



**PERANAN PEMBERIAN NATRIUM FLUORIDA (NaF) TERHADAP  
SEL OSTEOKLAS MELALUI EKSPRESI MATRIKS  
METALLOPROTEINASE-13 (MMP-13)  
PERGERAKAN GIGI ORTODONTI**

**SKRIPSI**

Oleh

**Arie Puspa Ningtyas**

**NIM 141610101003**

**FAKULTAS KEDOTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**



**PERANAN PEMBERIAN NATRIUM FLUORIDA (NaF) TERHADAP  
SEL OSTEOKLAS MELALUI EKSPRESI MATRIKS  
METALLOPROTEINASE-13 (MMP-13)  
PERGERAKAN GIGI ORTODONTI**

**SKRIPSI**

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

Oleh  
**Arie Puspa Ningtyas**  
**NIM 141610101003**

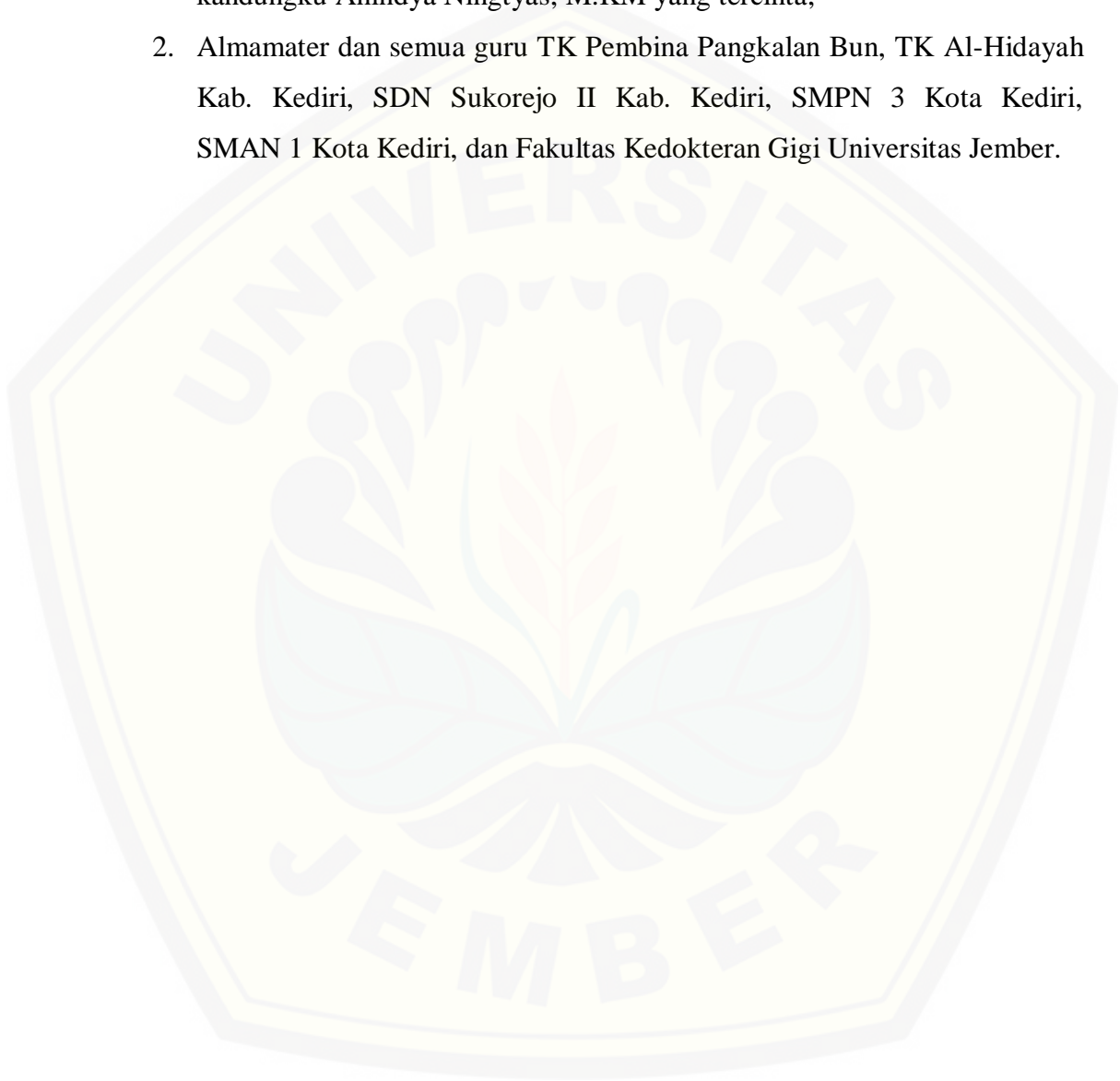
**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2018**

## **PERSEMBAHAN**

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Mulyadi, S.H dan Ibunda Apis Puji Astuti, serta kakak kandungku Anindya Ningtyas, M.KM yang tercinta;
2. Almamater dan semua guru TK Pembina Pangkalan Bun, TK Al-Hidayah Kab. Kediri, SDN Sukorejo II Kab. Kediri, SMPN 3 Kota Kediri, SMAN 1 Kota Kediri, dan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



## **MOTTO**

“Dan Apabila hamba-hambaKu bertanya kepadamu tentang Aku, maka (jawablah) bahwasanya Aku adalah dekat. Aku mengabulkan permohonan orang yang berdoa apabila ia memohon kepada-Ku, maka hendaklah mereka itu memenuhi (segala perintah-Ku) dan hendaklah mereka beriman kepada-Ku, agar mereka selalu dalam kebenaran.”

(Q.S Al-Baqarah ayat 186)\*

“Cukuplah Allah menjadi penolong bagi kami dan Allah adalah sebaik-baik pelindung.”

(Q.S Ali-Imran ayat 173)\*

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.”

(Q.S Asy-Syurah ayat 5-6)\*

---

\* Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Al-Qur'an Terjemahan dan Tafsir Per Kata*. Bandung: Penerbit JABAL.



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Arie Puspa Ningtyas

NIM : 141610101003

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Peranan Pemberian Natrium Fluorida (NaF) Terhadap Sel Osteoklas Melalui Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Ortodonti” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 10 April 2018

Yang menyatakan,

(Arie Puspa Ningtyas)

NIM 141610101003

**SKRIPSI**

**PERANAN PEMBERIAN NATRIUM FLUORIDA (NaF) TERHADAP  
SEL OSTEOKLAS MELALUI EKSPRESI MATRIKS  
METALLOPROTEINASE-13 (MMP-13)  
PERGERAKAN GIGI ORTODONTI**

Oleh

**Arie Puspa Ningtyas**

**NIM 141610101003**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes

Dosen Pembimbing Anggota : drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed

Skripsi berjudul “Peranan Pemberian Natrium Fluorida (NaF) Terhadap Sel Osteoklas Melalui Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Ortodonti” karya Arie Puspa Ningtyas telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : 10 April 2018

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc., P.hD  
NIP 196805291994031003

drg. Chandra Ardidarma, Sp. Orto

Pembimbing Utama,

Pembimbing Anggota,

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

drg.Rudy Joelijanto, M.Biomed  
NIP 197207151998021001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Jember

drg. Rahardian Parnaadji, M.Kes, Sp.Pros

NIP 196901121996011001

## RINGKASAN

Peranan Pemberian Natrium Fluorida (NaF) Terhadap Sel Osteoklas Melalui Matriks Ekspresi Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Ortodonti; Arie Puspa Ningtyas, 141610101003; 2018; 102 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Masyarakat pada era modern ini sangat memperdulikan segala aspek dalam kehidupannya, tidak terkecuali dalam bidang kesehatan salah satunya pada kesehatan gigi dan mulut. Mereka datang ke dokter gigi mempunyai tujuan ingin dilakukan perawatan yang bermacam-macam, salah satunya bertujuan ingin melakukan perawatan merapikan giginya yang berjejal agar tampak normal, atau memperbaiki permasalahan maloklusi. Dalam bidang kedokteran gigi, upaya untuk memperbaiki permasalahan maloklusi dilakukan melalui perawatan ortodonti dalam klinik ortodonsia. Perawatan ortodonti bertujuan menciptakan keseimbangan antara hubungan oklusal gigi-geligi, estetik wajah, serta stabilitas hasil perawatan.

Perawatan ortodonti dapat dilakukan dengan menggunakan piranti cekat maupun lepasan. Tekanan piranti ortodonti akan membuat daerah tarikan yang mengalami proses aposisi dan daerah tekanan yang mengalami proses resorpsi. Pemberian kekuatan ortodonti juga mempengaruhi perubahan aliran darah yang nantinya akan membantu percepatan pelepasan dari kolagenase-3 yaitu Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13). MMP-13 juga merupakan target hilir dari Paratiroid Hormon (PTH), PTH penting pada tahap awal osteoklastogenesis.

Pengaruh durasi perawatan akan berhubungan dengan tekanan yang diberikan praktiksi ortodonti. Tekanan yang diberikan dapat terjadinya resorpsi tulang sembilan kali lebih besar dari aposisi. Natrium Fluorida (NaF) dapat meningkatkan aposisi tulang pada dosis 11,75 ppm secara topikal pada tikus wistar jantan. Fluor pada dosis tepat dapat menghambat proses resorpsi, dan fluor bekerja pada aktivitas protease dalam matriks metalloproteinase dan menghambat degradasi matriks.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada daerah tekanan gigi insisivus tikus Wistar jantan yang diberi gaya mekanis ortodonti. Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Sampel yang digunakan 16 ekor tikus yang dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang diberi gaya mekanis ortodonti berupa pemasangan *closed coil spring* 10 gr/cm<sup>2</sup> dan tidak diberi fluor serta kelompok perlakuan merupakan kelompok yang diberi gaya mekanis ortodonti berupa pemasangan *closed coil spring* 10 gr/cm<sup>2</sup> dan diberi fluor 11,75 ppm pada sulkus gingiva tikus. Masing-masing kelompok dibedakan antara kelompok 7 hari dan 14 hari. Pengamatan dilakukan dengan membandingkan ekspresi MMP-13 setiap kelompok dengan pewarnaan imunohistokimia dan pemeriksaan *Immuno Ratio Score* (IRS).

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata ekspresi MMP-13 pada kelompok kontrol negatif hari ke-7 adalah 88,33, kontrol negatif hari ke-14 adalah 82,89, kelompok perlakuan hari ke-7 adalah 86,10, dan kelompok perlakuan hari ke-14 adalah 80,98. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terjadi penurunan dari kelompok kontrol negatif ke kelompok perlakuan. Kelompok hari ke-7 ekspresi lebih tinggi daripada kelompok hari ke-14. Data hasil *ImmunoRatio* kemudian dianalisis dan menunjukkan data yang berdistribusi normal dan homogen. Uji selanjutnya adalah uji parametrik *One Way Anova* yang menunjukkan bahwa data hasil uji statistik adalah sama atau tidak ada perbedaan secara signifikan.

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa akibat pemberian Natrium Fluorida (NaF) secara topikal dengan dosis 11,75 ppm dalam bentuk gel yang dimasukkan dalam sulkus gingiva tikus Wistar jantan yang diberi gaya mekanis ortodonti 10 gram/cm<sup>2</sup> terjadi penurunan jumlah sel osteoklas pada kelompok perlakuan hari ke-7 dan -14 yang dilihat dari menurunnya ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada daerah tekanan, walaupun penurunan tersebut tidak berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

## PRAKATA

Alhamdulillah, segala puji syukur atas segala pertolongan, kasih sayang, ilmu dan kekuatan yang telah Allah SWT berikan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Peranan Pemberian Natrium Fluorida (Naf) Terhadap Sel Osteoklas Melalui Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pergerakan Gigi Ortodonti”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

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

1. Allah SWT yang telah memberikan nikmat dan karunia yang tidak pernah henti dapat penulis rasakan setiap detik dalam hidup ini.
2. Ayahanda dan Ibunda tercinta Mulyadi, S.H dan Apis Puji Astuti, serta kakak kandung Anindya Ningtyas, M.KM yang tidak pernah putus dalam memberikan dorongan, kasih sayang, doa dan pengorbanan yang tiada batas hingga saat ini, penulis tidak pernah berada pada tahap ini tanpa doa kalian;
3. Almamater sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Pembimbing Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes dan Drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed dalam meluangkan waktu, ilmu, tenaga, semangat, dan dukungannya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
5. Prof. drg. Mei Syafriadi, M.DSc., Ph.D dan drg. Chandra Ardidarma, Sp. Ort selaku penguji atas ilmu, dukungan dan saran selama membimbing penulis untuk kesempurnaan skripsi ini;
6. Seluruh pihak yang telah membantu penulis dalam penelitian baik dari Laboratorium Biomedik FKG Unej, Laboratorium Kimia Farmasi dan Farmasetika Fakultas Farmasi Unej, dan Laboratorium Patologi Anatomi dan Biokimia FK UB;
7. Teman-teman LECI FKG 2014, KKN UMD 76, Kos Bulgis Queen dan NIM Dempet Afthin, Nabilah, Lady, Nanik, Rusella, Fadhilah, Erfika,



Arwinda, Umil, Shinta, Nadia Farhatika, Dini, dan Meirsa yang selalu menyediakan tempat untuk bercerita, saling mendoakan, dan selalu mendukung penulis;

8. Teman-temanku tim Fluor, Nabilah Dzakiyatul F, Dini Roswati S, dan Shinta Permata atas segala kerja keras, waktu, kerja sama, dan semangat selama menyelesaikan skripsi ini;
9. Sahabat dan saudaraku Gladis Githa, Fadila Fatma, Indah Asri, Shendy Canadya, Dwi Lutfi M.F, Asty Amalia, Rosalia Nur Hakim, Anika Restika, Wenny Restika, Hazrina Ishmah, Bima Perdana, Galih Fajar dan Faizal Dewantara yang bersedia membantu dan menyemangati penulis;
10. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

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

Jember, 10 April 2018

Penulis

**DAFTAR ISI**

	Halaman
<b>COVER</b> .....	<b>i</b>
<b>PERSEMBAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>MOTTO</b> .....	<b>iii</b>
<b>PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB 1.PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Maloklusi.....	4
2.2 Pergerakan Gigi .....	5
2.2.1 Macam Pergerakan Gigi Ortodonti.....	6
2.3 Osteogenesis .....	8
2.4 Remodeling Tulang.....	9
2.5 Sel Tulang.....	11
2.5.1 Osteosit.....	11
2.5.2 Osteoklas .....	11
2.5.3 Osteoblas .....	12
2.6 Proses Angiogenesis .....	12
2.7 Biomarker.....	14



2.7.1 Matriks Metalloproteinase (MMP)	14
2.7.2 Peran MMP-13 Dalam Formasi Tulang	15
2.8 Fluoride	16
2.8.1 Aksi Pada Tulang dan Sel Tulang	16
2.9 Hematoksin Eosin (HE)	16
2.9.1 Hematoksin Eosin Pada Tulang dan Sel Tulang	17
2.10 Imunohistokimia	18
2.10.1 Definisi Imunohistokimia	18
2.10.2 Prinsip Imunohistokimia	18
2.10.3 Imunohistokimia Setelah Pemberian Gaya Ortodonti	19
2.10.4 <i>Immuno Ratio Score</i> (IRS)	19
2.11 Kerangka Konsep	20
2.12 Hipotesis	21
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Jenis Penelitian	22
3.2 Rancangan Penelitian	22
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.3.1 Tempat Penelitian	22
3.3.2 Waktu Penelitian	22
3.4 Variabel Penelitian	23
3.4.1 Variabel Bebas	23
3.4.2 Variabel Terikat	23
3.4.3 Variabel Terkendali	23
3.5 Definisi Operasional	23
3.5.1 <i>Fluoride</i>	23
3.5.2 Remodeling Tulang	23
3.5.3 Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13)	24
3.5.4 Kekuatan Mekanik Ortodonti	24
3.6 Sampel Penelitian	24
3.6.1 Sampel Penelitian	24
3.6.2 Besar Sampel Penelitian	24

3.6.3 Syarat Sampel.....	25
3.7 Konversi Dosis .....	26
3.7.1 Dosis Fluor .....	26
3.7.2 Dosis Ketamin .....	26
3.8 Bahan dan Alat Penelitian .....	26
3.8.1 Bahan Penelitian .....	26
3.8.2 Alat Penelitian .....	27
3.9 Bahan untuk Analisis .....	28
3.10 Prosedur Penelitian .....	28
3.10.1 <i>Ethical Clearance</i> .....	28
3.10.2 Persiapan Hewan Coba .....	29
3.10.3 Pembagian Kelompok Perlakuan .....	29
3.10.4 Persiapan Gel Natrium Fluorida (NaF) .....	29
3.10.5 Pemasangan Coil Spring .....	30
3.10.6 Pengambilan Jaringan Penelitian.....	31
3.10.7 Pembuatan Sediaan dan Pemeriksaan Imunohistokimia .....	33
3.10.8 Pengamatan Ekspresi MMP-13 .....	34
3.11 Analisis Data.....	35
3.12 Skema Prosedur Penelitian .....	36
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
4.1 Hasil Penelitian.....	37
4.2 Pembahasan .....	39
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
5.1 Kesimpulan.....	42
5.2 Saran.....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>50</b>

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 Neutroklusi .....	4
Gambar 2.2 Distoklusi .....	5
Gambar 2.3 Mesioklusi .....	5
Gambar 2.4 Pergerakan Gigi <i>Tipping</i> .....	6
Gambar 2.5 Pergerakan Gigi <i>Bodily</i> .....	7
Gambar 2.6 Pergerakan Gigi Rotasi .....	7
Gambar 2.7 Pergerakan Gigi Vertikal .....	8
Gambar 2.8 Pergerakan Gigi <i>Torque</i> .....	8
Gambar 2.9 Proses Remodeling Tulang .....	9
Gambar 2.10 Sel Osteoklas .....	12
Gambar 2.11 Hematoksin Eosin Pada Tulang dan Sel Tulang .....	17
Gambar 2.12 Imunohistokimia Sel Osteoklas .....	19
Gambar 3.1 Pemasangan <i>closed coil spring</i> .....	30
Gambar 3.2 Desain Pemotongan dan Pengamatan Sel Osteoklas .....	37
Gambar 4.1 Gambaran Haematoksin Eosin (HE) .....	37
Gambar 4.2 Gambaran Imunohistokimia IHC) .....	38
Gambar 4.3 Diagram Rata-rata Hasil Ekspresi MMP-13 .....	39

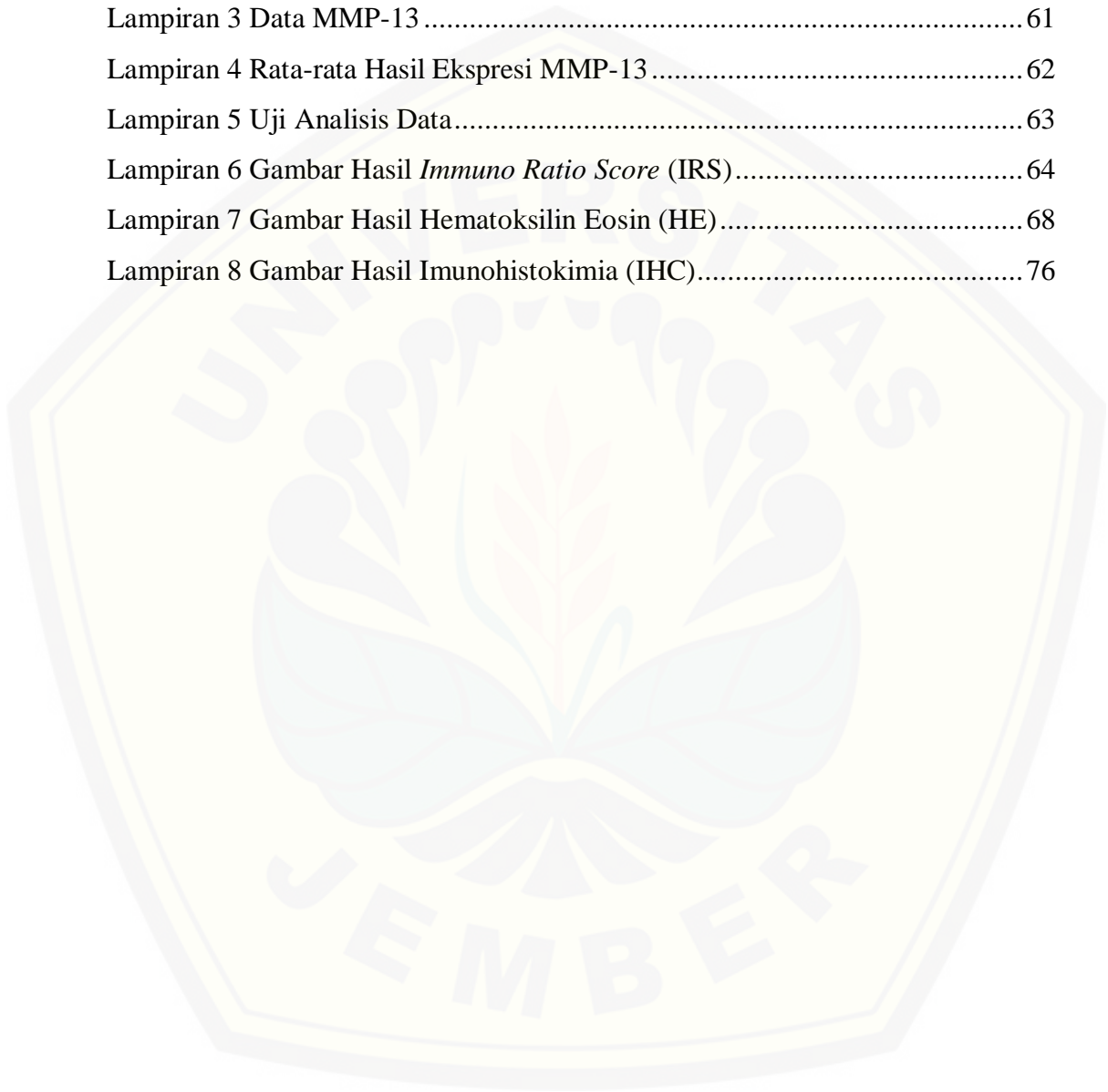
**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1 Kekuatan Optimal dari Ligamen Periodontal .....	5
Tabel 2.2. Proses Penyembuhan Luka Pada Tulang .....	10
Tabel 2.3 Faktor-faktor Lokal Pada Remodeling Tulang .....	14



**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1 Surat Perijinan Penelitian .....	50
Lampiran 2 Klasifikasi Matriks Metalloproteinae (MMPs).....	56
Lampiran 3 Data MMP-13 .....	61
Lampiran 4 Rata-rata Hasil Ekspresi MMP-13 .....	62
Lampiran 5 Uji Analisis Data.....	63
Lampiran 6 Gambar Hasil <i>Immuno Ratio Score</i> (IRS).....	64
Lampiran 7 Gambar Hasil Hematoksilin Eosin (HE).....	68
Lampiran 8 Gambar Hasil Imunohistokimia (IHC).....	76



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Masyarakat pada era modern ini sangat memperdulikan segala aspek dalam kehidupannya, tidak terkecuali dalam bidang kesehatan termasuk kesehatan gigi dan mulut. Masyarakat yang datang ke dokter gigi mempunyai tujuan ingin dilakukan perawatan yang bermacam-macam, salah satunya bertujuan ingin melakukan perawatan merapikan giginya yang berjejal atau biasa dikenal dengan maloklusi (Yohana, 2009). Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Nasional (2013) maloklusi merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut yang cukup besar, prevalensi maloklusi di Indonesia masih sangat tinggi yaitu sekitar 80% dari jumlah penduduk. Dalam bidang kedokteran gigi, upaya untuk memperbaiki permasalahan maloklusi dilakukan melalui perawatan ortodonti dalam klinik ortodonsia (Proffit, 2000).

Perawatan ortodonti bertujuan menciptakan keseimbangan antara hubungan oklusal gigi-geligi, estetik wajah, serta stabilitas hasil perawatan (Proffit, 2000). Perawatan ortodonti dapat dilakukan dengan menggunakan piranti cekat maupun piranti lepasan (Rahardjo, 2009). Tekanan piranti ortodonti dapat mempengaruhi perubahan pada gigi dan jaringan pendukungnya terutama pada remodeling dari tulang alveolar yang memungkinkan terjadinya pergerakan gigi. Pemberian gaya mekanis oleh piranti ortodonti akan menyebabkan terbentuknya daerah tekanan yang mengalami proses resorpsi oleh sel osteoklas dan daerah tarikan yang mengalami proses aposisi oleh sel osteoblas pada komponen pendukung gigi (Adilah *et al.*, 2010).

Pemberian kekuatan ortodonti juga terjadi perubahan aliran darah yang ditandai dengan hipoksia sehingga memproduksi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) yang memicu proses angiogenesis (Sutjiati, 2016). VEGF termasuk *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) akan membantu percepatan pelepasan kolagenase termasuk kolagenase-3 yaitu Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) (Seghezzi *et al.*, 1998). MMP-13 juga merupakan target hilir dari *Paratiroid Hormon* (PTH) (Inada *et al.*, 2004). Hormon paratiroid ini berperan



penting pada tahap awal osteoklastogenesis, dimana saat osteoklastogenesis meningkat akan diikuti juga dengan peningkatan jumlah osteoklas sepanjang permukaan tulang (Everett, 2011).

Kekuatan mekanik ortodonti harus memenuhi standar prosedur terhadap kekuatan yang diberikan. Pengaruh kecepatan durasi perawatan dapat membuat praktisi memberi kekuatan berlebih yang akan berakibat pada jaringan di sekitar gigi. Kekuatan untuk menggerakkan gigi berakar tunggal diperlukan 25-40 gram, kekuatan lebih dari 40 gram akan mengakibatkan kerusakan jaringan periodontal dan menimbulkan rasa sakit berlebihan (Raharjo, 2009). Kekuatan yang berlebihan pada pergerakan gigi ortodonti membuat proses resorpsi lebih besar dari aposisinya. Resorpsi tulang yang lebih besar sembilan kali daripada aposisinya dapat membuat keadaan kembali seperti sebelum perawatan atau lebih buruk (Indrayani, 2002). Penelitian-penelitian yang telah dilakukan menunjukkan alternatif untuk meningkatkan aposisi tulang dapat dengan pemberian relaxin (Liu, 2005), vitamin D (Colins, 1988), dan Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm secara topikal (Sutjiati, 2016).

Natrium Fluorida (NaF) merupakan agen anabolik yang mampu meningkatkan massa tulang. Penggunaan fluor pada dosis yang tepat akan memberikan suatu manfaat, karena fluor dapat menghambat proses resorpsi sel osteoklas dalam dosis 15-30 mg/L (15-30 ppm) pada tikus (Everett, 2011). Penelitian Ujjal *et al.* (2015) tentang NaF dalam penyakit periodontal, didapatkan bahwa NaF dapat menghambat fungsi dari osteoklas yang terisolasi. *Fluoride* juga bekerja pada aktivitas protease dalam matriks ekstraseluler dan menghambat degradasi matriks (Besten *et.al*, 2002).

Penelitian yang telah dilakukan Sutjiati (2016) tentang mekanisme pergerakan gigi ortodonti pada pemberian Natrium Fluorida (NaF) menyatakan bahwa konversi dosis 11,75 ppm pada tikus wistar jantan merupakan dosis efektif yang tidak menimbulkan kematian sel (apoptosis) dan telah didapatkan hasil yaitu adanya peningkatan jumlah sel osteoblas setelah pemberian NaF pada daerah tarikan (Sutjiati, 2016), oleh karena itu perlu dilakukan penelitian pada daerah tekanan karena pada daerah ini sel-sel osteoklas banyak dijumpai.

Penelitian ini menggunakan lama pengamatan 7 hari dan 14 hari. Waktu 7 hari dan 14 hari berkaitan dengan proses-proses regenerasi tulang. Proses inflamasi dimulai sejak awal pemberian tekanan ortodonti, pada kondisi ini akan terjadi proses osteoklastogenesis dari sel-sel makrofag yang diawali pada 72 jam (3 hari) hingga mencapai puncaknya pada hari ke-7 setelah dilakukan pemberian kekuatan gaya ortodonti (Maleeh *et al.*, 2016). Pada penelitian yang telah dilakukan oleh X.Li *et al* (2016) pada hari ke-7 setelah pemasangan piranti ortodonti sel osteoklas terlihat secara signifikan lebih tinggi dari pada hari ke-14.

Berdasarkan uraian di atas, maka perlu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk melihat efek Natrium Fluorida (NaF) terhadap sel osteoklas melalui Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada pergerakan gigi ortodonti.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Dari latar belakang di atas, rumusan masalah yang dapat diteliti yaitu bagaimanakah peranan pemberian Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm terhadap sel osteoklas melalui ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada pergerakan gigi ortodonti ?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah dapat mengetahui peranan pemberian Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm terhadap sel osteoklas melalui ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada pergerakan gigi ortodonti.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini diharapkan sebagai berikut :

1. Memberikan informasi tentang peranan Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm dalam mengurangi jumlah sel osteoklas pada daerah tekanan pada pergerakan gigi ortodonti.
2. Penelitian ini dapat sebagai acuan tambahan tentang manfaat Natrium Fluorida (NaF) berkaitan dengan relaps setelah perawatan ortodonti.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

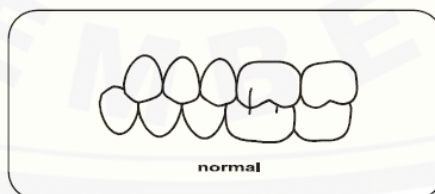
### 2.1 Maloklusi

Maloklusi didefinisikan sebagai keadaan dimana gigi tidak berada di dalam posisi normal lengkung rahang dan hubungan dengan gigi antagonisnya atau biasa dikenal dengan istilah disharmoni dentomaksila (Davies, 2007). Maloklusi merupakan suatu penyimpangan dari oklusi yang normal. Penyimpangan ini akan mengganggu fungsi dari gigi-gigi, seperti terganggunya faktor estetis, fungsi, dan bicara. Maloklusi tidak hanya terjadi karena satu faktor tetapi multifaktor (Sulandjari, 2008). Secara garis besar penyebab maloklusi adalah faktor herediter (genetik) dan juga faktor lokal (Rahardjo, 2012).

Klasifikasi maloklusi berguna untuk kemudahan dalam menentukan penggolongan maloklusi. Klasifikasi yang paling luas digunakan di dunia adalah klasifikasi Angle yang didasarkan atas relasi lengkung geligi dalam jurusan sagital. Kunci klasifikasi Angle adalah relasi molar pertama permanen (Soehardono, 2008). Klasifikasi maloklusi menurut Angle adalah sebagai berikut :

#### 2.1.1 Netroklusi (Klas I Angle)

Hubungan antara gigi-gigi rahang atas terhadap rahang bawah dimana tonjol mesiobukal (*mesiobuccal cusp*) molar satu permanen rahang atas berkontak dengan bukal *groove* mesiobukal (*mesiobuccal groove*) molar satu permanen rahang bawah (Sulandjari, 2008).

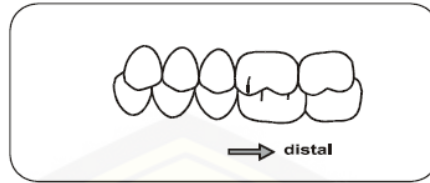


Gambar 2.1 Netroklusi (Sulandjari, 2008).

#### 2.1.2 Distoklusi (Klas II Angle)

Hubungan antara gigi-gigi rahang bawah terhadap gigi-gigi rahang atas dimana *groove* mesiobukal (*mesiobuccal groove*) molar satu permanen rahang

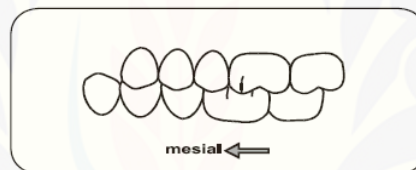
bawah lebih ke distal dari tonjol mesiobukal (*mesiobuccal cusp*) molar satu permanen rahang atas (Sulandjari, 2008).



Gambar 2.2 Distoklusi (Sulandjari, 2008).

### 2.1.3 Mesioklusi (Klas III Angle)

Hubungan antara gigi-gigi rahang bawah terhadap gigi-gigi rahang atas dimana *groove* mesiobukal (*mesiobuccal groove*) molar satu permanen bawah berada lebih mesial dari tonjol mesiobukal (*mesiobuccal cusp*) molar satu permanen rahang atas (Sulandjari, 2008).



Gambar 2.3 Mesioklusi (Sulandjari, 2008).

## 2.2 Pergerakan Gigi

Pergerakan gigi dapat berupa pergerakan secara fisiologis dan patologis. Pergerakan gigi tersebut dapat membuat keadaan gigi dan struktur jaringan pendukungnya mengalami perubahan. Pergerakan gigi secara fisiologis adalah pada masa perkembangan gigi geligi tersebut bergerak ke mesial, distal, dan anterior, dapat berlangsung sepanjang hidup jika terdapat kesempatan gigi geligi tersebut untuk bergerak. Pergerakan gigi secara patologis adalah pergerakan posisi gigi akibat terganggunya keseimbangan faktor pemelihara posisi gigi yang fisiologis oleh karena penyakit periodontal, sebagai contohnya adalah pergerakan gigi yang menyebabkan posisi gigi berpindah dari posisi yang sebenarnya dan susunan gigi menjadi tidak teratur sehingga menjadi maloklusi. Maloklusi agar mendapatkan oklusi normal diperlukan perawatan ortodonti dengan alat ortodonti (Balajhi, 2007; Foster, 1997).

Alat ortodonti terdiri dari alat lepasan dan cekat. Alat lepasan menghasilkan pergerakan gigi yang terbatas yang umumnya menghasilkan pergerakan *tipping* dari gigi, tetapi juga menghasilkan pergerakan intrusi, ekstrusi, dan rotasi dimana tidak seefektif dari alat cekat sedangkan pergerakan *bodily* atau *torque* sulit atau tidak mungkin dihasilkan. Kekuatan yang dipergunakan harus sesuai dengan kekuatan optimal yang sudah ditentukan untuk berbagai jenis pergerakan gigi (William, 2000).

Tabel 2.1 Perkiraan penggambaran kekuatan optimal yang tergantung dari area ligamen periodontal

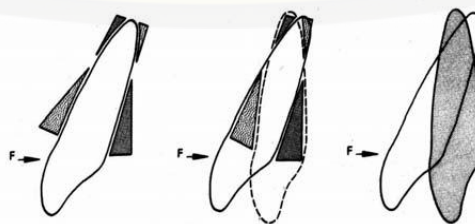
Tipe gerakan	Kekuatan ( gr ) / cm <sup>2</sup>
<b>Tipping</b>	<b>50-75</b>
<b>Bodily</b>	<b>100-150</b>
<b>Torque</b>	<b>75-125</b>
<b>Rotasi</b>	<b>50-75</b>
<b>Ekstrusi</b>	<b>50-75</b>
<b>Intrusi</b>	<b>15-25</b>

Kekuatan yang lebih kecil pada tabel dikenakan pada gigi yang lebih kecil, contohnya pada insisivus (Proffit, 1986).

### 2.2.1 Macam Pergerakan Gigi Secara Ortodonti

#### 1. Pergerakan *Tipping*

Pergerakan *tipping* adalah pergerakan gigi dimana gigi yang miring dapat ditegakkan kembali dan sebaliknya untuk mendapatkan hasil yang baik. Tekanan ortodonti diaplikasikan pada satu titik di mahkota gigi yang menjauhi arah tekanan. Mahkota gigi bergerak searah dengan gaya sedangkan apeks gigi bergerak dalam arah yang berlawanan (William, 2000; Balajhi, 2007).



Gambar 2.4 Pergerakan gigi tipping (Foster, 1997; Mulyani, 1994).

## 2. Pergerakan *Bodily* (Translasi)

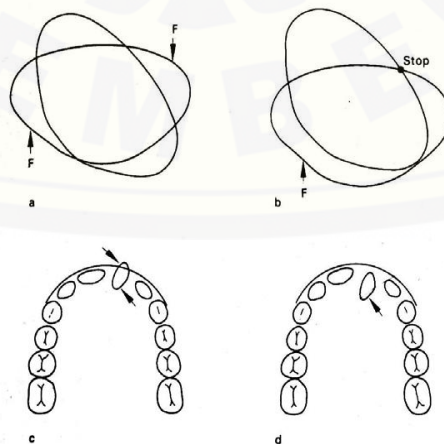
Pergerakan *bodily* adalah pergerakan translasi menyeluruh dari sebuah gigi ke posisi yang baru, semua bagian dari gigi bergerak dalam jumlah yang sama. Tekanan harus diaplikasikan pada daerah mahkota yang lebar dan setiap pergerakan *tilting* harus dibatasi. Pergerakan ini mengakibatkan resorpsi tulang pada daerah tekanan dan pembentukan tulang pada daerah tarikan (William, 2000; Balajhi, 2007).



Gambar 2.5 Pergerakan gigi bodily (Foster, 1997; Mulyani, 1994).

## 3. Pergerakan Rotasi

Pergerakan rotasi merupakan pergerakan gigi berputar disekeliling sumbu panjangnya. Rotasi dalam soketnya membutuhkan aplikasi tekanan ganda. Pergerakan rotasi diperoleh dengan memberi kekuatan pada suatu titik dari mahkota dan stop untuk mencegah pergerakan bagian mahkota yang lain (William, 2000; Balajhi, 2007).



Gambar 2.6 Pergerakan gigi rotasi (Foster, 1997; Mulyani, 1994).

#### 4. Pergerakan Vertikal

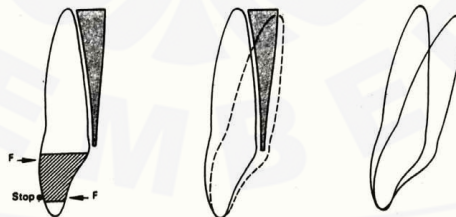
Pergerakan vertikal terdiri dari pergerakan ekstrusi dan intrusi dimana kedua pergerakan ini memperoleh kekuatan dengan arah yang berlawanan. Ekstrusi adalah pergerakan gigi keluar dari alveolus dimana akar mengikuti mahkota. Ekstrusi gigi dari soketnya dapat terjadi tanpa resorpsi dan deposisi tulang yang dibutuhkan untuk pembentukan kembali dari mekanisme pendukung gigi. Intrusi adalah pergerakan gigi secara vertikal kedalam alveolus. Intrusi gigi menyebabkan resorpsi tulang, terutama di sekitar apeks gigi (William, 2000; Balajhi, 2007).



Gambar 2.7 Pergerakan gigi vertikal (a) Ekstrusi dan (b) Intrusi (Foster, 1997; Mulyani, 1994).

#### 5. Pergerakan *Torque*

Pergerakan *torque* adalah pergerakan akar gigi dengan hanya sedikit pergerakan mahkota. Pergerakan ini mengakibatkan pada daerah tekanan terjadi resorpsi jaringan dan pada daerah tarikan terjadi aposisi sehingga menyebabkan gigi miring disekitar apeksnya (William, 2000; Balajhi, 2007).



Gambar 2.8 Pergerakan gigi *torque* (Foster, 1997; Mulyani, 1994).

### 2.3 Osteogenesis

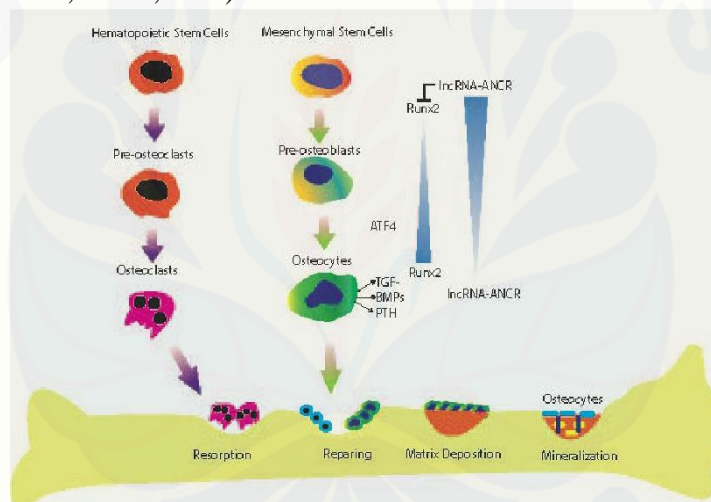
Osteogenesis adalah proses yang kompleks yang melibatkan interaksi epitel mesenkimal, kondensasi, dan diferensiasi akhir. Tulang pipih dikembangkan oleh osifikasi intramembran, sedangkan tulang panjang yang dikembangkan oleh



osifikasi endokondral (Mackie *et al.*, 2008). Osifikasi intramembran hasil dari diferensiasi oleh prekursor mesenkimal menjadi osteoblas, sedangkan osifikasi endokondral dimulai selama embriogenesis ketika sel-sel mesenkimal memadat dan berdiferensiasi menjadi kondrosit. Selama diferensiasi kondrosit, tulang rawan matriks ekstraselular sebagian terdegradasi dan dikolonisasi oleh osteoblas, osteoklas, pembuluh darah, dan oksida nitrat (NO) yang telah terlibat dalam proses ini (Karsenty, 2001).

## 2.4 Remodeling Tulang

Remodeling tulang atau prosesnya, dimediasi oleh osteoblas dan jumlah osteoklas dan aktivitasnya untuk mencapai keseimbangan dinamis (Florencio-Silva *et al.*, 2015; Raisz, 1998).



Gambar 2.9 Proses remodeling tulang oleh resorpsi osteoklas dan pembentukan oleh osteoblas. Osteoblas berasal dari mesenkim stem sel diregulasi oleh transkripsi faktor Runx2 dan non-coding RNAs seperti long non-coding RNAs (contohnya lncRNA-ANCR) (Gao and Xijun, 2016).

Proses penyembuhan, ada dua peran utama yang bekerja yaitu osteoklas meresorpsi tulang dan osteoblas membuat tulang baru. Osteoklas pada awalnya merekrut sitokin-sitokin yang saat remodeling terletak pada permukaan tulang, kemudian osteoklas membentuk tempat yang tidak beraturan yang memungkinkan melakukan perlekatan kuat terhadap permukaan tulang (Capulli *et al.*, 2014). Lingkungan asam yang dihasilkan oleh osteoklas menghilangkan komponen mineralisasi pada matriks tulang di area kerusakan tulang. Matriks organik menjadi terbuka dan secara bertahap terdegradasi (Buckwalter *et al.*, 1996).

Tahap selanjutnya pada remodeling tulang adalah tahap perputaran (*reversal phase*), dimulai dari sel mononuklear yang mempersiapkan permukaan tulang untuk osteoblas baru dan menyediakan sinyal untuk merekrut mereka. Progenitor osteoblas yang mengekspresi Runx2 dan kolagen tipe-1 telah didirikan selama diferensiasi osteoblas, disana terjadi tahap proliferasi (*proliferation phase*). Selama tahap ini, preosteoblas diselubungi dengan aktivitas *alkaline phosphatase*, kemudian berubah menjadi osteoblas matur dimana dikarakterisasi oleh peningkatan ekspresi Osx dan sekresi protein matriks tulang seperti osteokalsin, sialoprotein tulang I/II dan kolagen tipe-1. Osteoblas matur dan kemudian akan termineralisasi. Permukaan tulang yang telah pulih, osteoblas matur akan menjalani apoptosis atau akhirnya terdiferensiasi menjadi permukaan lapisan sel tulang lain atau osteosit, dimana tertanam dalam kalsifikasi matriks dan merespon tekanan mekanis (Buckwalter *et al.*, 1996).

#### 2.4.1 Masa Remodeling Tulang

Masa yang paling kritis dalam penyembuhan tulang adalah minggu pertama sampai minggu kedua. Pada saat ini peradangan dan revaskularisasi terjadi. Proses ini kan mengembalikan jaringan yang rusak menjadi jaringan tulang yang sesuai (Cheville, 2006).

Tabel 2.2 Proses Penyembuhan Luka Pada Tulang (Cheville, 2006).

Waktu	Proses Penyembuhan
1-5 hari	Edema dan pengendapan fibrin pada jaringan sekitar luka, Invasi jaringan granulasi, dan Proliferasi kondrosit serta osteoblas dari pinggir periosteal dan endosteal
3-7 hari	Pembentukan <i>provisional</i> kalus sebagai tulang yang merupakan penghubung oleh jaringan dan pulau-pulau granulasi dari tulang rawan
1-4 minggu	<i>Bony</i> kalus terbentuk oleh proses kalsifikasi, penghubung (jembatan) dari <i>provisional</i> kalus dari hubungan trabekula osteoid yang diproduksi oleh osteoblas

>4 minggu	Remodeling tulang: Proses osteoklastogenesis terus berlangsung dan juga pembentukan oleh osteoblas; Penghilangan eksternal kalus; dan Pelekukan internal kalus untuk membentuk sumsum tulang.
-----------	---

## 2.5 Sel Tulang

### 2.5.1 Osteosit

Osteosit adalah sel tulang dewasa yang terperangkap dalam matriks tulang dan memobilisasi kalsium dari matriks untuk transportasi dan pertukaran dengan cairan tubuh dalam menanggapi kebutuhan sistemik. Osteosit juga menanggapi pengaruh sistemik yang dibuktikan dengan peningkatan kadar *cyclic* AMP dan bertindak sebagai transduser tomodulate aktivitas remodeling tulang lokal. Osteosit dibebaskan oleh osteoklas selama resorpsi, dengan nasib akhirnya adalah kematian sel apoptosis. Sel tulang yang melapisi dapat mengatur komposisi ionik cairan tulang, melindungi permukaan tulang dari osteoklas, dan mengatur pembentukan tulang baru (Bruzzaniti and Baron, 2006; Teitelbaum, 2007).

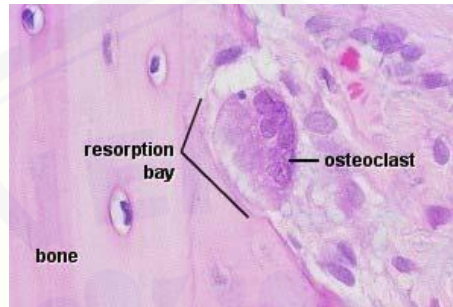
### 2.5.2 Osteoklas

Osteoklas sangat khusus pada sel resorptif migrasi tulang, berasal dari sel monosit/makrofag pada *hematopoietic* stem sel *lineage*. Osteoklas merupakan sel multinukleus besar yang berada di sepanjang permukaan tulang tempat terjadinya resorpsi. Osteoklas sering berada di dalam lekukan dangkal pada matriks tulang yang disebut lakuna *Howship*. Osteoklas bertanggung jawab untuk degradasi pada mineralisasi tulang dan oleh karena itu, penting untuk pertumbuhan tulang yang normal dan perkembangan, pemeliharaan integritas tulang sepanjang hidup, metabolisme kalsium melalui remodelling, dan homeostasis serta perbaikan (Yasuda *et al.*, 1998).

Diferensiasi osteoklas dibawah pengaruh dari beberapa faktor dan tergantung dari molekul sinyal ekstraseluler yang banyak, termasuk *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) yang disekresi oleh osteoprogenitor sel mesenkim, interferon gamma (INF- $\gamma$ ), interleukin (IL), *Tumor Necrosis Factor* (TNF), dan kontak dengan partikel tulang termineralisasi yang mengandung osteokalsin. Faktor-faktor tersebut bersama-sama mempromosikan aktivitas faktor



transkripsi dan ekspresi gen di osteoklas. Prekursor haematopoietik juga dapat mengalami diferensiasi dalam monosit dan makrofag yang berasal dari *colony-forming* sel, sirkulasi perifer monosit darah dan makrofag jaringan, dan akhirnya berfusi menjadi osteoklas multiseluler dewasa (Florencio-Silva *et al.*, 2015; Yasuda *et al.*, 1998).



Gambar 2.10 Sel Osteoklas, *Resorption bay*, dan Tulang (Caceci, 2011).

### 2.5.3 Osteoblas

Osteoblas berasal dari *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs), dimana dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposit, kondrosit, atau miosit, tergantung dari aktivitas atau hambatan jalur sinyal spesifik. Beberapa molekul sinyal regulasi sel paling penting akan berdiferensiasi termasuk *Bone Morphogenic Proteins* (BMPs), *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$ , anggota dari jalur *Wingless* (Wnt), *hedgehog*, paratiroid hormon, *insulin-like growth factor-1*, *fibroblast growth factor*, dan *Notch*. Osteoblas bertanggung jawab atas regulasi osteoklas dan pengendapan matriks tulang. Osteoblas saat berdiferensiasi mempunyai kemampuan untuk mensekresikan matriks tulang. Beberapa osteoblas menjadi terjebak dalam matriks tulang mereka sendiri, sehingga menyebabkan osteosit naik, secara bertahap berhenti mensekresi osteoid. Osteoblas kaya akan basa fosfatase, *organic phosphatase-splitting enzyme*, dan memiliki reseptor untuk *Paratiroid Hormon* (PTH) dan estrogen (Kini and Nandeesh, 2012).

## 2.6 Proses Angiogenesis

*Fibroblastic Growth Factor* (FGF) merupakan *growth factor* yang menstimulasi resorpsi tulang (Kini and Nandeesh, 2012). FGF-2 diekspresi di sel-

sel mesodermal dan *neuroectodermal* asal, dan di berbagai jenis sel tumor. Secara *in vitro*, FGF-2 adalah mitogen yang kuat untuk tipe sel yang berbeda, termasuk sel-sel vaskular endotelial dan fibroblas. Bersama sel endotelial yang dikultur, FGF-2 menginduksi fenotipe angiogenik yang terdiri dari peningkatan proliferasi, migrasi, produksi proteinase, dan ekspresi integrin spesifik. Secara *in vivo*, FGF-2 adalah induser kuat angiogenesis dan memiliki efek pleiotropik perkembangan dan diferensiasi berbagai organ (Moscatelli *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1996).

Aktivitas biologis dari FGF-2 dimediasi melalui sistem reseptor ganda yang terdiri dari empat afinitas tinggi, reseptor tirosin kinase dan afinitas rendah, heparin sulfat proteoglikan yang terletak di permukaan sel. FGF-2 ditemukan secara ekstrasel dan memodulasi beberapa fungsi sel dalam cara autokrin. Afinitas tinggi untuk heparin dan heparan, sulfat glikosaminoglikan, jumlah yang signifikan dari FGF-2 berhubungan dengan matriks ekstraselular dari kultur sel *in vitro*. Secara *In vivo*, FGF-2 telah terdeteksi dalam lamina basal kapiler darah, terutama pada percabangan pembuluh-pembuluh, dan dalam endothelium kapiler dari beberapa tumor. Kesimpulan yang dapat diperoleh bahwa sel endotel yang diturunkan FGF-2 dapat memediasi angiogenesis dengan mode aksi autokrin (Seghezzi *et al.*, 1998).

*Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) merupakan mitogen kuat untuk mikro dan makrovaskular sel endotelial (Seghezzi *et al.*, 1998). VEGF dapat membuat vasodilatasi dan meningkatkan permeabilitas vaskular. Tekanan oksigen memainkan peran utama dalam regulasi ekspresi VEGF dalam berbagai jenis sel, termasuk sel-sel endotel. VEGF sebagai mediator utama dari efek angiogenik hipoksia. Sitokin dan *growth factors*, serta promotor tumor meningkatkan ekspresi VEGF dalam berbagai jenis sel. VEGF sebagai mediator parakrin untuk tindakan tidak langsung dari faktor angiogenik, seperti mengubah *growth factor-β*. VEGF selain meningkatkan vaskulogenesis dan angiogenesis, VEGF juga meningkatkan permeabilitas pembuluh darah dan menginduksi fenestrasi dalam endothelium kapiler kecil dan venula. FGF-2 memodulasi angiogenesis dengan mekanisme autokrin dan FGF-2 serta VEGF mempunyai efek sinergis angiogenesis (Kini and Nandeesh, 2012).

Tabel 2.3 Faktor-Faktor Lokal Pada Remodeling Tulang

	Stimulasi pembentukan tulang	Stimulasi resorpsi tulang	Penghambat resorpsi tulang
<b>Growth factors</b>	BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7, IGF-I, IGF-II TGF- $\beta$ , FGF, dan PDGF	TNF, EGF, PDGF, FGF, M-CSF, and GM-CSF	
<b>Sitokin</b>	IL-4, IL-13, IFN, dan OPG	IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, PGE 2, PGE1, PGG2, PGI2, dan PGH2	IFN- $\gamma$ , IL-4

Tabel di atas menggambarkan bahwa *growth factor* dan sitokin terbagi menjadi stimulasi pembentukan tulang, stimulasi resorpsi tulang, dan penghambat resorpsi tulang (Kini and Nandeesh, 2012).

## 2.7 Biomarker

Biomarker istilah digunakan dalam arti luas meliputi hampir semua pengukuran yang mencerminkan interaksi antara sistem biologis dan agen lingkungan, yang mungkin kimia, fisik atau biologis (Araoud, 2011).

### 2.7.1 Matriks Metalloproteinase

Matriks ekstraseluler adalah seperti melalui proses degenerasi dari waktu ke waktu untuk membawa proses yang sangat penting seperti perbaikan jaringan dan remodeling, perkembangan komponen tertentu, morfogenesis, dan beragam aktivitas *signaling*. Elemen-elemen yang bertanggung jawab untuk degradasi matriks ekstraseluler adalah Matriks Metalloproteinase (MMP). Protease tersebut terlibat dalam penguraian komponen matriks ekstraseluler untuk menghasilkan berbagai lingkungan seluler untuk menjalankan mekanisme terkoordinasi yang tepat (Khalid and Muhammad, 2016). Matriks Metalloproteinase (MMP) pada manusia terdiri dari 25 macam, dimana mampu untuk mendegradasi dan memproses hampir seluruh komponen dari matriks ekstraseluler seperti protein dan proteoglikan termasuk basement membrannya. Matriks Metalloproteinase

(MMP) dapat juga memecah variasi yang besar dari non-matriks substrat seperti sitokin, kemokin, growth factors, dan reseptornya (Wiranowska *et al.*, 2015).

Aktivitas enzimatis Matriks Metalloproteinase (MMP) dihambat oleh beberapa protein yang dikenal sebagai jaringan penghambat matriks metalloproteinase (TIMPs). Keseimbangan telah dikontrol antara MMP/TIMPs untuk membawa fungsi regulasi yang dikarakteristik MMP dan gangguan dalam keseimbangan ini dapat akhirnya berakibat dalam variasi kondisi abnormal meliputi progresi tumor, invasi, angiogenesis, metastasis dan lainnya. Klasifikasi matriks metalloproteinase (MMP): (Lampiran 1) (Khalid and Muhammad, 2016).

Aktivitas proteolitik pada matriks metalloproteinase (MMP) dapat ditekan oleh  $\alpha$ -macroglobulin. Aktivitas katalitik pada matriks metalloproteinase (MMP) dapat dihambat oleh operasi reseptor mediasi endositik pada  $\alpha$ -macroglobulin. Molekul lainnya yang dapat menghambat matriks metalloproteinase (MMP) adalah jaringan penghambat matriks metalloproteinase-TIMPs. TIMPs mengikat substrat aktif matriks metalloproteinase (MMP) dalam rasio 1:1 kompleks non kovalen. TIMPs selain menghambat yang melawan matriks metalloproteinase, juga berpartisipasi dalam aktivitas lain, berperan sebagai kesatuan multifungsional (Khalid and Muhammad, 2016).

#### 2.7.2 Peran Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Dalam Formasi Tulang

Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) dibuktikan menambah remodeling matriks kolagen, morfologi sel, dan kelangsungan hidup dermal fibroblas *in vitro* (Toriseva *et al.*, 2012). MMP-13 juga merupakan enzim utama yang berperan pada degradasi kartilago. Dibandingkan dengan MMP yang lain, MMP-13 hanya terbatas pada jaringan ikat, dan tidak hanya berfungsi untuk degradasi kolagen tipe-2, namun juga mendegradasi proteoglikan, kolagen tipe-4 dan -9, osteonektin dan *perlecan* pada kartilago. Penelitian yang telah dilakukan menemukan bahwa pasien dengan destruksi kartilago sendi mempunyai ekspresi MMP-13 yang tinggi (Wang *et al.*, 2013).



## 2.8 Fluoride

*Fluoride* banyak berada pada lingkungan. Penelitian *fluoride* telah dilakukan dapat menginduksikan osteoklasogenesis pada tikus. *Fluoride* memediasi aksinya melalui jalur sinyal MAPK dan dapat menyebabkan perubahan pada ekspresi gen, tekanan pada sel, dan kematian sel. Biokimia dan kimia protein digunakan *fluoride* sebagai penghambat enzim dalam konsentrasi milimolar (mM) (Everett, 2011).

### 2.8.1 Aksi Pada Tulang dan Sel Tulang

*Fluoride* dapat secara langsung berinteraksi dengan mineral tulang *matrix physicochemically*. Fluoridasi *in vitro* pada tulang dengan mM [F] dapat menyebabkan konversi karbonat hidroksiapatit menjadi karbonat fluoroapatit, untuk merubah dalam kristalinasi, dan untuk mereduksi macam-macam kekuatan mekanik. Fluoroapatit lebih stabil dan resisten pada disolusi asam daripada hidroksiapatit. *Fluoride* dapat menunda mineralisasi dan mampu mengubah struktur kristal tulang. Dalam aksi fisikokimia, *fluoride* 10<sup>-5</sup> M dan 10<sup>-7</sup> M dapat mempengaruhi Matriks Metalloproteinase (MMP), mempengaruhi komposisi pada remodeling matriks dan *subsequent* mineralisasi pada tikus *in vitro* dalam proses mineralisasi kultur sel tulang. Fluoride dapat berperan pada osteoblas dan osteoklas *in vivo* dan *in vitro* (Everett, 2011).

*Fluoride* menginduksi *intact Parathyroid Hormone* (iPTH), reseptor yang dapat larut mengaktifasi faktor nuklear *kappa B ligand* (RANKL), dan *osteoklast-specific tartrate-resistant asam fosfat*. Paratiroid Hormon (PTH) penting pada tahap awal osteoklastogenesis. Meningkatnya osteoklastogenesis telah dibuktikan dengan peningkatan jumlah osteoklas sepanjang permukaan tulang. Peningkatan total *Alkaline Phosphatase* (ALP) pada serum, dengan pengurangan *concomitant* pada nilai *proosteoklasogenesis* iPTH dan RANKL. Akhirnya, ada peningkatan tulang trabekular dan pengurangan pada kualitas tulang (Everett, 2011).

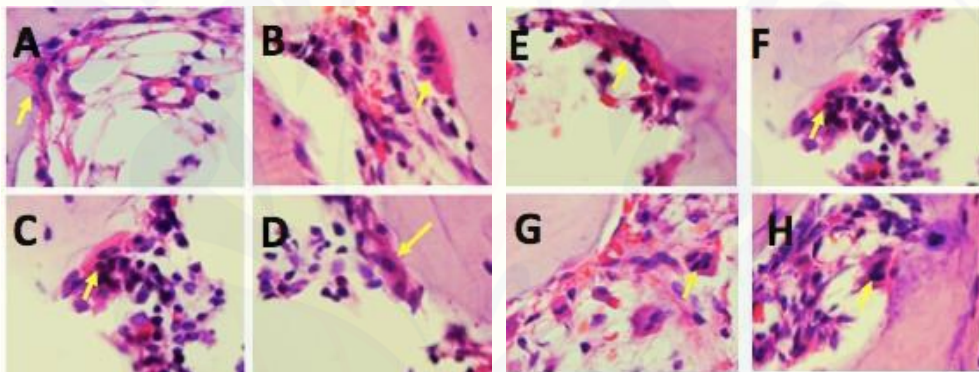
## 2.9 Hematoksilin Eosin (HE)

Hematoksilin dan Eosin merupakan pewarnaan yang banyak digunakan, diperlukan dalam diagnosa medis dan penelitian. Hematoksilin bekerja sebagai

pewarna basa yaitu zat ini mewarnai unsur basofilik jaringan. Hematoksilin memulas inti dan struktur asam lainnya dari sel (seperti bagian sitoplasma yang kaya-RNA dan matriks tulang rawan) menjadi biru. Eosin bersifat asam, eosin memulas komponen asidofilik jaringan seperti mitokondria, granula sekretoris dan kolagen. Eosin mewarnai sitoplasma dan kolagen menjadi warna merah yang muda (Junquera, 2007).

### 2.9.1 Hematoksilin Eosin Pada Tulang dan Sel Tulang

Penelitian Wijaya *et al.*, 2015 tentang pengaruh pemberian gel teripang terhadap jumlah osteoklas di daerah tekanan pada remodeling tulang pergerakan gigi ortodonti. Didapatkan hasil jumlah osteoklas yang diberi gel teripang emas lebih sedikit daripada yang tidak diberi gel teripang emas.



Gambar 2.11 Gambaran HPA dengan pembesaran 1000x jumlah osteoklas hari ke-6 pada gambar ABCD dan hari ke-14 pada EFGH di daerah tekanan pergerakan gigi ortodontik. Keterangan: AE merupakan kelompok kontrol negatif tidak diberi separator, BF merupakan kelompok kontrol positif diberi aplikasi separator, CG merupakan kelompok perlakuan pemberian aplikasi separator dengan gel teripang emas 3%, dan DH merupakan kelompok perlakuan pemberian aplikasi separator dengan gel teripang emas 3,5% (Wijaya *et al.*, 2015).

## 2.10 Imunohistokimia

### 2.10.1 Definisi Imunohistokimia

Imunohistokimia merupakan metode mendeteksi keberadaan molekul atau macam komponen yang ada dalam sel atau jaringan dengan menggunakan prinsip

reaksi antara antigen dengan antibodi (Unitly dan Dece, 2010). Imunohistokimia bertujuan untuk mengidentifikasi sel-sel spesifik berdasarkan komponen antigenik atau produk selulernya dengan reaksi kompleks antigen dan antibodi. Imunohistokimia digunakan sebagai dasar penegakan diagnosis dan identifikasi tipe sel berdasarkan detail sitomorfologi (Baratawidjaya, 2000; Leong, 1993). Manfaat imunohistokimia sebagai petanda molekul spesifik yang merupakan ciri khas proses sel tertentu dapat memberi petunjuk tentang etiologi, diagnosis, pengobatan, kambuhnya tumor, dan prognosis (Hastuti dan Humairah, 2011).

Teknik Imunohistokimia terdiri dari bermacam-macam antara lain teknik imunofluoresensi, imunoenzim, avidin-biotin, *immunogold silver staining*, dan teknik enzim-antienzim. Teknik imunoenzim sendiri meliputi *direct* dan *indirect*, dimana teknik *direct* digunakan enzim-antibodi untuk mengikat enzim pada antigen dalam suatu potongan jaringan. Bagian tersebut kemudian diinkubasi dengan substrat hidrogen peroksida dan kromogen *Diaminobenzidine* (DAB), untuk menghasilkan hasil reaksi dengan warna coklat yang dapat dilihat dengan mikroskop cahaya. Teknik *indirect* membutuhkan inkubasi awal potongan jaringan dengan suatu antibodi primer spesifik untuk mencari antigen. Potongan dicuci dan diinkubasi dengan suatu ikatan enzim-antibodi sekunder yang spesifik untuk imunoglobulin dari spesies sumber antibodi primer (Rahayu dan Elza, 2004; Leong, 1993). Penelitian pada ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada daerah tekanan tikus wistar jantan pada pergerakan gigi ortodonti setelah pemberian Natrium Fluorida (NaF) ini menggunakan teknik *direct* imunoenzim.

### 2.10.2 Prinsip Imunohistokimia

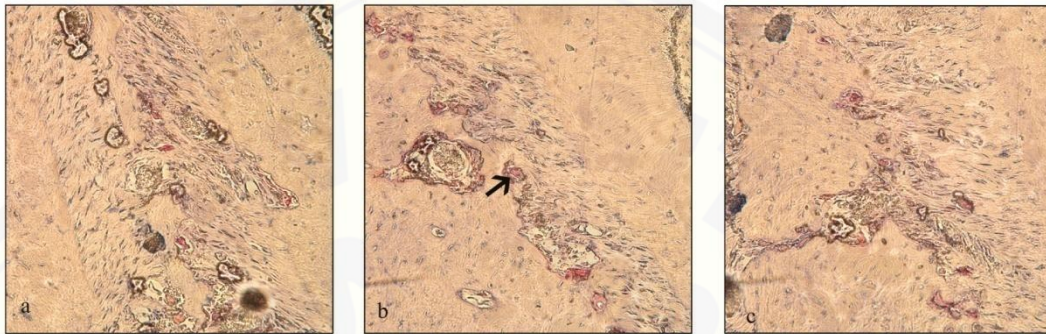
Pewarnaan imunohistokimia memiliki tiga tahapan, antara lain preparasi gelas obyek yang digunakan untuk penempelan preparat atau sediaan histologis, pelapisan (*coating*) gelas obyek dengan pembuatan *neufren* (agen penempel) untuk membantu proses *afixing* preparat ke gelas obyek, dan prosedur pewarnaan imunohistokimia itu sendiri. Pewarnaan imunohistokimia reaksi positif



ditunjukkan dengan munculnya warna coklat pada bagian sel yang mempunyai spesifisitas dengan antibodi primer yang digunakan (Unitly dan Dece, 2010).

### 2.10.3 Imunohistokimia Sel Osteoklas Setelah Pemberian Gaya Ortodonti

Berikut gambaran dengan pewarnaan imunohistokimia dalam penelitian X.Li *et al.*, 2016 tentang efek tekanan ortodonti pada aktivitas osteoklas.



Gambar 2.12 Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (*TRAP*) *positive staining* pada osteoklas pada sisi tekanan selama dan setelah pemberian gaya mekanis ortodonti pada tikus dewasa: a) osteoklas terlihat berjumlah sedikit pada sisi kontrol; (b) banyak osteoklas multinukleat (tanda panah) pada sisi tekanan setelah pemberian gaya mekanis 7 hari; dan C) sejumlah kecil osteoklas ditemukan di sisi tekanan pada hari 14 (X.Li *et al.*, 2016).

### 2.10.4 *Immuno Ratio Score* (IRS)

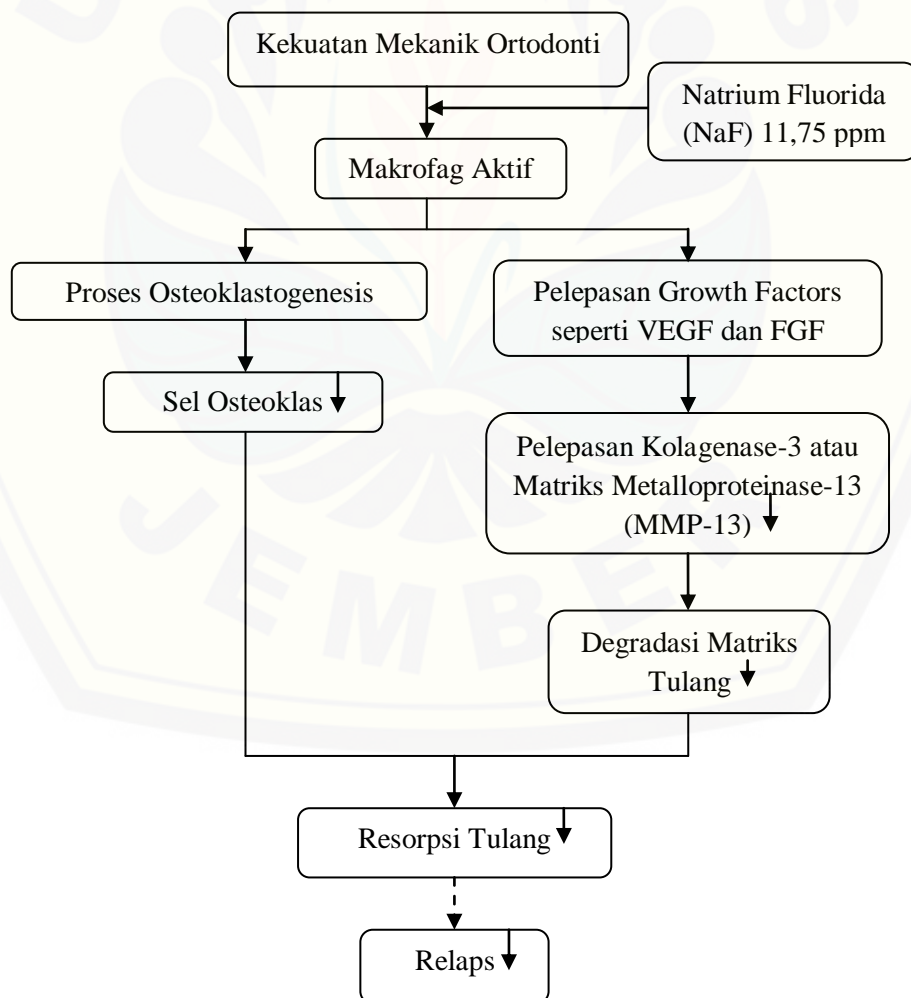
Penghitungan imunohistokimia (IHC) terdiri dari kualitatif dan semikuantitatif *scoring*. Metode semikuantitatif *scoring* lebih banyak digunakan karena dengan adanya *scoring*, hasil yang disajikan tidak akan menjadi sekedar hasil penilaian subjektif dari suatu ahli patologi (Vijayashree *et al.*, 2015). *ImmunoRatio Score* (IRS) merupakan metode semikuantitatif yang bertujuan pada evaluasi pewarnaan seluler, dengan adanya kombinasi modifikasi maka dapat digunakan untuk ekspresi pewarnaan ekstraseluler (Vijayashree *et al.*, 2015). Melalui analisis IRS dapat diketahui ekspresi marker tertentu sesuai keinginan peneliti melalui warna coklat yang terlihat saat mengidentifikasi preparat imunohistokimia (Ferreira dan Rasband, 2012). Analisis fotomikrograf dengan



menggunakan perangkat lunak banyak diusulkan karena dapat meningkatkan akurasi penghitungan sel dan menurunkan tingkat kesalahan.

Perangkat lunak IRS diusulkan untuk meningkatkan akurasi penghitungan sel dan memungkinkan penandaan sel yang dihitung, sehingga meningkatkan perbandingan antar data (Gonzalez *et al.*, 2016). Metode ini juga memiliki kekurangan yaitu apabila pewarnaan imunohistokimia tidak homogen maka akan terjadi bias pada penghitungan marker yang diinginkan. Artefak yang terbetuk akibat pewarnaan yang kurang baik juga dapat mempengaruhi hasil penghitungan IRS (Fedchecenko dan Reifenrath, 2014).

### 2.11 Kerangka Konsep



Penjelasan Kerangka Konsep :

Pergerakan gigi otodonti akan membuat kerusakan pada struktur tulang dimana saat terjadi kerusakan tulang, makrofag akan aktif pada fase inflamasi untuk memicu osteoklastogenesis dan juga melepaskan *Growth Factor* seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan *Fibroblast Growth Factor* (FGF). VEGF dan FGF-2 memiliki peran untuk membantu pelepasan kolagenase terutama kolagenase-3 yaitu Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13).

Natrium Fluorida (NaF) yang diberikan pada pergerakan gigi ortodonti menyebabkan penurunan dari proses osteoklastogenesis dan pelepasan MMP-13. Akibat dari penurunan proses osteoklastogenesis, jumlah sel-sel osteoklas menurun. *Fluoride* juga akan menekan matriks ekstraseluler untuk mendegradasi matriks tulang sehingga, proses resorpsi pada daerah tekanan dapat ditekan. Proses resorpsi pada daerah tekanan yang menurun ini dapat menekan terjadinya relaps, namun tidak dibahas secara mendalam.

## 2.12 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah Natrium Fluorida (NaF) dapat menurunkan jumlah sel osteoklas dengan penurunan ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada pergerakan gigi ortodonti.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

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

### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design*, yaitu rancangan acak lengkap untuk mengetahui efek perlakuan dan tanpa perlakuan pada unit eksperimen (Notoatmodjo, 2010). Pengukuran variabel dilakukan setelah hari ke- 7 dan hari ke- 14. Dalam penelitian eksperimental ini terdapat perlakuan dan pengulangan (replikasi) serta terdapat kontrol pembanding.

### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.3.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di :

1. Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
2. Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember
3. Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember
4. Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
5. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

#### 3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2017 hingga Februari 2018.

### 3.4 Variabel Penelitian

#### 3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah Natrium Fluorida (NaF) secara topikal aplikasi.

#### 3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13).

#### 3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain:

- a. Jenis hewan coba
- b. Umur hewan coba berat badan hewan coba
- c. Tatalaksana pemeliharaan hewan coba
- d. Jenis dan bahan anastesi
- e. Lokasi gigi dan pergerakan gigi
- f. Cara pemberian dan dosis Natrium Fluorida (NaF) dalam bentuk gel
- g. Waktu pengamatan
- h. Metode pemeriksaan

### 3.5 Definisi Operasional

#### 3.5.1 *Fluoride*

*Fluoride* merupakan unsur kimia yang memiliki sifat paling elektronegatif diantara unsur-unsur lain sehingga *fluoride* tidak pernah ditemukan dalam bentuk bebas dan selalu berikatan dengan unsur lain membentuk garam *fluoride* (Thylstrup, 1986). *Fluoride* yang digunakan dalam penelitian ini adalah gel Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm secara topikal aplikasi ke dalam sulkus gingiva tikus Wistar jantan. 11,75 ppm didapatkan dari perhitungan penyetaraan antara dosis optimal fluor secara topikal aplikasi yang dipakai manusia yaitu 400 ppm (Herschel, 1992; Walsh, 2006; Sutjiati, 2016).

#### 3.5.2 Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13)

Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) atau disebut juga kolagenase-3, terlibat dalam degradasi matriks ekstraseluler di berbagai jaringan. Aktivitas dari

MMP-13 banyak terlihat pada permukaan tulang di bawah sel-sel osteoklas, dan pada beberapa osteosit dan lakuna-lakuna di dekat osteoklas. MMP-13 dapat memainkan peran penting dalam degradasi kolagen tipe 1 dalam matriks tulang, bekerja bersama katepsin-K dan MMP-9 yang diproduksi osteoklas. Ekspresi MMP-13 pada penelitian ini diperiksa dengan pewarnaan imunohistokimia (Nakamura *et al.*, 2004).

### 3.5.3 Kekuatan Mekanik Ortodonti

Kekuatan mekanik ortodonti merupakan besarnya kekuatan yang diberikan kepada gigi untuk dapat digerakkan. Besar tekanan yang diberikan dalam penelitian ini diaplikasikan pada insisif sentral rahang atas tikus Wistar untuk menggerakkan gigi insisif ke arah kiri (distal) dengan menggunakan *closed coil spring* (NiTi) sebesar 10 gram/cm<sup>2</sup> yang diukur menggunakan tension gauge (Sutjiati, 2016). Kekuatan 2-10 cN (ekuivalen dengan g/cm<sup>2</sup>) merupakan kekuatan optimal untuk pergerakan pada gigi tikus (Ren *et al.*, 2003).

## 3.6 Sampel Penelitian

### 3.6.1 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus *Rattus Novergicus* strain wistar berjenis kelamin jantan dengan berat 200–250 gram dengan kondisi tikus dalam keadaan sehat.

### 3.6.2 Besar Sampel Penelitian

Besar sampel pada penelitian ini adalah berdasarkan (Daniel, 2005), yaitu :

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

#### Keterangan :

- n = Besar sampel tiap kelompok
- Z = Nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu, jika  $\alpha = 0,05$  maka  $Z = 1,96$
- $\sigma$  = Standar deviasi sampel
- d = Kesalahan yang masih dapat ditoleransi



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

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

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

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan, jumlah sampel masing-masing kelompok adalah sebesar 4 ekor. Pada penelitian ini terbagi secara acak 1 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dengan waktu pemeriksaan hari ke-7 dan hari ke-14, sehingga besar sampel yang diperlukan sebanyak 16 ekor yang terbagi dalam 4 kelompok.

### 3.6.3 Syarat Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai persyaratan kondisi fisik sehat dan tidak mengalami kelainan :

a. Jenis kelamin jantan

Pemilihan jenis kelamin ini ditujukan untuk menghindari pengaruh dari hormon–hormon seks wanita (estrogen) terhadap aktivitas osteoklas.

b. Umur dewasa dan berat badan ideal

Umur dewasa 3-4 bulan dengan berat badan 200–250 gram diharapkan mempunyai proses remodeling yang adekuat dan juga untuk menghindari pengaruh hormon–hormon pertumbuhan.

c. Makanan yang sesuai dan seragam

Tikus yang dipakai sebagai hewan coba diberi makanan. Agar mempunyai berat badan yang cukup ideal dan status kesehatan yang cukup baik. Hewan dilakukan aklimatisasi selama seminggu sebelum diberi perlakuan untuk adaptasi dengan tempat dan makanan.

### 3.7 Konversi Dosis

#### 3.7.1 Dosis Fluor

Bahan fluor yang digunakan adalah Natrium Fluorid (NaF) bentuk gel dengan dosis 11,75 ppm (Sutjiati, 2016).

#### 3.7.2 Dosis Ketamin

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

a. Dosis ketamin yang digunakan :

Konsentrasi 10% Ketamin

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

Berat badan hewan coba 200 – 250 gr = 0,2 – 0,25 kg

Rumus = ( Dosis x Berat ) : Konsentrasi

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

$$= 0,1 \text{ ml} ; 0,125 \text{ ml}$$

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

b. Dosis Xylazine yang digunakan :

Konsentrasi 2 % Xylazine

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

Berat badan hewan coba 200 – 250 gr = 0,2 – 0,25 kg

Rumus = ( Dosis x Berat ) : Konsentrasi

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

$$= 0,05 \text{ ml} ; 0,0625 \text{ ml}$$

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

### 3.8 Bahan dan Alat Penelitian

#### 3.8.1 Bahan Penelitian

- Air Mineral pH 8 (Pristine)
- Alkohol 70%, 80%, 95% dan absolut
- Antibodi MMP-13 (Santa Cruz Biotechnology)
- Aquades steril (Otsuka Indonesia)

- e. Bahan anestetikum yaitu Ketamin dan Xylazine (Pantex Holland)
- f. Buffer fosfat
- g. Entellan (Merck KgaA, Germany)
- h. Eosin (CV. Gamma Scientific Bolab)
- i. Etanol
- j. *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) 10% (Titriplex, EMD Millipore Corp., Germany)
- k. Formalin 10%
- l. Hematoksin (MP Biomedical Inc, France)
- m. Karbopol 1% (Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember)
- n. Natrium Fluorida 11,75 ppm (Emsure, EMD Millipore Corp., Germany)
- o. Pakan standar hewan coba dan air minum
- p. Paraffin (Merck KgaA, Germany)
- q. *Peroxidase* (Thermo Fisher Scientific)
- r. *Peroxisidase blocking solution* (Novocastra)
- s. *Phosphate buffer saline* (PBS)
- t. Propilen 3% (Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember)
- u. Semen Glass Ionomer Tipe IX (Fuji IX) sebagai perekat kawat pada gigi tikus
- v. *Superblock* (PBS) *blocking buffer* (Scytek Laboratories)
- w. Trietanolamin (TEA) 3% (Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember)
- x. *Xylol* (Merck KgaA, Germany)

### 3.8.2 Alat Penelitian

- a. Botol squit
- b. *Deck glass*/ kaca penutup
- c. *Diamond round bur* no.1
- d. *Disposable sput*
- e. Gunting
- f. Kamera (Sony CX6000)
- g. Kandang, tempat makan dan tempat minum tikus

- h. Mikromotor *Low speed straight hand piece* (Murano)
- i. Mikropipet (Socorex)
- j. Mikroskop cahaya (Olympus CX21, Japan)
- k. Mikrotom (Leica RM2245)
- l. Mortal dan alu
- m. NITI *closed coil spring* 0,01 inch (Ortho Prime, USA)
- n. *Orthodontics Tension gauge* (Ormco)
- o. Oven (Memmert, Germany)
- p. Pemrosesan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) (Sakura)
- q. *Poli-L-Lysine Object glass*
- r. Sarung tangan, masker, dan kertas label identitas
- s. *Scalpel*
- t. *Slide*
- u. Sonde setengah lingkaran dan spatula agate
- v. *Stainless steel ligature wire*
- w. Timbangan analitik (Sartorius)

### 3.9 Bahan untuk Analisis

- a. Aquades untuk menghilangkan kelebihan cat
- b. Hematoksilin
- c. Bahan-bahan pemeriksaan imunohistokimia

Bahan untuk melihat ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) adalah dengan menggunakan antibodi monoklonal anti-rat dengan pengecatan imunohistokimia.

### 3.10 Prosedur Penelitian

#### 3.10.1 *Ethical Cleareance*

Pengurusan keterangan kelaikan Etik Penelitian kepada Unit Etika dan Advokasi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

### 3.10.2 Persiapan Hewan Coba

Tikus wistar jantan sebanyak 16 ekor diadaptasikan dalam kandang selama satu minggu. Selama proses adaptasi, tikus diberi makanan standar dan diberi minum secara bebas/*ad libitum* setiap hari.

### 3.10.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Hewan coba yang sudah diadaptasikan akan dikelompokkan menjadi 4 kelompok yang terbagi dalam 2 kelompok antara lain: kontrol negatif yaitu kelompok kontrol yang diberi kekuatan mekanis ortodonti berupa pemasangan *ni-ti closed coil spring* 10 gr/cm<sup>2</sup> dan tidak diberi Natrium Fluorida (NaF), dan kelompok perlakuan yaitu kelompok perlakuan yang diberi kekuatan mekanis ortodonti berupa pemasangan *ni-ti closed coil spring* 10 gr/cm<sup>2</sup> dengan pemberian Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm. Pengamatan variabel masing-masing kelompok dilakukan pada hari ke-7 dan ke-14.

- a. Kelompok K- (1) (4 ekor) merupakan kelompok kontrol yang diberi kekuatan mekanis ortodonti selama 7 hari.
- b. Kelompok K- (2) (4 ekor) merupakan kelompok kontrol yang diberi kekuatan mekanis ortodonti selama 14 hari.
- c. Kelompok P1 (4 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi kekuatan mekanis ortodonti berupa pemasangan *ni-ti closed coil spring* dengan pemberian fluor selama 7 hari.
- d. Kelompok P2 (4 ekor) merupakan kelompok perlakuan yang diberi kekuatan mekanis ortodonti berupa pemasangan *ni-ti closed coil spring* dengan pemberian fluor selama 14 hari.

### 3.10.4 Persiapan Gel Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm

Natrium Fluorida (NaF) diperoleh dalam bentuk bubuk berwarna putih yang diproses menjadi bentuk gel. Pembuatan gel dilakukan dengan mencampurkan NaF sebanyak 11,75 mg, carbopol sebanyak 1%, Trietanolamin (TEA) sebanyak 3%, dan Propilen sebanyak 3% dalam 1 liter aquades steril menggunakan mortal dan alu.



### 3.10.5 Pemasangan *coil spring*

- a. Selama prosedur pemasangan dan aktivasi *ni-ti closed coil spring*, dilakukan anestesi intramuskuler pada tikus dengan larutan ketamine dan Xyla.
- b. Sebelum dipasang kekuatan *ni-ti closed coil spring* diukur dengan menggunakan *tension gauge* untuk menghasilkan kekuatan sebesar 10 gram/cm<sup>2</sup>.
- c. Sebuah *ni-ti closed coil spring* diletakkan di antara gigi insisif sentral rahang atas dan molar pertama kiri rahang atas untuk menggerakkan insisif ke arah distal. Piranti ini difiksasi dengan 0,1 mm *stainless steel ligature wire* yang dipasang mengelilingi gigi insisif sentral rahang atas melalui sebuah lubang yang dibuat dengan *round bur* pada sisi distovertikal dengan 0,1 mm *stainless steel ligature wire* yang dipasang mengelilingi gigi molar pertama. Untuk meningkatkan retensi, diaplikasikan *glass ionomer cement* (Sella, 2012).
- d. Hewan coba pada kelompok P1 dan P2 merupakan hewan coba yang diberi perlakuan gel NaF 11,75/ml secara topikal ke dalam sulkus gingiva gigi insisif dengan *syringe* modifikasi sebanyak 0,5 ml dua kali sehari. Pemberian NaF pada hewan coba dilakukan setelah hewan coba diberi makan.



Gambar 3.1 Pemasangan *closed coil spring* (Seifi *et al.*, 2013; X.Li *et al.*, 2016).

### 3.10.6 Pengambilan Jaringan Penelitian

Dilakukan dekaputasi hewan coba kelompok K-1 dan P1 pada hari ke-7 dan kelompok K-2 dan P2 pada hari ke-14. Pengambilan jaringan dilakukan



dengan menggunakan *knable* tang dan *scalpel* pada bagian anterior rahang atas. Pemotongan jaringan ini dilakukan di atas papan gabus. Jaringan yang diambil untuk penelitian harus segar artinya, jaringan diambil secepat mungkin setelah hewan coba dieuthanasia (Muntiha, 2001).

### 3.11 Tahap Pembuatan Sediaan

#### 1. Perendaman Jaringan dengan Larutan Buffered Neutral Formalin 10%.

Jaringan yang sudah terambil, dilakukan fiksasi dengan menggunakan larutan *Buffer Neutral Formalin* 10%. Larutan ini berfungsi untuk mengawetkan jaringan agar terhindar dari pencernaan jaringan oleh enzim-enzim (otolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik sel dan mempertahankan morfologi sel seperti semula (Muntiha, 2001). Fiksasi jaringan dilakukan selama minimal 24 jam (Santoso, 2006).

#### 2. Perendaman larutan dekalsifikasi

Dilakukan dekalsifikasi pada jaringan dengan menggunakan EDTA 10% selama 21 – 30 hari. Proses dekalsifikasi bertujuan untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang sehingga tulang menjadi lunak, dan memudahkan dalam proses pemotongan. Jaringan dicuci dengan PBS 3 - 5x untuk membersihkan dari kontaminan (Santoso, 2006). Proses dekalsifikasi telah selesai ditandai dengan jaringan yang sudah lunak (Muntiha, 2001).

#### 3. Pemrosesan Jaringan

##### a. Dehidrasi yaitu penarikan air dari dalam jaringan dengan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi . Tahapan dehidrasi sebagai berikut :

1. Alkohol 70 % = ± 15 menit
2. Alkohol 80 % = 1 jam
3. Alkohol 95 % = 2 jam
4. Alkohol 95 % = 1 jam
5. Alkohol 100 % = 1 jam
6. Alkohol 100 % = 1 jam
7. Alkohol 100 % = 1 jam (Syafriadi *et al.*, 2007).

b. Clearing yaitu proses penjernihan menggunakan bahan clearing seperti xylol, toluel, dan benzen. Pada penelitian ini menggunakan xylol. Tahapan clearing sebagai berikut :

1. Xylol = 1 jam
2. Xylol = 2 jam
3. Xylol = 2 jam (Syafriadi *et al.*, 2007).

c. Impregnasi yaitu proses infiltrasi bahan embedding dalam jaringan pada suhu 56°-60°C, caranya jaringan dibungkus dengan kertas saring yang sudah diberi label untuk menghindari kekeliruan identitas sampel, kemudian dimasukkan ke dalam bahan embedding yaitu paraffin TD 56°-60°C.

Tahapan impregnasi sebagai berikut :

1. Paraffin (56°-68°C) = 2 jam
2. Paraffin (56°-68°C) = 2 jam
3. Paraffin (56°-68°C) = 2 jam (Syafriadi *et al.*, 2007).

#### 4. Pembuatan Blok Jaringan (*embedding*)

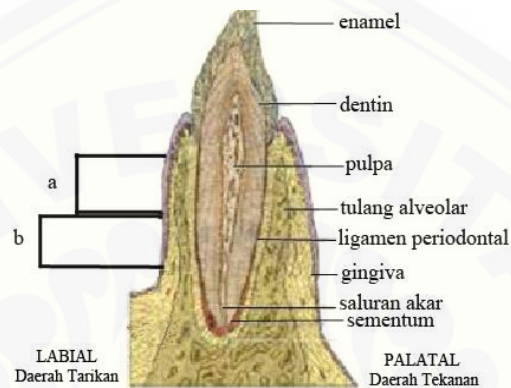
Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan embedding, yaitu paraffin, cellulose, dan tissue text. Pada penelitian ini menggunakan paraffin TD 60°C. Tahapan *embedding* sebagai berikut :

- a. Mempersiapkan alat cetak blok parafin dan meletakkan alat cetak tersebut di tempat dengan permukaan rata.
- b. Tuangkan paraffin cair (TD 60°C) ke dalam alat cetak blok, kemudian masukkan jaringan yang telah diimpregnasi dengan *surgical* yang kita inginkan dan jangan lupa diberi label sampel, tunggu beberapa menit sampai paraffin beku (Syafriadi *et al.*, 2007).

#### 5. Tahapan Penyayatan Jaringan

- a. Olesi obyek glass dengan meyer egg albumin dan tempelkan blok paraffin pada blok holder mikrotom dengan bantuan pemanasan.
- b. Penyayatan menggunakan mikrotom, sebelumnya bersihkan pisau mikrotom dengan kasa/kertas saring yang telah dibasahi dengan xylol dengan arah tegak lurus.
- c. Atur ketebalan sayatan mikrotom antara 4-6 µm, atau sesuai kebutuhan.

- d. Ambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas lalu letakkan diatas permukaan air *waterbath* dengan temperatur tetap 56°-58°C hingga sayatan mekar.
- e. Ambil sayatan yang telah mekar dengan obyek glass yang telah diolesi dengan meyer egg albumin, dan keringkan dengan *hotplate* dengan suhu sekitar 30-35°C, minimal selama 12 jam (Syafriadi *et al.*, 2007).



Gambar 3.2. Desain pemotongan anterior-posterior pandangan mesial dan distal.

### 3.12 Tahapan Pewarnaan dan Pengamatan Ekspresi MMP-13

#### 3.12.1 Pewarnaan Haematoksilin Eosin (HE)

- a. Proses deparafinisasi dengan tahapan antara lain :
  - a. Larutan Xylol = 2-3 menit
  - b. Larutan Xylol = 2-3 menit
  - c. Alkohol absolut = 3 menit
  - d. Alkohol absolut = 3 menit
  - e. Alkohol 95 % = 3 menit
  - f. Alkohol 95 % = 3 menit
  - g. Air mengalir = 10-15 menit
- b. Pengecatan Haematoksilin selama 15 menit. Kemudian dibilas dengan air mengalir/air hangat selama 20 menit.
- c. Pengecatan Eosin selama 15 detik - 2 menit.
- d. Proses dehidrasi dengan tahapan sebagai berikut :
  1. Alkohol 95 % = 2-3 menit
  2. Alkohol 95 % = 2-3 menit

3. Alkohol absolut = 2-3 menit
4. Alkohol absolut = 2-3 menit
- e. Proses clearing menggunakan xylol selama 3 menit sebanyak tiga kali.
- f. Mounting dengan larutan entellan selama 5 menit(Syafriadi *et al.*,2007).

### 3.12.2 Pewarnaan Imunohistokimia (IHC)

- a. Sediaan dilakukan deparafinisasi preparat dengan larutan *xylol* dan alkohol sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit.
- b. Rehidrasi dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95% dan etanol 70% masing- masing selama dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit.
- c. *Object glass* direndam dengan *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit.
- d. Inkubasi preparat dalam *prediluted blocking serum* 25°C selama 10 menit.
- e. Preparat direndam di dalam antibodi monoklonal Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) 25°C dengan konsentrasi 1:50 selama 10 menit.
- f. Preparat dicuci dengan *phosphatase buffer salien* (PBS) selama 5 menit.
- g. Inkubasi preparat dengan antybody sekunder pada suhu 25°C selama 10 menit.
- h. Preparat dicuci dengan *phosphatase buffer salien* (PBS) selama 5 menit.
- i. Inkubasi preparat dengan *peroxidase* pada suhu 25°C selama 10 menit.
- j. Preparat dicuci dengan *phosphatase buffer salien* (PBS) selama 5 menit.
- k. Inkubasi preparat dengan kromoden diaminobenzidine (DAB) pada suhu 25° C selama 10 menit.
- l. Preparat dicuci dengan air mengalir.
- m. Preparat dibersihkan dan ditetesi dengan mounting media kemudian ditutup dengan *cover glass*.
- n. Pengamatan hasil ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) (Sutjiati, 2016; Yusuf, 2017).

### 3.12.3 Pengamatan Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13)

Pengamatan dilakukan dengan pewarnaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) diamati dibawah mikroskop pembesaran 400x. Penghitungan dilakukan pada daerah 1/3 servikal daerah tekanan menggunakan *Software Immuno Ratio*. Hasil dari penghitungan pada dari tiga lapang pandang, kemudian akan dijumlahkan dan diambil rata-rata setiap kelompok (Fedcheenko dan Reifenrath, 2014).

### 3.13 Analisis Data

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi kondisi diusahakan sama dan dapat dikendalikan .

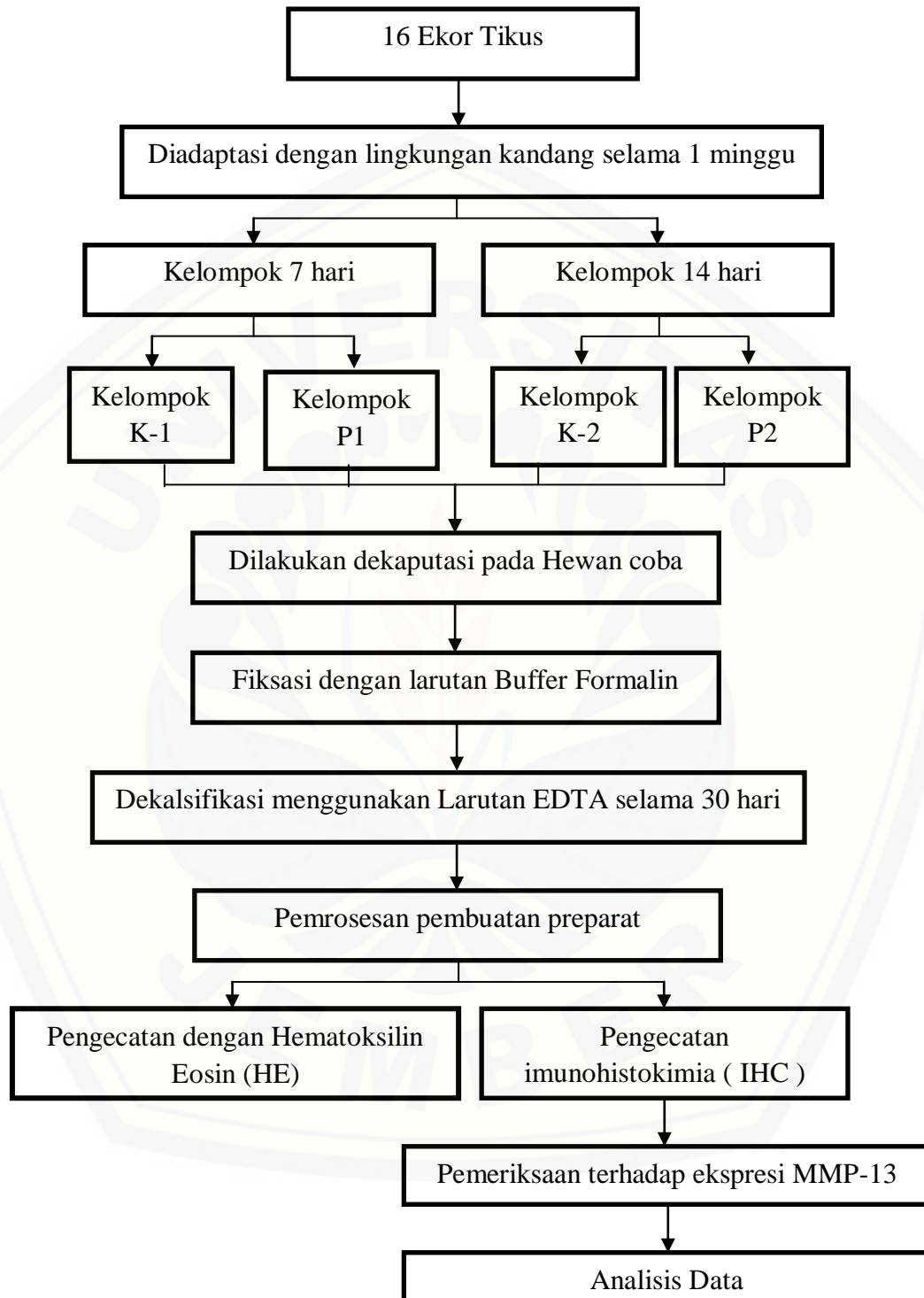
Urutan analisis data :

- a) Uji normalitas untuk menguji variabel yang diperiksa dalam penelitian berdistribusi normal menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*
- b) Uji homogenitas untuk menyatakan bahwa data antar kelompok memiliki matriks kovarians yang homogen menggunakan uji *Levene*
- c) Analisis varian, bila data berdistribusi normal maka dilakukan uji antar kelompok menggunakan *One-way Anova* dan bila data berdistribusi tidak normal maka dilakukan uji *Kruskal-Wallis*

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



### 3.14 Skema Prosedur Penelitian





## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian Natrium Fluorida (NaF) 11,75 ppm pada sulkus gingiva gigi insisivus tikus Wistar jantan yang diberi gaya mekanis ortodonti 10 gram/cm<sup>2</sup> terjadi penurunan jumlah sel osteoklas pada kelompok perlakuan hari ke-7 dan -14 yang dilihat dari menurunnya ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada daerah tekanan, walaupun penurunan tersebut tidak berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan jarak waktu pengamatan yang lebih pendek.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut selain jaringan keras yaitu jaringan lunak dan mengetahui ekspresi MMP-13 di jaringan periodontal.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan konsentrasi yang bervariasi.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap cara aplikasi NaF pada gigi yang dilakukan perawatan ortodonti selain di sulkus gingiva.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adilah, et al. 2010. Proses Fisiologi Pergerakan Gigi Ortodonti. *Orthodontic Dental Journal*. vol 1(1): 8-13.
- Alawiyah, Tuti dan Sianita, Pricillia. 2012. Retensi Dalam Perawatan Ortodonti. *Jurnal Ilmiah dan Teknologi Kedokteran Gigi*. vol 9(2) : 29-35.
- Araoud, Manel. 2011. *Biological Markers of Human Exposure to Pesticides*.Tunisia: INTECH Open Access Publisher.
- Balajhi, S.I. 2007. *Orthodontics The Art and Science 3<sup>rd</sup> ed*. New Delhi: Arya Medi Publishing House.
- Baratawidjaya, KG. 2000. *Immunology Dasar*, ed 4: Pemeriksaan Sistem Imun. p: 279-80.
- Bruzzaniti, A and Baron, R. 2006. Molecular Regulation of Osteoclast Activity. *Rev Endocr Metab Disord*. vol 7(1-2): 123-39.
- Buckwalter, J.A., Einhorn, T.A., Bolander, M.E., and Cruess, R.L. 1996. Healing of Musculoskeletal Tissues. *Proceedings of Fractures*.4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott. p:261-304.
- Budiawan, Dr. rer.nat. 2008. Peran Toksikologi Forensik Dalam Mengungkap Kasus Keracunan Dan Pencemaran.*Indonesian Journal of Legal and Forensic Sciences*. vol 1(1): 35-39.
- Caceci, T. 2011. Cartilago and Bone. <http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab8/Lab8obs.htm>. [Diakses pada 20 Oktober 2017].
- Capulli, M., Paone, R., and Rucci, N. 2014. Osteoblast and Osteocyte: Games Without Frontiers. *Arch Biochem Biophys*. vol 561: 3-12.
- Cheville, N.F. 2006. *Introduction to Veterinary Pathology 3<sup>rd</sup> edition*. USA: Blackwell Publishing.
- Daniel, W.2005. *Biostatistica Foundation for Analysis in the Health Science 6th edition*. Canada:John Willeyand Sons, Inc.
- Danz, J.C., Greuter, C., Sifakakis, I., Fayed M., Pandis, N., dan Katsaros, C. 2012. Stability and Relapse After Orthodontics Treatment of Deep Bite Cases-a Long-Term Follow-Up Study. *European Journal of Orthodontics*. vol 36(5): 522-30.

- Davies, S.J. 2007. Malocclusion- a Term in Need of Dropping or Redefinition. *British Dental Journal*. vol 202(9):3-9.
- Den Besten PK, Yan Y, Featherstone JD et al. 2002. Effects of fluoride on rat dental enamel matrix proteinases. *Arch Oral Biol*. vol 47(11): 763–770.
- Everett, E.T. 2011. Fluoride's Effects on the Formation of Teeth and Bones, and the Influence of Genetics. *Journal of Dental Research*.vol 90(5): 552-560.
- Everts V, Korper W, Hoeben KA et al. 2006. Osteoclastic bone degradation and the role of different cysteine proteinases and matrix metalloproteinases: differences between calvaria and long bone. *J Bone Miner Res*. vol 21(9): 1399–1408.
- Fedchenko N dan Reifenrath J. 2014. Different Approaches for Interpretation and Reporting of Immunohistochemistry Analysis Result in The Bone Tissue – A Review. *Creative Commons Attribution License*. 9 : 221.
- Ferreira T.A. dan Rasband W. 2012. The ImageJ user guide, Version 1.43 [EB/OL]. <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/user-guide.pdf>. [Diakses pada 5 Februari 2018].
- Florencio-silva, R., Sasso, G.R., Sasso-cerri, E., Simoes, M.J., and Cerri, P.S. 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*. doi: 10.1155/2015/421746.
- Foster, T.D. 1997. *Buku Ajar Ortodonti Edisi 3*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal: 168-83.
- Gao, Jianlong and Xijun, Liu. 2016. Bone Remodelling Regulated by Long Non-coding RNAs. *Journal of American Science*. vol 12(1).
- Goenharto, S dan Rusdiana, E. 2015. Piranti Retensi Pasca Perawatan Ortodonti. *Journal of Dental Technology*. vol 4(1): 1-7.
- Gonzalez, Rogelio., Nelly Molina-Frechero., Ramón G. Carreón-Burciaga., 1 Sandra López-Verdín., Carlos Robles-Bonilla., Vanesa Pereira-Prado., and Ronell Bologna-Molina. 2016. Comparison between Manual and Automated Methods for Ki-67 Immunoexpression Quantification in Ameloblastomas. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7486989>
- Hansu, Christy., P.S, Anindhita., dan Ni Wayan, Mariati. 2013. Kebutuhan Perawatan Ortodonti Berdasarkan Index of Orthodontic Treatment Need di SMP Katolik Theodorus Kotamobagu. *Jurnal e-Gigi (eG)*. vol 1(2): 99-104.

- Hartiningsih dan Anggraeni, Devita. 2015. Suplementasi Calcitriol Menurunkan Risiko Osteoporosis Tikus Ovariectomi. *Indonesian Journal of Veterinary Science*. vol 36: 0126-0421.
- Hastuti, Neni Wahyu dan Humairah, Medina Liza Lubis. 2011. Manfaat Pemeriksaan Imunohisto(sito)kimia. *Cermin Dunia Kedokteran* 186. vol 38(5): 384-386.
- Herschel, S. 1992. The need for toothpaste with Lower than konvensional fluoride concentrations for Preschool-aged Children. *Journal of Public Health Dentistry*, 216-221.
- Inada, Masaki., Michael, H. Byrne., Mahboob U, Rahman., Chisato, Miyaura., Carlos, Lopez, and Stephen M, Krane. 2004. Critical Roles for Collagenase-3 (MMP-13) in Development of Growth Plate Cartilage and in Endochondral Ossification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol 101(49). 20 Oktober 2004. *The National Academy of Sciences*: 17192-17197.
- Ingman, T., Apajalahti, S., Mantyla, P., Savolainen, P., and Sorsa, T. 2005. Matrix Metalloproteinase-1 and -8 in Gingival Crevicular Fluid During Orthodontic Tooth Movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation. *European Journal of Orthodontics*. vol 27: 202-207.
- Junquera, L.C. 2007. *Persiapan Jaringan Untuk Pemeriksaan Mikroskopi Histologi Dasar Teks dan Atlas Edisi 10*. Jakarta: EGC.
- Karsenty, G. 2001. Genetic Control of Skeletal Development. *Novartis Found Symp*. vol 232: 6-22.
- Kato, M.T., A. Bolanho., B.L Zarella., T. Salo., L. Tjaderhane., and M.A.R Buzalaf. 2014. Sodium Fluoride Inhibits MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res*. vol 93(1): 74-77.
- Khalid, Anibah and Muhammad Asim, Javaid. 2016. Matrix Metalloproteinases: New Targets in Cancer Therap. *Journal Cancer Science Therapy*. vol 8 (6): 143-153.
- Kini, Usha and Nandeesh, B.N. 2012. *Physiology of Bone Formation, Remodelling, and Metabolism*. Heidelberg: Springer.
- Klein S, Bikfalvi A., Birkenmeier, TM., Giancotti, FG., and Rifkin DB. 1996. Integrin Regulation By Endogenous Expression Of 18-Kda Fibroblast Growth Factor-2. *J Biol Chem*. 1996;271:22583–22590.



- Leong, ASY. 1993. *Applied Immunohistochemistry for The Surgical Pathologist*. London: Edward Arnold.
- Mackie, E., Ahmed, Y., Tatarczuch, L., Chen, K.S., and Mirams, M. 2008. Endochondral Ossification: How Cartilage is Converted into Bone in the Developing Skeleton. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. vol 40: 46-62.
- Maleeh, Imad., Jennifer, Robinson., and Sunil, Wadhwa. 2016. Role of Alveolar Bone in Mediating Orthodontics Tooth Movement and Relapse. *Proceedings of Biology of Orthodontic Tooth Movement*. Springer International Publishing Switzerland: 1-12.
- Moscatelli, D., Presta, M., and Rifkin, DB. 1986. Purification of a factor from human placenta that stimulates endothelial cell protease production, DNA synthesis and migration. *Proc Natl Acad Sci USA*. vol 83:2091–2095.
- Mulyani. 1994. *Biomekanika Pergerakan Gigi*. Jakarta: Widya Medika.
- Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi dari Jaringan Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksin dan Eosin*. Bogor: Balai Penelitian Veteriner.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta : Rineka Cipta.
- Oktaviani, D. 2008. Analisis Hubungan Maloklusi dengan Kualitas Hidup pada Remaja SMU Kota Medan Tahun 2007. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Gigi USU*. vol 1.
- Okuda A, Kanehisa J, Heersche JN. 1990. The effects of sodium fluoride on the resorptive activity of isolated osteoclasts. *J Bone Miner Res*. vol 5(1): S115–S120.
- Prakosa, M. Sukur Imam. 2016. Prevalensi Terjadinya Relaps Setelah Perawatan Dengan Alat Ortodontik Cekat. *Skripsi*. Yogyakarta: Program Sarjana Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Proffit, W.R. 2000. *Contemporary Orthodontics 3<sup>rd</sup> ed*. London : C.V Mosby Company. p: 128-141.
- Proffit, W.R. 1986. *Contemporary Orthodontics*. London : C.V Mosby Company.
- Qu, Q., Perala-Heape, M., Kapanen, A., Dahllund, J., Salo, J., Vaananen, H.K., and Harkonen, P. 1998. Estrogen Enhances Differentiation of Osteoblasts in Mouse Bone Marrow Culture. *Bone*. vol 22: 201-209.



- Rahardjo, P. 2009. *Ortodonti Dasar*. Surabaya: Airlangga University Press. p: 2-3, 60.
- Rahardjo, P. 2012. *Ortodonti Dasar Edisi 2*. Surabaya: Airlangga University Press. p: 45-67.
- Rahayu, Yani C dan Elza I, Auerkari. 2004. Teknik Imunohistokimia Sebagai Pendeteksi Antigen Spesifik Penyakit Infeksi. *Indonesian Journal of Dentistry*. vol 11(2): 76-82.
- Raisz, L.G., Rodan, G.A., Alvioli, L.V., and Krane, S.M. 1998. Embryology and Cell Biology of Bone. *Proceedings of Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders 3<sup>rd</sup> Edition*. Academic Press USA: 1-22.
- Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI Tahun 2013. <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Riskesdas%202013>. [Diakses pada 19 Oktober 2017].
- Salzman, JA. 1966. *Etiology of Malocclusion and Dentofacial Deformities In: Practice of Orthodontics*. Philadelphia and montreal: JB Lippincott company. p.114-123, 378-386.
- Santoso, H. B. 2006. Struktur Mikroskopis Kartilago Epifisialis Tibia Fetus Mencit (*Mus musculus L.*) dari Induk dengan Perlakuan Kafein. *Bek. Penel. Hayati*, 12: 69-74.
- Sasea, Altriany., B.S, Lampus., dan Aurelia, Supit. 2013. Gambaran Status Kebersihan Rongga Mulut dan Status Gingiva Pada Mahasiswa Dengan Gigi Berjejal. *Jurnal e-Gigi (eG)*. vol 1(1): 52-58.
- Seghezzi, Graziano., Sundeep, Patel., Christine J, Ren., Anna, Gualandris., Giuseppe, Pintucci., Edith S, Robbins., Richard L, Saphiro., Aubrey C, Galloway., Daniel B, Rifkin, and Paolo, Mignatti. 1998. Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in the Endothelial Cells of Forming Capillaries: An Autocrine Mechanism Contributing to Angiogenesis. *The Journal of Cell Biology*. vol. 141(7): 1659-1673.
- Seifi, Massoud DDS, MSD., Mohammad, Reza Badiee DDS., Zahra, Abdolazimi DDS., Parisa, Amdjadi DDS. 2013. Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Cell Journal*. vol 15(3): 230-237.
- Sella, R.C., de Mendoca, M.R., Osmar, Aparecido Coughi O.A., Li AN. T. 2012. Histomorphologic Evaluation of Periodontal Compression and Tension Sides

- During Orthodontic Tooth Movement in Rats. *Dental Press J Orthodontic*. vol 15(3): 108.17.
- Slooff W et al., eds. 1988. *Basisdocument fluoriden*. Bilthoven, Netherlands: National Institute of Public Health and Environmental Protection (Report No. 758474005)
- Soehardono, D, drg., MS., Sp.Ort (K). 2008. *Buku Ajar Ortodonsia III*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Song I, Kim JH, Kim K et al. 2009. Regulatory mechanism of NFATc1 in RANKL-induced osteoclast activation. *FEBS Lett*. vol 583(14): 2435–2440.
- Sulandjari, H. 2008. *Buku Ajar Orthodonsia I*. Yogyakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada.
- Sulastry, S. 2007. Korelasi Antara Lebar Mesio-distal Gigi dengan Kecembungan Profil Jaringan Lunak Wajah Orang Bugis-Makassar. *Jurnal Dentofacial*. vol 6(2): 72-7.
- Sutjiati, Rina. 2016. Mekanisme Hambatan Relaps Pergerakan Gigi Orthodonti Pada Pemberian Natrium Fluorida (NaF). *Disertasi*. Surabaya: Program Doctoral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
- Syafriadi, Mei. 2007. *Patologi Anatomi Degenerasi dan Radang: Petunjuk Praktikum*. Jember: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Teitelbaum, S. L. 2000. Bone Resorption By Osteoclasts. *Science*. vol 289(5484): 1504–1508.
- Teitelbaum, S.L. 2007. Osteoclasts: what do they do and how do they do it. *Am J Pathology*. vol 170(2): 427-35.
- Toriseva, Mervi., Laato, Olli Carpen., Suvi T, Ruohonen., Eriika, Savontaus., Masaki, Inada., Stephen M, Krane, and Veli, Matti Kahari. 2012. MMP-13 Regulates Growth of Wound Granulation and Modulates Gene Expression Signatures Involved in Inflammation, Proteolysis, and Cell Viability. *PLOS ONE*: 7(8). Pages 239-252.
- Ujjal K Bhawal., Hye-Jin Lee., Kazumune Arikawa., Michiharu Shimosaka., Masatoshi Suzuki.,Toshizo Toyama., Takenori Sato., Ryota Kawamata., Chieko Taguchi., Nobushiro Hamada., Ikuo Nasu., Hirohisa Arakawa, and Koh Shibutani. 2015. Micromolar Sodium Fluoride Mediates Anti-Osteoclastogenesis In Porphyromonas Gingivalis-Induced Alveolar Bone Loss. *International Journal of Oral Science*. vol 7. Page : 242–249.

- Unitly, Adrien J.A dan Dece E, Sahertian. 2010. Deteksi Kandungan Antioksidan Superoksida Dismustase (Sod) pada Organ Ginjal Tikus *Rattus Norvegicus* dengan Pewarnaan Imunohistokimia. 2 Juli 2010. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pattimura: ISBN: 978-602-97522-0-5.
- Waddington, RJ and Langley, MS.2003. Altered expression of matrix metalloproteinases within mineralizing bone cells in vitro in the presence of fluoride. *Connect Tissue Res.* vol 44:88-95.
- Walsh. 2006. Home care self-applied fluoride product: current concepts for maximal effectiveness. *Dental Practice.* 66-67.
- Wang, Meina., Erik R, Sampson., Hongting, Jin., Jia, Li., Qiao H, Ke., Hee, Jeong Im, andDi, Chen. 2013. MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Research and Therapy.*vol15(1).
- Wijaya, Stefany., Noengki, Praneswari., dan Maria, Lisdiana T. 2015. Pengaruh Pemberian Gel Teripang Emas Terhadap Jumlah Osteoklas Di Daerah Tekanan Pada Remodeling Tulang Pergerakan Gigi Ortodonti. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi.* vol 9(2): 173-181.
- William, J.K., Cook, P.K., Isaacson, K.G., and Thom, A.R. 2000. *Alat-alat Ortodonsi Cekat: Prinsip dan Praktek.* Jakarta: EGC.
- Wiranowska, Marzenna., Aryn, M Rojiani., and Mumtaz, V Rojiani. 2015. Matrix Metalloproteinases-Modulating the Tumor Microenvironment. *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis.* vol 6(3):225.
- X, Li., M, Li., J, Lu., Y, Hu., L, Cu., Zhang, D., and Yang Y. 2016. Age-related Effects on Osteoclastic Activities After Orthodontic Tooth Movement. *Bone Joint Res.* vol 5(10): 492-499.
- Yasuda, H., N. Shima., N. Nakagawa et al., 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesisinhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95(7): 3597–3602.
- Yohana, Winny. 2009. The Importance Oral Health For The Patient With Fixed Orthodontic Appliance. *Thesis.* Bandung: Program Magister Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjajaran.
- Yusuf, Putri Rahmawati. 2017. Pengaruh Pemberian Ekstrak *Thymoquinone* Jintan Hitam Terhadap Kadar Gula Darah Dan Re-epitelisasi Tepi Soket Gigi Pasca Ekstraksi Pada Tikus Yang Menderita Diabetes. *Skripsi.* Jember: Program Sarjana Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



## LAMPIRAN 1. Surat Perijinan Penelitian

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)          FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER  <i>(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH          FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</i></p>	
<p><b>ETHIC COMMITTEE APPROVAL</b>  <u>No. 032/UN25.8/KEPK/DL/2018</u></p>	
Title of research protocol	: "Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Ortodonti Setelah Pemberian Natrium Florida (Naf)"
Document approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Arie Puspa Ningtyas
Member of research	: -
Responsible Physician	: Arie Puspa Ningtyas
Date of approval	: February 5 <sup>th</sup> , 2018
Place of research	: 1. Biomedical Laboratory Dental Faculty Universitas Jember 1. Pharmacy Laboratory at Faculty of Pharmacy Universitas Jember 2. Pharmaceutics Laboratory at Faculty of Pharmacy Universitas Jember 3. Anatomical Pathology Laboratory Medicine Faculty University of Brawijaya 4. Biochemical Laboratory Medicine Faculty University of Brawijaya
<p>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.</p>	
<p>Jember, February 10<sup>th</sup>, 2018</p>	
 Dean of Faculty of Dentistry University of Jember	 Chair 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.)



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

Nomor : 4918/UN25.8.TL/2017  
Perihal : Pembuatan Gel

Kepada Yth  
Kepala Laboraturium Farmasetika  
Fakultas Farmasi Universitas Jember

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

- |    |                         |  |
|----|-------------------------|--|
| 1  | Nama                    | : Arie Puspa Ningtyas  |
| 2  | NIM                     | : 141610101003   |
| 3  | Semester/Tahun          | : 2017/2018  |
| 4  | Fakultas                | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 5  | Alamat                  | : Jln. Mastrip 1 No.61 , Jember  |
| 6  | Judul Penelitian        | : Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Pasca Perawatan Ortodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) |
| 7  | Lokasi Penelitian       | : Laboraturium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember   |
| 8  | Data/alat yang dipinjam | : Mortal, stamper, gelas ukur, beker glass, timbangan  |
| 9  | Waktu                   | : November 2017 s/d Selesai  |
| 10 | Tujuan Penelitian       | : Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Pasca Perawatan Ortodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) |
| 11 | Dosen Pembimbing        | : 1. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes<br>2. drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed  |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan  
Wakil Dekan I,  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
**Dr. drg. IDA Susilawati, M.Kes**  
NPP: 196109031986022001





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

Nomor : 4912/UN25.8/TL/2017  
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth  
Kepala Laboratorium Kimia Farmasi  
Fakultas Farmasi 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                    | : Arie Puspa Ningtyas  |
| 2  | NIM                     | : 141610101003   |
| 3  | Semester/Tahun          | : 2017/2018  |
| 4  | Fakultas                | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 5  | Alamat                  | : Jl. Mastrip 1 No. 61 Jember  |
| 6  | Judul Penelitian        | : Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Orthodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (Naf) Untuk Pencegahan Relaps                  |
| 7  | Lokasi Penelitian       | : Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember   |
| 8  | Data/alat yang dipinjam | : Timbangan Analitik , Gelas Beaker  |
| 9  | Waktu                   | : Agustus 2017 s/d Selesai   |
| 10 | Tujuan Penelitian       | : Untuk Mengetahui Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Orthodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (Naf) Untuk Pencegahan Relaps |
| 11 | Dosen Pembimbing        | : 1. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes<br>2. drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed  |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih





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

Nomor : 4912 /UN25.8.TL/2017  
Perihal : Ijin Penelitian

Kepada Yth  
Kepala Bagian Laboratorium Biomedik  
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas  
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                    | : Arie Puspa Ningtyas   |
| 2  | NIM                     | : 141610101003  |
| 3  | Semester/Tahun          | : 2017/2018   |
| 4  | Fakultas                | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember   |
| 5  | Alamat                  | : Jl. Mastrip 1 No.61   |
| 6  | Judul Penelitian        | : Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Ortodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF)                  |
| 7  | Lokasi Penelitian       | : Laboratorium Farmakologi FKG Universitas Jember   |
| 8  | Data/Alat yang Dipinjam | : Timbangan Analitik, Jangka Sorong, dan Papan paraffin   |
| 9  | Waktu                   | : November 2017 s/d Selesai   |
| 1  | Tujuan Penelitian       | : Untuk Mengetahui Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Ortodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) |
| 11 | Dosen Pembimbing        | : 1. Dr. drg. Rina Sutjiati , M.Kes<br>2. drg. Rudy Jeolijanto , M.Biomed   |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

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



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

Nomor : 0093 /UN25.8/TL/2018  
Perihal : Ijin Penelitian

12 MAR 2018

Kepada Yth  
Kepala Laboratorium Biokimia  
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya  
Di  
Malang

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

- 1 Nama : Arie Puspa Ningtyas
- 2 NIM : 141610101003
- 3 Semester/Tahun : 2017/2018
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Mastrip 1 No. 61 Jember
- 6 Judul Penelitian : Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Orthodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (Naf)
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- 8 Data/alat yang dipinjam : Mikroskop, mikropipet
- 9 Waktu : Januari 2018 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Untuk Menganalisis Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Orthodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (Naf)
- 11 Dosen Pembimbing : 1. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes  
2. drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an, Dekan  
Wakil Dekan I,



Dr. drg. IGA Susilawati, M.Kes  
NIDN 196109031986022001




**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**  
Jl. Kalimantan No. 37 Jember ☎(0331) 333530, Faks. 331591

---

Nomor Perihal : **0993 UN25.8/TL/2018**  
: Ijin Penelitian

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

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

1	Nama	: Arie Puspa Ningtyas
2	NIM	: 1416101003
3	Semester/Tahun	: 2017/2018
4	Fakultas	: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
5	Alamat	: Jl. Mastrip 1 No. 61 Jember
6	Judul Penelitian	: Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Orthodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (Naf)
7	Lokasi Penelitian	: Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
8	Data/alat yang dipinjam	: Mikrotom
9	Waktu	: Januari 2018 s/d Selesai
10	Tujuan Penelitian	: Untuk Menganalisis Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) Pada Pergerakan Gigi Orthodonti Setelah Pemberian Natrium Fluorida (Naf)
11	Dosen Pembimbing	: 1. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes 2. drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

  
 Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes  
NIP. 196109031986022001

**LAMPIRAN 2. Klasifikasi Matriks Metalloproteinase (MMP)**

Enzyme (Alternative names)	MMP	Chromosomal location ( <i>human</i> )	Stromal cell expression	Biological activities	Diseases associated
<i>Collagenases</i>					
Interstitial collagenase; Collagenase 1	MMP-1	11q22-q23	Macrophages, fibroblast, dendritic cells	Collagen catabolic process, ECM disassembly, etc.	Autosomal recessive dystrophic epidermolysis bullosa, severe generalized recessive dystrophic epidermolysis bullosa
Neutrophil collagenase; Collagenase 2	MMP-8	11q21-q22	Neutrophils	Collagen catabolic process, endodermal cell differentiation , etc.	Gingivitis and gum cancer.
Collagenase 3	MMP- 13	11q22.3	Fibroblast	ECM disassembly, bone mineralization and morphogenesis, etc.	Spondyloepim etaphyseal dysplasia, Missouri type, and metaphyseal anadysplasia.
Collagenase 4	MMP- 18	Not found in human	-	Collagen catabolic process	-
<i>Gelatinases</i>					
Gelatinase A	MMP-2	16q13	Macrophages, mast cells, endothelial cells, fibroblast, dendritic cells,	Embryo implantation, endodermal cell differentiation , ephrin receptor	Torg Winchester syndrome, multicentric osteolysis of torg.



			HPCs	signaling pathway, ECM disassembly, etc.,	
Gelatinase B	MMP-9	20q11.2-q13.1	Neutrophils, macrophages, lymphocytes, mast cells, fibroblast, dendritic cells, HPCs	ECM disassembly, ECM organization, leukocyte migration, macrophage differentiation, etc.	Metaphyseal anadysplasia 2, Intervertebral disc disease

***Stromelysins***

Stromelysin 1	MMP-3	11q23	Lymphocyte endothelial cells, fibroblast, dendritic cells	Cellular response to nitric oxide, collagen catabolic process, ECM disassembly, etc.,	Coronary heart disease 6
Stromelysin 2	MMP-10	11q22.3-q23	-	ECM disassembly, ECM organization, proteolysis, regulation of cell migration, etc.,	Middle cerebral artery infarction, epidermolysis bullosa dystrophica.

***Matrilysins***

Matrilysin 1	MMP-7	11q21-q22	Macrophages, endothelial cells	Aging, cellular response to mechanical stimulus, collagen catabolic process, etc.,	Light chain deposition disease, brain glioblastoma multiforme.
--------------	-------	-----------	--------------------------------	--	--

Matrilysin 2 Endometase	MMP- 26	11p15	-	Collagen catabolic process, negative regulation of inflammatory response, proteolysis, etc.,	Endometrial cancer
Endometrial cancer	MMP- 11	22q11.2	Fibroblast	Basement membrane organization, collagen catabolic process, collagen fibril organization	Aleutian mink disease, ophthalmomyi asis
MT1-MMP	MMP- 14	14q11-q12	Macrophages, endothelial cells, fibroblast, HPCs	Angiogenesis, astrocyte cell migration, ECM disassembly, etc.	Winchester syndrome (WNCHRS)
MT2-MMP	MMP- 15	15q13-q21	-	Cellular protein modification process, collagen catabolic process, endodermal cell differentiation , etc.	Arthritis, metastasis, etc.
MT3-MMP	MMP- 16	8q21	-	Chondrocyte proliferation, collagen catabolic process, craniofacial	Osteochondro sis, seminoma

				suture morphogenesis, etc.	
MT5-MMP	MMP-24	20q11.2	-	Cell-cell adhesion, cell-cell adhesion mediated by cadherin, proteolysis, etc.	-
MT4-MMP	MMP-17	12q24.3	-	Positive regulation of catalytic activity, etc.,	-
MT6-MMP	MMP-25	16p13.3	-	Positive regulation of catalytic activity, etc.,	-
Macrophage elastase	MMP-12	11q22.2-q22.3	Macrophages	ECM disassembly, ECM organization, positive regulation of epithelial cell proliferation involved in wound healing, etc.	Mid-dermal elastolysis, pulmonary emphysema.
-	MMP-19 RASI-1	12q14	Endothelial cells, fibroblast, dendritic cells	Angiogenesis, cell differentiation, collagen catabolic process, etc.	Cavitary optic disc anomalies, anthracosis
Enamelysin	MMP-20	11q22.3	-	Amelogenesis, collagen catabolic process, ECM disassembly,	Amelogenesis imperfecta, hypomaturation type, 2A2


				etc.	
XMMP ( <i>Xenopus</i> )	MMP- 21	-	-	Coronary vasculature development, determination of left/right symmetry, HPC differentiation , etc.,	-
CA-MMP	MMP- 23	1p36.3	-	Proteolysis, reproduction, etc.,	-
CMMP ( <i>Gallus</i> )	MMP- 27	11q24	-	Collagen catabolic process, etc.,	-
Epilysin	MMP- 28	17q21.1	-	Negative regulation of macrophage chemotaxis	-

**Tabel 1:** MMP: Nama dan lokasi kromosom pada manusia, aktivitas biologi dan penyakit yang berhubungan dengan beberapa MMP yang telah tersebut (Khalid and Muhammad, 2016).

## LAMPIRAN 3. Data Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13)

SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

## MMP-13 (MM0019-12E10): sc-101564



The Power to Heal™

---

**BACKGROUND**

The matrix metalloproteinases (MMP) are a family of peptidase enzymes responsible for the degradation of extracellular matrix components, including collagen, gelatin, Fibronectin, Laminin and proteoglycan. Transcription of MMP genes is differentially activated by phorbol ester, lipopolysaccharide (LPS) or staphylococcal enterotoxin B (SEB). MMP catalysis requires both calcium and zinc. MMP-13 (also designated collagenase-3) is produced by breast carcinomas and degrades collagen types I, II and III. MMP-13 has wide substrate specificity, and its physiologic expression is limited to situations in which rapid and effective remodeling of collagenous ECM takes place, such as fetal bone development and adult bone remodeling.

**REFERENCES**

- Birkedal-Hansen, H., et al. 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4: 197-250.
- Riancho, P., et al. 1994. Structural implications for the role of the N-terminus in the "superactivation" of collagenases. A crystallographic study. *FEBS Lett.* 338: 227-233.
- Franje, J.M., et al. 1994. Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem.* 269: 16766-16773.
- Machin, U. and Cosca, W. 1997. Expression of several matrix metalloproteinase genes in human monocyte cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 421: 247-251.
- Johansson, N., et al. 1997. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, perosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev. Dyn.* 208: 387-397.
- Stahle-Backdahl, M., et al. 1997. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in rheumatoid arthritis. *Lab. Invest.* 76: 717-728.

**CHROMOSOMAL LOCATION**

Genetic locus: MMP13 (human) mapping to 11q22.2.

**SOURCE**

MMP-13 (MM0019-12E10) is a mouse monoclonal antibody raised against recombinant MMP-13 of human origin.

**PRODUCT**

Each vial contains 100 µg IgG<sub>1</sub> in 1.0 ml PBS with < 0.1% sodium azide and 0.1% gelatin.

**STORAGE**

Store at 4° C. **\*\*DO NOT FREEZE\*\***. Stable for one year from the date of shipment. Non-hazardous. No MSDS required.

**RESEARCH USE**

For research use only. not for use in diagnostic procedures.

**APPLICATIONS**

MMP-13 (MM0019-12E10) is recommended for detection of MMP-13 of human origin by Western blotting (starting dilution 1:200, dilution range 1:100-1:1000), immunofluorescence (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500) and immunohistochemistry (including paraffin-embedded sections) (starting dilution 1:50, dilution range 1:50-1:500); non cross-reactive with other MMPs.

Suitable for use as control antibody for MMP-13 siRNA (h): sc-41568, MMP-13 shRNA Plasmid (h): sc-41568-SH and MMP-13 shRNA (h) Lentiviral Particles: sc-41568-V.

Molecular Weight of MMP-13: 48 kDa.

Positive Controls: SCC-4 whole cell lysate: sc-364363.

**SELECT PRODUCT CITATIONS**

- Ciarra, M.E., et al. 2013. Expression of CXCR4, MMP-13 and  $\beta$ -catenin in different histological subtypes of facial basal cell carcinoma. *Rev. J. Morphol. Embryol.* 54: 939-951.
- Vatjoka-Rogovic, I., et al. 2014. Matrix metalloproteinases and E-cadherin immunoreactivity in different basal cell carcinoma histological types. *Acta Histochem.* 116: 688-693.
- Rai, V., et al. 2016. Vitamin D attenuates inflammation, fatty infiltration, and cartilage loss in the knee of hyperlipidemic mice. *Arthritis Res Ther.* 18: 203.
- Chung, S.W., et al. 2016. Altered gene and protein expressions in torn rotator cuff tendon tissues in diabetic patients. *Arthroscopy*. E-published.

**PROTOCOLS**

See our web site at [www.scbt.com](http://www.scbt.com) for detailed protocols and support products.

**CONJUGATES**

See **MMP-13 (C-3): sc-515284** for MMP-13 antibody conjugates, including AC, HRP, FITC, PE, Alexa Fluor® 488 and Alexa Fluor® 647.

---

Santa Cruz Biotechnology, Inc. | 1-800-451-2001 | 858-452-2800 | fax 858-452-2801 | Europe | +35388 4573 8000 | 40 5221 4003 0 | [www.scbt.com](http://www.scbt.com)



**LAMPIRAN 4. Rerata Hasil Ekspresi Matriks Metalloproteinase-13 (MMP-13) pada Kelompok Kontrol Negatif dan Perlakuan (%)**

Kelompok Kontrol Negatif Hari ke-7	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	100	100	100	100
2	100	100	100	100
3	92,6	100	100	97,53
4	62,7	58,2	46,5	55,80
Rerata jumlah ekspresi MMP-13				88,33
Kelompok Kontrol Negatif Hari ke-14	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	98,4	99,3	100	99,23
2	98,9	59,6	94,6	84,37
3	100	100	91,3	97,10
4	52,7	59,5	40,4	50,87
Rerata jumlah ekspresi MMP-13				82,89
Kelompok Perlakuan Hari ke-7	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	94,2	100	100	98,07
2	45,3	43,5	51	46,60
3	100	99,3	100	99,77
4	100	100	100	100
Rerata jumlah ekspresi MMP-13				86,10
Kelompok Perlakuan Hari ke-14	Lapang pandang 1	Lapang pandang 2	Lapang pandang 3	Rata-rata
1	100	99,5	100	99,83
2	75,7	45,6	50,7	57,33
3	78,9	78,1	84,2	80,40
4	83,6	82,4	93,1	86,37
Rerata jumlah ekspresi MMP-13				80,98

**LAMPIRAN 5. Uji Analisis Data**

**5.1 Uji Normalitas *Kolmogorov-Smirnov***

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		Unstandardized Residual
N		16
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	.0000000
	Std. Deviation	19.99527725
Most Extreme Differences	Absolute	.256
	Positive	.183
	Negative	-.256
Kolmogorov-Smirnov Z		1.025
Asymp. Sig. (2-tailed)		.244

a. Test distribution is Normal.

**5.2 Uji Homogenitas *Levene***

**Test of Homogeneity of Variances**

hari ke-7

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.166	1	6	.698

**Test of Homogeneity of Variances**

hari ke-14

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.220	1	6	.656

**5.3 Uji Parametri *One-Way Anova***

**ANOVA**

hari ke-7

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.879	1	9.879	.017	.901
Within Groups	3498.828	6	583.138		
Total	3508.707	7			

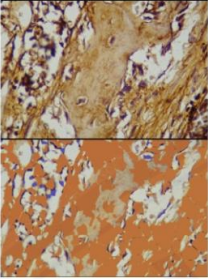
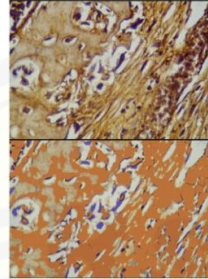
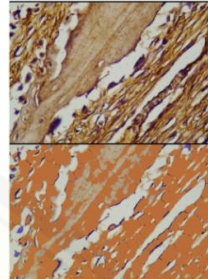
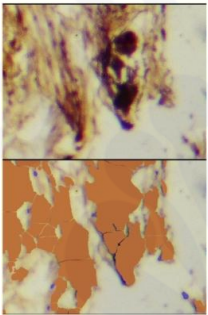
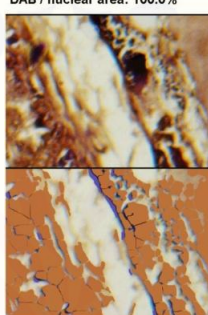
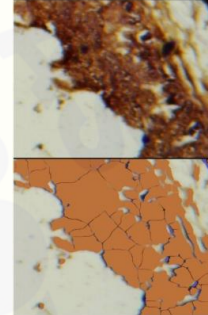
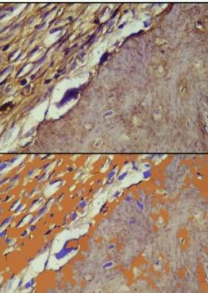
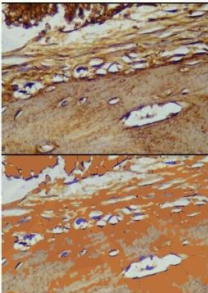
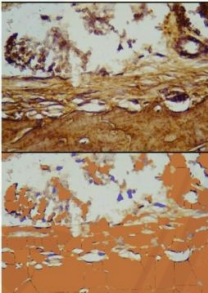
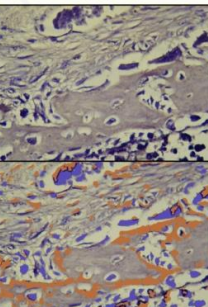
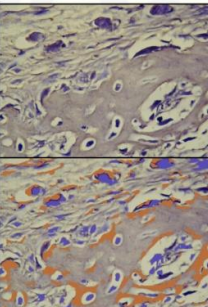
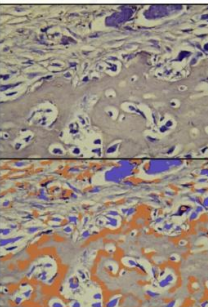
**ANOVA**

hari ke-14

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.296	1	7.296	.018	.898
Within Groups	2440.424	6	406.737		
Total	2447.720	7			

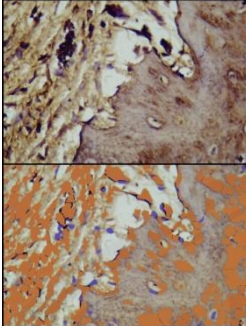
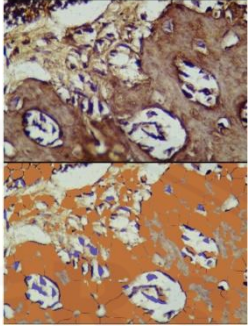
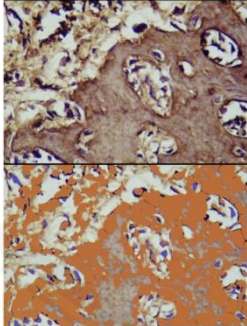
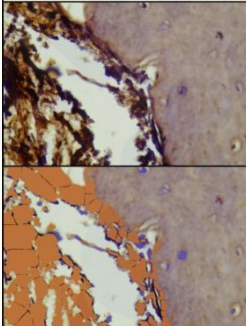
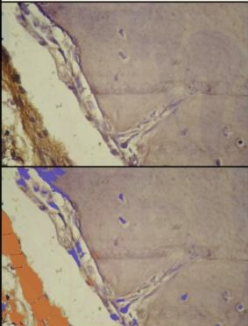
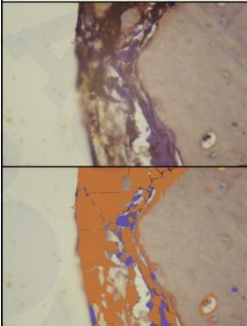
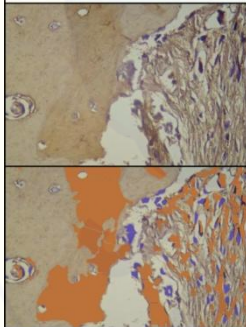
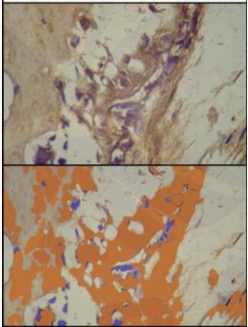
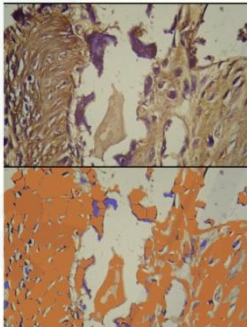
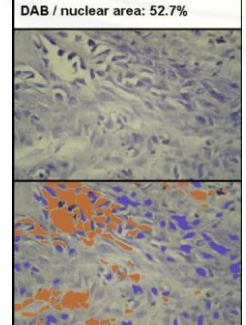
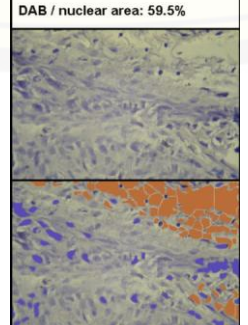
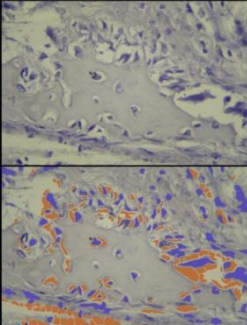
**LAMPIRAN 6. Gambar Hasil *Immuno Ratio Score (IRS)***

**6.1 Gambar Hasil IRS Kontrol Negatif Hari ke-7**

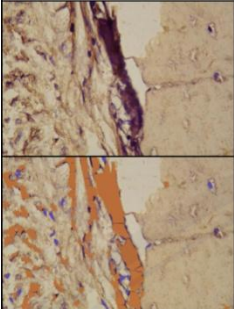
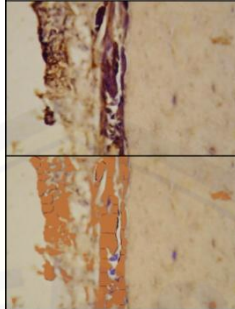
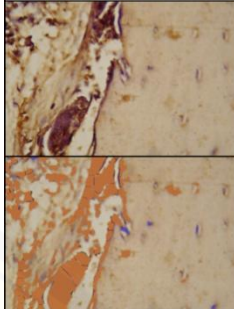
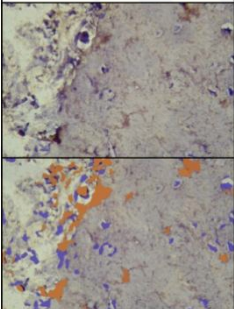
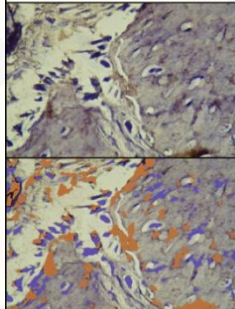
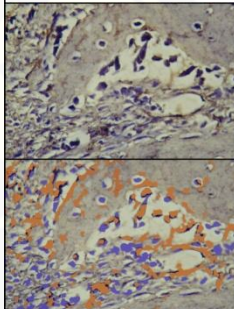
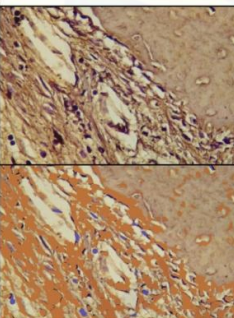
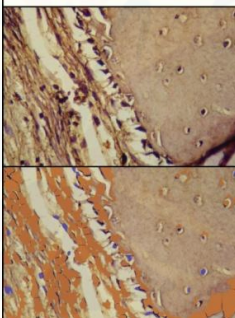
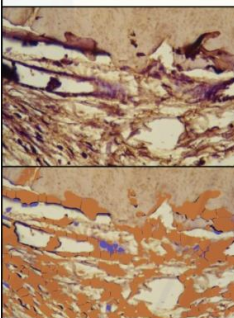
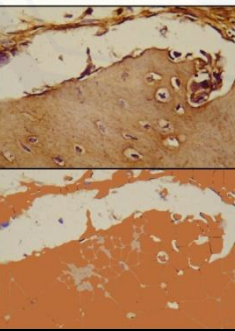
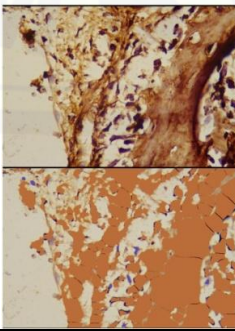
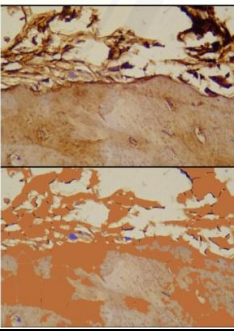
<p>1.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0377 Date: 7.2.2018 05:43 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0379 Date: 7.2.2018 05:44 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0383 Date: 7.2.2018 05:47 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 
<p>2.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: 400x_1 Date: 25.3.2018 14:02 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: 400x_4 Date: 25.3.2018 14:12 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: 400x_5 Date: 25.3.2018 14:13 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 
<p>3.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0235 Date: 7.2.2018 07:00 DAB / nuclear area: 92.6%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0236 Date: 7.2.2018 06:07 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0238 Date: 7.2.2018 06:08 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 
<p>4.</p>	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0313 Date: 7.2.2018 06:25 DAB / nuclear area: 46.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0317 Date: 7.2.2018 06:28 DAB / nuclear area: 58.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0319 Date: 7.2.2018 06:29 DAB / nuclear area: 62.7%</p> 



6.2 Gambar Hasil IRS Kontrol Positif Hari 14

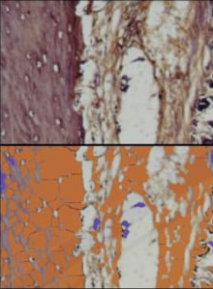
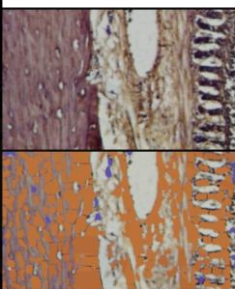
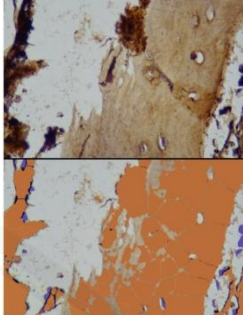
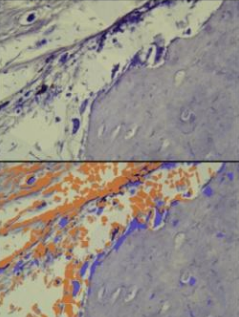
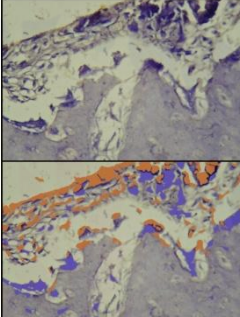
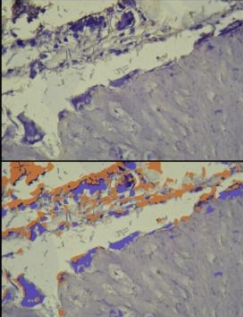
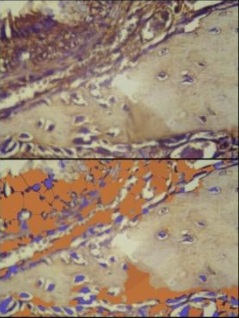
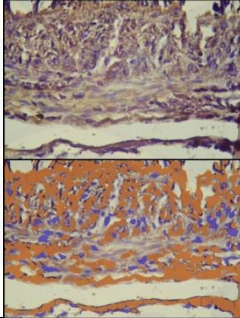
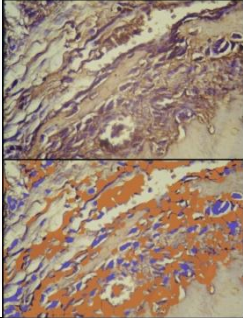
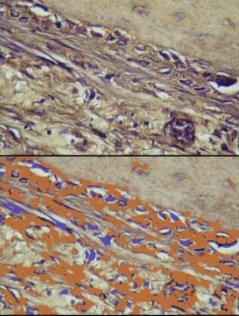
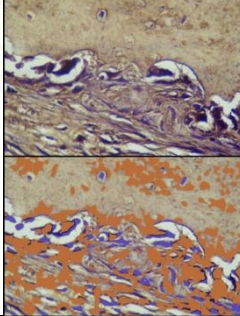
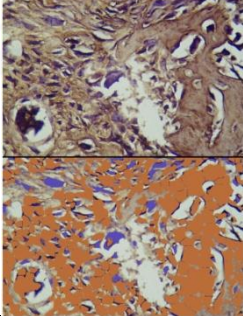
1.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0497 Date: 7.2.2018 17:36 DAB / nuclear area: 99.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0507 Date: 7.2.2018 17:40 DAB / nuclear area: 98.4%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0509 Date: 7.2.2018 17:41 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 
2.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0573 Date: 7.2.2018 17:43 DAB / nuclear area: 98.9%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC2998 Date: 10.2.2018 05:54 DAB / nuclear area: 59.6%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC2999 Date: 10.2.2018 05:57 DAB / nuclear area: 94.6%</p> 
3.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC3020 Date: 10.2.2018 06:07 DAB / nuclear area: 91.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC3022 Date: 10.2.2018 06:08 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC3024 Date: 10.2.2018 06:09 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 
4.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC6455 Date: 3.4.2018 00:42 DAB / nuclear area: 52.7%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC6457 Date: 3.4.2018 00:44 DAB / nuclear area: 59.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC6462 Date: 7.3.2018 14:31 DAB / nuclear area: 40.4%</p> 

6.3 Gambar Hasil IRS Perlakuan Hari ke-7

1.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1032 Date: 8.2.2018 01:03 DAB / nuclear area: 94.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1036 Date: 8.2.2018 01:04 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1038 Date: 8.2.2018 01:05 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 
2.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0896 Date: 8.2.2018 00:58 DAB / nuclear area: 45.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0898 Date: 8.2.2018 00:59 DAB / nuclear area: 43.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0904 Date: 8.2.2018 01:01 DAB / nuclear area: 51.0%</p> 
3.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0961 Date: 8.2.2018 00:39 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0965 Date: 8.2.2018 00:42 DAB / nuclear area: 99.3%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0969 Date: 8.2.2018 00:43 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 
4.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1119 Date: 8.2.2018 00:36 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1115 Date: 8.2.2018 00:34 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC1117 Date: 8.2.2018 00:35 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 

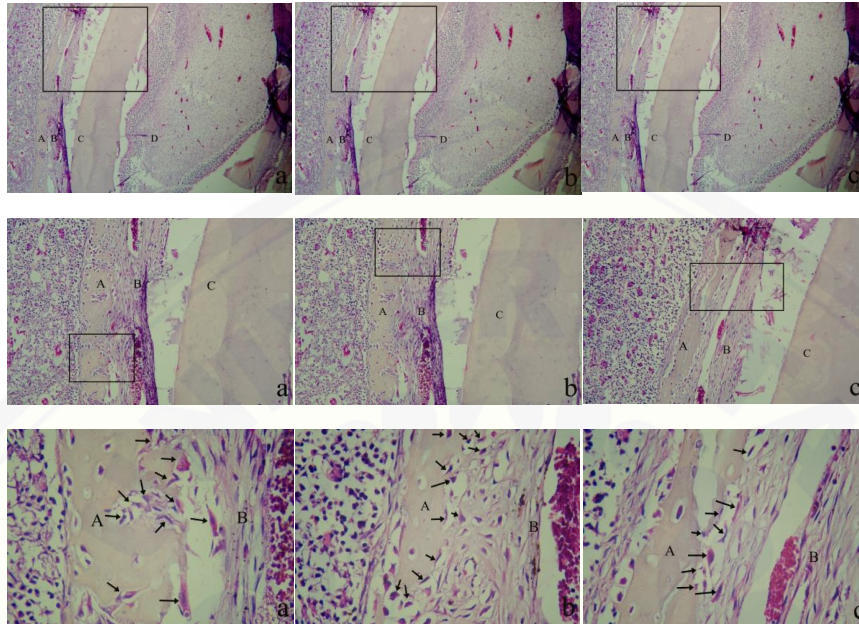


6.4 Gambar Hasil IRS Perlakuan Hari ke-14

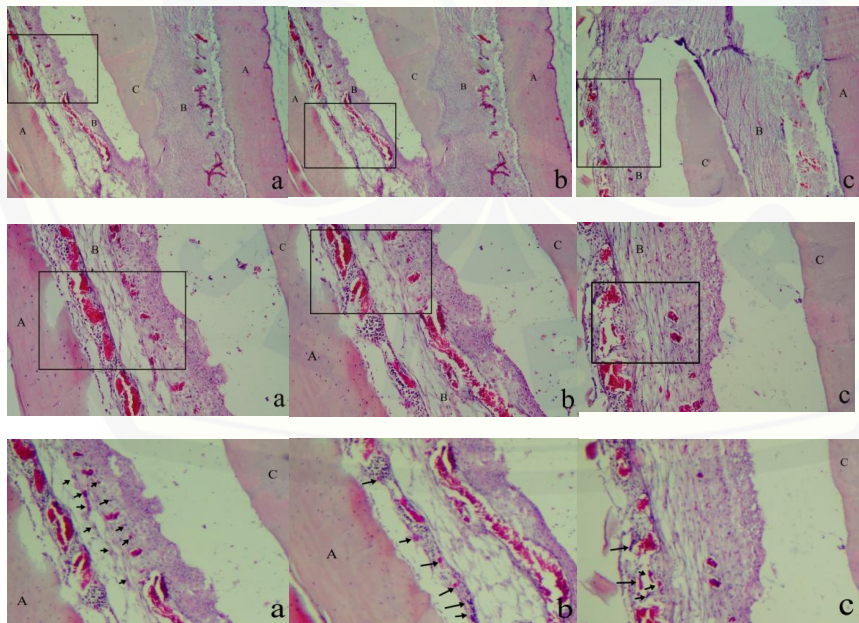
1.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0731_1 Date: 2.4.2018 23:07 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0731 Date: 2.4.2018 23:06 DAB / nuclear area: 99.5%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0761 Date: 7.2.2018 18:12 DAB / nuclear area: 100.0%</p> 
2.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0808 Date: 7.2.2018 18:20 DAB / nuclear area: 75.7%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0820 Date: 7.2.2018 18:28 DAB / nuclear area: 45.6%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0818 Date: 7.2.2018 18:27 DAB / nuclear area: 50.7%</p> 
3.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC2960 Date: 10.2.2018 06:17 DAB / nuclear area: 78.9%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC2964 Date: 10.2.2018 06:20 DAB / nuclear area: 84.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC2962 Date: 10.2.2018 06:19 DAB / nuclear area: 78.1%</p> 
4.	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0699 Date: 7.2.2018 18:48 DAB / nuclear area: 83.6%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0695 Date: 7.2.2018 18:47 DAB / nuclear area: 82.4%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: _DSC0693 Date: 7.2.2018 18:45 DAB / nuclear area: 93.1%</p> 

## LAMPIRAN 7. Gambar Hasil Hematoksilin Eosin (HE)

### 1. Kontrol Negatif Hari Ke-7

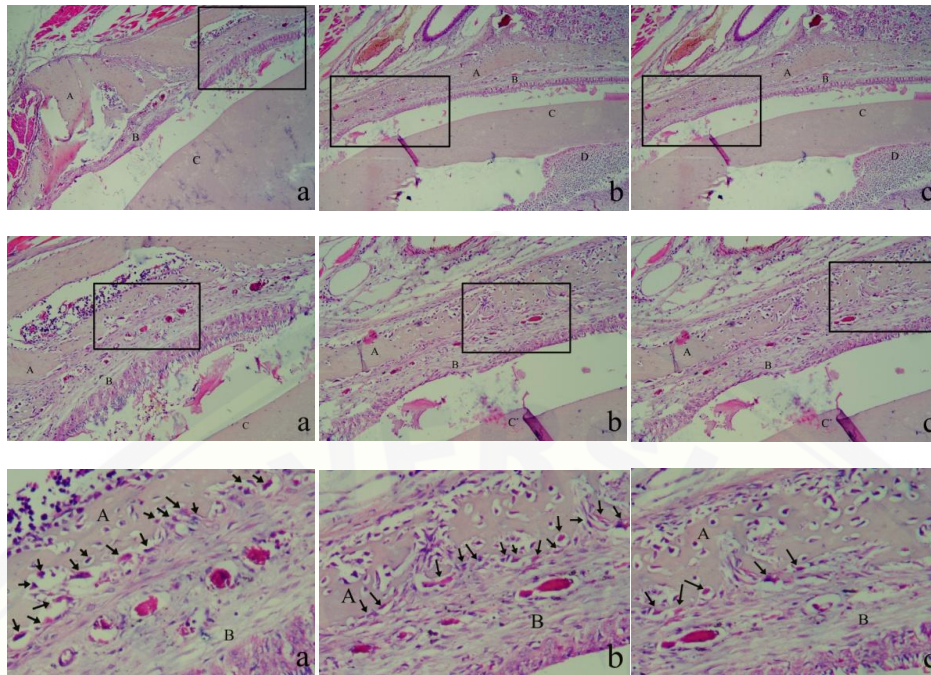


Gambar 7.1 Kontrol negatif tikus A dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), pulpa (D), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

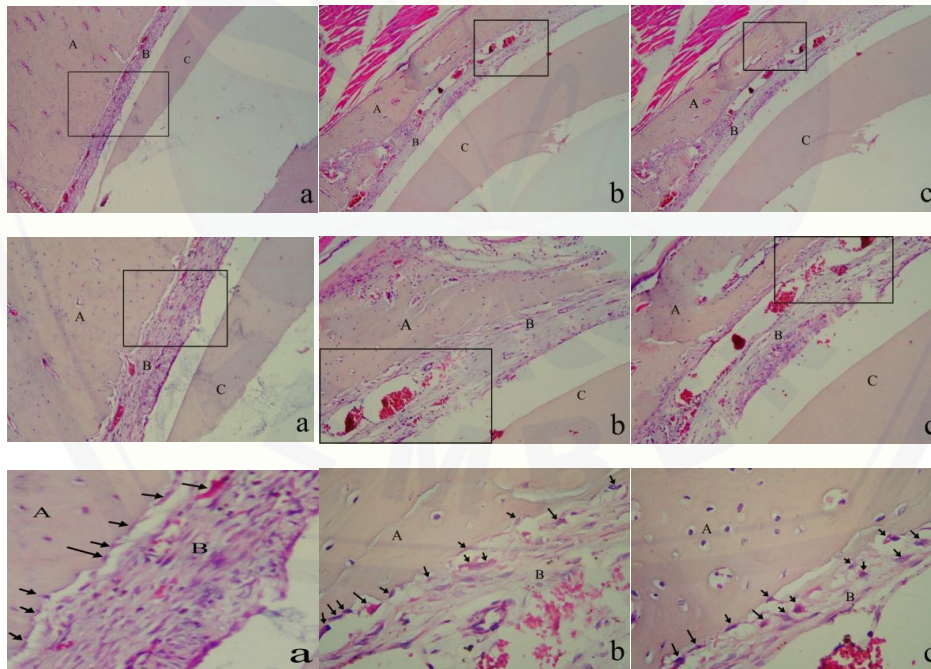


Gambar 7.2 Kontrol negatif tikus B dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



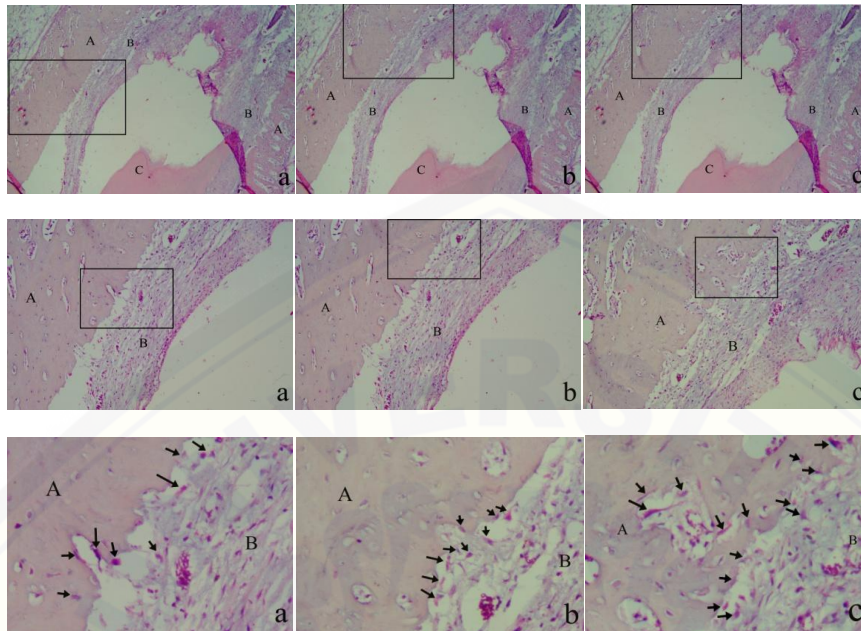


Gambar 7.3 Kontrol negatif tikus C dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), pulpa (D), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

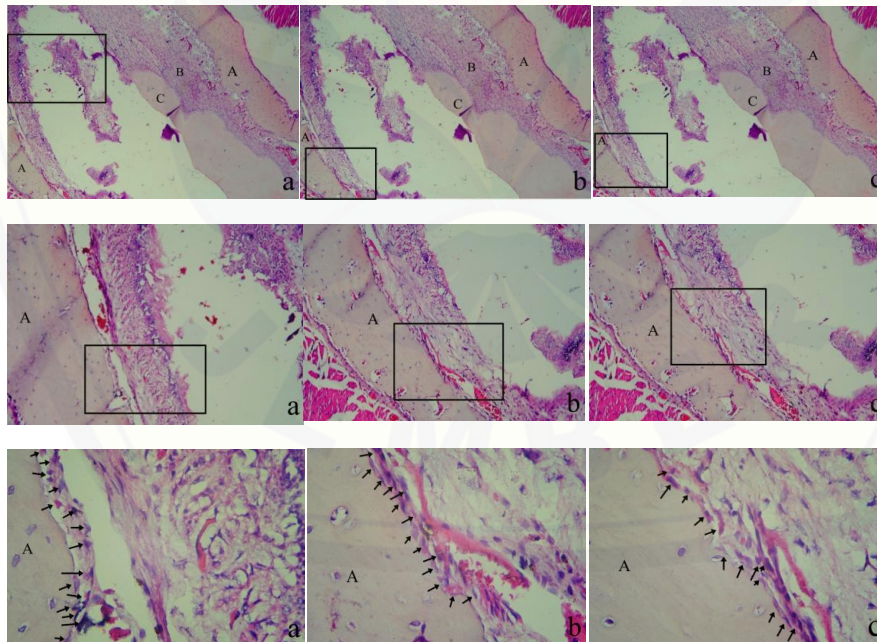


Gambar 7.4 Kontrol negatif tikus D dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

## 2. Kontrol Negatif Hari Ke-14

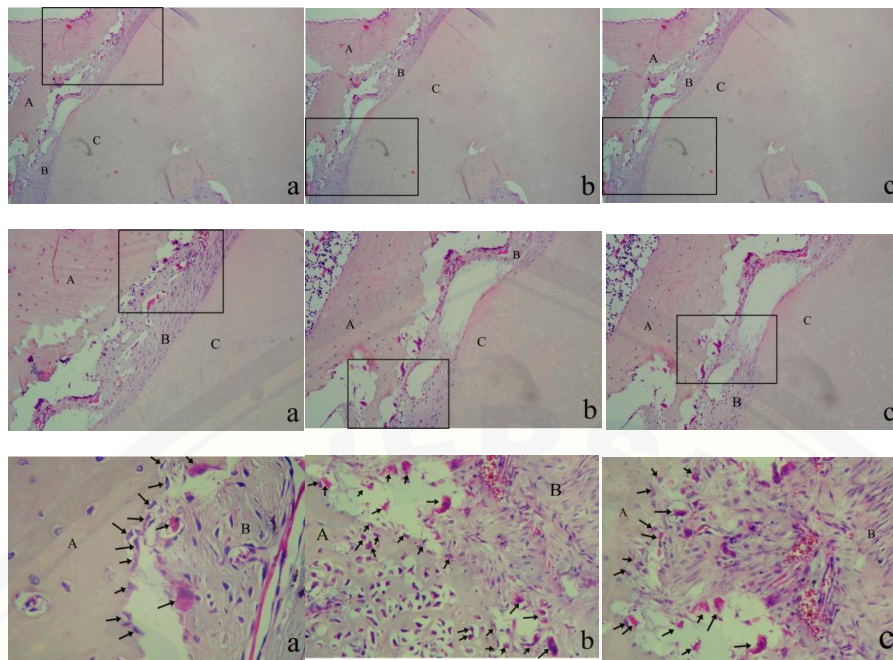


Gambar 7.5 Kontrol negatif tikus E dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

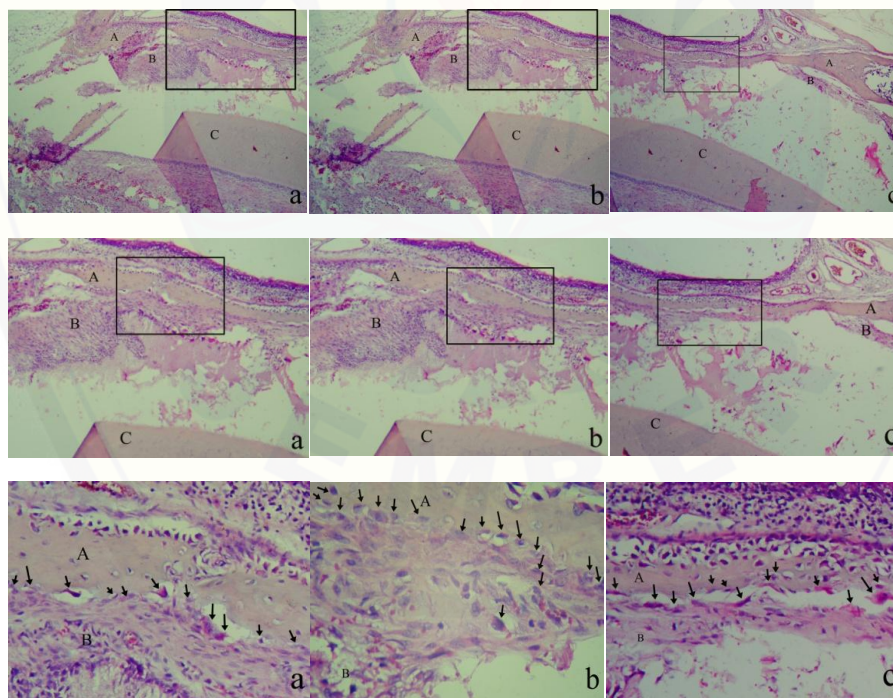


Gambar 7.6 Kontrol negatif tikus F dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.





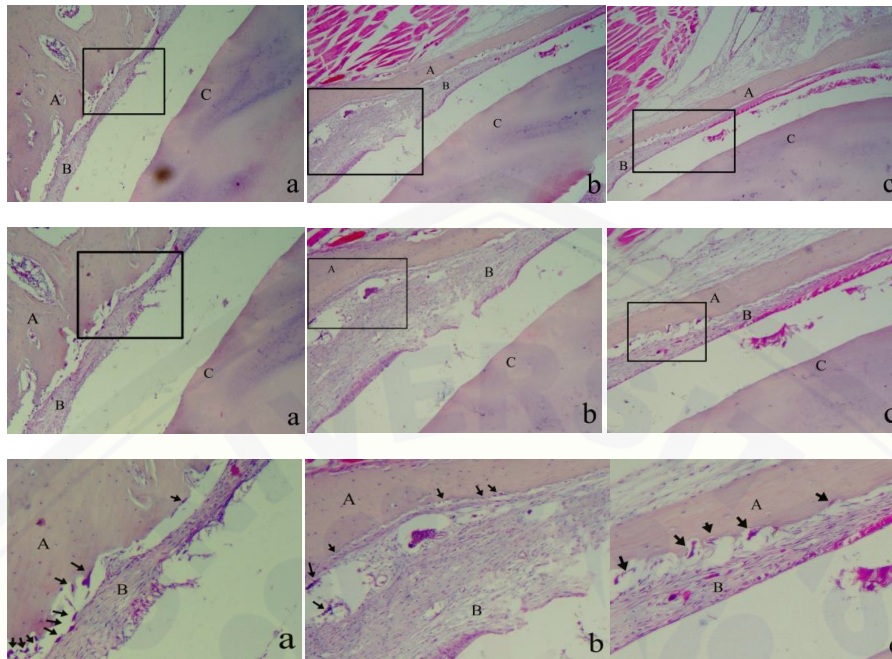
Gambar 7.7 Kontrol negatif tikus G dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



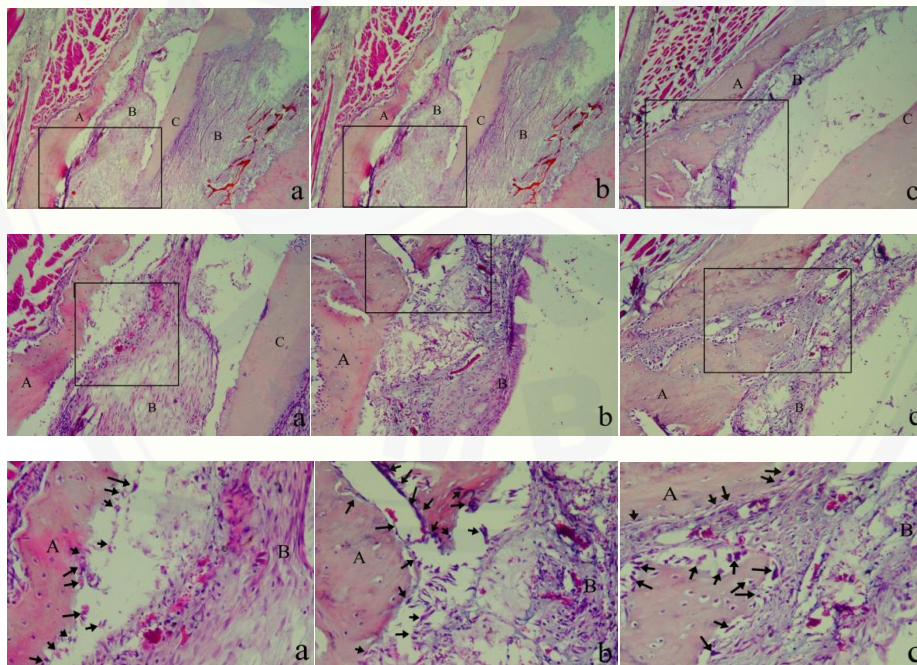
Gambar 7.8 Kontrol negatif tikus H dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



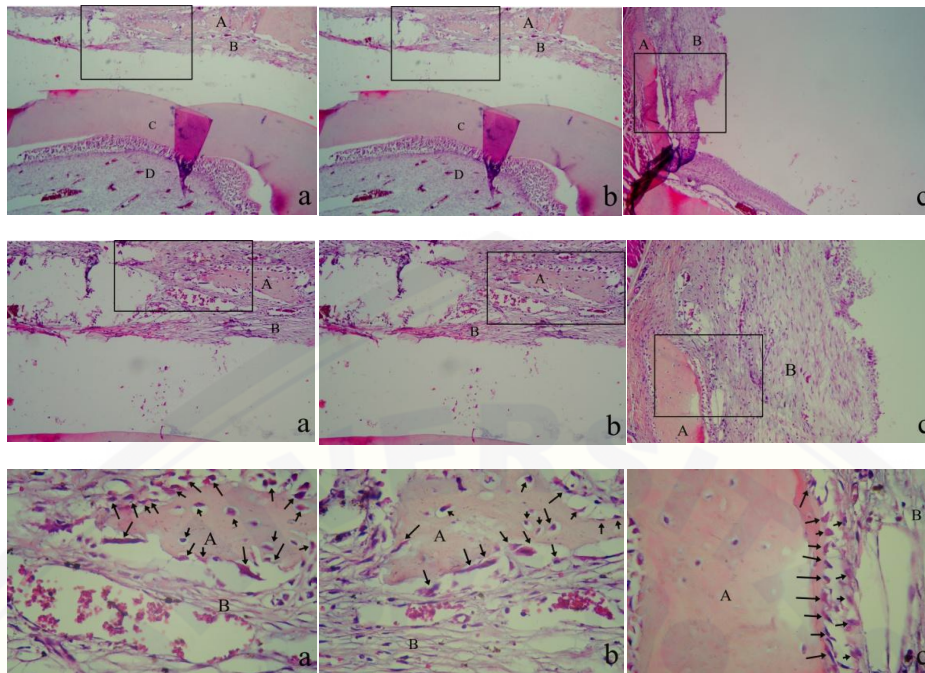
3. Perlakuan Hari Ke-7



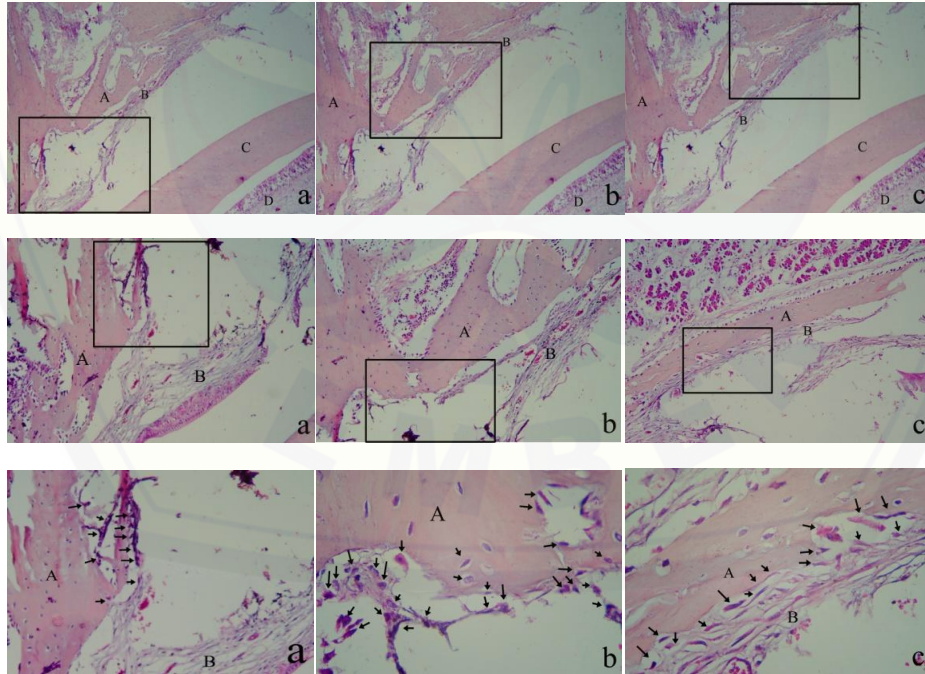
Gambar 7.9 Kontrol negatif tikus I dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



Gambar 7.10 Kontrol negatif tikus J dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



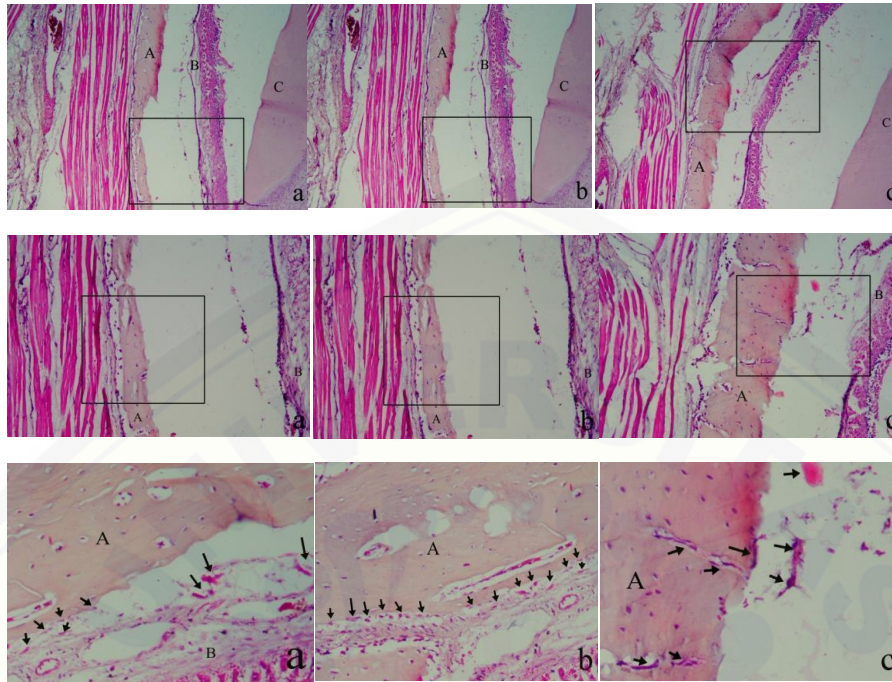
Gambar 7.11 Kontrol negatif tikus K dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



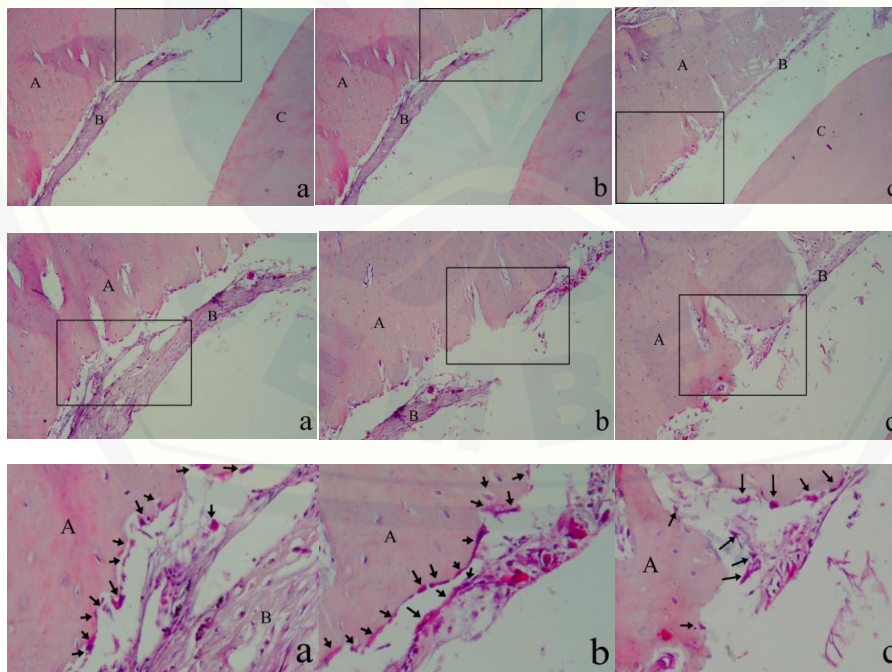
Gambar 7.12 Kontrol negatif tikus L dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



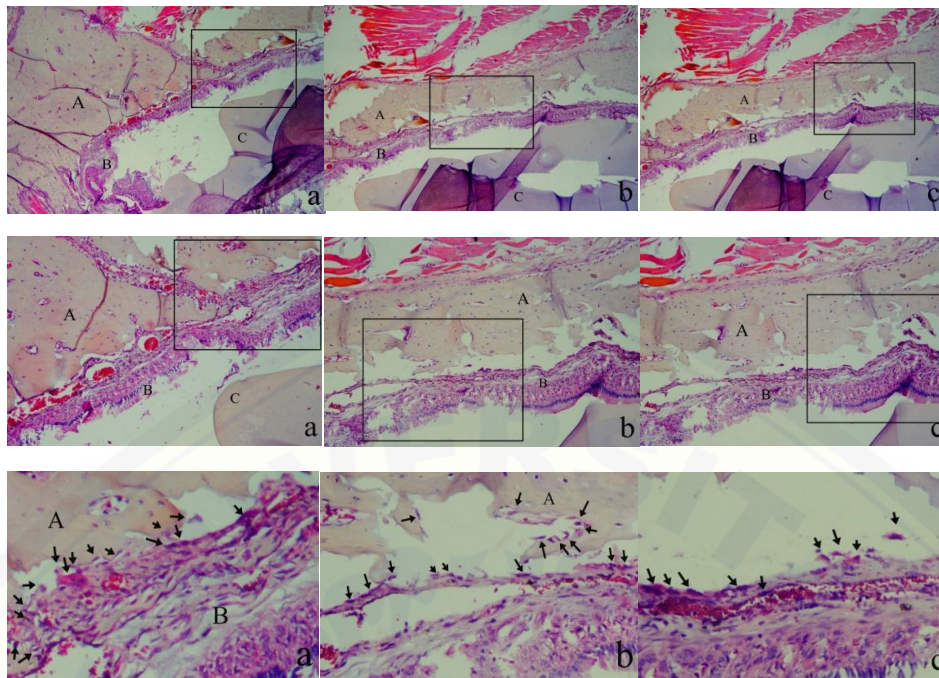
4. Perlakuan Hari Ke-14



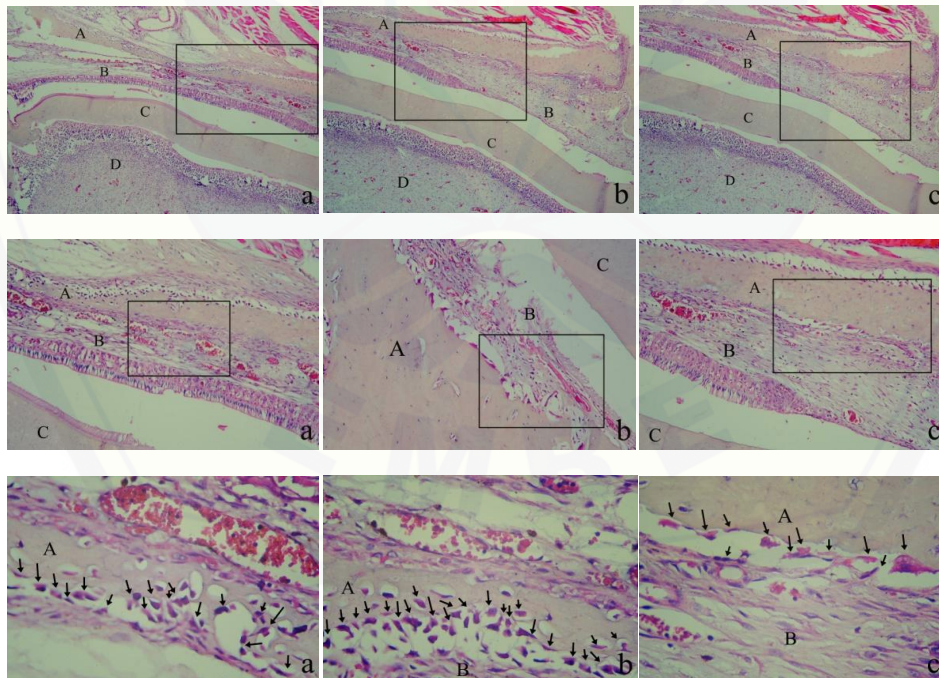
Gambar 7.13 Kontrol negatif tikus M dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



Gambar 7.14 Kontrol negatif tikus N dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



Gambar 7.15 Kontrol negatif tikus O dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

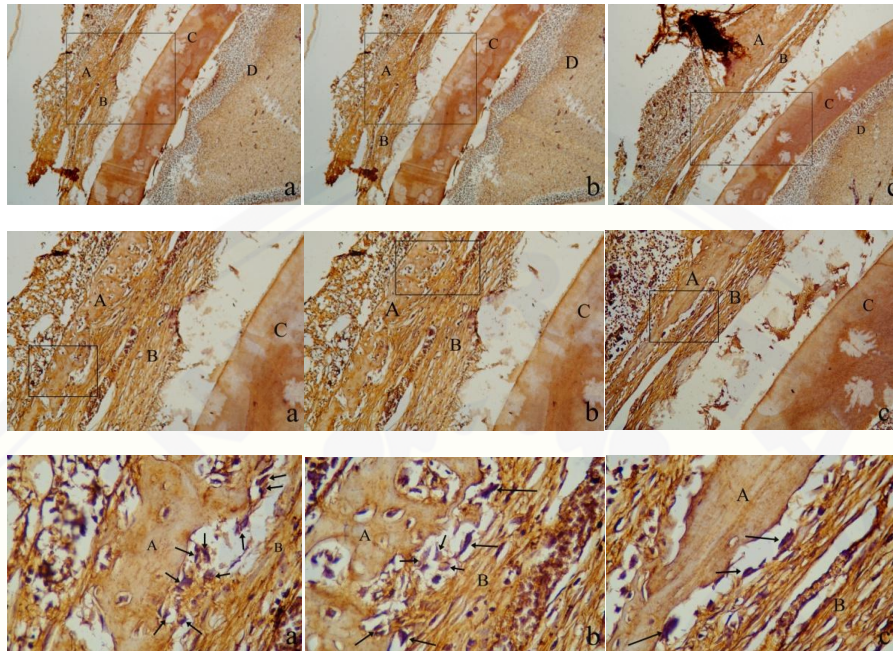


Gambar 7.16 Kontrol negatif tikus P dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), pulpa (D), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

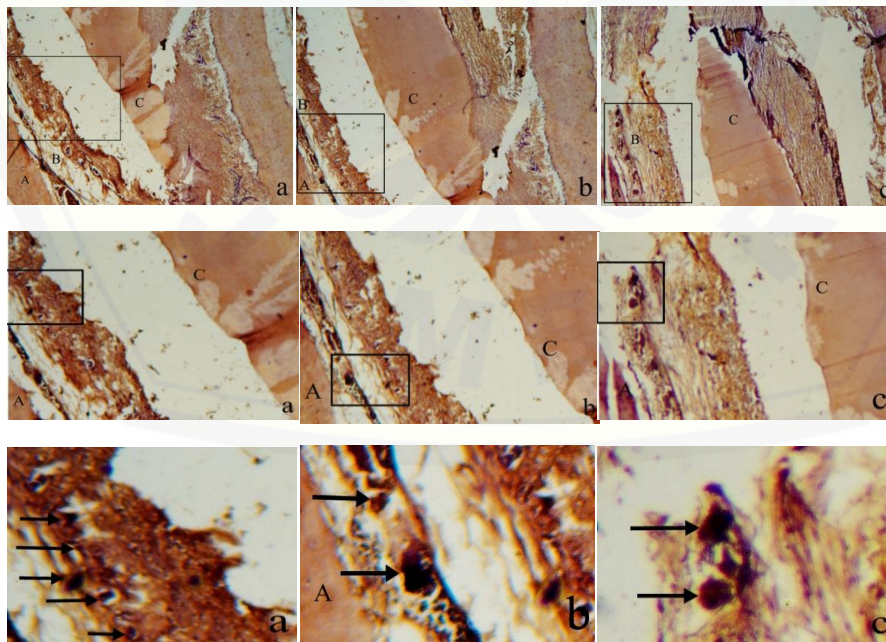


**LAMPIRAN 8. Gambar Hasil Imunohistokimia (IHC)**

**1. Kontrol Negatif Hari Ke-7**

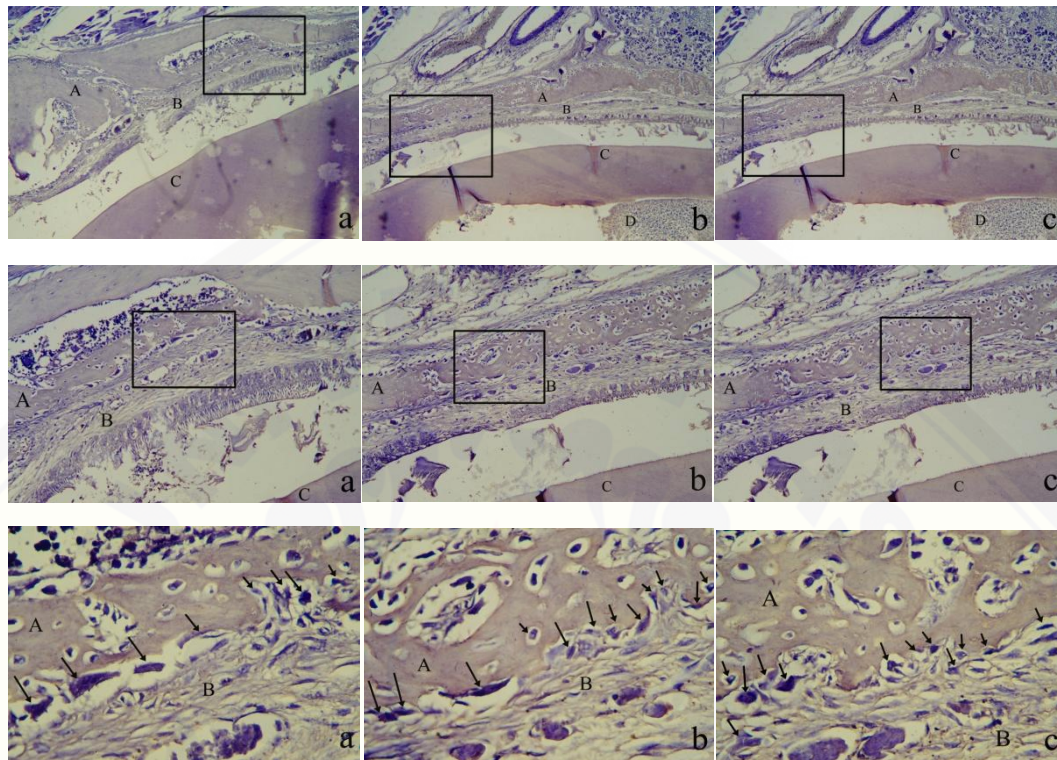


Gambar 8.1 Kelompok perlakuan tikus A dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), pulpa (D), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

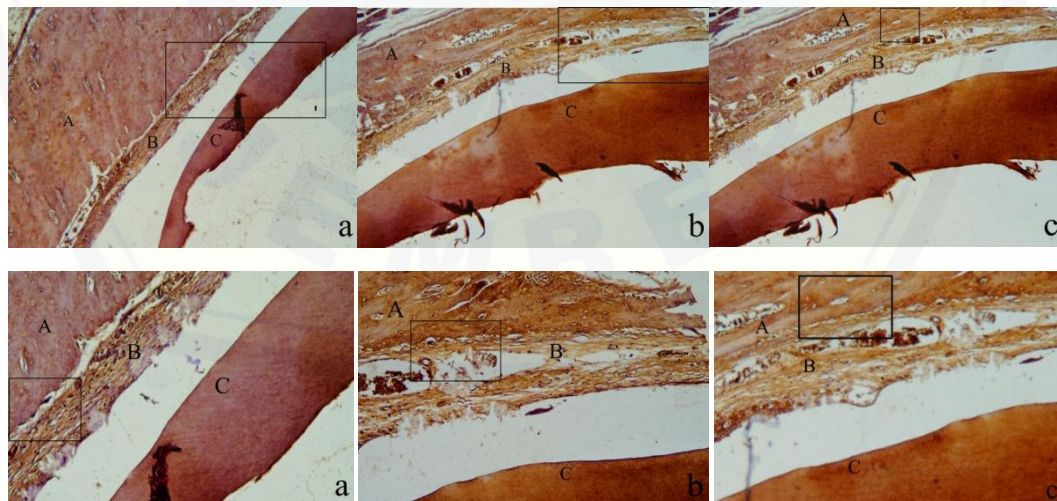




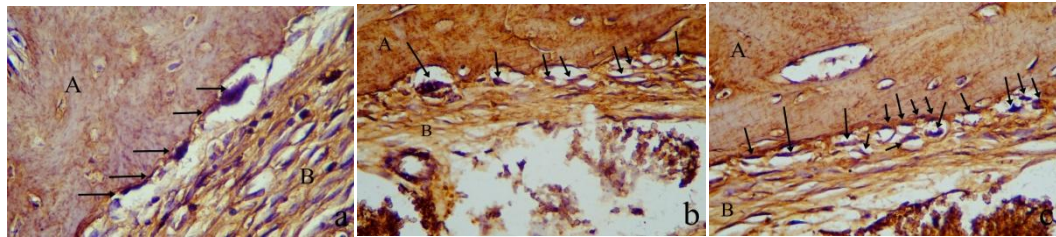
Gambar 8.2 Kelompok perlakuan tikus B dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



Gambar 8.3 Kelompok perlakuan tikus C dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

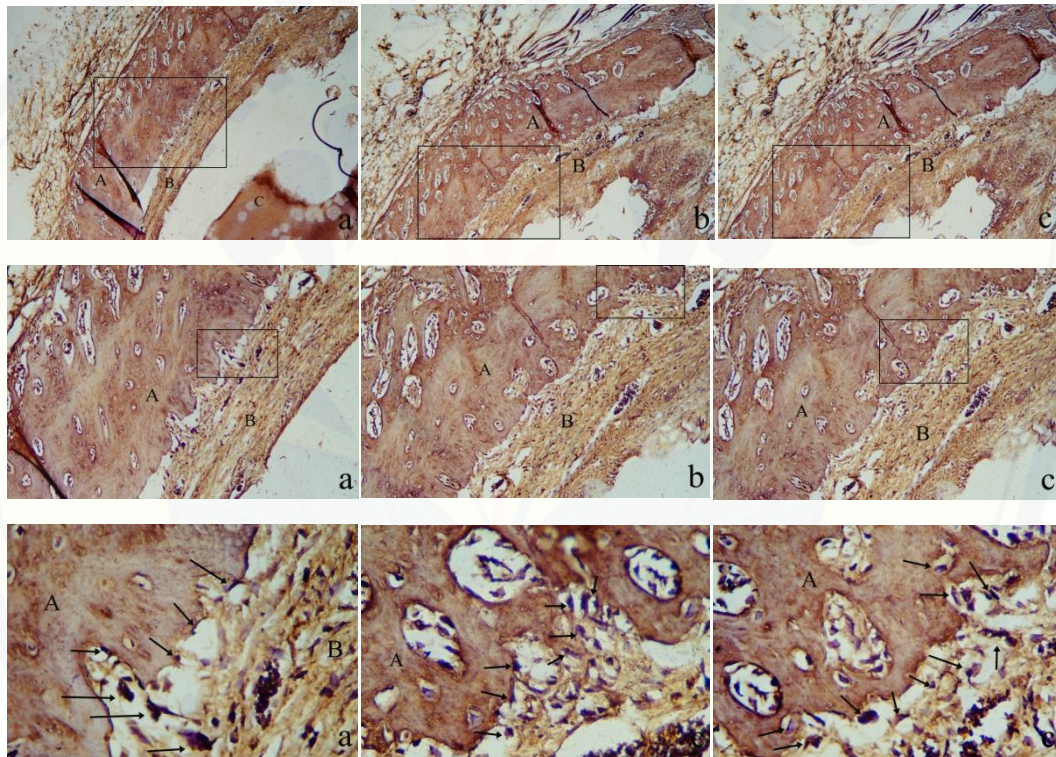




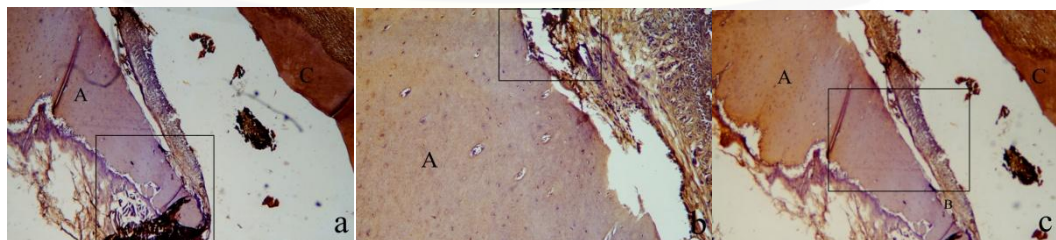


Gambar 8.4 Kelompok perlakuan tikus D dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

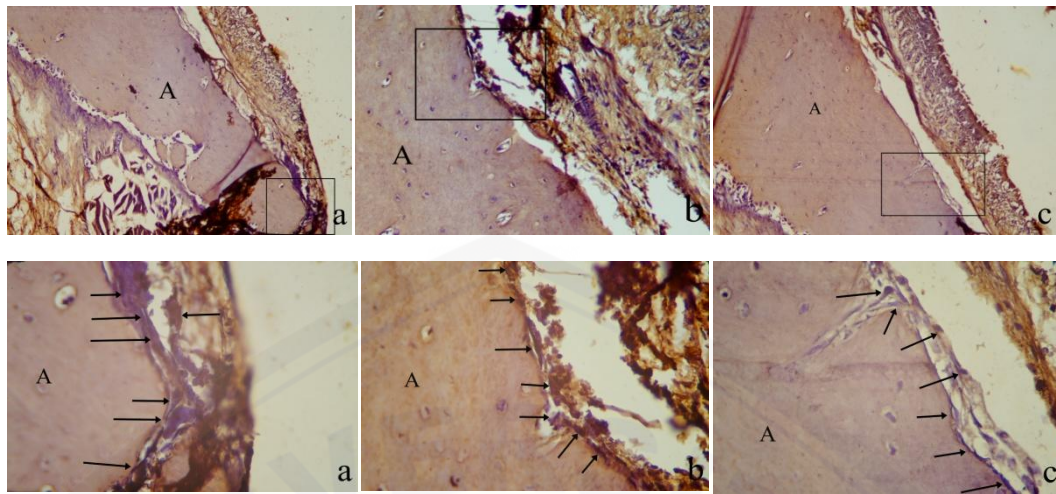
**2. Kontrol Positif Hari Ke-14**



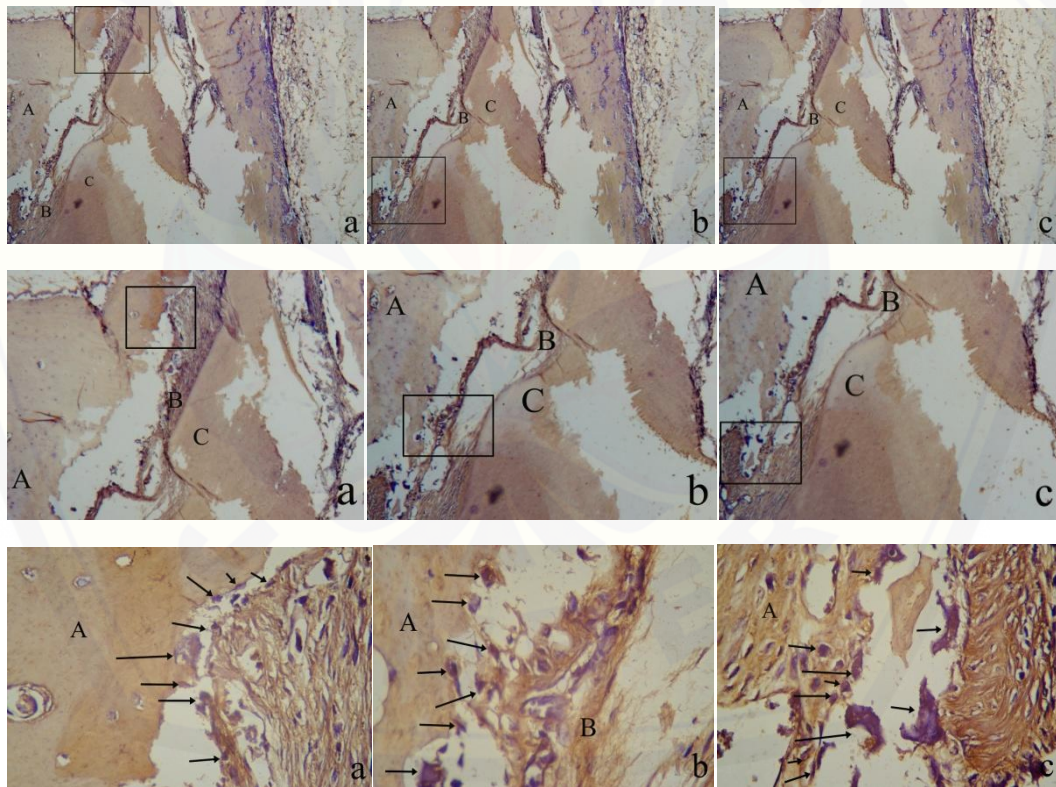
Gambar 8.5 Kelompok perlakuan tikus E dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.





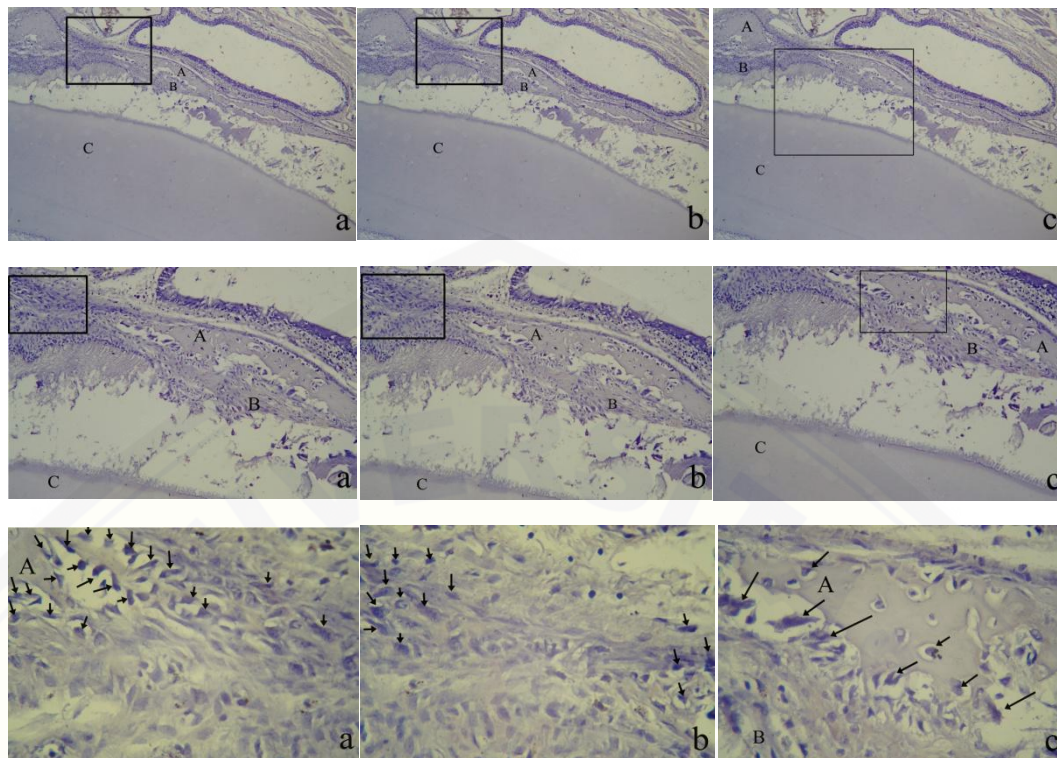


Gambar 8.6 Kelompok perlakuan tikus F dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



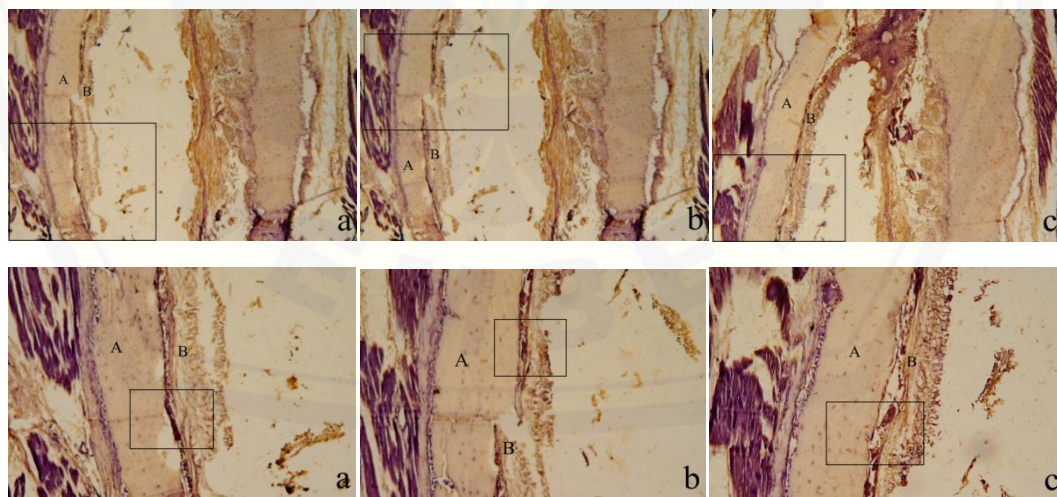
Gambar 8.7 Kelompok perlakuan tikus G dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



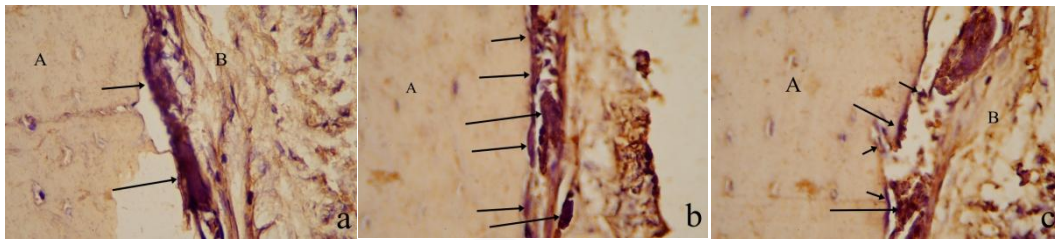


Gambar 8.8 Kelompok perlakuan tikus H dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.

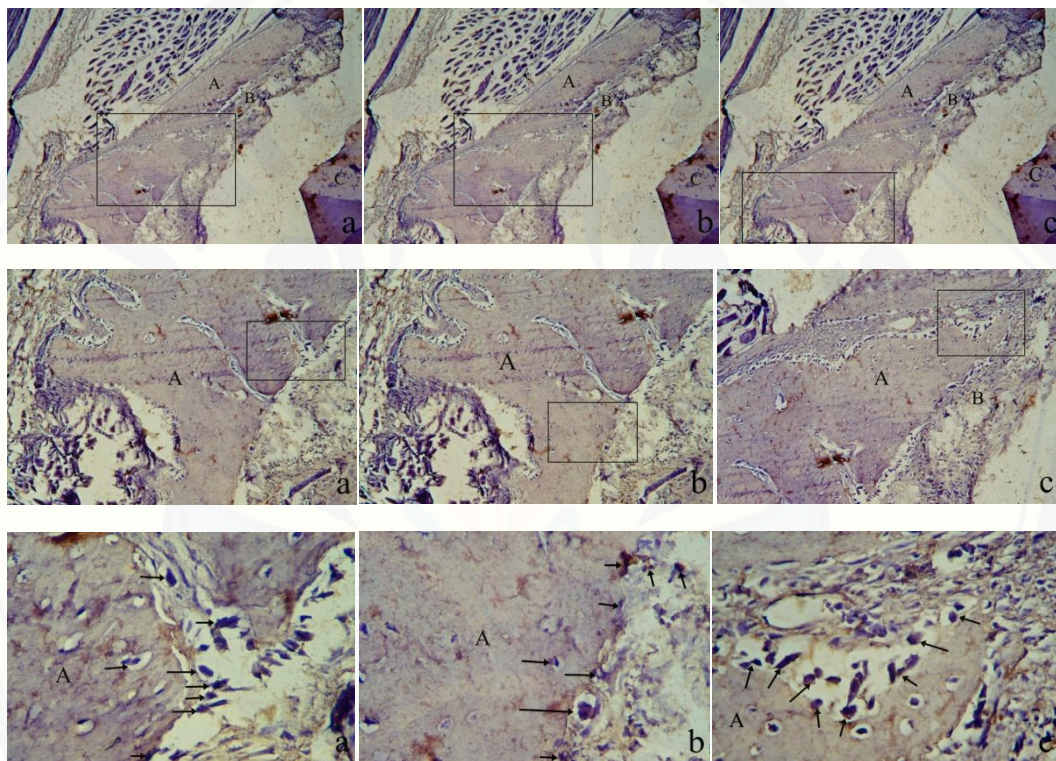
### 3. Perlakuan Hari Ke-7



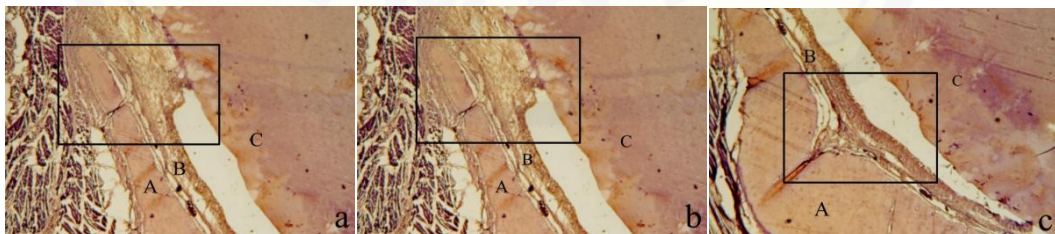




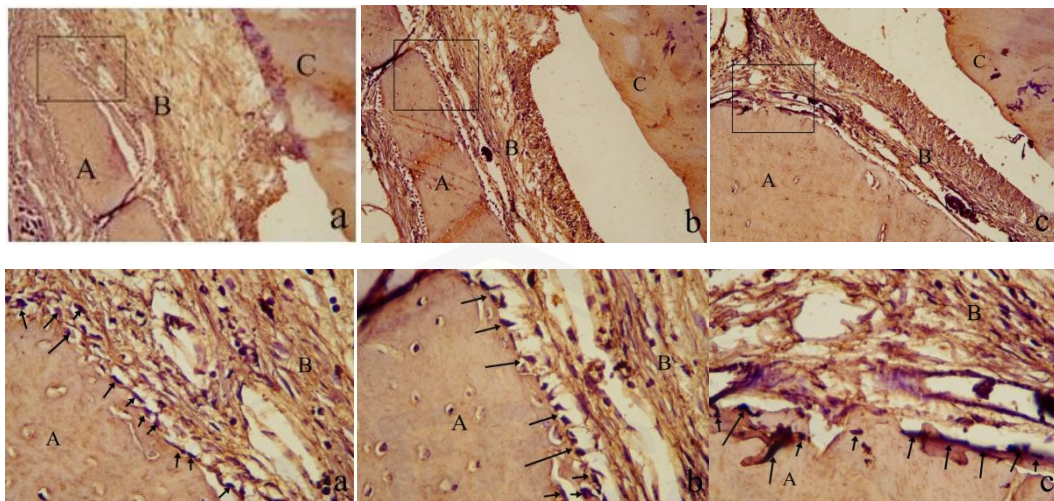
Gambar 8.9 Kelompok perlakuan tikus I dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



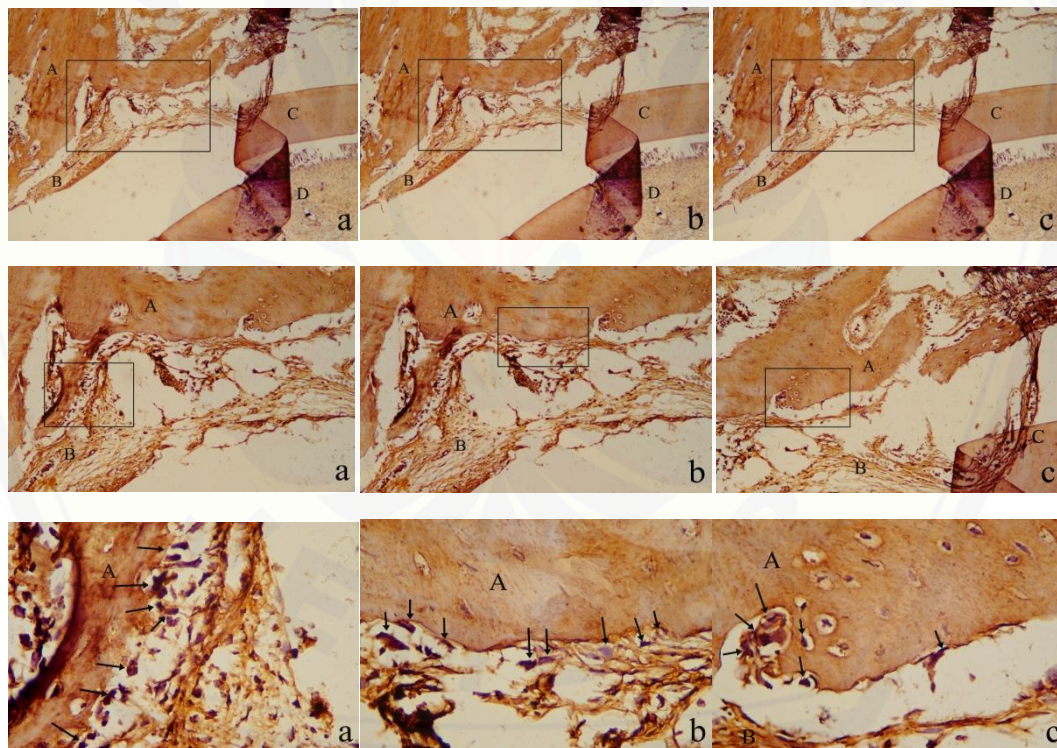
Gambar 8.10 Kelompok perlakuan tikus J dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.







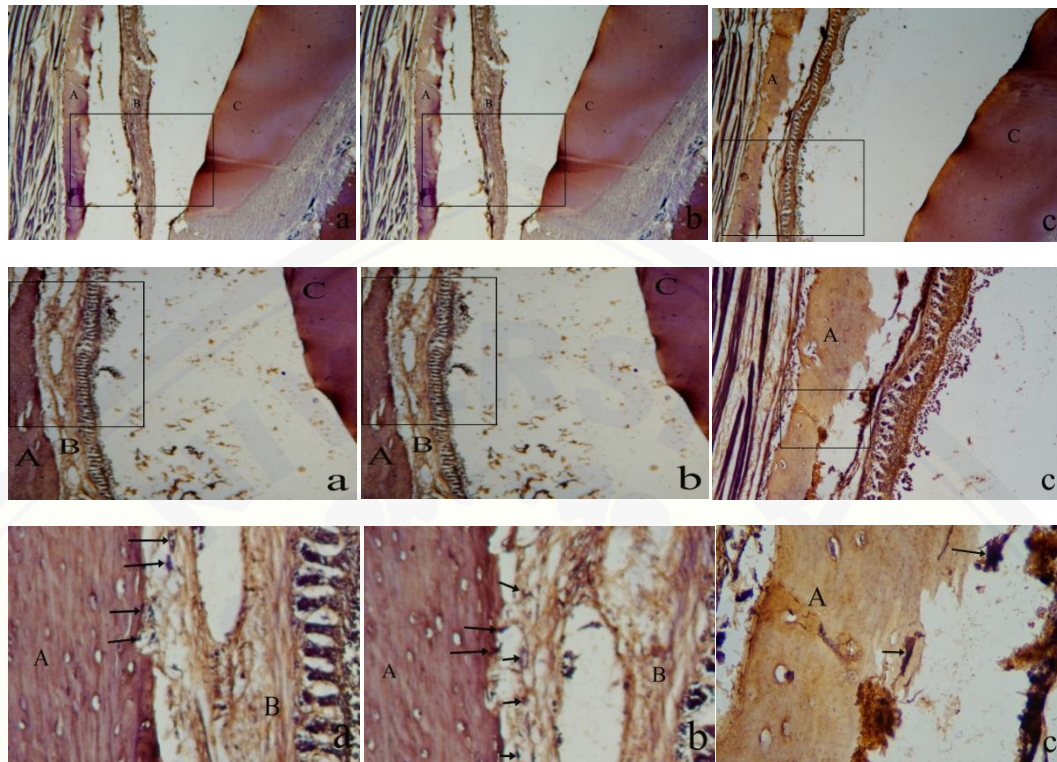
Gambar 8.11 Kelompok perlakuan tikus K dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



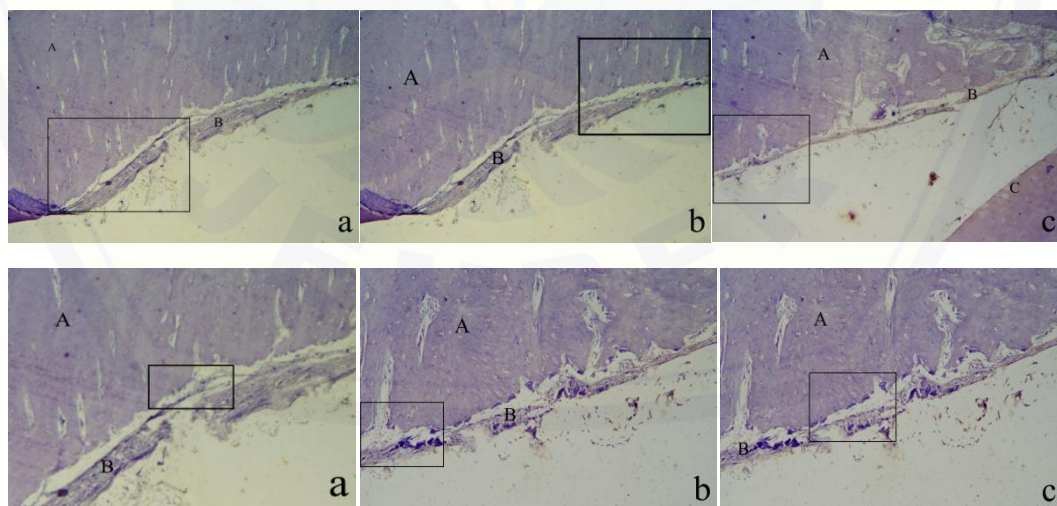
Gambar 8.12 Kelompok perlakuan tikus L dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



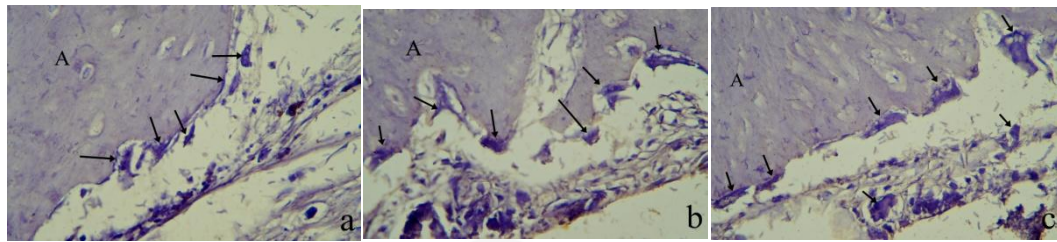
4. Perlakuan Hari Ke-14



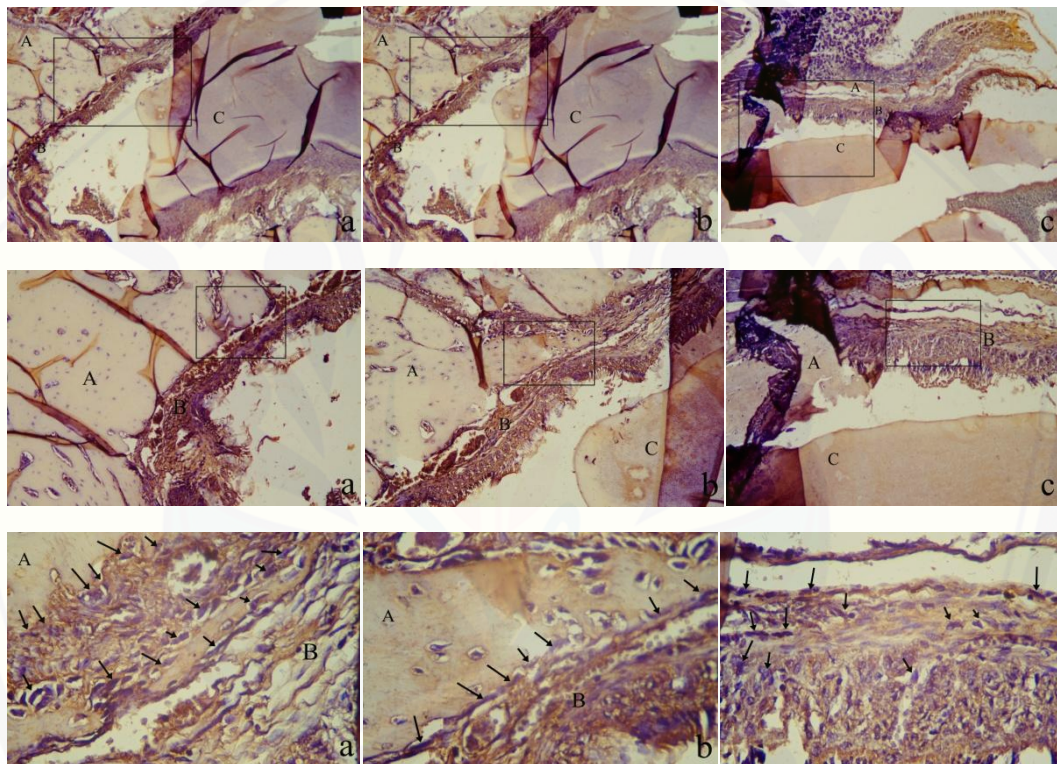
Gambar 8.13 Kelompok perlakuan tikus M dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



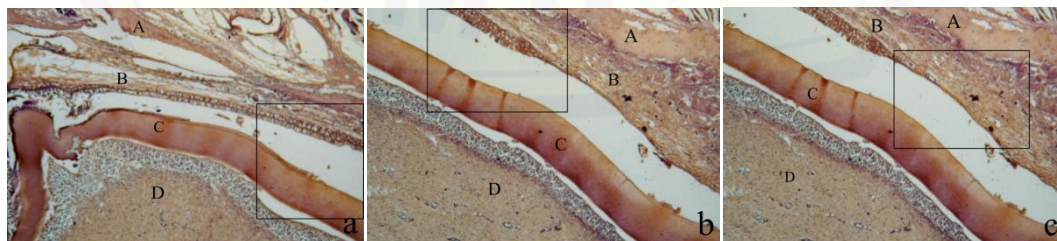


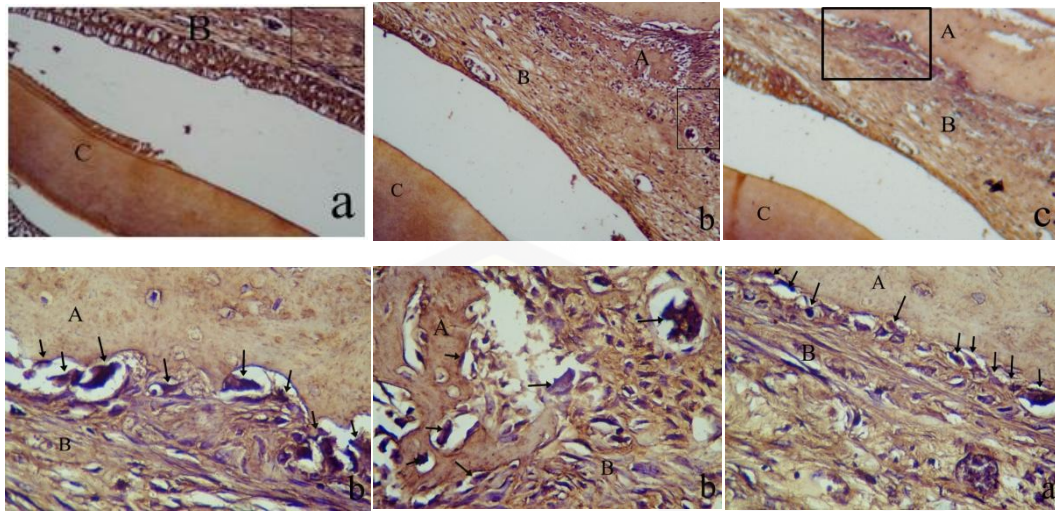


Gambar 8.14 Kelompok perlakuan tikus N dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.



Gambar 8.15 Kelompok perlakuan tikus O dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.





Gambar 8.16 Kelompok perlakuan tikus P dengan perbesaran 40x (a), 100x (b), dan 400x (c). Tulang alveolar (A), ligamen periodontal (B), dentin (C), dan tanda panah menunjukkan sel osteoklas.