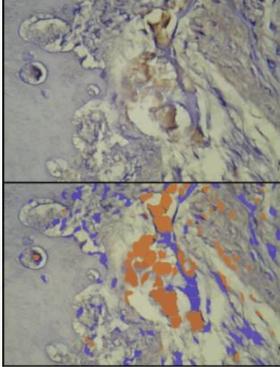
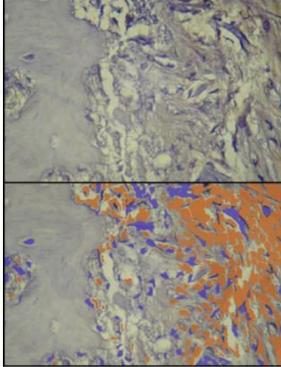
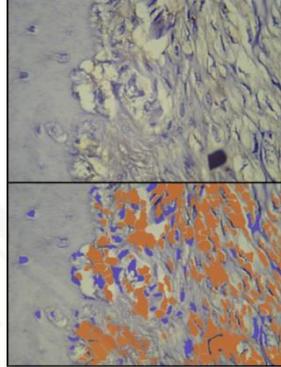
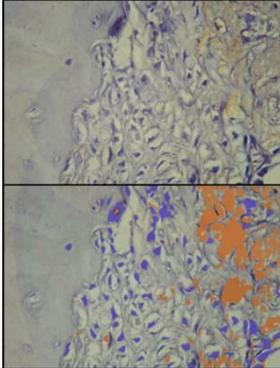
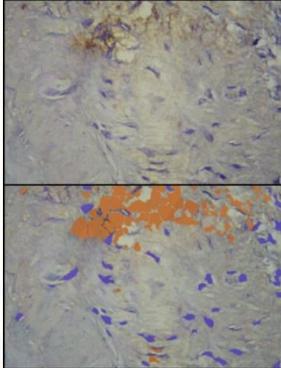
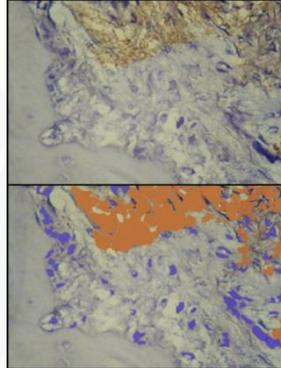
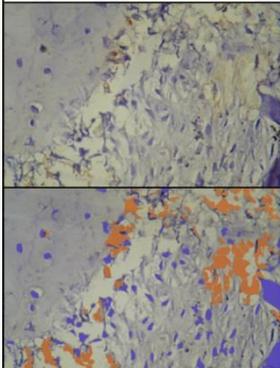
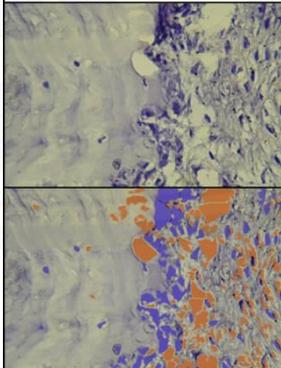
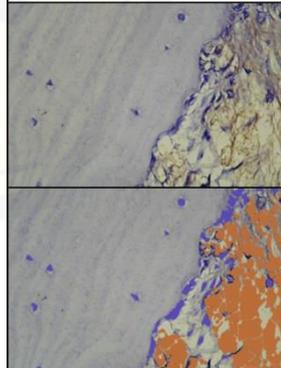
3.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1739 Date: 8.2.2018 07:32 DAB / nuclear area: 44.6%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1737 Date: 8.2.2018 07:31 DAB / nuclear area: 51.4%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0319 Date: 7.2.2018 06:02 DAB / nuclear area: 55.0%</p> 
4.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0344 Date: 7.2.2018 06:06 DAB / nuclear area: 47.1%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1785 Date: 8.2.2018 07:57 DAB / nuclear area: 58.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5700 Date: 1.3.2018 06:42 DAB / nuclear area: 45.2%</p> 

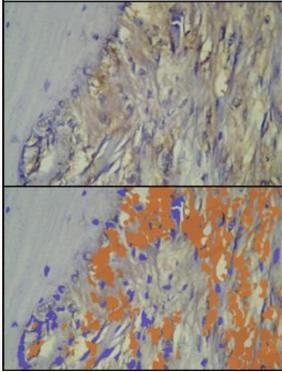
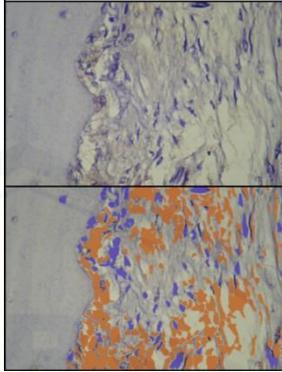
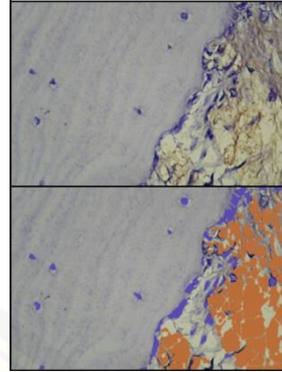
E.3 Kelompok C hari ke-14 dengan perbesaran 400x

Sampel	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3
1.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1789 Date: 8.2.2018 08:01 DAB / nuclear area: 50.1%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1791 Date: 8.2.2018 08:03 DAB / nuclear area: 55.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0360 Date: 7.2.2018 06:11 DAB / nuclear area: 60.1%</p> 

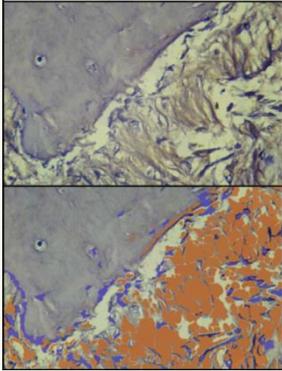
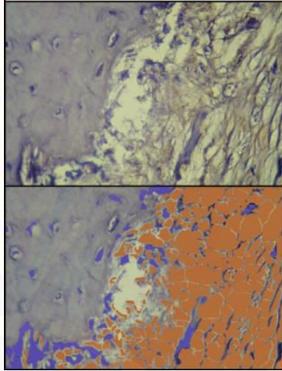
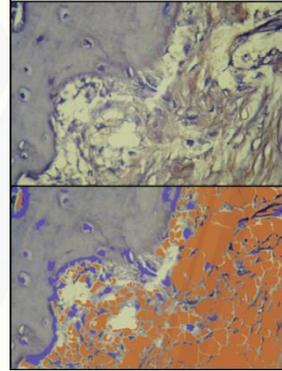
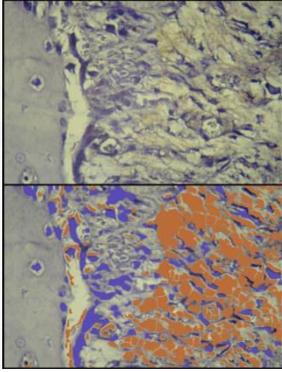
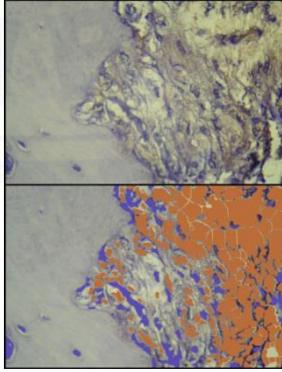
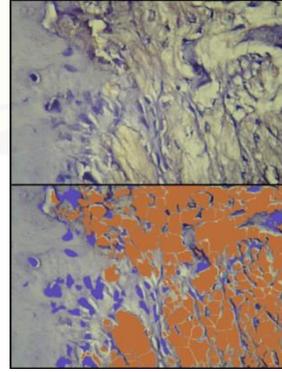
<p>2.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0370 Date: 7.2.2018 06:14 DAB / nuclear area: 53.8%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1931 Date: 8.2.2018 08:09 DAB / nuclear area: 55.7%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1916 Date: 8.2.2018 08:09 DAB / nuclear area: 61.0%</p> 
<p>3.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1817 Date: 8.2.2018 08:18 DAB / nuclear area: 43.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0399 Date: 7.2.2018 06:15 DAB / nuclear area: 43.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1811 Date: 8.2.2018 08:11 DAB / nuclear area: 58.1%</p> 
<p>4.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1803 Date: 8.2.2018 08:20 DAB / nuclear area: 55.7%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0388 Date: 7.2.2018 06:17 DAB / nuclear area: 57.4%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1801 Date: 8.2.2018 08:19 DAB / nuclear area: 60.8%</p> 

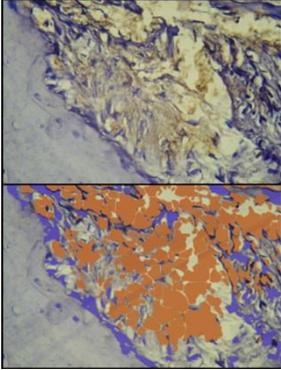
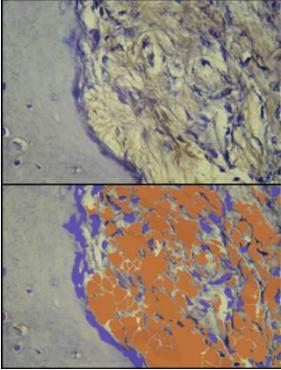
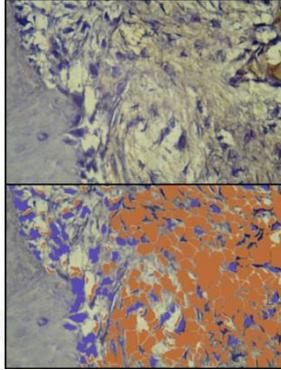
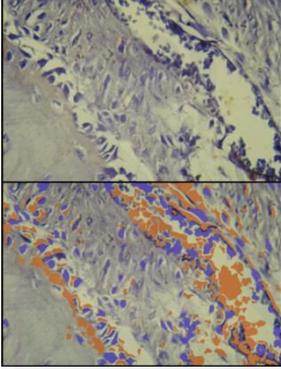
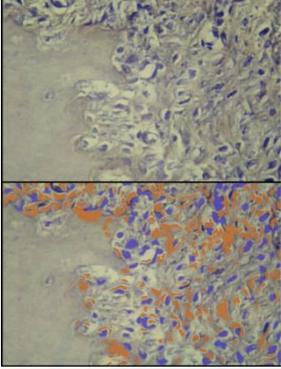
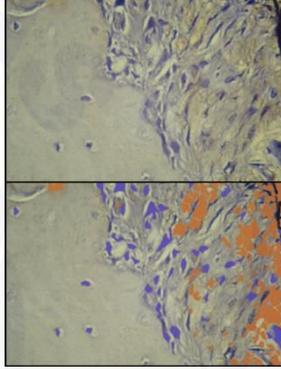
E.4 Kelompok D hari ke- 7 dengan perbesaran 400x

Sampel	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3
1.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1850 Date: 8.2.2018 08:24 DAB / nuclear area: 36.1%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1852 Date: 8.2.2018 08:26 DAB / nuclear area: 66.9%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1855 Date: 8.2.2018 08:28 DAB / nuclear area: 77.1%</p> 
2.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1829 Date: 8.2.2018 08:48 DAB / nuclear area: 47.9%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC6343 Date: 1.3.2018 09:40 DAB / nuclear area: 56.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1825 Date: 8.2.2018 08:41 DAB / nuclear area: 60.9%</p> 
3.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1832 Date: 8.2.2018 08:50 DAB / nuclear area: 45.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0415 Date: 7.2.2018 06:24 DAB / nuclear area: 47.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0427 Date: 7.2.2018 06:26 DAB / nuclear area: 77.7%</p> 

4.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1846 Date: 8.2.2018 09:00 DAB / nuclear area: 73.7%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1839 Date: 8.2.2018 08:58 DAB / nuclear area: 74.9%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0427 Date: 7.2.2018 06:26 DAB / nuclear area: 77.7%</p> 
----	---	--	---

E.5 Kelompok E hari ke- 14 dengan perbesaran 400x

Sampel	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3
1.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1859 Date: 8.2.2018 09:09 DAB / nuclear area: 83.1%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1864 Date: 8.2.2018 09:13 DAB / nuclear area: 83.8%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1861 Date: 8.2.2018 09:10 DAB / nuclear area: 84.7%</p> 
2.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1881 Date: 8.2.2018 09:22 DAB / nuclear area: 60.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1888 Date: 8.2.2018 09:26 DAB / nuclear area: 75.8%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1889 Date: 8.2.2018 09:29 DAB / nuclear area: 80.3%</p> 

<p>3.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1908 Date: 8.2.2018 09:33 DAB / nuclear area: 70.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1907 Date: 8.2.2018 09:32 DAB / nuclear area: 75.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1904 Date: 8.2.2018 09:30 DAB / nuclear area: 76.0%</p> 
<p>4.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1870 Date: 8.2.2018 09:38 DAB / nuclear area: 50.7%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1876 Date: 8.2.2018 09:42 DAB / nuclear area: 50.8%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC5937 Date: 1.3.2018 09:29 DAB / nuclear area: 56.4%</p> 

Lampiran F. *Ethical Clearance*

	<p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH DENTAL FACULTY UNIVERSITY OF JEMBER)</p>
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No. 027/UN25.8/KEPK/DL/2018</u></p>	
Title of research protocol	: "Efek Pemberian Natrium Florida (Naf) Secara Tropical Terhadap Ekspresi Osteoprotegerin Pada Daerah Tarikan Tulang Alveolar Gigi Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Nabilah Zakiyatul Fakhirah
Member of research	: -
Responsible Physician	: Nabilah Zakiyatul Fakhirah
Date of approval	: February 5 th , 2018
Place of research	: 1. Biomedical Laboratory Dental Faculty University of Jember 2. Pharmaceutics Laboratory Pharmacy Faculty Univ. of Jember 3. Anatomical Pathology Laboratory Medicine Faculty University of Brawijaya 4. Biochemistry Laboratory Medicine Faculty University of Brawijaya
<p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry University of Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p>	
<p>Jember, February 10th, 2018</p>	
<p>Dean for Research, Community Service and Collaboration Faculty of Dentistry University of Jember</p>	<p>Chairman of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry University of Jember</p>
	
<p>(drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)</p>	<p>(Dr. I Dewa Ayu Susilawati, drg. M. Kes.)</p>

Lampiran G. Surat Ijin Penelitian Pembuatan Preparat Jaringan


 KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
 UNIVERSITAS JEMBER
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991

Nomor : 0940 /UN25.8.TL/2018
 Perihal : Ijin Penelitian

12 MAR 2018

Kepada Yth
 Kepala Laboratorium Patologi Anatomi
 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya
 Di
 Malang

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :

1	Nama	: Nabillah Dzakiyatul Fakhirah
2	NIM	: 141610101004
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Mastrip 2 No.36 Jember
6	Judul Penelitian	: Efek Pemberian Natrium Florida (NAF) Secara Topikal Terhadap Ekspresi Osteoprotegrin (OPG) Pada Daerah Tarikan Tulang Alveolus Gigi Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
8	Data/Alat yang Dipinjam	: Mikrotom, dll
9	Waktu	: Januari 2018 s/d Selesai
1	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Efek Pemberian Natrium Florida (NAF) Secara Topikal Terhadap Ekspresi Osteoprotegrin (OPG) Pada Daerah Tarikan Tulang Alveolus Gigi Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti
11	Dosen Pembimbing	: 1. drg. Yenny Yustisia , M.Biotech 2. drg. Rudy Jeolijanto , M.Biomed

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan
 Wakil Dekan I,

 Dr. Ida Susilawati, M.Kes
 NIP. 196409031986022001

Lampiran H. Surat Ijin Penelitian Pengecatan IHC

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS JEMBER FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333536, Fak. 331991	
Nomor	: 0340 /UN25.8.TL/2018	12 MAR 2018
Perihal	: Ijin Penelitian	
Kepada Yth Kepala Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Di Malang		
Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi mahasiswa kami dibawah ini :		
1 2 3 4 5 6 7 8 9 1 11	Nama NIM Semester/Tahun Fakultas Alamat Judul Penelitian Lokasi Penelitian Data/Alat yang Dipinjam Waktu Tujuan Penelitian Dosen Pembimbing	: Nabillah Dzakiyatul Fakhirah : 141610101004 : 2017/2018 : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember : Jl. Mastrip 2 No.36 Jember : Efek Pemberian Natrium Florida (NAF) Secara Topikal Terhadap Ekspresi Osteoprotegrin (OPG) Pada Daerah Tarikan Tulang Alveolus Gigi Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti : Laboraturium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang : Mikroskop, mikropipet : Januari 2018 s/d Selesai : Untuk Menganalisis Efek Pemberian Natrium Florida (NAF) Secara Topikal Terhadap Ekspresi Osteoprotegrin (OPG) Pada Daerah Tarikan Tulang Alveolus Gigi Tikus Wistar Jantan Yang Diinduksi Gaya Mekanik Ortodonti : 1. drg. Yenny Yustisia , M.Biotech 2. drg. Rudy Jeolijanto , M.Biomed
Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih		
		an, Dekan Wakil Dekan I,   Dr. drg. DDA Susilawati, M.Kes NTP: 06149031986022001