



**EFEK KAFEIN TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOSIT PADA DAERAH
TEKANAN TULANG ALVEOLAR GIGI TIKUS YANG
DIINDUKSI GAYA ORTODONTI**

SKRIPSI

Oleh

**Annisa Dian Kartikaningtyas
NIM 121610101009**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2016



**EFEK KAFEIN TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOSIT PADA DAERAH
TEKANAN TULANG ALVEOLAR GIGI TIKUS YANG
DIINDUKSI GAYA ORTODONTI**

SKRIPSI

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

Oleh

**Annisa Dian Kartikaningtyas
121610101009**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2016

PERSEMBAHAN

Karya tulis ilmiah ini aku persembahkan kepada :

1. Ibunda Endang Srikaton dan Ayahanda Didik Nusantoro,SKM.,MM. tercinta, yang selalu memberikan semangat dan doa.
2. Kakakku tersayang Hardhika Suryantoro,SE.
3. Seluruh guru-guruku yang sangat berjasa sehingga aku menjadi seperti sekarang ini.
4. Agama dan bangsaku yang aku cintai dan aku banggakan.
5. Almamaterku Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTTO

Hai orang-orang yang beriman, mintalah pertolongan (kepada Allah) dengan sabar dan (mengerjakan shalat) sesungguhnya Allah beserta orang-orang yang sabar
(terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 153)^{*)}



^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *Al-Qur'an dan Terjemahnya*. Bandung: PT. Syaamil Cipta Media.

PERNYATAAN

Saya yang bertatanganan di bawah ini :

Nama : Annisa Dian Kartikaningtyas

NIM : 121610101009

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Kafein terhadap Jumlah Sel Osteosit pada Daerah Tekanan Tulang Alveolar Gigi Tikus yang Diinduksi Gaya Ortodonti” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada instansi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggungjawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 24 Mei 2016

Yang menyatakan,

Annisa Dian Kartikaningtyas

NIM 121610101009

SKRIPSI

**EFEK KAFEIN TERHADAP JUMLAH SEL OSTEOSIT PADA DAERAH
TEKANAN TULANG ALVEOLAR GIGI TIKUS YANG
DIINDUKSI GAYA ORTODONTI**

Oleh :

**Annisa Dian Kartikaningtyas
121610101009**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Amandia Dewi P.S, M.Biomed
Dosen Pembimbing Pendamping : Dr. Hj. Herniyati, drg., M. Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul Efek Kafein terhadap Jumlah Sel Osteosit pada Daerah Tekanan Tulang Alveolar Gigi Tikus yang Diinduksi Gaya Ortodonti telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

hari, tanggal : Selasa, 24 Mei 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

drg. Happy Harmono, M.Kes

NIP. 196709011997021001

Dosen Penguji Anggota

drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed

NIP. 198107172008012017

Dosen Pembimbing Utama

drg. Amandia Dewi P.S, M.Biomed

NIP. 198006032006042002

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. Hj. Herniyati, drg., M. Kes

NIP. 196810201996012001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember

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

NIP. 196901121996011001

RINGKASAN

Efek Kafein terhadap Jumlah Sel Osteosit pada Daerah Tekanan Tulang Alveolar Gigi Tikus yang Diinduksi Gaya Ortodonti ; Annisa Dian Kartikaningtyas, 121610101009 ; 2016 : 59 halaman ; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Perawatan ortodonti bertujuan untuk memperbaiki susunan gigi dan kedudukan gigi geligi sehingga mendapatkan fungsi oklusi yang stabil, perbaikan pengunyahan, fungsi bicara yang baik, keseimbangan otot dan estetika wajah yang harmonis. Pergerakan gigi ortodonti berkaitan erat dengan proses *remodelling* tulang untuk merespon dan beradaptasi terhadap tekanan alat ortodonti. Proses pergerakan gigi akan sempurna jika terdapat keseimbangan antara proses resorpsi tulang pada daerah tekanan dan aposisi tulang pada daerah tarikan. Daerah tekanan merupakan daerah yang pertama kali menerima gaya ortodonti dan sel osteosit merupakan sel tulang alveolar yang merespon pertama kali adanya tekanan dari alat ortodonti. Osteosit merupakan sel yang berperan sebagai *mechanosensor* tulang saat terjadi perubahan dan berperan penting dalam proses *remodelling* tulang yaitu mengatur keseimbangan resorpsi tulang dan aposisi tulang. Jumlah sel osteosit pada tulang alveolar dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu aplikasi gaya ortodonti dan pemberian kafein. Kafein diduga dapat membantu mempercepat pergerakan gigi dengan mempengaruhi metabolisme tulang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya peningkatan jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar gigi tikus yang diinduksi gaya ortodonti dengan pemberian kafein. Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Populasi penelitian adalah hewan coba tikus *Sprague Dawley* yang terbagi menjadi 2 kelompok, dimana setiap kelompok terdiri dari 4 tikus, yaitu kelompok kontrol yang hanya diinduksi gaya otodonti dan kelompok perlakuan yang diinduksi gaya ortodonti serta pemberian kafein selama 21 hari. Setelah proses perlakuan selesai, hewan coba dieuthanasia pada hari ke-22 menggunakan eter secara inhalasi, kemudian dipotong regio molar rahang atas kanan dengan *Ni-Ti closed coil spring* tetap terpasang pada

gigi, dilakukan pemrosesan jaringan dengan menggunakan EDTA 10% selama 1,5 bulan untuk proses dekalsifikasi, pengecatan jaringan menggunakan Hematoksilin Eosin (HE), dan melakukan pengamatan serta penghitungan jumlah sel osteosit pada mikroskop cahaya binokuler pada pembesaran 400x. Data yang diperoleh diuji normalitas dengan uji *Kolmogrov-Smirnov* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's Test*, kemudian dilanjutkan uji *Independent T-test*.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan rata-rata jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol namun tidak signifikan ($p > 0,05$). Sehingga, dapat ditarik kesimpulan bahwa kafein dapat meningkatkan jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar gigi tikus yang diinduksi gaya ortodonti, namun tidak signifikan.

PRAKATA

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

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp. Prost. selaku Dekan, Dr.drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes selaku Pembantu Dekan I, Dr. drg. Sri Hernawati, M.Kes selaku Pembantu Dekan II, dan drg. Izzata Barid, M.Kes selaku Pembantu Dekan III.
2. drg. Amandia Dewi P.S, M.Biomed selaku dosen pembimbing utama dan Dr. Hj. Herniyati, drg.,M.Kes selaku dosen pembimbing pendamping, terimakasih atas semua bimbingan, dukungan, dan ilmu yang telah diberikan sehingga karya tulis ini dapat selesai dengan baik.
3. drg. Happy Harmono, M.Kes selaku dosen penguji ketua dan drg. Nuzulul Hikmah, M.Biomed selaku dosen penguji anggota, terimakasih atas ilmu, bimbingan serta saran yang sangat bermanfaat.
4. drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc selaku dosen pembimbing akademik, terimakasih atas bimbingan dan motivasi yang begitu besar selama menempuh bangku perkuliahan.
5. Ibuku tercinta Endang Srikaton dan ayahku tercinta Didik Nusantoro, SKM.,MM. Terimakasih atas semua pengorbanan dan kasih sayang selama ini.
6. Kakakku Hardhika Suryantoro, SE, terimakasih atas motivasinya.

7. Letda. Adm. Misbahul Khoir Ila Bi Fadillah, S.T.Han, terimakasih telah memberikan semangat dan kasih sayangnya.
8. Sahabat-sahabat sekaligus saudaraku di Jember, Mbak Riris, Mbak Siska, Mbak Vina, Mbak Mala, Mbak Tatit, Zahro, Aulia, terimakasih telah menjadi keluarga baruku di Jember
9. Sahabat seangkatan di FKG Universitas Jember sekaligus saudaraku di kos Mastrip 34A, Medina, Junti, dan Wulan, terimakasih selama ini sudah menjadi tempat curhat baik suka maupun duka.
10. Sahabat penelitian, Ayoek dan Vira, terimakasih telah menjadi partner yang baik selama penelitian.
11. Teman-teman KKN 90, Diah, Dwindah, dan Aroel, terimakasih telah menjadi keluarga baru dan teman main mengelilingi kota Jember.
12. Staf Laboratorium Biologi-Kimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Pak Wibi, staf Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember Bu Wahyu dan Mas Agus, terimakasih telah menemani, membimbing dan membantu penelitian ini hingga selesai.
13. Semua pihak yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung membantu dalam penelitian hingga tersusun menjadi karya tulis ini.

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

Jember, 24 Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
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 Kafein	5
2.1.1 Definisi Kafein	5
2.1.2 Kandungan Kafein pada Minuman	6
2.1.3 Efek Konsumsi Kafein.....	6
2.2 Pergerakan Gigi Ortodonti	8
2.2.1 Gigi, Ligamen Periodontal, dan Tulang Alveolar.....	8
2.2.2 Teori Biomekanik Pergerakan Gigi	11
2.3 Sel Osteosit	12
2.3.1 Definisi Sel Osteosit	12

2.3.2 Letak Sel Osteosit	13
2.3.3 Bentuk dan Ukuran Sel Osteosit	13
2.3.4 Peran Sel Osteosit pada Pergerakan Gigi.....	14
2.4 Efek Kafein terhadap Sel Osteosit dan Pergerakan Gigi	16
2.5 Kerangka Konseptual Penelitian	18
2.6 Hipotesis	19
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Jenis Penelitian.....	20
3.2 Rancangan Penelitian	20
3.3 Tempat dan Waktu penelitian.....	20
3.3.1 Tempat Penelitian	20
3.3.2 Waktu Penelitian	20
3.4 Populasi dan Sampel Penelitian	20
3.4.1 Populasi penelitian.....	20
3.4.2 Sampel Penelitian	21
3.5 Kriteria Inklusi, Eksklusi, dan Drop Out	22
3.6 Identifikasi Variabel Penelitian.....	23
3.6.1 Variabel Bebas	23
3.6.2 Variabel Terikat	23
3.6.3 Variabel Terkendali	24
3.7 Bahan dan Alat Penelitian	24
3.7.1 Bahan Penelitian	24
3.7.2 Alat Penelitian	25
3.8 Prosedur Penelitian	26
3.8.1 Persiapan <i>Ethical Clearance</i>	26
3.8.2 Persiapan Hewan Coba	26
3.8.3 Penimbangan Berat Badan Hewan Coba	26
3.8.4 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	26
3.8.5 Pemasangan Koil Spring.....	27

3.8.6 Pemberian Kafein.....	28
3.8.7 Dosis Kafein.....	29
3.8.8 Pembuatan Sediaan Histologi	29
3.8.9 Pengecatan Haematoksilin Eosin (HE).....	30
3.8.10 Pengamatan dan Penghitungan Jumlah Sel Osteosit	32
3.9 Analisis Data	32
3.10 Alur Penelitian	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Hasil dan Analisis Data	34
4.2 Pembahasan	37
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	45

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Data kafein berdasarkan kategori minuman.....	6
Tabel 4.1 Rata-rata jumlah sel osteosit daerah tekanan tulang alveolar tikus pada masing-masing kelompok.....	34



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Kimia Kafein 1,3,7 – <i>methylxanthine</i>	5
Gambar 2.2 Struktur Gigi, Ligamen Periodontal, dan Tulang Alveolar	8
Gambar 2.3 Respon dari gaya mekanis secara continuous pada tulang alveolar pada sisi tekanan terjadi resorpsi tulang, dan pada sisi tarikan terjadi pembentukan tulang	11
Gambar 2.4 Sel Tulang Osteoblas, Osteoklas, dan Osteosit	14
Gambar 2.5 Struktur kanalikuli dan osteosit yang terkurung di dalam lakuna	14
Gambar 3.1 Pemasangan koil spring	28
Gambar 3.2 Skema alur penelitian	33
Gambar 4.1 Diagram batang rata-rata jumlah sel osteosit daerah tekanan dan tarikan tulang alveolar tikus pada masing-masing kelompok	35
Gambar 4.2 Gambaran histologis pewarnaan HE dengan perbesaran 40x	36
Gambar 4.3 Gambaran histologis jumlah sel osteosit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan pewarnaan HE dan perbesaran 400x.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Surat Keterangan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu.....	45
Lampiran B. Keterangan Kelayakan Etik	46
Lampiran C. Penghitungan Dosis Ketamin.....	47
Lampiran D. Penghitungan Konversi Dosis Seduhan Kopi Kering dari Manusia ke Tikus.	48
Lampiran E. Alat Penelitian.....	49
Lampiran F. Bahan Penelitian.....	53
Lampiran G. Prosedur Penelitian	54
Lampiran H. Penghitungan Jumlah Sel Osteosit Daerah Tekanan	55
Lampiran I. Uji Statistika.....	56
Lampiran J. Gambaran Histologi Kelompok Kontrol Daerah Tekanan	58
Lampiran K. Gambaran Histologi Kelompok Perlakuan Daerah Tekanan.....	59

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Seiring dengan perkembangan zaman modern ini, banyak sekali penduduk di Indonesia bahkan di dunia yang menjalani perawatan ortodonti. Tujuannya untuk memperbaiki susunan dan kedudukan gigi-geligi untuk mendapatkan hubungan gigi-geligi yang baik sehingga mendapatkan fungsi oklusi yang stabil, perbaikan pengunyahan, fungsi bicara yang baik, keseimbangan otot dan keserasian estetika wajah yang harmonis (Rahardjo, 2009). Perawatan ortodonti akan berhasil dan berperan penting pada proses pergerakan gigi apabila memenuhi beberapa faktor berikut ini yaitu faktor kebersihan rongga mulut, adanya tulang alveolar, jaringan periodonsium dan ligamen periodontal yang sehat (Priyatmoko, 2014).

Berdasarkan biomekanik pergerakan gigi, ketika sebuah kekuatan alat ortodonti diaplikasikan pada gigi maka akan menekan ligamen periodontal dan tulang alveolar. Perubahan yang terjadi yaitu melibatkan daerah tekanan tulang alveolar mengalami resorpsi tulang, sedangkan tulang alveolar yang berdekatan dengan daerah tarikan akan mengalami osteogenesis atau proses pembentukan tulang (Xie *et al.*, 2008).

Penelitian ini hanya mengamati daerah tekanan karena daerah tersebut merupakan penerima beban tekanan alat ortodonti dan adanya tekanan tersebut dapat merubah sistem biologi yaitu sel-sel tulang akan merespon perubahan dan akan beradaptasi (Henneman *et al.*, 2008). Saat alat ortodonti diaplikasikan maka terjadi aliran *bone fluid* melalui kanalikuli sehingga mengakibatkan tekanan pada membran sel dan mengaktifasi sel osteosit. Osteosit merupakan sel tulang yang merespon perubahan yang terjadi pertama kali saat diaplikasikan alat ortodonti karena osteosit berperan sebagai *mechanosensor* tulang saat ada rangsangan mekanis, tekanan, stress maupun rangsangan kimia (Bakker *et al.*, 2001).

Sel osteosit merupakan sel terbanyak yang terdapat di tulang alveolar yaitu sekitar 90-95% dan memiliki daur hidup yang bertahan selama beberapa tahun

(Bonewald, 2007). Osteosit kaya akan kandungan protein dan berperan mengatur homeostasis phosphat serta metabolisme mineral pada tulang alveolar. Peran osteosit pada pergerakan gigi adalah untuk mendeteksi beberapa perubahan dan kerusakan tulang melalui dendrit di sepanjang tulang di dalam kanalikuli dan memberikan sinyal kepada sel osteoblas dan osteoklas (Verbogt *et al.*, 2000). Selain itu, osteosit dapat mengatur keseimbangan antara proses resorpsi tulang maupun proses pembentukan tulang sehingga dapat terjadi *remodelling* tulang (Bakker *et al.*, 2001).

Proses *remodelling* tulang merupakan suatu proses yang diawali dengan fase resorpsi tulang alveolar oleh osteoklas yang memiliki batas daur hidup 12,5 hari, kemudian diikuti oleh fase pembentukan tulang oleh osteoblas pada hari ke 13. Alasan utama terjadinya *remodelling* tulang yaitu mengaktifkan tulang untuk memberikan respon dan mampu beradaptasi terhadap tekanan alat ortodonti yang terjadi selama pergerakan gigi ortodonti. Proses tersebut memerlukan interaksi antara beberapa sel pada tulang alveolar yaitu osteosit, osteoblas, dan osteoklas yang diatur oleh berbagai macam *biochemical* dan faktor mekanis. *Remodelling* tulang dalam kondisi normal terdapat keseimbangan antara jumlah resorpsi tulang oleh osteoklas dan jumlah pembentukan tulang oleh osteoblas (Hill, 1998). Penelitian yang dilakukan selama 21 hari diharapkan telah terjadi proses *remodelling* tulang yang ditandai dengan proses resorpsi telah selesai, kemudian digantikan dengan proses pembentukan tulang.

Proses pergerakan gigi ortodonti membutuhkan durasi perawatan ortodonti yang cukup lama yaitu sekitar 1-2 tahun (Yi, 2012). Kebanyakan pasien mengeluh bosan menjalankan perawatan ortodonti sehingga pasien malas untuk kontrol. Ditemukan beberapa penelitian mengenai bagaimana cara mempercepat proses pergerakan gigi ortodonti yaitu dengan mengonsumsi kafein. Berdasarkan penelitian Li (2014) kafein merupakan komponen dari biji kopi yang dapat mempercepat proses pergerakan gigi dengan meningkatkan osteoklastogenesis melalui peningkatan *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL). Sedangkan menurut penelitian Liu (2011), beberapa orang memiliki kebiasaan minum kopi, dapat efektif

mempercepat pergerakan gigi dengan efek kecil dari kafein yang merusak keseimbangan kalsium di jaringan tulang dan dapat mengurangi densitas tulang sehingga dapat meningkatkan kecepatan pergerakan gigi ortodonti. Efek kafein pada metabolisme tulang ini bersifat sementara dan *reversible* karena terjadi peningkatan penyerapan kalsium melalui 1,25-(OH)₂-D sehingga *bone density* kembali normal.

Menurut Manolagas (2000), jumlah osteosit dapat dijadikan tanda kepadatan tulang, apabila kepadatan sel tulang berkurang dapat diakibatkan oleh berkurangnya jumlah osteosit atau kurangnya kadar mineral dan sebaliknya. Berdasarkan penelitian Reis (2015), pemberian kafein dengan dosis 50mg/kgBB pada hari ke 7, 14, dan 21, dapat meningkatkan *osteogenic potential* oleh osteoblas. Ditandai oleh peningkatan *alkaline phosphatase activity*, *collagen synthesis*, mineralisasi dan ekspresi *osteogenic genes* seperti osteocalcin, osteopontin, *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2), dan kolagen tipe-I. Diharapkan dapat meningkatkan jumlah *mature osteoblast* yang akan berdiferensiasi menjadi osteosit sehingga bisa menambah jumlah osteosit yang telah ada di tulang alveolar.

Penelitian eksperimental mengenai jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar gigi tikus masih belum banyak diteliti. Oleh karena itu, penulis ingin mengetahui efek kafein terhadap jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi gaya ortodonti.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian kafein dapat meningkatkan jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar gigi tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi gaya ortodonti ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui adanya peningkatan jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar gigi tikus yang diinduksi gaya ortodonti dengan pemberian kafein.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Menghitung jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar kelompok kontrol yang diinduksi gaya ortodonti
- b. Menghitung jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar kelompok perlakuan yang diberi kafein dan diinduksi gaya ortodonti.
- c. Membandingkan jumlah sel osteosit pada kelompok kontrol yang diinduksi gaya ortodonti dan kelompok perlakuan yang diberi kafein serta diinduksi gaya ortodonti.

1.4 Manfaat Penelitian

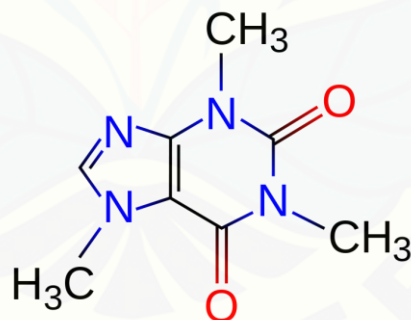
- a. Memberikan informasi ilmiah mengenai efek kafein terhadap jumlah sel osteosit pada tulang alveolar gigi tikus *Sprague Dawley* yang diinduksi gaya ortodonti.
- b. Dapat dijadikan sebagai acuan penelitian selanjutnya mengenai efek kafein terhadap jumlah sel osteosit pada tulang alveolar gigi tikus yang diinduksi gaya ortodonti.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kafein

2.1.1 Definisi Kafein

Kafein merupakan alkaloid yang termasuk golongan *methylxanthine* dengan rumus kimia $C_8H_{10}N_8O_2$ dan struktur kimianya 1,3,7-*trimethylxantine* (Gambar 2.1). Kafein memiliki berat molekul 194.19, bubuknya berwarna putih, dan rasanya pahit yang banyak terkandung di dalam biji kopi, daun teh, biji coklat, dan minuman berkarbonasi (Yi *et al*, 2012). Kafein berfungsi sebagai stimulan psikoaktif dan mempercepat produksi urin pada manusia maupun hewan (Yosef, 2008). Kafein dapat bereaksi dengan asam, basa, dan logam berat dalam asam, yaitu apabila asam, kafein akan bereaksi dan membentuk garam yang tidak stabil, sedangkan dengan basa akan membentuk garam yang stabil. Kafein juga mudah terurai dengan alkali panas kemudian membentuk kafeidin. Kafein dapat larut dalam air, mempunyai aroma wangi tetapi memberikan cita rasa yang pahit (Violita, 2011).



Gambar 2.1 Struktur Kimia Kafein 1,3,7 – *methylxanthine*

(Sumber: <http://voyageofillusion.wordpress.com/2012/07/06/varietas-tanaman-kopi/>, 2012)

2.1.2 Kandungan Kafein pada Minuman

Kopi dan teh banyak mengandung kafein dibandingkan jenis tanaman lain. Namun, apabila kandungan kafein pada kopi dibandingkan dengan teh maka kopi memiliki kandungan kafein lebih banyak (Tabel 2.1) (Hermanto, 2007).

Tabel 2.1 Data Kafein Berdasarkan Kategori Minuman

Produk Minuman	Kandungan Kafein
Secangkir Kopi	85 mg
Secangkir Teh	35 mg
Sebotol Coca-cola	35 mg
Minuman energi (Kratingdaeng, M-150, Galin Bugar, dll)	50 mg
Kopi Instan	2.8 – 5.0%
Kopi Moka (mentah)	1.08%
Kopi Moka (sangrai)	0.82%
Kopi Robusta Jawa	1.48%
Kopi Arabika	1.16%
Kopi Liberika (mentah)	1.59%
	2.19%

Sumber : Hermanto, 2007

2.1.3 Efek Konsumsi Kafein

Efek positif kafein bagi tubuh seperti pada dunia kedokteran kafein sering digunakan merupakan yang terkandung di dalam minuman yang dikenal sebagai *trimethylxantine*, yaitu dapat merangsang kerja jantung dan meningkatkan produksi urin. Selain itu, kafein juga memiliki kemampuan untuk menstimulasi otak, dapat mencegah penyakit saraf seperti penyakit Alzheimer dan Parkinson karena memiliki kandungan antioksidan di dalam kopi akan mencegah kerusakan sel yang dihubungkan dengan Parkinson, sedangkan efek kafeinnya akan menghambat peradangan di dalam otak. Di beberapa negara maju kafein bisa digunakan sebagai obat untuk mengatasi asma dan batu ginjal, namun belum ada penelitian secara ilmiah. Perlu diketahui bahwa kafein dalam dosis rendah dapat digunakan sebagai bahan untuk membangkitkan stamina dan juga menghilangkan rasa sakit. Efek positif lainnya yaitu bisa melindungi gigi karena kopi yang mengandung kafein memiliki

kemampuan antibakteri dan antilengket, sehingga dapat menjaga bakteri penyebab lubang menggerogoti lapisan gigi (Alamsyah, 2006).

Mekanisme kerja kafein dengan cara mengambil alih fungsi *adenosine* yang merupakan salah satu senyawa dalam sel otak yang membuat orang mudah untuk tidur. Saat fungsi *adenosine* ini sudah digantikan dengan kafein maka akan memacu produksi hormon adrenalin dan menyebabkan meningkatnya tekanan darah, jantung berdetak lebih cepat, sekresi asam lambung, aktivitas otot, dan merangsang hati untuk melepaskan senyawa gula ke aliran darah sehingga akan menghasilkan energy. Kafein juga akan membalikkan semua kerja *adenosine* sehingga tubuh tidak akan lagi merasa ngantuk dan membuat perasaan menjadi sedikit gembira serta mata akan terbuka lebih lebar. Menurut beberapa survey menyatakan bahwa setengah dari kandungan kafein yang diminum akan bertahan beberapa jam dalam tubuh sehingga dapat membuat mata sulit untuk terpejam atau insomnia akibatnya apabila kurang tidur yaitu mudah sakit kepala, gelisah, merasa tegang dan cepat marah (Alamsyah, 2006).

Dosis kafein yang boleh dikonsumsi sebesar 300 mg kafein atau setara dengan 3 cangkir kopi per hari. Kafein dapat menimbulkan efek kecanduan terhadap kafein jika mengonsumsi lebih dari 600 mg kafein atau setara dengan 5-6 cangkir kopi per hari selama 8-15 hari berturut-turut. Sedangkan dosis yang dapat berakibat fatal bagi manusia adalah sekitar 10.000 mg kafein atau setara dengan 20-50 cangkir per hari. Jadi, supaya kafein tidak menimbulkan efek negatif bagi kesehatan tubuh yaitu dengan cara tidak mengonsumsi kafein secara berlebihan dan terus menerus dalam jangka waktu panjang (Alamsyah, 2006).

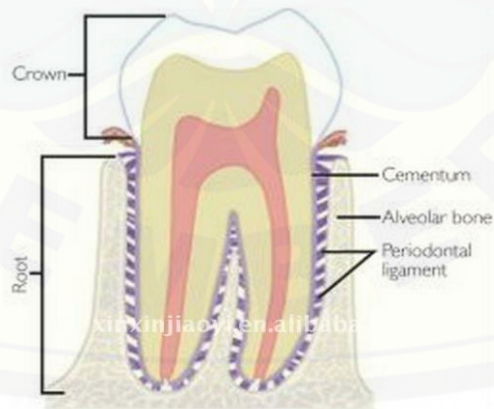
Kafein memiliki efek farmakologis yang bermanfaat secara klinis bagi tubuh sehingga bisa dikonsumsi oleh manusia. Namun, apabila dosisnya terlalu banyak maka tidak baik untuk tubuh (Coffefag, 2001). Berdasarkan *Food Drug Administration* (FDA) dosis kafein yang diizinkan sebesar 100-200 mg/hari, sedangkan menurut SNI (Standart Nasional Indonesia) 017152-2006 mengungkapkan

batas maksimal kafein yang terkandung di dalam makanan sebesar 50 mg/sajian dan minuman sebesar 150 mg/hari (Liska, 2004).

Studi sebelumnya mengenai efek kafein terhadap metabolisme tulang masih kontroversial, beberapa menyatakan memiliki efek tersebut (Massey dan Whiting, 1993), sedangkan penelitian lain melaporkan tidak terdeteksi efek tersebut (Sakamoto *et al.*, 2001). Beberapa menemukan bahwa kafein dapat mempengaruhi tergantung dosis, cara pemberian, dan umur hewan coba (Raputri *et al.*, 2007). Studi klinik dengan induksi kafein periode pendek (3 minggu) dan diberikan dosis rendah pada perawatan ortodonti, menunjukkan *Bone Mineral Density* (BMD) dari tulang alveolar berubah tidak signifikan (Compose *et al.*, 2012). Berdasarkan penelitian Yi (2012), pada induksi gaya ortodonti dan pemberian kafein selama 3 minggu tidak mengurangi *Bone Mineral Density* (BMD) karena waktu pemberian 3 minggu termasuk singkat dibandingkan dengan penelitian yang menggunakan induksi gaya ortodonti dan kafein selama kurang lebih 7 bulan.

2.2 Pergerakan Gigi Ortodonti

2.2.1 Gigi, Ligamen Peridontal dan Tulang Alveolar



Gambar 2.2 Struktur Gigi, Ligamen Periodontal, dan Tulang Alveolar
(Sumber: <https://positivedentist.wordpress.com/2013/06/26/mengenal-periodonsia/>)

Berdasarkan gambar 2.2 di atas terlihat gambaran struktur gigi terdiri dari mahkota dan akar. Gigi dikelilingi oleh jaringan periodontal yang mendukungnya dan melekatkan pada tulang rahang sehingga gigi tidak terlepas dari soketnya. Jaringan periodontal ini terdiri dari gingiva, tulang alveolar, ligamen periodontal dan sementum yang setiap jaringan memiliki peran penting dalam menjaga kesehatan dan fungsi dari periodontal yang dipengaruhi oleh morfologi gigi, fungsi, maupun usia (Putri *et al.*, 2010).

Ligamen periodontal berperan sebagai jaringan pengikat yang mengisi ruangan antara permukaan gigi dengan dinding soket, mengelilingi akar gigi bagian korona serta mendukung gingiva (Putri *et al.*, 2010). Fungsi ligamen periodontal adalah sebagai bantalan pelindung beban kunyah, sumber nutrisi jaringan periodontal, sumber persarafan untuk menerima rangsangan yang mengenai gigi (Rahardjo, 2009). Komponen utama dalam substansi dasar dari ligamen periodontal yaitu proteoglikan dan glikoprotein yang dibutuhkan dalam proses *remodelling* ligamen periodontal, karena dapat menambah viskoelastisitas dari ligamen periodontal (Narmada dan Syafei, 2008).

Cairan jaringan yang terdapat pada ruangan ligamen periodontal berasal dari sistem vaskular dan berperan sebagai “*Shock absorber*”. Bila tekanan yang besar terus dikenakan pada gigi maka cairan dengan cepat keluar dan kemudian gigi akan bergerak pada ruang periodontal sehingga gigi menekan ligamen periodontal dan menyentuh tulang (Priyatmoko, 2014).

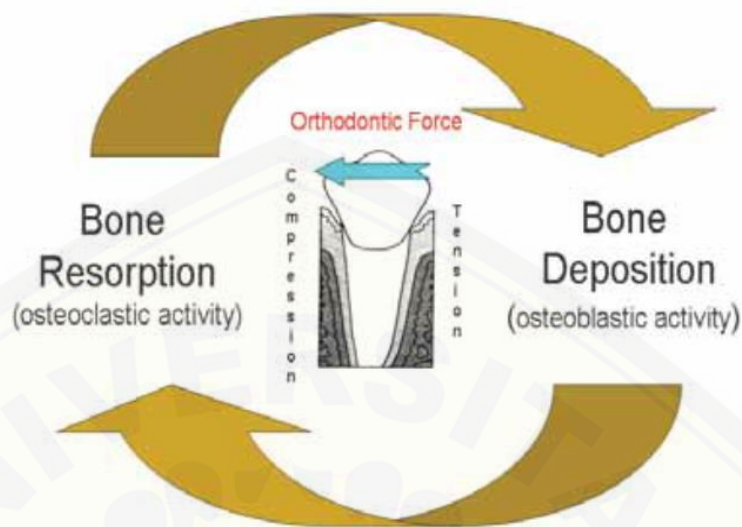
Sedangkan tulang alveolar merupakan bagian dari maksila dan mandibular yang membentuk dan mendukung soket gigi. Bagian tulang alveolar yang membentuk dinding soket gigi disebut alveolar propium yang didukung oleh tulang alveolar pendukung. Adanya tulang alveolar tergantung adanya gigi, jika gigi tidak ada karena dicabut maka akan mengalami resorpsi dan bila gigi tidak erupsi maka tulang alveolar tidak berkembang (Putri *et al.*, 2010).

Jaringan tulang terdiri dari 3 sel utama yaitu osteoblas, osteoklas, dan osteosit. Osteoblas ditemukan dalam satu lapisan pada permukaan jaringan tulang (*bone lining*

cells) yang berasal dari sel mesenkim dari sumsum tulang dan berperan dalam proses pembentukan tulang. Osteosit merupakan komponen sel utama dalam jaringan tulang. Mempunyai peranan penting dalam pembentukan matriks tulang dengan cara membantu pemberian nutrisi pada tulang. Osteoklas merupakan sel yang mempunyai kemampuan mengikis tulang. Terdapat satu sel tambahan pada tulang yaitu osteoprogenitor, sel ini akan mengalami mitosis, kemudian berkembang menjadi osteoblas, sehingga menjadi lebih aktif pada saat pembentukan, perbaikan atau fraktur tulang dan menghasilkan osteosit pada permukaan dalam jaringan tulang (Rahardjo, 2009).

Osteosit yang terlepas dari lakunanya akan mempunyai kemampuan menjadi sel osteoprogenitor yang nantinya dapat berubah menjadi osteosit lagi atau osteoklas dan menjadi sel primitif yaitu menghasilkan osteoblas selama pembentukan tulang (Priyatmoko, 2014). Ada dua jenis sel osteoprogenitor yaitu preosteoblas nantinya akan menjadi osteoblas dan preosteoklas yang menghasilkan osteoklas (Ruth, 2004).

Berdasarkan biomekanik pergerakan gigi, ketika sebuah kekuatan alat ortodonti diaplikasikan pada gigi maka akan menekan tulang alveolar, akan terbagi menjadi daerah tekanan dan tarikan. Hal ini menunjukkan urutan kejadian dimana tulang alveolar yang berdekatan dengan daerah tekanan akan mengalami resorpsi, sedangkan tulang alveolar pada daerah tarikan berhubungan dengan osteogenesis atau proses pembentukan tulang (Xie *et al.*, 2008) (Gambar 2.3). Proses pergerakan gigi akan terjadi secara sempurna apabila adanya keseimbangan antara proses resorpsi tulang dan proses pembentukan tulang (Amin, 2008).



Gambar 2.3 Respon dari gaya mekanis secara continuous pada tulang alveolar pada sisi tekanan terjadi resorpsi tulang, dan pada sisi tarikan terjadi pembentukan tulang (Sumber: Sanmuganathan, 2011)

2.2.2 Teori Biomekanik Pergerakan Gigi

Terdapat dua teori biomekanik pergerakan gigi secara ortodonti, yaitu :

1. Teori Elektrisitas (*Piezoelectric*)

Piezoelectric merupakan suatu fenomena pada material organik yang berkristal akan menghasilkan suatu aliran listrik karena adanya perpindahan elektron. Bila tulang mendapatkan tekanan maka sinyal *piezoelectric* akan terlihat. Sinyal elektrik tersebut dapat mempengaruhi reseptor membran sel atau permeabilitas membran sehingga mempengaruhi aktivitas sel. Teori ini menggunakan tulang sebagai bahan atau massa, oleh sebab itu proses *piezoelectric* menjembatani *remodelling* tulang yang disebabkan oleh kekuatan ortodonti karena tulang mempunyai efek *piezoelectric* yang besar (Rahardjo, 2009). Bila matriks jaringan mengalami distorsi karena pemberian tekanan maka akan terbentuk polaritas negatif dan positif pada permukaan tulang. Aliran negatif yaitu saat tekanan (stres kompresif) yang kemudian akan mengaktifkan osteoblas, sedangkan aliran positif yaitu saat tarikan (stres tensil) yang akan mengaktifkan osteoklas. Aliran listrik ini terjadi karena adanya migrasi elektron ke kutub yang berlawanan.

Aliran *piezoelectric* ini terjadi secara terus-menerus selama pengunyahan berlangsung. Deposisi dan resorpsi tulang akan terjadi sesuai dengan jenis aliran listrik yang pada akhirnya menyebabkan *remodelling* tulang karena adanya beban yang diberikan pada tulang (Priyatmoko, 2014).

2. Teori Tekanan-Tarikan (*Pressure-Tension*)

Adanya tekanan dan tarikan pada ligamen periodontal menyebabkan perubahan aliran darah serta lama kelamaan menyebabkan gigi bergeser. Aliran darah dan oksigen berkurang pada daerah ligamen periodontal yang tertekan sedangkan pada daerah yang tertarik maka pasokan darah tetap atau bertambah (Rahardjo, 2009). Terjadi pula perubahan bentuk pembuluh darah yaitu pembuluh darah mengalami vasodilatasi pada daerah tarikan di ligamen periodontal, sedangkan pada daerah tekanan akan mengalami penyempitan pembuluh darah. Perubahan aliran darah tersebut mengakibatkan perubahan fisiologi disekitarnya dan merangsang perubahan seluler disekitar tulang alveolar gigi yang mengalami tekanan (Priyatmoko, 2014).

2.3 Sel Osteosit

2.3.1 Definisi Sel Osteosit

Sel osteosit merupakan komponen sel utama pada jaringan tulang alveolar dan menyusun mayoritas dalam sel-sel tulang, karena populasinya sekitar 10 kali lipat dari populasi sel osteoblas (Robling *et al.*, 2006). Sel osteoblas yang tertanam dalam matriks tulang sering disebut sebagai sel osteosit. Sehubungan dengan proses pembentukan tulang, beberapa osteoblas akan mengalami akumulasi matriks disekitarnya dan 5%-20% dari *mature osteoblast* akan berdiferensiasi menjadi sel osteosit (Arnett, 2003). Sel osteosit berasal dari mesenkimal sel dan turunan kedua dari osteoblas (Alberto, 2012).

2.3.2 Letak Sel Osteosit

Sel osteosit terletak di dalam suatu ruangan yang berbentuk oval yaitu lakuna. Lakuna tersebut berada di dalam matriks yang telah termineralisasi (Gambar 2.4). Lakuna memiliki penjururan halus atau celah kecil yang biasanya disebut kanalikuli (*gap junction*) (Gambar 2.5). Kanalikuli berperan sebagai penghubung antar lakuna yang berdekatan sehingga osteosit bisa mencapai pembuluh darah untuk pertukaran nutrisi dan sisa metabolisme (Priyatmoko, 2014). Selain sebagai pertukaran nutrisi juga sebagai penghantar mediator dan sinyal yang lain (Alberto, 2012).

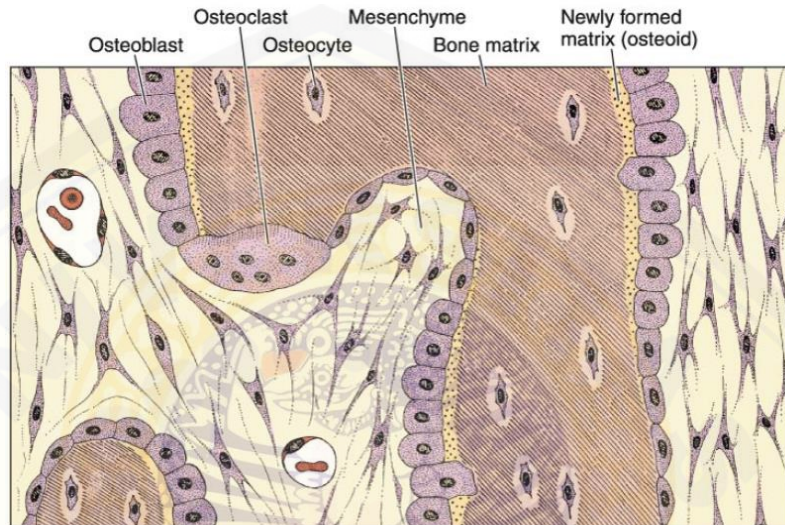
Dijelaskan juga bahwa terdapat dua tahap pada daur hidup osteosit, yaitu osteosit muda dimana selnya berukuran lebih kecil dan tinggal dalam osteoid dan tidak mengekspresikan alkaline phosphatase, kemudian osteosit tua dimana selnya berukuran lebih besar dan mengekspresikan alkaline phosphatase dan tertanam pada tulang yang termineralisasi. Sel osteosit yang besar akan degenerasi dan meninggalkan sebuah lakuna kosong. Sel osteosit yang terlepas dari lakuna mempunyai kemampuan menjadi sel osteoprogenitor yang dapat menjadi sel primitif yang menghasilkan osteoblas selama pembentukan tulang, selain itu dapat berubah menjadi osteosit lagi dan osteoklas (Paola, 2013).

2.3.3 Bentuk dan Ukuran Sel Osteosit

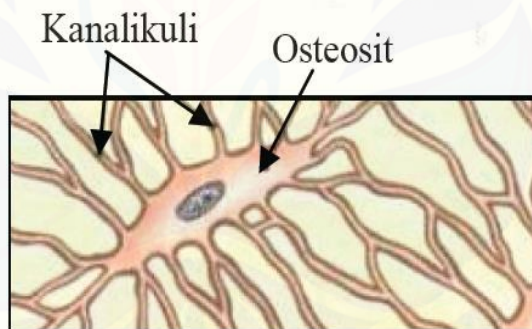
Bentuk sel osteosit apabila diamati secara histologis yaitu gepeng, mempunyai tonjolan yang bercabang. Ujung-ujung tonjolan yang berdekatan tersebut saling berhubungan melalui *gap junction* sehingga hal ini menunjukkan bahwa adanya pertukaran ion-ion diantara osteosit yang berdekatan (Gambar 2.4). Osteosit lebih kecil dibanding osteoblas, mempunyai retikulum endoplasmik dan aparatus golgi jauh lebih sedikit dibanding osteoblas serta kromatin inti yang lebih padat (Junquiera, 2007).

Ukuran sel osteosit sangat bervariasi, yaitu pada ukuran lakuna osteosit pada tikus sekitar 5 μ m sampai 20 μ m. Kanalikuli memiliki diameter yang berkisar antara 50 dan 100 nm. Sedangkan sitoplasma berukuran sekitar hampir setengah dari

diameter kanalikuli (Su *et al.*, 2006). Sitoplasma osteosit lebih kecil daripada sitoplasma osteoblas.



Gambar 2.4 Sel Tulang Osteoblas, Osteoklas, dan Osteosit
(Sumber : Junquiera dan Carneiro, 2007)



Gambar 2.5 Struktur kanalikuli dan osteosit yang terkurung di dalam lakuna
(Sumber : Junquiera dan Carneiro, 2007)

2.3.4 Peran Sel Osteosit pada Pergerakan Gigi

Tulang sangat peka oleh tekanan mekanis sehingga dapat merubah bentuk tulang. Sel-sel tulang dapat merespon berbagai rangsangan mekanis termasuk tekanan, tarikan dan aliran cairan jaringan (Weyts *et al.*, 2003). Mengingat bahwa osteosit merupakan differensiasi akhir dari osteoblas. Namun, osteosit tidak seperti osteoblas, karena osteosit tersimpan di dalam matriks tulang yang termineralisasi.

Menurut teori osteosit bertugas untuk mendeteksi adanya gangguan yang terjadi. Oleh karena itu, diduga bahwa osteosit memegang peranan penting yaitu sebagai pusat yang mengontrol terjadinya *remodelling* tulang, dimana secara fisik memicu untuk mengatur hemostasis tulang setempat (Noble, 2008). Osteosit kemungkinan besar dapat mendeteksi beberapa perubahan dan kerusakan tulang melalui dendrit-dendrit di sepanjang tulang dalam sistem kanalikuli dan dapat memberikan sinyal untuk perbaikan (Verbogt *et al.*, 2000). Kemudian juga diikuti terjadinya resorpsi. Aliran *bone fluid* di dalam kanalikuli melewati lapisan tipis dari matriks yang tidak termineralisasi disekitar badan sel dan proses sel osteosit yang mengakibatkan tekanan pada membran selnya sehingga dapat mengaktifasi osteosit (Goulet *et al.*, 2008).

Pada saat aplikasi gaya ortodonti, maka sel osteosit akan bertindak sebagai *mechanosensor* dan *mechanotransduction* tulang yang merespon dan mendeteksi perubahan yang terjadi pada tulang alveolar (Tatsumi *et al.*, 2007). Setelah osteosit teraktivasi, maka osteosit akan menerjemahkan rangsangan tersebut menjadi berbagai macam sinyal biokimia (Verbogt *et al.*, 2000) dan akan menimbulkan efek ke sel-sel tulang yang lain yaitu osteoblas dan osteoklas (Taylor *et al.*, 2007). Osteosit merespon adanya aliran *bone fluid* dengan memproduksi mediator kimia seperti *nitric oxide* (NO) dan prostaglandin. Mediator kimia tersebut dapat digunakan sebagai tanda bahwa sel telah aktif setelah pengaplikasian gaya ortodonti (Westbroek, 2000). Osteosit akan mengatur terjadinya resorpsi tulang tersebut dengan mendeteksi perubahan aliran *bone fluid* melalui kanalikuli tulang, kemudian memberikan sinyal ke osteoblas dan selanjutnya menstimulasi diferensiasi osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang (Wongdee dan Charoenphandhu, 2011).

2.4 Efek Kafein Terhadap Sel Osteosit dan Pergerakan Gigi

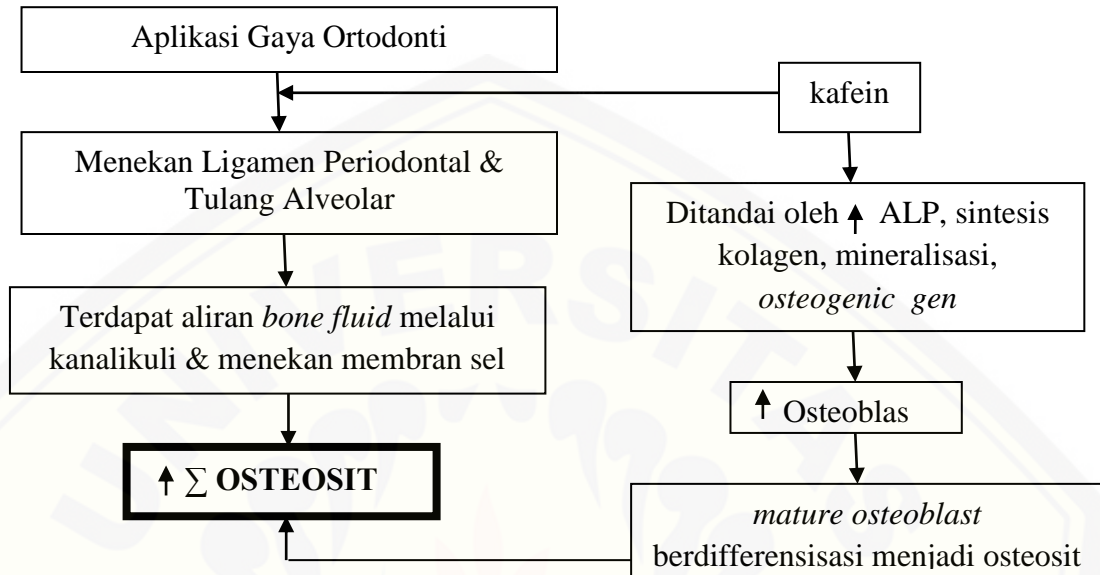
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wink *et al.* (1996) mengenai efek kafein pada sel-sel tulang dan pertumbuhan tulang pada tikus dengan dosis 4mg/100grBB pada hari ke 11, 15, 22, dan 50 menunjukkan jumlah osteosit lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kafein memiliki efek langsung dan efek tidak langsung. Efek langsung dari kafein adalah dapat menurunkan konsentrasi Zn dan Cu di plasma dan tulang sehingga mengganggu proses *manufacturing* tulang atau juga dapat menurunkan jumlah osteoblas yang akan berdiferensiasi menjadi osteosit sehingga osteosit terlihat lebih sedikit. Zink berperan penting dalam pertahanan dari struktur dan fungsi membran sel. Terjadinya penurunan konsentrasi Zn menyebabkan reduksi aktivitas osteoblas, kolagen, dan aktivitas alkaline phosphat. Sedangkan efek tidak langsung dari kafein adalah dapat merusak enzim-enzim untuk keberlangsungan respirasi sel karena adanya ROS (*Reactive Oxygen Species*).

Namun, hasil penelitian tersebut berbeda dengan hasil penelitian Reis *et al.* (2015), memberikan dosis kafein sebesar 25, 50, dan 100mg/kg selama 7, 14, dan 21 hari menunjukkan peningkatan jumlah osteoblas yang ditandai dengan meningkatnya jumlah *Alkaline Phosphatase* (ALP), kolagen, mineralisasi, dan ekspresi *osteogenic genes* seperti osteocalcin, osteopontin, Runx-2, dan kolagen tipe-I. Jadi, dengan mengonsumsi kafein proses pembentukan tulang tidak terganggu dan jumlah sel osteoblas yang akan berdiferensiasi menjadi osteosit dapat meningkat.

Menurut Li (2014), kafein yang terkandung dalam biji kopi dapat memberikan efek pada proses metabolisme tulang melalui proses regulasi osteoklas, osteoblas, dan keseimbangan kalsium. Pada studi ini ditemukan bahwa mengonsumsi kopi dapat mempercepat pergerakan gigi, karena efek dari kafein yang terkandung di dalam kopi tersebut dapat mempengaruhi peningkatan proses osteoklastogenesis melalui peningkatan *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand* (RANKL) yang berfungsi sebagai aktivator osteoklas. Jadi, efek kafein hanya bekerja pada tahap awal fase resorpsi tulang alveolar.

Berdasarkan penelitian Liu (2011), konsumsi kopi bisa membantu mempercepat pergerakan gigi ortodonti karena kafein dapat merusak keseimbangan kalsium pada tulang dengan terjadinya peningkatan ekskresi kalsium melalui urin. Hal ini disebabkan karena adenosin diblok sehingga dapat meningkatkan konsentrasi *Cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) dan akibatnya *Bone Mineral Density* (BMD) juga menurun. Oleh karena itu dapat membantu mempercepat pergerakan gigi. Namun, kafein jangka panjang menginduksi peningkatan absorpsi kalsium melalui peningkatan produksi 1,25-(OH)₂-D. Hal ini mengindikasikan bahwa berkurangnya BMD adalah sementara dan akan kembali ke level normal. Berkurangnya kepadatan tulang dapat diakibatkan oleh berkurangnya jumlah sel osteosit atau kurangnya kadar mineral dan sebaliknya jika jumlah osteosit bertambah maka proses pembentukan tulang tidak terganggu karena kafein (Manolagas, 2000).

2.5 Kerangka Konsep



Keterangan :

Aplikasi alat ortodonti pada gigi tikus menggunakan *Ni-Ti closed coil spring wire* dengan gaya sebesar 10 gr/cm² dan diberikan kafein dengan dosis 1,37mg/100grBB tikus. Ligamen periodontal dan tulang alveolar tertekan dan terbentuk daerah tekanan dimana terjadi resorpsi tulang alveolar oleh osteoklas dan daerah tarikan dimana terjadi pembentukan tulang oleh osteoblas. Penelitian ini mengamati daerah tekanan, karena merupakan daerah ligamen periodontal dan tulang alveolar yang menerima sinyal pertama saat diaplikasikan alat ortodonti (Henneman *et al.*, 2008). Tekanan alat ortodonti tersebut mengakibatkan terdapat aliran *bone fluid* pada tulang alveolar melalui kanalikuli atau *gap junction* sehingga menekan membran sel dan mengaktivasi osteosit. Osteosit merupakan sel tulang yang merespon perubahan yang terjadi pertama kali saat diaplikasikan alat ortodonti (Bakker *et al.*, 2001). Kemudian sel osteosit akan menjalankan tugasnya sebagai *mechanosensor* dan *mechanotransduction* tulang apabila tekanan maupun rangsangan

(Tatsumi *et al.*, 2007). Osteosit dapat berperan dalam mengatur keseimbangan antara resorpsi tulang dan aposisi tulang sehingga terjadi *remodelling* tulang (Noble *et al.*, 2008). Kafein dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas yang ditandai oleh peningkatan aktivitas *Alkaline Phosphatase* (ALP), sintesis kolagen, dan *osteogenic gen* seperti osteocalcin, osteopontin, RUNX2 dan *type-I collagen* (Ries *et al.*, 2015). Kemudian 5%-20% *mature osteoblast* akan berdifferensiasi menjadi osteosit sehingga bisa menambah jumlah osteosit yang telah ada di tulang alveolar (Arnett, 2003).

2.6 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini yaitu kafein dapat meningkatkan jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar gigi tikus yang diinduksi gaya ortodonti.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris (Notoatmojo, 2002).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post test control group design* (Notoatmojo, 2002).

3.3 Tempat dan Waktu penelitian

3.3.1 Tempat Penelitian

- a. Laboratorium Fisiologi bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, untuk keseluruhan proses perlakuan hewan coba dan pengambilan hewan coba.
- b. Laboratorium Patologi Anatomi Universitas Brawijaya dan RSUD Dr. Soetomo Surabaya, untuk proses pembuatan preparat jaringan.
- c. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, untuk pemeriksaan dan penghitungan preparat jaringan.

3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari 2015 – November 2015.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi Penelitian

Populasi adalah suatu wilayah yang terdiri atas obyek atau subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Populasi penelitian ini adalah hewan coba tikus *Sprague Dawley*.

3.4.2 Sampel Penelitian

a. Kriteria Sampel Penelitian

Pemilihan sampel penelitian dengan menggunakan *Purposive Sampling* atau *Judgmental Sampling*, merupakan cara penarikan sampel yang dilakukan untuk memilih subjek berdasarkan kriteria spesifik yang ditetapkan peneliti (Arikunto, 2006). Berikut ini adalah kriteria sampel penelitian :

1. Tikus Sprague Dawley
2. Jenis kelamin jantan
3. Kondisi fisik sehat
4. Berat badan ≥ 250 gram
5. Umur 3 bulan (Xin *et al.*, 2012)

b. Besar Sampel

Besar sampel dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

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

Keterangan :

n = jumlah sampel minimum

σ = standar deviasi sampel

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

Z = konstanta pada tingkat kesalahan tertentu,

 jika $\alpha=0,05$ maka $Z=1,96$

Penghitungan :

$$\begin{aligned}n &= \frac{z^2 \cdot \sigma^2}{d^2} \\ &= (1,96)^2 \\ &= 3,84 \approx 4\end{aligned}$$

Jumlah sampel yang digunakan penelitian ini adalah 4 sampel dalam setiap kelompok perlakuan. Penelitian ini menggunakan 8 ekor tikus sebagai sampel yang terbagi menjadi 2 kelompok yaitu terdiri dari 4 ekor tikus untuk setiap kelompok (Daniel, 2005).

3.5 Kriteria Inklusi, Eksklusi, dan *Drop Out*

a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah umur 3 bulan, jenis kelamin jantan, berat badan ≥ 250 gram, dan kondisi hewan coba sehat yang tidak ada kelainan fisik, nafsu makan baik, perilaku normal.

b. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah hewan coba berperilaku tidak normal atau berperilaku agresif selama penelitian, penurunan berat badan secara drastis, memiliki penyakit atau cedera fisik saat beradaptasi dengan kondisi lingkungan yang sesuai (selama 7 hari).

c. *Drop Out*

Hewan coba dinyatakan *drop out* apabila mati selama penelitian dan spesimen tidak dapat diamati.

3.6 Identifikasi Variabel Penelitian

3.6.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kafein.

Definisi Operasional

Kafein merupakan bubuk kafein jadi yang berwarna putih, rasanya pahit, dan tidak berbau yang diperoleh dari produk TCI-Amerika-United States.

Metode

Bubuk kafein dilarutkan dengan 2ml aquades dan diaduk, kemudian diberikan kepada hewan coba kelompok perlakuan kafein dengan cara disondase setiap hari selama 21 hari.

3.6.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah sel osteosit.

Definisi Operasional

a) Sel Osteosit

Sel osteosit merupakan sel berbentuk bulat, oval atau gepeng, inti sel berwarna ungu tua, terletak di dalam suatu ruangan berbentuk bulat atau oval yang disebut lakuna (satu lakuna untuk satu osteosit) pada tulang alveolar di daerah tekanan.

b) Daerah Tekanan

Daerah tekanan adalah daerah di sebelah mesial gigi molar satu yang diinduksi gaya ortodonti sebesar 10 gr/cm² selama 21 hari.

Metode

Sel osteosit secara histologi diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x yang dihitung pada daerah tekanan tulang alveolar tikus.

3.6.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu:

- a. Jenis makanan dan minuman hewan coba
- b. Kriteria hewan coba (*Tikus Sprague Dawley*)
 1. Jenis kelamin hewan coba
 2. Berat badan hewan coba
 3. Umur hewan coba
- c. Alat ortodonti dan cara pemasangan
- d. Gaya *Ni-Ti closed coil spring* 10gr/cm²
- e. Prosedur penelitian

3.7 Bahan dan Alat Penelitian

3.7.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- a. Hewan coba yaitu tikus jantan *Sprague Dawley* (Lampiran A)
- b. Bubuk kafein (TCI, America United State)
- c. Eter Chloroform dan ketamine (@*KTM-100* Tangerang-Indonesia)
- d. Aquades steril
- e. Formalin 10%
- f. EDTA 10%
- g. Alkohol 30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 100%
- h. Xylol
- i. Gelatin 5%
- j. Hematoksilin Eosin (HE)
- k. Embedding paraffin
- l. Semen Glass Ionomer (GC Fuji IX)
- m. Entellan
- n. PBS (Bio World, USA)
- o. Kapas steril

- p. Label
- q. Kertas saring
- r. Betadine
- s. Minuman dan makanan pelet (Turbo)
- t. Sarung tangan dan masker (Maxter dan Diapro)

3.7.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- a. Kandang pemeliharaan hewan coba, ukuran P= ± 34 cm, L= $\pm 26,5$ cm, T= ± 12 cm
- b. Tempat makan dan minum hewan coba
- c. *Ni-Ti closed coil spring* (OrtoTech, America United State)
- d. *Tension gauge*
- e. Timbangan digital (Precision Balance)
- f. *Disposable syringe* (Terumo Syringe, Japan)
- g. Sonde setengah lingkaran
- h. Gelas ukur
- i. Erlenmeyer
- j. Beaker glass
- k. *Blade* dan *scalpel*
- l. Gunting bedah
- m. Pinset
- n. Botol spitton
- o. Cetakan paraffin
- p. Mikrotom (Leica RM 2135)
- q. Blok holder mikrotom
- r. Waterbath (Memert, Japan)
- s. Hot plate
- t. Oven (Memert, Japan)
- u. Kuas kecil

- v. Mikroskop cahaya (Olympus CX21)
- w. *Object glass* (Ctripus, China)
- x. *Cover glass*
- y. Sonde lambung
- z. Bur low speed

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan *Ethical Clearance*

Sebelum penelitian dimulai, mengajukan pembuatan *Ethical Clearance* ke Komisi Kelayakan Etik Penelitian Kesehatan (KKEPK), Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga (Lampiran B).

3.8.2 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba diadaptasikan selama satu minggu dengan tempat tinggal dan makanan sebelum diberikan perlakuan untuk proses aklimisasi.

3.8.3 Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Berat badan hewan coba ditimbang dengan menggunakan timbangan digital sampai memenuhi ≥ 250 gram per ekor.

3.8.4 Pembagian Kelompok Perlakuan

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

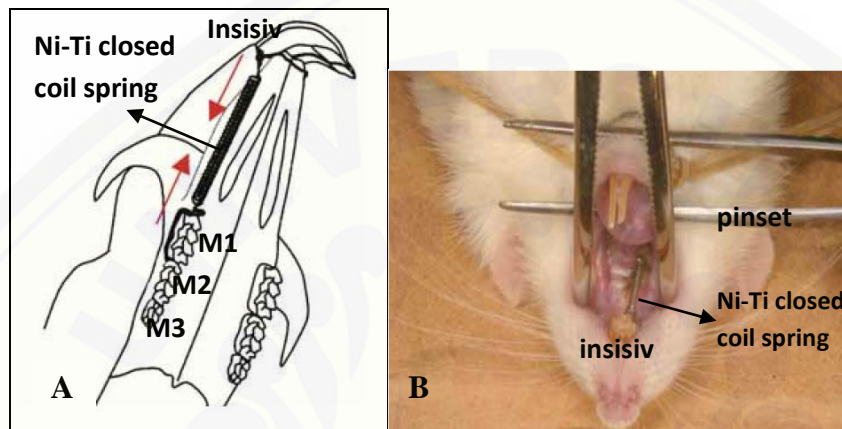
- a. Kelompok I (4 ekor) merupakan kelompok kontrol negatif yang diberi induksi gaya mekanis ortodonti berupa pemasangan *Ni-Ti closed coil spring* dengan panjang 6 mm, diameter 0,012 inch, dan memiliki gaya sebesar 10 gr/cm² dan aquades selama 21 hari.
- b. Kelompok II (4 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi induksi gaya mekanis ortodonti berupa pemasangan *Ni-Ti closed coil spring* dengan panjang 6 mm, diameter 0,012 inch, dan memiliki gaya 10gr/cm² dan kafein. Disondase pada lambung tikus selama 21 hari serta dosis kafein disesuaikan dengan berat badan tikus.

3.8.5 Pemasangan *Ni-Ti closed coil spring*

Pemasangan Koil spring pada gigi hewan coba (Gambar 3.1) dengan cara, sebagai berikut :

1. Hewan coba dianestesi terlebih dahulu menggunakan ketamine dengan dosis 0,2ml/grBB dengan cara menyuntikkan ke paha bagian belakang hewan coba yaitu secara intramuscular pada muskulus quadricep/tricep (Lampiran C). Anestesi ini dilakukan supaya hewan coba tidak merasa kesakitan dan bisa tenang saat dilakukan pemasangan *Ni-Ti closed coil spring*
2. Meletakkan hewan coba pada papan hewan coba dengan cara menelentangkan tubuh hewan coba dan mengikat keempat kaki dan kepala dengan kawat
3. Membuka mulut hewan coba dengan alat bantu agar mulut hewan coba terbuka selama pemasangan *Ni-Ti closed coil spring*
4. Mengikat kawat yang sudah dipotong pendek (*acrhwire*) sesuai kebutuhan pada masing-masing ujung koil spring
5. Membuat tempat untuk melekatkan salah satu kawat di ujung koil spring tadi pada kedua gigi insisivus dengan cara membuat seperti cerukan di bagian cervical gigi menggunakan bur *low speed* dan mata bur *wheel* kecil
6. *Archwire* pada ujung koil spring dililitkan pada gigi molar pertama, dengan cara memasukkan kawat pada sela-sela antara gigi molar pertama dengan gigi molar kedua. Setelah itu dibuat simpul dan diikat dengan kuat. Gaya ortodonti sebesar 10gr/cm² telah diukur sebelumnya dengan menggunakan *Tension Gauge*
7. Melilitkan kawat pada bagian cerukan gigi insisivus tersebut kemudian membuat tali simpul untuk mengikat dengan erat agar kawat tidak terlepas. Mengikat kawat pada kedua gigi insisivus sebagai retensi atau tumpuan saat menarik gigi molar pertama agar terjadi pergeseran
8. Memotong ujung kawat yang tersisa menggunakan gunting
9. Menutup hasil potongan kawat pada simpul dengan Semen *Glass Ionomer* menggunakan ujung sonde supaya ujung kawat tidak melukai jaringan lunak di dalam rongga mulut hewan coba

10. Menunggu Semen *Glass Ionomer* sampai kering \pm 2-5 menit agar tidak larut oleh saliva dan darah yang keluar, kemudian boleh menutup mulut hewan coba
11. Membersihkan darah yang keluar menggunakan kapas atau kasa apabila keluar darah. Kemudian mengoleskan betadine apabila terjadi luka saat pemasangan agar tidak terjadi infeksi pada hewan coba.



Gambar 3.1 **Pemasangan *Ni-Ti closed coil spring* pada tikus.** A. Ilustrasi pemasangan *Ni-Ti closed coil spring* dengan gaya $10\text{gr}/\text{cm}^2$ yang dililitkan pada M1 rahang atas kanan supaya M1 tertarik ke mesial dan insisivus sebagai gigi penjangkar. B. *Ni-Ti closed coil spring* yang telah terpasang pada gigi M1 dan Insisivus tikus.

3.8.6 Pemberian Kafein

Pemberian kafein diberikan sejak awal pemasangan *Ni-Ti closed coil spring* sampai dengan hari ke-21. Diberikan secara peroral dengan menggunakan sonde lambung atau disondase. Volume larutan kafein sesuai dengan konversi perhitungan dosis kafein berdasarkan berat badan tikus sehingga dosis yang diberikan pada setiap tikus akan berbeda.

3.8.7 Dosis Kafein

Penelitian ini dengan memberikan kafein pada hewan coba, dimana kafein yang diberikan berasal dari kopi bubuk Robusta yang diproduksi oleh PTPN X Jember. Penghitungan dosis kafein setara dengan satu cangkir seduhan kopi pada manusia yaitu 1 sendok makan kopi bubuk sebesar 10 gram yang dilarutkan dalam 150 ml air/1 cangkir. Jadi dosis kafein yang diberikan pada tikus sebesar 1,37mg/100grBB tikus (Lampiran D).

3.8.8 Pembuatan Sediaan Histologi

3.8.8.1 Pengambilan Sampel Jaringan

Pengambilan jaringan dilakukan dengan cara mengeuthanasia hewan coba pada hari ke-22. Berikut ini tahapan pengambilan jaringan, yaitu :

1. Melakukan anastesi pada hewan coba dengan cara inhalasi menggunakan eter yang ada di dalam tabung berisi kapas, kemudian memasukkan hewan coba ke dalam tabung, menutup tabung dan menunggu sampai hewan coba mati
2. Mengambil hewan coba yang sudah mati, kemudian menelentangkannya pada papan bedah untuk dibedah
3. Membuka sudut-sudut mulut hewan coba menggunakan gunting bedah agar lapang pandang lebih luas sehingga memudahkan peneliti untuk mengambil jaringan
4. Memotong bagian rahang atas kanan yang digunakan sebagai penelitian menggunakan bur yaitu pada regio molar pertama sampai molar ketiga. *Ni-Ti closed coil spring* dibiarkan tetap terpasang.

3.8.8.2 Menyimpan hasil potongan jaringan ke dalam botol-botol kecil berbentuk tabung yang sudah diisi dengan formalin 10 %. Jaringan harus terendam semua oleh formalin minimal selama 24 jam. Bertujuan untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi sel seperti semula, dan mencegah pertumbuhan bakteri maupun jamur.

3.8.8.3 Perendaman dalam Larutan Dekalsifikasi

Perendaman dalam larutan dekalsifikasi menggunakan EDTA 10% selama 1,5 bulan. Proses ini bertujuan agar garam-garam kalsium dari jaringan tulang dan gigi hilang sehingga dapat membuat tulang dan gigi menjadi lunak, dan memudahkan proses pemotongan.

3.8.8.4 Dehidrasi jaringan

Tahapan berikutnya adalah dehidrasi jaringan supaya air di dalam jaringan dapat ditarik. Dehidrasi jaringan menggunakan konsentrasi alkohol yang bertingkat, yaitu dengan alkohol 30%, 50%, 70%, 80%, 96%, dan absolut masing-masing selama 60 menit.

3.8.8.5 *Clearing*

Tahapan selanjutnya adalah *clearing* yang bertujuan untuk menjernihkan jaringan. Proses ini menggunakan *xylol* sebanyak 2 kali yang masing-masing selama 60 menit.

3.8.8.6 Impregnasi

Setelah tahapan *clearing* adalah proses impregnasi, merupakan tahapan infiltrasi bahan *embedding* dalam jaringan menggunakan parafin cair bersuhu 48⁰C.

3.8.8.7 *Embedding*

Proses *embedding* merupakan penanaman jaringan dalam parafin. Kemudian dilakukan *block* dalam parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari.

3.8.8.8 Pemotongan (*section*) blok parafin

Tahapan ini bertujuan untuk membuat preparat histologi. Adapun caranya adalah keesokan harinya ditempelkan pada holder dan dilakukan pemotongan setebal 4-6 μ m dengan *rotary microtome*. Dilakukan *mounting* pada gelas obyek dengan gelatin 5%.

3.8.9 Pengecatan Haematoksin Eosin (HE)

Melihat jumlah sel osteosit secara histologi pada jaringan tulang alveolar dengan menggunakan pengecatan HE, karena pewarnaan menggunakan HE bermanfaat untuk mengidentifikasi komponen-komponen sel suatu jaringan dari organ tubuh hewan coba (Muntiha, 2001). Berikut ini adalah tahapan pewarnaan (*staining*), yaitu :

1. Deparafinasi

Tahapan deparafinasi bertujuan untuk menghilangkan parafin dari jaringan dengan cara memasukkan gelas obyek hasil *parafin block* ke dalam xilol dilakukan 2 kali dan masing-masing selama 5 menit

2. Rehidrasi

Tahapan rehidrasi bertujuan untuk memasukkan air ke dalam jaringan supaya air tersebut dapat mengisi rongga-rongga jaringan yang kosong. Bahan yang digunakan yaitu alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing selama 5 menit

3. Kemudian dibilas dalam H₂O selama 5 menit

4. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit

5. Kemudian diwarnai dengan hematoksin selama 10 menit

6. Setelah itu, direndam dalam *tap water* selama 10 menit. Kemudian dibilas dengan H₂O

7. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol berseri 30% dan 50% masing-masing selama 5 menit

8. Kemudian diwarnai dengan larutan Eosin selama 3 menit.

9. Setelah itu dibilas dengan alkohol 30%

10. Dicuci dengan H₂O selama 5 menit dan dikeringkan

11. Kemudian dilakukan *mounting* (penutupan jaringan) dengan *entellan* dan tutup dengan *cover glass*. Membersihkan sisa *entellan* yang telah meleleh keluar menggunakan kapas yang sudah terbasahi xilol.

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

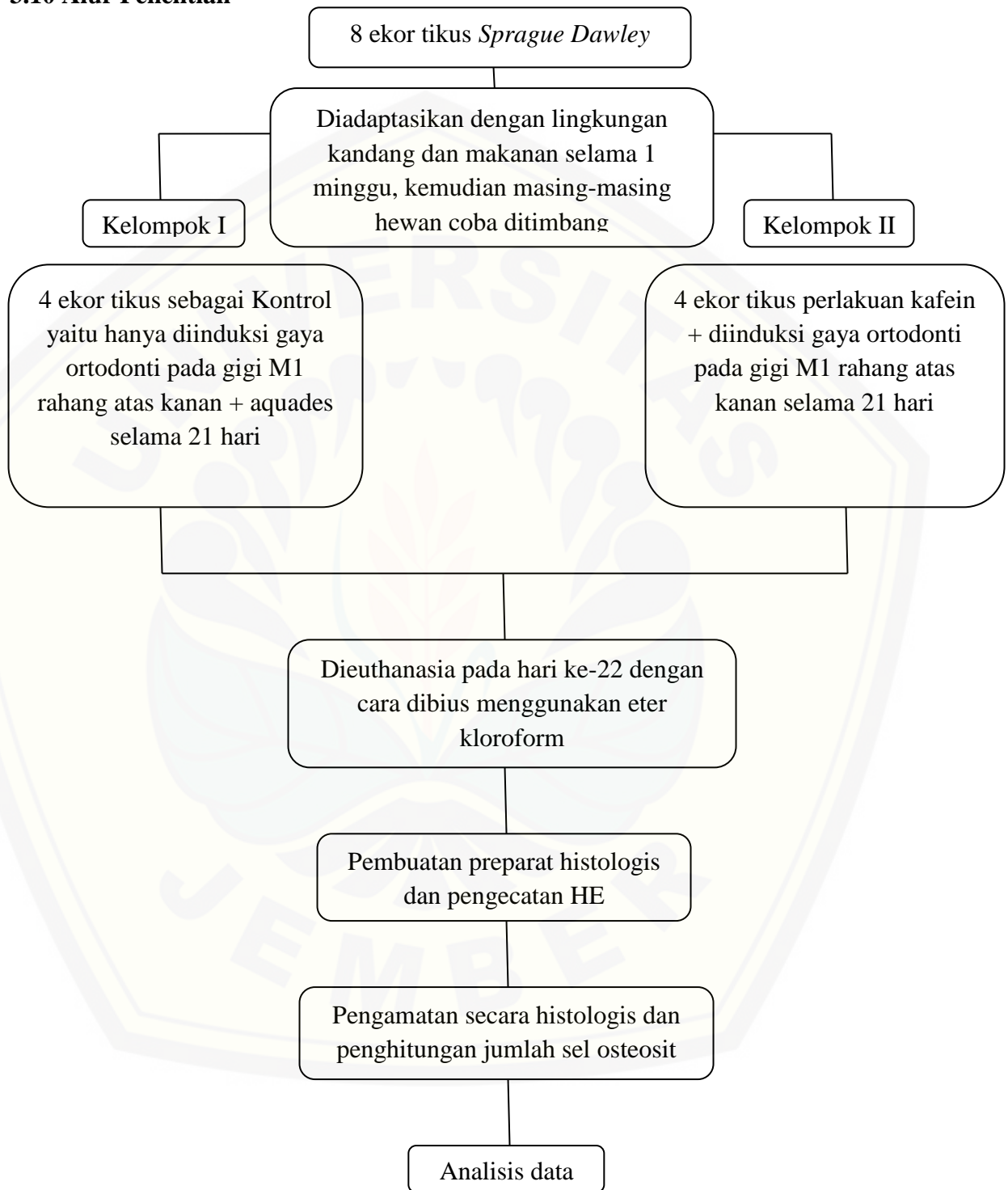
(Lab.PA Universitas Brawijaya)

3.8.10 Pengamatan dan Penghitungan Jumlah Sel Osteosit

Pengamatan sediaan histologis menggunakan mikroskop cahaya binokuler dengan lensa obyektif perbesaran 400x untuk menentukan daerah penghitungan. Setiap preparat berisi 2 sampai 3 potongan jaringan (ulangan) yang nantinya dipilih satu ulangan yang paling bagus. Preparat jaringan yang akan diamati harus terlihat jaringan gigi, ligamen periodontal dan tulang alveolar pada perbesaran 40x, hal ini untuk memudahkan menentukan daerah tekanan. Perhitungan jumlah sel osteosit dengan cara melihat 3 lapang pandang terpilih, yaitu pada puncak tulang alveolar, sepertiga tengah dan sepertiga apikal pada tulang alveolar di daerah tekanan gigi M1 rahang atas kanan. Setiap preparat masing-masing diamati oleh 3 orang pengamat yang berbeda dan dihitung jumlah sel osteosit sesuai dengan lapang pandang yang telah diamati, kemudian hasil pengamatan lapang pandang setiap pengamat dijumlahkan, setelah itu dirata-rata.

3.9 Analisis Data

Data perhitungan jumlah sel osteosit yang telah dianalisis dengan uji normalitas yaitu uji *Kolmogorov-Smirnov* dan dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene's Test* dengan nilai signifikansi 95% ($p \geq 0,05$). Selanjutnya data uji parametrik *Independent T* dengan nilai signifikansi 95% ($p < 0,05$) (Notoatmojo, 2002).

3.10 Alur Penelitian

Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa kafein dapat meningkatkan jumlah sel osteosit pada daerah tekanan tulang alveolar gigi tikus yang diinduksi gaya ortodonti namun peningkatan tersebut tidak signifikan.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, peneliti dapat memberikan saran, yaitu perlu penelitian lebih lanjut yang sama dengan variasi dosis kafein mulai dari dosis rendah sampai dosis tinggi, jangka waktu pemberian kafein dimulai dari hari ke 7 dan 14. Selain itu, kekuatan induksi gaya ortodonti yang bervariasi dan perlu dilakukan penambahan jumlah sampel dan kelompok perlakuan. Hal ini untuk mengetahui pengaruh kafein pada proses *remodelling* tulang pada perawatan ortodonti. Sebelum melakukan penelitian sebaiknya melakukan *trial* terlebih dahulu. Peneliti benar-benar mengikuti seluruh proses histologi yang sesuai dengan waktu dan prosedur yang semestinya serta peneliti diberi latihan untuk menggunakan mikrotom dengan benar.

DAFTAR PUSTAKA

- Alamsyah, A. N. 2006. *Taklukkan Penyakit Dengan Teh Hijau*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Alberto, Consolaro. 2012. *Advances in Knowledge About Induced Tooth Movement Part 1: The Osteocytes*. 2012. Dental Press Journal of Orthodontics. Vol. 17(3).
- Amin, M. N. 2008. *Aspek Seluler Pergerakan Gigi*. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Jember. Vol. 6 (1): 9-16.
- Arnett, T. 2003. *Bone Structure and Bone Remodelling*. Ph.D, Thesis. London University College.
- Bakker, A., Soejima, K., Klein-Neulend, J., Burger, E. 2001. *The Production of Nitric Oxide and Prostaglandin E(2) by Primary Bone Cells is Sear Stress Dependent*. Journal of Biomechanics, 34:671-677.
- Compose, M. J., De Albuquerque, E. G., Pinto, B. C., Hungaro, H. M., Gravina, M. A., Fraga, M. R. 2012. *The Role of Orthodontic Tooth Movement in Bone and Root Mineral Density: a Study of Patients Submitted and not Submitted to Orthodontic Treatment*. Medical Science Monitor. CR752-CR757.
- Daniel, W. 2005. *Biostatistics a Foundation for Analysis in the Health Science 5th edition*. Canada: John Wiley and Sons, Inc. Hal: 82-85.
- Goulet, G., Coper, D., Commbe, D., Zernicke, R. 2008. *Influence of Cortical Canal Architecture on Lacunacanalicular Pore Pressure and Fluid Flow*. Computerised Methods Biomechanical and Biomedical Engineering. 11:379-387.
- Henneman, S., Von de Hoff, J. W., Maltha, J. C. 2008. *Mechanobiology of Tooth Movement*. European Journal of Orthodontics. 30:299-306.
- Hill, P. A. 1998. *Bone Remodelling*. British Orthodontic Society. Vol. 25:101-107.
- Li, Y. 2014. *Drinking Coffee Accelerated Orthodontic Tooth Movement through Enhancing Osteoclastogenesis*. Jurnal International Association for Dental Research.

- Liska, K. 2004. *Drugs and The Body with Implication for Society*. Edisi ke-7. New 1 Jersey: Pearson.
- Liu Shing Hwa, Chen Chinliang, Yang Rong Sen, Yuan Peng Yen, Yang Ya Ting, and Tsai Chingmin. 2011. *Caffeine Enhances Osteoclast Differentiation From Bone Marrow Hematopoietic Cells And Reduces Bone Mineral Density In Growing Rats*. *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 29, issue 6, pp 954–960.
- Junqueira, L., Carneiro, C. J. 2007. *Text & Atlas Histologi Dasar*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Manolagas, S. C. 2000. *Birth and Death of Bone Cells, Basic Regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and Treatment of Osteoporosis*. *Endocrine Review*. 21(2):115-137.
- Massey, L.K., Whiting, S. J. 1993. *Caffeine, Urinary Calcium, Calcium Metabolism, and Bone*. *Journal of Nutrition*. 123(9):1611-1614.
- Muntiha, Mohammad. 2001. *Teknik Pembuatan Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE)*. Temu Teknis Fungsional Non Peneliti. Bogor: Balai Penelitian Veteriner.
- Narmada, I.B., Syafei, A. 2008. *The Role of Mechanical Force in Molecular and Cellular During Orthodontic Tooth Movement*. *Indonesian Journal of Dentistry*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Vol. 15 (3): 226-231
- Noble, B. S. 2008. *The osteocyte lineage*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 473:106-111.
- Notoatmojo, S. 2002. *Metodologi Penelitian*. (Edisi Revisi). Jakarta: PT. Rineka Pustaka.
- Paola, Pajevic, D. 2013. *Recent Progress in Osteocyte Research*. *Article Review EnM*. 28:255-261.
- Putri, Hiranya, Herijulianti, Eliza, dan Nurjannah, Neneng. 2010. *Ilmu Pencegahan Penyakit Keras dan Jaringan Pendukung Gigi*. Jakarta: EGC. Hal: 25–50.
- Prijatmoko, D. 2014. *Biomekanik Pergerakan Gigi*. Jakarta : CV Sagung Seto.
- Rahardjo, Pambudi. 2009. *Ortodonti Dasar*. Surabaya : Airlangga University Press.

- Raputri, P. B., Gallagher, J. C., Nawaz, Z. 2007. *Caffeine Decrease Vitamin D Receptor Protein Expression and 1,25(OH)₂D₃ Stimulated Alkaline Phosphatase Activity in Human Osteoblast Cells*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103:368-371.
- Reis, Amanda Sena, Riberio Lorena Gabriela Rocha, Ocarino Natalia de Melo, Goes Alfredo Miranda, Serakides Rogeria. 2015. *Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy*. *BMD Musculoskeletal Disorders*, 16:10.
- Ren, Y., Maltha, J. C., dan Kuijpers-Jagtman, A. M. 2004. *The Rat As A Model for Orthodontic Tooth Movement-A Critical Review and A Proposed Solution*. *European Journal of Orthodontic*. Vol. 26 (5): 483-490.
- Robling, A., Niziolek, P., Baldrige, L., Condon, K., Allen, M., Alam, I. 2006. *Mechanical Stimulation of Bone in vivo Reduces Osteocyte Expression of SOST/Sclerostin*. *Journal of Biological Chemistry*, 283:5866-5875.
- Ruth, M. S. 2004. *Pergerakan Biomekanik Gigi dalam Perawatan Ortodonsia*. *Dental Journal*. Vol. 37 (1): 12-14.
- Sakamoto, W., Nishihira, J., Fujie, K., Lizuka, T., Handa, H., Ozaki, M. 2001. *Effects of Consumption on Bone Metabolism*. *Bone*, 28(3):332-336.
- Sanmuganathan, Dinesh. 2011. *The Role of the Osteocyte in Orthodontic Tooth Movement in the Rat Dento-alveolar Complex*. The University of Adelaide Australia, page 29.
- Santoso, I. E. 2011. *Buku Ajar Etik Penelitian Kesehatan*. Malang: Universitas Brawijaya Press.
- Su, M., Jiang, H., Zhang, P., Liu, Y., Wang, E., Hsu, A. 2006. *Knee-loading Modality Drives Molecular Transport in Mouse Femur*. *Annals of Biomedical Engineering* 34:1600-1606.
- Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K. 2007. *Targeted Ablation of Osteocytes Induces Osteoporosis with Defective Mechanotransduction*. *Cell Metabolism*. Vol. 5(6):464-475.

- Taylor, A. F., Saunders, M. M., Shingle, D. L., Cimbala, J. M., Zhou, Z. 2007. *Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions*. Am Physiol Cell Physiol. 292: C545-C552.
- Verbogt, O., Gibson, G., Schaffler, M. 2000. *Loss of Osteocyte Integrity in Association with Microdamage and Bone Remodelling After Fatigue in Vivo*. Journal of Bone and Mineral Research. Vol. 15(1): 60-67.
- Violita, R. E. 2011. *Kopi*. Artikel Ilmu Bahan Makanan Bahan Penyegar. Semarang: Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Westbroek, I. 2000. *Differential Stimulation of Prostaglandin G/Hsynthase-2 in Osteocytes and Other Osteogenic Cells by Pulsating Fluid Flow*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 268:414-419.
- Weyts, F., Bosmans, B., Niesling, R., van Leeuwen, P., Weinans, H. 2003. *Mechanical Control of Human Osteoblast Apoptosis and proliferation in Relation to Differentiation*. Calcified Tissue International, 72:505-512.
- Wink, C. S., Rosswska, M. J., Nakamoto, T. 1996. *Effects of Caffeine on Bone Cells and Bone Development in Fast-Growing Rats*. The Anatomical Record, 246:30-38.
- Wongdee, K., Charoenphandhu, N. 2011. *Osteoporosis in Diabetes Mellitus: Possible Cellular and Molecular Mechanism*. World Journal of Diabetes, 2(3):41-48.
- Xie, R., Kuljpers-Jagtman, A. M., Maltha, J. C. 2008. *Osteoclasts Differentiation During Experimental Tooth Movement by a Short-term Force Application: an Immunohistochemical Study Rats*. Acta Odontologica Scandinavia, 66:314-320.
- Yi, Zhang, Yan, Yang, Li, dan Zhao. 2012. *Drinking Coffee May Accelerates Orthodontic Tooth Movements Trough Enhancing Osteoclastogenesis*. International Association for Dental Research. Vol 3 (2): 72-76.

Internet :

Coffefag. 2001. *Frequently Asked Questions about Caffeine*. Accessed at 18 Juni 2015.

Hermanto. 2007. *Kafein, Peningkatan Pembakaran Lemak Dan Performa Endurans*. Available from : <http://www.chem-is-try.org>. Accessed at 18 Juni 2015.


Yosef. 2008. *Kafein*. Available from : <http://yosefw.wordpress.com>. Accessed at 18 Juni 2015.

<http://voyageofillusion.wordpress.com/2012/07/06/varietas-tanaman-kopi/2012>.

Accessed at 25 September 2015.

<https://positivedentist.wordpress.com/2013/06/26/mengenal-periodonsia/>. Accessed at 25 September 2015.

Lampiran A. Surat Keterangan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu

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

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

Yang bertanda tangan di bawah ini :

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

Menerangkan bahwa ;


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

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

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

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

Atas kerjasama yang baik diucapkan banyak terima kasih

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

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

Lampiran B. Keterangan Kelaikan Etik

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

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

Nomor : 18/KKEPK.FKG/II/2015

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

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

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

DINYATAKAN LAIK ETIK

Surabaya, 16 Pebruari 2015
Ketua,



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

Lampiran C. Penghitungan Dosis Ketamin

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

Dosis yang digunakan :

$$\begin{aligned} \frac{X \text{ ml}}{200 \text{ gr}} &= \frac{0,6 - 1 \text{ ml}}{1000 \text{ gr}} \\ \frac{X \text{ ml}}{5} &= \frac{0,6 - 1 \text{ ml}}{10} \\ X &= 0,12 - 0,2 \text{ ml} \end{aligned}$$

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

Lampiran D. Penghitungan Konversi Dosis Seduhan Kopi Kering dari Manusia ke Tikus

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

Tahapan pembuatan (*Freeze Dried Ekstrak*) dalam penelitian ini adalah yang pertama, menimbang 10 gram bubuk kopi yang dilarutkan dalam 150 ml aquades panas/mendidih dan diaduk hingga homogen, kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh dikeringkan dengan *freeze dryer* sehingga didapatkan ekstrak kering. Ekstrak kering tersebut ditimbang beratnya dan didapatkan berat sebesar 2,27 g.

Keterangan :

1. Tikus dengan berat badan 200 g maka dikalikan dengan faktor konversi (0,018) sebesar $= 0,018 \times 2,27 \text{ g} = 0,04 \text{ g} = 40 \text{ mg}$.
2. 1 ekor tikus dengan berat badan 300 g diberikan $40 \text{ mg} \times 300/200 = 60 \text{ mg}/300 \text{ g BB}$ atau $= 20 \text{ mg}/100 \text{ g BB}$.

Diperoleh kadar kafein dalam sampel sebesar $6,84 \pm 0,05\% \text{ bb}$.

Keterangan :

1. Kadar kafein 6,84 % berarti dalam setiap 100 mg seduhan kopi kering terdapat 6,84 mg kafein.
2. 1 ekor tikus dengan berat badan 100 g diberikan 20 mg seduhan kopi kering, sehingga pemberian kafein pada tikus dengan berat badan 100 g yaitu $= 20/100 \times 6,84 \text{ mg} = 1,368 \text{ mg}/100 \text{ gr BB}$ (dibulatkan menjadi $1,37 \text{ mg}/100 \text{ gr BB}$)

Berikut ini contoh penghitungan dosis yang diberikan pada tikus dengan berat badan yang berbeda:

1 ekor tikus diketahui berat badannya sebesar 270 g, jadi dosis kafein yang diberikan sebesar $270/100 \times 1,37 \text{ mg} = 3,69 \text{ mg}$.

Lampiran E. Alat Penelitian

E.1 Alat Pemeliharaan hewan Coba



Keterangan:

1. Kandang
2. Tempat minum
3. Timbangan digital BB tikus

E.2 Alat Pemasangan Koil Spring



Keterangan:

- | | | |
|---|-------------------|------------|
| 1. <i>Ni-Ti closed coil spring wire</i> | 8. Pemotong kawat | 15. Tissue |
| 2. <i>Wire</i> | 9. Kaca mulut | |
| 3. Bur low speed | 10. Sonde | |
| 4. Mata bur <i>diamond wheel</i> | 11. Pinset | |
| 5. Papan fiksasi | 12. Pisau malam | |
| 6. <i>Terumo srynge</i> | 13. Masker | |
| 7. Gunting bedah | 14. Sarung tangan | |

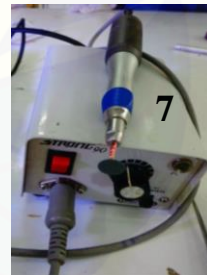
E.3 Alat Pemberian Kafein



Keterangan:

1. Sonde lambung
2. Pot seduhan kafein
3. Timbangan digital bubuk kafein

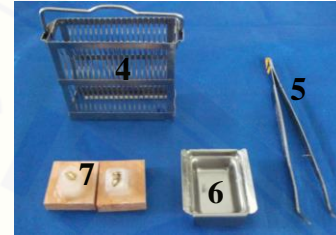
E.4 Alat Pengambilan Sampel Jaringan



Keterangan:

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| 1. Tabung berisi kapas | 5. Pot penyimpan jaringan |
| 2. Masker | 6. Gunting bedah |
| 3. Sarung tangan | 7. Bur |
| 4. Papan bedah | 8. Scalpel |

E.5 Alat Pembuat Sediaan Histologi dan Pengecatan



Keterangan:

1. Mikrotom
2. Waterbath
3. Oven
4. Histological basket
5. Pinset
6. Cetakan paraffin
7. Blok paraffin yang siap dipotong

E.6 Alat Pengamatan Sel Osteosit



Keterangan:

1. Optilab
2. Mikroskop cahaya binokuler

Lampiran F. Bahan Penelitian



Keterangan:

1. Tikus jantan *Sprague Dawley*
2. Bubuk Kafein
3. Eosin
4. Hematoksilin
5. Ketamin
6. Eter
7. PBS
8. Formalin
9. Etellan
10. *Coverglass*
11. *Objectglass*
12. Glass Ionomer Fuji IX

Lampiran G. Prosedur Penelitian**Keterangan :**

1. Anestesi ketamin secara intramuskular sebelum pemasangan *closed coil spring*
2. Proses pemasangan *closed coil spring*
3. Sondase kafein
4. Anestesi hewan coba dengan eter secara inhalasi sebelum dilakukan pemotongan jaringan
5. Hasil potongan jaringan
6. Penyimpanan jaringan di dalam formalin 10%

Lampiran H. Penghitungah Jumlah Sel Osteosit pada Daerah Tekanan

kelompok	Pengamat1	Pengamat2	Pengamat3	Rata-rata
k.1	25,33	25,67	28,33	26,44
k.2	22,67	25,67	27,33	25,22
k.3	27,67	29,33	29,33	28,78
k.4	-	-	-	-
			Jumlah	80,44
			Rata-rata	26,81

kelompok	Pengamat1	Pengamat2	Pengamat3	Rata-rata
p.1	27,67	25,67	28,33	27,22
p.2	-	-	-	-
p.3	27,33	28,33	28	27,88
p.4	28,33	28,33	29	28,55
			Jumlah	83,65
			Rata-rata	27,88

Keterangan :

Menghitung rata-rata jumlah total sel osteosit dengan cara dibagi 3

Lampiran I. Hasil Uji Statistika**a. Uji Normalitas Kolmogorov-Smirnov****One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Kontrol	Perlakuan
N		3	3
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	26,8133	27,8833
	Std. Deviation	1,80913	,66501
Most Extreme Differences	Absolute	,248	,175
	Positive	,248	,174
	Negative	-,195	-,175
Kolmogorov-Smirnov Z		,430	,304
Asymp. Sig. (2-tailed)		,993	1,000

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

b. Uji Homogenitas Levene Statistic**Descriptives**

Jumlah sel osteosit

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kontrol	3	26,813	1,809	1,044	22,319	31,307	25,22	28,78
Perlakuan	3	27,883	,665	,384	26,231	29,535	27,22	28,55
Total	6	27,348	1,353	,552	25,929	28,768	25,22	28,78

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah sel osteosit

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,681	1	4	,177

Keterangan : Data homogen ($p \geq 0,05$)

c. T-Test Tekanan antara Kontrol dan Perlakuan

Group Statistics

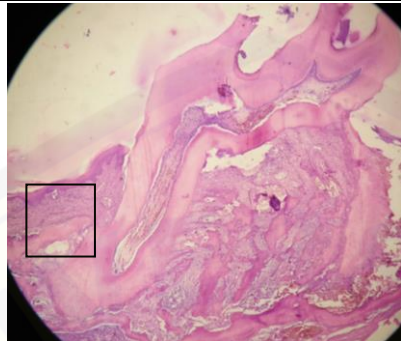
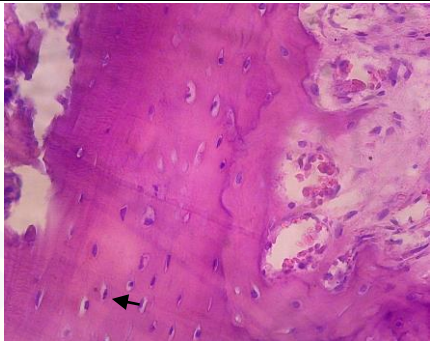
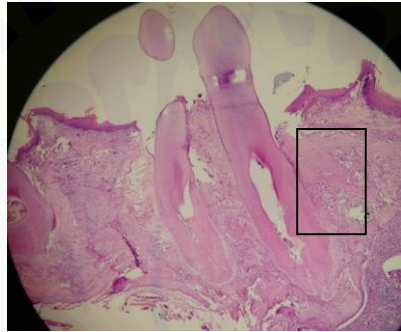
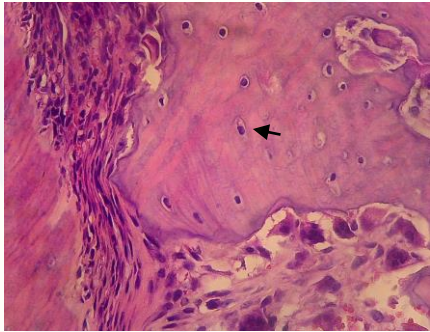
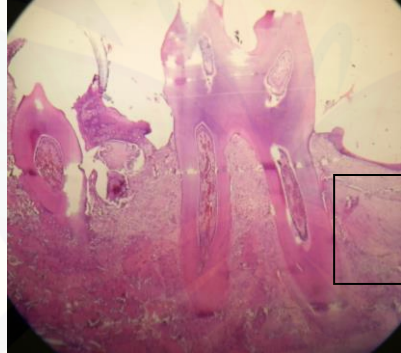
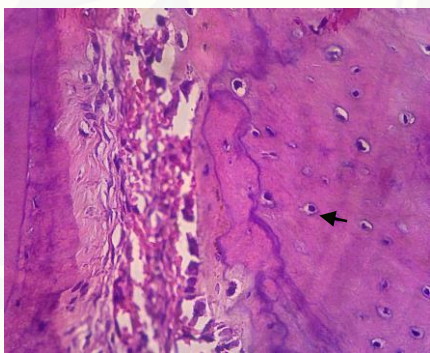
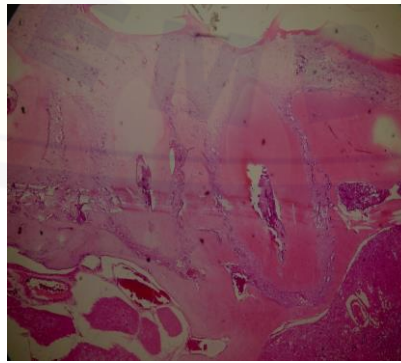
	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Jumlah sel osteosit	Kontrol	3	26,8133	1,80913	1,04450
	Perlakuan	3	27,8833	,66501	,38394



Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Jumlah sel osteosit	Equal variances assumed	2,681	,177	-,962	4	,391
	Equal variances not assumed			-,962	2,531	,419

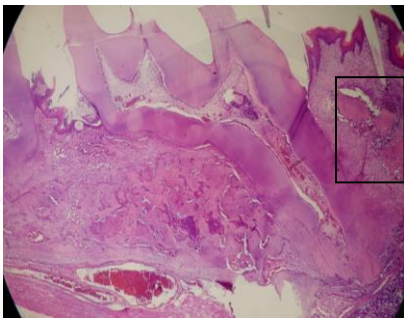
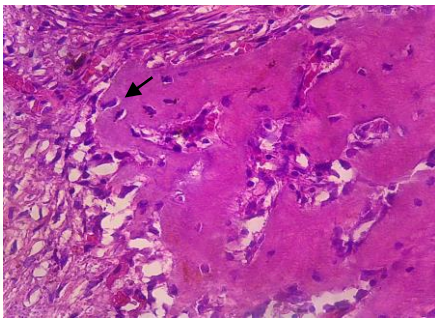
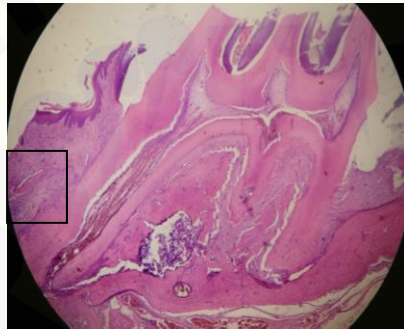
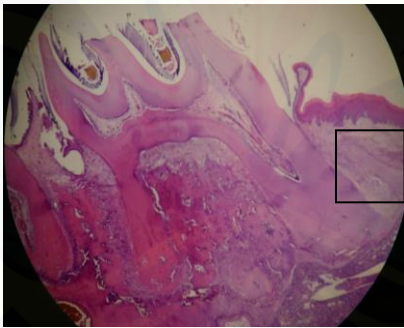
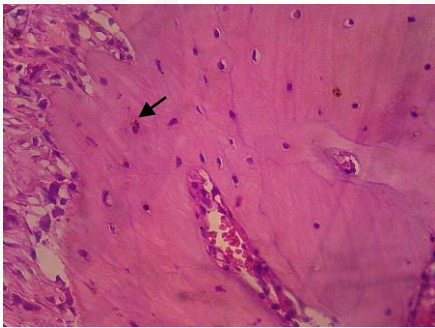
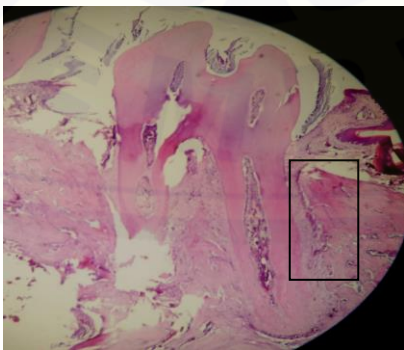
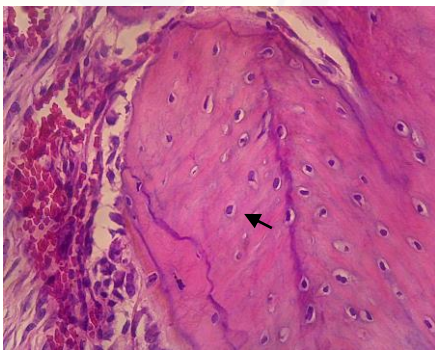
Keterangan : tidak signifikan ($p > 0,05$)

Lampiran J. Gambaran Histologi Kelompok Kontrol Daerah Tekanan

Sampel	Perbesaran 40x	Perbesaran 400x
K1		
K2		
K3		
K4		Tidak dapat diamati dan dihitung, karena arah potongan yang tidak jelas sehingga gambar histologi yang dihasilkan tidak sesuai kriteria

Keterangan :  = daerah tekanan,  = osteosit

Lampiran K. Gambaran Histologi Kelompok Perlakuan Daerah Tekanan

Sampel	Perbesaran 40x	Perbesaran 400x
P1		
P2		Tidak dapat dihitung karena pada daerah tekanan, tulang alveolar terpotong sehingga tidak dapat memenuhi 3 lapang pandang
P3		
P4		

Keterangan :  = daerah tekanan,  = osteosit