



**EKSPRESI INTERLEUKIN 10 (IL-10) SETELAH PEMBERIAN  
NATRIUM FLUORIDA (NaF) PADA KEKUATAN  
MEKANIK ORTODONTI**

**SKRIPSI**

Oleh

**Annisa Syifa Maharani**

**NIM 161610101121**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**



**EKSPRESI INTERLEUKIN 10 (IL-10) SETELAH PEMBERIAN  
NATRIUM FLUORIDA (NaF) PADA KEKUATAN  
MEKANIK 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

**Annisa Syifa Maharani**

**NIM 161610101121**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

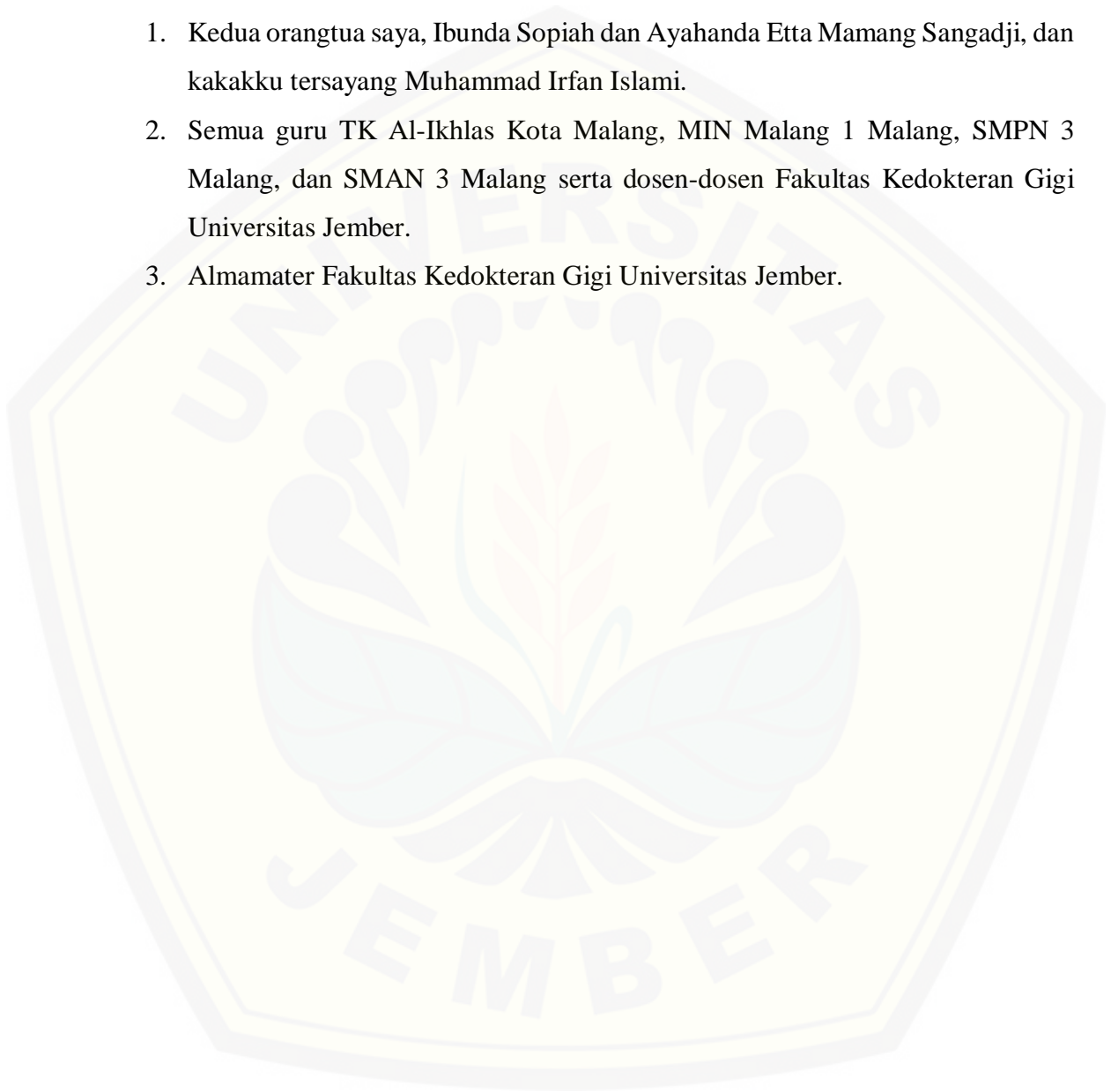
**UNIVERSITAS JEMBER**

**2020**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orangtua saya, Ibunda Sopiha dan Ayahanda Etta Mamang Sangadji, dan kakakku tersayang Muhammad Irfan Islami.
2. Semua guru TK Al-Ikhlas Kota Malang, MIN Malang 1 Malang, SMPN 3 Malang, dan SMAN 3 Malang serta dosen-dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
3. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



**MOTTO**

“Maka sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan, sesungguhnya beserta kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.” (Terjemahan Q. S. Asy-Syarh (94):5-8) <sup>\*)</sup>



---

<sup>\*)</sup> Kementerian Agama, R.I., 2014. al-Quran dan Terjemahan. *Bekasi: Darul Haq.*

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Annisa Syifa Maharani

NIM : 161610101121

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) pada Kekuatan Mekanik Ortodonti” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 10 Maret 2020

Yang menyatakan,

Annisa Syifa Maharani

NIM. 161610101121

**SKRIPSI**

**EKSPRESI INTERLEUKIN 10 (IL-10) SETELAH PEMBERIAN  
NATRIUM FLUORIDA (NaF) PADA KEKUATAN  
MEKANIK ORTODONTI**

Oleh

**Annisa Syifa Maharani**

**NIM 161610101121**

Dosen Pembimbing

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

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) pada Kekuatan Mekanik Ortodonti” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : 10 Maret 2020

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

Dr. drg. Didin Erma I., M.Kes.

drg. Yenny Yustisia, M.Biotech.

NIP.196903031997022001

NIP. 197903252005012002

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes.

drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed.

NIP. 196510131994032001

NIP. 197207151998021001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

Drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prof.

NIP. 196901121996011001

## RINGKASAN

**Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) pada Kekuatan Mekanik Ortodonti;** Annisa Syifa Maharani; 161610101121; 2020; 92 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Perawatan ortodonti bertujuan untuk memperbaiki susunan gigi geligi dan hubungan rahang yang tidak normal sehingga tercapai oklusi, fungsi yang normal, dan estetik wajah yang baik. Perawatan ini berdasarkan prinsi jika suatu kekuatan mekanik diberikan pada gigi dengan jangka waktu tertentu, akan terjadi pergerakan gigi karena ligament periodontal dan tulang di sekeliling gigi mengalami perubahan struktur tulang (*remodeling*).

Pasca pasien melewati perawatan ortodonti dan fase retensi, ditemukan adanya potensi relaps. Relaps sendiri adalah keadaan gigi kembali ke posisi awal maloklusi setelah dilakukan perawatan ortodonti. Kondisi ini tidak selalu terjadi namun perlu menjadi perhatian dokter gigi sebagai ukuran keberhasilan perawatan ortodonti jangka panjang. Oleh karena itu, dibutuhkan suatu upaya untuk menurunkan angka kejadian relaps yaitu dengan menggunakan Natrium Fluorida (NaF). Natrium Fluorida (NaF) adalah ion anorganik yang memiliki efek merangsang pembentukan tulang secara *in vivo* dan *in vitro*. Pada sel osteoblas NaF menyebabkan terjadinya proses proliferasi, diferensiasi, dan memodulasi aktivitas growth factor. Pada osteoklas, NaF menurunkan pembentukan osteoklas melalui reduksi *receptor activator of nuclear factor kB ligand* (RANKL). Salah satu sitokin yang terlibat dalam menghambat pembentukan osteoklas dan sebagai sitokin anti inflamasi adalah Interleukin 10 (IL-10). IL-10 menghambat pembentukan osteoklas secara langsung maupun tidak langsung. Secara langsung IL-10 menghambat pembentukan osteoklas dengan menurunkan ekspresi *nuclear factor of activated T cells* (NFATc1). Secara tidak langsung IL-10 menghambat pembentukan osteoklas dengan cara meningkatkan ekspresi Osteoprotegerin (OPG) dan menurunkan RANKL serta menurunkan ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, dan IL-



6 serta *Macrophage-colony stimulating hormone* (M-CSF). Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui efek pemberian NaF terhadap ekspresi IL-10 pada kekuatan mekanik ortodonti.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan *Randomized Post Test only Control Group*. Penelitian ini dilakukan pada 16 tikus Wistar jantan yang terbagi atas empat kelompok (dua kelompok kontrol dan dua kelompok perlakuan). Kelompok kontrol terdiri dari kelompok kontrol negatif 7 hari dan kelompok kontrol negatif 14 hari tanpa diberi Natrium Fluorida. Kelompok perlakuan terdiri dari kelompok 7 hari dan kelompok 14 hari yang diberi perlakuan Natrium Fluorida (NaF). Pada kelompok perlakuan diberikan gel NaF dengan dosis 11,34 ppm. Diaplikasikan secara topikal ke dalam sulkus gingiva tikus Wistar jantan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah rata-rata ekspresi IL-10 setelah pemberian NaF (Kelompok perlakuan 7 dan 14 hari) lebih tinggi daripada kelompok kontrol negatif 7 hari dan 14 hari. Ekspresi IL-10 kemudian dianalisis pada uji normalitas dan uji homogenitas didapatkan hasil bahwa data terdistribusi normal dan homogeny. Selanjutnya dilakukan analisis statistik menggunakan uji statistik parametric *One Way Anova* dimana hasilnya tidak terdapat perbedaan signifikan ekspresi IL-10 dari tiap kelompok penelitian.

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian gel Natrium Fluorida (NaF) dengan dosis 11,34 ppm yang diaplikasikan pada sulkus gingiva tikus Wistar jantan secara topikal mampu meningkatkan ekspresi IL-10 pada sel osteoklas setelah pemberian kekuatan mekanik ortodonti.

## PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT. atas segala rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) pada Kekuatan Mekanik 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 dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Kedua orang tua saya, Bapak Etta Mamang Sangadji dan Ibu Sopiiah, serta kakak saya, Muhammad Irfan Islami yang tiada hentinya mendoakan, memberikan kasih sayang, memberikan pengorbanan, juga semangat, dan masih banyak hal lagi hingga saat ini;
2. Kedua pembimbing saya, Dr. drg. Rina sutjiati, M.Kes., dan drg. Rudy Joelijanto, M.Biomed. yang telah membimbing, meluangkan waktu, mencurahkan pikiran, dan tenaga demi terselesaikannya skripsi ini.
3. Kedua penguji saya, Dr. drg. Didin Erma I., M.Kes., dan drg. Yenny Yustisia, M.Biotech. yang telah memberikan masukan serta saran yang membangun demi terwujudnya skripsi ini.
4. Dosen pembimbing akademik saya, Dr. drg. Atik Kurniawati, M.Kes.
5. drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., SP.Pros., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember beserta jajarannya;
6. Seluruh dosen dan karyawan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu serta membantu selama penulis menempuh pendidikan S1 selama ini;
7. Seluruh pihak yang ikut membantu penulis dalam penelitian, dari staf Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi UNEJ, staf Laboratorium

Farmakologi Ruang Hewan FKG UNEJ, Laboratorium Histologi FKG UNEJ, dan Laboratorium CDAST UNEJ;

8. Teman-teman tim penelitian yang telah bekerja sama dalam menyelesaikan skripsi ini;
9. Teman-teman kelompok Tutorial 10 yang selalu saling menyemangati, saling menghibur serta saling mendoakan satu sama lain selama ini;
10. Teman-teman kos yang selalu menghibur, menyemangati saling membantu serta mendoakan satu sama lain;
11. Teman-teman seangkatan FKG satu daerah Kota Malang yang selalu menyemangati satu sama lain;
12. Teman-teman terbaik semasa SMA Aldila Mazaya G., Fransisca Putri Intan D., Rinalni Nabila C., Hauzan Naufal F., dan Byan Rifki A., yang meski sudah terpisah jarak masih saling ada dan menyemangati satu sama lain;
13. Teman-teman terbaik semasa basket SMA, BBeam'16 yang selalu menyemangati satu sama lain dan tidak lupa Pak Wahyudiono yang selalu mendengarkan, menyemangati serta menghibur;
14. Teman-teman basket FKG khususnya Khairunnisa F. Arba dan M. Bintang Menara;
15. Teman-teman seperjuangan FKG angkatan 2016;
16. Seluruh pihak yang turut terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, terimakasih untuk kalian semua.

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

Jember, 10 Maret 2020

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	<b>i</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	<b>ii</b>
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	<b>v</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>PRAKATA</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvi</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Latar Belakang</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Rumusan Masalah</b> .....	<b>4</b>
<b>1.3. Tujuan Penelitian</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. Manfaat Penelitian</b> .....	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. Pergerakan Gigi Ortodonti</b> .....	<b>5</b>
2.1.1. Teori Pergerakan Gigi.....	<b>5</b>
2.1.2. Tahapan Pergerakan Gigi.....	<b>7</b>
<b>2.2. Tulang</b> .....	<b>8</b>
2.2.1. Definisi Tulang .....	<b>8</b>
2.2.2. Komposisi Tulang.....	<b>8</b>
<b>2.3. Remodeling Tulang</b> .....	<b>12</b>
2.3.1. Proses <i>Remodeling</i> Tulang.....	<b>12</b>
<b>2.4. Fluor</b> .....	<b>13</b>

2.4.1.	Mekanisme Kerja Fluor terhadap Tulang .....	13
<b>2.5.</b>	<b>Interleukin 10 (IL-10)</b> .....	14
<b>2.6.</b>	<b>Imunohistokimia</b> .....	15
<b>2.7.</b>	<b><i>Immunoratio Score</i> ( IRS)</b> .....	16
<b>2.8.</b>	<b>Kerangka Konsep</b> .....	18
<b>2.9.</b>	<b>Penjelasan Kerangka Konsep</b> .....	19
<b>2.10.</b>	<b>Hipotesis</b> .....	20
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1.</b>	<b>Jenis Penelitian</b> .....	21
<b>3.2.</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	21
3.2.1.	Tempat Penelitian .....	21
3.2.2.	Waktu Penelitian .....	22
<b>3.3.</b>	<b>Populasi dan Sampel</b> .....	22
3.3.1.	Populasi Penelitian .....	22
3.3.2.	Sampel Penelitian .....	22
<b>3.4.</b>	<b>Identifikasi Variabel Penelitian</b> .....	24
3.4.1.	Variabel Bebas .....	24
3.4.2.	Variabel Terikat.....	24
3.4.3.	Variabel Terkendali .....	24
<b>3.5.</b>	<b>Definisi Operasional</b> .....	24
3.5.1.	Natrium Fluorida (NaF) .....	24
3.5.2.	Ekspresi Interleukin 10 (IL-10).....	24
3.5.3.	Kekuatan Mekanik Ortodonti.....	25
<b>3.6.</b>	<b>Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	25
3.6.1.	Alat penelitian .....	25
3.6.2.	Bahan Penelitian.....	26
<b>3.7.</b>	<b>Konversi Dosis</b> .....	27
3.7.1.	Dosis Fluorida .....	27
3.7.2.	Dosis Bahan Anastetikum.....	28
<b>3.8.</b>	<b>Prosedur Penelitian</b> .....	29

3.8.1.	Perijinan <i>Ethical Clearance</i> .....	29
3.8.2.	Persiapan Hewan Coba .....	29
3.8.3.	Pembagian Kelompok Perlakuan .....	29
3.8.4.	Persiap Gel NaF.....	30
3.8.5.	Perlakuan Hewan Coba.....	30
3.8.6.	Euthanasia Hewan Coba .....	31
3.8.7.	Tahapan Pembuatan Sediaan dan Pemeriksaan Imunohistokimia .....	32
<b>3.9.</b>	<b>Prosedur Pengamatan dan Perhitungan Ekspresi IL-10 .....</b>	<b>37</b>
<b>3.10.</b>	<b>Analisis Data.....</b>	<b>39</b>
<b>3.11.</b>	<b>Alur Penelitian.....</b>	<b>41</b>
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.</b>	<b>Hasil Penelitian.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.</b>	<b>Pembahasan.....</b>	<b>45</b>
<b>BAB 5.</b>	<b>KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.</b>	<b>Kesimpulan.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2.</b>	<b>Saran.....</b>	<b>48</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>49</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>57</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 2.1 Faktor-faktor yang mempengaruhi pergerakan gigi.....	7



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2.1	Gambaran histologi sel Osteoblast..... 9
Gambar 2.2	Gambaran histologi Sel Osteosit..... 10
Gambar 2.3	Gambaran histologi Sel Osteoklas..... 11
Gambar 2.4	Ekspresi Interleukin-10 pada pewarnaan IHC..... 15
Gambar 2.5	Aplikasi ImageJ..... 17
Gambar 3.1	Pemasangan <i>coil spring</i> pada hewan coba..... 31
Gambar 3.2	Ilustrasi arah pematangan gigi insisiv tikus wistar..... 35
Gambar 3.3	Aplikasi ImageJ dan menu Plugins yang di dalamnya terdapat menu Immunoratio..... 38
Gambar 3.4	Hasil perhitungan ekspresi IL-10 pada aplikasi..... 39
Gambar 4.1	Gambaran preparat jaringan hasil pewarnaan Imunohistokimia padaperbesaran 400x..... 42
Gambar 4.2	Gambaran preparat jaringan hasil pewarnaan Imunohistokimia padaperbesaran 400x..... 43
Gambar 4.3	Diagram rata-rata jumlah ekspresi IL-10 pada gigi tikus Wistar Jantan..... 43



**DAFTAR LAMPIRAN**

	Halaman
Lampiran 1    Sertifikat <i>Ethical Clereance</i> .....	57
Lampiran 2    Surat Ijin Penelitian.....	58
Lampiran 3    Rerata Hasil Ekspresi Interleukin 10 (IL-10).....	62
Lampiran 4    Uji Analisis Data.....	63
Lampiran 5    Gambar Hasil <i>Immunoratio Score</i> (IRS).....	65
Lampiran 6    Gambar Alat dan Bahan Penelitian.....	70

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Makin berkembangnya jaman, penampilan menjadi salah satu hal yang penting bagi masyarakat tak terkecuali tampilan gigi seseorang. kondisi gigi yang kurang rapi bisa menimbulkan kurangnya rasa percaya diri pada seseorang. Kondisi ini dalam kedokteran gigi disebut sebagai maloklusi. Maloklusi adalah keadaan oklusi yang menyimpang dari keadaan normal atau keadaan gigi yang menyimpang dari relasi normal terhadap gigi-gigi lainnya. (Riyanti, 2018). Untuk menanganinya, penderita maloklusi akan mendatangi dokter gigi untuk melakukan perawatan ortodonti.

Perawatan ortodonti adalah perawatan yang dilakukan dokter gigi dalam menangani kasus gigi yang tidak beraturan atau berjejal. Tujuan dari perawatan ini untuk memperbaiki susunan gigi geligi dan hubungan rahang yang tidak normal sehingga dapat tercapai oklusi, fungsi yang normal, dan estetik wajah yang baik. (Rahardjo, 2009), serta stabilitas hasil akhir diharapkan tercapai setelah melakukan perawatan. (Proffit *et al.*, 2018).

Perawatan ortodonti dilakukan berdasarkan sebuah prinsip jika suatu kekuatan mekanik diberikan pada gigi dengan jangka waktu tertentu, akan terjadi pergerakan gigi karena ligamen periodontal dan tulang di sekeliling gigi mengalami perubahan struktur tulang (*remodeling*). Ketika kekuatan mekanik diterima oleh mahkota gigi, akan diteruskan melalui akar ke ligament periodontal dan tulang alveolar. Dari gaya yang diberikan ini, akan timbul daerah tekanan dan tarikan di sekitar gigi. Pada daerah tekanan terjadi resorpsi tulang sebagai respon terhadap adanya gaya, sedangkan pada daerah tarikan akan terjadi aposisi tulang untuk mempertahankan keutuhan dan mekanisme perlekatan gigi ke tulang. (Iskandar *et al.*, 2010).

Kekuatan mekanis yang diterima oleh daerah tekanan akan merangsang sel osteoklas untuk meresorpsi tulang. Gaya yang kecil menyebabkan resorpsi dan pembentukan tulang alveolar baru sangat kecil ataupun tidak terjadi, sedangkan gaya yang terlalu besar dapat mengaktivasi lebih dominan kerja osteoklas untuk meresorpsi dibanding kerja osteoblas dalam pembentukan tulang alveolar, sehingga resorpsi yang terjadi berlebihan (*underminning resorption*) (Amin *et al.*, 2017).

Proses *remodeling* tulang yang terjadi pada pergerakan gigi ortodonti melibatkan banyak sitokin dan *growth factor*. Sitokin-sitokin proinflamasi yang terlibat seperti TNF- $\alpha$ , IL-1, dan IL-6 membantu mempertahankan respon inflamasi dan aktivitas resorpsi tulang (Nikolic *et al.*, 2019). TGF- $\beta$  dan IL-10 berperan sebagai anti inflamasi. TGF- $\beta$  menginduksi pembentukan osteoblas dan matriks ekstraseluler sedangkan IL-10 berperan mengatur deposisi serta degradasi jaringan (Younis *et al.*, 2019).

Interleukin-10 (IL-10) adalah sebuah sitokin anti-inflamasi, dimana IL-10 menekan imunoproliferatif dan respon inflamasi. Penelitian yang dilakukan Xu *et al.*, menunjukkan bahwa IL-10 memiliki efek yang poten dalam menghambat osteoklastogenesis baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara tidak langsung, IL-10 menghambat pembentukan osteoklas dengan cara meningkatkan osteoprotegerin (OPG) dan menurunkan produksi *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand* (RANKL) (Zhang *et al.*, 2014). Dengan meningkatnya produksi IL-10 diharapkan mampu mengimbangi proses resorpsi tulang yang terjadi selama fase perawatan ortodonti.

Pasca pasien melewati fase perawatan ortodonti, dilanjutkan dengan fase retensi. Fase ini bertujuan untuk mempertahankan gigi pada keadaan posisi hasil koreksi sesudah peranti aktif dilepas. Peranti retensi ini dianjurkan penggunaannya selama 1-2 tahun (Andriekute *et al.*, 2017). Hal ini kembali lagi tergantung dari bagaimana kondisi individu tiap pasien. Hasil penelitian

Renkema *et al.*, menunjukkan fakta lain, meski menggunakan peranti retensi selama dua tahun masih bisa terjadi relaps (Renkema *et al.*, 2009).

Relaps adalah keadaan gigi kembali ke posisi awal maloklusi setelah dilakukan perawatan ortodonti. Kondisi ini tidak selalu terjadi namun perlu menjadi perhatian dokter gigi dalam hal tingkat keberhasilan perawatan dalam jangka waktu panjang. Hasil penelitian yang dilakukan Lapatki *et al.*, (2004) relaps terjadi sebanyak 20% setelah dua tahun perawatan ortodonti selesai dilakukan (Danz *et al.*, 2014). Penelitian lain yang dilakukan Sheibani *et al.*, (2010) ditemukan prevalensi terjadinya relaps sebanyak 61,5% dari 500 kasus yang ada. (Sutjiati *et al.*, 2017).

Relaps terjadi saat proses resorpsi dan aposisi tulang pada daerah sekitar gigi yang digerakkan oleh alat ortodonti tidak seimbang. Beberapa penelitian menunjukkan berbagai bahan alternatif yang dapat digunakan untuk meningkatkan aposisi tulang contohnya saja ekstrak propolis yang dilakukan oleh Handayani *et al.* (2016), gel *Stichopus hermanii* dan *Hyperbaric Oxygen* yang dilakukan oleh Sandana *et al.* (2017), dan juga pemberian Natrium Fluorida secara topikal (Sutjiati, 2016).

Natrium Fluorida (NaF) adalah salah satu senyawa dari fluor yang memiliki perlakuan dan efek yang beragam pada diferensiasi osteoblas. Natrium Fluorida (NaF) adalah ion yang unik diantara ion anorganik lainnya, dimana NaF mampu merangsang pembentukan tulang secara *in vivo* maupun *in vitro*. Pada osteoblas, NaF menyebabkan terjadinya proses proliferasi, diferensiasi, dan memodulasi aktivitas *growth factor* (Lee *et al.*, 2017). Pada osteoklas NaF menurunkan pembentukan osteoklas melalui reduksi RANKL (Bhawal *et al.*, 2015).

Berdasarkan uraian di atas, tingkat keberhasilan perawatan ortodonti dalam jangka waktu lama dapat dicapai jika angka kejadian relaps dapat dicegah, salah satunya dengan menggunakan Natrium Fluorida (NaF). NaF berperan dalam proses pembentukan tulang dimana hal ini diharapkan mampu

terjadi keadaan homeostasis antara proses resorpsi dan pembentukan tulang sehingga tidak terjadi relaps.

### **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian yang telah di sampaikan pada latar belakang, didapatkan rumusan masalah, bagaimanakah efek pemberian Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi Interleukin 10 (IL-10) pada kekuatan mekanik ortodonti

### **1.3. Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui efek pemberian Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi Interleukin 10 (IL-10) pada kekuatan mekanik ortodonti

### **1.4. Manfaat Penelitian**

- 1.4.1. Dapat memberikan informasi mengenai manfaat pemberian Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi Interleukin 10 (IL-10) pada kekuatan mekanik ortodonti
- 1.4.2. Dapat menjadi dasar penelitian lebih lanjut mengenai manfaat pemberian Natrium Fluorida (NaF) terhadap ekspresi Interleukin 10 (IL-10) pada kekuatan mekanik ortodonti

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Pergerakan Gigi Ortodonti

Pergerakan gigi ortodonti didefinisikan sebagai hasil dari respon biologis terhadap gangguan dalam keseimbangan fisiologis kompleks dentofasial oleh adanya gaya atau tekanan dari luar. Sedikit saja tekanan yang diberikan mampu menimbulkan pergerakan gigi, diikuti dengan proses remodeling pada ligament periodontal dan tulang alveolar (Dudic *et al.*, 2013).

Remodeling tulang adalah proses resorpsi tulang di daerah tekanan dan pembentukan tulang di daerah tarikan (Herniyati, 2016). Ketika kekuatan mekanik diaplikasikan, ligamen periodontal akan menyempit pada sisi yang mengalami tekanan, diikuti dengan resorpsi tulang alveolar akibat aktivitas osteoklas. Sebaliknya, pada sisi tarikan terjadi aposisi tulang oleh osteoblas (Iskandar *et al.*, 2010). Pergerakan gigi ortodonti dapat dikontrol dengan memperhatikan besarnya gaya yang diberikan dan respon biologis dari ligamen periodontal (Herniyati, 2016).

#### 2.1.1. Teori Pergerakan Gigi

Ada dua teori yang menjelaskan mengenai mekanisme pergerakan gigi. Teori yang pertama adalah teori piezoelektrik. Ketika alat ortodontik diaktifkan, gaya yang diberikan pada gigi akan ditransmisikan ke seluruh jaringan disekitarnya. Gaya ini menyebabkan pelengkungan pada tulang alveolar. Melengkungnya tulang alveolar berperan penting dalam pergerakan gigi ortodontik. Teori Piezoelektrik menyebutkan bahwa pergerakan gigi pada perubahan metabolisme tulang yang dikontrol oleh sinyal listrik yang dihasilkan oleh pelengkungan tulang alveolar. Sebagai respon terhadap gaya mekanis, dihasilkan potensial listrik dalam jaringan yang mendapat tekanan, potensial listrik ini mungkin mengisi makromolekul yang berinteraksi dengan daerah spesifik pada membrane

sel atau menggerakkan ion-ion melewati membrane sel. Tulang alveolar pada sisi tarikan memiliki konfigurasi konkaf, bermuatan elektronegatif dan menstimulasi peningkatan aktivitas osteoblast sehingga terjadi deposit tulang, sedangkan pada sisi tekanan tulang memiliki permukaan konveks bermuatan elektropositif atau netral dan menunjukkan peningkatan aktivitas osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang.

Piezoelektrik adalah fenomena yang dapat diamati pada bahan berkrystal, yaitu deformasi yang terjadi pada struktur kristal akan menghasilkan aliran listrik karena adanya perpindahan elektron pada kristal-kristal tersebut. Mineral tulang, kristal hidroksiapatit dan matriks kolagen merupakan struktur kristal organik yang memiliki sifat piezoelektrik. Sinyal piezoelektrik memiliki dua karakteristik istimewa, yaitu (1) sinyal yang cepat hilang, bila gaya diaplikasikan akan timbul sinyal piezoelektrik yang kemudian akan cepat hilang walaupun gaya tetap dipertahankan, dan (2) bila gaya dihentikan akan timbul sinyal yang sama tetapi berlawanan arah.

Teori selanjutnya adalah teori klasik dari pergerakan gigi yaitu Teori Tarikan dan Tekanan. Teori ini menghubungkan pergerakan gigi dengan perubahan seluler yang dihasilkan oleh *messenger* kimiawi akibat perubahan aliran darah dalam ligament periodontal. Perubahan aliran darah menimbulkan berkurangnya level oksigen di daerah tekanan dan menurunnya aktivitas *Adenosine triphosphate* (ATP). Perubahan ini dapat terjadi secara langsung atau tidak langsung pada aktivitas seluler dan diferensiasi (Asyri, 2018).

Tabel 2.1. Faktor-faktor yang mempengaruhi pergerakan gigi (Asyri, 2018)

<b>Faktor yang mempengaruhi pergerakan gigi</b>	<b>Daerah Tekanan</b>	<b>Daerah Tarikan</b>
Aliran darah	Menurun	Meningkat
Level oksigen	Menurun	Meningkat
Level Karbon dioksida	Meningkat	Menurun
Replikasi sel	Menurun	Meningkat
Produksi serabut	menurun	Meningkat

### 2.1.2. Tahapan Pergerakan Gigi

Pergerakan gigi menurut Burstone terbagi ke dalam 3 tahap, fase *initial*, fase *lag*, dan fase *post lag*. Fase *initial* atau fase awal terjadi segera setelah gigi diberi kekuatan mekanik. Pergerakan cepat karena gigi berpindah ke *periodontal space*. Fase ini biasanya terjadi antara 24 jam hingga dua hari setelah gigi diberikan kekuatan mekanik. Pergerakan gigi terjadi di dalam soket tulang alveolar. Oleh karena itu, timbul daerah tarikan dan tekanan di sekitar gigi. Pada ligament periodontal terjadi ekstravasasi pembuluh darah, kemoatraksi sel-sel inflamasi, dan pengerahan progenitor osteoblast dan osteoklas (Asyri, 2018).

Setelah fase *initial*, ada fase *lag* dimana gerakan yang terjadi minimal atau terkadang tidak ada gerakan sama sekali karena pada daerah ligament periodontal yang tertekan terjadi proses hyalinisasi (Asyri, 2018). Pada fase ini, terjadi proses inflamasi kronis setelah sebelumnya pada fase *initial* terjadi proses inflamasi akut (Dudic, 2018). Pergerakan tidak akan terjadi sampai jaringan yang nekrosis dihilangkan. Pada fase *lag*, pergerakan gigi berhenti sekitar 20-30 hari dan selama waktu itu, seluruh jaringan yang nekrosis dihilangkan bersamaan dengan resorpsi sumsum tulang yang berdekatan. Jaringan nekrotik yang berasal dari tulang dan ligament periodontal yang terkena tekanan akan dihilangkan oleh makrofag, foreign body giant cells (FBGc), dan sel-sel osteoklas selain itu



sel-sel yang berperan dalam fase ini adalah fibroblas, sel-sel endotel, osteoblast, dan sel-sel sumsum tulang (Asyri, 2018; Dudic 2018).

Fase ketiga atau post-lag phase merupakan tahapan dimana pergerakan gigi secara bertahap atau tiba-tiba meningkat dan biasanya terjadi setelah 40 hari kekuatan mekanik diberikan. Selama pergerakan gigi, diduga perkembangan terus menerus dan pengangkatan jaringan nekrotik terjadi (Asyri, 2018; Dudic 2018). Mengikuti pengangkatan jaringan nekrotik yang terhyalinisasi, pada fase ini pergerakan gigi nantinya akan berubah menjadi lebih stabil dari waktu ke waktu (Cifter *et al.*, 2019).

## 2.2. Tulang

### 2.2.1. Definisi Tulang

Tulang dilihat dari strukturnya dapat didefinisikan sebagai sebuah jaringan penghubung seperti kartilagoyang terdiri atas sel-sel yang bertempat di lacuna dan serat-serat kolagen. Definisi lain menurut Ward, 1977 tulang adalah jaringan keras dalam tubuh yang terdiri dari dua tipe jaringan yaitu jaringan kompak dan bunga karang mengandung kolagen dalam jumlah yang hampir sama (Perwitasari, 2008). Tulang adalah organ tubuh yang selalu mengalami proses pergantian (*turnover*), tulang lama diganti dengan tulang baru yaitu terjadi proses resorpsi dan proses formasi (Priyana, 2016).

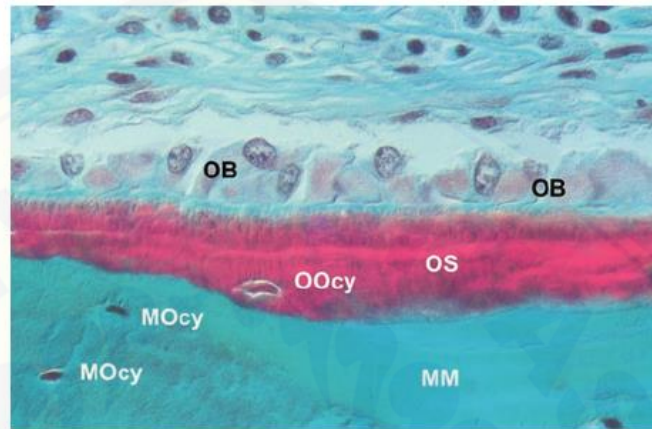
### 2.2.2. Komposisi Tulang

Tulang terdiri dari 2 bahan yaitu matriks tulang yang kaya akan mineral (70%) alias tulang yang sudah matang dan bahan-bahan organik (30%) terdiri dari sel-sel sebagai berikut:

#### a. Osteoblas

Secara histologi ditemukan pada permukaan tulang. Osteoblas mensintesis, mensekresi, dan menyimpan osteoid, komponen organik dari matriks tulang yang baru. Osteoid tidak terkalsifikasi dan tidak

mengandung mineral apapun, namun ketika disimpan, dengan cepat ia termineralisasi dan menjadi tulang (Eroschenko *et al.*, 2013).



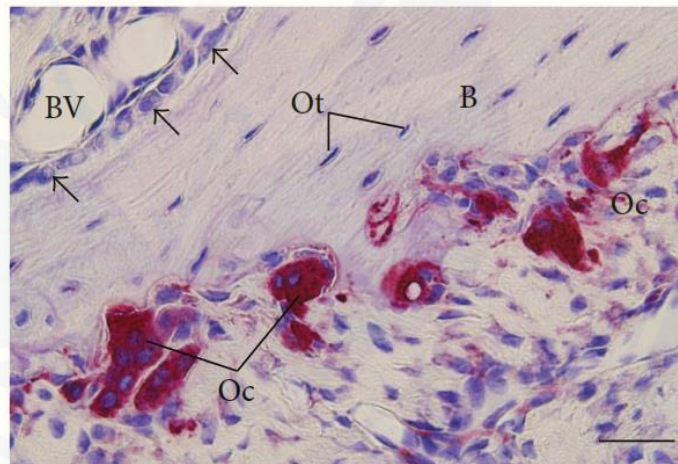
Gambar 2.1 Gambaran histologi sel Osteoblas (Ob) (Gasser *et al.*, 2017)

#### b. Osteosit

Osteosit adalah wujud dewasa dari osteoblast dan merupakan sel-sel utama pada tulang, osteosit juga lebih kecil daripada osteoblas. Osteosit terjebak oleh matriks tulang disekitarnya yang dihasilkan oleh osteoblast. Osteosit terletak didalam kanalikuli lakunadan sangat dekan dengan pembuluh darah. Pada tiap lacuna hanya itemukan 1 osteosit. Tidak seperti kartilago, matriks tulang yang termineralisasi lebih keras, sehingga nutrisi dan produk metabolisme tidak mudah berdifusi ke osteosit. Hal ini menyebabkan pada tulang banyak vaskularisasi dan memiliki system saluran atau kanalkecil yang disebut kanalikuli, yang terbuka ke dalam osteon (Eroschenko *et al.*, 2013).

Osteosit adalah sel-sel yang bercabang-cabang. Sitoplasmanya meluas hingga masuk ke kanalikuli, memancar ke segala arah dari tiap lacuna, dan membuar hubungan dengan sel-sel tetangga melalui *gap junctions*. Adanya koneksi ini, memungkinkan lewatnya ion dan

molekul kecil dari sel ke sel. Kanalikuli mengandung cairan ekstraseluler, dan *gap junction* pada perluasan sitoplasma memungkinkan masing-masing osteosit untuk berhubungan dengan osteosit yang berdekatan dan dengan bahan-bahan yang berada didalam pembuluh darah terdekat. Dengan cara ini kanalikuli membentuk koneksi kompleks di sekitar pembuluh darah dalam osteon dan membentuk mekanisme pertukaran yang efisien, nutrisi dibawa ke osteosit, pertukaran gas terjadi diantara dah dan sel, dan sampah metabolic dikeluarkan dari osteosit. kanalikuli menjaga osteosit tetap hidup, dan osteosit pada gilirannya mempertahankan homeostasis dari matriks tulang di sekitarnya dan konsentrasi kalsium dan fosfat dalam darah. Ketika osteosit mati, matriks tulang di sekitarnya diserap kembali oleh osteoklas (Eroschenko *et al.*, 2013).

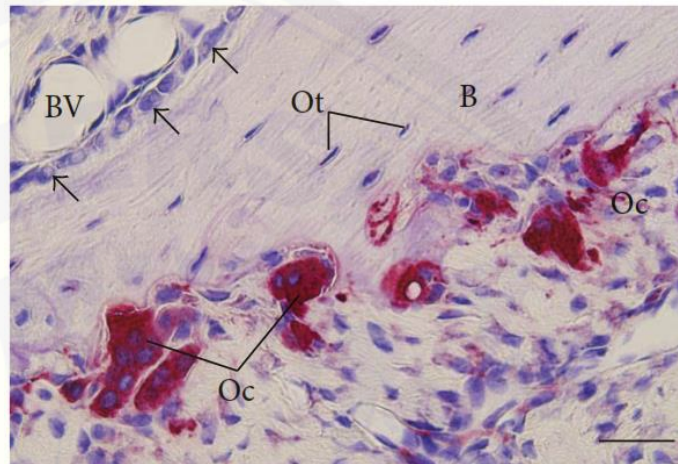


Gambar 2.2 Gambaran Histologi Sel Osteosit (Ot) (Florenco *et al.*, 2015).

### c. Osteoklas

Osteoklas adalah sel besar berinti banyak yang ditemukan di sepanjang permukaan tulang tempat resorpsi (removal of bone), remodeling, dan perbaikan tulang terjadi. Osteoklas tidak termasuk dalam sel osteoprogenitor, sebaliknya osteoklas berasal dari fusi darah atau sel-sel progenitor hemopoietik yang termasuk dalam turunan sel

makrofag-monosit *mononuclear* dari sumsum tulang. Fungsi utama sel ini adalah resorpsi tulang selama remodeling (pembaruan atau pembentukan ulang). Osteoklas biasanya terletak pada permukaan yang diresorpsi atau *lacuna Howship* (Eroschenko *et al.*, 2013).



Gambar 2.3 Gambaran Histologi Sel Osteoklas (Oc) (Florencio *et al.*, 2015).

d. Osteoprogenitor

Sel-sel osteoprogenitor adalah sel-sel induk pluripotential yang tidak berdiferensiasi yang berasal dari mesenkim jaringan ikat. Sel-sel ini terletak di lapisan dalam periosteum jaringan ikat dan di lapisan tunggal dalam endosteum yang melapisi marrow cavities, osteon (sistem Haversian), dan kanal perforans di tulang. Fungsi utama periosteum dan endosteum adalah nutrisi tulang dan untuk menyediakan pasokan osteoblas baru untuk pertumbuhan, remodeling, dan perbaikan tulang. Selama perkembangan tulang, sel-sel osteoprogenitor berproliferasi dengan mitosis dan berdiferensiasi menjadi osteoblas, yang kemudian mengeluarkan serat kolagen dan matriks tulang (Eroschenko *et al.*, 2013).

### 2.3. Remodeling Tulang

*Remodeling* pada tulang akan terjadi terus menerus sebagai respon kebutuhan mineral, stress mekanis, penipisan tulang, atau penyakit (Eroschenko *et al.*, 2013). *Remodeling* tulang alveolar pada pergerakan gigi ortodonti terjadi ketika tekanan yang diaplikasikan pada gigi menimbulkan respon pada sel-sel dalam ligamen periodontal, hal ini menyebabkan gigi dapat bergerak selama perawatan ortodonti (Handayani *et al.*, 2016). Berbagai macam sel seperti sel imun, pembuluh darah, dan sistem saraf serta sel-sel tulang ikut berpartisipasi pada remodeling jaringan selama pergerakan gigi ortodonti (Tripuwabhrut *et al.*, 2013).

#### 2.3.1. Proses *Remodeling* Tulang

Pada pergerakan gigi ortodonti dan proses remodeling terjadi proses inflamasi. Perubahan vaskular dan seluler merupakan peristiwa awal yang ditemukan dan sejumlah mediator inflamasi, termasuk sitokin dan neuropeptida.

Mekanisme *remodeling* tulang:

1. Tulang dan kemungkinan kerusakan kecil pada dentin terjadi pada pelepasan sitokin inflamasi (prostaglandin, IL-1 $\beta$  dan lainnya) dan paparan kolagen yang termineralisasi dengan cairan ekstraseluler.
2. Hal ini menghasilkan osteoblas yang memproduksi RANKL.
3. Pra-osteoklas dari sirkulasi darah memiliki reseptor RANK, yang mana akan diaktifkan oleh RANKL untuk osteoklas.
4. Saat tulang diresorpsi, faktor pertumbuhan dilepaskan yang akan menstimulus osteoblas untuk memproduksi OPG (reseptor yang mengikat RANKL dan mengurangi diferensiasi osteoklas) yang kemudian ditarik kembali ke permukaan tulang.
5. Sel-sel mononuklear bergerak masuk dan melapisi permukaan gigi yang teresorpsi dengan *cementing substance*.

6. Sel *osteogenic perivascular* berpindah melalui zona kepadatan sel yang rendah dan berdiferensiasi menjadi preosteoblas yang kemudian membelah menjadi dua osteoblas.
7. Osteoblas membentuk tulang baru, mengisi ruang yang teresorpsi menyelesaikan proses *turnover*.

#### 2.4. Fluor

*Fluoride* yang dulunya biasa disebut *fluorine*, merupakan elemen kimia yang bersifat sangat elektronegatif di antara semua elemen-elemen kimia. Oleh karena itu tidak pernah ditemukan dalam bentuk elemen bebas. Pada umumnya bersama-sama dengan elemen lain dalam bentuk garam-garam *fluoride* seperti antara lain contohnya kalsium fluorida dan natrium fluorida. Dosis optimal fluor yang diberikan secara topikal pada manusia sebanyak 400-550 ppm (O Mullane *et al.*, 2016; Sutjiati 2016).

##### 2.4.1. Mekanisme Kerja Fluor terhadap Tulang

Fluor dianggap sebagai multifungsional growth factor yang memiliki berbagai aksi pada diferensiasi osteoblas. Fluor adalah ion anorganik yang unik karena mampu merangsang pembentukan tulang secara *in vivo* maupun *in vitro*. Selain itu, fluor juga mampu menghambat osteoklastogenesis pada tulang (Lee *et al.*, 2017).

Kerja fluor pada osteoblas menyebabkan terjadinya proliferasi dan diferensiasi, menghambat fosfotyrosil acid phosphatase, dan mengatur aktivitas hormon-hormon pertumbuhan. Sebagai contoh, Natrium fluoride (NaF) mempercepat proliferasi osteoblast pada dosis yang telah ditentukan, hal ini ditunjukkan dengan pemberian NaF meningkatkan ekspresi Runx2. Ekspresi Runx2 ditemukan di preosteoblas, *immature osteoblast*, *early mature osteoblast*, dan preodontoblas serta bertindak sebagai pengatur utama pada diferensiasi osteoblas dan pembentukan tulang (Lee *et al.*, 2017).

Penelitian yang dilakukan Bhawal dkk. 2015, membuktikan bahwa pada kelompok yang diberi NaF tingkat resorpsi tulangnya berkurang jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini dibuktikan dengan ekspresi *nuclear factor of activated T cells* (NFAT)c1 berkurang pada kelompok perlakuan yang diberi NaF. NFATc1 sendiri berperan penting dalam pembentukan osteoklas (Bhawal *et al.*, 2015).

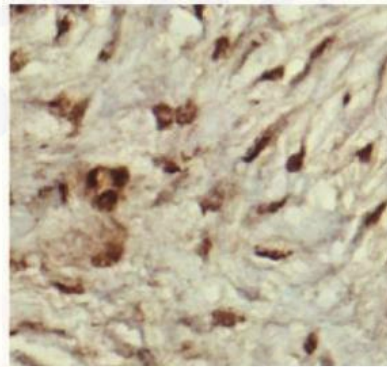
### 2.5. Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin (IL-10) atau *cytokines synthesis inhibitory factor* (CSIF) adalah sitokin yang penting dengan sifat anti-inflamasi selain TGF- $\beta$  dan IL-35. IL-10 merupakan protein yang larut dan terdiri dari 160 asam amino serta memiliki berat molekul sekitar 18 kD. IL-10 diproduksi oleh sel T, sel B, monosit, makrofag, sel mast, sel eosinofil, keratinosit, hepatosit, sel epitel, sel astrosit, dll. (Soeroso, 2007). IL-10 bertindak melalui kompleks reseptor transmembran, yang terdiri dari IL-10R1 dan IL-10R2, dan meregulasi fungsi banyak sel imun yang berbeda. Dalam monosit/makrofag, IL-10 mengurangi produksi mediator inflamasi dan menghambat presentasi antigen, meskipun IL-10 meningkatkan penyerapan antigen. Selain itu, IL-10 memainkan peran penting dalam biologi sel B dan sel T. Relevansi fisiologis khusus dari sitokin ini terletak pada pencegahan dan pembatasan reaksi imun spesifik dan tidak spesifik yang berlebihan dan, sebagai akibatnya, kerusakan jaringan (Sabat *et al.*, 2010).

IL-10 sebagai sitokin anti-inflamasi, pada tulang sitokin ini menghambat pembentukan osteoklas. Menurut Xu *et al.*, IL-10 memiliki efek menghambat yang poten pada pembentukan osteoklas bisa secara langsung dengan cara menghambat prekursor osteoklas. Secara tidak langsung atau molekular, IL-10 dalam mekanismenya melakukan penghambatan osteoklastogenesis diindikasikan meningkatkan ekspresi osteoprotegerin (OPG) dan menurunkan ekspresi receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) dan colony-stimulating factor-1 (CSF-1) atau disebut Macrophage-colony

stimulating factor (M-CSF) (Zhang *et al.*, 2014). Selain itu juga menurunkan produksi sitokin-sitokin yang berperan dalam pembentukan osteoklas seperti *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 (IL-1), dan Interleukin 6 (IL-6) serta M- (Amarasekara *et al.*, 2018).

Pada pewarnaan dengan teknik Imunohistokimia, ekspresi Interleukin-10 yang positif akan terlihat berwarna coklat. Berikut ditunjukkan pada gambar.



Gambar 2.4 Ekspresi Interleukin-10 pada pewarnaan IHC (Luo *et al.*, 2014).

## 2.6. Imunohistokimia

Teknik imunohistokimia adalah suatu metode yang bertujuan untuk mengidentifikasi sel-sel spesifik berdasarkan komponen antigenik atau produk selulernya dengan reaksi kompleks antigen-antibodi. Dengan kata lain, imunohistokimia digunakan sebagai dasar penegakan diagnosis dan identifikasi sel berdasarkan detail sitomorfologi (Rahayu *et al.*, 2008).

Terdapat dua metode dasar identifikasi antigen dalam jaringan dengan imunohistokimia, yaitu metode langsung (*direct method*) dan tidak langsung (*indirect method*).

### a. Metode langsung (*direct method*)

Metode langsung merupakan metode pengecatan satu langkah karena hanya melibatkan satu jenis antibodi, yaitu antibodi yang terlabel, contohnya antiserum terkonjugasi *fluorescein isothiocyanate* (FITC) atau rodhamin (Lubiset *et al.*, 2018).



b. Metode tidak langsung (*indirect method*)

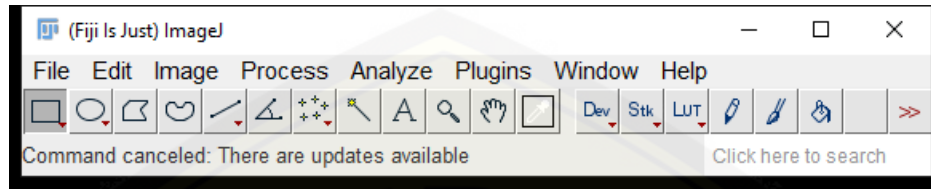
Metode ini menggunakan dua macam antibodi, yaitu antibodi primer (tidak berlabel) dan antibodi sekunder (berlabel). Antibodi primer bertugas mengenali antigen yang diidentifikasi pada jaringan (*first layer*), sedangkan antibodi sekunder akan berikatan dengan antibodi primer (*second layer*). Antibodi kedua merupakan anti-antibodi primer. Pelabelan antibodi sekunder diikuti dengan penambahan substrat berupa kromogen. Kromogen merupakan suatu gugus fungsi senyawa kimiawi yang dapat membentuk senyawa berwarna bila bereaksi dengan senyawa tertentu. Penggunaan kromogen *fluorescent dye* seperti FITC, rodhamin, dan Texas-red disebut metode *immunofluorescence*, sedangkan penggunaan kromogen enzim seperti peroksidase, alkali fosfatase, atau glukosa oksidase disebut metode *immunoenzyme* (Lubis *et al.*, 2018).

### 2.7. *Immunoratio Score* (IRS)

Metode perhitungan imunohistokimia dilakukan secara kualitatif dan semi kuantitatif. Salah satu metode semi kuantitatif adalah penggunaan *software Immunoratio Score* (IRS). *ImmunoRatio* adalah aplikasi tidak berbayar dan analisa gambar berbasis website untuk preparat yang dilakukan pewarnaan imunohistokimia (Yeo *et al.*, 2017). Dalam perkembangannya, aplikasi ini dapat diakses dengan mengunduh software ImageJ yang nantinya akan diarahkan ketika kita membuka website <http://jvsmicroscope.uta.fi/> (Fulawka *et al.*, 2016; González *et al.*, 2016).

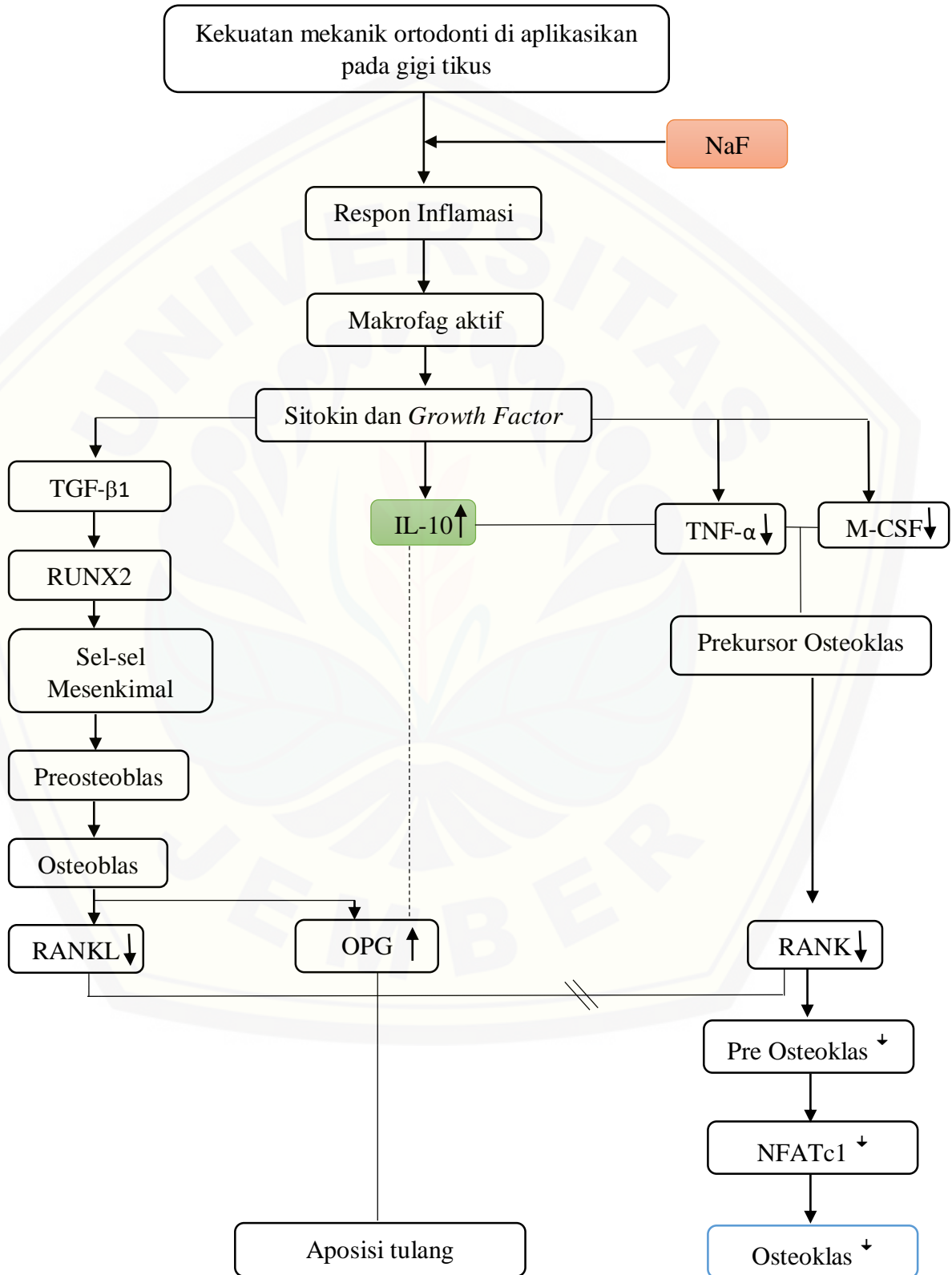
*Immunoratio* pertama kali dikembangkan pada tahun 2010 (Yeo *et al.*, 2017). Hasil perhitungan ekspresi akan disajikan berupa dua gambar, gambar pertama adalah gambar asli sebagai pembanding gambar kedua berupa gambar *pseudocolor* yang merupakan hasil perhitungan dari aplikasi (Castaneda *et al.*, 2017). Kualitas pewarnaan sangat penting untuk analisis gambar menggunakan *software* ini. Variasi pada pewarnaan jaringan bisa

mempengaruhi hasil interpretasi yang dilakukan dengan *software* ini (Yeo *et al.*, 2017).



Gambar 2.5 Aplikasi ImageJ

2.8. Kerangka Konsep



**Keterangan:**

Kotak warna merah	: Pemberian perlakuan
Kotak warna hijau	: Parameter yang diperiksa
Kotak garis biru	: Hasil pemberian NaF

## 2.9. Penjelasan Kerangka Konsep

Kekuatan mekanik dari alat ortodonti yang diaplikasikan pada gigi tikus akan menyebabkan timbulnya proses inflamasi. Adanya proses inflamasi menimbulkan respon sel-sel makrofag untuk memproduksi berbagai macam sitokin dan *growth factor* yang berperan dan memiliki efek pro inflamasi dan anti inflamasi.

Pada gigi tikus yang diberi kekuatan mekanik ortodonti kemudian diberi perlakuan berupa pemberian gel Natrium Fluorida (NaF). Pemberian NaF berpengaruh pada proses *remodeling* tulang dimana NaF dapat meningkatkan proses aposisi tulang dengan meningkatkan pembentukan osteoblas dan menurunkan pembentukan osteoklas.

Peningkatan pembentukan osteoblas terjadi karena meningkatnya *Transforming growth factor-beta 1* (TGF- $\beta$ 1). TGF- $\beta$ 1 meningkatkan produksi *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), dimana Runx2 menginduksi sel-sel mesenkimal menjadi preosteoblas yang nantinya akan menjadi sel-sel osteoblast yang aktif. Selanjutnya mekanisme penurunan pembentukan sel osteoklas terjadi karena pemberian NaF meningkatkan ekspresi Interleukin 10 (IL-10). Peningkatan IL-10 mempengaruhi penurunan pembentukan sel osteoklas secara tidak langsung dan secara langsung. Secara tidak langsung, IL-10 meningkatkan ekspresi *Osteoprotegerin* (OPG) dan menurunkan ekspresi *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL). Osteoklas akan terbentuk jika RANKL berikatan dengan *Receptor activator of NF- $\kappa$ B* (RANK) yang diproduksi oleh sel osteoklas. Adanya peningkatan OPG menghalangi RANKL berikatan dengan RANK sebaliknya RANKL akan

berikatan dengan OPG. Selain itu secara tidak langsung IL-10 menurunkan ekspresi *Tumor Necrosis Factor-Alpha* (TNF- $\alpha$ ) dan *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) pada prekursor osteoklas sehingga pembentukan preosteoklas berkurang begitu pula ekspresi RANK pada preosteoklas. Secara langsung IL-10 mengurangi pembentukan sel osteoklas dengan mengurangi ekspresi *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFATc1).

#### **2.10. Hipotesis**

Natrium Florida (NaF) secara topikal dapat meningkatkan ekspresi Interleukin 10 (IL-10) pada sel osteoklas di daerah tulang alveolar gigi tikus Wistar jantan yang diinduksi kekuatan mekanik ortodonti.

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris. Sampel maupun perlakuan diharapkan terkendali, terukur dan pengaruh perlakuan dapat dipercaya. Penelitian jenis ini merupakan suatu penelitian yang bertujuan untuk mencari hubungan sebab akibat dengan memanipulasi atau mengintervensi variable dalam satu atau lebih kelompok dan mengendalikan faktor yang dapat mempengaruhi hubungan sebab akibat, kemudian membandingkannya dengan kelompok kontrol yang tidak dilakukan perlakuan atau dimanipulasi (Notoatmodjo, 2012).

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test only Control Group*, yaitu rancangan penelitian yang memungkinkan peneliti untuk mengetahui efek perlakuan dan tanpa perlakuan pada unit eksperimen (Notoatmodjo, 2012). Pengukuran variable dilakukan setelah hari ke – 7 dan hari ke – 14. Dalam penelitian eksperimental ini terdapat perlakuan dan pengulangan (replikasi) serta terdapat kontrol pembanding (Hienz dkk, 2015).

### 3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

#### 3.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di:

- a. Pembuatan gel Natrium Fluorida (NaF) di Laboratorium Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Jember.
- b. Perlakuan hewan coba di Laboratorium Farmakologi ruang hewan, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.
- c. Pembuatan preparat jaringan tulang alveolar di Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.
- d. Pewarnaan *immunohistochemistry* (IHC) di Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember,

- e. Perhitungan jumlah ekspresi IL-10 dilakukan di Laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi Gedung *Center for Development of Advance Science and Technology* (CDAST), Universitas Jember.

### 3.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2019 sampai selesai.

## 3.3. Populasi dan Sampel

### 3.3.1. Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah 16 tikus *Rattus Novergocus* strain wistar berjenis kelamin jantan

### 3.3.2. Sampel Penelitian

#### a. Cara Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan teknik *total sampling*. Teknik *total sampling* adalah teknik yang menjadikan seluruh populasi sebagai sampel (Notoadmodjo, 2012).

#### b. Besar Sampel Penelitian

Besar sampel ditentukan berdasarkan jumlah ulangan yang dianggap telah cukup baik dengan menggunakan rumus (Daniel, 2012):

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

#### **Keterangan:**

n = Besar sampel tiap kelompok

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

$\sigma$  = Standar deviasi sampel

d = Kesalahan yang masih dapat ditoleransi

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

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

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

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq 4$$

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

c. Syarat Sampel

a) Jenis Kelamin Jantan

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

b) Umur Dewasa dan Berat Badan Ideal

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

c) Pakan yang Sesuai dan Seragam

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



diberi perlakuan untuk adaptasi dengan tempat dan makanan. (Sutjiati, 2016).

### **3.4. Identifikasi Variabel Penelitian**

#### 3.4.1. Variabel Bebas

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

#### 3.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah Interleukin 10 (IL-10)

#### 3.4.3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain:

- a. Jenis hewan coba
- b. Umur hewan coba
- c. Berat badan hewan coba
- d. Tatalaksana pemeliharaan hewan coba
- e. Jenis dan bahan anastesi hewan coba
- f. Lokasi gigi dan pergerakan gigi
- g. Cara pemberian dan dosis bahan perlakuan
- h. Waktu evaluasi
- i. Metode pemeriksaan

### **3.5. Definisi Operasional**

#### 3.5.1. Natrium Fluorida (NaF)

Bahan Fluorida yang digunakan dalam penelitian ini adalah bubuk Natrium Fluorida dengan merk dagang emsure berwarna putih yang dibentuk menjadi gel dengan dosis 11,34 ppm. Diaplikasikan secara topikal ke dalam sulkus gingiva tikus Wistar jantan (Sutjiati, 2016).

#### 3.5.2. Ekspresi Interleukin 10 (IL-10)

Pengamatan ekspresi Interleukin 10 (IL-10) pada sel osteoklas dengan metode imunohistokimia memperlihatkan warna coklat pada sel

yang positif mengekspresikan IL-10 menggunakan perbesaran 400x. Perhitungan ekspresi IL-10 dilakukan menggunakan *software Immunoratio Score (IRS)*.

### 3.5.3. Kekuatan Mekanik Ortodonti

Kekuatan mekanik ortodonti merupakan besarnya kekuatan yang diberikan dengan jangka waktu tertentu, akan terjadi pergerakan gigi karena ligamen periodontal dan tulang di sekeliling gigi mengalami perubahan (remodeling). Besar kekuatan mekanik ortodonti yang diberikan dalam penelitian ini diaplikasikan pada gigi insisif sentral rahang atas tikus Wistar jantan untuk menggerakkan gigi insisif ke arah palatal dengan menggunakan *Ni-Ti closed coil spring* sebesar 10 gram/cm<sup>2</sup> yang diukur menggunakan *tension gauge* (Sutjiati, 2016).

## 3.6. Alat dan Bahan Penelitian

### 3.6.1. Alat penelitian

Berikut alat-alat yang digunakan dalam penelitian:

1. Kandang peliharaan hewan coba
2. Tempat makan dan tempat minum hewan coba
3. Timbangan berat badan hewan coba (merk Exhaust)
4. Timbangan analitik
5. Mortar dan alu
6. Kotak kaca
7. Gunting
8. Tabung reaksi
9. *Ni-ti closed coil spring*
10. *Stainless steel ligature wire*
11. *Tension gauge* (Ormco, Europa)
12. *Disposable syringe* 1 ml (Onemed, Indonesia)
13. *Excavator*, sonde setengah lingkaran, *scalpel*, arteri *clamp*, pinset
14. Pot jaringan (Makmur Jaya, Indonesia)

15. Mikromotor *contra angle low speed*
16. *Minidrill*
17. Diamond round bur no.1 (Edents, Switzerland)
18. Kuas, kertas saring, label identitas
19. Mesin *processing* jaringan
20. *Tissue cassette*
21. *Block mould*
22. Pisau mikrotom (*Microtome Holder*)
23. *Slide warmer*
24. *Deck glass*
25. *Object glass*
26. Wadah baskom
27. *Staining jar*
28. Mikroskop
29. Kamera mikroskop optilab
30. Knable tang
31. Sarung tangan dan masker

### 3.6.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian sebagai berikut:

1. Pakan standar hewan coba (Turbo, Indonesia) dan air minum
2. Bubuk Natrium Fluorida
3. Carbopol 1%, TEA 3%, dan propilen glikol 3%
4. Semen *Glass Ionomer* Tipe IX (Fuji IX)
5. Larutan bufferneutral formalin 10% (Makmur Jaya, Indonesia)
6. Asam Formiat 10%
7. Bahan Anestetikum Ketamin dan Xylazine
8. Bahan embedding
9. Paraffin

10. Alkohol 100%, 95%, 80%, 75%, 70%, dan Alkohol absolut (Novapharin, Indonesia)
11. Xylol
12. Akuades steril (Aditama Raya Farmindo, Indonesia)
13. Blocking serum (kit)
14. *Diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB)
15. *Mayer's Hematoxylin*
16. Buffer fosfat
17. Etanol absolut
18. Entelan
19. *Bluing reagent*
20. *Phosphate buffer saline* (PBS) (pH 7,6)
21. *Peroxidase blocking solution*
22. *Prediluted blocking serum*
23. *Horseradish peroxidase* (HRP)
24. Antibodi IL-10 (Shenandoah Biotechnology, Warwick, USA)
25. Antibodi sekunder biotin
26. *Cotton pellet*.

### **3.7. Konversi Dosis**

#### 3.7.1. Dosis Fluorida

Bahan fluorida yang digunakan adalah Natrium Fluorida (NaF) bentuk gel dengan dosis 11,34 ppm dengan dosis 2,16mg/hari (Aguilar *et al*, 2008) yang merupakan sediaan fluorida yang aman untuk tikus Wistar jantan yang digunakan dalam penelitian ini dengan berat sebesar 200-250 gram. Pengaplikasian NaF pada tikus Wistar jantan dilakukan 2 kali sehari, yakni, pada pagi dan sore hari.

Perhitungan penggunaan dosis pada tikus wistar diuraikan sebagai berikut:

Dosis optimal fluor 2,16 mg/kgBB/hari

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

$$\begin{aligned} \text{Rumus} &= (\text{Dosis optimal} \times \text{Berat badan} \times \text{Hari}) \\ &= (2,16 \text{ mg/kg/hari} \times 0,25 \text{ kg} \times 7 \text{ hari}) + (2,16 \text{ mg/kg/hari} \times 0,25 \\ &\text{ kg} \times 14 \text{ hari}) \\ &= 3,78 \text{ mg} + 7,56 \text{ mg} = 11,34 \text{ mg} \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned} \text{Rumus} &= (\text{Dosis optimal} \times \text{Berat badan}) : \text{Konsentrasi optimal} \\ &= (2,16 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}) : 2 \text{ mg/ml} = 0,216 \text{ ml} \\ &= (2,16 \text{ mg} \times 0,25 \text{ kg}) : 2 \text{ mg/ml} = 0,27 \text{ ml} \end{aligned}$$

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

### 3.7.2. Dosis Bahan Anestetikum

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

a. Dosis Ketamin yang digunakan:

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

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

$$\begin{aligned} \text{Rumus} &= (\text{Dosis} \times \text{Berat}) : \text{Konsentrasi} \\ &= (50 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}) : 100 \text{ mg/ml} ; (50 \text{ mg} \times 0,25 \text{ kg}) : 100 \\ &\text{ mg/ml} \\ &= 0,1 \text{ ml} ; 0,125 \text{ ml} \end{aligned}$$

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

b. Dosis Xylazine yang digunakan:

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi 2 \% Xylazine} &= 2 \text{ gr} / 100 \text{ ml} \\ &= 2000 \text{ mg} / 100 \text{ ml} \\ &= 20 \text{ mg/ml}\end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}\text{Rumus} &= (\text{Dosis} \times \text{Berat}) : \text{Konsentrasi} \\ &= (5 \text{ mg} \times 0,2 \text{ kg}) : 20 \text{ mg/ml} ; (5 \text{ mg} \times 0,25 \text{ kg}) : 20 \\ &\text{mg/ml} \\ &= 0,05 \text{ ml} ; 0,0625 \text{ ml}\end{aligned}$$

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

### 3.8. Prosedur Penelitian

#### 3.8.1. Perijinan *Ethical Clearence*

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

#### 3.8.2. Persiapan Hewan Coba

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

#### 3.8.3. Pembagian Kelompok Perlakuan

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

- a. Kelompok A merupakan kelompok kontrol yang diberi kekuatan mekanik ortodonti selama 7 hari sebanyak 4 ekor.
- b. Kelompok B merupakan kelompok kontrol yang diberi kekuatan mekanik ortodonti 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 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 NaF selama 14 hari sebanyak 4 ekor.

#### 3.8.4. Persiap Gel 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 dicampurkan 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.

#### 3.8.5. Perlakuan Hewan Coba

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



Gambar 3.1 Pemasangan *coil spring* pada hewan coba (Aghili *et al.*, 2017)

2. Hewan coba pada kelompok C dan D merupakan hewan coba yang diberi perlakuan gel NaF 11,34 ppm secara topikal ke dalam sulkus gingiva dengan syringe modifikasi sebanyak dua kali sehari. Pemberian NaF pada hewan coba dilakukan setelah hewan coba diberi makan dua kali sehari (Sutjiati, 2016).

#### 3.8.6. Euthanasia Hewan Coba

Dilakukan dekaputasi hewan coba kelompok A dan B pada hari ke-8 dan kelompok C dan D pada hari ke-15. Euthanasia hewan coba dilakukan dengan injeksi ketamin overdosis secara intramuscular (Vieira *et al*, 2018). 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.

### 3.8.7. Tahapan Pembuatan Sediaan dan Pemeriksaan Imunohistokimia

#### a. Perendaman Jaringan dengan Larutan Buffer Neutral Formalin 10%.

Jaringan yang sudah terambil, dilakukan fiksasi dengan menggunakan larutan Buffer Neutral Formalin 10%. Larutan ini berfungsi untuk mengawetkan jaringan agar terhindar dari pencernaan jaringan oleh enzim-enzim (otolisis) atau bakteri dan untuk melindungi struktur fisik sel dan mempertahankan morfologi sel seperti semula (Roelofs *et al*, 2019). Fiksasi jaringan dilakukan selama minimal 24 jam (Santoso, 2006).

#### b. Perendaman larutan dekalsifikasi

Dilakukan dekalsifikasi pada jaringan dengan menggunakan Asam Formiat 10% selama 7 hari. Proses dekalsifikasi bertujuan untuk menghilangkan garam kalsium dari jaringan tulang sehingga tulang menjadi lunak, dan memudahkan dalam proses pemotongan. Jaringan dicuci dengan PBS 3 - 5x untuk membersihkan dari kontaminan (Santoso, 2006). Proses dekalsifikasi selesai ditandai dengan jaringan yang sudah lunak (Muntiha, 2001).

#### c. Pemrosesan Jaringan

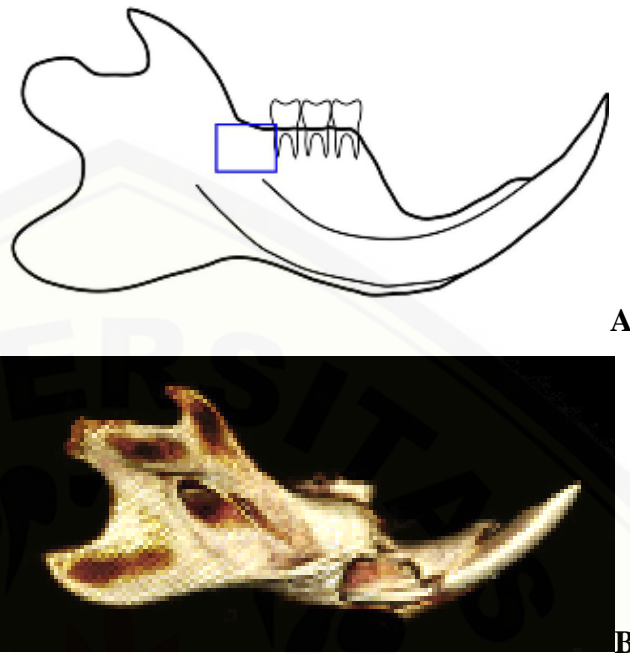
1. Dehidrasi yaitu penarikan air dari dalam jaringan dengan menggunakan konsentrasi rendah ke tinggi. Tahapan dehidrasi sebagai berikut:

- 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
2. Clearing yaitu proses penjernihan menggunakan bahan clearing seperti xylol, toluel, dan benzene. Pada penelitian ini menggunakan xylol. Tahapan clearing sebagai berikut:
    - a) Xylol = 1 jam
    - b) Xylol = 2 jam
    - c) Xylol = 2 jam
  3. Impregnasi yaitu proses infiltrasi bahan embedding dalam jaringan pada suhu 56°-60°C, caranya jaringan dibungkus dengan kertas saring yang sudah diberi label untuk menghindari kekeliruan identitas sampel, kemudian dimasukkan ke dalam bahan embedding yaitu paraffin TD 56°- 60°C. Tahapan impregnasi sebagai berikut:
    - a) Paraffin (56°-68°C) = 2 jam
    - b) Paraffin (56°-68°C) = 2 jam
    - c) Paraffin (56°-68°C) = 2 jam
  4. Pembuatan Blok Jaringan (embedding) Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan embedding, yaitu paraffin, cellulose, dan tissue text. Pada penelitian ini menggunakan paraffin TD 56°-60°C. Tahapan embedding sebagai berikut:
    - a) Mempersiapkan alat cetak blok parafin dan meletakkan alat cetak tersebut di tempat dengan permukaan rata.
    - b) Tuangkan paraffin cair (TD 56°-60°C) ke dalam alat cetak blok, kemudian masukkan jaringan yang telah diimpregnasi dengan surgical yang kita inginkan dan jangan lupa diberi label sampel, tunggu beberapa menit sampai paraffin beku.

#### 5. Tahapan Penyayatan Jaringan

- a) Olesi obyek glass dengan meyer egg albumin dan tempelkan blok paraffin pada blok holder mikrotom dengan bantuan pemanasan.
- b) Penyayatan menggunakan mikrotom, sebelumnya bersihkan pisau mikrotom dengan kasa/kertas saring yang telah dibasahi dengan xylol dengan arah tegak lurus.
- c) Atur ketebalan sayatan mikrotom antara 4-6  $\mu\text{m}$ , atau sesuai kebutuhan.
- d) Ambil sayatan yang telah diperoleh dengan kuas lalu letakkan diatas permukaan air waterbath dengan temperatur tetap 56°-58°C hingga sayatan mekar.
- e) Ambil sayatan yang telah mekar dengan obyek glass yang telah diolesi dengan meyer egg albumin, dan keringkan dengan hotplate dengan suhu sekitar 30-35°C, minimal selama 12 jam. (Syafriadi *et al.*, 2007).



Gambar 3.2 (A) Ilustrasi arah pemotongan gigi insisiv tikus wistar (Trejo-Iriarte *et al.*, 2019) (B) Ilustrasi arah pemotongan gigi secara anatomis (Martelli *et al.*, 2019).

d. Pengecatan Jaringan dengan Imunohistokimia

Prosedur pewarnaan dengan immunohistochemistry yang dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga adalah sebagai berikut:

- a. Sediaan dilakukan deparafinasi 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 3°C.
- 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  $\mu$ 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 monoklonal TNF-  $\alpha$  sebanyak 80  $\mu$ l menggunakan mikropipet kemudian inkubasi dengan suhu 30C selama 24 jam.
- j. Cuci preparat dengan phosphatase 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 phosphatase 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 phosphatase buffer saline (PBS) selama 5 menit.
- o. Aliri preparat dengan aquadest.
- p. Rendam preparat dengan diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) sebanyak 100  $\mu$ l menggunakan mikropipet selama 15 menit kemudian bilas dengan aquadest.
- q. Tetesi preparat dengan mayer's hematoxylin selama 2 menit sebanyak 2 tetes.

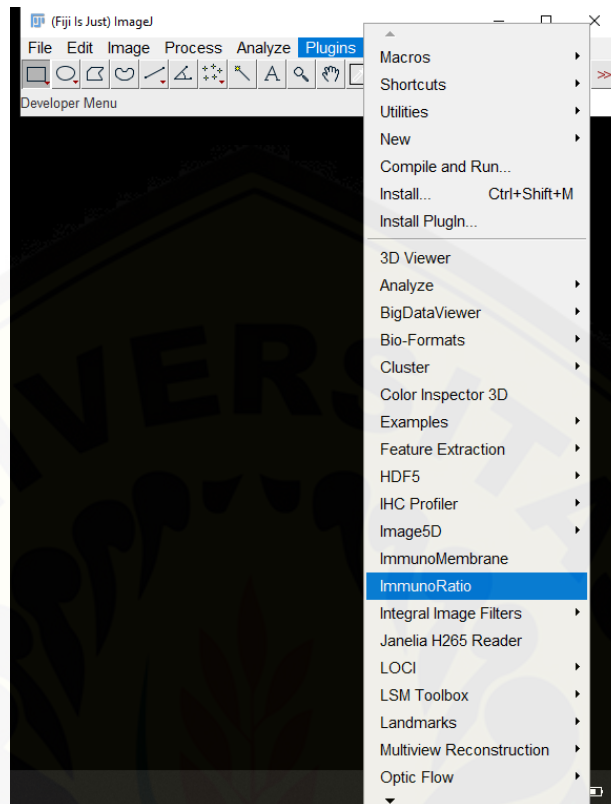
- r. Cuci preparat dengan air mengalir.
- s. Tetesi preparat dengan bluing reagent sebanyak 2 tetes selama 30 detik.
- t. Cuci preparat dengan air mengalir.
- u. Inkubasi pada suhu 600C selama 24 jam
- v. Bersihkan preparat lalu tetesi dengan mounting media kemudian ditutup dengan cover glass (Sutjiati R, 2016).

### 3.9. Prosedur Pengamatan dan Perhitungan Ekspresi IL-10

Pengamatan dan perhitungan jumlah ekspresi IL-10 dilakukan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember. Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4-6  $\mu\text{m}$ , kemudian dideteksi immunohistokimia terhadap ekspresi IL-10 untuk melihat jumlah ekspresi dari 36 protein IL-10 tersebut. Pengamatan sediaan dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x untuk menentukan daerah perhitungan, kemudian untuk melakukan perhitungan jumlah ekspresi IL-10 dilakukan perbesaran 400x.

Perhitungan jumlah ekspresi IL-10 dilakukan menggunakan program Immunoratio (IRS). IRS merupakan *software* yang menganalisis gambar preparat hasil pewarnaan *immunohistochemistry* (IHC) untuk melihat jumlah ekspresi antibodi tertentu dan dapat diunduh secara online. Ekspresi IL-10 dapat terhitung melalui gambaran warna coklat yang terekspresi pada preparat. Hasil dari penghitungan ekspresi IL-10 menggunakan IRS berupa persentase.

Perhitungan jumlah ekspresi IL-10 dilakukan pada aplikasi ImageJ dengan cara memilih menu “Plugins” kemudian pilih “Immunoratio”. Hasil perhitungan akan menunjukkan persentase daerah sel yang positif oleh aplikasi akan ditandai dengan warna orange kecoklatan. Berikut ditunjukkan pada gambar 3.3.

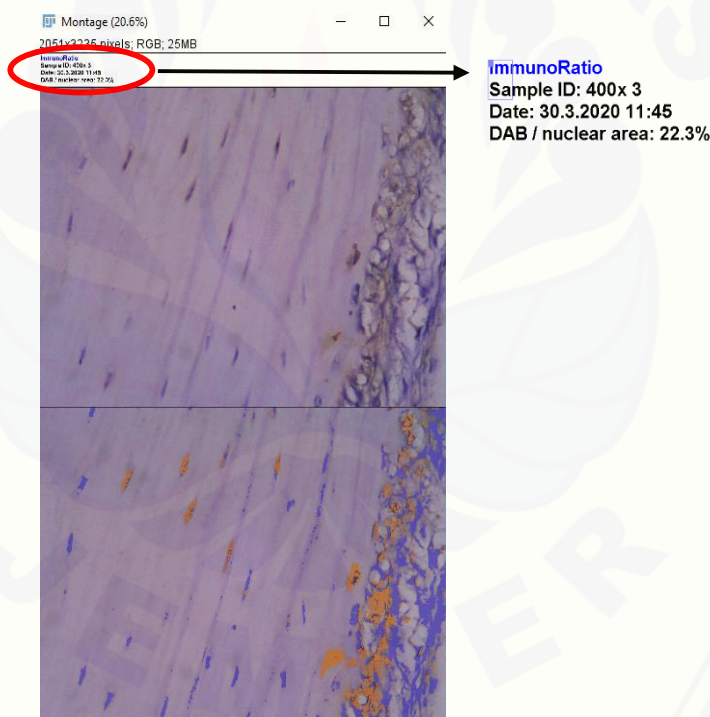


Gambar 3.3 Aplikasi ImageJ dan menu Plugins yang di dalamnya terdapat menu Immunoratio

Tahapan penggunaan aplikasi ImageJ untuk menentukan ekspresi IL-10 adalah sebagai berikut:

1. Buka aplikasi ImageJ, aplikasi dapat diunduh melalui website Imunoratio dengan alamat website sebagai berikut <http://jvsmicroscope.uta.fi/> begitu pula dengan plugin Immunoratio dapat diunggah melalui arahan website tersebut.
2. Buka gambar yang akan dilakukan perhitungan, klik menu “File” seperti yang tertera pada Gambar 3.3 kemudian pilih menu “Open” kemudian pilih gambar sesuai yang ingin dilakukan perhitungan.
3. Pilih menu “Plugins” kemudian cari dan klik menu “Immunoratio”.

- Setelah klik “Immunoratio” akan muncul box dialog pada bagian bawah ujung kiri terdapat kotak “Ask sample identifier” hilangkan tanda centang pada kotak tersebut kemudian klik “OK”
- Tunggu beberapa saat untuk aplikasi mengolah data hingga akhirnya akan muncul hasil perhitungan. Hasil perhitungan akan disajikan dua gambar. Gambar pertama memperlihatkan gambar asli dari foto preparat jaringan dan gambar kedua adalah hasil perhitungan aplikasi disajikan. Daerah positif terekspresinya IL-10 akan berwarna orange kecoklatan. Besar ekspresi tertera pada deskripsi gambar yang dapat dilihat diatas kedua gambar tersebut. Berikut hasil perhitungan menggunakan aplikasi.



Gambar 3.4 Hasil perhitungan ekspresi IL-10 pada aplikasi.

### 3.10. Analisis Data

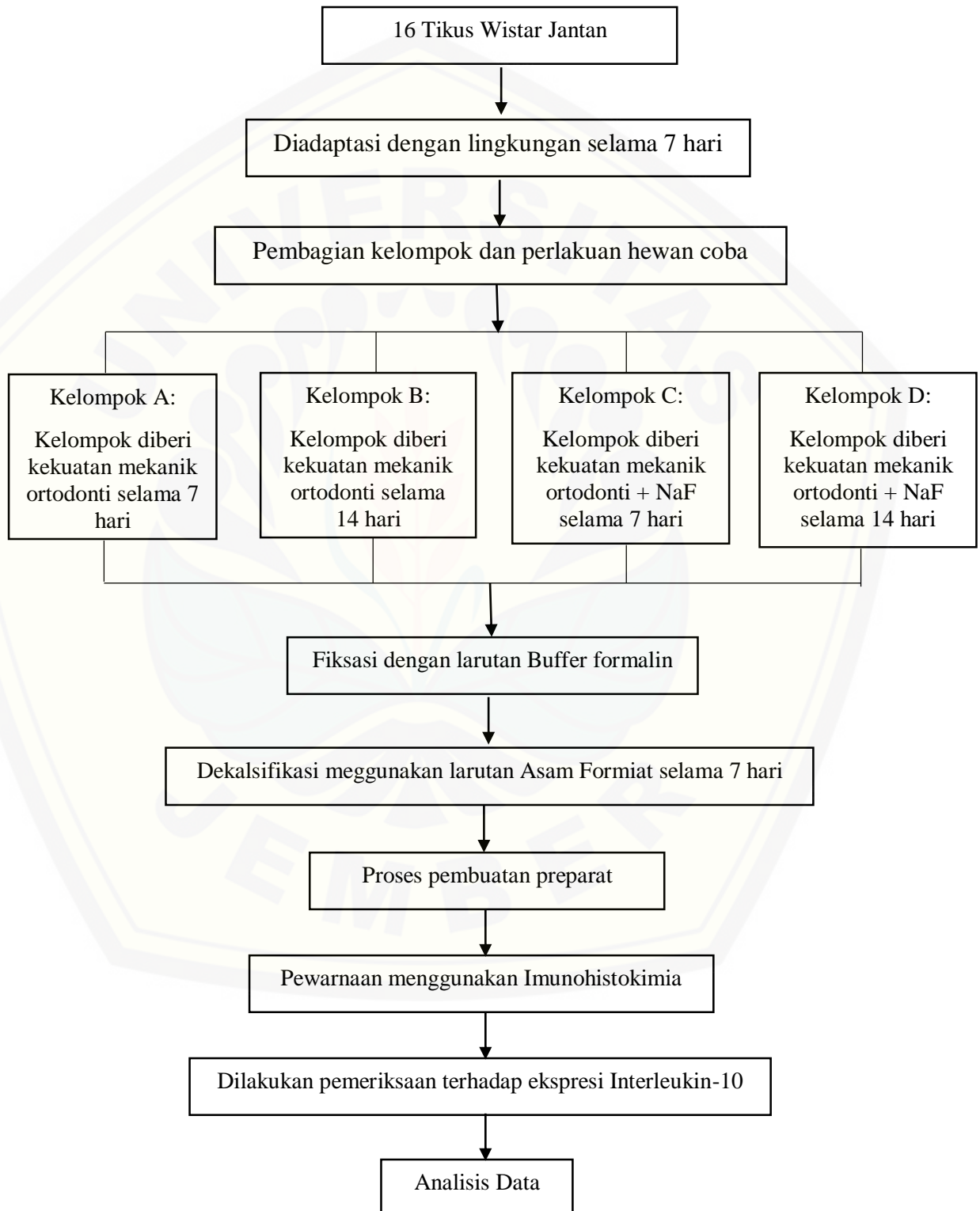
Data hasil penelitian ini akan ditampilkan dalam bentuk tabel yang berisi besarnya rata-rata dan standar deviasinya serta foto-foto. Data hasil penelitian ini akan diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro Wilk* dan diuji homogenitasnya



dengan uji *Levene* untuk mengetahui keseragaman data penelitian. Kemudian dianalisis menggunakan uji parametrik, *One Way Anova* yaitu uji parametrik lebih dari 2 sampel bebas untuk menganalisa rata-rata jumlah ekspresi IL-10. Selanjutnya, dilanjutkan dengan uji beda lanjut (*post hoc test*) yaitu *Least Significance Difference* (LSD) untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan dari antar kelompok perlakuan.



### 3.11. Alur Penelitian



## **BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1. Kesimpulan**

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat diambil kesimpulan bahwa efek pemberian Natrium Fluorida (NaF) pada ekspresi Interleukin 10 (IL-10) yang diberi kekuatan mekanik ortodonti terjadi peningkatan ekspresi IL-10 pada kelompok tikus yang diberi perlakuan NaF meskipun tidak berbeda secara signifikan dibanding dengan kelompok yang tidak diberi NaF.

### **5.2. Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan jarak waktu pengamatan yang lain.
2. Perlu dilakukan penelitian lain menggunakan variabel lain yang berperan pada resorpsi dan pembentukan tulang pada gigi tikus yang diberikan kekuatan mekanik ortodonti.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut cara pengaplikasian Natrium Fluorida (NaF) yang lebih efektif pada perawatan ortodonti.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Aghili, H., Yassaei, S., Zahir, S.T. dan Arjmandi, R., 2017. Effect of Methylphenidate on Orthodontic Tooth Movement and Histological Features of Bone Tissue in Rats: An Experimental Study. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(7), p.ZF01.
- Amarasekara, D.S., Yun, H., Kim, S., Lee, N., Kim, H. and Rho, J., 2018. Regulation of osteoclast differentiation by cytokine networks. *Immune network*, 18(1).
- Amin, M.N. dan Permatasari, N., 2017. Aspek Biologis Pergerakan Gigi secara Ortodonti. *STOMATOGNATIC-Jurnal Kedokteran Gigi*, 13(1), pp.22-27.
- Andriekute, A., Vasiliauskas, A. dan Sidlauskas, A., 2017. A survey of protocols and trends in orthodontic retention. *Progress in orthodontics*, 18(1), p.31.
- Asiry, M.A., 2018. Biological aspects of orthodontic tooth movement: A review of literature. *Saudi journal of biological sciences*, 25(6), pp.1027-1032.
- Bhawal, U.K., Lee, H.J., Arikawa, K., Shimosaka, M., Suzuki, M., Toyama, T., Sato, T., Kawamata, R., Taguchi, C., Hamada, N. dan Nasu, I., 2015. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss. *International journal of oral science*, 7(4), p.242.
- Castaneda, C.A., Castillo, M., Sanchez, J., Casavilca, S., Gonzalez, C., Flores, C., Cano, L., Belmar-Lopez, C., Villa-Robles, R., Rios-Martini, G. dan Wu, Y., 2017. Factors influencing Ki67 calculation in neuroendocrine neoplasia. *International Journal of Endocrine Oncology*, 4(1), pp.23-30.
- Cifter, M., Celikel, A.D.G., Cifter, E.D., Tagrikulu, B., Olgaç, V., Erdem, M.A. dan Cankaya, A.B., 2019. Comparison of the efficiency of alveolar decortication and low level laser therapy on orthodontic tooth movement and alveolar metabolism in rats. *Journal of Dental Sciences*, 14(4), pp.401-407.

- Daniel, W.W. dan Cross, C.L., 2012. *Biostatistics: a foundation for analysis in the health sciences*. Wiley.
- Danz, J.C., Greuter, C., Sifakakis, I., Fayed, M., Pandis, N. dan Katsaros, C., 2012. Stability and relapse after orthodontic treatment of deep bite cases—a long-term follow-up study. *European journal of orthodontics*, 36(5), pp.522-530.
- Dudic, A., 2018. Influencing factors of orthodontic tooth movement and root resorption, and evaluation of its radiographic diagnostic means.
- Dudic, A., Giannopoulou, C. dan Kiliaridis, S., 2013. Factors related to the rate of orthodontically induced tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 143(5), pp.616-621.
- Eroschenko, V.P. dan Di Fiore, M.S., 2013. *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G.R.D.S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J. dan Cerri, P.S., 2015. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015.
- Fulawka, L. dan Halon, A., 2016. Proliferation index evaluation in breast cancer using ImageJ and ImmunoRatio applications. *Anticancer research*, 36(8), pp.3965-3972.
- González-González, R., Molina-Frechero, N., Carreón-Burciaga, R.G., López-Verdín, S., Robles-Bonilla, C., Pereira-Prado, V. dan Bologna-Molina, R., 2016. Comparison between Manual and Automated Methods for Ki-67 Immunoexpression Quantification in Ameloblastomas. *Analytical Cellular Pathology*, 2016.
- Gonzales, C., Hotokezaka, H., Karadeniz, E.I., Miyazaki, T., Kobayashi, E., Darendeliler, M.A. dan Yoshida, N., 2011. Effects of fluoride intake on orthodontic tooth movement and orthodontically induced root resorption. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*, 139(2), pp.196-205.

- Handayani, B. dan Lisdiana, M., 2016. Pengaruh ekstrak propolis dalam meningkatkan fibroblas untuk remodeling di daerah tarikan pada pergerakan gigi Ortodonti. *DENTA*, 10(2), pp.142-148.
- Hartiningsih, Anggraeni, D., Widiyono, I. dan Wuryastut, H. 2015. Respons Tulang Femur Tikus Ovariohisterektomi yang Mengonsumsi Kasein dan Disuplementasi Calcitriol Selama 30 Minggu. *Jurnal Veteriner*. 16 (1): 68-77.
- Herniyati, H., Analisis VEGF pada Pergerakan Gigi Ortodonti Setelah Pemberian Seduhan Kopi Robusta (*Coffeacanephora*). *Jurnal Teknosains*, 5(2), pp.90-96.
- Iskandar, P. dan Ismaniati, N.A., 2010. Peran prostaglandin pada pergerakan gigi ortodonti. *Dentofacial*, 9(2), pp.91-100.
- Jayaprakash, P.K., Basavanna, J.M., Grewal, H., Modi, P., Sapawat, P. and Bohara, P.D., 2019. Elevated levels of Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , epidermal growth factor, and  $\beta$ 2-microglobulin levels in gingival crevicular fluid during human Orthodontic tooth movement (OTM). *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 8(5), p.1602.
- Jiang, N., Guo, F., Sun, B., Zhang, X. dan Xu, H., 2020. Different effects of fluoride exposure on the three major bone cell types. *Biological Trace Element Research*, 193(1), pp.226-233.
- Krishnan, V. dan Davidovitch, Z. eds., 2015. *Biological mechanisms of tooth movement*. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell.
- Kuang, P., Guo, H., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X. dan Zhao, L., 2019. Sodium fluoride impairs splenic innate immunity via inactivation of TLR2/MyD88 signaling pathway in mice. *Chemosphere*, 237, p.124437.
- Kuang, P., Deng, H., Cui, H., Chen, L., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Wang, X. dan Zhao, L., 2017. Sodium fluoride (NaF) causes toxic effects on splenic development in mice. *Oncotarget*, 8(3), p.4703.

- Li, Y., Jacox, L.A., Little, S.H. and Ko, C.C., 2018. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 34(4), pp.207-214.
- Lee, M., Arikawa, K. dan Nagahama, F., 2017. Micromolar levels of sodium fluoride promote osteoblast differentiation through Runx2 signaling. *Biological trace element research*, 178(2), pp.283-291.
- Lubis, H.M.L., 2018. Kajian Molekuler P53 Pemanfaatan Tanaman Herbal Buah Legundi (*Vitex Trifolia L*) Terhadap Massa Tumor Jaringan Kulit. *Buletin Farmatera*, 3(1).
- Luo, K., Ma, S., Guo, J., Huang, Y., Yan, F. dan Xiao, Y., 2014. Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. *BioMed research international*, 2014.
- Manela, C., 2014. Pengaruh Penambahan Natrium Florida Terhadap Kadar 6 Monoacetylmorphine dan Morfin Pada Sampel Darah= Effect of Adding Sodium Fluoride to the concentration of 6 Monoacetylmorphine and Morphine In Blood Samples.
- Martelli, S.J.R., Damian, M.F., Schinestsck, A.R., Schuch, L.F., Cascaes, A.M. dan Vasconcelos, A.C.U., 2019. Imaging and histomorphometric evaluation of mandible and tibia of rats treated with bisphosphonates. *Oral and maxillofacial surgery*, 23(4), pp.473-479.
- Mitchel L. 2007 An introduction to orthodontics. 3th ed. New York: Oxford University Press. p. 1-27, 52-5.
- Muntiha, M. 2001. Teknik Pembuatan Histopatologi dari Jaringan Hewan dengan Pewarnaan Hematoksilin dan Eosin (HE). Temu Teknis Fungsional Non Peneliti. Bogor: Balai Penelitian Veteriner.
- Nikolic, N., Jakovljevic, A., Carkic, J., Beljic-Ivanovic, K., Miletic, M., Soldatovic, I., Andric, M., Ivanovic, V. dan Milasin, J., 2019. Notch signaling pathway in apical periodontitis: correlation with bone resorption regulators and proinflammatory cytokines. *Journal of endodontics*, 45(2), pp.123-128.

- Notoatmodjo, S. 2010. Metodologi Penelitian Kesehatan. (Edisi Revisi). Jakarta: PT. Rineka Pustaka.
- O Mullane, D.M., Baez, R.J., Jones, S., Lennon, M.A., Petersen, P.E., Rugg-Gunn, A.J., Whelton, H. dan Whitford, G.M., 2016. Fluoride and oral health. *Community dental health*, 33(2), pp.69-99.
- Perwitasari, D.S., 2008, Juni. Hidrolisis tulang sapi menggunakan HCl untuk pembuatan gelatin. In *Surabaya (ID): Seminar Nasional Soemardjo Brotohardjono*.
- Priyana, A., 2016. Peran pertanda tulang dalam serum pada tatalaksana osteoporosis. *Universa Medicina*, 26(3), pp.152-159.
- Proffit, W.R., Fields, H.W., Larson, B. dan Sarver, D.M., 2018. *Contemporary orthodontics-e-book*. Elsevier Health Sciences.
- Rahardjo, P., 2009. Ortodonti Dasar. *Surabaya: Airlangga*.
- Rahayu, Y. and Auerkari, E., 2008. TEKNIK IMUNOHISTOKIMIA SEBAGAI PENDETEKSI ANTIGEN SPESIFIK PENYAKIT INFEKSI. *Journal of Dentistry Indonesia*, 11(2), pp.76-82.
- Renkema, A.M., Hélène Sips, E.T., Bronkhorst, E. dan Kuijpers-Jagtman, A.M., 2009. A survey on orthodontic retention procedures in The Netherlands. *The European Journal of Orthodontics*, 31(4), pp.432-437.
- Riyanti, E., 2018. Prevalensi maloklusi dan gigi berjejal berdasarkan jenis kelamin dan umur pada anak-anak Sekolah Dasar di Bandung. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*, 2(12), pp.992-995.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K. dan Geginat, J., 2010. Biology of interleukin-10. *Cytokine & growth factor reviews*, 21(5), pp.331-344.



- Sato, M., Yachiguchi, K., Motohashi, K., Yaguchi, Y., Tabuchi, Y., Kitani, Y., Ikari, T., Ogiso, S., Sekiguchi, T., Hai, T.N. dan Hoang, N.V., 2017. Sodium fluoride influences calcium metabolism resulting from the suppression of osteoclasts in the scales of nibbler fish *Girella punctata*. *Fisheries science*, 83(4), pp.543-550.
- Sella, R.C., M.R. de Mendonca, Cuoghi, O.A., An, Li.T. 2012. Histomorphologic evaluation of periodontal compression and tension sides during orthodontic tooth movement in rats. *Dental Press J Orthod*. 17 (3): 108-117.
- Sutjiati, R. 2016. Mekanisme Hambatan Relaps Pergerakan Gigi Ortodonti Pemberian Natrium Fluorida (Studi Eksperimental Pada Tikus Wistar). Disertasi. Surabaya: Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Sutjiati, R., Rubianto, I.B., Sudiana, I.K. dan Rahayu, R.P., 2017. The Inhibition of Relapse of Orthodontic Tooth Movement by NaF Administration in Expressions of TGF- $\beta$ 1, Runx2, Alkaline Phosphatase and Microscopic Appearance of Woven Bone. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering*, 11(10), pp.551-558.
- Syafriadi, S., Setyorini, dan Joelijanto. 2008. Patologi Anatomi: Degenerasi dan Radang. Tidak Dipublikasikan. Petunjuk Praktikum. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- Trejo-Iriarte, C.G., Serrano-Bello, J., Gutiérrez-Escalona, R., Mercado-Marques, C., García-Honduvilla, N., Buján-Varela, J. dan Medina, L.A., 2019. Evaluation of bone regeneration in a critical size cortical bone defect in rat mandible using microCT and histological analysis. *Archives of Oral Biology*, 101, pp.165-171.
- Tripuwabhut, P., Mustafa, M., Gjerde, C.G., Brudvik, P. dan Mustafa, K., 2013. Effect of compressive force on human osteoblast-like cells and bone remodelling: an in vitro study. *Archives of oral biology*, 58(7), pp.826-836.

- Vujacic, A., Pavlovic, J. and Konic-Ristic, A., 2018. The Role of Cytokines in Orthodontic Tooth Movement. In *Current Approaches in Orthodontics*. IntechOpen.
- Yao, Y., Ma, Y., Zhong, N. and Pei, J., 2019. The inverted U-curve association of fluoride and osteoclast formation in mice. *Biological trace element research*, 191(2), pp.419-425.
- Yeo, M.K., Kim, H.E., Kim, S.H., Chae, B.J., Song, B.J. dan Lee, A., 2017. Clinical usefulness of the free web-based image analysis application ImmunoRatio for assessment of Ki-67 labelling index in breast cancer. *Journal of clinical pathology*, 70(8), pp.715-719.
- Yi, L., Li, Z., Jiang, H., Cao, Z., Liu, J. dan Zhang, X., 2018. Gene Modification of Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and Interleukin 10 (IL-10) in Suppressing Mt Sonicate Induced Osteoclast Formation and Bone Absorption. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, p.5200.
- Yoshimatsu, M., Shibata, Y., Kitaura, H., Chang, X., Moriishi, T., Fumio, H., Yoshida, N. dan Yamaguchi, A. 2006. Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *J Bone Miner Metab*. 24: 20-27.
- Younis, L.T., Masood, M., Bahnasi, F.I.E., Abd Rahman, A.N.A. dan Hassan, M.I.A., 2019. The Role of Components and Molecules of Periodontal Ligament in Orthodontic Tooth Movement. *Asian Journal of Dental Sciences*, pp.1-12.
- Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S. dan Yang, W., 2014. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed research international*, 2014.
- Zorlu, F.Y., Darici, H. dan Turkkahraman, H., 2019. Histomorphometric and Histopathologic Evaluation of the Effects of Systemic Fluoride Intake on

Orthodontic Tooth Movement. *European Journal of Dentistry*, 13(03), pp.361-369.



LAMPIRAN

LAMPIRAN 1. Sertifikat *Ethical Clearance*

 KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK)  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER  
(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH  
FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)

**ETHIC COMMITTEE APPROVAL**  
No.588/UN25.8/KEPK/DL/2019

Title of research protocol : "Interleukin 10 (IL-10) Expression after Application of Sodium Flouride (NaF) IN Orthodontic Tooth Movement"

Document Approved : Research Protocol

Principal investigator : Annisa Syifa Maharani

Member of research : 1. Atha Ramadhona Yuniar  
2. Shobrina Wahyuni  
3. Hasna'Fakhriyah Jinan

Responsible Physician : Annisa Syifa Maharani

Date of approval : September- November 2019

Place of research : 1. Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi UNEJ  
2. Laboratorium Farmakologi Ruang Hewan FKG UNEJ  
3. Laboratorium Histologi FKG UNEJ  
4. Laboratorium CDAST UNEJ

The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.

Jember, October 12<sup>th</sup> 2019

Dean of Faculty of Dentistry  
Universitas Jember  
  
(dr. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros.)

Chair person of Research Ethics Committee  
Faculty of Dentistry Universitas Jember  
  
Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.

## LAMPIRAN 2. Surat Ijin Penelitian

## 2.1. Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember



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](http://kg.unej.ac.id)

Nomor : 7565 /UN25.8.TL/2019  
Perihal : Ijin Penelitian

18 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 di bawah ini:

- |    |                        |  |
|----|------------------------|--|
| 1  | Nama                   | : Annisa Syifa Maharani  |
| 2  | NIM                    | : 161610101121   |
| 3  | Semester/Tahun         | : VII/2019-2020  |
| 4  | Fakultas               | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 5  | Alamat                 | : Jl. Mastrip 1 No. 61   |
| 6  | Judul Penelitian       | : Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) Setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) Pada Kekuatan Mekanik Ortodontik  |
| 7  | Lokasi Penelitian      | : Laboratorium Histologi<br>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 IL-10 sel osteoblas tulang alveolar tikus wistar pada saat perawatan ortodonti. |
| 11 | Dosen Pembimbing       | : 1. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes<br>2. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed   |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



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

## 2.2. Laboratorium Biologi Molekul dan Bioteknologi CDAST Universitas Jember



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 Faksimili. (0331) 331991  
Laman: [fg.unej.ac.id](http://fg.unej.ac.id)

Nomor : 7565 /UN25.8.TL/2019  
Perihal : Ijin Penelitian

18 DEC 2019

Kepada Yth  
Ketua 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 preparat bagi mahasiswa kami dibawah ini:

- |    |                        |  |
|----|------------------------|--|
| 1  | Nama                   | : Annisa Syifa Maharani  |
| 2  | NIM                    | : 161610101071   |
| 3  | Semester/Tahun         | : VII/2019-2020  |
| 4  | Fakultas               | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 5  | Alamat                 | : Jl. Mastrip 1 No. 61   |
| 6  | Judul Penelitian       | : Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) Setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) Pada Kekuatan Mekanik Ortodontik  |
| 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 IL-10 sel osteoblas tulang alveolar tikus wistar pada saat perawatan ortodonti. |
| 11 | Dosen Pembimbing       | : 1. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes<br>2. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed   |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



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

## 2.3. Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember



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: [fg.unej.ac.id](http://fg.unej.ac.id)

Nomor : 9565 /UN25.8.TL/2019  
Perihal : Ijin Penelitian

18 DEC 2019

Kepada Yth  
Ketua 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 di bawah ini:

- |    |                        |  |
|----|------------------------|--|
| 1  | Nama                   | : Annisa Syifa Maharani  |
| 2  | NIM                    | : 161610101121   |
| 3  | Semester/Tahun         | : VII/2019-2020  |
| 4  | Fakultas               | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember  |
| 5  | Alamat                 | : Jl. Mastrip 1 No. 61   |
| 6  | Judul Penelitian       | : Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) Setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) Pada Kekuatan Mekanik Ortodontik  |
| 7  | Lokasi Penelitian      | : Laboratorium Farmasetika<br>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 IL-10 osteoblas tulang alveolar tikus wistar pada saat perawatan ortodontik |
| 11 | Dosen Pembimbing       | : 1. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes<br>2. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed   |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih



## 2.4. Laboratorium Hewan Coba Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember



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](http://kg.unej.ac.id)

Nomor : 7565 /UN25.8.TL/2019  
Perihal : Ijin Penelitian

18 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 di bawah ini:

- 1 Nama : Annisa Syifa Maharani
- 2 NIM : 161610101121
- 3 Semester/Tahun : VII/2019-2020
- 4 Fakultas : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember
- 5 Alamat : Jl. Mastrip 1 No. 61
- 6 Judul Penelitian : Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) Setelah Pemberian Natrium Fluorida (NaF) Pada Kekuatan Mekanik Ortodontik
- 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 IL-10 sel osteoblas tulang alveolar tikus wistar pada saat perawatan ortodonti.
- 11 Dosen Pembimbing : 1. Dr. drg. Rina Sutjiati, M.Kes  
2. drg. Rudy Joelijanto, M. Biomed

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan  
Wakil Dekan I,



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



**LAMPIRAN 3. Rerata Hasil Ekspresi Interleukin 10 (IL-10) pada Kelompok Kontrol Negatif dan Perlakuan (%)**

Kelompok Kontrol Negatif Hari ke-7	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	Lapang Pandang 4	Rerata
1	12.6	17.8	22.3	26.3	19.75
2	8.6	7.8	5.7	16.2	9.575
3	19.8	1,1	1	17.4	9.825
4	6.6	7.6	7.5	8.8	7.625
<b>Rerata Jumlah Ekspresi IL-10</b>					<b>11.69</b>
Kelompok Kontrol Negatif Hari ke-14	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	Lapang Pandang 4	Rerata
1	21.7	17.7	15.2	11	16.4
2	18.2	13.4	10	9.1	12.675
3	19.4	18	23.7	20.7	20.45
4	9.1	8.2	8.5	8.5	8.575
<b>Rerata Jumlah Ekspresi IL-10</b>					<b>14.525</b>
Kelompok Perlakuan Hari ke-7	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	Lapang Pandang 4	Rerata
1	12.9	16.2	25.6	23.0	19.425
2	17.5	13.3	10.2	7.4	12.1
3	12.8	9.1	10.3	12.7	11.225

4	16.2	14.8	19.4	25.9	19.075
<b>Rerata Jumlah Ekspresi IL-10</b>					<b>15.46</b>
Kelompok Perlakuan Hari ke-14	Lapang Pandang 1	Lapang Pandang 2	Lapang Pandang 3	Lapang Pandang 4	Rerata
1	6.2	4.7	8.0	8.6	6.875
2	11.2	10.8	11.4	20.7	13.525
3	26.4	23.2	26.4	36.7	28.175
4	39.4	66.7	60.8	50.1	54.25
<b>Rerata Jumlah Ekspresi IL-10</b>					<b>25.70</b>

#### LAMPIRAN 4. Uji Analisis Data

##### 3.1. Uji Normalitas *Shapiro Wilk*

###### Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KELOMPOK A	.384	4	.	.784	4	.077
KELOMPOK B	.144	4	.	.996	4	.984
KELOMPOK C	.295	4	.	.796	4	.095
KELOMPOK D	.219	4	.	.925	4	.566

a. Lilliefors Significance Correction

##### 3.2. Uji Homogenitas *Levene*

Hari ke-7

###### Test of Homogeneity of Variances

EKSPRESI IL-10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.026	1	6	.876

Hari ke-14

**Test of Homogeneity of Variances**

EKSPRESI IL-10

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.269	1	6	.084

**3.3. Uji Parametri *One Way Anova***

Hari ke-7

**ANOVA**

EKSPRESI IL-10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28.313	1	28.313	1.152	.324
Within Groups	147.453	6	24.576		
Total	175.766	7			

Hari ke-14

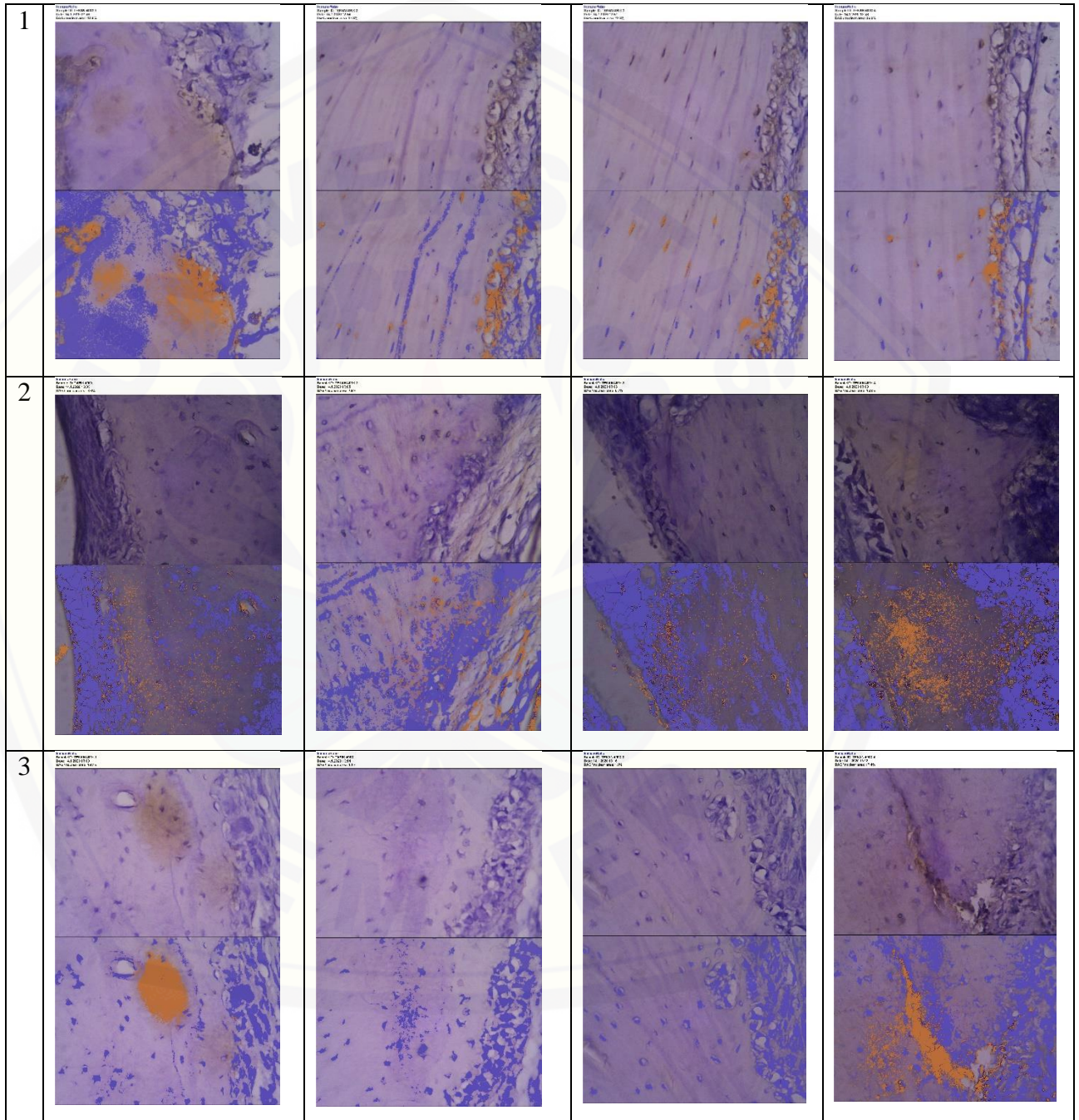
**ANOVA**

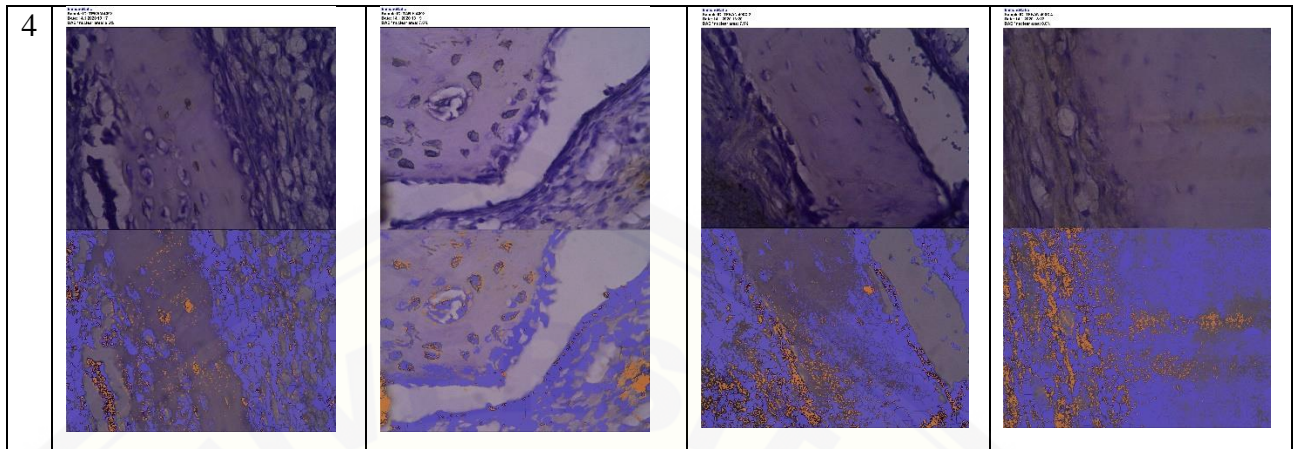
EKSPRESI IL-10

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	250.041	1	250.041	1.071	.341
Within Groups	1401.285	6	233.548		
Total	1651.326	7			

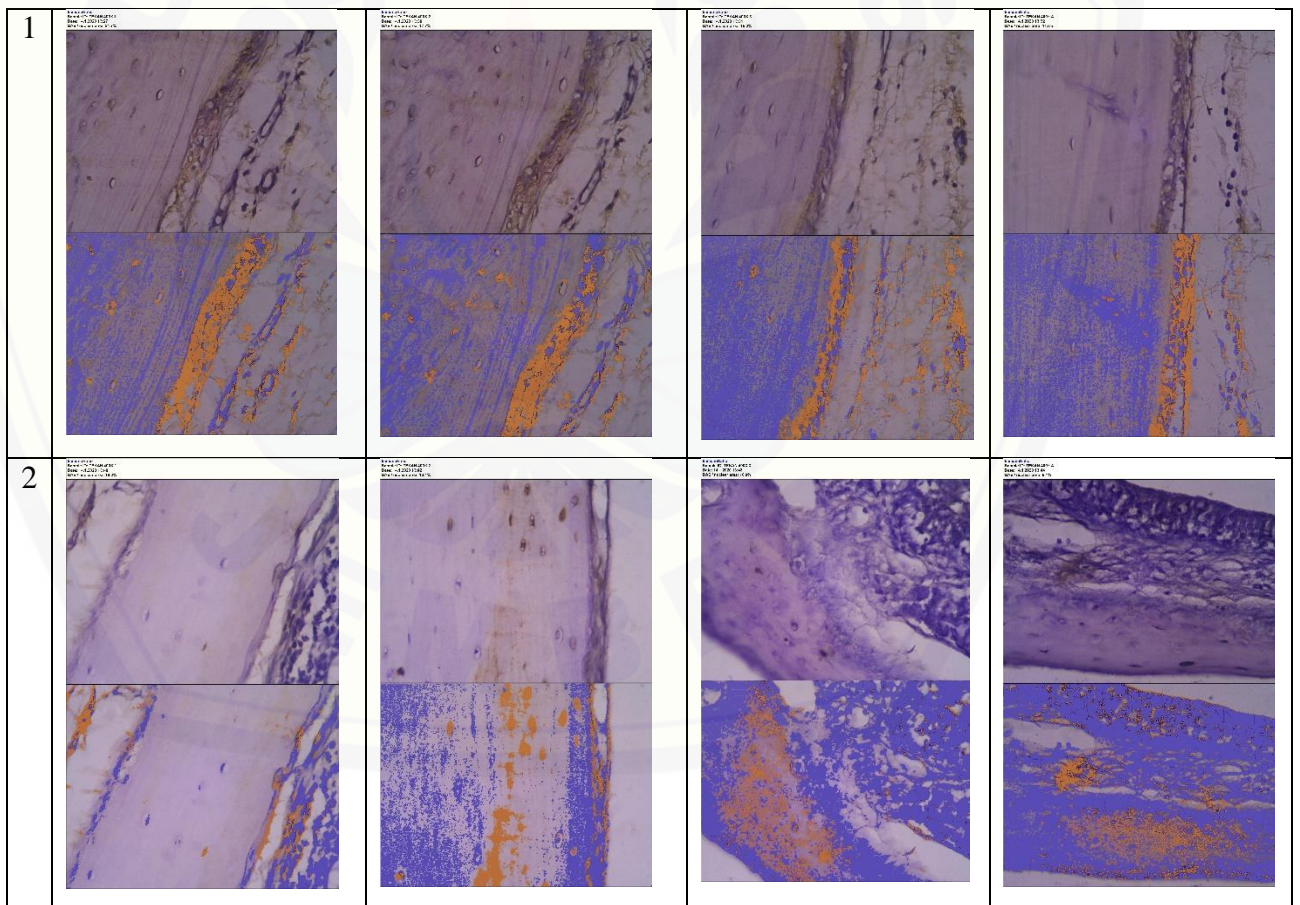
**LAMPIRAN 5. Gambar Hasil *Immunoratio Score (IRS)***

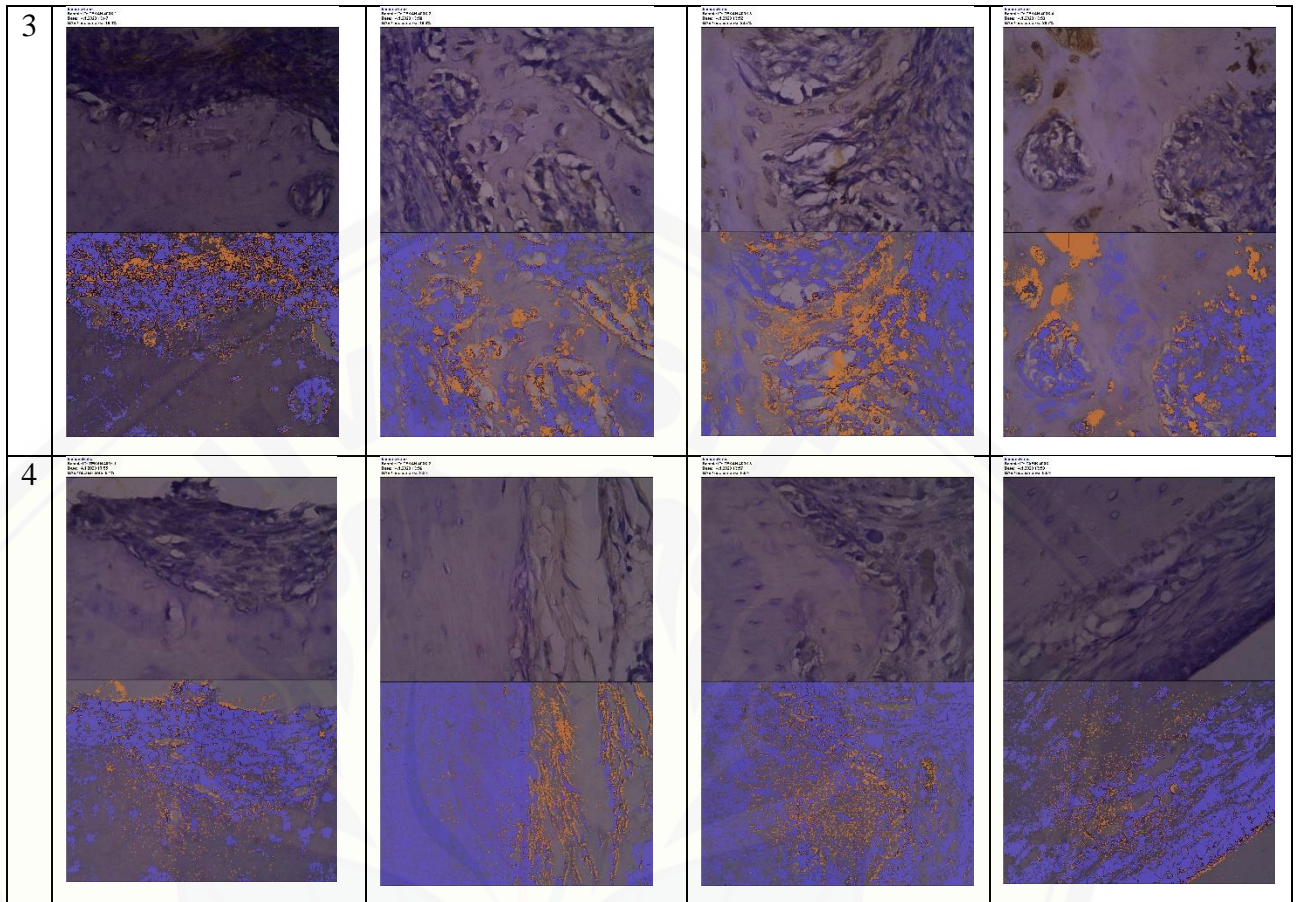
**4.1. Gambar Hasil IRS Kontrol Negatif Hari ke-7**



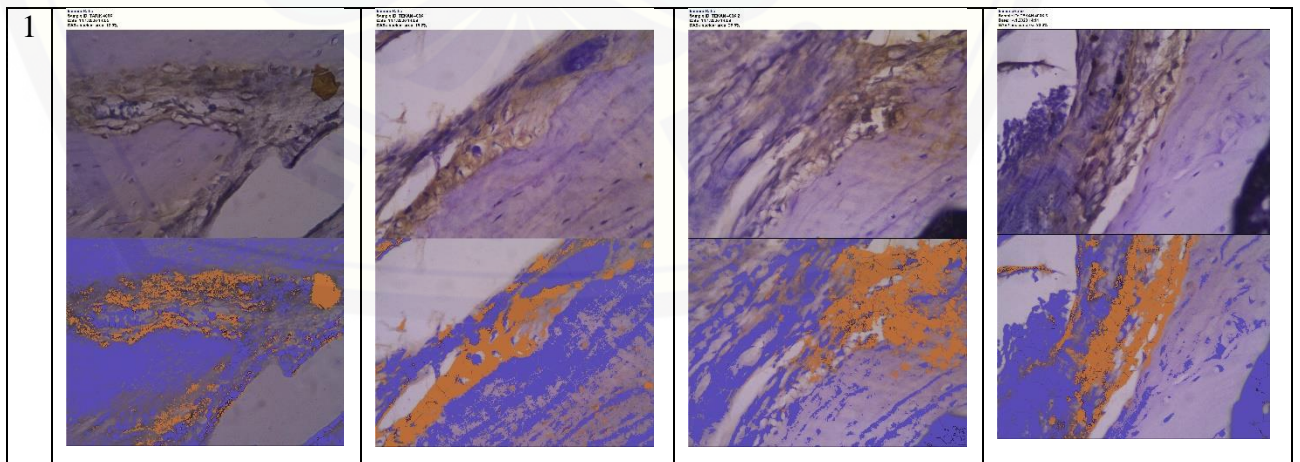


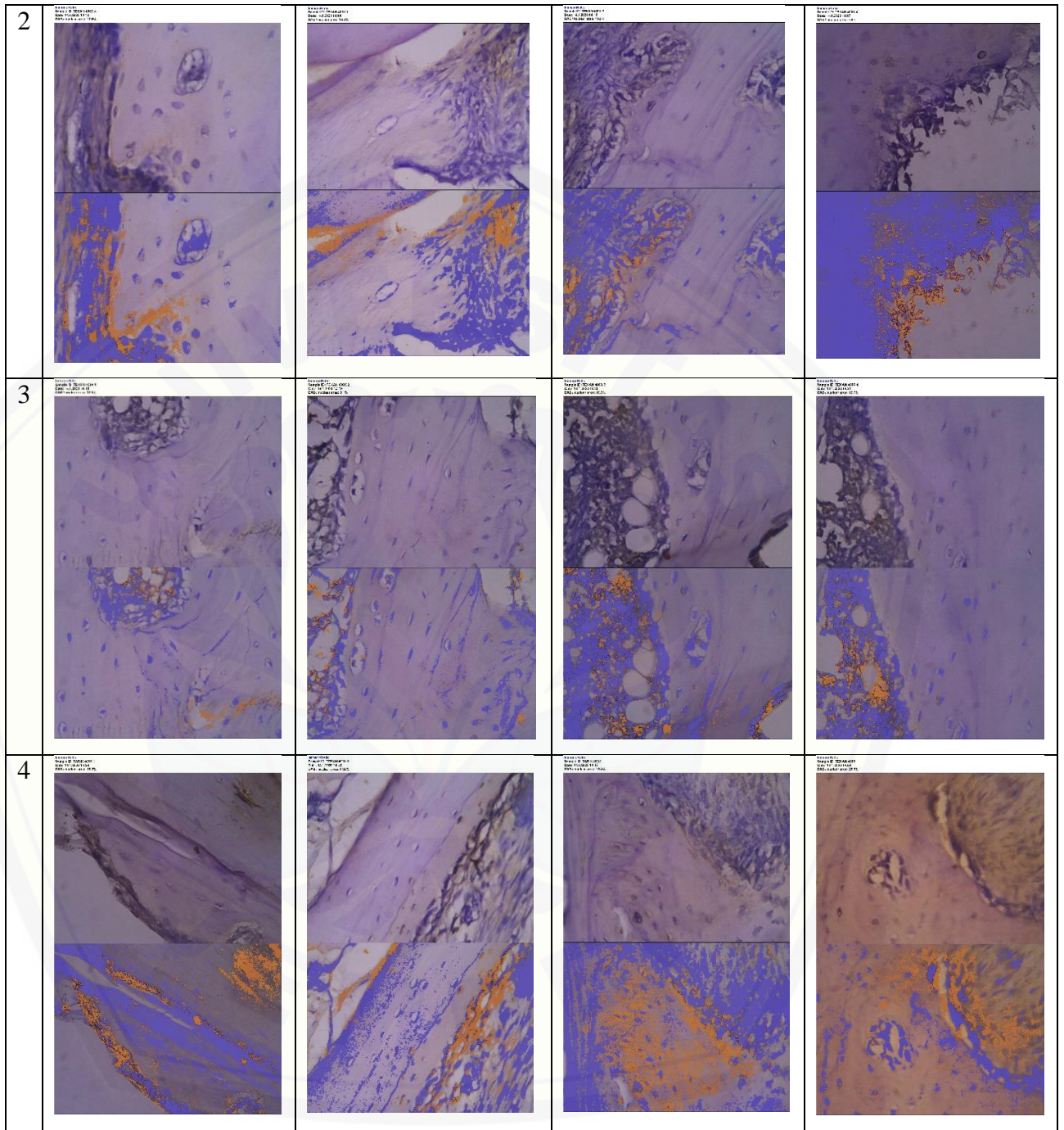
**4.2. Gambar Hasil IRS Kontrol Negatif Hari ke-14**



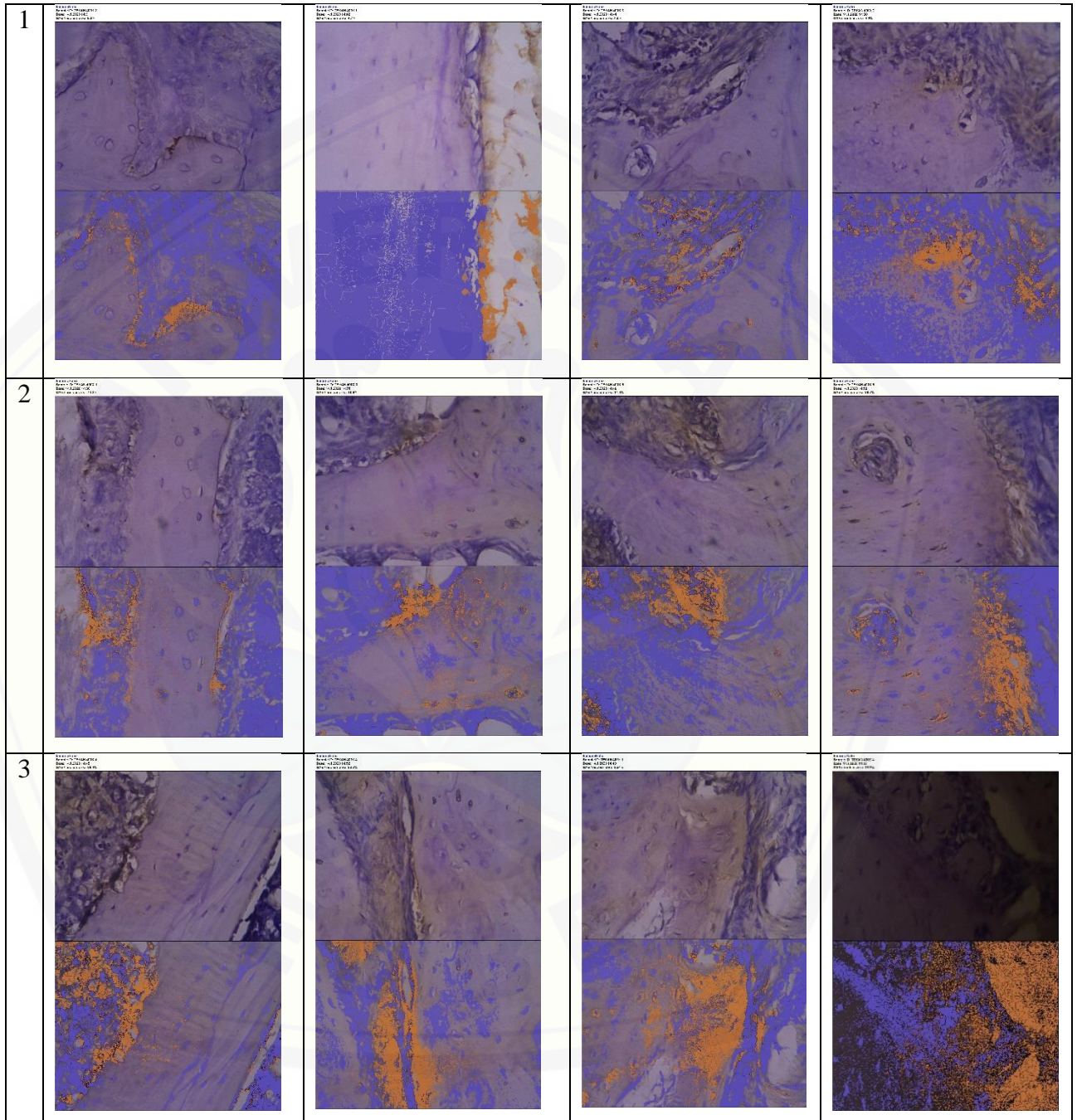


### 4.3. Gambar Hasil IRS Perlakuan Hari ke-7

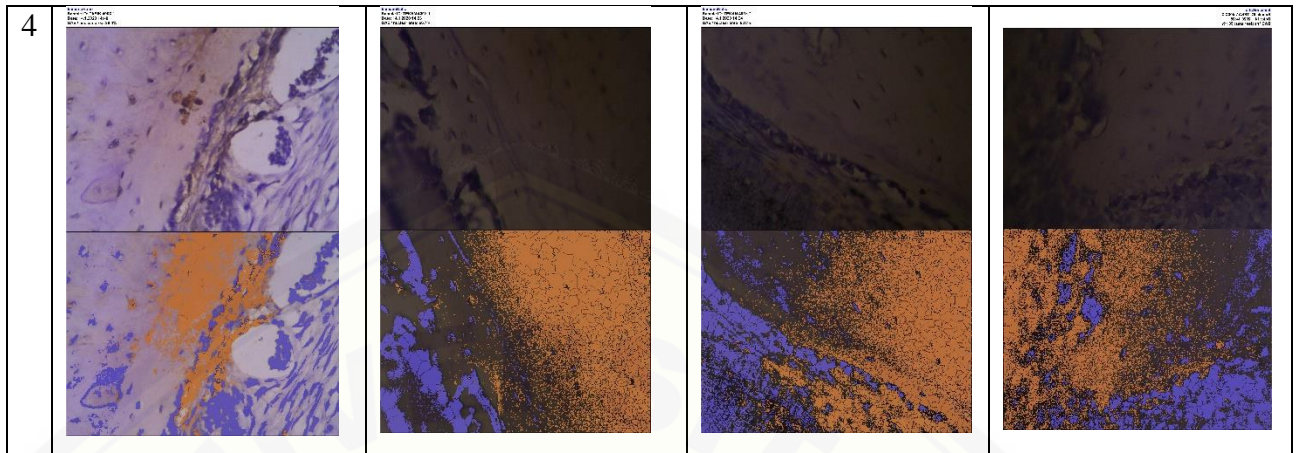




**4.4. Gambar Hasil IRS Perlakuan Hari ke-14**

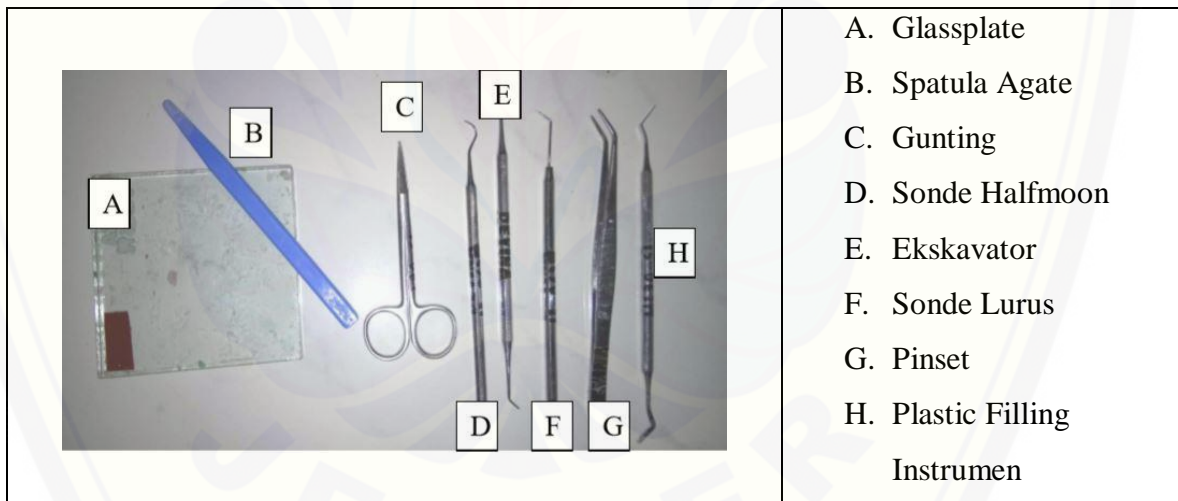






## LAMPIRAN 6. Gambar Alat dan Bahan Penelitian

### 5.1. Gambar Alat Penelitian





Syringe Modifikasi



Timbangan Berat Badan Hewan Coba



Beaker Glass



Gelas Ukur



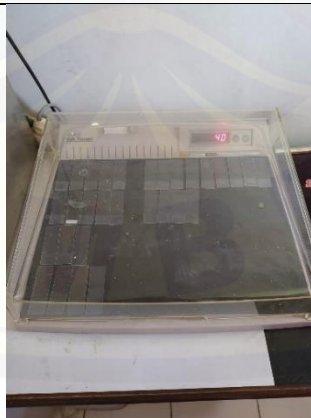
Homogenizing Mixer



Tissue Cassete



Water Bath



Slide Warmer



Inkubator



Mikrotom



Mikroskop Cahaya  
dan Kamera Optilab



Mortal dan Alu



Pipet



Disposible Syringe 1 ml



Kandang, Tempat  
Minum, dan Tempat  
Makan



Pot Jaringan	Tension Gauge	Mikromotor Contra Angle Low Speed
--------------	---------------	-----------------------------------



Micropipette



Laptop

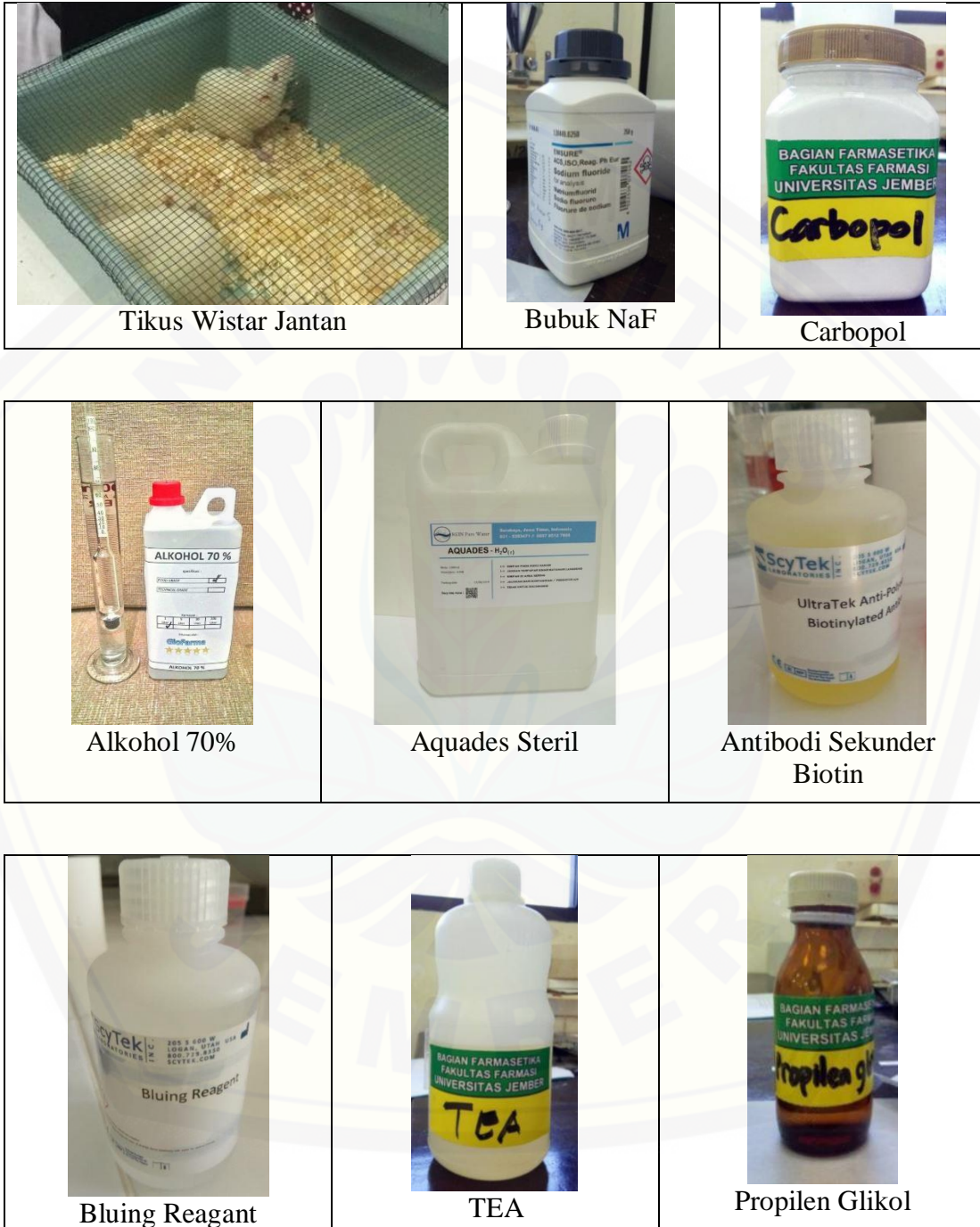


Staining Jar



Timbangan Analitik

5.2. Gambar Bahan Penelitian





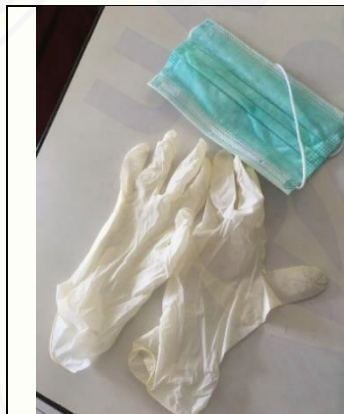
Ketamin



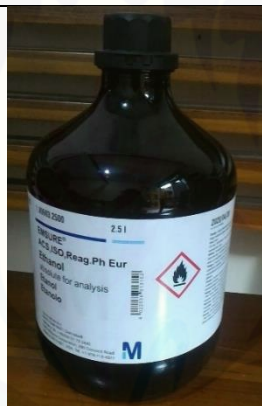
Xylazine



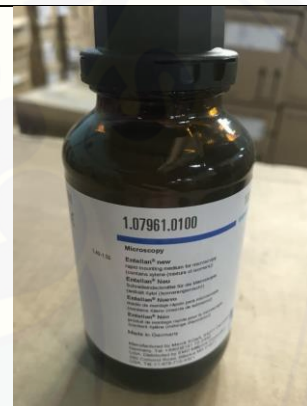
Glass Ionomer No. IX



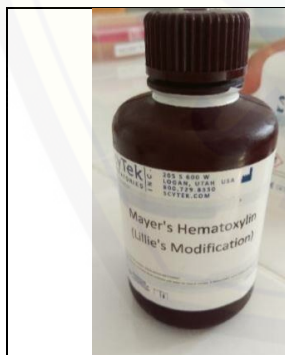
Handsooon dan Masker



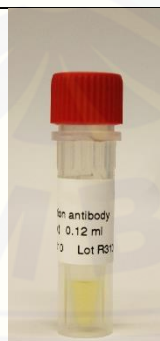
Ethanol Absolut



Entelan



Mayer's Hematoksilin



Antibodi Primer IL-10



Stainless Steel Ligature Wire



Ni-Ti Closed Coil Spring



Xylol



Preparat Jaringan



Kotak Object Glass