



**EKSPRESI CASPASE-3 SEL OSTEOLAS SETELAH
PEMBERIAN GEL NATRIUM FLUORIDA (NaF)
PADA PERGERAKAN ORTODONTI**

SKRIPSI

Oleh

**Hasna' Fakhriyah Jinan
NIM 161610101071**

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**EKSPRESI CASPASE-3 SEL OSTEOLAS SETELAH
PEMBERIAN GEL NATRIUM FLUORIDA (NaF)
PADA PERGERAKAN ORTODONTI**

SKRIPSI

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

Oleh

**Hasna' Fakhriyah Jinan
NIM 161610101071**

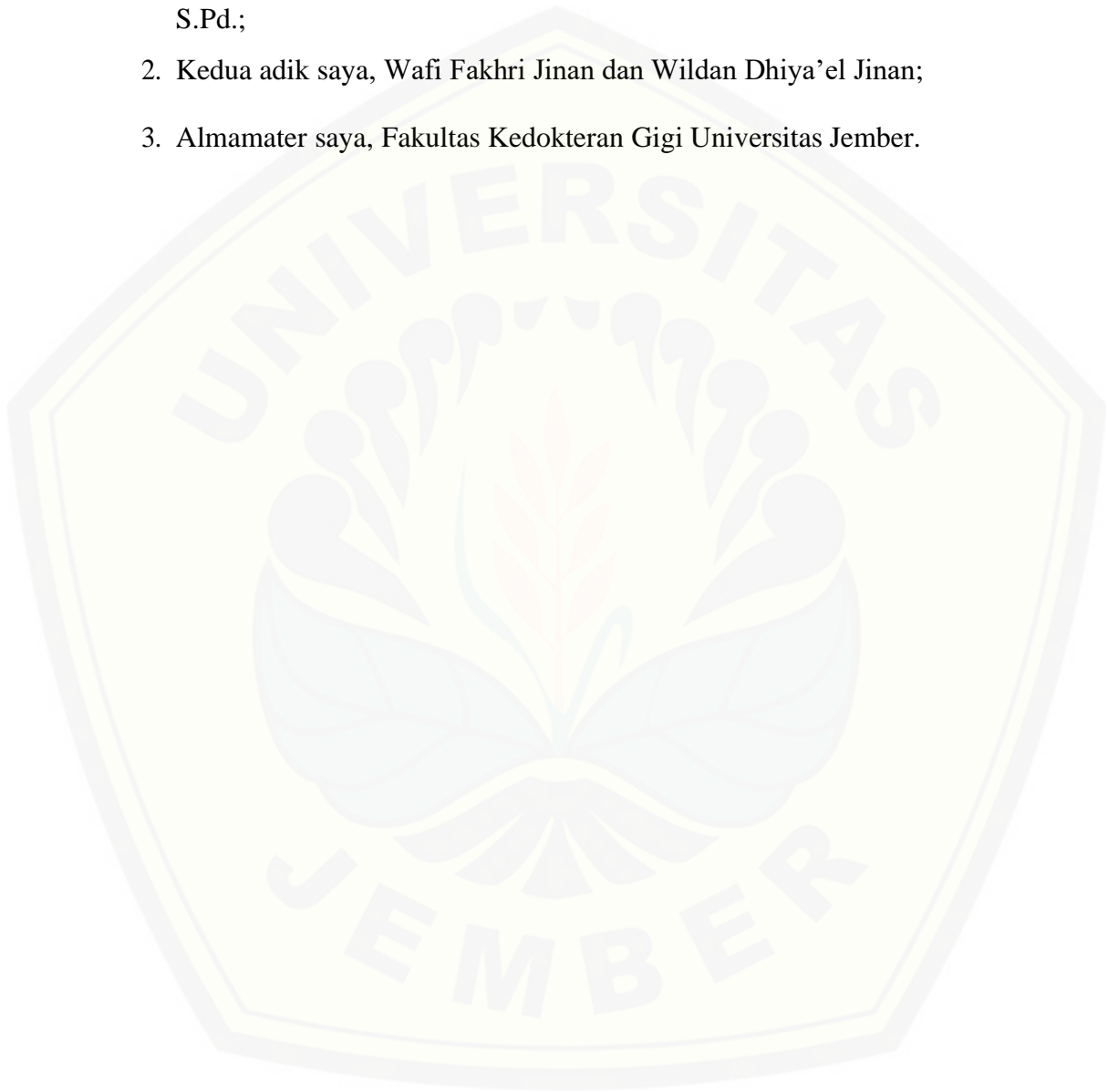
**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tua saya, Ayah Moh. Johan, S.Ag., dan Ummi Etik Hidayanti, S.Pd.;
2. Kedua adik saya, Wafi Fakhri Jinan dan Wildan Dhiya'el Jinan;
3. Almamater saya, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



MOTTO

وَلَا تَهِنُوا وَلَا تَحْزَنُوا وَأَنْتُمْ الْأَعْلَوْنَ إِنْ كُنْتُمْ مُؤْمِنِينَ

“So do not weaken and do not grieve, and you will be superior if you are (true) believers” (QS. 3:139)*

“Dark and difficult times lie ahead. Soon, we must all face the choice between what is right and what is easy” (J.K. Rowling)**



*) QS. Al-Imran:139

***) J.K. Rowling. Harry Potter and the Deathly Hallows

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Hasna' Fakhriyah Jinan

NIM : 161610101071

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Ekspresi Caspase-3 Sel Osteoblas Setelah Pemberian Gel Natrium Fluorida (NaF) Pada Pergerakan Ortodonti” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 20 Februari 2020

Yang menyatakan

Hasna' Fakhriyah Jinan
NIM 161610101071

SKRIPSI

**EKSPRESI CASPASE-3 SEL OSTEOLAS SETELAH
PEMBERIAN GEL NATRIUM FLUORIDA (NaF)
PADA PERGERAKAN ORTODONTI**

Oleh

Hasna' Fakhriyah Jinan
NIM 16161010171

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Ekspresi Caspase-3 Sel Osteoblas Setelah Pemberian Gel Natrium Fluorida (NaF) Pada Pergerakan Ortodonti” karya Hasna’ Fakhriyah Jinan telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Kamis, 13 Februari 2020

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Tim Penguji

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

drg.Leliana Sandra D. P., Sp.Ort.
NIP. 197208242001122001

drg. Lusi Hidayati, M.Kes
NIP. 197404152005012002

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed
NIP. 197207151998021001

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

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

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

RINGKASAN

Ekspresi Caspase-3 Sel Osteoblas Setelah Pemberian Gel Natrium Fluorida (NaF) Pada Pergerakan Ortodonti; Hasna' Fakhriyah Jinan; 161610101071; 2020; 83 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Perawatan ortodonti dilakukan oleh dokter gigi untuk memperbaiki maloklusi. Tujuan perawatan ortodonti dicapai melalui mekanisme jaringan, seluler dan molekuler akibat stimulus mekanik pada saat perawatan ortodonti. Hipotesis oleh Sandstedt, Oppenhei and Schwarz menyatakan bahwa aplikasi piranti ortodonti pada gigi menimbulkan gaya mekanis yang melibatkan koordinasi antara resorpsi tulang alveolar oleh osteoklas pada sisi tekanan dan aposisi/ pembentukan tulang alveolar oleh osteoblas pada sisi tarikan. Keseimbangan koordinasi osteoklas dan osteoblas menjadi penentu keberhasilan dan kestabilan gigi yang telah diperbaiki pada perawatan ortodonti. Keseimbangan dan kestabilan perawatan ortodonti dapat diperoleh dengan peningkatan proses pembentukan tulang pada sisi tarikan dan pengurangan proses resorpsi tulang pada sisi tekanan. Salah satu bahan yang diketahui dapat meningkatkan proses pembentukan pada tulang di daerah tarikan yakni Natrium Fluorida (NaF). NaF bekerja pada jalur yang teraktivasi oleh adanya stres lingkungan dan memungkinkannya untuk merespons berbagai rangsangan ekstraseluler. Salah satu respon stres seluler adalah apoptosis atau kematian sel terprogram. Apoptosis diperantarai oleh aktivasi Caspase-3 pada sel. Tingginya ekspresi Caspase-3 menandai tingginya aktivasi Caspase-3 pada sel yang memicu apoptosis sel tersebut. Pemberian gel NaF menurunkan apoptosis osteoblas melalui penekanan aktivasi Caspase-3 yang merupakan protease penginduksi apoptosis. Dengan demikian, osteoblas pada sisi tarikan dapat ditingkatkan melalui proliferasi preosteoblas dan dapat dipertahankan jumlahnya. Penelitian tentang peranan penambahan Natrium Fluorida (NaF) 11,34 ppm terhadap sel osteoblas melalui ekspresi caspase-3 di daerah tekanan gigi insisivus maksila tikus Wistar jantan ini dilakukan dengan pewarnaan Imunohistokimia (IHC) metode

indirect. Pewarnaan Imunohistokimia (IHC) dilakukan untuk mengetahui jumlah sel osteoblas melalui ekspresi caspase-3. Hasil ekspresi yang positif pada pewarnaan IHC akan menunjukkan warna coklat pada sitoplasma atau nucleus sel osteoblas. Seluruh sampel sediaan jaringan yang telah dilakukan pewarnaan IHC ini kemudian diambil gambar perbesaran 400× dengan menggunakan kamera optilab. Perhitungan jumlah ekspresi Caspase-3 sel osteoblas pada gambar yang telah diambil dilakukan dengan menggunakan aplikasi Immunoratio Software (IRS). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa pemberian Natrium Fluorida (NaF) 11,34 ppm pada sulkus gingiva gigi insisivus tikus Wistar jantan yang diberi gaya mekanis ortodonti 10 gram/cm² terjadi penurunan jumlah ekspresi Caspase-3 sel osteoblas pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Perbedaan secara signifikan ditunjukkan oleh kelompok D (perlakuan 14 hari) dibandingkan dengan kelompok B (kontrol 14 hari) dan kelompok D (perlakuan 14 hari) dibandingkan dengan kelompok C (perlakuan 7 hari). Pengaplikasian beban mekanik ortodonti menyebabkan osteoblas tulang alveolar mengaktifkan Caspase-3 yang memulai aktivasi jalur apoptosis osteoblas itu sendiri. Selanjutnya, RANKL akan menginduksi osteoklastogenesis yang akan berlanjut pada resorpsi tulang alveolar. Hubungan RANKL dengan Caspase-3 dan sebab akibat antara resorpsi tulang oleh osteoklas dan apoptosis oleh osteoblas. Fungsi NaF dalam menurunkan ekspresi Caspase-3 diperoleh melalui penekanan terhadap sintesis TNF- α . Penekanan terhadap sitokin ini menghambat aktivasi Caspase-3 oleh osteoblas. Dengan demikian, hasil penelitian ini yang menunjukkan bahwa NaF menurunkan ekspresi Caspase-3 melalui penekanan sintesis TNF- α sehingga proses apoptosis sel osteoblas dihambat dan proliferasi osteoblas meningkat.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekspresi Caspase-3 Sel Osteoblas Setelah Pemberian Gel Natrium Fluorida (NaF) Pada Pergerakan 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 serta bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT, atas kasih sayang dan pertolongan-Nya saya dapat menyelesaikan skripsi ini;
2. Rasulullah Muhammad SAW, yang membawa islam sebagai rahmatan lil alamin;
3. Kedua orang tua saya, Ayah Moh. Johan, S.Ag., dan Ummi Etik Hidayanti, S.Pd., tercinta atas kasih sayang yang tak terbatas, perjuangan tiada henti dan doa yang dipanjatkan setiap waktu untuk saya dan kedua adik saya;
4. drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
5. drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed., selaku dosen pembimbing utama dan Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes., selaku dosen pembimbing pendamping yang telah melibatkan saya dalam penelitiannya, serta memberikan ilmu, dukungan, saran, serta meluangkan waktunya dalam penyusunan skripsi ini;
6. drg. Leliana Sandra Deviade Putri, Sp.Ort., selaku dosen penguji utama dan drg. Lusi Hidayati, M.Kes., selaku dosen penguji anggota yang telah memberikan kritik dan saran dalam penyelesaian skripsi ini;
7. Teman penelitian saya, Shobrina yang telah menepati janji untuk memulai dan menyelesaikan skripsi ini bersama;
8. Sahabat dan teman terdekat saya, Isfania, Fitri, Shobrina, Risna, Saraswita, Innanisa, Septiana, Amalia, Fairuz, Anin, Nadiah, Devanti, Rezza dan Adam. Terimakasih telah bersedia menjadi teman saya. Terimakasih karena selalu ada untuk menemani, menghibur dan membantu saya hingga kini;

9. Kelompok Tutor H, Septiana, Ardin, Nadiyah, Syafira, Anin, Isfania, Devanti, Resza dan Ocik, telah membantu saya belajar melewati dan menikmati lebih dari setengah perjalanan perkuliahan saya di FKG;
10. Teman-teman D4 Battra 2015, terimakasih masih menganggap saya sebagai bagian dari kalian;
11. Seluruh angkatan FKG 2016, terima kasih atas kesempatan belajar dan pengalamannya;
12. Semua pihak yang terlibat secara langsung maupun tidak langsung dalam penyusunan skripsi ini, terima kasih telah meluangkan waktu dan tenaga untuk saya.

Jember, 20 Februari 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PERBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Pergerakan Gigi Pada Perawatan Ortodonti	5
2.1.1 Tahap Pergerakan Gigi.....	6
2.2 Tulang	8
2.2.1 Definisi Tulang	8
2.2.2 Struktur Tulang	9
2.3 Remodeling Tulang	12
2.3.1 Proses Remodeling Tulang.....	12
2.4 Fluor	14
2.4.1 Efek Fluor Terhadap Tulang	15
2.5 Caspase-3	16

2.6	Imunohistokimia	17
2.6.1	Antibodi	19
2.7	Immuno Ratio Software (IRS)	21
2.8	Kerangka Konsep	23
2.9	Penjelasan Kerangka Konsep	24
2.10	Hipotesis	25
BAB 3.	METODE PENELITIAN	26
3.1	Jenis Penelitian	26
3.2	Rancangan Penelitian	26
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian	26
3.3.1	Tempat Penelitian	26
3.3.2	Waktu Penelitian.....	27
3.4	Sampel Penelitian	27
3.4.1	Subjek Penelitian	27
3.4.2	Besar sampel penelitian.....	27
3.4.3	Kriteria Sampel.....	28
3.5	Variabel Penelitian	28
3.5.1	Variabel Bebas.....	28
3.5.2	Variabel Terikat.....	29
3.5.3	Variabel Terkendali	29
3.6	Definisi Operasional	29
3.6.1	Natrium Fluorida	29
3.6.2	Ekspresi Caspase-3	29
3.6.3	Kekuatan Mekanik Ortodonti	29
3.7	Konversi Dosis	30
3.7.1	Dosis Natrium Fluorida.....	30
3.7.2	Dosis Bahan Anestetikum	31
3.8	Bahan dan Alat Penelitian	32
3.8.1	Bahan Penelitian	32
3.8.2	Alat Penelitian	33
3.9	Prosedur Penelitian	34

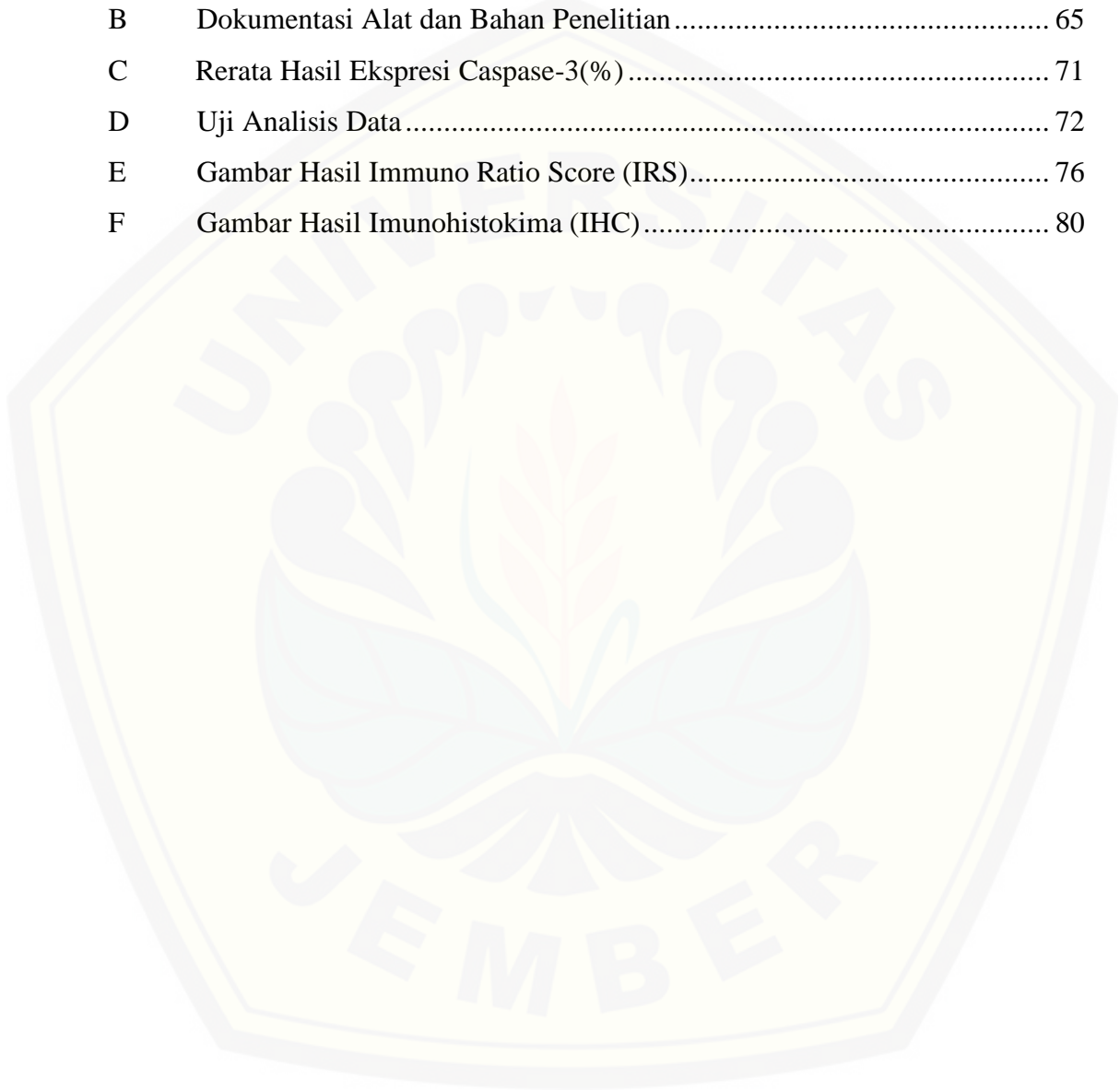
3.9.1 Perijinan <i>Ethical Clearance</i>	34
3.9.2 Persiapan Hewan Coba	34
3.9.3 Pembagian Kelompok Perlakuan.....	34
3.9.4 Persiapan Gel Natrium Fluorida (NaF).....	35
3.9.5 Perlakuan Hewan Coba.....	35
3.9.6 Euthanasia Hewan Coba	36
3.9.7 Tahapan pembuatan Sediaan dan Pemeriksaan Imunohistokimia.....	36
3.9.8 Prosedur Pengamatan Ekspresi Caspase-3	41
3.10 Analisis Data.....	42
3.11 Alur Penelitian	43
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	44
4.1 Hasil Penelitian.....	44
4.2 Analisis Data.....	46
4.3 Pembahasan.....	47
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	54
5.1 Kesimpulan.....	54
5.2 Saran.....	54
DAFTAR PUSTAKA	55
LAMPIRAN	60

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Ilustrasi daerah tekanan dan tarikan	5
2.2 Proses remodeling tulang.....	12
2.3 Teknik IHC <i>direct</i> dan <i>indirect</i>	18
2.4 Teknik IHC <i>indirect</i> Avidin-Biotin Complex (ABC) dan teknik <i>indirect</i> Peroxidase Antiperoxidase (PAP).....	19
2.5 Antibodi poliklonal dan antibodi monoklonal	20
2.6 Kerangka konsep	23
3.1 Ilustrasi pemasangan <i>closed coil spring</i> pada tikus.....	35
3.2 Ilustrasi arah pemotongan jaringan	40
3.3 Alur Penelitian	43
4.1 Gambaran sel osteoblas dengan pewarnaan imunohistokimia	44
4.2 Diagram rata-rata persentase ekspresi Caspase-3	46

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A Surat Perijinan Penelitian	60
B Dokumentasi Alat dan Bahan Penelitian	65
C Rerata Hasil Ekspresi Caspase-3(%)	71
D Uji Analisis Data	72
E Gambar Hasil Immuno Ratio Score (IRS).....	76
F Gambar Hasil Imunohistokima (IHC).....	80



DAFTAR SINGKATAN

ABC	: <i>Avidin-Biotin Complex</i>
AlFn	: <i>Aluminum Fluoride</i>
BeFn	: <i>Beryllium Fluoride</i>
BMP	: <i>Bone Morfogenetic Protein</i>
BMSC	: <i>Bone Marrow Stem Cell</i>
Caspase -1	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -1</i>
Caspase -2	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -2</i>
Caspase -3	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -3</i>
Caspase -4	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -4</i>
Caspase -5	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -5</i>
Caspase -6	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -6</i>
Caspase -7	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -7</i>
Caspase -8	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -8</i>
Caspase -9	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -9</i>
Caspase -10	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -10</i>
Caspase -12	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -12</i>
Caspase -14	: <i>Cysteine-Dependent Aspartate Proteases -14</i>
DAB	: <i>Diaminobenzidine</i>
Dlx5	: <i>Distal-Less Homeobox -5</i>
FITC	: <i>Anti-Fluorescein Isothiocyanate</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
HSC	: <i>Hematopoietic Stem-Cell</i>
IFN- γ	: <i>Gamma Interferon</i>
IGF	: <i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IGF-1R	: <i>Insulin-Like Growth Factor -1 Receptor</i>
IgG	: <i>Immunoglobulin G</i>
IgM	: <i>Immunoglobulin M</i>
IHC	: <i>Immunohistokimia</i>
IL -1	: <i>Interleukin -1</i>



IL -2	: <i>Interleukin -2</i>
IL -3	: <i>Interleukin -3</i>
IL -6	: <i>Interleukin -6</i>
IL -8	: <i>Interleukin -8</i>
IRS	: <i>Immunoratio Software</i>
M-CSF	: <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NaF	: <i>Natrium Fluorida</i>
ODF	: <i>Osteoclast Differentiation Factor</i>
OPG	: <i>Osteoprogeterin</i>
Osx	: <i>Osterix</i>
PAP	: <i>Peroxidase Antiperoxidase</i>
RANK	: <i>Receptor Activator Of NF-Kappa-B</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>
Runx2	: <i>Runtrelated -2</i>
TGF-B	: <i>Transforming Growth Factor -B</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Prevalensi maloklusi mencapai 80% dari jumlah populasi penduduk Indonesia sehingga masih menjadi salah satu masalah kesehatan gigi dan mulut selain karies dan penyakit periodontal (Nabila *et al.*, 2017). Maloklusi adalah ketidaksesuaian dari hubungan gigi atau hubungan rahang yang menyimpang dari normal. Akibat yang ditimbulkan oleh maloklusi yang tidak dilakukan perawatan diantaranya dapat menyebabkan tampilan wajah yang buruk, resiko karies dan penyakit periodontal, sampai gangguan pada sendi temporo mandibula (Wijayanti *et al.*, 2014).

Perawatan yang dilakukan oleh dokter gigi untuk memperbaiki maloklusi meliputi perawatan ortodonti. Ortodonti adalah cabang ilmu pertama dalam kedokteran gigi yang mempelajari pertumbuhan wajah, perkembangan gigi, oklusi, dan mempelajari diagnosis, pencegahan, serta perawatan anomali oklusi (Vinod dan Ze 'ev, 2015). Perawatan ortodonti bertujuan untuk mendapatkan susunan gigi yang teratur, kontak oklusal yang baik, sehingga dapat dicapai fungsi oklusi yang efisien, dan estetika penampilan wajah yang menyenangkan serta hasil perawatan yang stabil (Ardhana, 2013).

Tujuan perawatan ortodonti dicapai melalui mekanisme jaringan, seluler dan molekuler akibat stimulus mekanik pada saat perawatan ortodonti sehingga memungkinkan gigi bergerak. Pergerakan gigi pada saat perawatan ortodonti disebut sebagai pergerakan ortodonti. Diskusi awal mengenai mekanisme pergerakan ortodonti ini dimulai pada pertengahan abad ke-19 yang kemudian melahirkan pemahaman adanya proses remodeling tulang sepanjang hidup. Mekanisme pergerakan ini melibatkan perubahan ligamen periodontal, dukungan tulang alveolar dan jaringan dengan sel-sel yang berbeda karakteristik remodelingnya (Meikle, 2006). Hipotesis oleh Sandstedt, Oppenhei and Schwarz menyatakan bahwa aplikasi piranti ortodonti pada gigi menimbulkan gaya mekanis yang membentuk sisi tekanan dan sisi tarikan (Asiry, 2018). Kedua sisi tersebut melibatkan koordinasi antara resorpsi tulang alveolar oleh osteoklas pada

sisi tekanan dan aposisi/ pembentukan tulang alveolar oleh osteoblas pada sisi tarikan (Hikmah *et al.*, 2016).

Keseimbangan koordinasi osteoklas dan osteoblas menjadi penentu keberhasilan dan kestabilan gigi yang telah diperbaiki pada perawatan ortodonti. Bhawal menyebutkan keseimbangan dan kestabilan perawatan ortodonti dapat diperoleh dengan peningkatan proses pembentukan tulang pada sisi tarikan dan pengurangan proses resorpsi tulang pada sisi tekanan. Salah satu bahan yang diketahui dapat meningkatkan proses pembentukan pada tulang di daerah tarikan yakni Natrium Fluorida (NaF) (Bhawal *et al.*, 2015).

Natrium Fluorida (NaF) merupakan senyawa gabungan dari elemen fluor (F) dan natrium (Na). Fluor (F) adalah elemen kimia yang paling elektronegatif sehingga tidak pernah ditemukan di alam dalam bentuk elemennya. Fluor paling banyak ditemukan berbentuk fluorida (F⁻) dalam berbagai macam mineral, seperti dalam batuan dan tanah, batuan vulkanik dan sub-vulkanik, serta endapan garam yang berasal dari laut (O'Mullane *et al.*, 2016). Natrium Fluorida (NaF) diketahui dapat mempengaruhi proses diferensiasi sel pembentuk tulang, peningkatan aktivitas alkali fosfatase dalam sel osteoblasik, dan homeostasis metabolisme mineral tulang. Natrium Fluorida (NaF) juga dapat berperan sebagai elemen kumulatif yang dapat mengubah aposisi dan resorpsi jaringan tulang. Pada dosis rendah, Natrium Fluorida (NaF) dapat meningkatkan massa tulang melalui peningkatan proliferasi osteoblas serta merangsang pembentukan tulang secara *in vitro* dan *in vivo* (Bhawal *et al.*, 2015).

Natrium Fluorida (NaF) bekerja pada jalur yang teraktivasi oleh adanya stres lingkungan dan memungkinkannya untuk merespons berbagai rangsangan ekstraseluler. Respon stres seluler adalah reaksi terhadap perubahan atau fluktuasi kondisi ekstraseluler yang merusak struktur dan fungsi makromolekul (Gendebien, 2011). Respon ini bergantung pada tingkat keparahan dan durasi stres yang terjadi. Sel yang terkena stres akan mengembalikan keadaan homeostasisnya seperti semula sebagai bentuk adaptasi dengan lingkungannya yang baru. Beragam respons stres seluler yaitu , dan apoptosis (Everett, 2011).

Salah satu protease yang terlibat dalam proses respon stres seluler peradangan dan apoptosis adalah Caspase. Caspase atau *Cysteine-dependent aspartate proteases* diproduksi sebagai zymogens non-aktif (disebut procaspase) dan diaktifkan melalui homodimerisasi atau pembelahan (Svandova *et al.*, 2018). Caspase-3 digolongkan dalam caspase pro-apoptosis pelaksana yang berperan penting dalam proses apoptosis/ kematian sel. Selain itu, Caspase-3 memiliki peran penting dalam diferensiasi jaringan, regenerasi dan perkembangan saraf yang tidak melibatkan aktivitas apoptosis (Shalini *et al.*, 2015).

Berdasarkan uraian diatas, pemberian Natrium Fluorida (NaF) berpotensi mempengaruhi ekspresi Caspase-3 dalam proses resorpsi dan aposisi tulang yang dapat meningkatkan keseimbangan dan kestabilan remodeling tulang pada saat perawatan ortodonti. Karenanya, peneliti tertarik untuk meneliti efek pemberian Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi Caspase-3 sel osteoblas pada tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi gaya mekanik ortodonti.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut didapatkan rumusan masalah apakah ekspresi Caspase-3 sel osteoblas pada pergerakan ortodonti menurun dengan pemberian Natrium Fluorida (NaF).

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Natrium Fluorida (NaF) terhadap penurunan ekspresi Caspase-3 sel osteoblas pada pergerakan ortodonti.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Meningkatkan wawasan dan memberikan pengalaman pada peneliti dalam melakukan penelitian.
2. Memberikan informasi terhadap masyarakat ilmiah mengenai manfaat dari pemberian Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi Caspase-3 sel osteoblas pada pergerakan gigi ortodonti.

3. Menjadi dasar penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi Caspase-3 pada pergerakan gigi ortodonti.

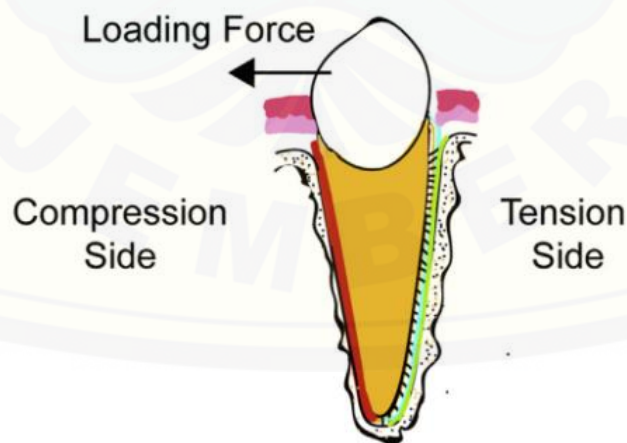


BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pergerakan Gigi Pada Perawatan Ortodonti

Pergerakan gigi melalui kompleks dentoalveolar merupakan proses sinergis dari fenomena fisik dan remodeling jaringan secara biologis (Li *et al.*, 2018). Pada prinsipnya, perawatan ortodonti melibatkan pergerakan gigi yang diperoleh melalui remodeling tulang alveolar dan jaringan periodontal sebagai respon terhadap adanya gaya mekanis (Hikmah *et al.*, 2016) yang bervariasi besar kekuatannya, waktu aplikasi dan arah tekanan melalui sel reseptor dan cascade pensinyalan yang pada akhirnya menghasilkan remodeling tulang dan pergerakan gigi ortodonti (Li *et al.*, 2018).

Pergerakan gigi secara fisik oleh kekuatan mekanik ortodonti bergantung pada hukum newton (Li *et al.*, 2018). Aplikasi piranti ortodonti pada gigi memberikan suatu gaya mekanik sehingga membentuk daerah tekanan (*compression side*) dan daerah tarikan (*tension side*). Kedua daerah tersebut melibatkan koordinasi antara resorpsi tulang alveolar oleh osteoklas pada sisi tekanan dan pembentukan tulang alveolar oleh osteoblas pada sisi tarikan (Hikmah *et al.*, 2016)



Gambar 2.1 Ilustrasi daerah tekanan dan tarikan (Li *et al.*, 2018)

2.1.1 Tahap Pergerakan Gigi

Aplikasi piranti ortodonti menyebabkan stres mekanik pada ligamen periodontal sehingga ligamen periodontal memberikan respon awal berupa perubahan metabolik yang memungkinkan pergerakan gigi. Perubahan samar pada ketebalan ligamen periodontal terjadi satu jam setelah aplikasi tekanan piranti ortodonti, sedangkan perubahan signifikan terlihat setelah enam jam (Ariffin *et al.*, 2011).

Pergerakan gigi pada pergerakan ortodonti menurut Burstone terbagi menjadi tiga fase, yaitu: fase inisial, fase *lag*, dan fase *postlag* (Vinod dan Ze 'ev, 2015).

a. Fase Inisial

Fase inisial tercirikan dengan periode pergerakan yang sangat cepat yang terjadi segera setelah aplikasi tekanan pada gigi. Fase inisial ini dikaitkan dengan pergeseran gigi ke dalam *space* ligamen periodontal (Vinod dan Ze 'ev, 2015) dan biasanya terjadi pada 24 jam pertama hingga dua hari setelah aplikasi tekanan (Asiry, 2018).

Tekanan dan tarikan yang kuat akibat aplikasi beban mekanik pada serat dan sel-sel ligamen periodontal merupakan proses kompleks yang pada gilirannya menyebabkan ekstrasvasi pembuluh darah, kemotaksis sel inflamasi dan rekrutmen progenitor osteoblas dan osteoklas (Asiry, 2018). Diawali respon inflamasi akut berupa vasodilatasi kapiler dan migrasi leukosit ke kapiler. Sel-sel yang bermigrasi ini akan menghasilkan sitokin inflamasi, *growth factor*, dan prostaglandin. Sitokin inflamasi yang berimplikasi pada pergerakan gigi dan pembentukan tulang yaitu kelompok Interleukin seperti IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), *gamma interferon* (IFN- γ), dan *osteoclast differentiation factor* (ODF). Sitokin inflamasi yang memiliki peranan langsung pada pergerakan ortodonti dentoalveolar adalah TNF- α dan IL-1. Sitokin tersebut memiliki aktivitas biologi yang sama yaitu menarik leukosit dan menstimulasi fibroblas, sel endotel, osteoklas dan osteoblas untuk memulai resorpsi tulang dan mencegah pembentukan tulang (Vinod dan Ze 'ev, 2015).

b. Fase *Lag*

Fase lag terjadi saat pergeseran gigi tidak ada atau terjadi secara minimal. Ketiadaan gerakan atau minimalnya gerakan diakibatkan hialinisasi ligamen periodontal di area tekanan. Area hialinisasi yang terbentuk pada daerah tekanan merupakan perubahan serabut ligamen periodontal dari bentuk normalnya. Perubahan ini diakibatkan perubahan aliran darah, kerusakan sel, dan komunikasi sel yang memicu apoptosis atau nekrosis sebagai akibat tekanan dari kekuatan mekanik ortodonti. Pergerakan ini akan terus terhenti hingga jaringan nekrosis dihilangkan. Terhentinya gerakan ini biasanya terjadi selama dua puluh hingga tiga puluh hari setelah aplikasi beban mekanik ortodonti atau selama jangka waktu penghilangan jaringan nekrotik bersama dengan resorpsi sumsum tulang di sekitarnya (Asiry, 2018).

Durasi fase *lag* akan semakin panjang seiring dengan semakin besarnya beban mekanik yang diaplikasikan dan semakin banyak daerah hialinisasi yang terbentuk sehingga semakin banyak daerah yang harus diresorpsi. Jaringan nekrotik dari tulang dan daerah ligamen periodontal yang mengalami tekanan dihilangkan oleh makrofag, *giant cell* dan osteoklas (Amin dan Nur, 2016).

Gigi akan mulai bergerak kembali setelah jaringan nekrotik hilang dan resorpsi tulang telah terjadi. Daerah yang telah terbebas dari jaringan nekrotik akan memicu *quiescent osteoblast* di daerah ligamen periodontal yang mengalami tekanan membesar, kemudian menghasilkan matriks tulang baru (osteoid). Selanjutnya fibroblas *like cells* (pericytes) di sekitar kapiler ligamen periodontal akan menghasilkan osteoblas progenitor baru. Preosteoblas ini berproliferasi dan bermigrasi ke permukaan tulang alveolar sepanjang serat Sharpey. Bersamaan dengan itu, fibroblas ligamen periodontal di daerah tarikan mulai memperbanyak dan memperbarui matriks sekitarnya (Vinod dan Ze'ev, 2015).

c. Fase *Postlag*

Fase ketiga adalah fase *postlag* di mana pergerakan gigi secara bertahap atau tiba-tiba meningkat dan biasanya terlihat setelah empat puluh hari setelah aplikasi kekuatan awal (Asiry, 2018). Selama fase ketiga, laju pergerakan

terbagi menjadi 2, yaitu fase akselerasi dan fase linier yang dimulai sekitar empat puluh hari setelah pengaplikasian piranti ortodonti. Pengamatan pada daerah tekanan ligamen periodontal saat *postlag* menunjukkan serat kolagen dengan orientasi yang tidak tepat dan permukaan tulang yang tidak teratur akibat resorpsi frontal atau resorpsi langsung (Vinod dan Ze 'ev, 2015).

Meskipun fase ini dikatakan sebagai tahap lanjutan dari fase *Lag*, namun sebuah laporan oleh von Böhl *et al* (2004) (dalam Vinod dan Ze 'ev, 2015). menyebutkan bahwa zona hyalinisasi di daerah tekanan juga ditemukan pada tahap ini, terutama di daerah dengan penerapan kekuatan tinggi. Temuan ini menunjukkan bahwa perkembangan dan penghilangan jaringan nekrotik adalah proses yang terus-menerus terjadi selama perpindahan gigi. Kesimpulan ini didukung oleh hipotesis Melsen (1999) (dalam Vinod dan Ze 'ev, 2015) yang mengatakan bahwa resorpsi tulang tidak langsung pada daerah tekanan bukan merupakan reaksi terhadap kekuatan tetapi upaya untuk menghilangkan tulang iskemik yang terletak berdekatan dengan jaringan yang terhyalinisasi. Selanjutnya resorpsi tulang secara langsung dianggap sebagai bagian dari proses remodeling.

2.2 Tulang

2.2.1 Definisi Tulang

Tulang adalah jaringan ikat termineralisasi yang terdiri dari empat jenis sel, yaitu osteoblas, sel-sel pelapis tulang, osteosit, dan osteoklas. Tulang memiliki fungsi penting dalam tubuh, seperti penggerak, dukungan dan perlindungan jaringan lunak, penyimpanan kalsium dan fosfat, serta penyimpanan sumsum tulang (Crockett *et al.*, 2011). Tulang adalah organ yang sangat dinamis yang terus-menerus diresorpsi oleh osteoklas dan diperbarui oleh osteoblas (Silva *et al.*, 2015).

2.2.2 Struktur Tulang

a. Sel Penyusun Tulang

1) Osteoblas

Osteoblas adalah sel pembentuk tulang berbentuk kubus yang terletak di sepanjang permukaan tulang. Osteoblas berasal dari hasil diferensiasi *mesenchymal stem cell* (MSC) melalui ekspresi faktor *transkripsi Runx2*, *Distal-less homeobox-5* (Dlx5), dan *osterix* (Osx). Runx2 disebut sebagai gen master dalam diferensiasi osteoblas (Silva *et al.*, 2015). Proses pembentukan tulang oleh osteoblas terjadi dalam 2 langkah, dimulai dengan pembentukan matriks ekstraseluler lalu langkah selanjutnya adalah pengendapan kristal mineral dalam matriks ekstraseluler tersebut (Silva *et al.*, 2015). Mineralisasi dengan pengendapan kristal dalam matriks ekstraseluler hanya terjadi pada sebagian zona dan menyisakan zona matriks ekstraseluler tidak termineralisasi. Zona matriks ekstraseluler tidak termineralisasi terletak paling dekat dengan osteoblas disebut osteoid (Vinod dan Ze'ev, 2015).

Mineralisasi matriks ekstrasel pada osteoid terjadi oleh karena osteoblas mensintesis protein seperti kolagen tipe 1 yang merupakan protein utama penyusun matriks yaitu osteokalsin dan sialoprotein. Selain itu terdapat protein seperti hormon yang terlibat diantaranya TGF- β , IGF dan BMP (Crockett *et al.*, 2011). Diperkirakan bahwa protein-protein ini dilepaskan secara utuh selama proses resorpsi dan berfungsi sebagai faktor autokrin yang menstimulasi osteoblas selama remodeling.

Osteoblas merupakan sel pengatur pembentukan osteoklas. McSheehy dan Chambers (1986) secara tidak sengaja menemukan bahwa reseptor stimulator resorpsi tulang seperti parathyroid hormon dan 1,25(OH)₂-vitamin D₃ tidak terdapat dalam osteoklas ataupun progenitornya, tetapi dapat ditemukan dalam osteoblas. Penemuan ini mengawali penemuan-penemuan lain mengenai hubungan osteoblas sebagai pengatur osteoklastogenesis (Vinod dan Ze'ev, 2015).

2) Sel Pelapis Tulang

Sel-sel pelapis tulang adalah osteoblas diam berbentuk datar yang menutupi permukaan tulang, di mana tidak terjadi resorpsi tulang maupun pembentukan tulang. Dalam keadaan normal, sel ini memiliki nukleus yang tipis dan datar serta sitoplasma yang memanjang di sepanjang permukaan tulang. Beberapa sel ini menunjukkan proses meluas ke kanalikuli. Selain itu sel pelapis tulang ini membentuk *gap junction* antara sel pelapis tulang yang berdekatan dan antara sel pelapis tulang dengan osteosit (Silva et al., 2015).

Aktivitas sekretori sel pelapis tulang bergantung pada status fisiologis tulang. Saat terjadi peningkatan aktivitas sekretori, sel pelapis tulang akan memperbesar ukurannya dan berubah bentuk menjadi kubus. Fungsi sel pelapis tulang tidak sepenuhnya dipahami, tetapi diketahui bahwa sel ini mencegah interaksi langsung antara osteoklas dan matriks tulang. Fungsi tersebut dibutuhkan ketika resorpsi tulang tidak seharusnya terjadi. Selain itu sel ini juga terlibat dalam diferensiasi osteoklas dengan menghasilkan osteoprotegerin (OPG) dan *Receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand* (RANKL) sebagaimana osteoblas (Silva et al., 2015)

3) Osteosit

Osteosit adalah sel-sel nonproliferasif yang merupakan diferensiasi akhir dari turunan osteoblas dalam lakuna tulang kortikal dan *cancellous* (Vinod dan Ze'ev, 2015). Morfologi osteosit berbeda-beda tergantung pada jenis tulang. Misalnya, osteosit dari tulang trabekuler lebih bulat daripada osteosit dari tulang kortikal dengan morfologi memanjang. Osteosit terbentuk dari hasil diferensiasi osteoblas yang merupakan turunan dari *mesenchymal stem cell* (MSC) (Silva et al., 2015).

Perubahan osteoblas menjadi osteosit disebabkan oleh aktivitas mineral seperti hidroksiapatit, kalsium karbonat dan kalsium fosfat yang tersimpan di sekitar osteosit, membentuk lakuna yang akan ditempati osteosit seumur hidupnya. Sel-sel ini memiliki ekstensi sel dengan karakteristik seperti saraf untuk berkomunikasi satu sama lain dan ekstensi

menyerupai osteoblas pada permukaan tulang (Silva *et al.*, 2015). Saluran komunikasi ini terhubung antar lakuna melalui saluran sempit yang dikenal sebagai kanalikuli, di mana dendrit osteosit bersentuhan dan berkomunikasi melalui *gap junction* (Li *et al.*, 2018).

Menurut Bonewald, osteosit juga berkomunikasi dengan osteoklas melalui sekresi berbagai molekul (Vinod dan Ze 'ev, 2015). Sel- sel osteosit terletak berdekatan satu sama lain dan merupakan sel tulang yang paling banyak. Sel ini membentuk lebih dari 95% keseluruhan jumlah sel tulang. Oleh karena itu, matriks ekstraseluler dalam tulang menunjukkan jaringan komunikasi luas antara osteositik-osteoblasik-osteoklastik, dimana osteosit berperan sebagai pengaturnya (Crockett *et al.*, 2011). Jaringan antar osteosit dapat merasakan beban mekanis pada tulang dengan mekanisme yang belum sepenuhnya diketahui. Meskipun reseptor hormon seks penting dalam efek osteogenik dari beban mekanis secara *in vivo*, namun reseptor hormon seks bukan satu-satunya yang memediasi efek osteogenik dalam osteosit (Crockett *et al.*, 2011). Menurut Noble, silia pada sel osteosit mampu merespons rangsangan mekanis dan Connexin-43 yang disebut sebagai saluran membran mekano-sensorik sehingga dapat merespons regangan/pembebanan. Selain itu, osteosit juga merespons beban mekanis melalui reseptor yang terikat membran, misalnya reseptor *insulin-like growth factor* (IGF-1R) (Vinod dan Ze 'ev, 2015).

4) Osteoklas

Osteoklas adalah sel multinuklear yang terbentuk dari hasil akhir diferensiasi sel mononuklear *Hematopoietic Stem-Cell* (HSC) melalui stimulasi oleh *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) yang diekspresikan oleh osteoblas dan sel-sel osteoprogenitor *mesenchymal* lain (Silva *et al.*, 2015). Selain itu terdapat *Receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand* (RANKL) yang diekspresikan oleh osteoblas di permukaan tulang dan sel stroma di sumsum tulang. RANKL merupakan

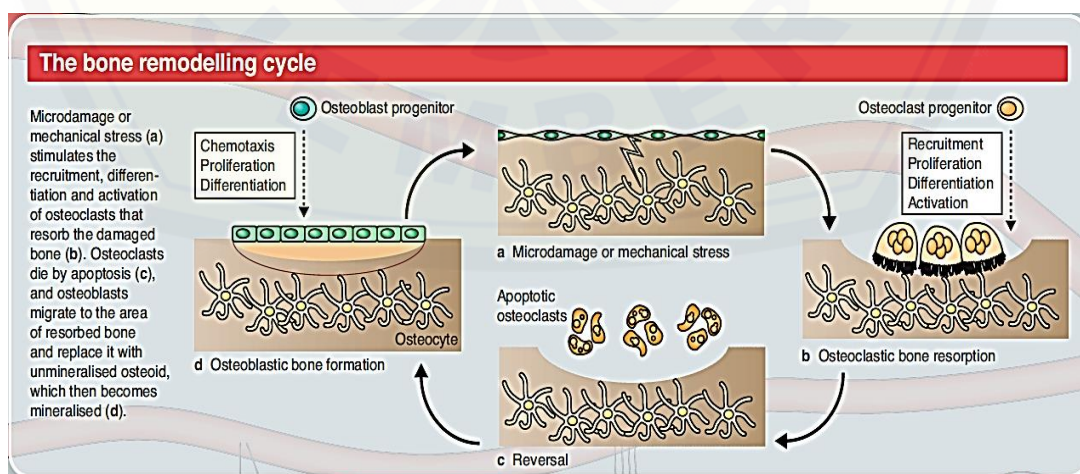
sitokin yang secara spesifik mendorong progenitor osteoklastik (Vinod dan Ze'ev, 2015).

Osteoklas adalah satu-satunya sel yang mampu menyerap tulang. Tulang harus didemineralisasi sebelum ezim-enzim pendegradasi matriks dapat memproduksi asam dalam lakuna (lakuna resorpsi). Karena itu, pembentukan tulang dan remodeling fisiologis maupun patologis tulang memerlukan kerja osteoklas (Crockett *et al.*, 2011).

2.3 Remodeling Tulang

Remodeling tulang secara normal diperlukan untuk penyembuhan fraktur, sebagai adaptasi kerangka terhadap penggunaan mekanik, dan untuk homeostasis kalsium (Crockett *et al.*, 2011). Ketidakseimbangan antara resorpsi dan pembentukan tulang menyebabkan beberapa penyakit tulang. Resorpsi berlebihan oleh osteoklas tanpa pembentukan sejumlah tulang baru oleh osteoblas berkontribusi terhadap kehilangan tulang dan osteoporosis. Sedangkan bila pembentukan tulang oleh osteoblas tidak diimbangi dengan resorpsi oleh osteoklas akan mengakibatkan osteopetrosis. Dengan demikian, keseimbangan antara pembentukan tulang dan resorpsi tulang sangat diperlukan. Keseimbangan ini bergantung pada aksi beberapa faktor lokal dan sistemik termasuk hormon, sitokin, kemokin, dan stimulasi biomekanik (Silva *et al.*, 2015)

2.3.1 Proses Remodeling Tulang



Gambar 2.2 Proses remodeling tulang (Crockett *et al.*, 2011)

Remodeling yang terjadi secara alami maupun yang diinduksi oleh piranti ortodonti secara mekanik melibatkan koordinasi dari sel osteoklas dan osteoblas (Hikmah *et al.*, 2016). Dengan pemberian gaya mekanik, osteosit berperan sebagai mekanosensor untuk mendeteksi perubahan aliran *bone fluid* melalui kanalikuli tulang, serta merespon melalui transmisi sinyal menuju osteoblas melalui *syncytial process*. Pada proses selanjutnya osteoblas menstimulasi diferensiasi osteoklas dan meresorpsi tulang (Crockett *et al.*, 2011).

Faktor penting yang berperan dalam metabolisme tulang yaitu *receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand* (RANKL), *receptor activator of NF-kappa- β* (RANK), dan osteoprotegerin (OPG) (Vinod dan Ze 'ev, 2015). Ikatan RANKL dengan reseptor RANK dalam prekursor osteoklas akan menginduksi pembentukan osteoklas. OPG yang diproduksi oleh osteoblas akan berikatan dengan RANKL untuk mencegah interaksi RANK – RANKL sehingga menghambat osteoklastogenesis. Oleh karena itu sistem RANKL – RANK – OPG disebut sebagai mediator utama osteoklastogenesis (Silva *et al.*, 2015).

Proses remodeling tulang diawali oleh terjadinya *microdamage* pada permukaan tulang dilanjutkan oleh proses inflamasi akut. Proses inflamasi menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah dan peningkatan permeabilitasnya bersamaan dengan sintesis prostaglandin, *growth factor* (GF) dan sitokin inflamasi (Vinod dan Ze 'ev, 2015). Kemudian leukosit akan bermigrasi secara kemotaksis keluar dari lumen pembuluh darah menuju daerah *microdamage*. Inhibisi leukotrien atau sintesis prostaglandin akan menghambat proses inflamasi tersebut (Silva *et al.*, 2015).

Limfosit di daerah *microdamage* akan menginduksi preosteoklas di dalam sirkulasi mengekspresikan RANK bersamaan dengan proses fusi preosteoklas menjadi osteoklas yang akan meresorpsi tulang. Osteosit dalam tulang yang mengalami resorpsi menginduksi sintesis GF. Melalui sintesis GF ini, preosteoblas berdiferensiasi menjadi osteoblas dan mengekspresikan RANKL. RANKL osteoblas ini akan berikatan dengan RANK dari preosteoklas untuk meneruskan proses remodeling tulang hingga selesai. Proses ini dihambat oleh ikatan RANKL

dengan OPG yang juga dihasilkan oleh preosteoblas sehingga remodeling tulang terhenti (Crockett *et al.*, 2011).

Setelah seluruh tulang yang rusak sudah teresorpsi, maka osteoklas akan melalui apoptosis. Proses ini dilanjutkan oleh migrasi osteoblas akan menuju area tulang yang telah diresorpsi. Osteoblas kemudian menghasilkan tulang melalui sintesis dan sekresi *directional* kolagen tipe I untuk membentuk protein matriks tulang bersama dengan beberapa jenis kolagen kecil, proteoglikan, fibronektin dan protein tulang spesifik, seperti osteopontin, sialoprotein tulang dan osteokalsin (Crockett *et al.*, 2011). Endapan protein-protein tersebut akan membentuk osteoid fleksibel yang tidak termineralisasi tempat osteoblas tinggal (Vinod dan Ze 'ev, 2015).

Tahap selanjutnya osteoid fleksibel akan termineralisasi dan menjadi tulang. Kekakuan tulang, yang membedakannya dari matriks kolagen lainnya, disebabkan oleh mineral tulang. Mineralisasi dicapai dengan perilisan fosfat secara lokal oleh fosfatase dalam vesikel matriks membran turunan osteoblas di dalam osteoid. Fosfatase dengan lingkungan cairan ekstraseluler yang kaya kalsium menghasilkan nukleasi dan pertumbuhan kristal hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ membentuk tulang keras (Crockett *et al.*, 2011).

2.4 Fluor

Fluor adalah salah satu elemen kimia yang paling elektronegatif dan reaktif karena jari-jari atomnya yang kecil. Sejumlah besar fluor ditemukan pada batuan vulkanik hasil letusan gunung berapi, disolusi batuan dan berbagai aktivitas manusia (pembakaran batu bara, pemrosesan bijih, produksi dan penggunaan pupuk, serta tanaman industri). Fluor juga ditemukan pada perairan alami seperti air laut, air tawar, dan air dekat sumber air panas yang berasal dari gunung berapi (Kanduti *et al.*, 2016). Karena sangat reaktif, di alam fluor tidak ditemukan dalam keadaan elementer melainkan terikat sebagai fluorida anorganik seperti AlF_n , BeF_n dan NaF (Everett, 2011).

Fluorida sebagai elemen kumulatif dapat berperan dalam proses diferensiasi sel-sel pembentuk tulang. Karena perannya tersebut, fluorida dapat

mempengaruhi pembentukan dan resorpsi jaringan tulang serta memengaruhi homeostasis metabolisme mineral tulang (Bhawal *et al.*, 2015). Karena kemampuannya tersebut fluorida sering digunakan sebagai bahan campuran dalam bahan-bahan kedokteran gigi dan produk komersil seperti pasta gigi dan obat kumur (O'Mullane, *et al.*, 2016).

2.4.1 Efek Fluor Terhadap Tulang

Natrium Fluorida (NaF) sebagai salah satu bentuk fluor adalah agen anabolik yang mampu meningkatkan massa tulang, meskipun mekanisme kerjanya masih belum jelas. Natrium Fluorida (NaF) dalam kadar yang berbeda memiliki sifat bifasik, artinya dalam dosis yang berbeda akan memberikan efek yang berbeda bahkan berkebalikan (Everett, 2011). Pergantian tulang yang normal selama remodeling mengarah pada perubahan kandungan fluor yang mencerminkan fluor plasma pada saat itu. Fluor berpengaruh pada diferensiasi osteoblas, pembentukan nodul tulang dan regenerasi tulang (Bhawal *et al.*, 2015).

Osteoblas memiliki peran penting dalam pembentukan dan regulasi osteoklas. Studi oleh Takahashi *et al* (2011) (dalam Pei *et al.*, 2012) menemukan bahwa osteoblas yang teraktivasi akan mengeluarkan lebih banyak sitokin, salah satunya *receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand* (RANKL). Sekresi sitokin ini merangsang pembentukan osteoklas, sehingga meningkatkan resorpsi tulang dan mempertahankan homeostasis metabolisme tulang. Dikatakan oleh Krook dan Minor (1998) serta Lui *et al.*, (2007) (dalam Pei *et al.*, 2012) osteoblas yang diberi fluorida dosis rendah menunjukkan peningkatan proliferasi disertai peningkatan pembentukan tulang. Sedangkan penelitian terbaru oleh Qu *et al* (2008) dan Shibo *et al* (2007) (dalam Pei *et al.*, 2012) menunjukkan bahwa fluorida dapat merangsang ekspresi RANKL dari osteoblas.

Selain RANKL, terdapat gen-gen lain yang mempengaruhi remodeling tulang seperti *transkripsi Runtrelated-2* (Runx2) dan osteokalsin. Runx2 adalah gen master diferensiasi osteoblas, sedangkan osteokalsin umumnya digunakan sebagai marker saat proses diferensiasi osteoblas berlangsung (Yang *et al.*, 2017). Hasil penelitian oleh Yang *et al* (2017) menunjukkan bahwa dibandingkan dengan kontrol, ekspresi Runx2 meningkat dengan stimulasi 1 mg / L dan 4 mg / L

fluorida, dan menurun dengan 16 mg / L fluorida. Selain itu protein osteokalsin juga terekspresi tinggi dalam *bone marrow stem cell* (BMSC) yang diberi fluorida sebanyak 1 mg / L dan 4 mg / L, sedangkan ekspresi osteokalsin berkurang dengan pemberian fluorida 16 mg / L dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa fluorida dosis rendah meningkatkan apoptosis melalui peningkatan diferensiasi osteoblas.

2.5 Caspase-3

Caspase-3 adalah salah satu kelompok caspase atau *cysteine-dependent aspartate proteases* merupakan enzim proteolitik yang diproduksi sebagai zymogen non-aktif (procaspases) dan diaktifkan oleh homodimerisasi atau pembelahan (Svandova *et al.*, 2018). Enzim ini berperan dalam pengendalian kematian dan peradangan sel, namun fungsi caspase tidak terbatas pada kematian sel saja. Caspase juga berperan dalam peristiwa non-apoptosis termasuk proliferasi, supresi tumor, perkembangan saraf dan penuaan (Shalini *et al.*, 2015), diferensiasi eritroid, pembentukan lensa, spermatogenesis, diferensiasi *stem cell*, dan pemangkasan dendrit. Proses pengaktifan caspase oleh sel-sel tersebut serta jenis caspase yang diaktifkan dan dinonaktifkan belum sepenuhnya dipahami (Julien dan James, 2017).

Berdasarkan fungsinya, caspase manusia dibagi menjadi caspase pro-apoptosis dan caspase inflamasi. Caspase pro-apoptosis terdiri atas caspase inisiator yaitu Caspase-2, -8, -9 dan -10, dan caspase eksekutor yaitu caspases-3, -6, dan -7 (Svandova *et al.*, 2018). Caspase inflamatori terdiri atas Caspase-1, -4, -5, -12, -14. Semua caspase eksekutor yaitu Caspase-3, -6 dan -7 diaktifkan melalui Caspase inisiator. Caspase-9 adalah komponen penting untuk aktivasi caspase eksekutor apoptosis. Caspase-9 yang teraktivasi mampu mengaktifkan Caspase-3 dan -7 yang merupakan kunci terkait dengan dimulainya apoptosis. Jadi, keterkaitan Caspase-9, -3 dan -7 memiliki peran penting dalam terjadinya apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa, penghambatan aktivitas Caspase-9 mengarah pada pencegahan apoptosis (Behzadi dan Reza, 2015).

Apoptosis disebut juga sebagai program kematian sel yang diprogram adalah suatu sistem pengaturan untuk menyeimbangkan situasi homeostasis selama pertumbuhan, perkembangan dan diferensiasi pada organisme multiseluler (Behzadi dan Reza, 2015). Apoptosis merupakan keadaan fisiologis yang ditandai oleh perubahan nuklear (kondensasi kromatin nuklear dan fragmentasi nuklear), kontraksi sel, dan kehilangan perlekatan dengan sel yang berdekatan. Proses kematian sel ini diatur oleh faktor regulasi di dalam sel yang dimediasi oleh caspase dan dapat diinduksi atau dihambat oleh faktor eksternal. Apoptosis penting untuk perkembangan dan fungsi normal organisme multiseluler (Mollazadeh *et al.*, 2018).

Caspase-3 memiliki peran penting dalam apoptosis. Caspase-3 mencapai perannya sepanjang degradasi polimerase nuclear dan bertanggung jawab atas apoptosis dalam sistem kekebalan tubuh. Peran caspase-3 memiliki kemiripan yang tinggi dengan peran Caspase-6, dan -7 (Behzadi dan Reza, 2015). Dalam fungsi non-apoptosis, aktivitas Caspase-3 juga penting dalam diferensiasi sel stroma sumsum tulang dan sel tulang (Bell dan Lynn, 2017).

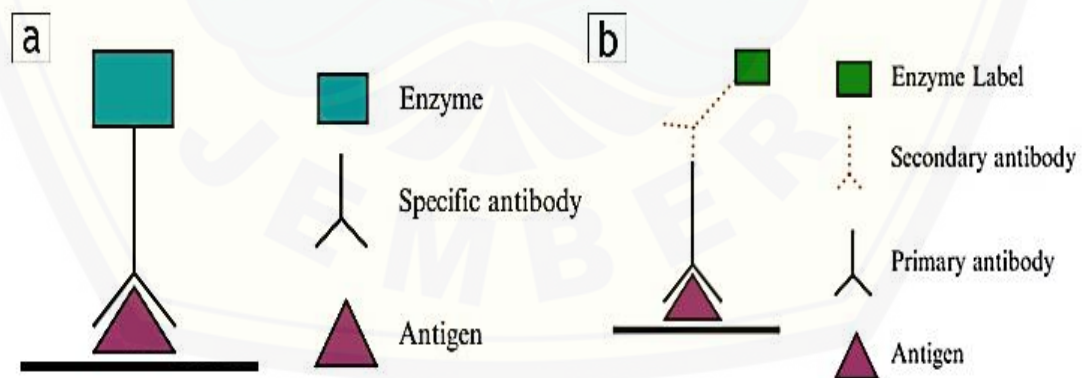
2.6 Imunohistokimia

Imunohistokimia (IHC) adalah teknik untuk identifikasi sel atau konstituen jaringan (antigen) melalui interaksi antigen-antibodi. Teknik ini sering digunakan sebagai prosedur diagnostik tambahan dalam histopatologi. Prinsip IHC telah dikenal sejak tahun 1930-an tetapi baru pada tahun 1942 studi IHC menggunakan antibodi FITC berlabel untuk mengidentifikasi antigen Pneumococcal dalam jaringan murine yang terinfeksi pertama kali dilaporkan. Laporan tersebut mengawali kemajuan dalam konjugasi protein, metode fiksasi jaringan, label deteksi dan mikroskop yang menjadikan Teknik imunohistokimia menjadi teknik penting dalam laboratorium diagnostik dan penelitian. Pewarnaan imunohistokimia menggunakan antibodi fluorofor berlabel (imunofluoresensi) dan enzim berlabel (immunoperoxidase) untuk mengidentifikasi protein ataupun molekul sel lainnya (Kabiraj *et al.*, 2015). Salah satu kelebihan teknik IHC adalah sensitifitas dan spesififikasi yang tinggi dan berlaku untuk hampir semua molekul

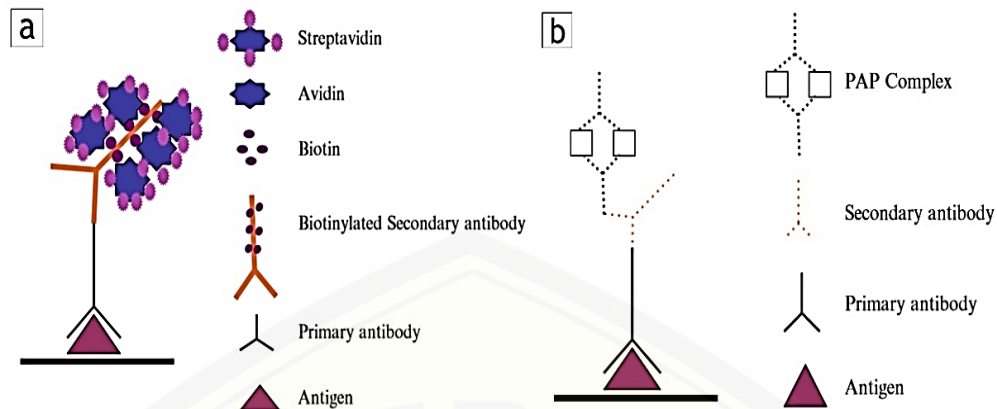
imunogenik dan ditafsirkan dalam konteks morfologis (Katikireddy dan Finbarr, 2011).

Teknik imunohistokimia terbagi menjadi dua, yaitu teknik *direct* dan *indirect*. Teknik *direct* umumnya terdiri dari satu langkah dan melibatkan penggunaan antibodi berlabel secara langsung untuk mendeteksi antigen tertentu di dalam jaringan. Kelebihan teknik ini yaitu mudah dan tidak memakan waktu lama. teknik *direct* IHC menggunakan antibodi utama yang telah diberi label sehingga memudahkan peneliti. namun, teknik *direct* biasanya kurang sensitif dan kurang mampu mengikat antigen dengan sinyal yang lemah. Jumlah antibodi primer berlabel yang dapat untuk digunakan dalam *direct* IHC juga relatif terbatas (Katikireddy dan Finbarr, 2011).

Metode *indirect* menggunakan antibodi primer tanpa label untuk mendeteksi antigen tertentu pada jaringan dan antibodi sekunder berlabel untuk mengikat antibodi primer. Metode *indirect* memperkuat sinyal karena sejumlah antibodi sekunder dapat berikatan dengan antibodi primer, sehingga meningkatkan jumlah produk yang disimpan di lokasi antigen. Pilihan antibodi sekunder berlabel yang dapat digunakan bersama dengan berbagai antibodi primer yang berbeda juga tergolong banyak.



Gambar 2.3 Teknik IHC *direct* (a) dan *indirect* (b) (Katikireddy dan Finbarr, 2011)



Gambar 2.4 Teknik IHC *indirect* Avidin-Biotin Complex (ABC) (a) dan teknik *indirect* Peroxidase Antiperoxidase (PAP) (b) (Katikireddy dan Finbarr, 2011)

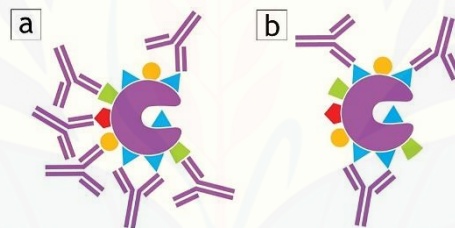
Metode *indirect* dapat menjadi prosedur tiga langkah disebut sebagai metode Avidin-Biotin Complex (ABC) untuk lebih memperkuat sinyal. Salah satu metode tiga langkah yang populer adalah penggunaan antibodi sekunder yang dilabeli dengan biotin. Label biotin ini dapat mengikat sejumlah kompleks avidin / streptavidin yang telah dikaitkan dengan enzim. Contoh lain dari metode tiga langkah *indirect* adalah teknik Peroxidase Antiperoxidase (PAP). Metode PAP menggunakan antibodi sekunder untuk membentuk jembatan antara antibodi primer dan kompleks PAP. Kompleks PAP terdiri dari kombinasi antibodi pelawan horseradish peroxidase dan beberapa molekul horseradish peroxidase. Dengan menggunakan teknik ini, antibodi primer encer dapat digunakan sehingga mengurangi pewarnaan latar belakang (Katikireddy dan Finbarr, 2011).

2.6.1 Antibodi

Sel imun atau sel B menghasilkan antibodi terhadap protein yang ditargetkan. Antibodi ini kemudian dapat mengenali dan mengikat protein yang ditargetkan yang disebut antigen. Lebih khusus, mereka memiliki afinitas untuk situs tertentu pada antigen tersebut yang disebut epitop. Antibodi atau imunoglobulin (Ig) memiliki beberapa kelas atau isotip. Isotip imunoglobulin yang berbeda melakukan fungsi yang berbeda, di tempat yang berbeda dalam tubuh. Antibodi Yang paling sering digunakan yaitu IgG dan IgM dalam bentuk monoklonal ataupun poliklonal (Key, 2006).

Antibodi monoklonal adalah populasi antibodi homogen untuk epitop tunggal yang diproduksi oleh klon individu sel plasma. Produksi antibodi monoklonal paling sering menggunakan tikus. Antibodi poliklonal adalah campuran molekul yang berbeda dengan afinitas, spesifisitas, dan kisaran antigen yang bervariasi. Antibodi jenis ini diproduksi oleh sel yang berbeda dan secara imunokimia berbeda (Nambiar *et al.*, 2016).

Antibodi bereaksi terhadap daerah tertentu (epitop atau penentu antigenik) dari molekul target. Setiap molekul memiliki jumlah dan kelipatan epitop yang berbeda. Antibodi poliklonal dapat bereaksi dengan beberapa jenis epitop dalam antigen, sedangkan antibodi monoklonal hanya dapat bereaksi dengan satu jenis epitop. Meskipun demikian, antibodi monoklonal memiliki spesifisitas yang lebih besar untuk molekul target dibandingkan dengan antibodi poliklonal (Nambiar *et al.*, 2016).



Gambar 2.5 Antibodi poliklonal dan antibodi monoklonal. Antibody poliklonal dapat mengikat antigen berbeda (a), sedangkan antibodi monoklonal hanya dapat mengikat jenis antigen tertentu (b) (Key, 2006)

Epitop tidak terbentuk unik untuk antigen tertentu sehingga terdapat kemungkinan bahwa epitop yang sama (urutan asam amino) dapat ditemukan di tempat lain. Meningkatkan jumlah epitop target, seperti dalam penggunaan antibodi poliklonal, hanya meningkatkan peluang untuk mewarnai molekul lain yang bukan molekul lawan antibodi. Epitop dapat dikenali dari bentuknya. Ketika bentuk epitope terdistorsi, maka antibodi mungkin akan sulit mengenalinya (Nambiar *et al.*, 2016).

2.7 Immuno Ratio Software (IRS)

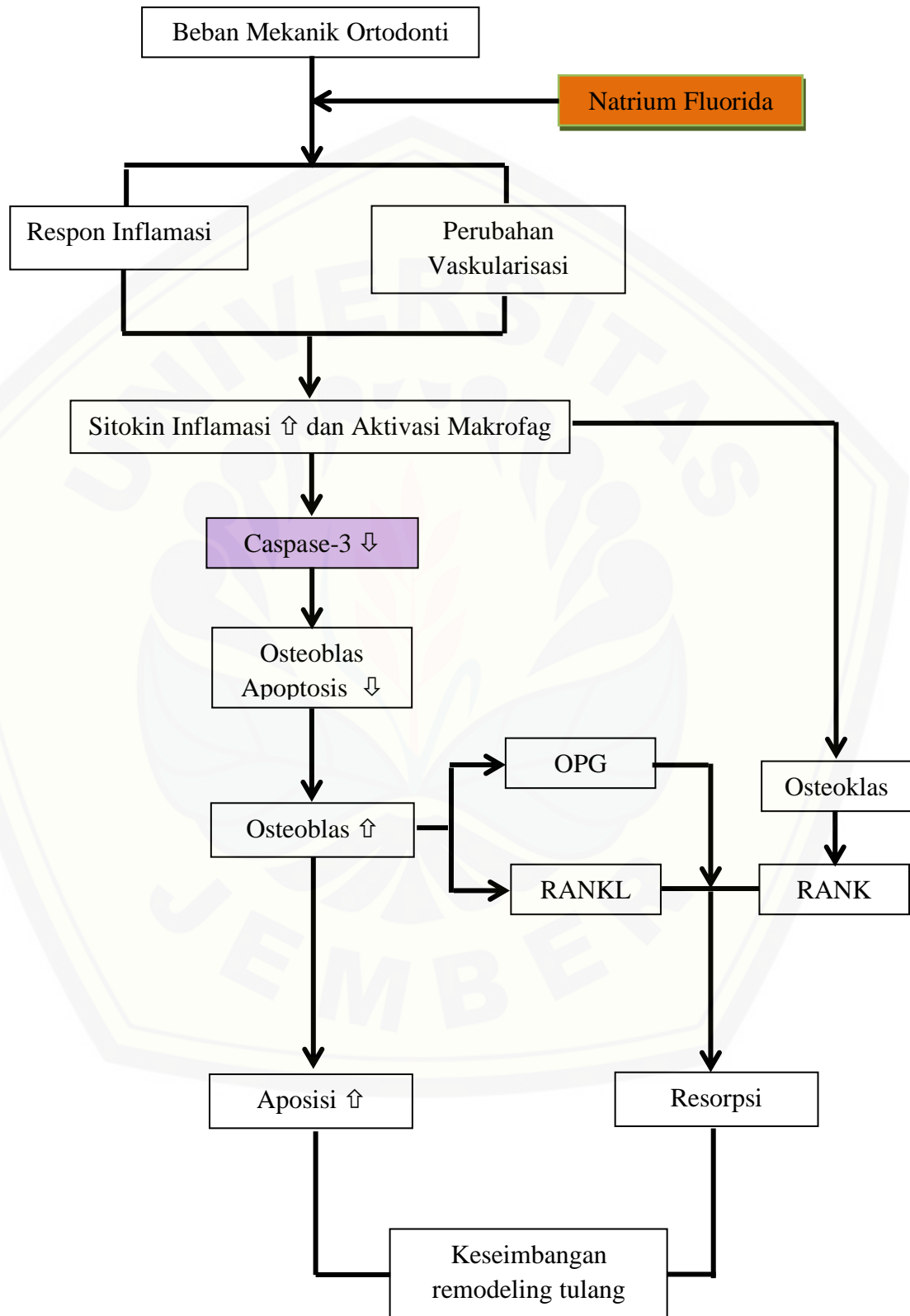
Immuno Ratio Software adalah aplikasi berbasis web yang dapat menghitung presentase jumlah sel dengan antigen dari antibodi primer tertentu dengan cara memisahkan komponen pewarnaanya (hematoksilin dan diaminobenzidine). Aplikasi ini akan memberikan output berupa presentase jumlah sel yang memiliki antigen spesifik dari antibodi yang digunakan dan terwarnai oleh DAB chromogen pada satu lapang pandang. Penggunaannya dapat mempermudah analisa kuantitatif pewarnaan imunohistokimia dengan akurasi yang baik (Rajan *et al.*, 2014).

Immuno Ratio pertama kali dikembangkan sebagai plugin untuk ImageJ perangkat lunak analisis gambar menggunakan bahasa pemrograman Java (Tuominen *et al.*, 2010). Selain *built-in* fungsi ImageJ, algoritma analisis Immuno Ratio menggunakan plugin *calculator plus* untuk koreksi *blankfield*, algoritma *Rolling Ball* untuk pengurangan latar belakang, pengurangan, plugin dekonvolusi warna untuk DAB dan pemisahan noda hematoxylin, Iso Data algoritma untuk thresholding adaptif, dan Algoritma DAS untuk segmentasi inti (Rajan *et al.*, 2014).

Penilaian kuantitatif otomatis dari imunostaining dilakukan dengan metode dasar dan lanjutan. Metode dasar tidak memungkinkan input / penyesuaian oleh pengguna sedangkan metode lanjutan memungkinkan koreksi latar belakang, penyesuaian skala gambar dan penyesuaian ambang batas warna. Hasilnya dinyatakan sebagai persentase positif. Outputnya adalah montase stain IHC asli dan gambar yang dianalisis (Vijayashree *et al.*, 2015)

Immuno Ratio dapat di akses secara bebas atau digunakan secara online melalui perambah (browser) internet. Immuno Ratio mendukung semua jenis perambah dan sistem operasi komputer. Immuno Ratio dapat digunakan secara *offline* sebagai plugin dari perangkat lunak pengolahan citra ImageJ. ImageJ adalah perangkat lunak pengolahan citra yang dikembangkan dalam bahasa Java sehingga dapat digunakan pada semua sistem operasi komputer. ImageJ dikembangkan oleh research services branch (RSB), National Institute of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA (Ramadhani *et al.*, 2012).

2.8 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka Konsep

2.9 Penjelasan Kerangka Konsep

Beban mekanik oleh aplikasi peranti ortodonti pada gigi akan menyebabkan terjadinya perubahan vaskuler diikuti dengan proses inflamasi akibat peregangan serat PDL. Kedua proses tersebut menghasilkan sitokin-sitokin proinflamasi dan mengaktifasi makrofag yang memediasi terjadinya remodeling berupa resorpsi pada daerah tekanan dan aposisi pada daerah tarikan.

Aktivasi makrofag pada daerah tekanan memicu perekrutan preosteoklas yang mengarah pada osteoklastogenesis. Proses ini memperbanyak jumlah osteoklas sehingga osteoklas akan meresorpsi tulang alveolar. Peningkatan jumlah sitokin inflamasi juga menyebabkan peningkatan respon stres sel osteoblas berupa sintesis RANKL dan aktivasi sinyal apoptosis osteoblas. Respon stres sel osteoblas berupa sintesis RANKL mempertahankan terjadinya osteoklastogenesis. Kemudian RANKL osteoblas akan berikatan dengan RANK osteoklas yang akan meneruskan proses terjadinya kerusakan tulang alveolar akibat resorpsi tulang agar gigi bergerak. Selanjutnya sinyal apoptosis sel osteoblas menurunkan jumlah osteoblas sehingga menghambat proses aposisi tulang di daerah tarikan.

Pemberian gel NaF meningkatkan aposisi tulang ditandai adanya peningkatan proliferasi osteoblas dan penurunan apoptosis osteoblas. NaF menurunkan apoptosis osteoblas melalui penekanan aktivasi Caspase-3 yang merupakan protease penginduksi apoptosis. Dengan penekanan aktivasi Caspase-3 yang ditandai dengan penurunan ekspresinya, maka tingkat kematian osteoblas melalui apoptosis dapat ditekan. Dengan demikian, osteoblas pada sisi tarikan dapat ditingkatkan melalui proliferasi preosteoblas dan dapat dipertahankan jumlahnya.

Osteoblas memproduksi OPG, sebuah inhibitor osteoklastogenesis melalui ikatannya dengan RANKL. OPG mencegah ikatan RANK dengan RANKL sehingga proses osteoklastogenesis dihambat. Proses ini pada akhirnya dapat memperlambat proses resorpsi tulang di daerah tekanan dan proses aposisi tulang pada daerah tarikan dapat meningkat mengimbangi proses resorpsi tulang yang terjadi.

2.10 Hipotesis

Natrium Fluorida (NaF) dapat menurunkan ekspresi Caspase-3 sehingga tingkat kematian osteoblas melalui apoptosis ditekan dan jumlah osteoblas yang diproliferasi dapat dipertahankan jumlahnya. Jumlah osteoblas yang stabil akan meningkatkan proses aposisi tulang yang mengimbangi proses resorpsi tulang oleh osteoklas dan diperoleh kestabilan perawatan ortodonti.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah kuantitatif eksperimental laboratoris yang merupakan suatu bentuk penelitian dimana variabel dimanipulasi sehingga dapat dipastikan pengaruh dan efek variabel tersebut terhadap variabel lain yang diobservasi. Dalam penelitian aspek-aspek yang diteliti atau variabel yang diukur diawasi, dikontrol dan dikendalikan sehingga dapat ditentukan hubungan atau pengaruh salah satu sifat, preposisi, maupun disposisi terhadap aspek lainnya (Yusuf, 2017).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Posttest Only Control Group Design*, yaitu dengan cara memilih kelompok eksperimen dan kelompok kontrol secara random. Selanjutnya kelompok eksperimen akan dikenakan perlakuan. pada akhir kegiatan sesudah perlakuan selesai diberikan, maka dilakukan *post test* pada kedua kelompok agar dapat diketahui efek perlakuan pada unit eksperimen (Yusuf, 2017). Pengukuran variabel dilakukan setelah perlakuan selama 7 dan 14 hari. 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:

- a. Perlakuan hewan coba di Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- b. Pembuatan gel Natrium Fluoride (NaF) di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- c. Pembuatan preparat histologi di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

- d. Pembacaan preparat di Laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi CDAST Universitas Jember.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2019 sampai Januari 2020.

3.4 Sampel Penelitian

3.4.1 Subjek Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus Wistar jantan (*Ratus norvegicus*).

3.4.2 Besar sampel penelitian

Besar sampel ditentukan berdasarkan jumlah ulangan yang dianggap telah cukup baik dengan menggunakan rumus (Daniel, 2013):

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

Keterangan:

n = Besar sampel tiap kelompok

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

σ = Standar deviasi sampel

d = Kesalahan yang masih dapat ditoleransi

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

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

$$n \geq Z^2$$

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

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan, diperoleh jumlah sampel masing-masing kelompok adalah sebesar 4 ekor. Pada penelitian ini terbagi secara acak 1

kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol dengan waktu pengamatan selama 7 dan 14 hari, sehingga besar sampel yang diperlukan sebanyak 16 ekor yang terbagi dalam 4 kelompok.

3.4.3 Kriteria Sampel

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kriteria:

a. Jenis kelamin

Tikus wistar yang digunakan berjenis kelamin jantan. Pemilihan jenis kelamin ini ditujukan untuk menghindari pengaruh dari hormon-hormon seks wanita (estrogen) terhadap aktivitas sel osteoblas.

b. Kondisi Fisik

tikus dalam keadaan sehat dan tidak mengalami kelainan.

c. Umur dan berat badan

Tikus yang digunakan mencapai umur dewasa yaitu 4-5 bulan dengan berat badan 200-250 gram. Penentuan umur dan berat badan ini ditujukan agar hewan coba mempunyai proses remodeling yang adekuat dan juga untuk menghindari pengaruh hormon-hormon pertumbuhan.

d. Pakan yang sesuai dan seragam

Tikus yang digunakan sebagai hewan coba diberi makanan dengan jenis yang sama dan disesuaikan agar mempunyai berat badan yang cukup ideal dan status kesehatan yang tetap baik.

e. Aklimatisasi

Aklimatisasi dilakukan selama seminggu sebelum tikus diberi perlakuan sebagai adaptasi tikus dengan lingkungannya yang baru (Sutjiati, 2016).

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

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

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah Caspase-3.

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain:

- a. Pemilihan hewan coba meliputi jenis hewan coba, jenis kelamin hewan coba, umur hewan coba, dan berat badan hewan coba.
- b. Tatalaksana pemeliharaan hewan coba meliputi pemberian makan dan minum, jenis makan dan minum, dan pembersihan kandang.
- c. Bahan, dosis dan cara pemberian anastesi.
- d. Bahan, dosis dan cara pemberian perlakuan.
- e. Lokasi gigi dan pergerakan gigi.
- f. Waktu evaluasi.
- g. Metode pemeriksaan.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Natrium Fluorida

Bahan Fluorida yang digunakan dalam penelitian ini adalah bubuk Natrium Fluorida (NaF) yang dibuat menjadi gel dengan dosis 11,34 ppm. Gel ini diberikan secara topikal ke dalam sulkus gingiva gigi insisif maksila tikus Wistar jantan (Sutjiati, 2016).

3.6.2 Ekspresi Caspase-3

Dalam penelitian ini ekspresi caspase-3 yang dilihat pada daerah tekanan dan tarikan, dilakukan dengan pemeriksaan imunohistokimia. Ekspresi caspase-3 berupa jumlah sel Osteoblas yang positif ditandai adanya warna coklat pada sitoplasma sel Osteoblas.

3.6.3 Kekuatan Mekanik Ortodonti

Besar tekanan mekanik Ortodonti yang diberikan dalam penelitian ini diaplikasikan pada gigi insisif maksila tikus Wistar jantan untuk menggerakkan gigi insisif ke arah palatal dengan menggunakan *closed coil spring* (NiTi) sebesar 10 gram/cm² yang diukur menggunakan *tension gauge*.

3.7 Konversi Dosis

3.7.1 Dosis Natrium Fluorida

Bahan yang digunakan adalah Natrium Fluorida (NaF) dalam bentuk gel dengan dosis 11,34 ppm yang merupakan sediaan fluorida yang aman untuk tikus Wistar jantan seberat 200-250 gram yang digunakan dalam penelitian ini. Pemberian gel Natrium Fluorida (NaF) pada tikus Wistar jantan dilakukan 2 kali sehari, yaitu pada pagi dan sore hari.

Dosis yang digunakan sebagai berikut:

Dosis optimal fluor 2,16 mg/kg/hari

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

Rumus = (Dosis optimal × Berat badan × Hari)

$$= (2,16 \text{ mg/kg/hari} \times 0,25 \text{ kg} \times 7 \text{ hari}) + (2,16 \text{ mg/kg/hari} \times 0,25 \text{ kg} \times 14 \text{ hari})$$

$$= 3,78 \text{ mg} + 7,56 \text{ mg}$$

$$= 11,34 \text{ mg}$$

Jadi, dosis fluor dalam mg adalah 11,34 mg dan jika dilarutkan dalam 1 liter aquadest menjadi 11,34 ppm (mg/L).

Volume yang diberikan :

Konsentrasi optimal 0,2 % = 0,2 gr / 100 mL = 200 mg / 100 mL = 2 mg/mL

$$\text{Rumus} = \frac{\text{Dosis optimal} \times \text{Berat badan}}{\text{Konsentrasi optimal}}$$

$$= \frac{2,16 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}}{2 \text{ mg/mL}}$$

$$= 0,216 \text{ mL}$$

$$= \frac{2,16 \text{ mg} \times 0,25 \text{ kg}}{2 \text{ mg/mL}}$$

$$= 0,27 \text{ mL}$$

Jadi Volume gel yang diberikan sebesar 0,2 – 0,3 mL.

3.7.2 Dosis Bahan Anestetikum

Bahan anestesi yang digunakan berupa campuran ketamin dan xylazine. Ketamin 10% (dosis 50 mg/kg) dan Xylazine 2% (dosis 5 mg/kg) secara intramuskuler (Hartiningsih et al., 2015).

- a. Dosis Ketamin yang digunakan :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 10\% Ketamin} &= \frac{10 \text{ gr}}{100 \text{ mL}} \\ &= \frac{10.000 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \\ &= 100 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \text{Rumus} &= \frac{\text{Dosis} \times \text{Berat badan hewan}}{\text{Konsentrasi}} \\ &= \frac{50 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}}{100 \text{ mL}} \\ &= 0,1 \text{ mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} &= \frac{50 \text{ mg} \times 0,25 \text{ kg}}{100 \text{ mL}} \\ &= 0,125 \text{ mL} \end{aligned}$$

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

- b. Dosis Xylazine yang digunakan :

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi 2\% Xylazine} &= \frac{2 \text{ gr}}{100 \text{ mL}} \\ &= \frac{2.000 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \\ &= 20 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

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

$$\text{Rumus} = \frac{\text{Dosis} \times \text{Berat badan hewan}}{\text{Konsentrasi}}$$

$$\begin{aligned} &= \frac{5 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}}{20 \text{ mg/mL}} \\ &= 0,05 \text{ mL} \\ &= \frac{5 \text{ mg} \times 0,25 \text{ kg}}{20 \text{ mg/mL}} \\ &= 0,0625 \text{ mL} \end{aligned}$$

Jadi dosis Xylazine yang digunakan adalah 0,05 – 0,0625 mL.

3.8 Bahan dan Alat Penelitian

3.8.1 Bahan Penelitian

- a. Bubuk Natrium Fluorida
- b. Carbopol 1%, TEA 3%, dan propilen glikol 3%
- c. Pakan standar hewan coba dan air minum
- d. Bahan anestetikum Ketamin dan Xylazine
- e. Semen Glass Ionomer Tipe IX
- f. Buffer neutral formalin 10%
- g. Asam formiat 10%
- h. Phosphate buffer saline
- i. Alkohol 100%, 95%, 80%, 70%
- j. Xylol
- k. Paraffin
- l. Meyer egg albumin
- m. Aquades steril
- n. Peroxidase blocking solution
- o. Prediluted blocking serum
- p. Antibody primer Caspase-3
- q. Antibody sekunder biotin
- r. Horseradish peroxidase (HRP)
- s. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)
- t. Mayer's Hematoxylin

- u. Bluing reagent
- v. Entelan

3.8.2 Alat Penelitian

- a. Handscoon dan masker
- b. Timbangan analitik
- c. Mortar dan alu
- d. Pipet
- e. Beaker glass
- f. Gelas ukur
- g. Homogenizing mixer
- h. Kandang peliharaan hewan coba
- i. Tempat makan dan tempat minum hewan coba
- j. Timbangan berat badan hewan coba
- k. Disposable syringe 1 ml
- l. Mikromotor contra angle low speed
- m. Diamond round bur
- n. Ni-Ti *closed coil spring*
- o. Stainless steel ligature wire
- p. Tension gauge
- q. Excavator, sonde setengah lingkaran, scalpel, arteri clamp, pinset
- r. Syringe modifikasi
- s. Knabel tang
- t. Pot jaringan
- u. Base mold
- v. Tissue cassette
- w. Mikrotom
- x. Inkubator
- y. Object glass
- z. Deck glass
- aa. Water bath
- bb. Slide warmer

- cc. Mikropipet
- dd. Staining jar
- ee. Mikroskop cahaya
- ff. Kamera mikroskop optilab

3.9 Prosedur Penelitian

3.9.1 Perijinan *Ethical Cleareance*

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

3.9.2 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba dilakukan adaptasi dengan tempat tinggal, makanan dan minuman selama 7 hari sebelum diberikan perlakuan.

3.9.3 Pembagian Kelompok Perlakuan

Hewan coba yang sudah diadaptasikan akan dibagi menjadi 4 kelompok sebagai berikut:

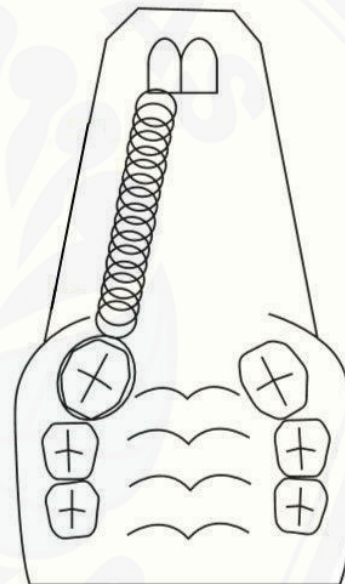
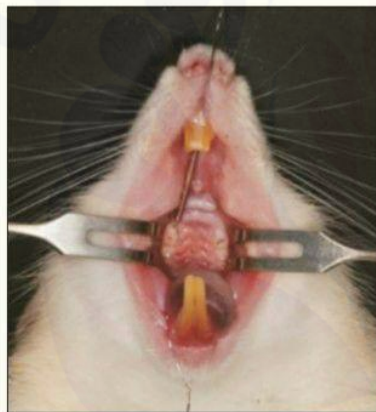
- a. Kelompok A merupakan kelompok kontrol yang diberi kekuatan mekanik ortodonti berupa pemasangan Ni-Ti *closed coil spring* selama 7 hari sebanyak 4 ekor.
- b. Kelompok B merupakan kelompok kontrol yang diberi kekuatan mekanik ortodonti berupa pemasangan Ni-Ti *closed coil spring* selama 14 hari sebanyak 4 ekor.
- c. Kelompok C merupakan kelompok perlakuan yang diberi kekuatan mekanik ortodonti berupa pemasangan Ni-Ti *closed coil spring* dengan pemberian gel Natrium Fluorida (NaF) selama 7 hari sebanyak 4 ekor.
- d. Kelompok D merupakan kelompok perlakuan yang diberi kekuatan mekanik ortodonti berupa pemasangan Ni-Ti *closed coil spring* dengan pemberian gel Natrium Fluorida (NaF) selama 14 hari sebanyak 4 ekor.

3.9.4 Persiapan Gel Natrium Fluorida (NaF)

Natrium Fluorida (NaF) diperoleh dalam bentuk bubuk berwarna putih yang diproses menjadi bentuk gel. Pembuatan gel tersebut dilaksanakan di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember. Dosis Natrium Fluorida yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebesar 11,34 ppm. Pembuatan gel dilakukan dengan cara mencampurkan Natrium Fluorida (NaF) sebanyak 11,34 mg, carbopol sebanyak 1%, TEA sebanyak 3%, dan propilen glikol sebanyak 3% dalam 1 liter aquades steril menggunakan mortar dan alu.

3.9.5 Perlakuan Hewan Coba

a. Pemasangan *closed coil spring*



Gambar 3.1 Ilustrasi pemasangan *closed coil spring* pada tikus (Minato *et al.*, 2018)

- 1) Injeksi anastesi menggunakan campuran ketamin dan xylazine secara intramuskuler.
- 2) Pembuatan cekungan dengan *round bur* pada sisi mesiodistovertical insisif maksila.
- 3) Pemasangan Ni-Ti *closed coil spring* pada cekungan yang telah dibuat. Fiksasi dengan 0,1 mm *stainless steel ligature wire* yang dipasang mengelilingi gigi insisif maksila.

- 4) Pengukuran kekuatan Ni-Ti *closed coil spring* dengan menggunakan *tension gauge* untuk menghasilkan kekuatan sebesar 10 gr/cm^2 .
 - 5) Pemasangan Ni-Ti *closed coil spring* pada gigi molar pertama kanan maksila. Fiksasi dengan 0,1 mm *stainless steel ligature wire* mengelilingi gigi molar pertama kanan maksila.
 - 6) Retensi ditingkatkan dengan pengaplikasian *glass ionomer cement* setelah pemasangan *stainless steel ligature wire* (Sella, 2012).
- b. Hewan coba pada kelompok C dan D diberi perlakuan gel Natrium Fluorida (NaF) 11,34 ppm secara topikal ke dalam sulkus gingiva gigi insisif maksila dengan syringe modifikasi sebanyak dua kali sehari. Pemberian Natrium Fluorida (NaF) pada hewan coba dilakukan setelah hewan coba diberi makan dua kali sehari (Sutjiati, 2016).

3.9.6 Euthanasia Hewan Coba

Dilakukan dekaputasi hewan coba kelompok A dan C pada hari ke-8 dan kelompok B dan D pada hari ke-15. Euthanasia hewan coba dilakukan dengan injeksi ketamin overdosis secara intramuskular. 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 dilakukan euthanasia.

3.9.7 Tahapan pembuatan Sediaan dan Pemeriksaan Imunohistokimia

- a. Fiksasi Jaringan dengan Larutan Buffer Neutral Formalin 10%
Jaringan yang sudah terambil harus segera dilakukan fiksasi secepatnya untuk menjaga sel dan komponen jaringan pada keadaan "*life-like state*" dengan menggunakan larutan Buffer Neutral Formalin 10%. Larutan ini akan menghentikan proses autolisis jaringan melalui inaktivasi enzim hidrolisis dari lisosom sehingga didapatkan morfologi seluler yang lebih baik untuk dianalisis serta

menstabilkan struktur jaringan baik di dalam maupun di antara sel dengan membuat molekul menjadi resisten terhadap disolusi air dan cairan lainnya. Fiksasi jaringan dilakukan setidaknya selama 12 - 24 jam.

b. Dekalsifikasi Jaringan dalam Larutan Asam Formiat 10%

Dilakukan dekalsifikasi pada jaringan dengan menggunakan Asam Formiat 10% selama 7 hari. Proses ini bertujuan untuk menghilangkan mineral dari tulang atau jaringan yang mengandung garam kalsium lain sehingga didapatkan sediaan yang baik dan lunak tanpa adanya kerusakan akibat jaringan yang keras pada saat pemrosesan (Khristian dan Dewi, 2017). Jaringan dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline/ PBS* 3 – 5 kali untuk membersihkan dari kontaminan (Santoso, 2006). Proses dekalsifikasi selesai ditandai dengan jaringan yang sudah lunak (Khristian dan Dewi, 2017).

c. Pemrosesan Jaringan

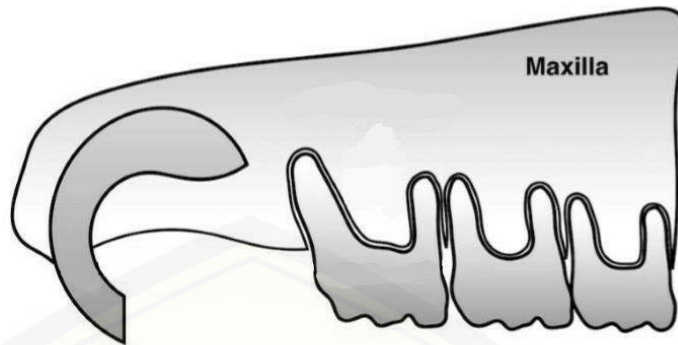
1) Dehidrasi yaitu mengeluarkan seluruh air dan cairan fiksatif dari dalam jaringan (Khristian dan Dewi, 2017) dengan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi. Pada penelitian ini dehidrasi dilakukan menggunakan alkohol. Tahapan dehidrasi sebagai berikut :

- a) Alkohol 70 % = ± 15 menit
- b) Alkohol 80 % = 1 jam
- c) Alkohol 95 % = 2 jam
- d) Alkohol 95 % = 1 jam
- e) Alkohol 100 % = 1 jam
- f) Alkohol 100 % = 1 jam
- g) Alkohol 100 % = 1 jam

Beberapa tanda keberhasilan dehidrasi, antara lain: tidak terlihatnya lagi aliran perpindahan larutan ketika dimasukkan ke dalam larutan dehidrasi terakhir; jaringan tersebut terlihat berwarna abu-abu atau pucat; tekstur jaringan lunak dan rapuh (Khristian dan Dewi, 2017).

- 2) *Clearing* yaitu proses penjernihan dengan mengeluarkan cairan dehidrasi dan menggantinya dengan suatu larutan yang dapat berikatan dengan media infiltrasi menggunakan bahan *clearing* seperti xylol, toluel, dan benzene (Khristian dan Dewi, 2017). Pada penelitian ini *clearing* dilakukan menggunakan xylol. Tahapan *clearing* sebagai berikut :
 - a) Xylol = 1 jam
 - b) Xylol = 2 jam
 - c) Xylol = 2 jam
- 3) Impregnasi atau infiltrasi yaitu proses memasukkan filtrat ke dalam jaringan sehingga jaringan tersebut mengeras akibat filtrat pada suhu ruang. Parafin adalah filtrat yang paling banyak digunakan untuk infiltrasi dan *embedding*. Impregnasi dengan parafin dilakukan 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 filtrat yaitu parafin titik didih 56°- 60°C. Jaringan yang terinfiltrasi oleh parafin akan membentuk matriks sehingga mencegah kerusakan struktur jaringan selama pemotongan (Khristian dan Dewi, 2017). Tahapan impregnasi sebagai berikut :
 - a) Paraffin (56°-60°C) = 2 jam
 - b) Paraffin (56°-60°C) = 2 jam
 - c) Paraffin (56°-60°C) = 2 jam
- 4) Pembuatan Blok Jaringan (*embedding*). *Embedding* merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding*, yaitu paraffin, cellulose, dan *tissue text* (Khristian dan Dewi, 2017). Pada penelitian ini menggunakan paraffin titik didih 56°-60°C. Tahapan *embedding* sebagai berikut :
 - a) Tuangkan paraffin cair secukupnya ke dalam *base mold*.
 - b) Posisikan jaringan sesuai dengan yang diharapkan.

- c) Dinginkan dasar dari *base mold* sehingga posisi tidak terjadi perubahan.
 - d) Tutup dengan kaset jaringan.
 - e) Tuangkan paraffin cair kembali hingga batas maksimal.
 - f) Dinginkan dengan kondisi alas *base mold* dingin.
- 5) Tahapan Penyayatan Jaringan. Untuk pengamatan secara mikroskopis penyayatan jaringan dilakukan dengan ketebalan tertentu menggunakan suatu teknik dan instrument khusus agar diperoleh sediaan jaringan yang representatif. Instrument yang biasa digunakan adalah mikrotom dengan pisau khusus secara vertikal, sehingga didapatkan pita jaringan dengan ketebalan tertentu dan seragam (Khristian dan Dewi, 2017). Tahap penyayatan jaringan yaitu:
- a) Olesi *object glass* dengan meyer egg albumin dan tempelkan blok paraffin pada *block 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 dalam *waterbath* dengan temperatur tetap 56°-58°C hingga sayatan mekar.
 - e) Ambil sayatan yang telah mekar dengan *object glass* yang telah diolesi dengan *meyer egg* albumin, dan keringkan dengan *hotplate* dengan suhu sekitar 30-35°C, minimal selama 12 jam.



Gambar 3.2 Ilustrasi arah pemotongan jaringan (Kraiwattanapong dan Samruajbenjakun, 2018)

- 6) Tahapan Pewarnaan Jaringan. Prosedur pewarnaan menggunakan teknik imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember adalah sebagai berikut:
 - a) Sediaan dilakukan deparafinisasi preparat menggunakan larutan xylol sebanyak tiga kali, masing-masing selama 10 menit.
 - b) Rehidrasi menggunakan etanol absolut sebanyak 3 kali, masing-masing selama 10 menit kemudian inkubasi preparat selama 24 jam dengan suhu 3⁰C.
 - c) Keluarkan preparat hingga uap menghilang.
 - d) Cuci preparat menggunakan aquadest sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit
 - e) Bersihkan *object glass* kemudian tetesi preparat dengan peroxidase blocking solution sebanyak 2 tetes kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 40 menit.
 - f) Cuci preparat menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
 - g) Bersihkan *object glass* kemudian tetesi preparat dengan *prediluted blocking serum* sebanyak 100 μ L menggunakan mikropipet kemudian inkubasi dengan suhu 3⁰C selama 24 jam.
 - h) Cuci preparat menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit.

- i) Rendam preparat dalam antibodi Caspase-3 sebanyak 80 μL menggunakan mikropipet kemudian inkubasi dengan suhu 3°C selama 24 jam.
- j) Cuci preparat dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
- k) Rendam preparat dengan antibodi sekunder sebanyak 2 tetes kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 60 menit.
- l) Cuci preparat dengan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak tiga kali, masing-masing selama 5 menit.
- m) Rendam preparat dengan *horseradish peroxidase* (HRP) sebanyak 2 tetes kemudian inkubasi pada suhu ruang selama 40 menit.
- n) Cuci preparat dengan *phosphate buffer saline* (PBS) selama 5 menit.
- o) Aliri preparat dengan aquadest.
- p) Rendam preparat dengan *diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) sebanyak 100 μL menggunakan mikropipet selama 15 menit kemudian bilas dengan aquadest.
- q) Tetesi preparat dengan *mayer's hematoxylin* selama 2 menit sebanyak 2 tetes.
- r) Cuci preparat dengan air mengalir.
- s) Tetesi preparat dengan *bluing reagent* sebanyak 2 tetes selama 30 detik.
- t) Cuci preparat dengan air mengalir.
- u) Inkubasi pada suhu 60°C selama 24 jam
- v) Bersihkan preparat lalu tetesi dengan entellan kemudian ditutup dengan *cover glass* (Sutjiati, 2016; Yusuf, 2017).

3.9.8 Prosedur Pengamatan Ekspresi Caspase-3

Pengamatan dan perhitungan jumlah ekspresi Caspase-3 sel osteoblas dilakukan di Laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi CDAST

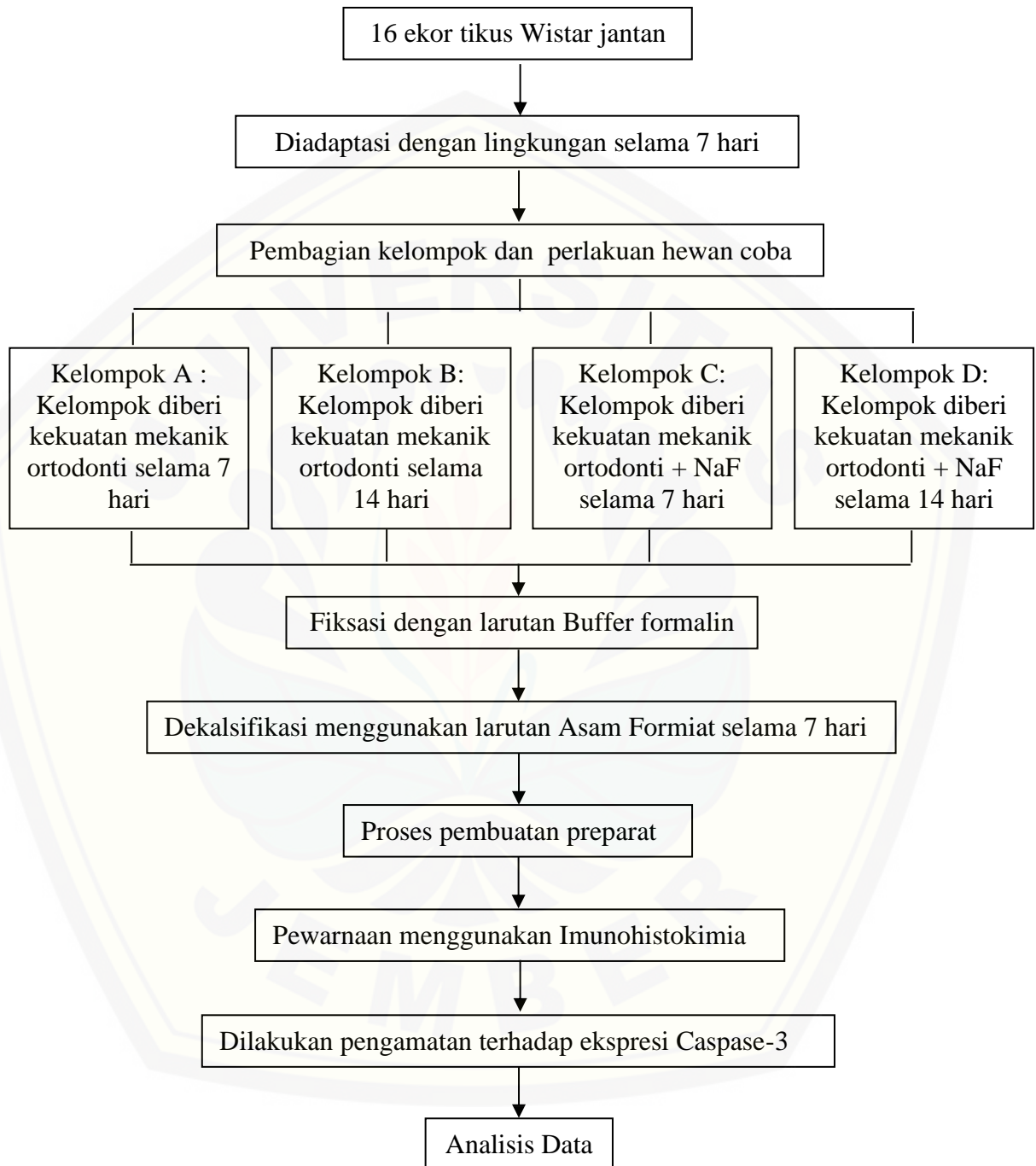
Universitas Jember. Setiap sampel jaringan yang telah diwarnai dengan teknik imunohistokimia diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40×, 100×, dan 400× kemudian dilakukan pengambilan gambar dengan menggunakan kamera optilab sebanyak jumlah sampel. Daerah perhitungan jumlah ekspresi Caspase-3 sel osteoblas ditentukan melalui perbesaran 400× dan diambil gambar dengan menggunakan kamera optilab sebanyak jumlah sampel.

Perhitungan jumlah ekspresi Caspase-3 sel osteoblas dilakukan menggunakan aplikasi Immunoratio Software (IRS). Hasil gambar preparat dengan perbesaran 400× yang sebelumnya telah diperoleh melalui kamera optilab dimasukkan dalam aplikasi Immunoratio Software (IRS). Aplikasi tersebut akan memberikan persentase ekspresi Caspase-3 sel osteoblas. Pengamatan ini dilakukan dengan dua pengamat untuk menghindari dari subjektivitas. (Sutjiati R, 2016; Yusuf, 2017).

3.10 Analisis Data

Data hasil penelitian ini akan ditampilkan dalam bentuk tabel yang berisi jumlah ekspresi Caspase-3 pada masing-masing sampel dan besarnya rata-rata pada seluruh kelompok disertai gambar. Data hasil penelitian ini akan diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan diuji homogenitasnya dengan uji *Levene* untuk mengetahui keseragaman data penelitian. Kemudian dianalisis menggunakan uji *One-Way Anova*, yaitu uji parametrik lebih dari 2 sampel bebas untuk menganalisa rata-rata jumlah ekspresi Caspase-3 .

3.11 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur Penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang dilakukan maka dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Pemberian Natrium Fluorida (NaF) 11,34 ppm pada sulkus gingiva gigi insisivus maksila tikus Wistar jantan yang diberi gaya mekanis ortodonti 10 gram/cm² menurunkan jumlah ekspresi Caspase-3 sel osteoblas dibanding tikus tanpa pemberian Natrium Fluorida (NaF).
2. Perbedaan ekspresi Caspase-3 sel osteoblas secara signifikan ditunjukkan oleh kelompok D (perlakuan 14 hari) dibandingkan dengan kelompok B (kontrol 14 hari) dan kelompok D (perlakuan 14 hari) dibandingkan dengan kelompok C (perlakuan 7 hari).

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka saran yang dapat diajukan sebagai berikut :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan jarak waktu pengamatan yang lebih panjang.
2. Perlu dilakukan pengukuran jarak gigi insisiv maksila tikus Wistar jantan dengan gigi molar maksila kanan pada saat awal pemasangan dan akhir pengamatan untuk mengetahui pergerakan gigi yang terjadi.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan variasi konsentrasi, bentuk sediaan dan cara pemberian NaF pada gigi yang dikenai kekuatan mekanik ortodonti.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin M. N. dan N. Permatasari. 2016. Aspek Biologis Pergerakan Gigi secara Ortodonsi. *Stomatognatic (Jurnal Kedokteran Gigi Unej)* 13 (1): 22-27.
- Ardhana W.. 2013. Identifikasi Perawatan Ortodontik Spesialisti dan Umum. *Majalah Kedokteran Gigi* 20 (1):1-8.
- Ariffin S. H. Z., Z. Yamamoto, I. Z. Z. Abidin, R. M. A. Wahab, dan Z. Z. Ariffin. 2011. Cellular and Molecular Changes in Orthodontic Tooth Movement. *The Scientific World Journal* 11:1788–1803.
- Asiry M. A. 2018. Biological Aspects Of Orthodontic Tooth Movement A Review Of Literature. *Saudi Journal of Biological Sciences* xxx xxx–xxx.
- Behzadi P. dan R. Ranjbar. 2015. Caspases and Apoptosis. *iMedPub Journals* 1(2):6.
- Bell R. A. V. dan L. A. Megeney. 2017. Evolution Of Caspase-Mediated Cell Death And Differentiation: Twins Separated At Birth. *Cell Death and Differentiation* 24:1359–1368.
- Bhawal U. K., H. J. Lee, K. Arikawa, M. Shimosaka, M. Suzuki, T. Toyama, T. Sato, R. Kawamata, C. Taguchi, N. Hamada, I. Nasu, H. Arakawa dan K. Shibutani. 2015. Micromolar Sodium Fluoride Mediates Anti-Osteoclastogenesis In Porphyromonas Gingivalis-Induced Alveolar Bone Loss. *International Journal of Oral Science* 7:242–249.
- Çevik Ö., Z. Adigüzel, A. T. Baykal Dan A. Şener. 2017. Tumor necrosis factor-alpha induced caspase-3 activation-related iNOS gene expression in ADP-activated platelets. *Turkish Journal of Biology* 41: 31-40.
- Crockett J. C., M. J. Rogers, F. P. Coxon, L. J. Hocking dan M. H. Helfrich. 2011. Bone Remodelling At A Glance. *Journal of Cell Science* 124:991-998.
- Daniel W. W. 2013. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences 10th Ed Student Solutions Manual*. Wiley.
- Everett, E.T.. 2011. Fluoride's Effects on the Formation of Teeth and Bones, and the Influence of Genetics. *J Dent Res* 90(5):552-560.
- Gendebien S. W.. 2011. *Advances in Regenerative Medicine*. InTech.

- Hartiningsih dan D. Anggraeni. 2016. Respon Sistem Homeostasis Kalsium Tikus Ovariectomi yang Mengonsumsi Kombinasi Calcitriol dengan Raloxifene. *Jurnal Sain Veteriner* 34 (1):92-101.
- Hikmah N., A. Dewi PS, dan H. Maulana. 2016. Rasio Ostoklas dan Osteoblas pada Tulang Alveolar Model Tikus Diabetes dengan Aplikasi Gaya Ortodonti. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 29 (1):54-58.
- Julien O. dan J. A Wells. 2017. Caspases And Their Substrates. *Cell Death and Differentiation* 24:1380–1389.
- Kabiraj A., J. Gupta, T. Khaitan, P. T. Bhattacharya. 2015. Principle And Techniques Of Immunohistochemistry. *International Journal of Biological Medical Research* 6 (3):5204-5210.
- Kanduti D., P. Sterbenk, dan B. Artnik. 2016. Fluoride: A Review Of Use And Effects On Health. *Mater Sociomed* 28 (2): 133-137.
- Katikireddy K. R. dan F. O’Sullivan. 2011. Immunohistochemical and Immunofluorescence Procedures for Protein Analysis. *Methods In Molecular Biology* 784:155-67.
- Key M.. 2006. *Immunochemical Staining Methods 4th Edition*. Dako Corporation Carpinteria, CA, USA.
- Khristian E. dan D. Inderiati. 2017. *Sitohistoteknologi*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kraiwattanapong K. dan B. Samruajbenjakun. 2018. Effects of different force magnitudes on corticotomy-assisted orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthodontist* 88 (5): 632-637.
- Li Y., L. A. Jacox, S. H. Little, dan C. C. Ko. 2018. Orthodontic Tooth Movement The Biology And Clinical Implications. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 34:207-214.
- Luo Q., H. Cui, H. Deng, P. Kuang, H. Liu., Y. Lu, J. Fang, Z. Zuo, J Daeng, Y. Li, X. Wang dan L. Zhao. 2017. Sodium Fluoride Induces Renal Inflammatory Responses By Activating NF-kb Signaling Pathway And Reducing Antiinflammatory Cytokine Expression In Mice. *Oncotarget* 8(46): 80192-80207.
- Meikle M. C. 2006. The Tissue, Cellular, And Molecular Regulation Of Orthodontic Tooth Movement 100 Years After Carl Sandstedt. *European Journal of Orthodontics* 28:221–240.

- Minato Y., M. Yamaguchia, M. Shimizua, J. Kikuta, T. Hikidaa, M. Hikida, M. Suemitsu, K. Kuyama dan K. Kasa. 2018. Effect of caspases and RANKL induced by heavy force in orthodontic root resorption. *The korean Journal of Orthodontics* 48(4):253-261.
- Mollazadeh S., B. S. F. Bazzar dan M. A. Kerachian. 2015. Role Of Apoptosis In Pathogenesis and Treatment Of Bone Related Disease. *Journal of Othopaedic Surgery and Research* 10:15.
- Nabila R. C., R. S. Primarti dan I. Ahmad. 2017. Hubungan Pengetahuan Orang Tua Dengan Kondisi Maloklusi Pada Anak Yang Memiliki Kebiasaan Buruk Oral. *Journal Of Syiah Kuala Dentistry Society* 2 (1):12-18.
- Nambiar S. K., V. C. Haragannavar, D. Augustine, Sowmya S. V., R. S. Rao, K. Kumari dan Pavithra V.. 2016. Immunohistochemistry A Brief Review. *Journal of Dental & Oro-facial Research* 12 (2):25-29.
- O'mullane D.M., R.J. Baez, S. Jones, M.A. Lennon, P.E. Petersen, A.J. Rugg-Gunn, H. Whelton and G.M. Whitford. 2016. Fluoride and Oral Health. *Community Dental Health* 33:69-99.
- Oweis R. 2018. Associations between fluoride intakes, bone outcomes and dental fluorosis. *Disertasi*. University of Iowa.
- Pei J., Y. Gao, B. Li, L. Zhou, Z. Zhang dan D. Sun. 2012. Effect Of Fluoride On Osteoclast Formation At Various Levels Of Nucleic Factor Kappa-B Ligand (RANKL). *Research Report Fluoride* 45 (2):86-93.
- Rajan S. S., K. Horgan, V. Speirs dan A. M. Hanby. 2014. External Validation Of The Immunohistochemistry Image Analysis Application For Estrogen Determination In Breast Cancer. *J Clin Pathol* 67:72-75.
- Ramadhani D., I. Kurnia, S. Soetopo, D. Tetriana, I. Ramli, Budiningsih, Andrijono, T. Kurjana, dan M. D. L. Tobing. 2012. Analisis Serta Stitching Citra Imunohistokimia Mib-1 Dengan Immunohistochemistry Dan Perangkat Lunak Nish Element D 2.30. *Lokakarya Komputasi dalam Sains dan Teknologi Nuklir* 187-196.
- Santoso H. B.. 2006. Struktur Mikroskopis Kartilago Epifisialis Tibia Fetus Mencit (Musculus L.) Dari Induk Dengan Perlakuan Kafein Bek. Penel. *Hayati* 12:69-74.
- Seifi M., M. R. Badiie, Z. Abdolazimi dan P. Amdjadi. 2013. Effect Of Basic Fibroblast Growth Factor On Orthodontic Tooth Movement In Rats. *Cell Journal* 15 (3) 230-237.

- Sella, R. C., M. R. de Mendonca, Cuoghi, O. A., An, Li T. 2012. Histomorphoc Evaluation Of Periodontal Compression And Tension Side During Orthodontic Tooth Movement In Rats. *Dental Press J Orthod.* 17(3):108-117.
- Shalini S., L. Dorstyn, S. Dawar dan S. Kumar. 2015. Old, New And Emerging Functions Of Caspases. *Cell Death and Differentiation* 22:526-539.
- Silva R. F., G. R. S. Sasso, E. S. Cerri, M. J. Simões, dan P. S. Cerri. 2015. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International* 1-17.
- Song F., Y. Wang, D. Jiang, T. Wang, Y. Zhang, H. Ma, dan Y. Kang. 2016. Cyclic Compressive Stress Regulates Apoptosis in Rat *Osteoblast*: Involvement of PI3K/Akt and JNK MAPK Signaling Pathways. *PLoS ONE* 11(11) : 1-16.
- Sutjiati R.. 2016. Mekanisme Hambatan Relaps Pergerakan Gigi Ortodonti Pemberian Natrium Fluoride (Studi Eksperimental Pada Tikus Wistar). *Disertasi*. Surabaya Program Studi Ilmu Kedokteran: Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Svandova E., B. Vesela, A. S. Tucker dan E. Matalov. 2018. Activation Of Pro apoptotic Caspases in Non apoptotic Cells During Odontogenesis and Related Osteogenesis. *Frontiers in Physiology* 9(174):1-13.
- Taddei S. R. d. A., A. P. Moura, I. Andrade Jr., G. P. Garlet, T. P. Garlet, M. M. Teixeira dan T. A. d. Silva. 2012. Experimental Model of Tooth Movement in Mice : A Standardized Protocol for Studying Bone Remodeling under Compression and Tensile Strains. *Journal of Biomechanics* 45 (16) : 2729-2735.
- Tuominen V. J., S. R. A. Viitanen, M. Jumppanen dan J. Isola. 2010. Immunoratio: A Publicly Available Web Application For Quantitative Image Analysis Of Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), and Ki-67. *Breast Cancer Research* 12 (4): R56.
- Vijayashree R., P. Aruthra dan K. R. Rao.. 2015. A Comparison of Manual and Automated Methods of Quantitation of Oestrogen/Progesterone Receptor Expression in Breast Carcinoma. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 9 (3): EC01-EC05.
- Vinod, K. dan Ze 'ev D.. 2015. *Biological Mechanisms Of Tooth Movement. 2nd Edition*. John Wiley & Sons, Ltd.

- Wijayanti P., Krisnawati dan N. Ismah. 2014. Gambaran Maloklusi Dan Kebutuhan Perawatan Ortodonti Pada Anak Usia 9-11 Tahun (Studi Pendahuluan Di SD At-Taufiq, Cempaka Putih, Jakarta). *Jurnal PDGI* 63 (1):25-29.
- Gendebien W. S.. 2011. *Advances in Regenerative Medicine*. InTech.
- Yang C., Y. Wang dan H. Xu. 2017. Fluoride Regulate *Osteoblastic* Transforming Growth Factor- β 1 Signaling by Mediating Recycling of the Type I Receptor ALK5. *Journal Plos One* 12 (1):1-14.
- Yusuf M.. 2017. *Metode Penelitian: Kuantitatif, Kualitatif, Dan Penelitian Gabungan Cetakan ke-4*. Jakarta: Kencana.
- Zheng L., W. Wang, J. Ni, X. Mao, D. Song, T. Liu, J. Wei, dan H. Zhou. 2017. Role Of Autophagy In Tumor Necrosis Factor-A Induced Apoptosis Of *Osteoblas* Cells. *J Investig Med* 65:1014–1020.

LAMPIRAN A. Surat Perijinan Penelitian

 <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</p>	
<p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No.581/UN25.8/KEPK/DL/2019</u></p>	
Title of research protocol	: "Expression of Caspase 3 to Osteoblas by Giving NaF Gel (Sodium Flouride) in Orthodontic Movement"
Document Approved	: Research Protocol
Principal investigator	: Hasna Fakhriyah Jinan
Member of research	: -
Responsible Physician	: Hasna Fakhriyah Jinan
Date of approval	: Desember 2019-Januari 2020
Place of research	: 1. Lab. Farmasetika , Fakultas Farmasi UNEJ 2. Lab. Hewan Coba FKG UNEJ 3. Lab.Histologi FKG UNEJ 4. Lab. CDAST UNEJ
<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, October 11th 2019</p>	
 Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember (drg. R. Bahardyan P. M. Kes, Sp. Pros.)	 Chairperson of Research Ethics Committee of Dentistry Universitas Jember (Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, DAN KEBUDAYAAN
 UNIVERSITAS JEMBER
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegal Boto Kotak Pos 159 Jember 68121
 Telepon (0331) 333536, 331743 Fasimili. (0331) 331991
 Laman: kg.unej.ac.id

Nomor : 7572 /UN25.8.TL/2019
 Perihal : Ijin Penelitian

19 DEC 2019

Kepada Yth
 Kepala Bagian Farmasetika
 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. Adapun bentuk kegiatan penelitiannya adalah pembuatan gel Natrium Fluorida bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- 1 Nama : Hasna' Fakhriyah Jinan
- 2 NIM : 161610101071
- 3 Semester/Tahun : VII/2019-2020
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Danau Toba II No. 71A Jember
- 6 Judul Penelitian : Ekspresi Caspase-3 Sel Osteoblas Setelah Pemberian Gel Natrium Fluorida (NaF) Pada Pergerakan Ortodonti
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Farmasetika
Fakultas Farmasi Universitas Jember
- 8 Data/alat yg di pinjam : -
- 9 Waktu : Desember 2019 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Mengetahui pengaruh pemberian gel Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi caspase-3 sel osteoblas tulang alveolar tikus wistar pada saat perawatan ortodonti.
- 11 Dosen Pembimbing : 1. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed
: 2. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



an Dekan
 an Dekan I,
 Dr. drg. Masniari Novita, Sp.OF(K)
 NIP.196811251999032001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegal Boto Kotak Pos 159 Jember 68121
Telepon (0331) 333536, 331743 Fasimili. (0331) 331991
Laman: fkg.unej.ac.id

Nomor : 7572 /UN25.8.TL/2019
Perihal : Ijin Penelitian

19 DEC 2019

Kepada Yth
Ketua Bagian Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian. Adapun bentuk kegiatan penelitiannya adalah perlakuan hewan bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- 1 Nama : Hasna' Fakhriyah Jinan
- 2 NIM : 161610101071
- 3 Semester/Tahun : VII/2019-2020
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Danau Toba II No. 71A Jember
- 6 Judul Penelitian : Ekspresi Caspase-3 Sel Osteoblas Setelah Pemberian Gel Natrium Fluorida (NaF) Pada Pergerakan Ortodonti
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Hewan Coba
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 8 Data/alat yg di pinjam : -
- 9 Waktu : Desember 2019 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Mengetahui pengaruh pemberian gel Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi caspase-3 sel osteoblas tulang alveolar tikus wistar pada saat perawatan ortodonti.
- 11 Dosen Pembimbing : 1. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed
2. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan
Wakil Dekan I,



Dr. drg. Masniari Novita, Sp.OF(K)
NIP.196811251999032001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegal Boto Kotak Pos 159 Jember 68121
Telepon (0331) 333536, 331743 Fasimili, (0331) 331991
Laman: fk.unej.ac.id

Nomor : 7572 /UN25.8.TL/2019
Perihal : Ijin Penelitian

19 DEC 2019

Kepada Yth
Ketua Bagian Biomedik
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian. Adapun bentuk kegiatan penelitiannya adalah pembuatan preparat histologi bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- | | | |
|----|------------------------|--|
| 1 | Nama | : Hasna' Fakhriyah Jinan |
| 2 | NIM | : 161610101071 |
| 3 | Semester/Tahun | : VII/2019-2020 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Danau Toba II No. 71A Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Ekspresi Caspase-3 Sel Osteoblas Setelah Pemberian Gel Natrium Fluorida (NaF) Pada Pergerakan Ortodonti |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Histologi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yg di pinjam | : Mikroskop, Timbangan, dll |
| 9 | Waktu | : Desember 2019 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Mengetahui pengaruh pemberian gel Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi caspase-3 sel osteoblas tulang alveolar tikus wistar pada saat perawatan ortodonti. |
| 11 | Dosen Pembimbing | : 1. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed
: 2. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



Dr. drg. Masniari Novita, Sp.OF(K)
NIP.196811251999032001



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegal Boto Kotak Pos 159 Jember 68121
Telepon (0331) 333536, 331743 Fasimili. (0331) 331991
Laman: kg.unej.ac.id

Nomor : 7572 /UN25.8.TL/2019
Perihal : Ijin Penelitian

19 DEC 2019

Kepada Yth
Kepala Divisi Biologi Molekul Dan Bioteknologi
CDAST Universitas Jember
Di
Jember

Dalam rangka pengumpulan data penelitian guna penyusunan skripsi maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian. Adapun bentuk kegiatan penelitiannya adalah pembacaan prepat bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- 1 Nama : Hasna' Fakhriyah Jinan
- 2 NIM : 161610101071
- 3 Semester/Tahun : VII/2019-2020
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Danau Toba II No. 71A Jember
- 6 Judul Penelitian : Ekspresi Caspase-3 Sel Osteoblas Setelah Pemberian Gel Natrium Fluorida (NaF) Pada Pergerakan Ortodonti
- 7 Lokasi Penelitian : Laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi CDAST Universitas Jember
- 8 Data/alat yg di pinjam : -
- 9 Waktu : Desember 2019 s/d Selesai
- 10 Tujuan Penelitian : Mengetahui pengaruh pemberian gel Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi caspase-3 sel osteoblas tulang alveolar tikus wistar pada saat perawatan ortodonti.
- 11 Dosen Pembimbing : 1. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed
: 2. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan
Wakil Dekan I,

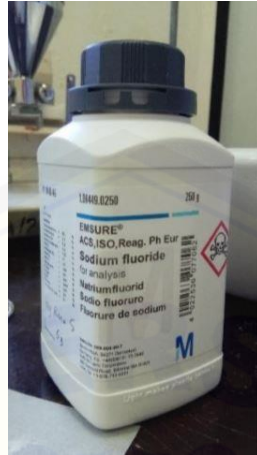


Dr. drg. Masniari Novita, Sp.OF(K)
NIP.196811251999032001

LAMPIRAN B. Dokumentasi Alat dan Bahan Penelitian



Tikus Wistar jantan



Bubuk Natrium Fluorida



Ketamin



Xylazine



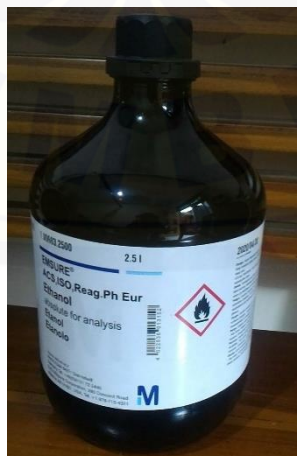
Carbopol



TEA



Propilen glikol



Alkohol absolut



Glass Ionomer tipe IX



1. DAB kit (Peroxidase blocking solution, Prediluted blocking serum, Diaminobenzidine tetrahydrochloride)
2. Object glass
3. Deck glass
4. Asam formiat
5. Phosphat buffer saline
6. Meyer egg albumin
7. Entelan
8. Buffer neutral formaline 10%
9. Parafin
10. Xylol



Horseradish Peroxidase



Aquades steril



Antibodi primer Caspase-3



Antibodi sekunder biotin



Mayer's hematoxylin



Bluing reagent



Handsoon dan masker



Timbangan analitik



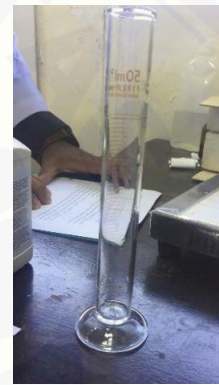
Homogenizing mixer



Pipet



Beaker glass



Gelas ukur



Timbangan berat badan
hewan coba



Mortal dan alu



Disposable syringe 1 mL



Mikromotor contra angle low speed



Ni-Ti closed coil spring



Syringe modifikasi



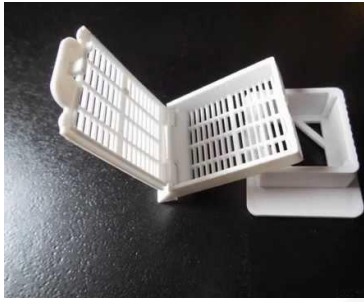
Stainless steel ligature wire



Tension gauge



Kandang tikus, makanan tikus dan minuman tikus



Tissue cassette



Water Bath



Slide Warmer



Mikrotom



Inkubator



Mikropipet



Staining jar



Pot jaringan



Mikroskop cahaya dan kamera optilab



LAMPIRAN C. Rerata Hasil Ekspresi Caspase-3 (%)

Ekspresi Caspase-3 Kelompok A: Kontrol Hari ke-7	
1	91,6
2	99,8
3	71,2
4	87,5
Rerata jumlah ekspresi Caspase-3	87,5
Ekspresi Caspase-3 Kelompok B: Kontrol Hari ke-14	
1	61,7
2	95,5
3	78,4
4	88,2
Rerata jumlah ekspresi Caspase-3	80,9
Ekspresi Caspase-3 Kelompok C: Perlakuan Hari ke-7	
1	89,3
2	62,7
3	54,9
4	84,1
Rerata jumlah ekspresi Caspase-3	72,75
Ekspresi Caspase-3 Kelompok D: Perlakuan Hari ke-14	
1	27,7
2	24,1
3	42,0
4	32,7
Rerata jumlah ekspresi Caspase-3	31,62

LAMPIRAN D. Uji Analisis Data**D.1 Uji Analisis Data Kontrol 7 Hari dan Perlakuan 7 Hari****D.1.1 Uji Normalitas Shapiro-Wilk****Tests of Normality**

		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Ekspresi Caspase3	Kontrol	.954	4	.738
	Perlakuan	.900	4	.430

a. Lilliefors Significance Correction

D.1.2 Uji Homogenitas Levene**Test of Homogeneity of Variances**

Ekspresi caspase-3

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.032	1	6	.864

D.1.3 Uji Parametri One-Way Anova**ANOVA**

Ekspresi Caspase3

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	436.601	1	436.601	2.085	.199
Within Groups	1256.137	6	209.356		
Total	1692.739	7			

D.2 Uji Analisis Data Kontrol 14 Hari dan Perlakuan 14 Hari

D.2.1 Uji Normalitas Shapiro-Wilk

Tests of Normality

		Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Ekspresi Caspase-3	Kontrol	.964	4	.802
	Perlakuan	.954	4	.741

a. Lilliefors Significance Correction

D.2.2 Uji Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi Caspase-3

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.489	1	6	.268

D.2.3 Uji Parametri One-Way Anova

ANOVA

Ekspresi Caspase-3

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4865.911	1	4865.911	35.511	.001
Within Groups	822.158	6	137.026		
Total	5688.069	7			

D.3 Uji Analisis Data Kontrol 7 Hari dan Kontrol 14 Hari

D.3.1 Uji Normalitas Shapiro-Wilk

Tests of Normality

	Kontrol	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Ekspresi Caspase3	Hari 7	.954	4	.738
	Hari 14	.964	4	.802

a. Lilliefors Significance Correction

D.3.2 Uji Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances

Ekspresi Caspase3

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.268	1	6	.623

D.3.3 Uji Parametri One-Way Anova

ANOVA

Ekspresi Caspase3

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	86.461	1	86.461	.483	.513
Within Groups	1075.117	6	179.186		
Total	1161.579	7			

D.4 Uji Analisis Data Perlakuan 7 Hari dan Perlakuan 14 Hari

D.4.1 Uji Normalitas Shapiro-Wilk

Tests of Normality

	Perlakuan	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Ekspresi Caspase3	7 Hari	.900	4	.430
	14 Hari	.954	4	.741

a. Lilliefors Significance Correction

D.4.2 Uji Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances

Jumlah

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.050	1	6	.830

D.4.3 Uji Parametri One-Way Anova

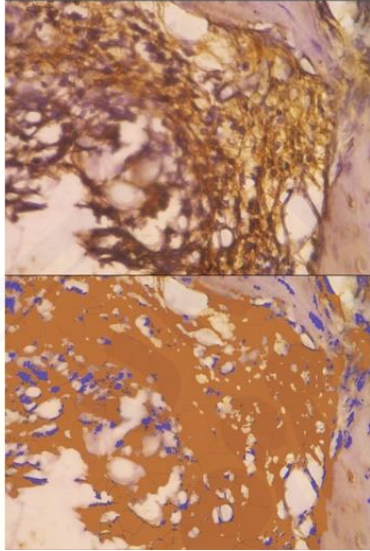
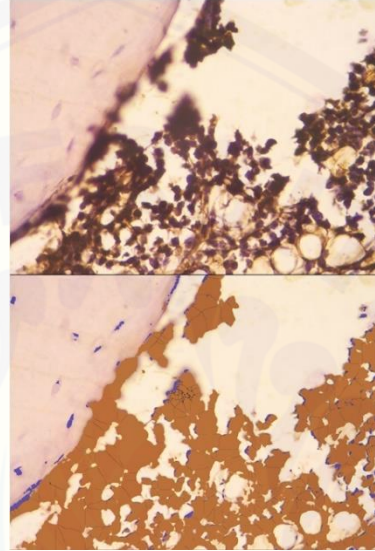
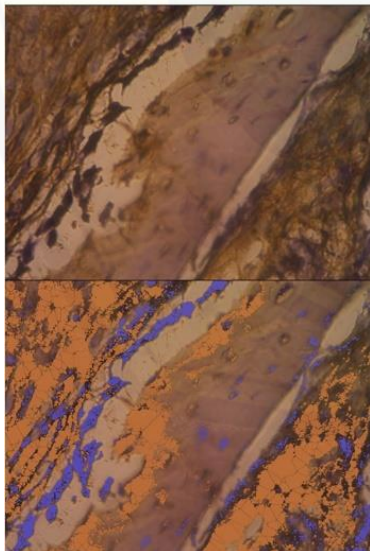
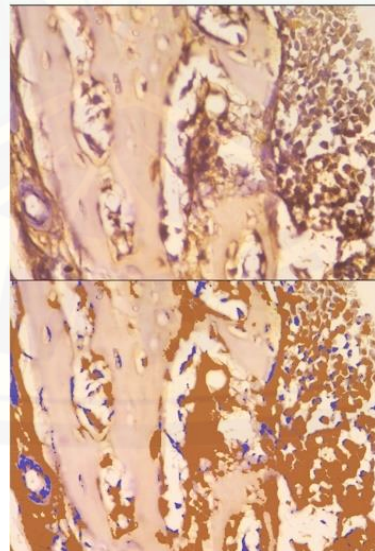
ANOVA

Jumlah

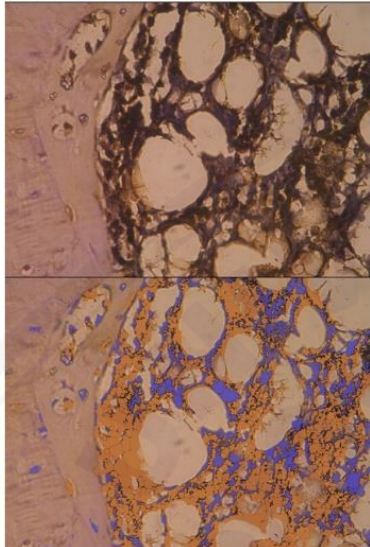
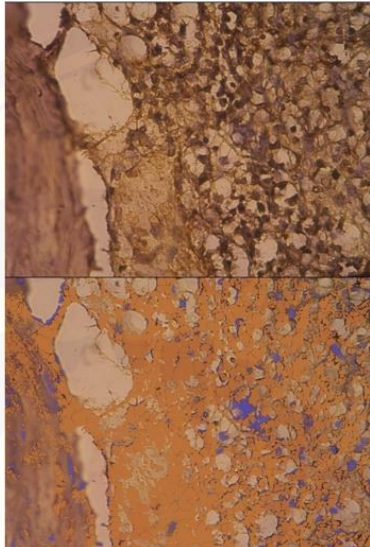
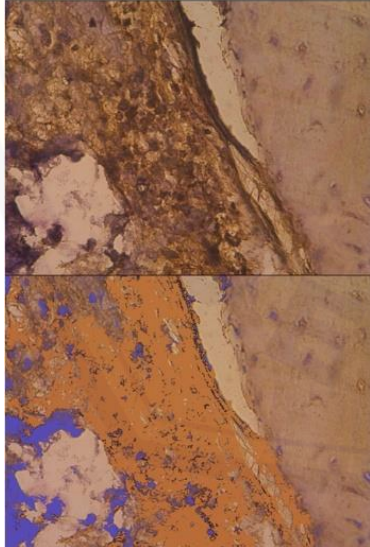
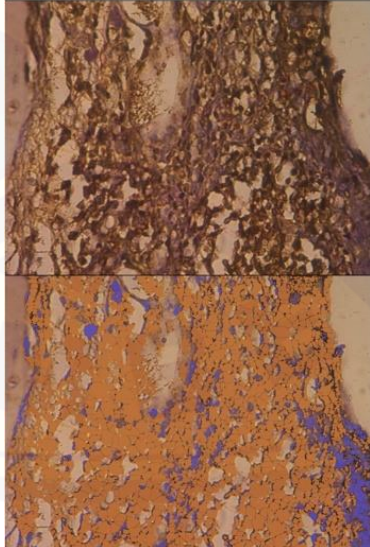
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.263	1	.263	25.046	.002
Within Groups	.063	6	.010		
Total	.326	7			

LAMPIRAN E. Gambar Hasil Immuno Ratio Score (IRS)

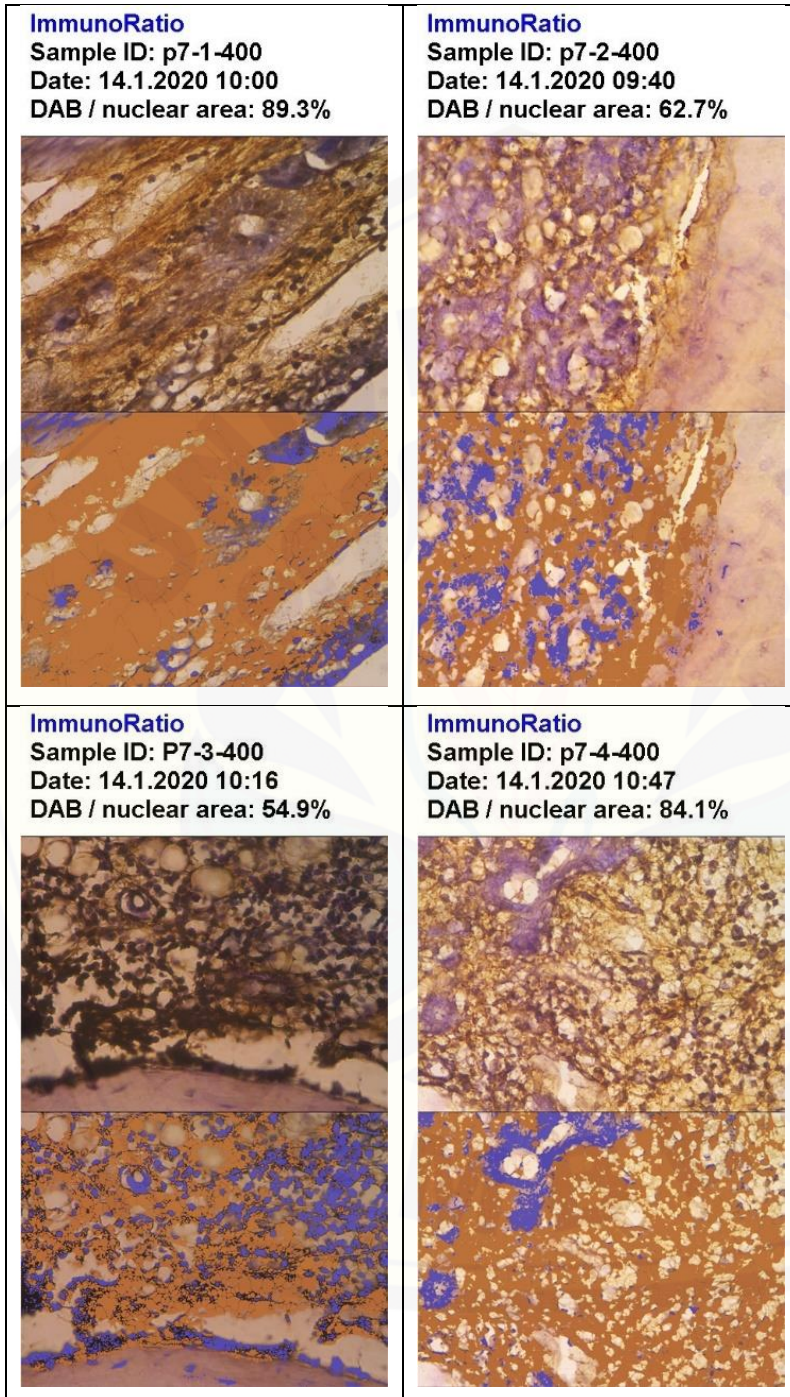
E.1 Gambar Hasil IRS Kontrol 7 Hari

<p>ImmunoRatio Sample ID: K7-1-400 Date: 14.1.2020 09:25 DAB / nuclear area: 91.6%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: k7-2-400 Date: 14.1.2020 11:14 DAB / nuclear area: 99.8%</p> 
<p>ImmunoRatio Sample ID: K7-3-400 Date: 14.1.2020 09:29 DAB / nuclear area: 71.2%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: k7-4-400 Date: 14.1.2020 09:35 DAB / nuclear area: 87.5%</p> 

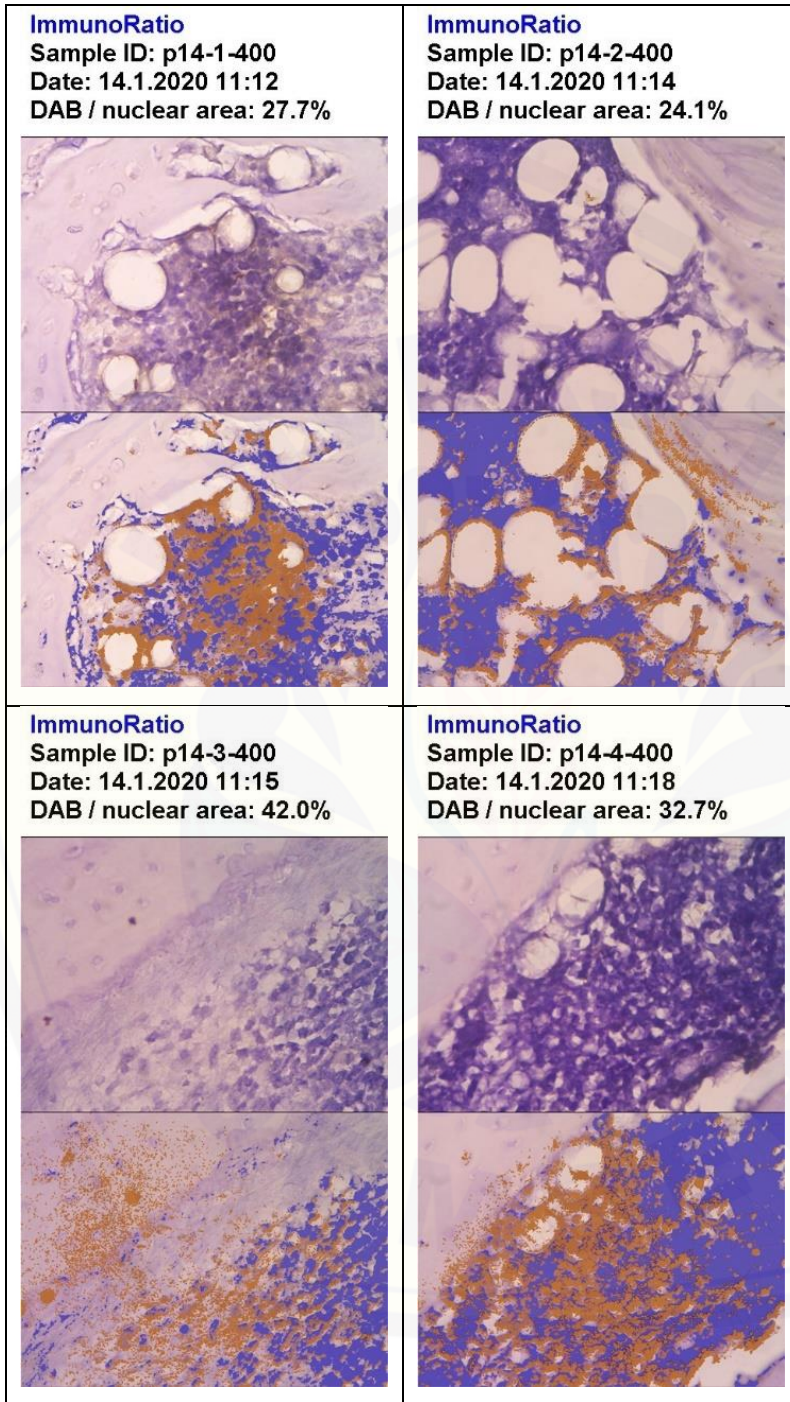
E.2 Gambar Hasil IRS Kontrol 14 Hari

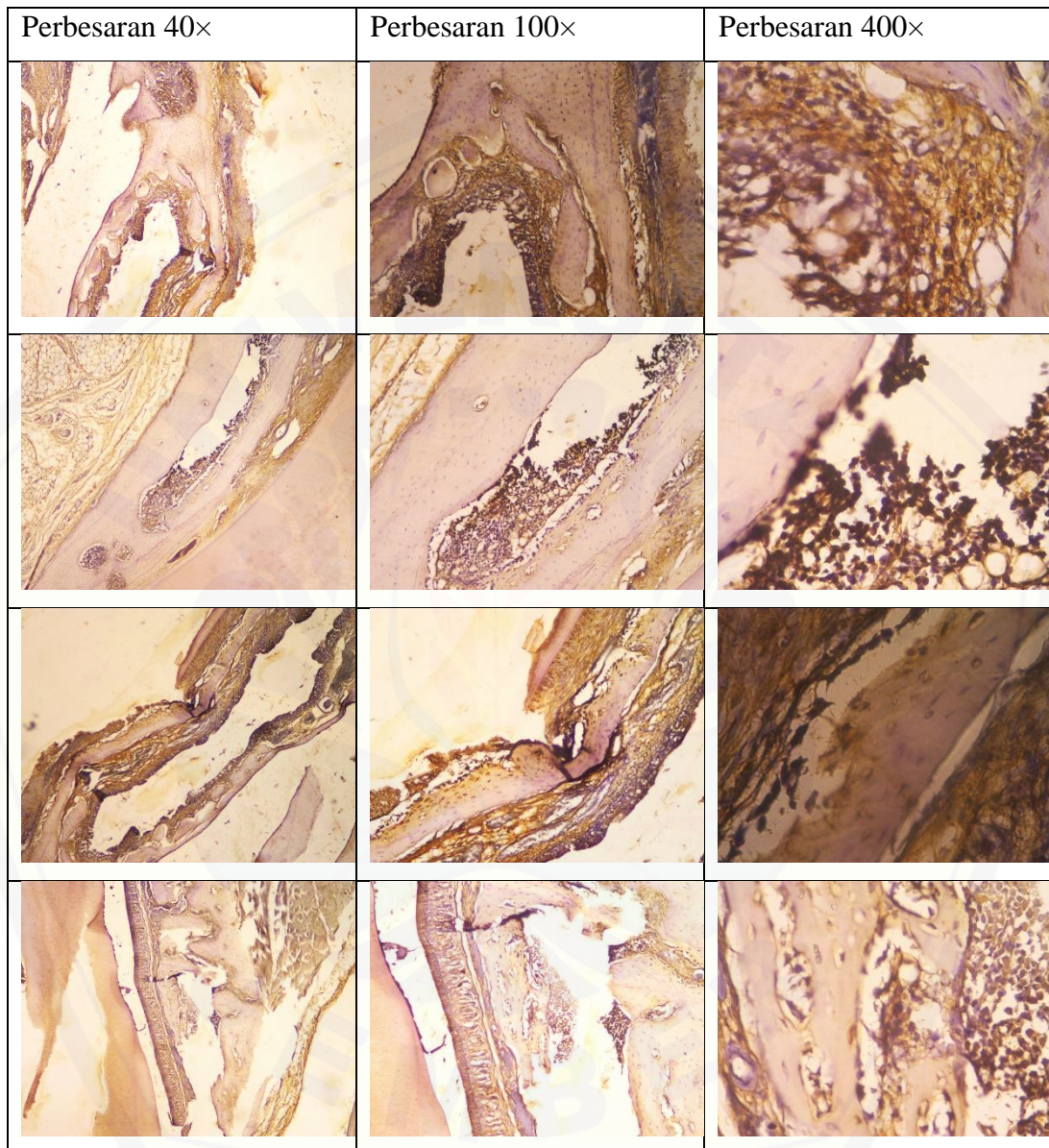
<p>ImmunoRatio Sample ID: K14-1-400 Date: 14.1.2020 10:59 DAB / nuclear area: 61.7%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: K14-2-400 Date: 14.1.2020 11:01 DAB / nuclear area: 95.5%</p> 
<p>ImmunoRatio Sample ID: K14-3-400 Date: 14.1.2020 11:03 DAB / nuclear area: 78.4%</p> 	<p>ImmunoRatio Sample ID: K14-4-400 Date: 14.1.2020 11:04 DAB / nuclear area: 88.2%</p> 

E.3 Gambar Hasil IRS Perlakuan 7 Hari

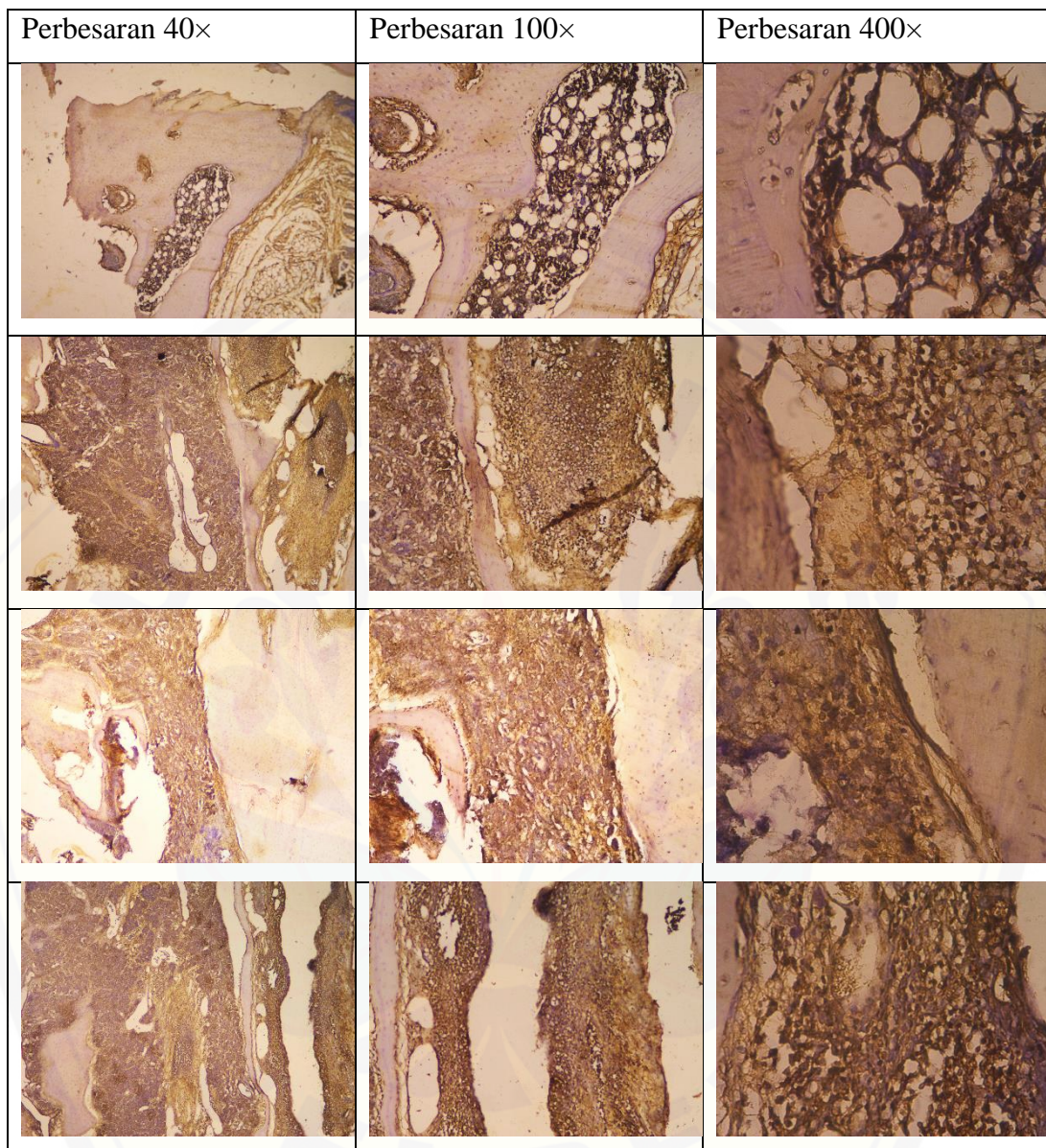


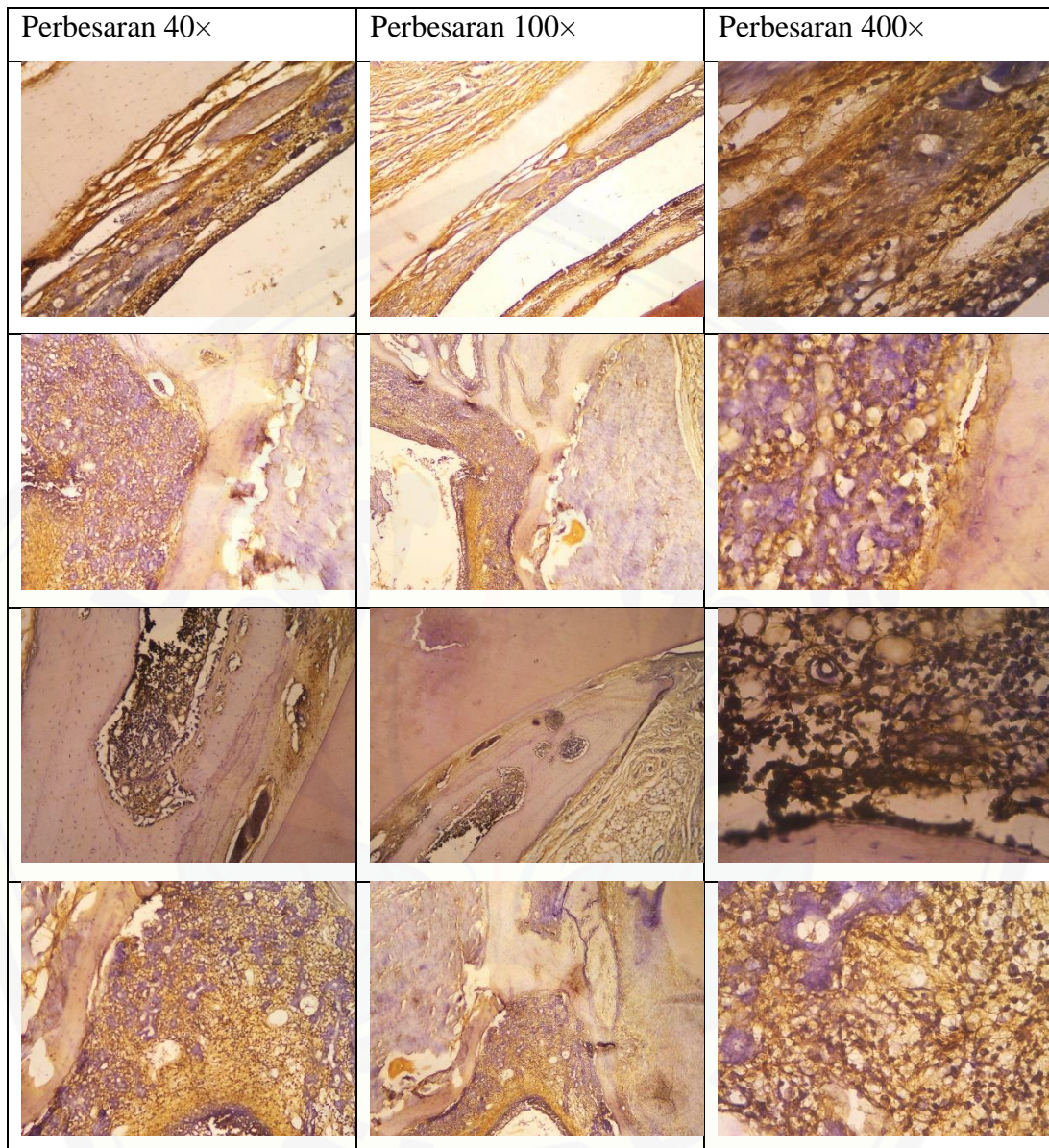
E.4 Gambar Hasil IRS Perlakuan 14 Hari



LAMPIRAN F. Gambar Hasil Imunohistokima (IHC)**F.1 Gambar Hasil IHC Kontrol 7 Hari**

F.2 Gambar Hasil IHC Kontrol 14 Hari



F.3 Gambar Hasil IHC Perlakuan 7 Hari

F.4 Gambar Hasil IHC Perlakuan 14 Hari