



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KITOSAN LIMBAH KULIT  
UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*) SECARA ORAL  
TERHADAP DENSITAS TULANG ALVEOLAR PASCA  
EKSTRAKSI GIGI PADA TIKUS WISTAR JANTAN**

**SKRIPSI**

Oleh

**Aulia Rahma Elnisa  
NIM 141610101074**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**



**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KITOSAN LIMBAH KULIT  
UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*) SECARA ORAL  
TERHADAP DENSITAS TULANG ALVEOLAR PASCA  
EKSTRAKSI GIGI PADA TIKUS WISTAR JANTAN**

**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

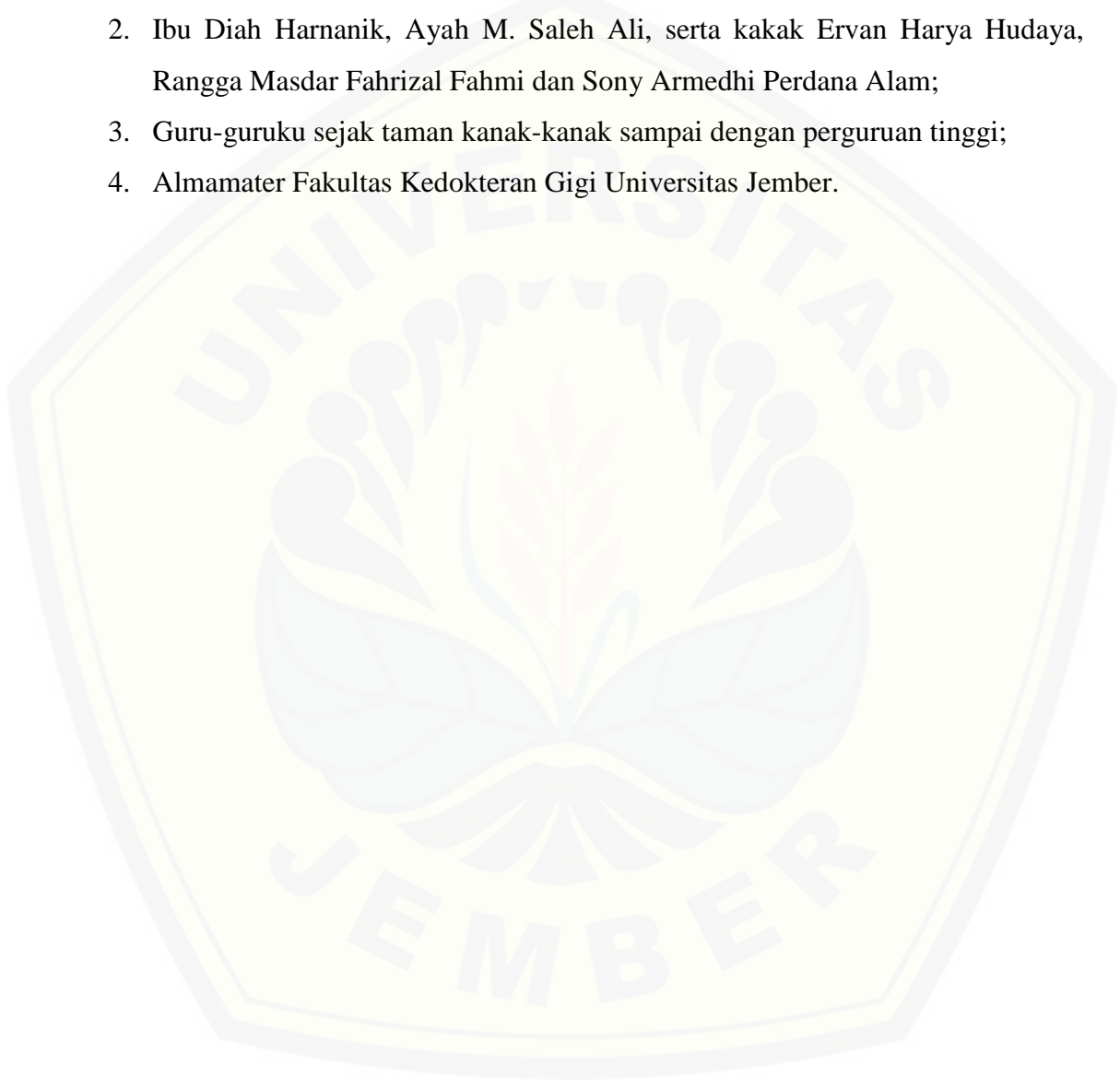
**Aulia Rahma Elnisa**  
**NIM 141610101074**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2018**

**PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allaah Azza wa Jalla dan Rasulullah Shallahu'alaihi wa sallam;
2. Ibu Diah Harnanik, Ayah M. Saleh Ali, serta kakak Ervan Harya Hudaya, Rangga Masdar Fahrizal Fahmi dan Sony Armedhi Perdana Alam;
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

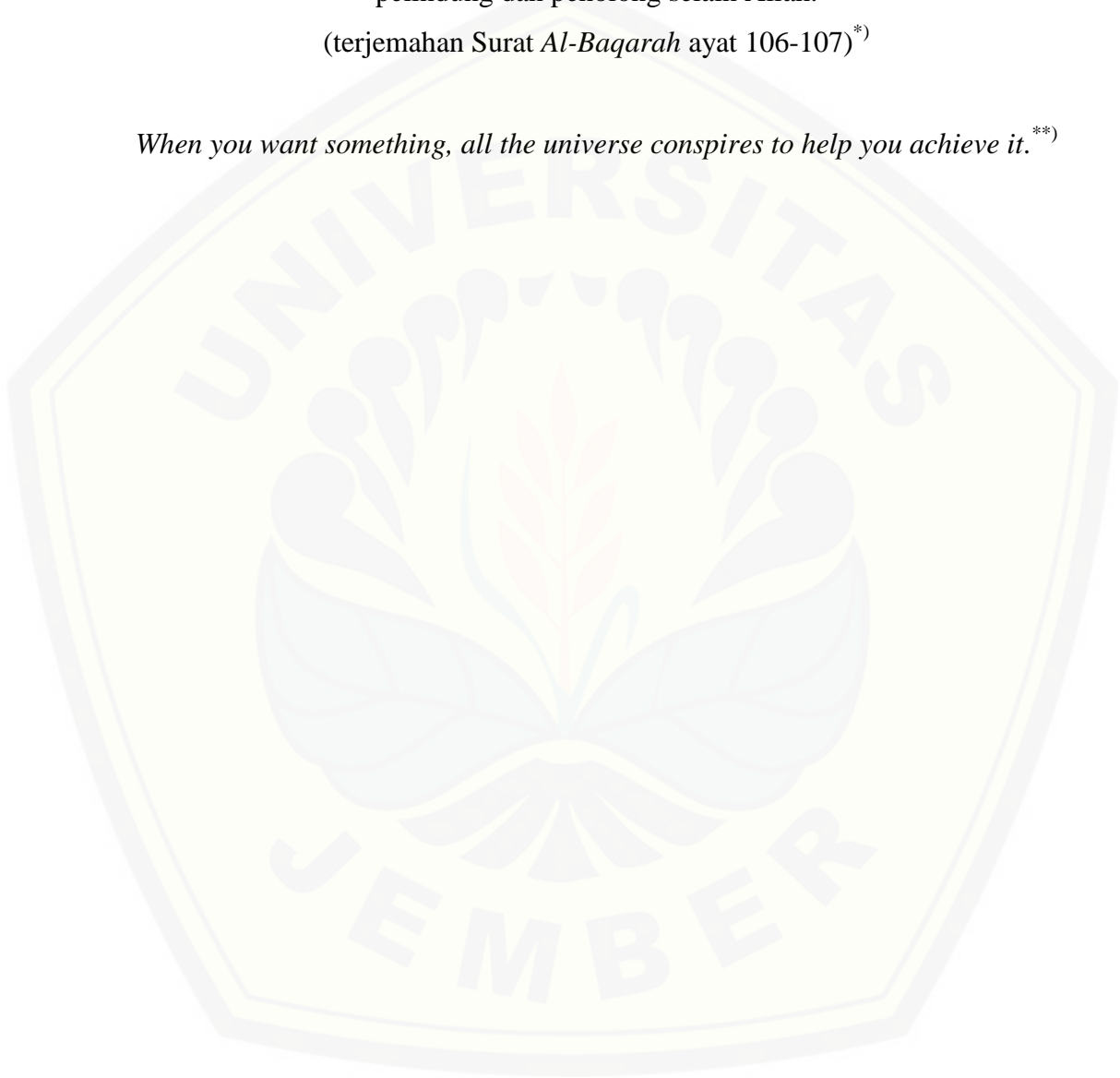


## MOTO

Tidakkah kamu tahu bahwa Allah Mahakuasa atas segala sesuatu? Tidakkah kamu tahu bahwa Allah memiliki kerajaan langit dan bumi? Dan tidak ada bagimu pelindung dan penolong selain Allah.

(terjemahan Surat *Al-Baqarah* ayat 106-107)<sup>\*)</sup>

*When you want something, all the universe conspires to help you achieve it.*<sup>\*\*)</sup>



---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2002. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta: CV Darus Sunnah.

<sup>\*\*)</sup> Coelho, Paulo. 2017. *The Alchemist*. London: HarperCollins Publishers.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

nama : Aulia Rahma Elnisa

NIM : 141610101074

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) Secara Oral Terhadap Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Gigi pada Tikus Wistar Jantan” adalah benar-benar hasil karya 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 manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 24 April 2018

Yang menyatakan,

Aulia Rahma Elnisa

NIM 141610101074

**SKRIPSI**

**EFEK PEMBERIAN EKSTRAK KITOSAN LIMBAH KULIT  
UDANG VANNAMEI (*Litopenaeus vannamei*) SECARA ORAL  
TERHADAP DENSITAS TULANG ALVEOLAR PASCA  
EKSTRAKSI GIGI PADA TIKUS WISTAR JANTAN**

Oleh

Aulia Rahma Elnisa  
NIM 141610101074

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Zainul Cholid, Sp.BM.

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Abdul Rochim, M.Kes., MMR.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Efek Pemberian Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) Secara Oral Terhadap Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Gigi pada Tikus Wistar Jantan” ini telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada :

hari, tanggal : Selasa, 24 April 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota,

drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc.  
NIP. 197905052005011005

drg. Nadie Fatimatuzzahro, MDSc.  
NIP. 198204242008012022

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Pendamping,

drg. Zainul Cholid, Sp.BM.  
NIP. 197105141998021001

drg. Abdul Rochim, M.Kes., MMR.  
NIP. 195804301987031002

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost.  
NIP. 196901121999601001



## RINGKASAN

**Efek Pemberian Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) Secara Oral Terhadap Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Gigi pada Tikus Wistar Jantan;** Aulia Rahma Elnisa; 141610101074; 2018: 60 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Ekstraksi gigi merupakan salah satu prosedur terapi di bidang kedokteran gigi yang bertujuan untuk mengeluarkan gigi yang tidak dapat dipertahankan lagi di rongga mulut. Soket gigi pasca ekstraksi yang dibiarkan tanpa diberi perawatan dapat mengalami mineralisasi yang buruk, yang akan menyebabkan bekurngnya kekuatan tulang dan meningkatkan resiko kegagalan perawatan rehabilitatif pasca ekstraksi dengan penggunaan protesa atau implan. Kitosan hasil deasetiliasi kitin pada limbah kulit kepala dan kulit badan udang vannamei merupakan bahan yang berpotensi dalam regenerasi dan perbaikan jaringan tulang karena memiliki sifat osteoinduktif dan mampu mempercepat penyembuhan luka. Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei secara oral terhadap densitas tulang alveolar pasca ekstraksi pada tikus Wistar jantan.

Penelitian eksperimental laboratoris pada tikus Wistar jantan ini menggunakan rancangan *the post test only control group design*. Sampel berjumlah 20 ekor, berat 180-250 gram, terbagi menjadi 4 kelompok, yaitu dua kelompok kontrol dengan pemberian larutan saline secara oral selama 21 hari pasca ekstraksi gigi (kelompok Saline 21) dan 28 hari pasca ekstraksi gigi (kelompok Saline 28), serta dua kelompok perlakuan dengan pemberian larutan kitosan 5% dosis 100 mg/200 gram BB selama 21 hari pasca ekstraksi gigi (kelompok Kitosan 21) dan 28 hari pasca ekstraksi gigi (kelompok Kitosan 28). Sampel dieutanasia pada hari ke-21 pasca ekstraksi gigi untuk kelompok Saline 21 dan kelompok Kitosan 21, dan hari ke-28 pasca ekstraksi gigi untuk kelompok Saline 28 dan kelompok Kitosan 28. Dilanjutkan dengan pengambilan tulang sampel, pembuatan foto rontgen sampel tulang, dan pengukuran densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi menggunakan *software Adobe Photoshop CC 2018*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai densitas tulang alveolar pada kelompok kontrol dan perlakuan semakin meningkat dari penghitungan hari ke-21 hingga hari ke-28. Nilai densitas tulang alveolar terbesar terdapat pada kelompok Kitosan 28, dan nilai terkecil terdapat pada kelompok Saline 21. Kelompok perlakuan memiliki nilai densitas tulang alveolar yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil analisis statistik parametrik uji *One Way ANOVA* dan uji *LSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) di antara beberapa kelompok penelitian. Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei secara oral memiliki efek berupa peningkatan densitas tulang alveolar pasca ekstraksi pada tikus Wistar jantan.



## PRAKATA

Alhamdulillah rabbil ‘alamin, segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam atas segala pertolongan, hidayah, rahmat, ilmu, dan kekuatan yang telah diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udag Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) Secara Oral Terhadap Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Gigi pada Tikus Wistar Jantan”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Pros, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. Zainul Cholid Sp.BM., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Abdul Rochim M.Kes., MMR., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan ilmu dalam membimbing serta mendidik penulis hingga dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik;
3. drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Nadie Fatimatuzzahro, MDSc., selaku Dosen Penguji Anggota atas bimbingan, ilmu, serta saran untuk perbaikan dan kesempurnaan skripsi ini;
4. drg. Hafiedz Maulana, M.Biomed., selaku Dosen Pembimbing Akademik atas arahan, ilmu dan motivasi selama penulis menjadi mahasiswa;
5. Ibu Hj. Diah Harnanik, Ayah H.M Saleh Ali, S.H, S.E, M.M., Kakak Ervan Harya Hudaya, S.T., Rangga Masdar Fahrizal Fahmi S.Si., serta Sony Armedhi Perdana Alam, S.T., atas panjatan doa yang tiada henti, dukungan, dan motivasi selama ini;
6. Staf Laboratorim Biomedik dan *Bioscience* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember: Bapak Agusmurdjohadi Putradjaka, Ibu Nur, Ibu Indri, Ibu Nur Aziza, dan Ibu Ning, yang membantu dalam pengerjaan penelitian skripsi ini;

7. Staf Laboratorium Pangan Politeknik Negeri Jember, Bapak Jabir, yang membantu dalam pengerjaan penelitian skripsi ini;
8. Staf Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember, Ibu Itus, yang membantu dalam pengerjaan penelitian skripsi ini;
9. Staf Laboratorium Klinik Parahita Jember, yang membantu dalam pengerjaan penelitian skripsi ini;
10. Seluruh staf di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang membantu dalam proses pelaksanaan dan penyelesaian skripsi ini;
11. Ghiza Jibrila Khumaira Barqly dan Yusuf Rizkillah Akbar yang telah menjadi mentor dalam meneliti kitosan, serta memberikan motivasi selama menjalani perkuliahan di FKG;
12. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian; atas tenaga, waktu, dan segala bentuk bantuan yang telah diberikan hingga tersusunnya skripsi ini.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan khususnya dibidang kesehatan serta menjadi upaya dalam meningkatkan mutu kesehatan masyarakat.

Jember, 24 April 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	viii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
1.4.1 Bagi Peneliti .....	3
1.4.2 Bagi Masyarakat .....	4
1.4.3 Bagi Institusi .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 Udang Vannamei (<i>Litopenaeus vannamei</i>)</b> .....	5
2.1.1 Morfologi Udang Vannamei ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	6
2.1.2 Kandungan dalam Kulit Udang Vannamei ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	8
<b>2.2. Kitosan</b> .....	9
<b>2.3 Penyembuhan Luka Soket Pasca Ekstraksi Gigi</b> .....	11
2.3.1 Penyembuhan Luka Jaringan Lunak Soket Gigi Pasca Ekstraksi Gigi .....	12
2.3.2 Penyembuhan Luka Jaringan Keras Soket Gigi Pasca Ekstraksi Gigi .....	14

2.4	Densitas Tulang Alveolar .....	16
2.5	Hipotesis.....	18
2.6	Kerangka Konseptual Penelitian .....	19
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN.....</b>	<b>20</b>
3.1	Jenis Penelitian.....	20
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	20
3.2.1	Tempat Penelitian .....	20
3.2.2	Waktu Penelitian.....	20
3.3	Variabel Penelitian.....	20
3.3.1	Variabel Bebas.....	20
3.3.2	Variabel Terikat .....	20
3.3.3	Variabel Terkendali .....	20
3.4	Definisi Operasional Penelitian .....	21
3.4.1	Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ).....	21
3.4.2	Densitas Tulang Alveolar .....	21
3.4.3	Ekstraksi Gigi .....	22
3.5	Sampel Penelitian.....	22
3.5.1	Kriteria Sampel Penelitian.....	22
3.5.2	Besar Sampel .....	22
3.6	Penghitungan Dosis.....	23
3.6.1	Dosis Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	23
3.6.2	Dosis Ketamin .....	23
3.7	Alat dan Bahan Penelitian .....	23
3.7.1	Alat Penelitian .....	23
3.7.2	Bahan Penelitian .....	24
3.8	Prosedur Penelitian.....	25
3.8.1	<i>Ethical Clearence</i> .....	25
3.8.2	Persiapan Hewan Coba.....	25
3.8.3	Pembuatan Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	25
3.8.4	Persiapan Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	27
3.8.5	Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba .....	27

3.8.6 Ekstraksi Gigi Hewan Coba.....	28
3.8.7 Pengambilan Sampel Tulang Hewan Coba .....	29
3.8.8 Pembuatan Foto Rontgen Sampel Tulang Hewan Coba.....	29
3.8.9 Pengukuran Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Gigi .....	29
<b>3.9 Analisis Data.....</b>	<b>33</b>
<b>3.10 Alur Penelitian.....</b>	<b>34</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Analisis Data.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Pembahasan .....</b>	<b>38</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>43</b>
<b>5.1. Kesimpulan.....</b>	<b>43</b>
<b>5.2. Saran .....</b>	<b>43</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>50</b>

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Udang vannamei ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	5
2.2 Morfologi udang <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	7
2.3 Struktur kimia kitosan.....	9
2.4 Fase-fase penyembuhan luka soket gigi pasca ekstraksi gigi.....	12
2.5 Kerangka konseptual penelitian.....	19
3.1 Tampilan foto rontgen setelah dimasukkan kedalam <i>Adobe Photoshop</i> .....	30
3.2 Tampilan foto rontgen tiap sampel saat diperbesar .....	30
3.3 Tampilan foto rontgen pada ukuran 400% dengan kotak <i>histogram</i> .....	31
3.4 Tampilan foto rontgen tiap sampel tulang dengan <i>grid</i> .....	32
3.5 Penghitungan densitas tulang alveolar pada daerah apikal.....	32
3.6 Penghitungan densitas tulang alveolar pada daerah medial .....	32
3.7 Penghitungan densitas tulang alveolar pada daerah koronal .....	33
3.8 Tampilan kotak histogram yang menunjukkan nilai mean gray level .....	33
3.9 Alur penelitian .....	34
4.1 Grafik batang rata-rata nilai densitas tulang alveolar .....	36



**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Data volume produksi dan ekspor udang tahun 2010 hingga bulan September 2014 .....	6
2.2 Efek sitokin pro-inflamasi saat proses penyembuhan luka.....	13
2.3 Tahapan pembentukan jaringan tulang baru dalam proses <i>intramembranous ossification</i> .....	15
4.1 Densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi pada tikus Wistar jantan (dengan satuan <i>gray levels</i> ) .....	35
4.2 Hasil Uji LSD rata-rata densitas ulang alveolar pasca ekstraksi pada tikus Wistar jantan pada kelompok kontrol dan perlakuan .....	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i> .....	50
Lampiran B. Surat Ijin Penelitian Laboratorium Biomedik.....	51
Lampiran C. Alat dan Bahan Penelitian.....	52
Lampiran D. Penghitungan Besar Sampel .....	56
Lampiran E. Penghitungan Dosis.....	57
E.1 Dosis Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang <i>Vannamei</i> ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) .....	57
E.2 Dosis Ketamin .....	57
Lampiran F. Hasil Penghitungan Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi pada Tikus Wistar Jantan .....	59
Lampiran G. Hasil Analisis Data .....	60
G.1 Uji Normalitas <i>Shapiro-Wilk</i> .....	60
G.2 Uji Homogenitas <i>Levene-Test</i> .....	60
G.3 Uji <i>One Way ANOVA</i> .....	60
G.4 Uji <i>Least Significant Difference (LSD)</i> .....	61

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Ekstraksi gigi merupakan salah satu prosedur terapi di bidang kedokteran gigi yang bertujuan untuk mengeluarkan gigi yang tidak dapat dipertahankan lagi di rongga mulut. Ekstraksi juga dapat dilakukan untuk mempersiapkan rongga mulut sebelum dilakukan perawatan ortodontik dan prostodontik. Prosedur ini meliputi luksasi gigi di dalam soketnya kemudian gigi dikeluarkan dari tulang alveolar (Taub *et al.*, 2015). Gigi yang telah diekstraksi akan meninggalkan soket yang terbuka dalam rongga mulut hingga terjadi proses penyembuhan luka (Steiner *et al.*, 2008). Proses penyembuhan luka merupakan respon fisiologis tubuh dengan menggantikan dan mengembalikan struktur anatomi atau fungsi jaringan yang rusak (Flanagan, 2000).

Steiner *et al.* (2008) melaporkan bahwa saat proses penyembuhan luka terjadi resorpsi osteoklastik pada dinding soket dan *alveolar crest* sebagai bentuk respon tulang setelah mengalami trauma. Cohen dan Levy (2014) juga menyatakan bahwa ekstraksi dapat menyebabkan resorpsi tulang, terutama pada daerah bukal. Hal tersebut mengakibatkan reduksi dari ketinggian *alveolar ridge* dan penurunan volume tulang baik secara transversal maupun vertikal. Selain itu, soket gigi pasca ekstraksi yang dibiarkan tanpa diberi perawatan dapat mengalami mineralisasi yang buruk, yang akan menyebabkan bekurangnya kekuatan tulang (UDHHS, 2004) dan meningkatkan resiko kegagalan perawatan rehabilitatif pasca ekstraksi dengan penggunaan protesa atau implan (Van Steenberghe *et al.*, 2002). Penyembuhan tulang yang substansial sangat dibutuhkan untuk mendukung keberhasilan perawatan rehabilitatif tersebut (Manrique *et al.*, 2011). Oleh karena hal itu, maka dibutuhkan suatu bahan yang dapat mempercepat proses penyembuhan luka pada tulang.

Salah satu bahan alami yang berpotensi dalam regenerasi dan perbaikan jaringan tulang adalah kitosan. Kitosan merupakan derivat dari kitin, sebuah elemen struktural yang ditemukan pada eksoskeleton krustasea dan antropoda (Levengood dan Zhang, 2015). Kitosan memiliki sifat osteoinduktif, mampu

meningkatkan aktivitas dan proliferasi osteoblas, membantu pembentukan tulang dan dapat meningkatkan mineralisasi tulang pada defek tulang (Senel dan McClure, 2004; Kmiec *et al.*, 2017). Kitosan telah terbukti sebagai bahan yang potensial dan menjanjikan dalam terapi di bidang kedokteran gigi karena memiliki sifat biokompatibilitas yang tinggi, biodegradabilitas, bioadhesi, antibakteri, anti inflamasi, dan mempercepat penyembuhan luka (Kmiec *et al.*, 2017). Penelitian Hanifah dan Darmawan (2011) menunjukkan bahwa pemberian kitosan secara oral dengan dosis 100 mg/200 gram BB memiliki efek anti inflamasi pada tikus model *rheumatoid arthritis*. Hal ini berarti bahwa kitosan memiliki efek secara sistemik dan aman diberikan secara oral pada hewan coba. Salah satu krustasea yang mengandung kitosan pada kulit kepala dan kulit badan adalah udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) atau *whiteleg shrimp* (Antonino *et al.*, 2017).

Udang vannamei merupakan salah satu komoditas utama budidaya perikanan yang berkontribusi besar dalam kegiatan ekspor Indonesia. Produksi udang vannamei di Indonesia mengalami peningkatan signifikan dari 256.578 ton pada tahun 2010 menjadi 411.729 ton pada tahun 2014 (KKP, 2014). Sebanyak 80-90% ekspor udang dilakukan dalam bentuk beku tanpa kepala dan kulit, sehingga limbah yang dihasilkan mencapai 50-60% dari bobot udang utuh. Hingga saat ini limbah kulit udang hanya digunakan untuk pakan ternak, hidrolisat protein, bahan baku kerupuk, terasi, dan petis udang (Sugita *et al.*, 2009). Padahal limbah tersebut mengandung senyawa kimia seperti protein, mineral CaCO<sub>3</sub>, dan kitosan (Srijanto, 2003) yang berpotensi dijadikan bahan yang bernilai tinggi. Limbah kulit kepala dan kulit badan udang vannamei harus diproses melalui tahap deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi hingga didapatkan kitosan sebagai bahan yang dapat mempercepat penyembuhan luka (Antonino *et al.*, 2017).

Proses penyembuhan tulang pasca ekstraksi gigi telah dipelajari secara ekstensif secara histologis dan radiografis baik pada manusia maupun hewan. Metode radiografis paling umum digunakan dalam evaluasi klinis karena tidak invasif, murah, serta cepat dalam mengumpulkan dan menginterpretasikan hasilnya. Proses penyembuhan tulang dapat dievaluasi melalui peningkatan

radiopasitas, yang dapat diukur dengan analisis *optical density* melalui nilai *mean gray level* pada *software Adobe Photoshop* (Barbosa *et al.*, 2014). *Optical density* dapat menunjukkan besarnya densitas tulang atau *bone mineral density* (BMD), yaitu banyaknya massa tulang yang terbentuk yang diinterpretasikan melalui radiopasitas pada radiograf digital. Metode ini membantu dalam visualisasi, penilaian dan pengukuran kepadatan optik tulang pada seluruh daerah soket pasca ekstraksi gigi secara dua dimensi. Hal tersebut memungkinkan evaluasi terhadap pembentukan tulang pasca ekstraksi serta efek dari pemberian bahan terhadap regenerasi jaringan tulang dalam jangka waktu tertentu (Martins *et al.*, 2005; Filho *et al.*, 2011).

Hingga saat ini, belum terdapat penelitian tentang efek pemberian kitosan limbah kulit udang *vannamei* secara oral terhadap densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi pada tikus Wistar. Berdasarkan hal tersebut, peneliti tertarik untuk menelitinya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan didapatkan permasalahan apakah terdapat efek pemberian ekstrak kitosan limbah kulit udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) secara oral terhadap densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi pada tikus Wistar jantan?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak kitosan limbah kulit udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) secara oral terhadap densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi pada tikus Wistar jantan.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Bagi Peneliti

Mengetahui efek pemberian ekstrak kitosan limbah kulit udang *vannamei* (*Litopenaeus vannamei*) secara oral terhadap densitas tulang alveolar pasca

ekstraksi gigi pada tikus Wistar jantan.

#### 1.4.2 Bagi Masyarakat

Memberi informasi ilmiah tentang manfaat dari kitosan limbah kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) sehingga pemanfaatan limbah kulit udang vannamei dapat dioptimalkan untuk mengurangi pencemaran lingkungan dan diolah sebagai bahan yang bernilai jual tinggi khususnya dalam bidang medis.

#### 1.4.3 Bagi Institusi

Memberi sumbangan pemikiran dan bukti ilmiah tentang efek pemberian ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) secara oral terhadap densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi, sehingga dapat digunakan sebagai landasan pengembangan riset lebih lanjut.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*) merupakan krustasea dekapoda yang berasal dari daerah subtropis pantai Pasifik timur dari Teluk California di Meksiko bagian utara sampai Amerika Tengah, hingga ke Peru di Amerika Selatan. Udang ini telah diperkenalkan secara luas di seluruh dunia sejak tahun 1970an dan menjadi budidaya spesies udang yang penting di Asia sejak tahun 2000. Udang vannamei resmi diizinkan masuk ke Indonesia melalui SK Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. 41/2001, saat produksi udang windu menurun sejak 1996 akibat serangan penyakit dan penurunan kualitas lingkungan (WWF-Indonesia, 2014). Ciri khas dari udang vannamei adalah tubuhnya yang berwarna putih kemerahan karena pigmen karotenoid, dengan kaki yang berwarna putih sehingga sering disebut dengan *whiteleg shrimp* (Haliman dan Adijaya, 2005) (Gambar 2.1).



Gambar 2.1 Udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) (Dokumentasi pribadi)

Udang vannamei banyak dibudidayakan karena memiliki banyak keunggulan seperti dapat mencapai ukuran besar, tumbuh secepat udang windu (3 gram/minggu), dapat dibudidayakan pada salinitas yang tinggi (0,5-45 ppt) dan memiliki kebutuhan protein yang lebih rendah (20-35%) dibanding udang windu. Selain itu, udang ini memiliki toleransi terhadap penurunan salinitas dan resisten terhadap penyakit sehingga cocok untuk dibudidayakan di tambak. Harga jual udang vannamei yang cukup mahal membuat produksi udang vannamei meningkat setiap tahunnya (Briggs *et al.*, 2004).

Data produksi dan ekspor udang dari tahun 2010 hingga bulan September 2014 ditunjukkan pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Data volume produksi dan ekspor udang tahun 2010 hingga bulan September 2014

Komoditas	Jumlah per Tahun (ton)					Kenaikan Rata-rata (%)
	2010	2011	2012	2013	2014	2010-2014
<b>Volume Produksi</b>						
Udang Windu	125.157	126.157	117.888	171.583	126.595	3.32
Udang Vannamei	206.578	246.420	251.763	390.278	411.729	20.49
Udang Lainnya	48.875	28.577	46.052	77.094	53.895	14.23
<b>Volume Ekspor</b>						
Udang	145.092	158.062	162.068	162.410	141.042	-0.37

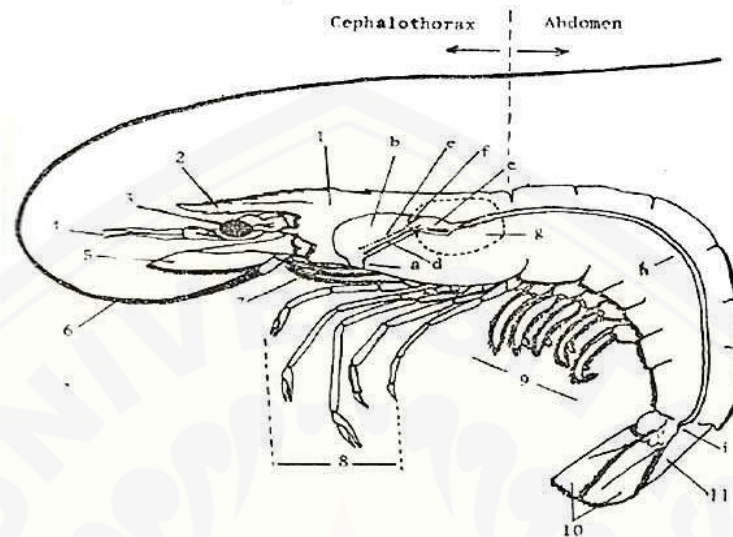
Sumber: Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2014

Meningkatnya angka produksi juga diiringi dengan peningkatan jumlah limbah udang. Udang di ekspor dalam bentuk udang beku segar, yang telah mengalami *cold storage* setelah melalui pemisahan kepala dan kulit. Industri udang beku segar mengakibatkan adanya limbah berupa kepala (*carapace*) dan kulit (*peeled*) yang menimbulkan masalah pencermaran lingkungan (Dompeipen *et al.*, 2016). Limbah ini selanjutnya disebut *bio-waste* dengan perolehan rata-rata 45-55% dari bobot udang keseluruhan. Daya jual dan pemanfaatan limbah tersebut sangat rendah, padahal limbah kulit udang tersebut mengandung protein, karotenoid dan kitin yang dapat diolah menjadi bahan yang bernilai tinggi (Lertsutthiwong *et al.*, 2002). Sampai saat ini *bio-waste* tersebut hanya dimanfaatkan sebesar 30% dari jumlah limbah yang ada sebagai bahan baku industri kerupuk, petis, terasi, pupuk, dan pakan ternak (Dompeipen *et al.*, 2016).

### 2.1.1 Morfologi Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

Ditinjau dari morfologinya, tubuh udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) terbagi menjadi dua bagian, yaitu bagian kepala hingga dada yang disebut *cephalothorax* dan abdomen yang meliputi bagian perut dan ekor. Seluruh bagian tubuh udang dibungkus oleh kerangka luar yang tersusun dari kitin, disebut dengan eksoskeleton. *Cephalothorax* tertutup kulit kitin yang tebal disebut *carapace*. Bagian *cephalothorax* terdiri dari tiga belas ruas, yaitu lima ruas pada

kepala dan delapan ruas pada bagian dada. Bagian abdomen terdiri dari enam ruas dengan ekor pada bagian belakangnya (Gambar 2.2) (Murtidjo, 2003).



Gambar 2.2 Morfologi udang *Litopenaeus vannamei* (Haliman dan Adijaya, 2005)

Keterangan:

- |   |  |
|---|--|
| 1 = cangkang kepala ( <i>carapace</i> ) | 7 = alat pembantu rahang ( <i>maxilliped</i> ) |
| 2 = kerucut kepala ( <i>rostrum</i> )   | 8 = kaki jalan ( <i>periopods</i> )            |
| 3 = mata majemuk                        | 9 = kaki renang ( <i>pleopods</i> )            |
| 4 = sungut kecil ( <i>antennules</i> )  | 10 = ekor kipas ( <i>uropods</i> )             |
| 5 = <i>prosartema</i>                   | 11 = ujung ekor ( <i>telson</i> )              |
| 6 = sungut besar ( <i>antenna</i> )     |  |

Udang vannamei memiliki tubuh berbuku-buku dan aktivitas berganti kulit luar atau eksoskeleton secara periodik (*moulting*). Bagian tubuh digunakan untuk makan, bergerak, membenamkan diri ke dalam lumpur, menopang insang, dan organ sensor. Kepala udang vannamei terdiri dari *antenna* dan *antennula* yang berfungsi sebagai indra penciuman dan keseimbangan, *mandibula* untuk mengunyah, serta *maxillula* dan *maxilla* untuk membantu makan dan bernafas. Selain itu kepala udang juga memiliki tiga pasang *maxilliped* yang berfungsi untuk berenang dan mengonsumsi makanan, serta lima pasang kaki berjalan (*periopods*) atau disebut kaki sepuluh (*decapods*). Pada ujung *periopods* terdapat ruas-ruas yang berbentuk capit (*dactylus*). *Dactylus* ada pada kaki ke-1, ke-2, dan ke-3 (Murtidjo, 2003; Haliman dan Adijaya, 2005).

Abdomen udang vannamei terdiri dari enam ruas. Pada bagian abdomen terdapat lima pasang kaki renang yang berfungsi untuk berenang dan sepasang ekor (*uropods*) yang membentuk kipas bersama-sama ujung ekor (*telson*) untuk membantu melakukan gerakan melompat dan naik turun. Genus *Penaeus* ditandai dengan adanya gigi pada bagian atas dan bawah *rostrum* serta hilangnya bulu cambuk (*setae*) pada tubuhnya. Secara khusus udang ini memiliki dua gigi pada tepi *rostrum* bagian ventral dan delapan sampai sembilan gigi pada tepi *rostrum* bagian dorsal (Murtidjo, 2003; Haliman dan Adijaya, 2005).

#### 2.1.2 Kandungan dalam Kulit Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

Eksoskeleton atau kerangka luar udang tersusun oleh kitin, yang diperkuat oleh mineral kalsium karbonat. Kandungan kitin dari limbah udang (kepala, kulit, dan ekor) mencapai sekitar 50% dari berat udang utuh, sehingga limbah udang ini dapat digunakan sebagai bahan baku penghasil kitin, kitosan, dan turunannya yang bernilai tinggi (Purwanti, 2014).

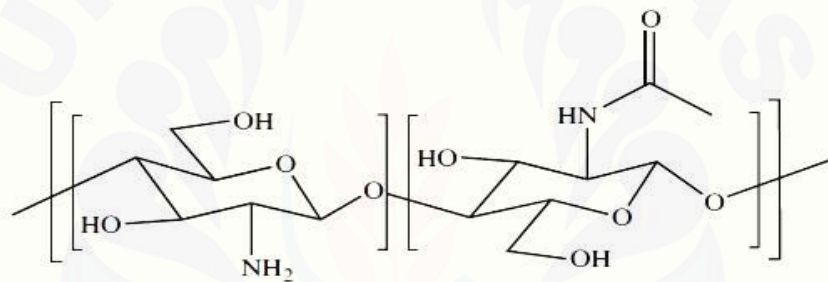
Sejak tahun 1894 beberapa peneliti memiliki ketertarikan yang tinggi dalam mengaplikasikan kitin dan mempelajari relasi struktural dan sifat dari polisakarida tersebut dan derivatnya. Kitin dan kitosan menunjukkan suatu sifat biologis yang sangat baik seperti biokompatibilitas, biodegradabilitas, antibakteri, pengemulsi dan kemampuan khelasi. Karena sifat-sifat tersebut, kitosan dapat digunakan dalam sejumlah besar aplikasi industri diantaranya di bidang perairan, pertanian, tekstil, kosmetik, industri makanan, farmasi dan di bidang medis (Kmiec *et al.*, 2017).

Aplikasi kitosan dalam bidang medis diantaranya adalah sebagai akselerator penyembuhan luka, regenerasi jaringan, kultur sel, penyembuhan tulang, penghambat tumor, antivirus, hemostatik, analgesik, anti inflamasi, antibakteri, penghambat dental plak, mengontrol kolesterol darah dan menurunkan berat badan. Oleh karena banyaknya potensi yang dimiliki kitosan, dibutuhkan adanya penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan dan mengoptimalkan sifat yang dimiliki oleh kitosan (Senel dan McClure, 2004).



## 2.2. Kitosan

Kitosan tidak secara ekstensif tersedia di alam, namun dapat dengan mudah diperoleh dari deasetilisasi alkalin dari kitin. Kitin merupakan biopolimer terbanyak yang tersedia di alam setelah selulosa, dimana terdistribusi di alam sebagai komponen eksoskeleton pada krustasea, kutikula serangga, dinding sel beberapa bakteri dan jamur. Kitosan merupakan polisakarida yang terbentuk dari unit  $(1 \rightarrow 4)$ -2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan (*N-acetyl glucosamine*) dan  $(1 \rightarrow 4)$ -2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan (*glucosamine*). Biasanya produk kitosan dapat diambil 60% dari derajat deasetilisasi, yang dihasilkan dari hidrolisis kimia dibawah kondisi basa saat deasetilisasi kitin (Croisier dan Jérôme, 2013). Struktur kimia senyawa ini tergambar pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Struktur kimia kitosan (Croisier dan Jérôme, 2013)

Struktur kimia dalam kitosan, yang serupa dengan asam hialuronat diduga mampu bertindak sebagai agen penyembuh luka. Produk kitin dan kitosan mampu mempercepat penyembuhan luka, mengurangi frekuensi perawatan, memberikan proteksi permukaan luka yang nyaman dan tanpa rasa sakit. Selain itu, kitosan mampu mengaktifkan pertahanan jaringan tubuh untuk mencegah infeksi, dengan demikian dapat dijadikan sebagai alternatif penggunaan antibiotik (Senel dan McClure, 2004).

Mekanisme kitosan sebagai akselerator penyembuhan luka adalah dengan mengaktifasi dan memodulasi fungsi sel-sel inflamasi seperti neutrofil, makrofag, fibroblas dan sel endotel, serta meningkatkan pembentukan dan organisasi dari jaringan granulasi (Levengood dan Zhang, 2014). Bumgardner *et al.* (2003) menyatakan bahwa kitosan adalah biopolimer yang mempercepat pembentukan tulang, mempermudah penyembuhan luka dan memiliki sifat antimikroba.

Pembentukan tulang yang lebih cepat tersebut mampu mempermudah prosedur ortopedik dan implan kraniofasial.

Studi *in vitro* menunjukkan bahwa kitosan meningkatkan adhesi dan proliferasi dari sel-sel osteogenik dan *mesenchymal stem cells* (MSCs) (Seol *et al.*, 2004). Sel mesenkimal yang berdiferensiasi menjadi osteoblas mesenkimal (*mesenchymal osteoblast*) memainkan peranan penting dalam proses pembentukan jaringan tulang melalui *intramembranous ossification*. Sel osteoblas mesenkimal akan mensekresikan kolagen yang membentuk jaringan tulang muda atau *woven bone*. Jaringan tersebut berfungsi sebagai *scaffold* (kerangka awal) untuk deposisi kolagen lanjutan untuk membentuk jaringan tulang yang lebih matur (Shapiro, 2008; Vieira *et al.*, 2015).

Ardakani *et al.* (2011) melakukan sebuah studi *in vivo* untuk melihat efek pemberian kitosan secara topikal terhadap regenerasi tulang. Bubuk kitosan yang telah dicampur dengan darah pasien dimasukkan ke dalam soket gigi premolar pasca ekstraksi. Setelah 10 minggu, pasien melakukan foto rontgen periapikal dan diukur densitas tulangnya menggunakan *software Adobe Photoshop*. Ditemukan bahwa regenerasi jaringan tulang lebih cepat terjadi pada soket yang diisi oleh kitosan dibandingkan dengan soket yang tidak dirawat. Pada daerah apikal soket yang dirawat dengan kitosan memiliki 98.2% densitas maksimal tulang mandibula, yang mana 29.3% lebih besar dibandingkan dengan soket yang dibiarkan tanpa perawatan.

Dosis dan konsentrasi kitosan yang digunakan untuk memicu efek terapi pada hewan coba merupakan dosis dan konsentrasi yang aman. Hanifah dan Darmawan (2011) melaporkan bahwa pemberian kitosan secara oral dengan dosis 100 mg/200 gram BB memiliki efek anti inflamasi terhadap tikus model *rheumatoid arthritis*. Dosis letal median dari kitosan adalah >10.000 mg/kg. Hal tersebut menunjukkan bahwa kitosan tidak menyebabkan toksisitas akut dan aman diberikan secara oral pada hewan coba. Barqly (2016) menyatakan bahwa pada konsentrasi diatas 10% kitosan akan membentuk gel, karena semakin tinggi konsentrasi maka viskositas kitosan juga akan semakin tinggi. Oleh karena itu, disarankan penggunaan konsentrasi dibawah 10% agar larutan kitosan memiliki daya alir yang baik saat diberikan pada hewan coba. Zhang *et al.* (2012)



menggunakan kitosan konsentrasi 5% dengan pemberian secara oral sekali sehari selama empat minggu untuk melihat efeknya terhadap kadar trigliserida dan kolesterol dalam darah tikus obesitas.

Kitosan pada umumnya tidak larut dalam air tetapi larut dalam pelarut asam dengan pH di bawah 6 seperti asam asetat, asam format dan asam laktat. Pelarut yang sering digunakan sebagai pelarut kitosan adalah pelarut asam asetat 1% (Nadarajah, 2005).

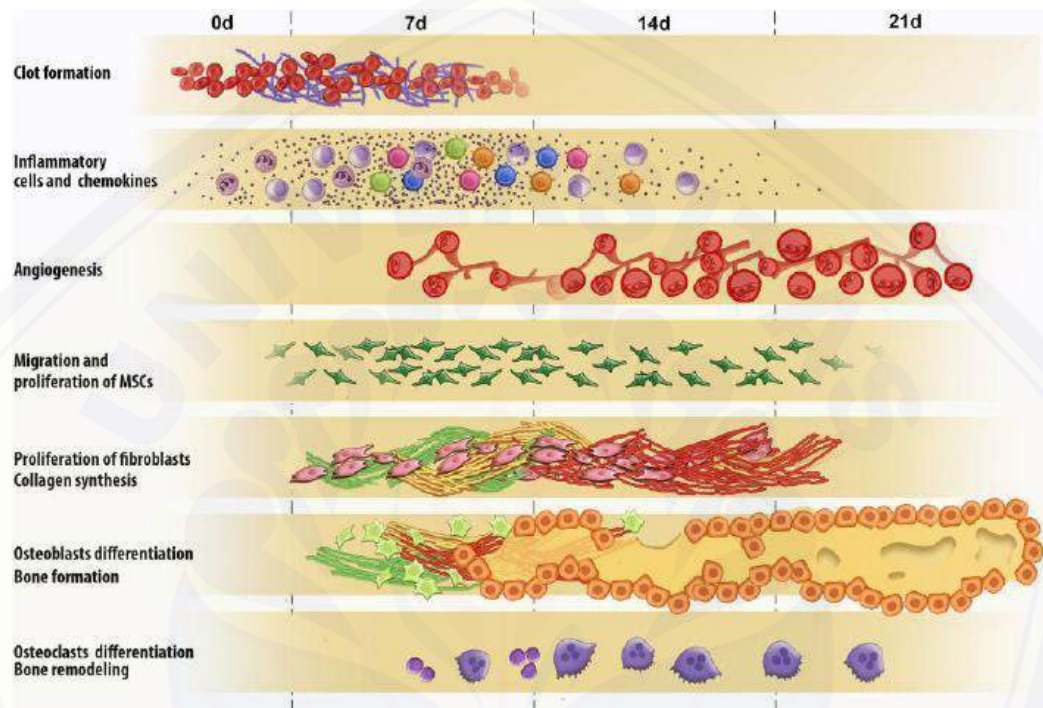
### 2.3 Penyembuhan Luka Soket Pasca Ekstraksi Gigi

Ekstraksi gigi merupakan prosedur mengeluarkan gigi dari soket tulang alveolar (Taub *et al.*, 2015). Tindakan ini diindikasikan salah satunya pada gigi yang tidak dapat direstorasi serta pada gigi dengan penyakit periodontal yang sudah tidak dapat dipertahankan (Koerner, 2006). Gigi dengan penyakit periodontal adalah indikasi paling sering untuk tindakan ekstraksi. Dalam survei epidemiologi oleh Chrysanthakopoulos (2011), 34,4% dari 1231 gigi yang telah diekstraksi disebabkan oleh penyakit periodontal, 32,2% karena karies, dan 33,4% karena alasan lain.

Penyembuhan luka melibatkan interaksi yang kompleks dan berkesinambungan antara sistem imunologis dan biologis. Proses penyembuhan luka pasca ekstraksi diawali dengan reaksi hemostasis dan inflamasi yang dilanjutkan dengan fase proliferasi dan fase remodeling (Vieira *et al.*, 2015) (lihat Gambar 2.4). Hemostasis terjadi segera setelah cedera, ditandai dengan agregasi platelet dan vasokonstriksi ujung pembuluh darah yang rusak hingga terbentuk bekuan darah (*blood clot*). Inflamasi terjadi 0-3 hari dimana sel radang menginfiltrasi daerah luka untuk mencegah infeksi serta mensekresi sitokin pro-inflamasi dan faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang berguna untuk aktivasi dan regulasi berbagai sel. Fase proliferasi terjadi mulai hari ke- 3 hingga 21 hari, ditandai dengan migrasi dan proliferasi *mesenchymal stem cell* (MSCs) dan sel fibroblas, angiogenesis, sintesis kolagen dan pembentukan tulang. Tahap terakhir adalah fase remodeling yang terjadi setelah hari ke- 21 hingga 1-2 tahun, dimana terjadi perkembangan epitelium baru, maturasi kolagen dan siklus resorpsi tulang

oleh osteoklas yang diikuti dengan pembentukan dan remineralisasi tulang oleh osteoblas (Velnar *et al.*, 2009; Orsted *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2015).

Gambar 2.4 Fase-fase penyembuhan luka soket gigi yang diawali pembentukan *blood clot* dan diakhiri pembentukan tulang yang diikuti proses *remodeling* (Vieira *et al.*, 2015)



### 2.3.1 Penyembuhan Luka Jaringan Lunak Soket Gigi Pasca Ekstraksi

Pasca dilakukan ekstraksi gigi, pemulihan dari soket akan segera dimulai. Fase penyembuhan diawali dengan reaksi hemostasis, saat *adenosine diphosphate* (ADP) dari jaringan yang rusak mengaktifasi platelet untuk melekat pada jaringan ikat kolagen, sementara darah mengisi soket yang kosong. Hal tersebut menyebabkan agregasi platelet dan terbentuk *blood clot* atau bekuan darah, yaitu eritrosit dan leukosit yang tertanam dan gel fibrin. Bekuan darah tersebut berfungsi untuk mengontrol perdarahan, melindungi soket, dan mendukung keberhasilan dari fase penyembuhan selanjutnya (Cohen dan Levy, 2014; Orsted *et al.*, 2011). Platelet juga memproduksi thrombin yang akan mengubah fibrinogen menjadi fibrin, yang berfungsi untuk memperkuat agregasi platelet sehingga terbentuk bekuan darah yang stabil atau disebut koagulum (Kumar *et al.*, 2004; Orsted *et al.*, 2011). Koagulum mengisi soket gigi sampai batas tepi jaringan lunak (mukosa oral) (Larjava, 2012).

Setelah koagulum terbentuk, platelet akan memproduksi *growth factors* yang berperan dalam fase penyembuhan luka selanjutnya yaitu *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ). PDGF berperan dalam mempengaruhi aktivitas otot halus dan sifat mitogenik dari fibroblas, serta memicu kemotaksis sel radang akut seperti neutrofil dan makrofag dari sirkulasi darah menuju daerah luka. Sel ini akan melakukan *marginasi*, *rolling*, dan ekstravasasi dan menginfiltrasi daerah luka. Selanjutnya sel tersebut akan memfagositosis bakteri dan debris jaringan sehingga area luka menjadi steril. Fungsi fagositosis ini sangat penting karena fase proliferasi tidak akan terjadi sampai daerah luka menjadi steril dari debris, bakteri, maupun sel radang (Cohen dan Levy, 2014; Orsted *et al.*, 2011). TGF- $\beta$  berperan dalam merangsang makrofag untuk mensekresi sitokin yang mengatur aktivitas seluler dalam fase inflamasi seperti *tumor necrosis factor-alfa* (TNF- $\alpha$ ), dan *interleukin-1* (IL-1) (Tabel 2.3) (Cohen dan Levy, 2014).

Tabel 2.2 Efek sitokin pro-inflamasi pada proses penyembuhan luka

Sitokin pro-inflamasi	Efek leukosit	Efek endotel	Efek fibroblas
	Agregasi dan aktivasi neutrofil	Induksi aktivasi endotel	Enzim kolagenase dan protease meningkat
IL-1 dan TNF- $\alpha$	Peningkatan sekresi sitokin pro-inflamasi lain (IL-8, IL-6, PDGF)	Peningkatan proliferasi dan produksi matriks ekstraselular	Aktivasi fibroblas jaringan (peningkatan proliferasi dan sintesis kolagen)
	Peningkatan sintesis PGE <sub>2</sub>	Perlekatan leukosit meningkat	
	Neutrofilia	Aktivitas prokoagulan meningkat	

Sumber: Kumar *et al.*, 2004; Pratama, 2016

Pada hari ke-2 sampai ke-4 pasca ekstraksi, eritrosit dan fibrin dalam koagulum mulai mengalami lisis dimulai dari daerah pusat (*center*) dan dilanjutkan di daerah tepi (*marginal*) soket (Larjava, 2012). Kondisi ini disertai proliferasi aktif sel-sel mesenkim akan menyebabkan soket terkolonisasi oleh jaringan granulasi. Jaringan granulasi yang terdiri dari jaringan pembuluh darah

baru, sel radang, dan eritrosit akan menggantikan seluruh bekuan darah dalam waktu seminggu. Jaringan ini akan digantikan oleh *provisional matrix* (PM), yang kaya sel mesenkim, serabut kolagen, serta pembuluh darah yang akan membentuk *finger-like formation* dari jaringan tulang muda yang berfungsi sebagai *scaffold* (rangka awal) pada proses re-epitelisasi, angiogenesis, dan osteogenesis (Cohen dan Levy, 2014; Pratama, 2016).

### 2.3.2 Penyembuhan Luka Jaringan Keras Soket Gigi Pasca Ekstraksi

Penyembuhan jaringan keras soket dimulai bersamaan dengan pergantian koagulum menjadi jaringan granulasi (Vieira *et al.*, 2015). Proses pembentukan tulang baru atau osteogenesis sangat dipengaruhi oleh peran sel osteoblas. Sel ini dapat berasal dari tiga sumber, yaitu periosteum, endosteum, dan sel mesenkim yang bersirkulasi (Hupp *et al.*, 2014). Faktor pertumbuhan yang dihasilkan pada fase inflamasi yaitu TGF- $\beta$  dan *bone morphogenetic protein* (BMP), akan memicu proliferasi dan diferensiasi sel-sel tersebut menjadi osteoblas (Sykaras dan Opperman, 2003).

Proses pembentukan tulang pada soket gigi diawali oleh pembentukan PM yang kaya akan sel mesenkim. Sel mesenkim akan berdiferensiasi menjadi sel osteoblas mesenkimal (*mesenchymal osteoblast* atau MOBL) yaitu sel yang mononuklear, sitoplasmanya basofil dan berbentuk kuboid atau oval (Gorustovich *et al.*, 2008). Proses pembentukan jaringan tulang yang diperantarai oleh sel mesenkim yang berdiferensiasi ini disebut proses *intramembranous ossification* (Shapiro *et al.*, 2008; Vieira *et al.*, 2015) (lihat Tabel 2.2).

Proses *intramembranous ossification* diawali oleh berdiferensiasinya sel mesenkim dalam PM menjadi sel MOBL pada hari ke-3 pasca ekstraksi (Dong-Ju *et al.*, 2012). Sel MOBL mensekresikan kolagen tipe 1 secara sirkumferensial ( $360^{\circ}$ ) pada matriks ekstraselular di sekelilingnya. Selanjutnya kolagen akan beragregasi secara acak dan membentuk jaringan tulang muda atau *immature bone* yang disebut *woven bone* (WB). Jaringan ini hiperselular dengan sel MOBL dan terbentuk dari anyaman serabut kolagen yang tersusun secara acak. Anyaman tulang ini berfungsi sebagai *scaffold* (kerangka awal) untuk deposisi kolagen



lanjutan untuk membentuk jaringan tulang yang lebih matur (Shapiro, 2008; Vieira *et al.*, 2015).

Tabel 2.3 Tahapan pembentukan jaringan tulang baru dalam proses *intramembranous ossification*

Hari ke- (pasca ekstraksi)	Tahapan proses <i>intramembranous ossification</i>
1-2	Pembentukan <i>blood clot</i> (BC) dan koagulum, fase inflamasi
2-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perubahan koagulum menjadi jaringan granulasi</li> <li>• Pembentukan <i>provisional matrix</i> (PM)</li> <li>• Proliferasi sel mesenkim menjadi sel MOBL</li> </ul>
7	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bentuk <i>woven bone</i> (anyaman tulang) (WB) terlihat di dinding perifer dan dasar soket</li> <li>• Sel MOBL menuju permukaan <i>woven bone</i> dan menjadi sel SOBL</li> </ul>
8-9	Sel SOBL mendeposisikan kolagen pada <i>woven bone</i> yang menghasilkan bentuk <i>lamellar bone</i> (LB) yang seperti pulau-pulau ( <i>spicules</i> )
10	Bentuk <i>lamellar bone</i> di perifer dan dasar soket bertemu di pusat ( <i>center</i> ) soket
14	Peningkatan massa tulang dan ketebalan tulang trabekula
21	Pembentukan tulang selesai. Soket terisi penuh dengan <i>lamellar bone</i> yang membentuk jaringan tulang trabekula yang padat.
>21	Fase remodeling oleh osteoblas dan osteoklas

Sumber : Shapiro, 2008; Dong-Ju *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2015

Pada hari ke-7 pasca ekstraksi, WB mulai terlihat di tepi dan dasar soket. Bentuk WB akan meluas dengan pola sentripetal, yang bermula dari tulang lama di tepi soket menuju pusat soket yang memicu pertemuan antar WB yang baru terbentuk dan membentuk pola trabekula (Larjava, 2012). Ketika pembentukan WB sebagai *scaffold* telah mencukupi, sel MOBL mulai bergerak ke permukaan WB yang selanjutnya disebut osteoblas permukaan (*surface osteoblast* atau SOBL). Sel ini juga mensekresikan kolagen tipe 1 dan melanjutkan deposisi kolagen secara paralel hanya pada permukaan WB (Shapiro, 2008). Sel SOBL yang aktif mensekresikan kolagen berbentuk kuboid, sedangkan yang tidak aktif berbentuk pipih atau sering disebut *lining cells* (Gorustovich *et al.*, 2008). Deposisi kolagen secara paralel oleh SOBL ini akan menghasilkan jaringan tulang yang lebih matur yang disebut *lamellar bone* (LB) (Shapiro, 2008). LB adalah bentuk jaringan tulang sekunder (*mature bone*) yang sel MOBL-nya lebih sedikit, ada sel osteoblas permukaan (*surface osteoblast* atau SOBL) di sepanjang

permukaannya, serta osteosit (osteoblas berbentuk pipih) di dalam matriksnya (Shapiro, 2008). *Remodeling* dari WB menjadi LB merupakan tahapan yang esensial untuk membentuk jaringan tulang baru yang kuat (Shapiro, 2008).

Pada hari ke-10 pasca ekstraksi, bentukan LB seperti pulau-pulau atau *spicule* sudah terlihat, dan menunjukkan jaringan tulang baru semakin matur (Dong-Ju *et al.*, 2012). Pada hari ke-14 pasca ekstraksi, terjadi peningkatan volume tulang dan ketebalan tulang trabekula diakibatkan oleh meningkatnya jumlah trabekula secara progresif dan terdapat reduksi dari pelepasan trabekula (Vieira *et al.*, 2015).

Pembentukan jaringan tulang dikatakan selesai ketika soket gigi terisi penuh oleh bentukan LB yang membentuk jaringan tulang trabekula yang padat. Hal tersebut terjadi pada hari ke-21 pasca ekstraksi. Ketika jaringan tulang baru telah selesai dibentuk, tahapan selanjutnya adalah remodeling oleh sel osteoblas dan osteoklas. Peningkatan jumlah osteoklas akan diiringi dengan stabilisasi dari densitas osteoblas yang berlangsung secara berkesinambungan (Vieira *et al.*, 2015).

#### 2.4 Densitas Tulang Alveolar

Densitas adalah ukuran yang menunjukkan kepadatan tulang. Densitas tulang adalah *marker* yang dapat digunakan sebagai parameter besarnya resiko terjadinya fraktur tulang serta progresifitas penyembuhan tulang (Tahir, 2009). Kemampuan tulang untuk melawan resiko terjadinya fraktur disebut dengan kekuatan tulang. Kekuatan tulang ditentukan oleh integrasi dari kuantitas, kualitas dan pergantian tulang (Unnanuntana *et al.*, 2011). Kuantitas tulang erat kaitannya dengan densitas tulang atau disebut *bone mineral density* (BMD), yaitu banyaknya massa tulang (gram) yang terkandung per unit volum tulang ( $\text{cm}^3$ ). BMD memberikan sumbangan terbesar pada kekuatan tulang yaitu lebih dari tiga kuartil dari kekuatan tulang total (Kyrgidis *et al.*, 2011).

Densitas tulang terbentuk dari ikatan serabut-serabut kolagen dengan kristal hidroksiapatit. Serabut kolagen adalah salah satu penyusun matriks organik tulang. Matriks organik tulang terdiri atas serat kolagen sebesar 90-95%, dan



sisanya dibentuk oleh medium gelatinosa homogen yang disebut dengan substansi dasar (Guyton dan Hall, 2007).

Densitas tulang dipengaruhi oleh keseimbangan dinamik antara proses pembentukan dan penyerapan tulang. Bila pertumbuhan linear dan volume massa tulang maksimal telah tercapai, proses remodeling bertujuan untuk mempertahankan massa tulang (Setyorini *et al.*, 2009). Proses remodeling merupakan proses yang seimbang antara penyerapan tulang dan pengisian kembali celah penyerapan tersebut, hal itu dapat menyebabkan meningkatnya kepadatan tulang (Ganong, 2003).

Densitas tulang dapat digunakan dalam evaluasi progresifitas penyembuhan tulang. Selama ini penyembuhan tulang diukur melalui pemeriksaan secara histologis dan radiologis. Meskipun evaluasi secara histologis dianggap sebagai standar yang sangat baik dalam mengukur pertumbuhan tulang di dalam kavitas atau defek tulang, metode ini memiliki beberapa kelemahan. Keterbatasan dari potongan jaringan histologis adalah hanya mampu menunjukkan area yang spesifik pada suatu daerah tertentu, tidak pada keseluruhan daerah defek, sehingga dapat menghambat perbandingan hasil dari pengukuran. Selain itu, pertumbuhan tulang di dalam kavitas dapat menunjukkan pola yang tidak teratur, sehingga analisis histologis menggunakan potongan dari satu area belum tentu dapat mewakili pertumbuhan tulang di daerah lainnya (Filho *et al.*, 2011).

Pemeriksaan secara radiografis, khususnya dengan teknik radiografi digital, telah banyak digunakan dalam penelitian yang menyelidiki kerusakan tulang, evaluasi dari perbaikan tulang serta pembentukan jaringan tulang. Metode ini efisien dalam mendeteksi lesi tulang, menghitung nilai densitas tulang, serta dapat diolah menggunakan alat perangkat lunak yang akan membantu dalam visualisasi, pembatasan dan pengukuran dari lesi atau defek tulang (Martins *et al.*, 2005). Densitas tulang dapat dihitung melalui analisis tingkat radiopasitas tulang dalam radiograf digital, yang dinyatakan sebagai *optical density*. Nilai *optical density* didapatkan dari nilai *mean gray level* pada kotak *histogram* dalam *software Adobe Photoshop* setelah diaplikasikan pada radiograf digital tulang (Barbosa *et al.*, 2014). Daerah yang paling radiopak atau paling besar densitas tulangnya akan mengeluarkan nilai *mean gray level* sebesar 256, sementara daerah yang paling

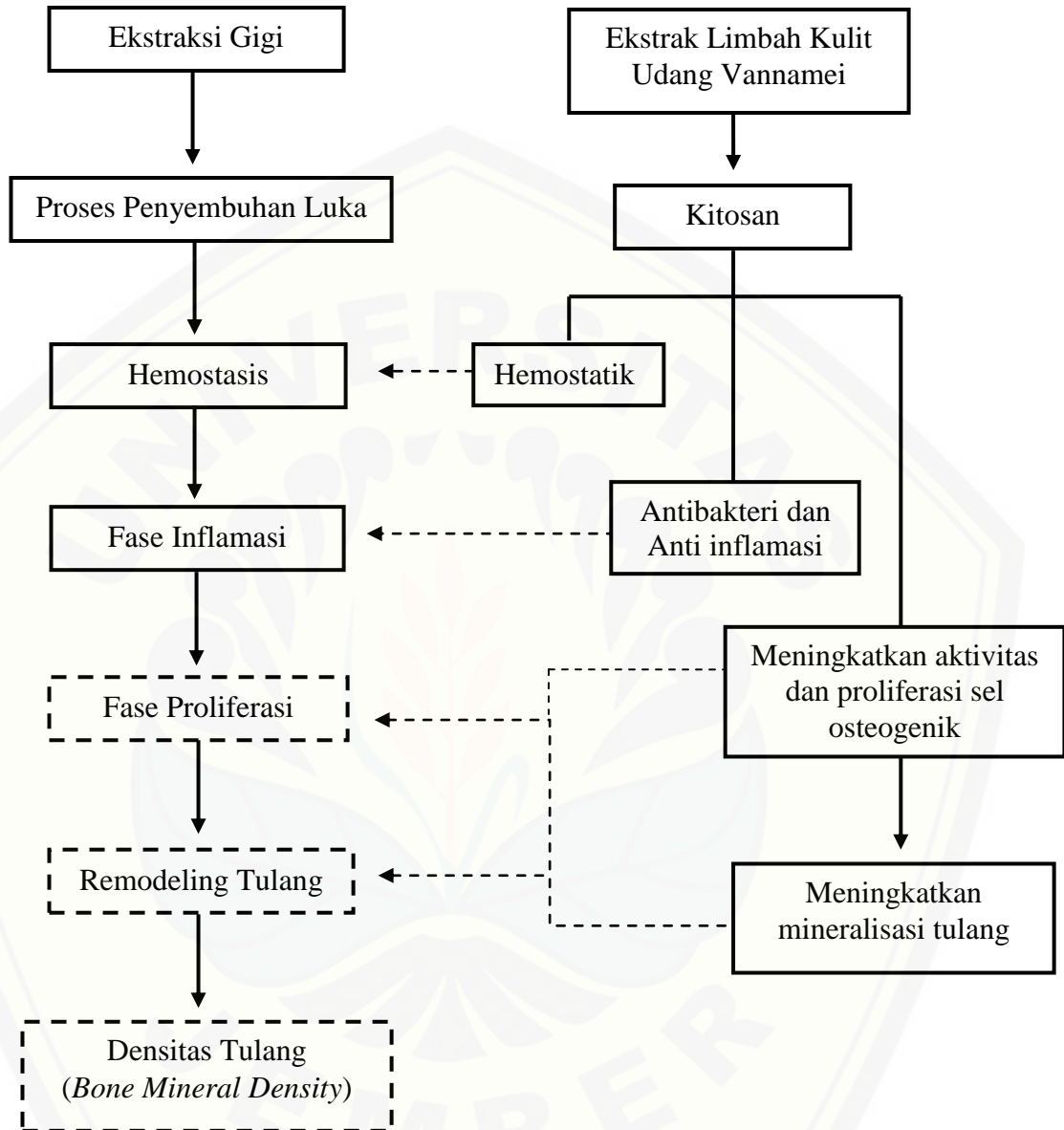
radiolusen atau paling rendah densitas tulangnya akan mengeluarkan nilai *mean* 0 (Yustiawan, 2015).

## 2.5 Hipotesis

Berdasarkan tinjauan pustaka, hipotesis penelitian ini adalah pemberian ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) secara oral dapat meningkatkan densitas tulang alveolar pasca ekstraksi pada tikus Wistar jantan.



2.6 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan:

----- : proses yang diamati

-----> : mempercepat proses

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris, dengan rancangan penelitian *the post test only control group design* yaitu melakukan pengukuran sesudah perlakuan diberikan, kemudian membandingkan hasilnya dengan kelompok kontrol (Notoatmodjo, 2005).

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.2.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Pangan Politeknik Negeri Jember untuk pembuatan ekstrak limbah kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*), Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember bagian Farmakologi dan Hewan Coba untuk proses perlakuan hewan coba, dan Laboratorium Klinik Parahita Jember untuk pembuatan foto rontgen sampel tulang hewan coba.

#### 3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2017 – Januari 2018.

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak limbah kulit udang vannamei secara oral dengan konsentrasi 5%.

#### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi.

#### 3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah:

- a. Pembuatan ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei.
- b. Dosis ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei.
- c. Kriteria hewan coba.
- d. Tahap perlakuan hewan coba.
- e. Teknik pembuatan foto radiografi tulang alveolar.
- f. Teknik pengukuran densitas tulang alveolar.

### 3.4 Definisi Operasional Penelitian

#### 3.4.1 Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

Ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) adalah ekstrak berbentuk bubuk yang dihasilkan dari ekstraksi limbah kulit kepala dan kulit badan udang vannamei yang didapatkan dari Tambak Anugrah Makmur di Desa Tanjung Demung, Kecamatan Besuki, Kabupaten Situbondo. Ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei diberikan pada tikus secara oral dalam bentuk larutan kitosan 5% dengan dosis 100 mg/200 gram BB. Larutan kitosan 5% setara dengan bubuk kitosan sebanyak 0.5 gr yang dilarutkan dengan asam asetat 1% sebanyak 10 ml.

#### 3.4.2 Densitas Tulang Alveolar

Densitas tulang atau disebut *bone mineral density* (BMD) dalam penelitian ini adalah banyaknya massa tulang yang terbentuk yang diinterpretasikan melalui radiopasitas jaringan tulang pada radiograf digital secara dua dimensi. Densitas tulang yang diukur secara radiografis dinyatakan dalam *optical density*. Nilai *optical density* didapatkan dari penghitungan *mean gray level* pada *tool histogram software Adobe Photoshop CC 2018* yang diaplikasikan pada radiograf digital tulang alveolar pasca ekstraksi gigi tikus Wistar jantan. Penghitungan dilakukan secara vertikal pada tiga daerah yaitu apikal, medial, dan koronal soket gigi molar satu kiri bawah pada hari ke-21 dan ke-28 pasca ekstraksi gigi. Semakin besar nilai *mean gray level* menunjukkan nilai *optical density* yang semakin besar.

### 3.4.3 Ekstraksi Gigi

Ekstraksi gigi dilakukan pada molar satu kiri rahang bawah tikus menggunakan sonde setengah lingkaran, ekskavator, *artery clamp* dan pinset. Sebelum dilakukan ekstraksi, tikus dianastesi dengan ketamin secara intraperitoneal.

## 3.5 Sampel Penelitian

### 3.5.1 Kriteria Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria sebagai berikut:

- a. Tikus putih galur Wistar jenis kelamin jantan
- b. Tikus berumur 2-3 bulan
- c. Tikus dengan berat 180-250 gram
- d. Tikus dalam keadaan sehat dan tidak memiliki kelainan atau cacat

### 3.5.2 Besar Sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus (Daniel, 2005), yaitu:

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

$n$  = jumlah sampel minimum

$\sigma$  = standar deviasi sampel

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

$Z$  = konstanta pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0.05$  maka  $Z = 1,96$

Pada penelitian ini, nilai  $\sigma$  diasumsikan sama dengan nilai  $d$ , hal ini karena nilai  $\sigma^2$  sangat jarang diketahui, maka penghitungan besar sampel adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned} n &= \frac{(1,96)^2 \cdot \sigma^2}{\sigma^2} \\ &= (1,96)^2 \\ &= 3,84 \text{ (dibulatkan menjadi 4)} \end{aligned}$$



Berdasarkan perhitungan rumus, jumlah sampel minimal adalah 4 pada setiap kelompok. Pada penelitian ini digunakan 5 sampel pada setiap kelompok penelitian.

### **3.6 Penghitungan Dosis**

#### **3.6.1 Dosis Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)**

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hanifah dan Darmawan (2015), dosis efektif kitosan pada hewan coba tikus adalah 100 mg/200 gram BB per hari. Jika dikonversikan untuk tikus pada penelitian ini, maka dosis ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei yang digunakan adalah 90-125 mg/180-250 gram BB tikus per hari (Lampiran E. Penghitungan Dosis).

#### **3.6.2 Dosis Ketamin**

Menurut Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan (2016), dosis ketamin intraperitoneal yang digunakan untuk anestesi tikus adalah 40-100 mg/kg BB. Ketamin yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai konsentrasi 1000 mg/10 ml. Jika dikonversikan untuk tikus pada penelitian ini, maka dosis ketamin yang digunakan adalah 0,72-0,1 ml/180-250 gram BB tikus (Lampiran E. Penghitungan Dosis).

### **3.7 Alat dan Bahan Penelitian**

#### **3.7.1 Alat Penelitian**

- a. Kandang tikus (Citra Plastics, Indonesia)
- b. Tempat makan dan minum tikus
- c. Timbangan digital (Camry EK 3650, China)
- d. Sonde lambung (FKG UNEJ, Indonesia)
- e. Ekskavator besar dan kecil (Schezer, Germany)
- f. Sonde setengah lingkaran (Dentica, Pakistan)
- g. *Artery clamp* (Onemed, Indonesia)
- h. Pinset (Dentica, Pakistan)

- i. *Disposable syringe* (Onemed, Indonesia)
- j. *Dental rat chair* (FKG UNEJ, Indonesia)
- k. Blender (National, Indonesia)
- l. Neraca digital (Pioneer, Ohaus Corp., USA)
- m. Gelas ukur (Iwaki Pyrex, Japan)
- n. Tabung reaksi (Iwaki Pyrex, Japan)
- o. *Mortar dan pastle* (RRC, China)
- p. Oven (Binder, Germany)
- q. *Blade dan Scalpel* (Meiden Stainless, Japan)
- r. Gunting bedah (Dentica, Pakistan) dan pisau malam
- s. Toples kedap udara (Lion Star, Indonesia)
- t. Pot jaringan (Aneka Kimia, Indonesia)
- u. Sarung tangan dan masker (Onemed, Indonesia)
- v. Papan bedah
- w. Baki *stainless steel*
- x. Spidol, kertas label, dan kertas saring
- y. Foto rontgen thorax (Toshiba Rotanode DRX-1603B, Japan). Digunakan foto rontgen thorax FCR dengan *computed radiography* agar semua sampel tulang dapat difoto secara bersamaan dalam 1 film sehingga mengurangi resiko bias.
- z. *Software Adobe Photoshop CC 2018* (Adobe System, California, USA)

### 3.7.2 Bahan Penelitian

- a. Kulit kepala dan kulit badan udang vannamei yang didapatkan dari Tambak Anugrah Makmur, Desa Tanjung Demung, Kecamatan Besuki, Kabupaten Situbondo.
- b. Larutan NaOH 8% dan 50% (Makmur Sejati, Indonesia)
- c. Larutan HCl 1.25 N (Fakultas Farmasi UNEJ, Indonesia)
- d. Aquades (Widatra Bhakti, Indonesia)
- e. Larutan asam asetat 1% (Makmur Sejati, Indonesia)
- f. Larutan saline 3% (Otsuka, Indonesia)

- g. Ketamin HCl (KTM-100, Indonesia)
- h. Eter (Merck KgA, Jerman)
- i. Larutan buffer formalin 10% (FKG UNEJ, Indonesia)
- j. *Cotton pellete*
- k. Pakan standar hewan coba (Turbo 521, Indonesia)
- l. Air minum hewan coba
- m. Serbuk kayu

### 3.8 Prosedur Penelitian

#### 3.8.1 *Ethical Clearence*

Sebelum dilakukan penelitian, mengurus perizinan pelaksanaan penelitian berupa *ethical clearance* ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, dengan *Ethic Committee Approval* No. 037/UN25.8/KEPK/DL/2018.

#### 3.8.2 Persiapan Hewan Coba

20 ekor tikus Wistar jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan awal berkisar  $\pm 200$  gram diadaptasikan dalam kandang selama 7 hari dan diberi makanan standar tikus dan minum setiap hari secara *ad libitum*. Setiap 1 kandang maksimal diisi oleh 3 tikus. Proses adaptasi dilakukan untuk memperoleh keseragaman (homogenesitas), mengurangi stres hewan coba sebelum dilakukan penelitian serta untuk memenuhi kriteria penelitian.

#### 3.8.3 Pembuatan Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*)

Pembuatan ekstrak kitosan dilakukan melalui isolasi senyawa kitin dan kitosan dengan menggunakan metode yang dikembangkan oleh No dan Meyers (1997) dengan cara sebagai berikut:

- a. Limbah kulit kepala dan kulit badan udang vannamei dicuci dan dibersihkan dengan air kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari selama  $\pm 30-60$  menit. Limbah kulit udang kering sebanyak  $\pm 450$  gram dihaluskan dengan

menggunakan blender tanpa air hingga didapatkan bubuk limbah kulit sebanyak 400 gram.

- b. Tindakan Deproteinasi (penghilangan protein) dilakukan agar limbah kulit udang tidak cepat mengalami pembusukan. Deproteinasi membutuhkan larutan basa (NaOH). Dilakukan dengan cara mencampurkan bubuk limbah kulit udang vannamei ke dalam NaOH 8% rasio 1:6 (b/v) pada suhu 80-85°C selama 1 jam. Setelah itu padatan dinetralkan dengan aquades dan disaring dengan kertas saring, kemudian dimasukkan oven hingga kering (Akbar *et al.*, 2015).
- c. Tindakan Demineralisasi (penghilangan mineral) pada bubuk hasil deproteinasi. Tahap ini membutuhkan larutan asam (HCl). Ketika HCl dicampurkan pada bubuk hasil deproteinasi ( $\text{CaCO}_3$ ) akan mengeluarkan gelembung  $\text{CO}_2$  dan air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) sehingga menyisakan  $\text{CaCl}_2$ , hasil proses ini disebut kitin. Demineralisasi dilakukan dengan cara mencampurkan bubuk hasil deproteinasi ke dalam HCl 1,25 N rasio 1:10 (b/v) pada suhu 100°C selama 2 jam. Setelah itu padatan dinetralkan dengan aquades dan disaring dengan kertas saring, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 80°C selama 24 jam (Akbar *et al.*, 2015; Barqly, 2016).
- d. Tindakan Deasetilisai (penghilangan gugus asetil) untuk pembuatan kitosan. Tindakan ini membutuhkan larutan basa (NaOH). Ketika terjadi pencampuran ekstrak kitin dengan NaOH, terjadi adisi OH pada amida kemudian terjadi eliminasi gugus  $\text{COCH}_3$ , sehingga terbentuklah  $\text{NH}_2$  yang berikatan dengan polimer kitin. Hasil proses ini merupakan senyawa yang disebut dengan kitosan. Deasetilasi dilakukan dengan cara mencampurkan kitin ke dalam NaOH 50% rasio 1:20 (b/v) pada suhu 120°C selama 1 jam. Setelah itu padatan dinetralkan dengan aquades dan disaring dengan kertas saring, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 100°C selama 24 jam (Barqly, 2016).

#### 3.8.4 Persiapan Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang *Vannamei* (*Litopenaeus vannamei*)

- a. Pembuatan larutan menggunakan rumus sebagai berikut (Puriwiyanto, 2013):

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

M = konsentrasi

$$V2 = V1 + \text{pelarut}$$

- b. Pembuatan larutan asam asetat 1%.

Berdasarkan hasil perhitungan diperlukan asam asetat 100% sebanyak 1 ml untuk dicampurkan kedalam aquades 100 ml sehingga didapatkan asam asetat 1%.

- c. Pembuatan larutan kitosan 5%.

Berdasarkan hasil perhitungan diperlukan bubuk kitosan sebanyak 0.5 gr untuk dicampurkan ke dalam asam asetat 1% sebanyak 10 ml sehingga didapatkan kitosan 5%. Bubuk kitosan dan asam asetat dicampur dengan *mortar* dan *pastle* hingga homogen kemudian dimasukkan didalam *disposable syringe*. Untuk penentuan pemberian larutan kitosan 5% pada tikus sesuai dosis digunakan konversi rumus perbandingan yang dapat dilihat pada Lampiran E.

#### 3.8.5 Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba

Hewan coba sebanyak 20 ekor tikus Wistar jantan dibagi secara acak menjadi 2 kelompok, yaitu:

- 1) Kelompok I adalah kelompok kontrol yang terdiri dari 10 ekor tikus Wistar.

Kelompok ini dibagi menjadi 2 sub kelompok, dengan 5 ekor tikus pada setiap sub kelompok. Perlakuan hewan coba dijabarkan sebagai berikut: melakukan anestesi hewan coba dengan ketamin secara intraperitoneal, kemudian gigi molar satu kiri bawah hewan coba diekstraksi. Pasca ekstraksi gigi, tikus diberi larutan saline secara oral sekali dalam sehari. Tikus diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum*.

- a. Pada hari ke-21 hewan coba dieutanasia dan dilakukan pengambilan sampel tulang hewan coba (kelompok Saline 21).



- b. Pada hari ke-28 hewan coba dieutanasia dan dilakukan pengambilan sampel tulang hewan coba (kelompok Saline 28).
- 2) Kelompok II adalah kelompok perlakuan yang terdiri dari 10 ekor tikus Wistar. Kelompok ini dibagi menjadi 2 sub kelompok, dengan 5 ekor tikus pada setiap sub kelompok. Perlakuan hewan coba dijabarkan sebagai berikut: melakukan anestesi hewan coba dengan ketamin secara intraperitoneal, kemudian gigi molar satu kiri bawah hewan coba diekstraksi. Pasca ekstraksi gigi, tikus diberi larutan ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei dengan dosis 100 mg/200 gram BB secara oral sekali dalam sehari. Tikus diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum*.
- a. Pada hari ke-21 hewan coba dieutanasia dan dilakukan pengambilan sampel tulang hewan coba (kelompok Kitosan 21).
  - b. Pada hari ke-28 hewan coba dieutanasia dan dilakukan pengambilan sampel tulang hewan coba (Kelompok Kitosan 28).

#### 3.8.6 Ekstraksi Gigi Hewan Coba

Ekstraksi molar satu kiri bawah tikus dilakukan pada masing-masing kelompok yang sebelumnya telah dianestesi dengan ketamin dengan dosis terendah untuk injeksi intraperitoneal yaitu 40 ml/kg BB (Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan, 2016), dosis yang digunakan pada tikus adalah 0,72-0,1 ml/180-250 gram BB tikus. Anestesi dilakukan dengan cara menginjeksi ketamin menggunakan *disposable syringe* pada bagian kuadran posterior abdomen tikus. Ekstraksi gigi dilakukan dengan cara memasukkan sonde setengah lingkaran ke dalam sulkus gingiva untuk merusak perlekatan gingiva dan gigi. Lalu gigi digoyang dengan menggunakan *artery clamp* serta diungkit dengan menggunakan ekskavator kecil. Dilakukan secara hati-hati dengan arah dan gerakan yang menimbulkan trauma minimal. Darah yang tersisa pada soket pasca ekstraksi dibersihkan dengan *cotton pellete*.



### 3.8.7 Pengambilan Sampel Tulang Hewan Coba

Setelah seluruh perlakuan selesai selama 21 hari dan 28 hari, tikus pada seluruh kelompok dieutanasia dengan cara over inhalasi eter hingga tidak terdeteksi denyut jantung dan pernafasannya. Pengambilan sampel tulang alveolar tikus dilakukan dengan cara memotong mandibula kiri tikus dari regio molar satu sampai molar tiga, kemudian mandibula difiksasi dalam larutan buffer formalin 10% minimal selama 24 jam. Fiksasi bertujuan untuk mencegah terjadinya proses autolisis, mempertahankan morfologi sel, serta mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri.

### 3.8.8 Pembuatan Foto Rontgen Sampel Tulang Hewan Coba

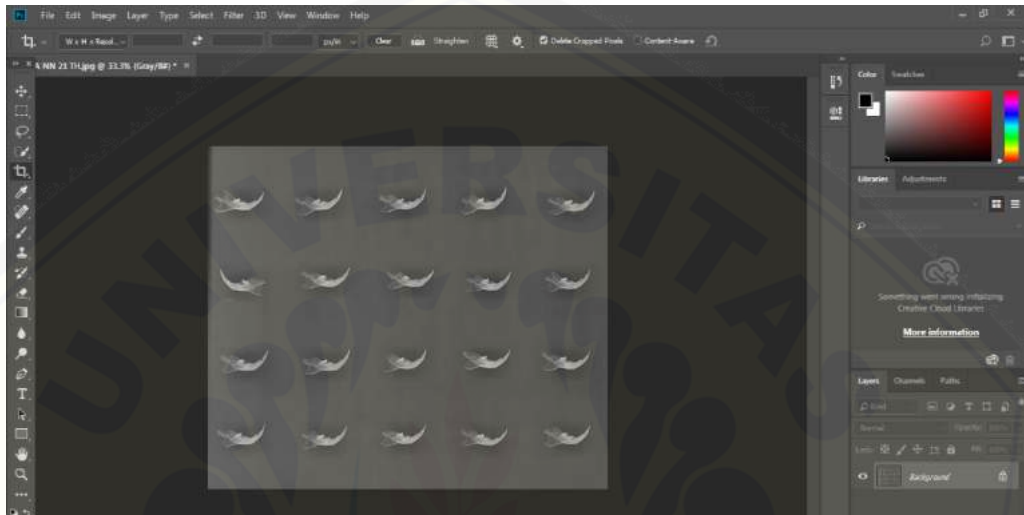
Pembuatan foto rontgen tulang sampel tikus dilakukan di Laboratorium Parahita, Jember. Penentuan kepadatan tulang diukur melalui analisis *digital optical density* dari radiopasitas pada radiograf digital tulang. Digunakan foto rontgen thorax agar semua sampel tulang dapat difoto secara bersamaan dalam 1 film sehingga mengurangi resiko bias. 20 sampel tulang mandibula kiri tikus diletakan berjejer pada *imaging plate*, kemudian sampel tulang difoto. Pengolahan foto rontgen dilakukan dengan cara digital (*computed radiography*). Hasil foto pada *imaging plate* diubah menjadi sinyal digital yang selanjutnya ditampilkan pada monitor komputer kemudian *file* disimpan dalam *flash disk*.

### 3.8.9 Pengukuran Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Gigi

Penghitungan densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi dilakukan secara manual pada hasil digital radiograf. Pengukuran dibagi secara vertikal pada tiga daerah, yaitu koronal, medial, dan apikal dari soket molar satu kiri rahang bawah pasca ekstraksi menggunakan bantuan *tool grid* pada *Adobe Photoshop CC 2018*. *Grid* membagi tiga daerah secara vertikal dengan ketinggian masing-masing sebesar 0,056 inci atau sekitar 1,42 mm. Untuk lebar *grid* disesuaikan dengan lebar soket tiap sampel. Lebar soket berkisar antara 0,167 inci (4,24 mm) sampai dengan 0,361 inci (9,17 mm).

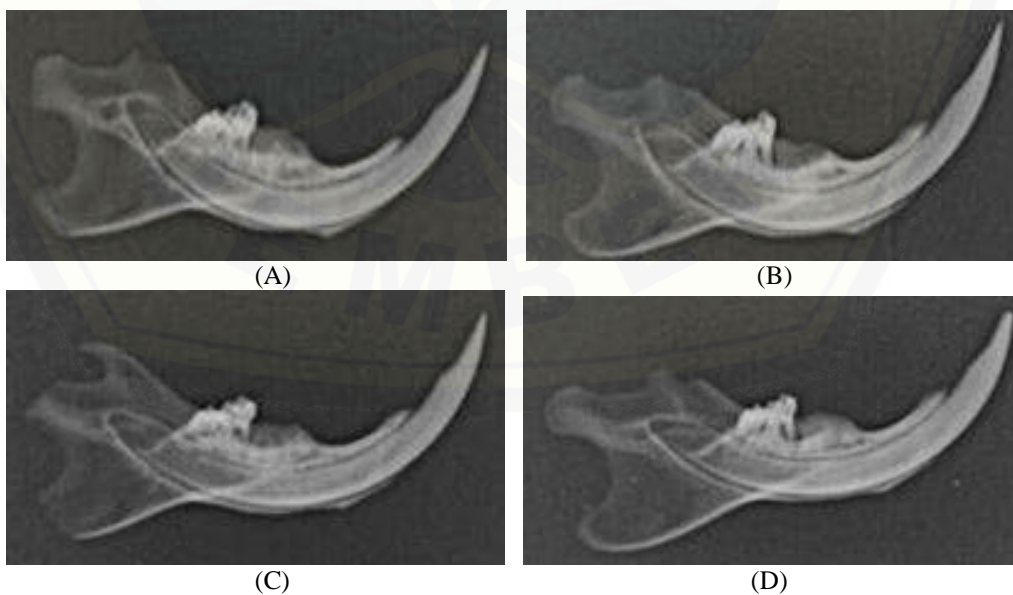
Setiap gambar dianalisis melalui nilai *gray level* pada kotak *histogram* pada *software Adobe Photoshop CC 2018*, dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Memasukkan *softfile* hasil foto rontgen pada *software Adobe Photoshop CC 2018* dengan cara klik *File – Open*, kemudian akan muncul gambar seperti di bawah ini:



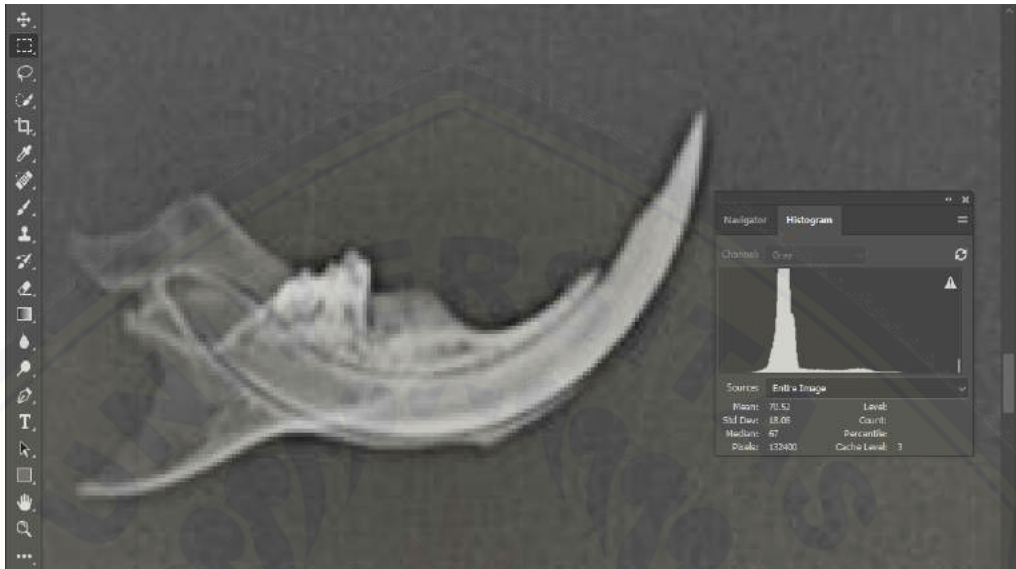
Gambar 3.1 Tampilan foto rontgen digital yang memuat 20 sampel tulang setelah dimasukkan kedalam *Adobe Photoshop CC 2018*

- b. Untuk memudahkan penghitungan densitas, gambaran radiograf dari setiap sampel pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan perlu diperbesar.



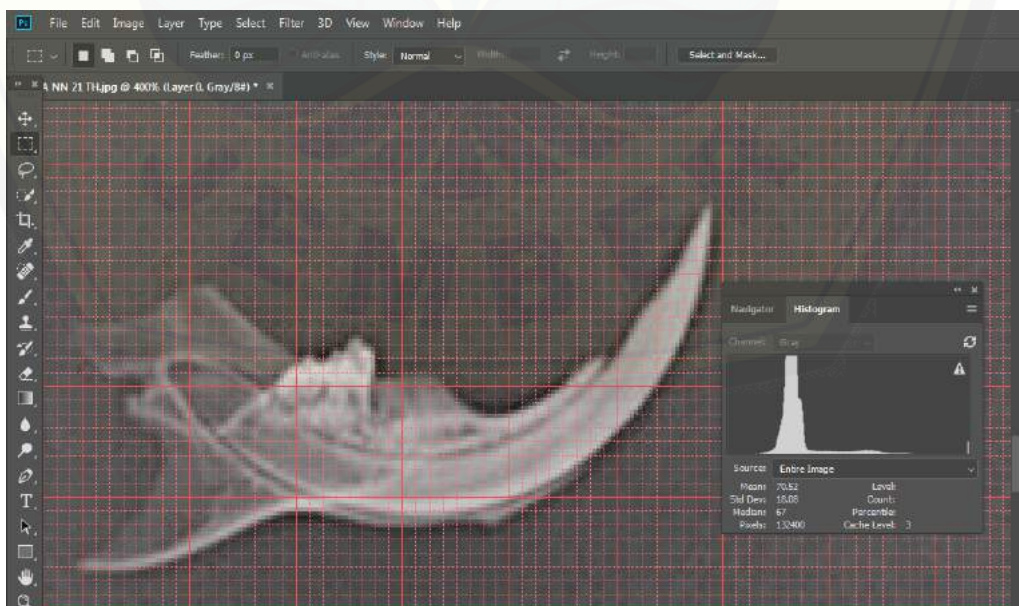
Gambar 3.2 Tampilan foto rontgen tiap sampel saat diperbesar. (A) Sampel foto kelompok Saline 21. (B) Sampel foto kelompok Saline 28. (C) Sampel foto kelompok Kitosan 21. (D) Sampel foto kelompok Kitosan 28.

- c. Untuk perbesaran sampel dapat diatur hingga perbesaran 400%. Kemudian memunculkan kotak *histogram* yang akan menunjukkan nilai *mean gray level* dengan cara klik *Window – Histogram*. Lalu akan tampak seperti ini:



Gambar 3.3 Tampilan foto rontgen tiap sampel pada ukuran 400% dengan kotak *histogram* yang akan memunculkan nilai *mean gray level*

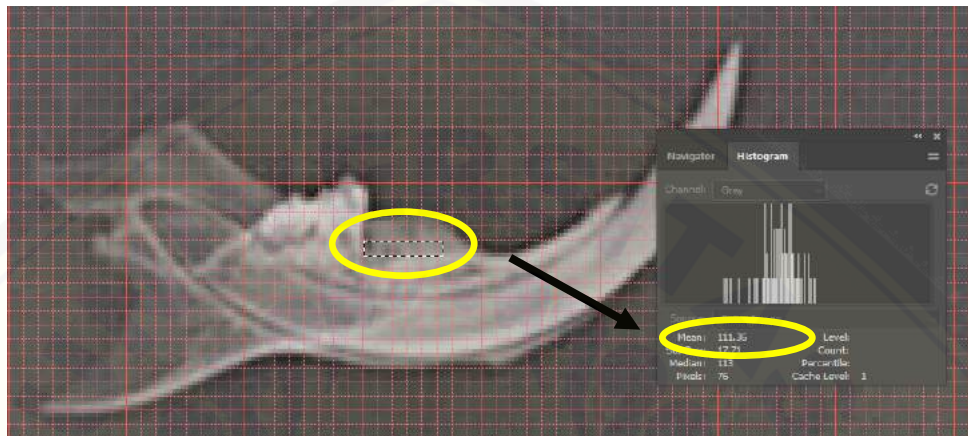
- d. Untuk memunculkan *grid* atau garis yang berfungsi untuk membagi tiga daerah pada tulang alveolar secara vertikal (apikal, medial dan koronal) yaitu dengan cara klik *View – Show – Grid*. Lalu akan tampak gambar seperti di bawah:



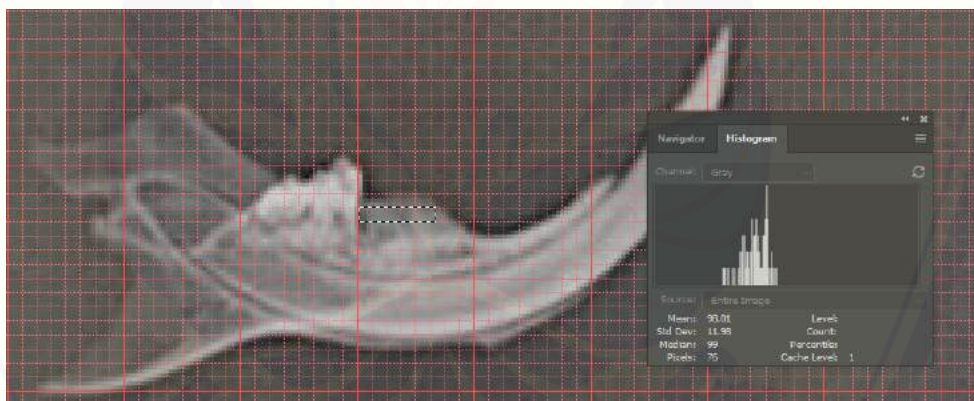
Gambar 3.4 Tampilan foto rontgen tiap sampel tulang dengan *grid*



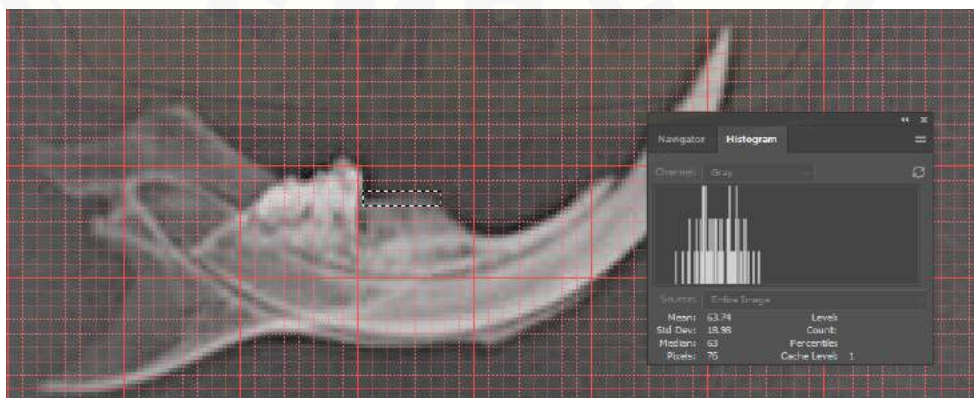
- e. Nilai densitas tulang alveolar atau *digital optical density* didapatkan dari nilai *mean gray level* pada kotak *histogram*. Untuk mendapatkan nilai tersebut, *block area* yang akan dihitung densitasnya sesuai dengan tinggi dan lebar soket. Nilai mean akan muncul secara otomatis pada kotak *histogram*. Penghitungan dimulai dari daerah apikal, lalu ke medial, dan terakhir pada daerah koronal.



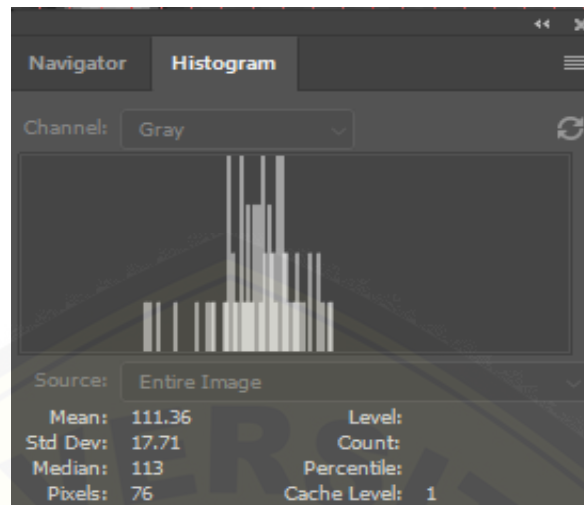
Gambar 3.5 Penghitungan densitas tulang alveolar pada daerah apikal



Gambar 3.6 Penghitungan densitas tulang alveolar pada daerah medial



Gambar 3.7 Penghitungan densitas tulang alveolar pada daerah koronal



Gambar 3.8 Tampilan kotak histogram yang menunjukkan nilai *mean gray level*

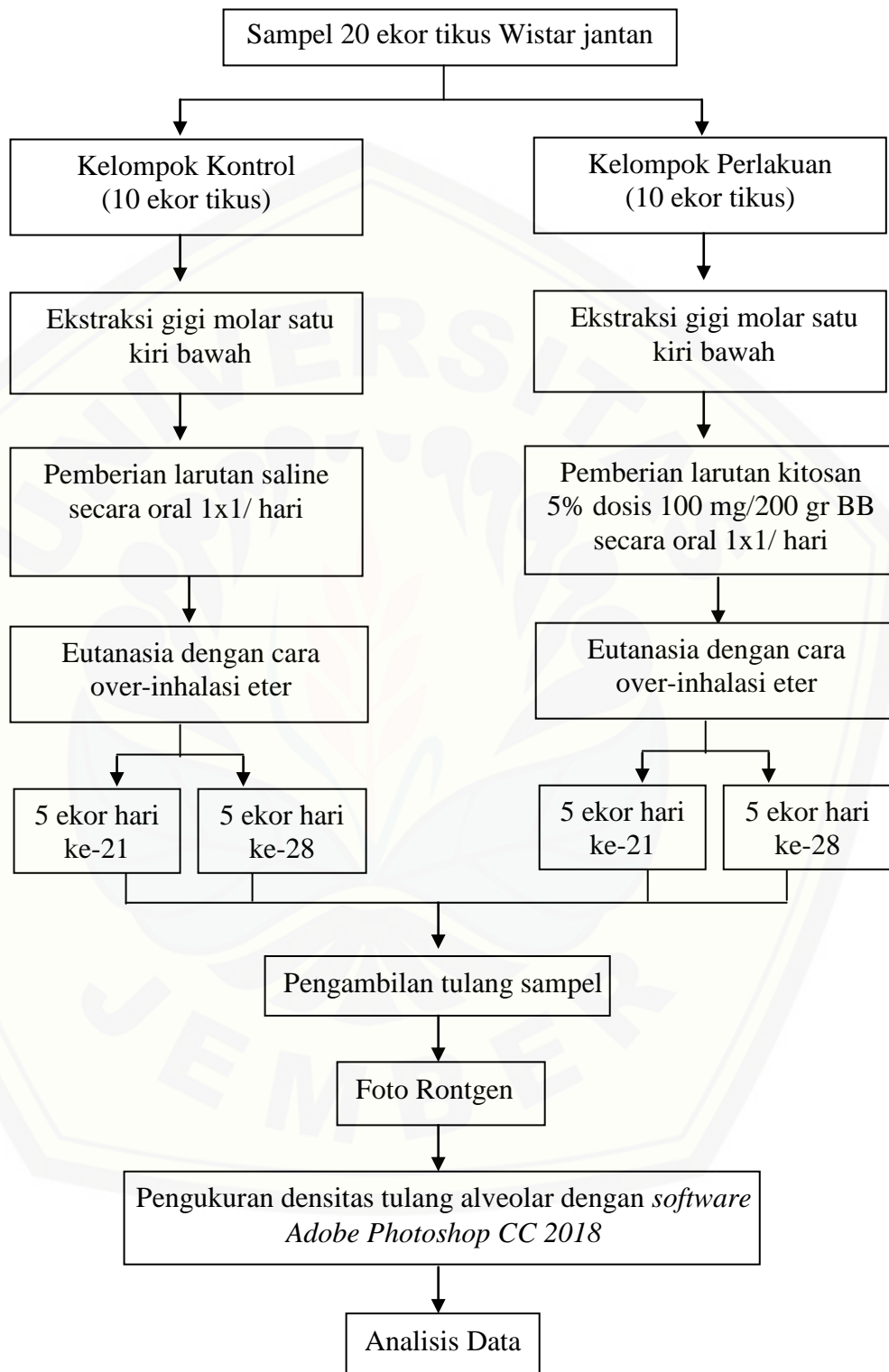
Tulang alveolar dengan densitas (*optical density*) paling besar atau memiliki radiopasitas tertinggi akan mengeluarkan nilai *mean gray level* sebesar 256, sementara tulang dengan densitas paling rendah atau paling radiolusen akan mengeluarkan nilai *mean gray level* sebesar 0 (Yustiawan, 2015).

### 3.9 Analisis Data

Data penelitian yang diperoleh ditabulasikan, kemudian dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan menggunakan uji *Levene* dengan nilai signifikansi 95% ( $p \geq 0,05$ ). Jika data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji statistik parametrik menggunakan uji *One Way ANOVA* untuk menguji hipotesis komparatif dengan cara membandingkan subyek yang berjumlah lebih dari dua dengan data berskala rasio dengan nilai signifikansi 95% ( $p < 0,05$ ). Selanjutnya, dilakukan uji lanjut *LSD (Least Significance Different)* untuk mengetahui perbedaan secara signifikan.



### 3.10 Alur Penelitian



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Kesimpulan

Pemberian ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei (*Litopenaeus vannamei*) secara oral memiliki efek berupa peningkatan densitas tulang alveolar pasca ekstraksi gigi pada tikus Wistar jantan.

### 5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, penulis dapat memberikan saran sebagai berikut.

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan waktu yang lebih lama untuk menganalisis pengaruh pemberian kitosan terhadap stabilitas nilai densitas tulang pada proses regenerasi tulang pasca ekstraksi gigi.
- b. Dapat dilakukan penelitian dengan sampel tulang pada organ tubuh yang berbeda untuk mengetahui efek pemberian kitosan terhadap jaringan tulang pada tubuh secara keseluruhan.
- c. Melakukan modifikasi sehingga ekstrak yang dihasilkan berbentuk mikro-kitosan atau nano-kitosan untuk meningkatkan efektivitas pemberian dan metabolisme kitosan dalam tubuh.
- d. Dapat dilakukan metode pemeriksaan radiografi dengan alat *microcomputed tomography* (micro-CT) yang dapat memberikan gambaran tulang alveolar pasca ekstraksi gigi secara tiga dimensi dalam resolusi tinggi.
- e. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan kriteria umur atau tingkat kesegaran dari limbah kulit udang vannamei yang berbeda untuk menganalisis dan membandingkan kualitas ekstrak kitosan yang dihasilkan dari limbah kulit udang tersebut.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, Y. R., G. Barqly, A. Sulistian, A. Elnisa, dan A. Wulan. 2015. Daya antibakteri kitin pada limbah kulit udang terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *BIMKGI* 3(2): 1-5.
- Antonino, R. S. C. M. d. Q., B. R. P. L Fook, V. A. D. O. Lima, R. I. D. F. Rached, E. P. N. Lima, R. K. D. S. Lima, C. A. P. Covas, dan M. V. L Fook. 2017. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Marine Drugs* 15, 141.
- Ardakani, F. E., A. N. Azam, S. Yassaei, F. Fathei, dan G. Rouhi. 2011. Effects of chitosan on dental bone repair. *Health* 3(4): 200-205.
- Barbosa, D., A. G. J Villaverde, E. A. L Arisawa, R. A Souza. 2014. Laser therapy in bone repair in rats: analysis of bone optical density. *Acta Ortop Bras.* 22(2): 71-4.
- Barqly, G. J. K. 2016. Tingkat Kebersihan *Smear Layer* Gambaran *Scanning Electron Microscope* Saluran Akar Gigi setelah Diirigasi dengan Larutan Kitosan Limbah Kulit Udang Windu (*Penaeus Monodon*). *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Briggs, M., S. F. Smith, R. Subasinghe, dan M. Phillips. 2004. *Introductions and Movement of Penaeus vannamei and Penaeus stylirostris in Asia and The Pacific*. Bangkok: FAO.
- Bumgardner, J. D., R. Wisner, P. D, Gerard, P. Bergin, B. Chest-nutt, dan M. Marin. 2003 Chitosan: Potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 14: 423-438.
- Chrysanthakopoulos, N. A. 2011. Original Article: Periodontal reasons for tooth extraction in a group of greek army personnel. *JODDD* 5(2): 55-60.
- Cohen, N., dan J. C. Levy. 2014. Healing processes following tooth extraction in orthodontic cases. *J Dentofacial Anom Orthod* 17: 304.
- Croisier, F., dan C. Jérôme. 2013. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal* 49: 780-792.

- Cui, Y. Q., dan R. W Shen. 2006. Effect of N-acetylglucosamine on osteoblastic activity and expression of bone morphogenetic protein in fracture healing. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation* 10(5): 158-160.
- Daniel, W. 2005. *Biostatic a Foundation for Analysis in The Health Science*. 6<sup>th</sup> ed. Canada: John Wiley and Sons Inc.
- Dompeipen, E. J., M. Kaimudin, dan R. P. Dewa. 2016. Isolasi kitin dan kitosan dari limbah kulit udang. *Majalah Biam* 12(01): 32-38.
- Dong-Ju, J-Kook, Cheryl, Ahran, Jung-Seok, Ui-Won, Chang-Sung, Seung-Jong, dan Seong-Ho. 2012. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. *J Periodontal Implant Sci* 42(5): 158-165.
- Filho, L. A. B., B. T. Primo, H. T. Gassen, V. R. C. Fontanella, A. N. Silva Jr. 2011. Evaluation of opticl density of bone defect filled with calcium phosphate cement and bioactive glass in rats. *Acta Cirurgica Brasileira* 26(1).
- Flanagan, M. 2000. The physiology of wound healing. *J Wound Care* 9(6): 299-300.
- Ganong, W. F. 2003. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Ganong*. Edisi 22. Jakarta: EGC.
- Gorustovich, Steimetz, dan Nielsen. 2008. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. *Anat Rec* 291: 441-447.
- Guyton, A. C., dan J. E Hall. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Edisi 11. Jakarta: EGC.
- Haliman, R. W., dan D. S Adijaya. 2005. *Udang Vannamei, Pembudidayaan dan Prospek Pasar Udang Putih yang Tahan Penyakit*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hanifah, N., dan E. Darmawan. 2015. Efek anti inflamasi kitosan dari cangkang udang pantai trisik pada tikus model *rheumatoid arthritis*. *Pharmaçiana* 5(2): 177-184.
- Hupp, Ellis, dan Tucker. 2014. *Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery*. Sixth Edition. Missouri: Elsevier.

- Igarashi, M., K. Sakamoto, dan I. Nagaoka. 2011. Effect of glucosamine, a therapeutic agent for osteoarthritis, on osteoblastic cell differentiation. *International Journal of Molecular Medicine* 28: 373-379.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan (KKP). 2014. *Udang Vaname dan Udang Windu Masih Andalan Ekspor Indonesia*. Web Dirjen Perikanan Budidaya [http://djp.kkp.go.id/index.php/arsip/c/246/Udang-Vaname-dan-Udang-Windu-Masih-Andalan-Ekspor-Indonesia/?category\\_id=13](http://djp.kkp.go.id/index.php/arsip/c/246/Udang-Vaname-dan-Udang-Windu-Masih-Andalan-Ekspor-Indonesia/?category_id=13). [Diakses pada 29 November 2017].
- Kim, I. Y., S. J. Seo, H. S. Moon, M. K. Yoo, I. Y. Park, dan B. C. Kim. 2008. Chitosan and its derivate for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 26: 1-21.
- Kmiec, M., L. Pighinelli, M. F. Tedesco, M. M. Silva, dan V. Reis. 2017. Chitosan-properties and applications in dentistry. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access* 2(4): 00035.
- Koerner, K. L. 2006. *Manual of Minor Oral Surgery for The General Dentist*. Iowa: Blackwell Munksgaard.
- Kumar, Cotran, dan Robbins. 2004. *Robbins: Buku Ajar Patologi*. Edisi 7. Volume 1. Terjemahan oleh Awal Prasetyo dkk. Jakarta: EGC.
- Kyrgidis, A., T. G. Tzellos, K. Toulis, dan K. Antoniadis. 2011. The facial skeleton in patients with osteoporosis: a field for disease signs and treatment complications. *Journal of Osteoporosis* vol. 2011, Article ID 147689, 11 pages.
- Larjava, H. 2012. *Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management*. UK: Wiley-Blackwell.
- Lertsutthiwong, P., N. C. How, S. Chandkrachang, dan W. F. Stevens. 2002. Effect of chemical treatment on the characteristics of shrimp chitosan. *Journal of Metals, Materials and Minerals* 12(1): 11-18.
- Levengood, S. L., dan M. Zhang. 2014. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B Mater Biol Med* 2(21): 3161-3184.
- Manrique, N., C. C. S. Pereira, L. M. G. Garcia, S. Micaroni, A. A. F. D. Carvalho, S. H. V. Perri, R. Okamoto, D. H. Sumida, dan C. Antoniali. 2011. Alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR). A radiographic densitometry study. *J Appl Oral Sci* 20(2): 222-7.



- Martins, M. V., M. A. d. S. d. Silva, E. M. Filho, L. C. d. Moraes, J. X. d. M. Castilho, R. F. d. Rocha. 2005. Evaluation of digital optical density of bone repair in rats medicated with ketoprofen. *Brazilian Dental Journal* 16(3).
- Murtidjo, B. 2003. *Pembenihan Udang Windu Skala Kecil*. Yogyakarta: Kanisius.
- Nadarajah, K. 2005. *Development and Characterization of Antimicrobial Edible Films from Crawfish Chitosan*. Louisiana: Louisiana State University.
- Nilsson, M. 2010. The Role of Physical Activity on Bone Density and Bone Geometry in Men. *Tesis*. Gothenburg: Institute of Medicine at Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Sweden.
- No, H. K, dan S. P. Meyers. 1997. *Preparation of Chitin and Chitosan* dalam R. A. A. Muzzarelli, dan M. G. Peter. Grottamare: Chitin Handbook, European Chitin Soc.
- Notoatmodjo, S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Orsted., Keast, L. Forest, dan F. Megie. 2011. Basic Principles of Wound Healing. *Wound Care Canada* 9(2): 4-12.
- Pratama, S. M. 2016. Efek Ekstrak *Thymoquinone* Jintan Hitam Terhadap Proses Pembentukan Tulang Soket Gigi Pasca Ekstraksi Pada Tikus Yang Diinduksi Diabetes. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Puriwiyanto, A. 2013. *Modul Praktikum Oseanografi Kimia*. Program Studi Ilmu Kelautan Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya.
- Purwanti, A. 2014. Evaluasi proses pengolahan limbah kulit udang untuk meningkatkan mutu kitosan yang dihasilkan. *J Teknologi* 7(1): 83-90.
- Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. 2016. *Penggunaan dan Penanganan Hewan Coba Rodensia dalam Penelitian sesuai dengan Kesejahteraan Hewan*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementrian Pertanian.
- Rubin, B. R., J. M Talent, P. Kongtawelert, R. M. Pertusi, M. D. Forman, dan R.W Gracy. 2001. Oral polymeric N-acetyl-D-glucosamine and osteoarthritis. *JAOA* 101(6).

- Senel, S., dan S. J McClure. 2004. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev* 56(10): 1467-80.
- Seol, Y. J., J. Y. Lee, Y. J. Park, Y. M. Lee, K. Young, I. C. Rhyu, S. J. Lee, S. B. Han, dan C. P. Chung. 2004. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnol Lett* 26: 1037-1041.
- Setyorini, A., I. K. G. Suandi, I. G. L Sidiartha, dan W. B Suryawan. 2009. Pencegahan osteoporosis dengan suplementasi kalsium dan vitamin D pada penggunaan kortikosteroid jangka panjang. *Sari Pediatri* 11(1).
- Shapiro, F. 2008. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasty and surface osteoblast. *Eur Cell Mater* 15: 53- 76.
- Srijanto, B. 2003. Kajian Pengembangan Teknologi Proses Produksi Chitin dan Chitosan Secara Kimiawi. *Prosiding seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia 2003*. Volume I: F01-1 – F01-5.
- Steiner, G. G., W. Francis, R. Burrell, M. P. Kallet, D. M. Steiner, dan R. Macias. 2008. The healing socket and socket regeneration. *Compend Contin Educ Dent*. 29(2): 114-6, 118, 120-4 passim.
- Sugita, P., A. Sjahriza, T. Wukirsari, dan D. Wahyono. 2009. *Kitosan: Sumber Biomaterial Masa Depan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor Press.
- Suryono, B. Setiawan, D. Martianto, dan D. Sukandar. 2007. Pengaruh Pemberian Susu terhadap Kadar Kalsium Darah dan Kepadatan Tulang Remaja Pria. *Media Gizi & Keluarga* 31(1).
- Sykaras, N., dan L. A Opperman. 2003. Review: Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician?. *J Oral Sci* 45(2): 57-7.
- Tahir, A. M. 2009. Gambaran densitas mineral tulang vertebra lumbal akseptor KB suntik DMPA. *Maj Obstetri Ginekologi Indonesia* 33(2).
- Taub, P. J., S. R. Buchman, P. K. Patel, dan M. N. Cohen. 2015. *Ferraro's Fundamentals of Maxillofacial Surgery*. New York: Springer.
- U.S. Department of Health and Human Services (UDHHS). 2004. *Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General*. Rockville: U.S. Department of Health and Human Services, Office of the Surgeon General.

- Unnanuntana, A., B. J. Rebolledo, M. M. Khair, E. F. DiCarlo, dan J. M. Lane. 2011. Diseases affecting bone quality: beyond osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res* 469(8): 2194–2206.
- Van Steenberghe, D., R. Jacobs, M. Desnyder, G. Maffei, M. Quirynen. 2002. The relative impact of local and endogenous patient-related factors on implant failure up to the abutment stage. *Clin Oral Implants Res*. 13: 617-22.
- Velnar, T., T. Bailey dan V. Smrkolj. 2009. The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research* 37: 1528-1542.
- Vieira, A. E., C. E Repeke, S. B. F. Junior, P. M. Colavite, C. C Biguetti, R. C Oliveira, G. F. Assis, R. Taga, A. P. F. Trombone, dan G. P. Garlet. 2015. Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. *Plos One* 10(5): 1-22.
- World Wide Fund for Nature (WWF) - Indonesia. 2014. *Budidaya Udang Vannamei - Tambak Semi Intensif dengan Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL)*. Jakarta: Tim Perikanan WWF Indonesia.
- Yamazaki, H., Mano H, Nakatani S, dan Wada M. 2007. The intake of glucosamine increased bone mass by pQCT in ddy mice. *Glucosamine Res* 3: 1-6.
- Yustiawan, E. Y. 2015. Pengaruh Stresor Renjatan Listrik Terhadap Densitas Tulang Mandibula pada Tikus *Sprague Dawley*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Zhang, H., X. Zhong, Y. Tao, S. Wu, dan Z. Su. 2012. Effect of chitosan and water-soluble chitosan micro and nanoparticles in obese rats fed a high-fat diet. *International Journal of Nanomedicine* 7: 4069-4076.



## LAMPIRAN

Lampiran A. Surat Keterangan *Ethical Clearance*

	<b>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</b>
<b>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</b> <u>No. 037/UN25.8/KEPK/DL/2018</u>	
Title of research protocol	: "Efek Pemberian Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamel ( <i>Litopenaeus vannamei</i> ) Secara Oral Terhadap Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Gigi Pada Tikus Wistar Jantan"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Aulia Rahma Elnisa
Member of research	: -
Responsible Physician	: Aulia Rahma Elnisa
Date of approval	: February 5 <sup>th</sup> , 2018
Place of research	: 1. Food Technology Laboratory Politeknik Negeri Jember 2. Pharmacology Laboratory Biomedical Sect. Faculty of Dentistry Universitas Jember
The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember states that the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.	
Jember, February 10 <sup>th</sup> , 2018	
Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember	Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember
 (drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros)	 (Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M. Si.)

## Lampiran B. Surat Ijin Penelitian Laboratorium Biomedik



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

Nomor : 4381 /UN25.8.TL/2017  
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth  
Kepala Laboratorium Biomedik  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Di  
Jember

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                    | : Aulia Rahma Elnisa  |
| 2  | NIM                     | : 141610101074  |
| 3  | Semester/Tahun          | : 2017/2018   |
| 4  | Fakultas                | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember   |
| 5  | Alamat                  | : Jl. Danau Toba VII/No.223 Jember  |
| 6  | Judul Penelitian        | : Efek Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei (Litopenaeus Vannamei) Terhadap Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Pada Tikus Wistar Jantan                  |
| 7  | Lokasi Penelitian       | : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 8  | Data/alat yang dipinjam | : Neraca, gelas ukur, dental rat chair, dll   |
| 9  | Waktu                   | : November 2017 s/d Selesai   |
| 10 | Tujuan Penelitian       | : Untuk Mengetahui Efek Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei (Litopenaeus Vannamei) Terhadap Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi Pada Tikus Wistar Jantan |
| 11 | Dosen Pembimbing        | : 1. drg. Zainul Cholid, Sp.BM<br>2. drg. Abdul Rochim, M.Kes, M.MR   |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an. Dekan  
Wakil Dekan I,  
**Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes**  
NIP.196109031986022001



## Lampiran C. Alat dan Bahan Penelitian



## Keterangan:

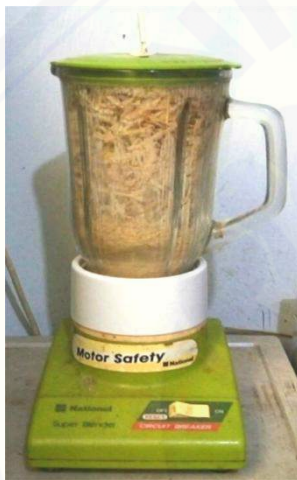
- |                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| A. Timbangan digital              | L. <i>Disposable syringe</i> 5 ml |
| B. <i>Dental rat chair</i>        | M. Pisau malam                    |
| C. Toples kedap udara             | N. Pinset                         |
| D. Timbangan digital              | O. <i>Artery clamp</i>            |
| E. Papan bedah                    | P. Gunting bedah                  |
| F. Sarung tangan                  | Q. Sonde setengah lingkaran       |
| G. Masker                         | R. Ekskavator kecil               |
| H. Kain lap                       | S. Ekskavator besar               |
| I. <i>Cotton pallette</i>         | T. <i>Blade dan scalpel</i>       |
| J. Baki <i>stainless steel</i>    | U. Spidol                         |
| K. <i>Disposable syringe</i> 1 ml |                                   |



Gelas ukur dan tabung reaksi



Oven



Blender



Mortar dan *paste*



Sonde lambung



Kandang tikus beserta serbuk kayu, tempat makan + pakan standart dan tempat minum + air minum





Kulit kepala dan kulit badan udang vannamei



Larutan saline 3%



Aquades



Larutan NaOH dan Larutan HCL



Buffer formalin 10%



Larutan asam asetat 1%



Ketamin HCL



Eter

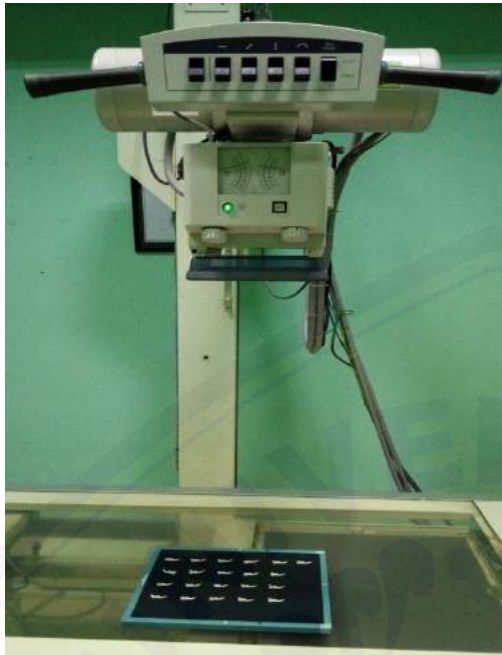
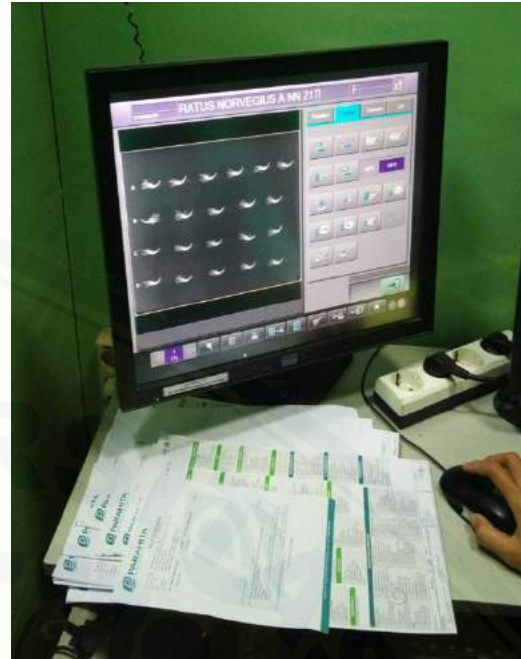
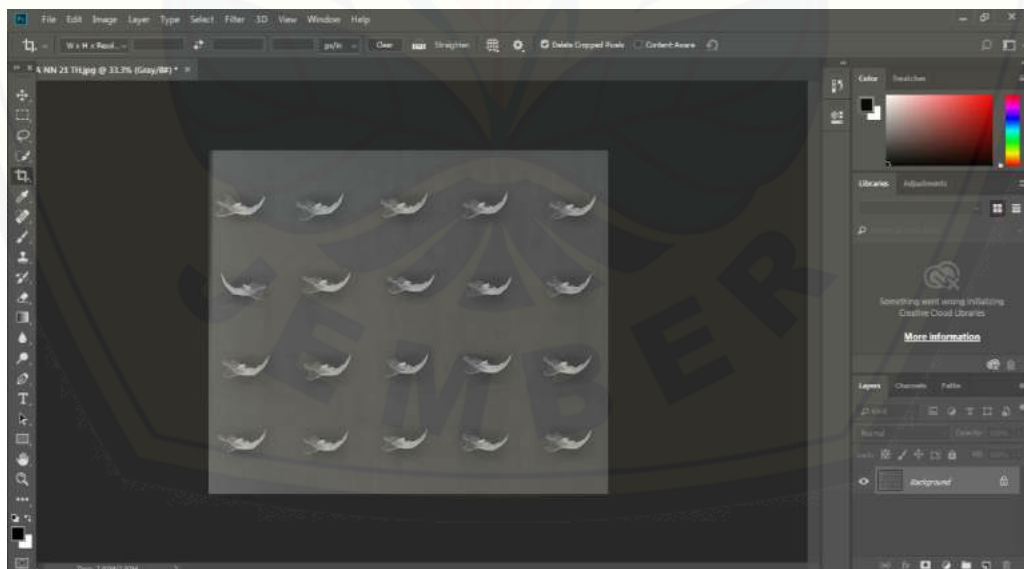


Foto Thorax FCR dengan sampel tulang kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada *imaging plate*



Pengolahan foto rontgen secara *computed radiography*



Hasil foto rontgen sampel tulang tikus yang akan dihitung densitasnya menggunakan *software Adobe Photoshop CC 2018*

**Lampiran D. Penghitungan Besar Sampel**

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah berdasarkan rumus (Daniel, 2005), yaitu:

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

n = jumlah sampel minimum

$\sigma$  = standar deviasi sampel

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

Z = konstanta pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0.05$  maka  $Z = 1,96$

Pada penelitian ini, nilai  $\sigma$  diasumsikan sama dengan nilai d, hal ini karena nilai  $\sigma^2$  sangat jarang diketahui, maka penghitungan besar sampel adalah sebagai berikut :

$$\begin{aligned} n &= \frac{(1,96)^2 \cdot \sigma^2}{\sigma^2} \\ &= (1,96)^2 \\ &= 3,84 \text{ (dibulatkan menjadi 4)} \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan rumus, jumlah sampel minimal adalah 4 pada setiap kelompok.



### Lampiran E. Penghitungan Dosis

#### E.1 Dosis Ekstrak Kitosan Limbah Kulit Udang Vannamei

Menurut Hanifah dan Darmawan (2012), dosis efektif ekstrak kitosan limbah kulit udang vannamei pada hewan coba tikus adalah 100 mg/200 gram BB per hari.

Berat rata-rata setiap tikus berdasarkan kriteria = 180-250 gram

$$\begin{aligned} \text{Dosis ekstrak pada tikus} &= 100 \text{ mg/kg BB} \times \frac{180-250 \text{ gr}}{200 \text{ gr}} \\ &= 90 \text{ mg-125 mg/ 180-250 gr BB} \end{aligned}$$

Konsentrasi kitosan yang digunakan adalah 5%, didapatkan dengan cara mencampurkan 0,5 gram kitosan kedalam pelarut asam asetat 1% sebanyak 10 ml. Volume sediaan kitosan 5% yang diberikan pada tikus berdasarkan konversi dosis tikus, menggunakan perbandingan:

$$\frac{m_1}{V_2} = \frac{m_2}{V_2}$$

Sebagai contoh untuk tikus dengan berat 180 gram, dosis kitosan yang diberikan adalah 90 mg (0,09 gr). Volume pelarut yang dibutuhkan adalah:

$$\begin{aligned} \frac{0,5 \text{ gr}}{10 \text{ ml}} &= \frac{0,09 \text{ gr}}{V_2} \\ V_2 &= 1,80 \text{ ml.} \end{aligned}$$

#### E. 2 Dosis Ketamin

Menurut Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan (2015), dosis ketamin intraperitoneal yang digunakan untuk anestesi tikus adalah 40-100 mg/kg BB. Pada penelitian ini dosis yang digunakan menggunakan dosis terendah yaitu 40 mg/ kg BB.

$$\begin{aligned} \text{Dosis yang digunakan} &= 40 \text{ mg} \times \frac{180-250 \text{ gr}}{1000 \text{ gr}} \\ &= 7,2-10 \text{ mg} \end{aligned}$$

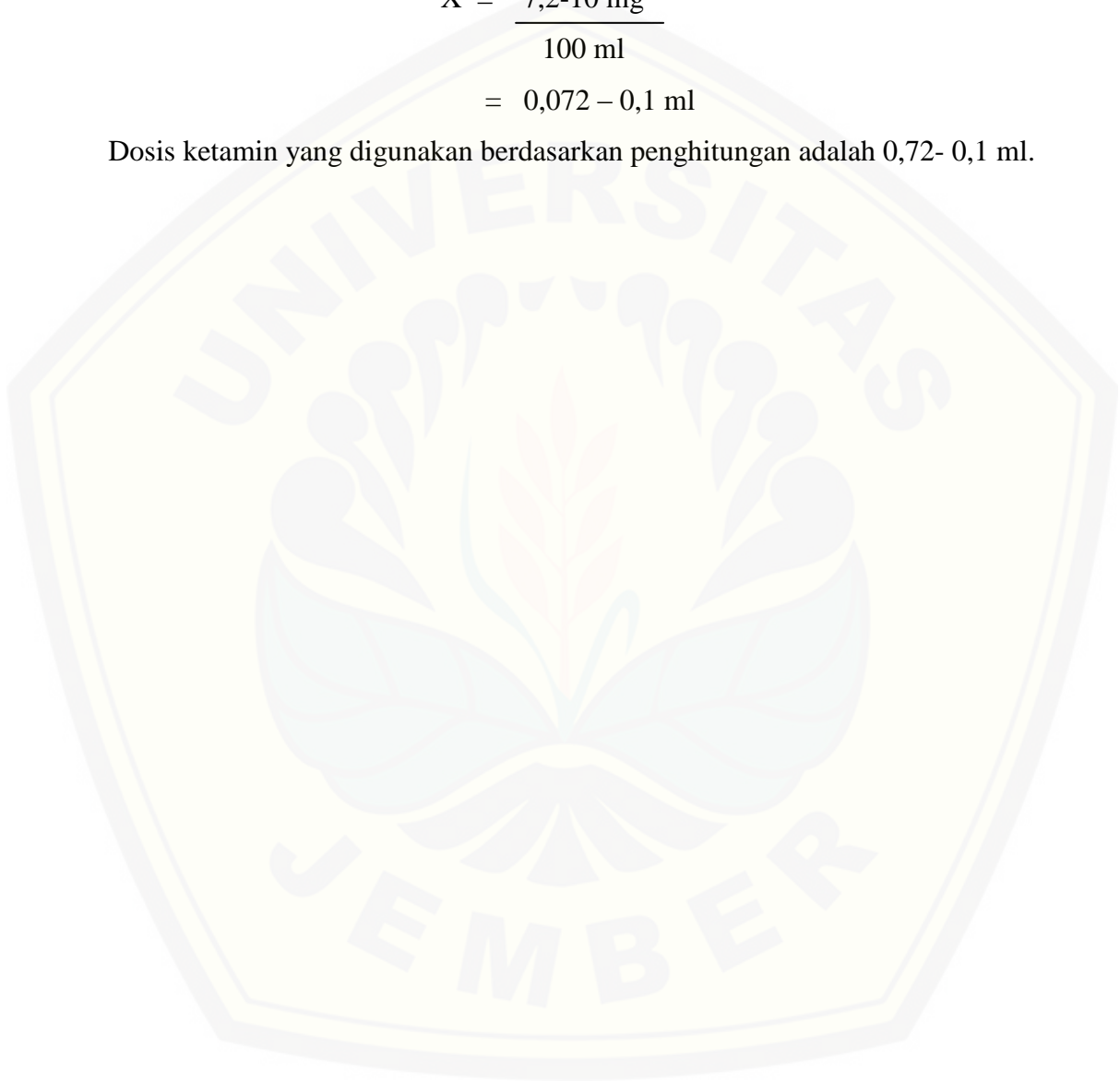
Ketamin yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai konsentrasi 1000 mg/10 ml. Dosis ketamin yang dibutuhkan adalah:

$$\frac{1000 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = \frac{7,2-10 \text{ mg}}{X \text{ ml}}$$

$$X = \frac{7,2-10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

$$= 0,072 - 0,1 \text{ ml}$$

Dosis ketamin yang digunakan berdasarkan penghitungan adalah 0,72- 0,1 ml.



**Lampiran F. Hasil Penghitungan Densitas Tulang Alveolar Pasca Ekstraksi  
pada Tikus Wistar Jantan**

Kelompok Saline 21				
	Apikal	Medial	Koronal	Mean
1	108.88	90.76	57.21	<b>85.62</b>
2	107	92.04	55.89	<b>84.98</b>
3	103.79	87.78	56.23	<b>82.60</b>
4	101.64	87.07	54.18	<b>80.96</b>
5	103.16	80.54	54.18	<b>79.29</b>
Kelompok Kitosan 21				
	Apikal	Medial	Koronal	Mean
1	119.41	90.86	67.01	<b>92.43</b>
2	118.9	81.42	67.35	<b>89.22</b>
3	117.92	83.67	57.54	<b>86.38</b>
4	114.8	87.07	56.97	<b>86.28</b>
5	110.72	90.76	57.2	<b>86.23</b>
Kelompok Saline 28				
	Apikal	Medial	Koronal	Mean
1	117.69	86.72	69.16	<b>91.19</b>
2	115.26	99.01	62.12	<b>92.13</b>
3	111.36	98.01	63.74	<b>91.04</b>
4	109.19	80.26	62.58	<b>84.01</b>
5	111.83	89.07	66.17	<b>89.02</b>
Kelompok Kitosan 28				
	Apikal	Medial	Koronal	Mean
1	131.52	103.57	78.65	<b>104.58</b>
2	127.69	107.08	76.15	<b>103.64</b>
3	132.65	94.75	71.40	<b>99.60</b>
4	116.98	80.37	67.40	<b>88.25</b>
5	129.52	97.74	70.37	<b>99.21</b>

**Lampiran G. Hasil Analisis Data**

G.1 Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

**Tests of Normality**

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Densitas Tulang Alveolar	Kitosan 28	.309	5	.133	.843	5	.174
	Saline 28	.284	5	.200*	.825	5	.127
	Kitosan 21	.337	5	.065	.784	5	.060
	Saline 21	.205	5	.200*	.944	5	.696

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

G.2 Uji Homogenitas *Levene-Test*

**Test of Homogeneity of Variances**

Densitas Tulang Alveolar

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.883	3	16	.471

G.3 Uji *One Way ANOVA*

**ANOVA**

Densitas Tulang Alveolar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	695.962	3	231.987	13.788	.000
Within Groups	269.211	16	16.826		
Total	965.173	19			

G.4 Uji *Least Significant Difference* (LSD)**Multiple Comparisons**

Densitas Tulang Alveolar

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kitosan 28	Saline 28	9.57800*	2.59428	.002	4.0784	15.0776
	Kitosan 21	10.94933*	2.59428	.001	5.4497	16.4490
	Saline 21	16.36600*	2.59428	.000	10.8664	21.8656
Saline 28	Kitosan 28	-9.57800*	2.59428	.002	-15.0776	-4.0784
	Kitosan 21	1.37133	2.59428	.604	-4.1283	6.8710
	Saline 21	6.78800*	2.59428	.019	1.2884	12.2876
Kitosan 21	Kitosan 28	-10.94933*	2.59428	.001	-16.4490	-5.4497
	Saline 28	-1.37133	2.59428	.604	-6.8710	4.1283
	Saline 21	5.41667	2.59428	.053	-.0830	10.9163
Saline 21	Kitosan 28	-16.36600*	2.59428	.000	-21.8656	-10.8664
	Saline 28	-6.78800*	2.59428	.019	-12.2876	-1.2884
	Kitosan 21	-5.41667	2.59428	.053	-10.9163	.0830

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