



**EKSPRESI *TOLL-LIKE RECEPTOR 2* SETELAH PEMBERIAN
PASTA TULANG IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)**

SKRIPSI

Oleh

Shintia Dwi Pramesty

NIM 161610101048

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**EKSPRESI *TOLL-LIKE RECEPTOR 2* SETELAH PEMBERIAN
PASTA TULANG IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)**

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

Shintia Dwi Pramesty

NIM 161610101048

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

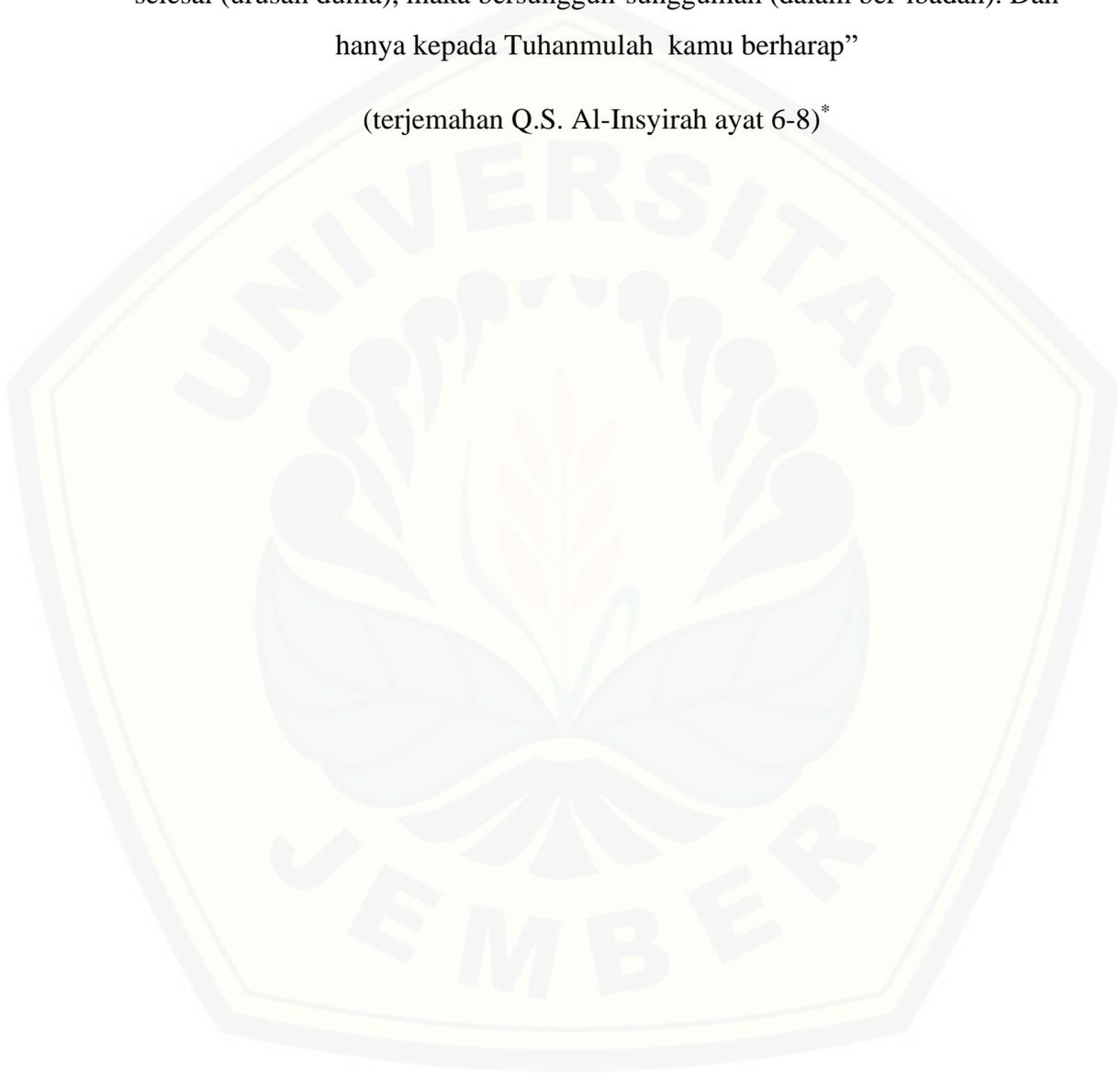
Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat dan perlindungan-Nya
2. Papa Herlan, Mama Nia, Tete Siska, Aa Rio, Wawa, dan semua keluarga besar yang saya sayangi
3. Guru-guru sejak TK, SD, SMP, SMA yang telah mendidik dan memberikan ilmu yang sangat bermanfaat
4. Segenap almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (urusan dunia), maka bersungguh-sungguhlah (dalam ber-ibadah). Dan hanya kepada Tuhanmulah kamu berharap”

(terjemahan Q.S. Al-Insyirah ayat 6-8)*



*) Murodh Nurikhsan. 2004. *Juz 'Amma dan Terjemahannya*. Jakarta: Wahyu Media.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Shintia Dwi Pramesty

NIM : 161610101048

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa Skripsi yang berjudul “Ekspresi *Toll-Like Receptor 2* setelah Pemberian Pasta Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)” adalah benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 5 Maret 2020

Yang menyatakan,

Shintia Dwi Pramesty

161610101048

SKRIPSI

**EKSPRESI *TOLL-LIKE RECEPTOR 2* SETELAH PEMBERIAN
PASTA TULANG IKAN GURAMI (*Osphronemus gouramy*)**

Oleh

Shintia Dwi Pramesty

NIM 161610101048

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si

Dosen Pembimbing Pendamping : Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Ekspresi *Toll-Like Receptor 2* setelah Pemberian Pasta Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)” telah di uji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi pada :

Hari, tanggal : Kamis, 5 Maret 2020

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dosen Penguji Anggota

drg. Erawati Wulandari, M.Kes
NIP. 196708191993032001

Dr. drg. Tecky Indriana, M.Kes.
NIP. 196811261997022001

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. drg. I D A Ratna Dewanti, M.Si
NIP. 196705021997022001

Dr. drg. I D A Susilawati, M.Kes.
NIP. 196109031986022001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

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

RINGKASAN

Ekspresi *Toll-Like Receptor 2* setelah Pemberian Pasta Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*); Shintia Dwi Pramesty; 161610101048; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Trauma mekanik yang menyisakan selapis tipis dentin dapat mempermudah mikroorganisme patogen invasi ke dalam jaringan pulpa gigi. Kondisi tersebut akan menimbulkan respon inflamasi yang diinisiasi oleh pengenalan *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) oleh TLR2 dari berbagai sel. Dilakukan perawatan dengan pemberian suatu bahan yang dapat berperan sebagai anti-inflamasi dan bersifat antibakteri, sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan jaringan pulpa gigi. Bahan yang diduga memiliki peran tersebut adalah tulang ikan gurami. Tulang ikan gurami memiliki berbagai kandungan yaitu asam amino, omega-3, omega-6, dan flavonoid. Kandungan tersebut diduga dapat berfungsi sebagai anti-inflamasi dan antibakteri, sehingga dapat menghambat ekspresi TLR2. Mekanisme tersebut dapat memodulasi perbaikan jaringan dan mempercepat proses penyembuhan.

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Sampel yang digunakan adalah 12 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 3 kelompok secara acak, masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Kelompok pertama (K1), gigi molar kiri rahang bawah kiri pada tikus tanpa dibur sebagai kelompok kontrol. Kelompok kedua (P1), gigi molar rahang bawah kiri dibur untuk dibuat kavitas klas I pada oklusal giginya dan ditumpat sementara (*Orafil*). Kelompok ketiga (P2), gigi molar rahang bawah kiri dibur untuk dibuat kavitas klas I pada oklusal giginya, diberi pasta tulang ikan gurami konsentrasi 75% dan ditumpat sementara (*Orafil*). Empat ekor tikus dari tiap kelompok didekapitasi pada hari ke-4 untuk mendapatkan sampel jaringan, kemudian dilakukan pengamatan ekspresi TLR2 dari sel inflamasi menggunakan pewarnaan imunohistokimia dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Data hasil

penelitian di uji normalitas dan homogenitasnya dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene*. Selanjutnya, data dianalisis dengan menggunakan uji parametrik *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *LSD (Least Significance Difference)*.

Berdasarkan hasil pengamatan didapatkan bahwa rerata jumlah ekspresi TLR2 pada kelompok kontrol (K1) yaitu $2,5 \pm 1,29$; kelompok gigi dibur tanpa aplikasi pasta tulang ikan gurami (P1) yaitu $13,25 \pm 0,95$; dan kelompok gigi dibur dengan aplikasi pasta tulang ikan gurami (P2) yaitu $8,75 \pm 2,21$. Data yang diperoleh menunjukkan rerata jumlah ekspresi TLR2 pada kelompok gigi bur dengan aplikasi pasta tulang ikan gurami lebih rendah dibandingkan dengan kelompok gigi dibur tanpa aplikasi pasta ikan gurami. Hal ini berarti bahwa aplikasi pasta tulang ikan gurami memiliki pengaruh yang lebih besar terhadap penghambatan ekspresi TLR2 dari sel inflamasi pada pulpa gigi. Data dilanjutkan dengan analisis uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok dengan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$), selanjutnya uji *LSD* didapatkan perbedaan yang bermakna.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa aplikasi pasta tulang ikan gurami dapat menghambat ekspresi TLR2 dari sel inflamasi pada pulpa gigi. Dengan demikian, proses inflamasi pada pulpa akan menurun sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan jaringan pulpa.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat mengemban ilmu dengan baik di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dan dapat menyelesaikan penyusunan skripsi yang berjudul “Ekspresi *Toll-Like Receptor 2* setelah Pemberian Pasta Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat penyelesaian pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, motivasi, semangat, dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, saya ingin mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan perlindungan-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros. selaku dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Prof. Dr. drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si. selaku dosen pembimbing utama dan Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M.Kes. selaku dosen pembimbing pendamping yang telah melibatkan saya dalam penelitian dan meluangkan waktu untuk membimbing saya;
4. drg. Erawati Wulandari, M.Kes. selaku dosen penguji ketua dan Dr. drg. Tecky Indriana, M.Kes. selaku dosen penguji anggota yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan tugas akhir saya;
5. drg. Ayu Mashartini Prihanti, Sp.PM. selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan motivasi kepada saya;
6. Segenap almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
7. Kedua orangtua yang saya cintai mama Nia dan papa Herlan, teteh saya Siska Eka Pratiwi, adik-adik saya Shandrio Tri Prasetyo, dan Salwa Adhia Prasista yang selalu mendoakan, memberikan dukungan, dan yang menguatkan saya;

8. Kakek saya Aki Haji Parta dan nenek saya Mbah Nana yang selalu memberikan doa dan dukungan kepada saya;
9. Clara Ayu Monica Octaviani yang selalu memberi dukungan, perhatian, dan motivasi kepada saya;
10. Pihak-pihak yang berjasa dalam penelitian: bu Itus Farmasi, mas Agus, dan bu Wahyu;
11. Teman-teman penelitian, Dheamira Rosida dan Sunana Ageng Hikmawati yang sangat membantu saya dalam penelitian tulang ikan gurami;
12. Anugrah Sutejo yang sudah memberikan dukungan dan mendengarkan keluh kesah saya;
13. Liyathotun Fatimah yang selalu menghibur dan memberi semangat kepada saya;
14. Nina Tauvika yang selalu memberi dukungan, motivasi, dan menghibur saya;
15. Ria Inawati yang selalu menghibur dan memberi perhatian kepada saya;
16. Nada Ocarina Savitri, Ananda Regina, dan Nia Nurmayanti yang sudah banyak membantu saya;
17. Sintya (teman dari fakultas kesehatan masyarakat) yang telah membantu saya dalam mengerjakan analisis penelitian;
18. Teman-teman kos pink squad, umbrella dan tutorial jaran goyang yang memberikan semangat;
19. Teman-teman DEXTRA 2016, KKN 61 dan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari keterbatasan dan kekurangan penulisan skripsi ini, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan demi kesempurnaan penulisan selanjutnya. Penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 5 Maret 2020

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|-----------------------------------------------------------|-------------|
| HALAMAN JUDUL | ii |
| PERSEMBAHAN..... | iii |
| MOTTO | iv |
| PERNYATAAN..... | v |
| PENGESAHAN | vii |
| RINGKASAN | viii |
| PRAKATA | x |
| DAFTAR ISI..... | xii |
| DAFTAR TABEL | xv |
| DAFTAR GAMBAR..... | xvi |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xvii |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 3 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 3 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA..... | 4 |
| 2.1 Inflamasi Pulpa | 4 |
| 2.2 Toll-Like Receptors | 5 |
| 2.2.1 Klasifikasi TLRs | 6 |
| 2.2.2 Toll-like Receptor 2..... | 6 |
| 2.3 Ikan Gurami (<i>Osphronemus gouramy</i>) | 8 |
| 2.3.1 Klasifikasi Ikan Gurami..... | 8 |
| 2.3.2 Morfologi Ikan Gurami..... | 9 |
| 2.3.3 Habitat Ikan Gurami | 9 |
| 2.4 Sediaan Pasta | 10 |
| 2.5 Hubungan Tulang Ikan Gurami dengan TLR2..... | 10 |

| | |
|-----------------------------------------------------------|-----------|
| 2.6 Tikus Wistar (<i>Rattus novvergicus</i>) | 14 |
| 2.6.1 Taksonomi Tikus Wistar | 14 |
| 2.6.2 Morfologi Gigi Tikus Wistar | 15 |
| 2.7 Kerangka Konsep | 17 |
| 2.8 Hipotesis | 19 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 20 |
| 3.1 Jenis Penelitian | 20 |
| 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian | 20 |
| 3.3 Variabel Penelitian | 20 |
| 3.3.1 Variabel Bebas | 20 |
| 3.3.2 Variabel Terikat | 20 |
| 3.3.3 Variabel Terkendali | 20 |
| 3.4 Definisi Operasional Penelitian | 21 |
| 3.4.1 Tulang Ikan Gurami | 21 |
| 3.4.2 Pasta Tulang Ikan Gurami | 21 |
| 3.4.3 Sel Inflamasi | 21 |
| 3.4.4 Ekspresi TLR2 | 21 |
| 3.5 Sampel Penelitian | 22 |
| 3.5.1 Kriteria Sampel | 22 |
| 3.5.2 Jumlah Sampel | 22 |
| 3.5.3 Kelompok Sampel..... | 22 |
| 3.5.4 Besar Sampel | 23 |
| 3.6 Alat dan Bahan | 23 |
| 3.6.1 Alat Penelitian..... | 23 |
| 3.6.2 Bahan Penelitian | 25 |
| 3.7 Prosedur Penelitian | 26 |
| 3.7.1 Tahap Persiapan Hewan Coba | 26 |
| 3.7.2 Pembuatan Serbuk Tulang Ikan Gurami..... | 27 |
| 3.7.3 Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami..... | 27 |
| 3.7.4 Tahap Sterilisasi Alat | 28 |
| 3.7.5 Tahap Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba | 28 |

| | | |
|---------------|---------------------------------------|-----------|
| 3.7.6 | Pembuatan Preparat Jaringan..... | 29 |
| 3.7.7 | Imunohistokimia | 31 |
| 3.7.8 | Pengamatan Ekspresi TLR2..... | 33 |
| 3.8 | Analisis Statistik | 33 |
| 3.9 | Alur Penelitian | 34 |
| BAB 4. | HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 35 |
| 4.1 | Hasil Penelitian | 35 |
| 4.2 | Analisis Hasil Penelitian..... | 37 |
| 4.3 | Pembahasan | 37 |
| BAB 5. | KESIMPULAN DAN SARAN | 43 |
| 5.1 | Kesimpulan..... | 43 |
| 5.2 | Saran | 43 |
| | DAFTAR PUSTAKA | 44 |
| | LAMPIRAN..... | 51 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|----------------------------------------------------------|---------|
| 2.1 Klasifikasi TLRs | 6 |
| 2.2 Komposisi tulang ikan | 11 |
| 4.1 Rerata sel inflamasi yang mengekspresikan TLR2 | 36 |



DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 2.1 Mekanisme kerja TLR2 | 8 |
| 2.2 Morfologi ikan gurami..... | 9 |
| 2.3 Struktur kimia asam amino | 11 |
| 2.4 Jenis asam amino | 12 |
| 2.5 Struktur kimia flavonoid..... | 14 |
| 2.6 Gambar rahang atas dan gigi molar tikus Wistar..... | 15 |
| 2.7 Gambar gigi molar tikus dengan mikroskop cahaya | 16 |
| 4.1 Sel inflamasi pada pulpa gigi tikus Wistar yang mengekspresikan TLR2 (tanda panah hitam) dan tidak mengekspresikan TLR2 (tanda panah merah) yang diamati dengan perbesaran 1000x..... | 35 |
| 4.2 Rerata jumlah sel inflamasi yang mengekspresikan TLR2 pada pulpa gigi tikus Wistar tiap kelompok..... | 36 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|----------------------------------------------------------------------|---------|
| Lampiran A. Surat <i>ethical clearance</i> | 51 |
| Lampiran B. Surat keterangan analisa hewan | 52 |
| Lampiran C. Surat ijin penelitian | 53 |
| Lampiran D. Data hasil perhitungan jumlah rata-rata sel radang | 54 |
| Lampiran E. Uji normalitas dan homogenitas..... | 55 |
| Lampiran F. Uji parametrik <i>One Way ANOVA</i> dan LSD..... | 56 |
| Lampiran G. Foto hasil penelitian..... | 57 |
| Lampiran H. Proses persiapan dan perlakuan hewan coba | 65 |
| Lampiran I. Proses pembuatan dan pewarnaan jaringan..... | 66 |
| Lampiran J. Hasil pengamatan histologi | 67 |

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dentin terbuka dapat disebabkan oleh trauma mekanik. Pada kondisi tersebut akan mempermudah berbagai mikroorganisme patogen berpenetrasi dan menyebar ke jaringan pulpa gigi melalui tubulus dentinalis (Erdogan dkk., 2018; Zheng dkk., 2019). Mikroorganisme mengekspresikan *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) yang akan dikenali oleh salah satu reseptor yaitu *toll-like receptor 2* (TLR2) pada semua sel. Menurut Skevaki dkk. (2014), TLR2 merupakan jenis reseptor yang mampu mengenali PAMPs dari berbagai patogen. TLR2 akan mengaktifasi *nuclear factor* $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) untuk mensekresi berbagai sitokin proinflamasi (Abbas dkk., 2016 dan Ren dkk., 2016). Respon inflamasi pada jaringan pulpa gigi merupakan mekanisme pertahanan untuk melindungi jaringan dan memodulasi perbaikan jaringan (Natarajan, 2018).

Perawatan jaringan pulpa yang terinflamasi perlu dilakukan. Hal tersebut bertujuan mempertahankan vitalitas jaringan pulpa gigi dan mencegah terjadinya inflamasi kronis yang dapat merusak jaringan (Baratawidjaja dan Iris, 2014; Kolasa dan Joanna, 2018). Perawatan dapat dilakukan dengan pemberian suatu bahan pada jaringan pulpa gigi yang terinflamasi. Bahan yang diberikan bekerja melindungi jaringan pulpa yang terpapar dan sebagai bahan antibakteri, sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan pulpa gigi (Brizuela dkk., 2017; Moliz dkk., 2017). Pada umumnya, bahan yang digunakan hanya memiliki peran sebagai antibakteri, sedangkan sebagai anti-inflamasi masih jarang ditemui. Oleh karena itu, dibutuhkan bahan yang diduga memiliki kemampuan sebagai anti-inflamasi dan antibakteri. Bahan tersebut adalah tulang ikan gurami.

Tulang ikan gurami memiliki kandungan protein hewani yang cukup tinggi. Protein ini mengandung berbagai jenis asam amino yang lengkap dan dapat memenuhi unsur-unsur biologis yang sempurna (Purwaningsih dkk., 2016). Penelitian Tridhar (2016) menunjukkan bahwa pada tulang ikan gurami mengandung tinggi protein dibandingkan dengan ikan tawar lainnya. Kualitas

protein dipengaruhi oleh komposisi asam amino. Berdasarkan penelitian Pratama dkk (2018), tulang ikan gurami memiliki asam amino esensial yang relatif tinggi. Asam amino berfungsi sebagai anti-inflamasi dan untuk perbaikan jaringan dengan mekanisme pembentukan fibroblas, pembentukan kolagen, neo-vaskularisasi, dan *remodelling* (Feriyanto, 2014, Pratama dkk., 2018 dan Purwaningsih dkk., 2016). Kandungan lain dari tulang ikan gurami yaitu omega-3, omega-6, serta flavonoid yang berperan sebagai anti-inflamasi (Dewanti dkk., 2019). Flavonoid juga berperan sebagai antibakteri dengan mekanisme merusak permeabilitas dinding bakteri, mikrosom, dan lisosom (Carolia dan Wulan, 2016). Adanya mekanisme tersebut akan mempercepat penurunan ekspresi TLR2, sehingga menghambat aktivasi NF- κ B dan sekresi TNF- α (Nirwana, 2012; Meizarini dkk., 2016). Dengan demikian, akan memicu proses penyembuhan jaringan.

Pertumbuhan produksi ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) di Indonesia semakin meningkat tiap tahunnya. Produksi ikan gurami pada tahun 2017 mencapai 169 ribu ton, kemudian meningkat pada tahun 2018 mencapai 356,53 ribu ton dengan rata-rata kenaikan produksinya yaitu 110,88% (Kementerian Kelautan dan Perikanan, 2018). Banyaknya masyarakat yang mengkonsumsi ikan gurami menyebabkan tingginya limbah yang dihasilkan. Menurut Putranto dkk. (2015), tulang ikan merupakan suatu limbah dari industri perikanan yang belum dimanfaatkan dengan baik. Berdasarkan uraian tersebut, penulis tertarik untuk meneliti mengenai pengaruh aplikasi pasta tulang ikan gurami pada jaringan pulpa gigi yang mengalami inflamasi terhadap ekspresi TLR2.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana ekspresi TLR2 setelah pemberian pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) pada jaringan pulpa gigi?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk menganalisis ekspresi TLR2 setelah pemberian pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) pada jaringan pulpa gigi.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi mengenai ekspresi TLR2 setelah pemberian pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) pada jaringan pulpa gigi.
2. Sebagai referensi pada penelitian-penelitian selanjutnya yang berhubungan dengan pemanfaatan limbah tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) sebagai biomaterial dalam bidang kedokteran gigi serta menjadi bahan kajian lebih lanjut.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inflamasi Pulpa

Inflamasi pada pulpa merupakan suatu respon pertahanan dari jaringan pulpa terhadap rangsangan yang berbahaya. Pulpa berusaha untuk melindungi dirinya dari rangsangan tersebut dengan cara mengenali mikroorganisme patogen untuk memicu respons inflamasi agar memodulasi perbaikan dan regenerasi jaringan. Sitokin diproduksi sebagai respons terhadap suatu infeksi untuk menghilangkan dan menghancurkan berbagai macam mikroorganisme patogen (Natarajan, 2018).

Inflamasi pada pulpa dapat disebabkan oleh infeksi mikroorganisme melalui karies, trauma mekanik, dan iritasi bahan kimia selama prosedur perawatan (Park dkk., 2015). Apabila tidak hati-hati maka preparasi kavitas atau preparasi mahkota akan merusak odontoblas. Makin dekat pulpa, jumlah tubulus per unit permukaan serta diameter akan makin meningkat. Akibatnya permeabilitas dentin akan lebih besar didaerah yang lebih dekat ke pulpa daripada daerah yang dekat dengan pertautan email-dentin (*dentin enamel junction*) (Nirwana, 2012).

Pada proses awal, mikroorganisme patogen akan masuk ke dalam jaringan pulpa gigi melalui tubulus dentinalis. Pada tubulus dentinalis terdapat cairan yang mempunyai komposisi sama dengan cairan ekstraseluler. Cairan yang terkontaminasi patogen akan merembes melalui dentin ke pulpa untuk memulai inflamasi (Nirwana, 2012). Proses selanjutnya, sel odontoblas yang berada pada perifer pulpa sebagai sel pertama yang akan menghadapi patogen dan mengatur respon inflamasi pulpa (Cooper dkk., 2014; Garg, 2014). Pengenalan patogen pada odontoblas dibantu oleh *pattern recognition receptors* (PRRs) sebagai mekanisme pertahanan yang diinisiasi respon imun alamiah. TLRs merupakan salah satu PRRs yang bekerja untuk mengenali suatu mikroorganisme patogen melalui pola molekul pada permukaannya yang dinamakan PAMPs. Reseptor tersebut terdapat pada berbagai sel yaitu odontoblas, fibroblas, *pulp stem cell*, makrofag, neutrofil, limfosit, sel dendritik, dan sel mast. Tahap selanjutnya, TLRs akan mengaktivasi

NF- κ B untuk memproduksi sitokin proinflamasi seperti TNF- α . Fungsi dari sitokin tersebut sebagai penunjuk arah migrasi pada sel-sel inflamasi untuk mencapai daerah yang terjadi inflamasi, mengatur pertumbuhan dan diferensiasi leukosit. (Giraud dkk., 2018, Natarajan, 2018; Widjiastuti dkk., 2017).

Pada dasarnya pulpa merupakan jaringan ikat yang sama seperti jaringan ikat yang lain dibagian tubuh. Namun, ada beberapa faktor yang membuat berbeda dalam memberikan respons terhadap iritasi yaitu sebagai berikut (Nirwana, 2012):

- a. Hampir seluruh jaringan pulpa dikelilingi jaringan keras, sehingga membatasi pulpa untuk membengkak dan hal ini mengakibatkan kemampuan pulpa mentolerir edema terbatas.
- b. Pulpa hampir tidak memiliki sistem sirkulasi kolateral, sehingga mengurangi kemampuan pulpa dalam menghadapi bakteri, jaringan nekrotik, dan inflamasi.
- c. Pulpa mengandung sel unik yaitu odontoblas. Pulpa dapat membentuk jaringan keras berupa *reparative dentin* untuk melindungi dirinya dari cedera.

2.2 Toll-Like Receptors

TLRs merupakan reseptor penting dalam sistem imun. Menurut Baratawidjaja dalam buku “Imunologi Dasar” (2014), TLRs terutama mengenal sejumlah besar patogen yang berhubungan dengan PAMPs seperti yang ditemukan pada sejumlah besar komponen patogen virus, bakteri, jamur, bahkan protozoa seperti DNA, LPS bakteri gram negatif, lipoprotein, dan polisakarida zimosan jamur. Struktur PAMPs dari mikroorganisme patogen tersebut akan dikenali oleh PRRs yang spesifik. TLRs merupakan bentuk dari PRRs yang melekat pada sel imun dan termasuk kedalam kelas mayor PRRs yang berperan penting dalam respon imun terhadap komponen patogen. Perlekatan yang dilakukan TLRs akan membentuk suatu sinyal untuk mengaktifasi faktor transkripsi yaitu NF- κ B yang bekerja mengekspresikan berbagai sitokin dan molekul adhesi endotelial. (Abbas dkk., 2016; Ahsani, 2014; dan Baratawidjaja, 2014).

2.2.1 Klasifikasi TLRs

TLRs dapat diklasifikasikan menjadi beberapa jenis. Berikut adalah klasifikasi TLRs menurut Baratawidjaja (2014) pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Klasifikasi TLRs

| Jenis TLR | Ligan | Mikroba Sasaran |
|-----------|-------------------------------------------|--------------------------------|
| TLR1 | Lipopeptida triasil | Mikobakteri |
| TLR2 | Peptidoglikan | Bakteri gram positif |
| | <i>Glycosylphosphatidylinositol</i> (GPI) | Tripanosoma |
| | Lipoprotein | Mikobakteri |
| | Zimosan | Ragi dan jamur lainnya |
| TLR3 | DsRNA | Virus |
| TLR4 | LPS | Bakteri gram negative |
| | Protein F | RSV |
| TLR5 | Flagelin | Bakteri |
| TLR6 | Lipopeptida diasil | Mikobakteri |
| | Zimosan | Ragi dan jamur |
| TLR7 | ssRNA | Virus |
| TLR8 | SsRNA | Virus |
| TLR9 | DNA, Hemozin | Bakteri, virus, dan plasmodium |
| TLR10 | Belum diketahui | Bakteri |
| TLR11 | <i>Profilin-like protein</i> | Toksoplasma, bakteri |

Sumber: Baratawidjaja, 2014.

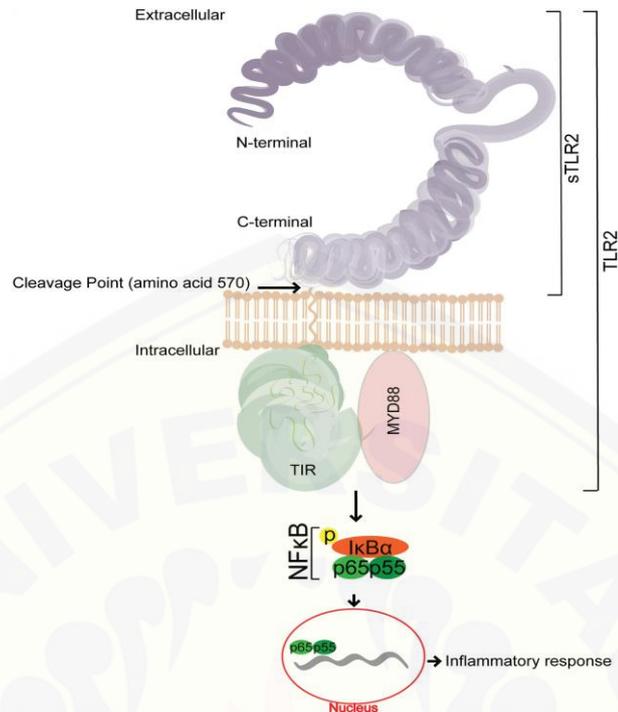
2.2.2 Toll-Like Receptor 2

TLRs merupakan salah satu PRRs yang sangat penting. Saat ini diketahui ada 11 jenis dari TLRs, baik secara individu maupun kombinasi dengan berbagai jenis TLRs lainnya. TLRs tetap bekerja untuk mengenali PAMPs, termasuk lipid, lipoprotein, asam nukleat, dan protein (Nyirenda dkk., 2015). TLR2 termasuk salah satu jenis TLRs yang berfungsi mengenali PAMPs yang sebagian besar

diekspresikan oleh bakteri, termasuk lipopeptida, peptidoglikan, GPI, dan zimosan (Skevaki dkk., 2014).

Dibandingkan jenis TLR lainnya, TLR2 mampu mengenali PAMPs terluas dari berbagai patogen, termasuk bakteri gram positif, bakteri gram negatif, mikobakteri, jamur, virus dan parasit (Skevaki dkk., 2014). Hal tersebut dikarenakan TLR2 mampu membentuk heterodimer dengan TLR1 atau TLR6 (Nyirenda dkk., 2015). Aktivasi TLR2/TLR1 dapat menginduksi sitokin proinflamasi seperti IL-17 dan IL-12, sedangkan aktivasi TLR2/TLR6 dapat menimbulkan sekresi IL-10 (Ren dkk., 2016).

TLR2 bekerja dalam proses inflamasi jaringan. Pada tahap awal, suatu mikroorganisme akan masuk kedalam jaringan berikatan dengan TLR2 pada bagian ekstraseluler. Pengenalan PAMPs dari mikroorganisme dilakukan oleh TLR2 pada permukaan sel, sehingga menginduksi sinyal transduksi intraseluler. TLR2 yang sudah teraktivasi akan menarik molekul adaptor di dalam sitoplasma. Molekul adaptor pertama yang teridentifikasi adalah *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) yang bekerja menyebarkan sinyal dari TLRs. Adanya molekul adaptor tambahan yaitu *MyD88-adaptor-like protein* (MAL), *toll-Interleukin-1 receptor* (TIR) untuk menginduksi IFN- β (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM), dan *sterile-alpha and armadillo motif-containing protein* (SARM) (Skevaki dkk., 2014). Setelah itu, akan berikatan dengan *IL-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK1), *IL-1 receptor-associated kinase 2* (IRAK2), dan *IL-1 receptor-associated kinase 4* (IRAK4) (O'Neill dkk., 2013). IRAK1 akan berinteraksi dengan *TNF receptor-associated factor 6* (TRAF6) yang akan mengaktifkan kompleks protein kinase, sehingga memfosforilasi I κ B kinase (IKK) menjadi I κ B untuk mengaktifasi NF- κ B (O'Neill dkk., 2013 dan Widjiastuti dkk., 2017). Selanjutnya, NF- κ B akan mengaktifasi transkripsi gen untuk mensekresi sitokin proinflamasi yaitu TNF α , IL-1 β , dan lain sebagainya (Crew dkk., 2015). Mekanisme tersebut dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Mekanisme kerja TLR2 (Henrick dkk., 2016)

2.3 Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*)

Ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) merupakan salah satu jenis ikan air tawar asli Indonesia yang banyak dibudidayakan oleh masyarakat. Rasa dagingnya yang gurih dan lezat serta memiliki nilai ekonomis yang tinggi menjadikan ikan ini banyak diminati (Pratama, 2018).

2.3.1 Taksonomi Ikan Gurami

Berikut adalah taksonomi ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) (Andreas, 2016 dan Haq, 2015).

| | |
|----------|------------------------------|
| Filum | : Chordata |
| Kelas | : Pisces |
| Subkelas | : Teloestei |
| Ordo | : Labyrinthici |
| Subordo | : Anabantoidae |
| Familia | : Anabantidae |
| Genus | : <i>Osphronemus</i> |
| Spesies | : <i>Osphronemus gouramy</i> |

2.3.2 Morfologi Ikan Gurami

Secara morfologi, ikan gurami memiliki ciri fisik dengan panjang rata-rata 65cm (Khusna, 2017). Ikan gurami memiliki bentuk badan yang khas yaitu pipih, agak panjang, dan lebar (Romansyah, 2015). Bentuk kepalanya tumpul, berdahi agak menonjol, panjang sirip punggung dapat mencapai pangkal ekor, dan sirip ekor berbentuk busur. Sirip ikan gurami memiliki ciri dengan adanya bintik hitam. Warna punggung ikan gurami dewasa berwarna kecoklatan dan warna perutnya agak kekuningan (Andreas, 2016).



Gambar 2.2 Ikan Gurami (Haq, 2015)

2.3.3 Habitat Ikan Gurami

Ikan gurami banyak dibudidayakan di Indonesia. Ikan ini tidak hanya dibudidayakan di Pulau Jawa, tetapi terdapat juga diluar Pulau Jawa seperti Sumatera Barat, Sumatera Selatan, dan Lampung (Aryani, 2013). Gurami umumnya hidup di perairan tawar, namun ada pula yang hidup di perairan payau (Haq, 2015). Ketinggian lokasi yang tepat untuk budidaya ikan gurami sekitar 500-600m dari permukaan laut dengan suhu 24-28°C, hal ini dapat meningkatkan perkembangan gurami menjadi lebih baik (Khusna, 2017). Membudidayakan ikan gurami harus memperhatikan kualitas air dalam kolam, yaitu dengan derajat keasaaman (pH) yang tepat berkisar 6,5-8. Ikan gurami dapat juga dipelihara pada wadah yang terbatas seperti kolam tanah, kolam tembok, kolam plastik, dan keramba dengan luas 200-500m² dengan kedalaman 120-150cm (Andreas, 2016).

2.4 Sediaan Pasta

Pasta merupakan sediaan setengah padat yang mengandung bahan padat dalam jumlah besar. Pasta disiapkan dengan menambahkan sejumlah serbuk tidak larut yang signifikan (biasanya 50% atau lebih). Pasta biasanya sangat kental atau kaku dan kurang berlemak dibandingkan salep dimana bahan serbuk pada basisnya memiliki jumlah yang besar (Fatmawaty dkk., 2019). Formulasi pasta dibuat dengan mencampurkan bahan obat yang berbentuk serbuk dalam jumlah besar dengan vaselin atau paraffin cair atau dengan bahan dasar tidak berlemak yang dibuat dengan gliserol, musilago, atau sabun (Elmitra, 2017).

Sediaan pasta memiliki beberapa keunggulan. Berikut ini adalah beberapa keunggulan pasta (Elmitra, 2017; Fatmawaty dkk., 2019):

1. Pasta dapat mengikat cairan lebih baik daripada salep.
2. Pasta lebih melekat, sehingga meningkatkan daya kerja lokal.
3. Pasta memiliki sifat melindungi, membentuk lapisan yang dapat menyerap dan menetralkan bahan kimia berbahaya.

Pasta memiliki kemampuan menyerap eksudat oleh sifat alami serbuk/komponen penyerap lainnya.

2.5 Hubungan Tulang Ikan Gurami dengan TLR2

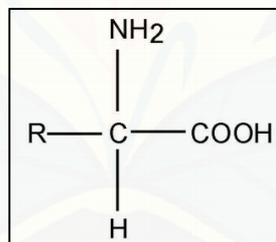
Tulang ikan gurami memiliki kandungan gizi yang cukup baik. Salah satu kandungan tertinggi pada tulang ikan gurami adalah protein. Protein merupakan sumber asam-asam amino yang mengandung unsur C, H, O, N yang tidak dimiliki oleh lemak atau karbohidrat. Fungsi dari protein yaitu sebagai anti-inflamasi dengan cara mencegah terjadinya infeksi dan meningkatkan sirkulasi sehingga mempercepat proses penyembuhan luka (Santosa dan Riyono, 2018). Protein juga berfungsi sebagai sumber energi (Subandiyono dan Sri, 2016). Berikut adalah komposisi dari tulang ikan yang ditunjukkan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Komposisi tulang ikan

| Komposisi | Jumlah (%) |
|---------------|------------|
| Air | 7,03%. |
| Kadar abu | 0,93% |
| Kadar lemak | 1,63% |
| Kadar protein | 84,85% |

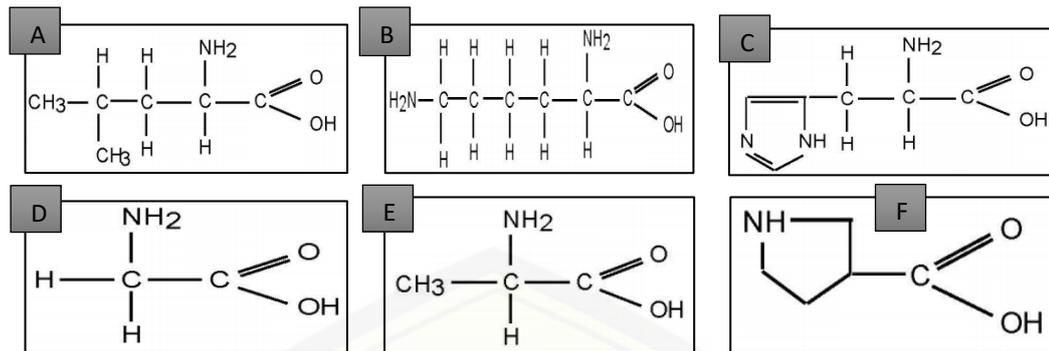
Sumber: Tridhar, 2016.

Asam amino merupakan penyusun protein yang sangat penting. Biasanya terdapat 24 asam amino yang menyusun protein, namun sebagian besar ikan daerah tropis membutuhkan 10 asam amino untuk pertumbuhan dan berbagai proses metaboliknya (Subandiyono dan Sri, 2016). Menurut Pratama dkk (2018), ikan gurami yang segar dan kukus mengandung asam amino yang relatif tinggi. Kandungan asam amino berfungsi untuk sintesa bahan lain dan sebagai sumber energi seperti sintesa kolagen (Santosa dan Riyono, 2018). Asam amino terdiri dari berbagai komponen yaitu kelompok amin, kelompok karboksil, dan kelompok radikal (R) pada α -karbon (Gambar 2.3) (Subandiyono dan Sri, 2016).



Gambar 2.3 Struktur kimia asam amino (Subandiyono dan Sri, 2016)

Kerja asam amino berbeda-beda sesuai dengan jenisnya. Terdapat beberapa jenis asam amino, antara lain leusina, lisina, dan histidina (Gambar 2.4). Leusina merupakan jenis asam amino esensial tertinggi yang bekerja sebagai pengobatan jika terjadi trauma. Lisina sebagai komposisi dasar antibodi, memperkuat sirkulasi, dan menjaga pertumbuhan sel yang normal. Histidina bekerja dalam interaksi dengan protein lain, sebagai prekursor histamin, dan untuk pertumbuhan serta perbaikan jaringan (Pratama dkk., 2018). Terdapat juga glisin, alanin dan prolin sebagai jenis asam amino penyusun kolagen (Gambar 2.4) (Tridhar,2016).



Gambar 2.4 Jenis-jenis asam amino: Leusina (A), Lisina (B), Histidina (C), Glisin (D), Alanin (E), dan prolin (F) (Subandiyono dan Sri, 2016)

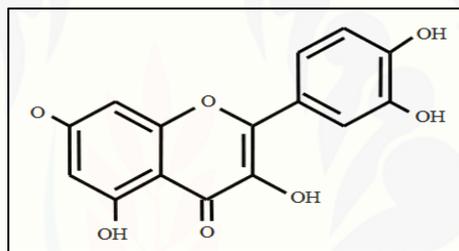
Struktur asam amino akan membentuk protein yang sangat dibutuhkan untuk proses neo-vaskularisasi, proliferasi fibroblas, sintesa kolagen, dan *remodelling*. Adanya pembentukan sel-sel baru dan jaringan granulasi seperti makrofag, fibroblas, dan pembuluh darah akan mempercepat penyembuhan jaringan (Feriyanto, 2014). Makrofag akan mengawali proses penyembuhan jaringan dengan memakan dan menghancurkan mikroba, juga menghasilkan *growth factor* yaitu *transforming growth factor* $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) yang akan menstimulasi fibroblas untuk mensintesis kolagen, sehingga ekspresi kolagen meningkat yang akan memicu penyembuhan pulpa (Abbas dkk., 2016; Feriyanto, 2014; dan Nirwana, 2012). Peningkatan jumlah makrofag terjadi pada hari ke 3 dan seiring berjalannya waktu akan semakin menurun. Penurunan jumlah makrofag akan memicu produksi fibroblas bersama dengan limfosit, kemudian menghasilkan kolagen dalam jumlah besar untuk penyembuhan jaringan (Mutiara dkk., 2015). Proses penyembuhan tersebut akan mempercepat penurunan ekspresi TLR2 yang umumnya terjadi pada hari ke 7. Kondisi ini akan mempengaruhi juga penurunan ekspresi NF- $\kappa\beta$ dan TNF- α (Nirwana, 2012; Meizarini dkk., 2016).

Tulang ikan mengandung asam lemak omega-3 dan omega-6. Keduanya merupakan *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFAs) yang dianggap sebagai pelindung dari suatu respons inflamasi tidak terkontrol (Molfino dkk., 2017). Asam arakidonat (AA) merupakan turunan dari asam lemak omega-6, sedangkan asam lemak omega-3 dapat berupa *Docosa Hexaenoic Acid* (DHA) dan *Eicosa Pentaeinoic Acid* (EPA). Enzim siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase (LOX) akan membantu mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin (prostasiklin

dan tromboksan) dan leukotrien (LT₄). Prostaglandin (PGI₂) bekerja menghambat pembekuan darah dan memperlancar aliran darah, sedangkan tromboksan (TXA₂) bekerja dalam proses pembekuan darah. Leukotrien akan meningkatkan jumlah sel neutrofil dan leukosit ke daerah luka sehingga dapat terjadi fagositosis. Secara bersamaan, lipoxins bekerja sebagai mediator anti-inflamasi dengan cara menghalangi infiltrasi sel neutrofil (*polymorphonuclear* atau PMN) dan menghentikan produksi LT₄ yang dibantu oleh enzim 15 lipooksigenase (15-LO). Lipoxins bekerja sama dengan resolvins E1 (turunan EPA) dan protektin D1 (turunan DHA) yang bertujuan memobilisasi makrofag untuk memakan sel neutrofil dan membersihkan sisa fagositosis senyawa asing. Fase tersebut merupakan tanda inflamasi berakhir (*resolution*). Fase berikutnya yaitu fase proliferasi yang dibantu oleh EPA untuk mempengaruhi kerja fibroblas dalam mensintesa kolagen lebih banyak sehingga terjadi penumpukan kolagen. Apabila terjadi secara terus menerus maka akan mempercepat proses penyembuhan jaringan. Fase tersebut dinamakan fase maturasi (Nicodemus dkk., 2014; Wijaya dkk., 2015). Penyembuhan jaringan ditandai oleh menurunnya ekspresi TLR2 dan sitokin proinflamasi, sehingga terdapat penurunan respon inflamasi (Nirwana, 2012).

Kandungan tulang ikan terdapat juga senyawa flavonoid. Flavonoid berasal dari golongan senyawa phenolik yang memiliki struktur dasar kimia yaitu C₆ – C₃ – C₆ (Gambar 2.5) (Redha, 2010). Flavonoid dapat bekerja sebagai anti-inflamasi dengan mekanisme penghambatan enzim siklooksigenase dan lipooksigenase. Aktivitas tersebut dikarenakan adanya cincin benzopiron yang dapat berikatan dengan enzim siklooksigenase dan lipooksigenase, sehingga menghambat sekresi asam arakidonat yang akan mempengaruhi penurunan produksi prostaglandin, TXA₂, LT₄ serta sekresi sitokin proinflamasi. Flavonoid akan memodulasi gen proinflamasi dengan menghambat sinyal transduksi, sehingga menurunkan modulasi transkripsi gen. Flavonoid juga dapat memperlambat imobilisasi leukosit dan menurunkan aktivasi komplemen. Hal tersebut akan menyebabkan berkurangnya jumlah leukosit yang adhesi pada dinding endotel dan menurunkan stimulasi degranulasi neutrofil. Berdasarkan mekanisme kerja flavonoid dapat

dihasilkan penurunan dari respon inflamasi pada jaringan (Makiyah dan Rizka, 2018; Marbun dan Martina, 2015; Soleha dan Agung, 2016; Zaini dkk., 2016). Flavonoid juga dapat bekerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel, dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme tersebut yang mempengaruhi terhambatnya pembentukan DNA dan RNA, sehingga menimbulkan rusaknya permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom (Carolia dan Wulan, 2016). Hal tersebut memicu penurunan akses mikroorganisme patogen ke pulpa, sehingga membatasi aktivasi sel imun dan respon inflamasi. Dengan demikian, akan ada penurunan aktivasi TLR2 dan terhambatnya sekresi sitokin proinflamasi (Carolia dan Wulan, 2016; Farges dkk., 2015).



Gambar 2.5 Struktur Kimia Flavonoid (Redha, 2010)

2.6 Tikus Wistar (*Rattus novergicus*)

2.6.1 Taksonomi Tikus Wistar

Berikut adalah taksonomi tikus wistar menurut Kartika, dkk (2013).

| | |
|---------|----------------------------|
| Kingdom | : <i>Animal</i> |
| Filum | : <i>Chordata</i> |
| Kelas | : <i>Mamalia</i> |
| Ordo | : <i>Rodentia</i> |
| Famili | : <i>Muridae</i> |
| Genus | : <i>Rattus</i> |
| Spesies | : <i>Rattus novergicus</i> |

2.6.2 Morfologi Gigi Tikus Wistar

Tikus wistar (*Rattus norvegicus*) sering digunakan untuk penelitian eksperimental karena memiliki karakteristik fisiologis paling mirip dengan mamalia dan manusia (Sumarna, 2017). Tikus ini memiliki dua gigi insisif pertama, molar pertama, molar kedua, dan molar ketiga (Gambar 2.6). Keseluruhan jumlah gigi rahang atas dan bawah terdapat 16 buah. Gigi insisif pada tikus akan tumbuh selama hidupnya yang disebut dengan *open rooted*. Sedangkan, gigi molar pada tikus wistar memiliki kemiripan secara anatomi, histologis, biologis, dan fisiologis dengan gigi molar manusia. Gigi molar tikus menunjukkan struktur ruang pulpa (*pulp chamber*), jaringan pulpa, akar, dan apikal dengan foramen apikalis yang serupa dengan gigi manusia (Gambar 2.7). Ketebalan enamel dari gigi molar tikus hanya 0.1 mm, sedangkan dentin memiliki ketebalan sekitar 0,4 – 0.6 mm (Dammaschke, 2010; Gay, 2013; dan Nirwana, 2012).

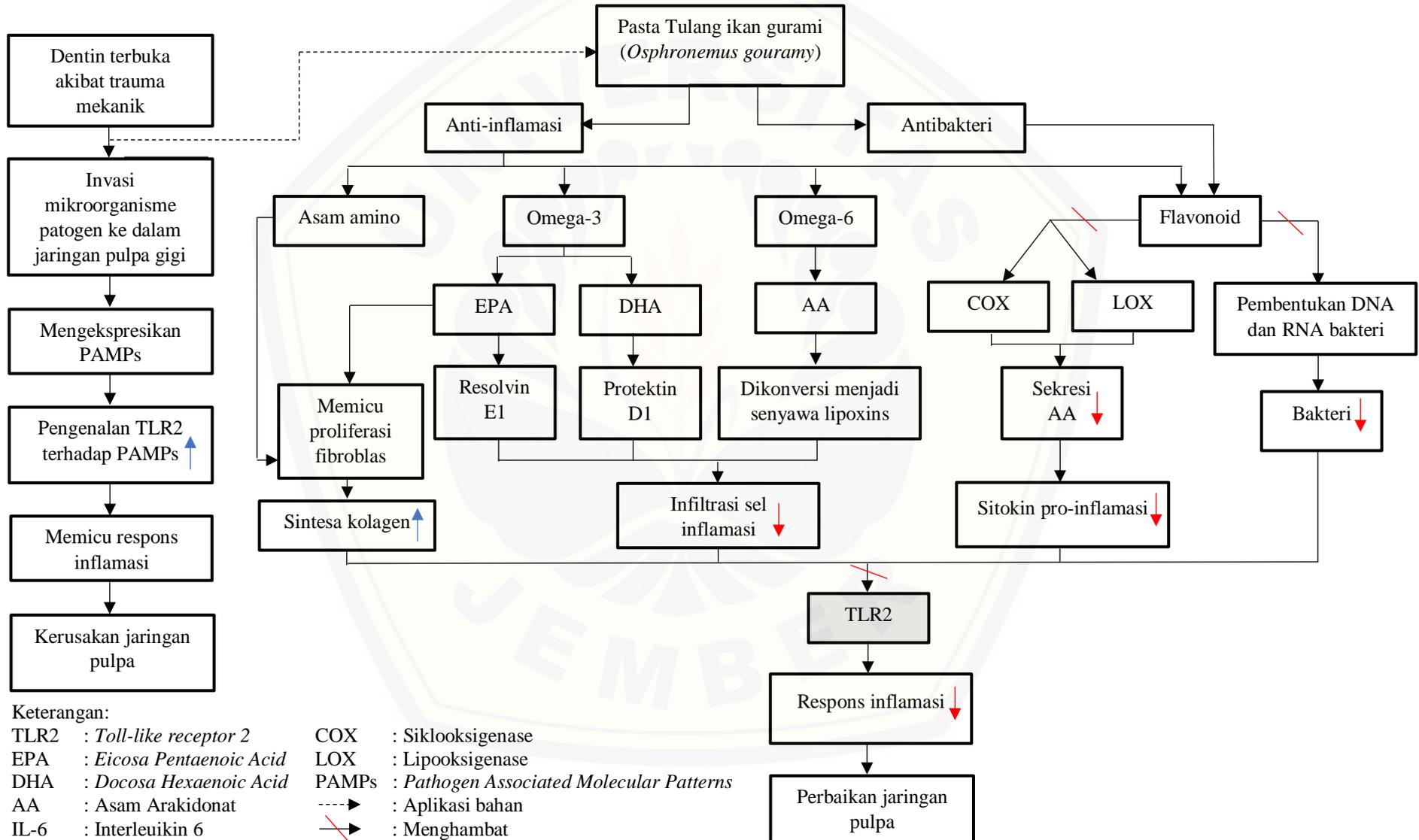


Gambar 2.6 Gambaran inferior tengkorak tikus bagian rahang atas yang menunjukkan gigi molar pertama dengan ditandai  (Dammaschke, 2010)



Gambar 2.7 Gambaran histologis gigi molar rahang atas tikus wistar dengan mikroskop cahaya, pengecatan *toluidine blue*, pembesaran 400x (Dammaschke, 2010)

2.7 Kerangka Konsep



Penjelasan

Dentin terbuka dapat disebabkan oleh trauma mekanik. Kondisi tersebut dapat mempermudah invasi mikroorganisme patogen ke dalam jaringan pulpa gigi melalui tubulus dentinalis. Struktur PAMPs dari mikroorganisme akan dikenali oleh TLR2. Tahap selanjutnya, TLR2 akan meneruskan sinyal transduksi intraseluler untuk mengaktifasi NF- κ B yang akan melepaskan berbagai sitokin proinflamasi seperti TNF α . Proses tersebut akan memicu berlangsungnya inflamasi secara terus menerus yang dapat mengakibatkan kerusakan pada jaringan pulpa apabila tidak dilakukan perawatan.

Perawatan dilakukan untuk mencegah proses inflamasi berkelanjutan dan mempertahankan vitalitas jaringan pulpa. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah pasta tulang ikan gurami. Bahan ini mengandung asam amino, omega-3, omega-6, dan flavonoid yang dapat berfungsi sebagai anti-inflamasi. Asam amino bekerja memicu proliferasi fibroblas, sehingga mempercepat proses penyembuhan jaringan yang terinflamasi. Turunan omega-3 yaitu EPA dan DHA. EPA berperan sama seperti asam amino yang dapat meningkatkan proliferasi fibroblas dalam mensintesa kolagen. Apabila sintesa kolagen terjadi terus menerus akan mempercepat proses penyembuhan jaringan. Asam arakidonat (turunan omega-6) dikonversi menjadi senyawa lipoxins, kemudian bekerja sama dengan resolvins E1 (turunan EPA) dan protektin D1 (turunan DHA) sebagai mediator anti-inflamasi. Adanya peran dari ketiga mediator anti-inflamasi tersebut akan mempengaruhi penurunan infiltrasi sel inflamasi.

Flavonoid bekerja menghambat COX dan LOX, sehingga terjadi penurunan sekresi asam arakidonat yang mempengaruhi penurunan sitokin proinflamasi. Flavonoid juga berfungsi sebagai antibakteri dengan mekanisme menghambat pembentukan DNA dan RNA dari bakteri, sehingga merusak permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom. Mekanisme kerja dari semua kandungan pasta tulang ikan gurami akan menghambat ekspresi TLR2, sehingga dapat menurunkan aktivasi NF- κ B dalam melepaskan sitokin proinflamasi seperti TNF α . Dengan demikian, memicu penurunan fase inflamasi yang dapat mempercepat proses penyembuhan jaringan pulpa gigi.

2.8 Hipotesis

Pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dapat menghambat ekspresi TLR2 pada jaringan pulpa gigi.



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vivo*. Rancangan penelitian ini menggunakan *the post-test only control group design* yaitu pengukuran atau observasi pada kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol dan tanpa diadakannya pretest (Praptomo dkk., 2017). Pada penelitian ini dibagi menjadi tiga kelompok, kemudian pengamatan hanya dilakukan pada saat *post-test* dengan membandingkan ketiga kelompok tersebut.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi, Histologi Fakultas Kedokteran Gigi, dan Fakultas Farmasi Universitas Jember pada bulan September - November 2019.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah ekspresi TLR2.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali pada penelitian ini adalah:

- a. Lingkungan hidup tikus wistar jantan.
- b. Hewan coba tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*) berdasarkan berikut ini.
 - a) Jenis kelamin, usia, dan berat badan.
 - b) Pemeliharaan.
 - c) Makanan dan minuman.

- d) Cara preparasi gigi molar tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*).
- e) Cara pengaplikasian pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*).
- f) Cara pengambilan preparat jaringan.
- g) Cara perhitungan ekspresi TLR2.

3.4 Definisi Operasional Penelitian

3.4.1 Tulang Ikan Gurami

Tulang ikan gurami yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Pasar Kepatihan Trunojoyo Kabupaten Jember. Tulang ikan dijadikan serbuk, kemudian diolah menjadi pasta tulang ikan gurami di Laboratorium Farmasi Universitas Jember.

3.4.2 Pasta Tulang Ikan Gurami

Pasta tulang ikan gurami merupakan campuran sediaan serbuk tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dengan bahan pembuat pasta yang dibuat dengan konsentrasi 75%.

3.4.3 Sel inflamasi

Sel inflamasi merupakan suatu sel yang berperan penting dalam merespons adanya injuri pada semua jaringan. Sel inflamasi yang diamati pada penelitian ini yaitu makrofag, neutrofil, dan limfosit.

3.4.4 Ekspresi TLR2

TLR2 merupakan suatu reseptor sistem imun yang bekerja mengenali PAMPs dari bakteri. Ekspresi TLR2 akan diamati dengan menggunakan metode imunohistokimia yang apabila terekspresi akan tampak sitoplasma berwarna kecoklatan pada sel inflamasi yang diamati dibawah mikroskop perbesaran 1000x dengan dibagi menjadi empat lapang pandang.

3.5 Sampel Penelitian

3.5.1 Kriteria Sampel Tikus Wistar Jantan

- a. Jenis kelamin jantan dengan strain atau galur wistar (*Rattus norvegicus*).
- b. Berat badan 150-200 gram.
- c. Usia 2-3 bulan.
- d. Keadaan umum tikus baik setelah diadaptasikan selama 7 hari.

3.5.2 Jumlah Sampel

Besar sampel adalah jumlah 12 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*), berat 150-200 gr, usia 2-3 bulan yang dilakukan adaptasi 1 minggu, setelah dilakukan alokasi random dikelompokkan menjadi 3 kelompok penelitian. Jumlah tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*). Masing-masing kelompok diamati pada hari ke 4.

3.5.3 Kelompok Sampel

Sampel penelitian dibagi menjadi 3 kelompok penelitian, sebagai berikut:

- a. Kelompok pertama (K1): Gigi molar kiri rahang bawah pada tikus tanpa dibur sebagai kelompok kontrol.
- b. Kelompok kedua (P1): Gigi molar kiri rahang bawah pada tikus dibur untuk dibuat kavitas kelas I pada oklusal giginya, kemudian ditumpat sementara (*Orafil*).
- c. Kelompok ketiga (P2): Gigi molar kiri rahang bawah tikus dibur untuk dibuat kavitas kelas I pada oklusal giginya, diberi pasta tulang ikan gurami kemudian ditumpat sementara (*Orafil*).

3.5.4 Besar Sampel

Daniel (2013) menyatakan cara perhitungan besar sampel yang digunakan dalam penelitian eksperimental laboratoris adalah berdasarkan rumus sebagai berikut.

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

Keterangan:

n = Besar sampel minimum

σ = Standart deviasi (SD) sampel

d = Kesalahan yang masih ditoleransi, diasumsikan $d = \sigma$

Z = Konstanta pada tingkat kesalahan tertentu; jika $\alpha = 0.05$, maka nilai Z adalah Z = 1.96

p = Keterpercayaan penelitian (95 %)

Oleh karena itu, perhitungannya menjadi:

$$n = (1,96)^2$$

$$n = 3.84 \approx 4$$

Jadi, jumlah sampel minimum yang harus digunakan adalah 4 sampel tiap kelompok.

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat Penelitian

- a. Alat untuk Pembuatan Serbuk Tulang Ikan Gurami
 1. Pisau (*Global eagle*)
 2. Panci aluminium
 3. Saringan
 4. Sikat gigi
 5. Ayakan
 6. Kompor (*Rinai*)
 7. Blender (*Phillips*)
 8. Oven (*Memmert*)

- b. Alat untuk Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami
 1. Mortar dan stamper
 2. Kaca arloji
 3. Gelas ukur 10ml (*Iwaki*)
 4. Timbangan (*SNUG-300*)
 5. Wadah pasta
- c. Alat untuk Sterilisasi
 1. *Autoclave (Ependorf)*
- d. Alat untuk Persiapan dan Perlakuan Hewan Coba
 1. Timbangan hewan coba
 2. Sonde
 3. Spatula semen
 4. Ekskavator
 5. *Glass Plate*
 6. Pinset
 7. Gunting
 8. *Plastic filling instrument (PFI)*
 9. *Blade dan Scalpel*
 10. Masker (*One Med*)
 11. Sarung tangan (*Maxter*)
 12. *Stopper sement*
 13. *Round bur* ukuran $\frac{1}{4}$ (*Edenta*)
 14. Mikromotor dan *low speed contra angle*
 15. *Liner Applicator*
 16. Kandang tikus
 17. Tempat makan tikus
 18. *Rat Dental Chair*
 19. *Cotton pellet*
 20. *Paper pad*

- e. Alat untuk Pembuatan dan Pewarnaan Jaringan
 1. Mikrotom (*Leica RM2135*)
 2. Mikroskop binokuler (*Olympus, USA*)
 3. *Object glass* dan *deck glass* (*Poly-L-Lysine, Duran Group*)
 4. *Slide warmer* (*Tissue-Tek Slide Warmer PS-53*)
 5. *Waterbath* (*Memmert*)
 6. *Automatic tissue processor* (*Tissue-Tek VIP 5Jr*)
 7. Kompor listrik

3.6.2 Bahan Penelitian

- a. Bahan untuk Pembuatan Serbuk Tulang Ikan Gurami
 1. Tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*)
 2. Air
- b. Bahan untuk Sterilisasi
 1. Alkohol 70%
- c. Bahan untuk Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami
 1. Serbuk tulang ikan gurami 100%
 2. Plasebo:
 - a) *Magnesium Carbonat* 22gr
 - b) *Calcium Carbonat* 25gr
 - c) Gliserin 9ml
 - d) Propilen glikol 7ml
 - e) *Aquadest ad* 100gr
- d. Bahan untuk Persiapan dan Perlakuan Hewan Coba
 1. Tikus wistar jantan (*Rattus norvegicus*)
 2. Makanan tikus wistar jantan
 3. Ketamin
 4. *Xylazine*
 5. Pasta tulang ikan gurami dengan konsentrasi 75%
 6. Tumpatan sementara (*Orafil*)
 7. *Aquadest* steril

8. Formalin 10%
- e. Bahan untuk Pembuatan Preparat dan Pewarnaan Jaringan
 1. Asam format 10%
 2. Air
 3. Alkohol 70%, 80%, 95%, 100%
 4. *Paraffin*
 5. *Xylol*
 6. Gliserin
 7. *Meyer egg albumin*
- f. Bahan untuk Pewarnaan Jaringan
 1. H₂O₂
 2. *Phosphate Buffer Saline (PBS)*
 3. Antibodi primer *Anti-TLR2 (Abbiotec, Cat. No. 251110)*
 4. *Anti Polivalent DAB (Scy-Tek)*
 5. *Aquadest*
 6. *Cat Mayer hematoxylin (counterstain)*
 7. Alkohol 70%, 80%, 90%, 95%, absolut I, II, dan III
 8. *Xylol*
 9. *Entellan*

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Tahap Persiapan Hewan Coba

- a. Sebelum penelitian, dilakukan persiapan pembuatan *Ethical clearance* di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.
- b. Adaptasi sampel tikus wistar terhadap lingkungan kandang selama 1 minggu dengan diberi makan dan air minum setiap hari.
- c. Berat badan tiap sampel tikus ditimbang dan dikelompokkan menjadi 3 kelompok secara acak masing-masing 4 ekor.

3.7.2 Pembuatan Serbuk Tulang Ikan Gurami

Berikut adalah prosedur pembuatan serbuk tulang ikan gurami yang dibuat berdasarkan penelitian Nur dkk. (2018), Putranto dkk. (2015), dan Spiraliga dkk. (2017).

1. Pemisahan dan Pencucian Tulang Ikan Gurami

Lakukan filet pada ikan gurami menggunakan pisau. Pisahkan sisik dan duri tulang ikan gurami tersebut. Setelah dilakukan pemisahan, tempatkan pada saringan dan segera cuci tulang ikan dengan air mengalir untuk membersihkan tulang ikan dari sisa-sisa daging yang masih menempel.

2. Perebusan dan Pencucian Tulang Ikan Gurami

Tulang ikan yang sudah bersih direbus dalam air mendidih menggunakan panci aluminium dengan suhu 70°C - 100°C selama 30 menit (*degreasing*). Perebusan dilakukan untuk memastikan kembali tidak adanya sisa-sisa daging dan lemak yang masih menempel pada tulang. Setelah direbus selama 30 menit, segera angkat dan tiriskan. Lalu cuci kembali tulang ikan sampai bersih dengan air mengalir.

3. Pengeringan dan Penghalusan Tulang Ikan Gurami

Tulang ikan yang sudah bersih kemudian dikeringkan menggunakan oven pengering selama 48 jam pada suhu 65°C . Setelah kering, tulang ikan dihaluskan menggunakan blender sehingga menjadi serbuk tulang ikan. Selanjutnya ayak serbuk tulang ikan menggunakan ayakan.

3.7.3 Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami

Pembuatan pasta tulang ikan gurami 75% adalah sebagai berikut (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017; Sumarna, 2017).

- a. Timbang serbuk tulang ikan gurami 100% sebanyak 75gr
- b. Campurkan 25gr plasebo dan 75gr serbuk tulang ikan gurami 100% (*Osphronemus gouramy*) hingga didapatkan berat 100gr untuk mendapatkan pasta tulang ikan gurami dengan konsentrasi 75%.

3.7.4 Tahap Sterilisasi Alat

Semua alat penelitian yang terbuat dari logam dicuci bersih kemudian disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 120° C. Sedangkan alat yang terbuat dari plastik disterilkan dengan menggunakan alkohol.

3.7.5 Tahap Pengelompokan dan Perlakuan Hewan Coba

Sebanyak 12 ekor tikus wistar jantan dengan berat 150-200 gram secara acak dibagi menjadi 3 kelompok. Setiap kelompok berjumlah 8 ekor tikus.

a. Kelompok pertama (K1)

Gigi molar kiri rahang bawah pada tikus tanpa dibur sebagai kelompok kontrol untuk melihat adanya ekspresi TLR2 pada kondisi normal.

b. Kelompok kedua (K2)

– Tikus dianastesi dengan ketamin dosis 40mg/KgBB secara intramuskular ditunggu selama 2 menit kemudian diletakan di *Rat Dental Chair*.

– Gigi molar kiri rahang bawah pada tikus dibur searah sumbu gigi sedalam 0,5mm. Pengeburan dimulai pada oklusal gigi menggunakan *low-speed contra angle* dengan *round bur* ukuran 1/4 untuk menghilangkan bagian enamel gigi sampai menyisakan selapis tipis dentin.

– Kavitas dibersihkan dari sisa serbuk dentin dengan diirigasi menggunakan NaOCl 2,5% dan *aquadest* steril, selanjutnya dikeringkan dengan kapas kering steril.

– Kavitas kemudian ditutup menggunakan tumpatan sementara (*Orafil*) yang diaplikasikan dengan *plastic filling instrument* atau sonde kemudian dimampatkan dengan *stopper sement* kecil (Akbari, 2017; IAS Veterinary Staff, 2014; Nirwana, 2012).

b. Kelompok ketiga (K3)

– Tikus pada kelompok ini diberikan perlakuan yang sama seperti kelompok kedua (K2) sampai pada tahap kavitas dikeringkan dengan kapas kering steril.

- Kavitas yang telah kering diberi pasta tulang ikan gurami konsentrasi 75% dengan menggunakan *liner applicator*.
- Kavitas kemudian ditutup menggunakan tumpatan sementara (*Orafil*) yang diaplikasikan dengan *plastic filling instrument* atau sonde kemudian dimampatkan dengan *stopper sement* kecil (Akbari, 2017; IAS Veterinary Staff, 2014; Nirwana, 2012).

Tiap kelompok dilakukan dekapitasi pada hari ke-4 setelah perlakuan. Tikus Wistar jantan dikorbankan lalu didekapitasi pada hari ke-4 karena rerata jumlah infiltrasi sel inflamasi (makrofag, limfosit, dan neutrofil) sedang mencapai puncaknya (Enggardipta dkk., 2016). Hari ke-4, tikus dianestesi dengan ketamin dan *xylazine* dosis masing-masing 75mg/kgBB dan 10mg/kgBB secara intraperitoneal (IAS Veterinary Staff, 2014). Tahap selanjutnya, dilakukan dekapitasi dan pemotongan rahang bawah regio molar kiri. Semua sampel jaringan dari semua kelompok perlakuan difiksasi menggunakan formalin 10% selama minimal 12-18 jam untuk mencegah terjadinya autolisis, mempertahankan morfologi, dan mencegah pertumbuhan jamur serta bakteri. Setelah difiksasi jaringan dicuci dengan air mengalir.

3.7.6 Pembuatan Preparat Jaringan

Sampel yang telah dimasukkan ke dalam formalin 10% selanjutnya dilakukan dekalsifikasi. Proses dekalsifikasi menggunakan larutan asam format untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang dan gigi sebelum pemotongan, sehingga tulang dan gigi menjadi lebih lunak dan memudahkan dalam pemotongan. Tahap dekalsifikasi sebagai berikut:

- a. Sampel yang telah direndam dalam formalin 10% dicuci dengan air bersih yang mengalir pelan selama 30 menit.
- b. Kemudian dimasukkan ke dalam larutan asam format 10% selama 14 hari dan dilakukan vibrasi setiap hari agar proses dekalsifikasi merata.
- c. Setelah itu dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan sisa bahan dekalsifikasi. (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017; Sumarna, 2017).

Setelah melalui tahap dekalsifikasi semua sampel rahang yang sudah lunak dipotong untuk memperkecil jaringan sehingga menyisakan gigi molar dan jaringan periodontal dari tikus. Selanjutnya merupakan tahap pembuatan sediaan histologi. Tahapan ini meliputi proses dehidrasi, *clearing* dan impregnasi, yaitu:

- Dehidrasi dengan cara merendam dalam alkohol secara bertingkat dengan konsentrasi 70%, 80%, 95% I, 95% II, Absolut (100%) I, Absolut (100%) II, Absolut (100%) III untuk menghilangkan air dalam jaringan. Pada tiap konsentrasi direndam secara berturut-turut selama 60 menit.
- Tahap berikutnya *clearing* dengan cara merendam dalam larutan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III, masing-masing selama 60 menit.
- Setelah itu dilakukan impregnasi melalui proses infiltrasi parafin dalam oven dengan suhu 60°C, dengan cara bertahap. Sediaan dimasukkan ke dalam *paraffin* murni I, II, dan III masing-masing selama 120 menit (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017; Sumarna, 2017).

Setelah melalui proses dehidrasi, *clearing*, dan impregnasi, tahap pembuatan sediaan histologi berikutnya adalah sebagai berikut:

- a. Pembuatan blok (*embedding*)
 1. Persiapan alat cetak dari logam yang berbentuk balok bersiku yang ditempatkan di atas permukaan kaca. Alat cetak diolesi dengan gliserin untuk mempermudah pemisahan alat cetak dengan blok *paraffin* yang telah *setting*.
 2. Parafin cair disiapkan dalam wadah, *paraffin* cair ini digunakan untuk *embedding*.
 3. Parafin cair untuk *embedding* dituangkan ke dalam cetakan hingga penuh setinggi permukaan, lalu jaringan ditanamkan pada posisi yang sesuai dan diusahakan jaringan menempel pada dasar cetakan dalam kondisi rata.
 4. Bila *paraffin* sudah mengeras, cetakan dilepaskan dan blok *paraffin* diberi label dan siap dilakukan pemotongan. (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017; Sumarna, 2017).

- b. Pemetongan jaringan menggunakan mikrotom
 1. Blok *paraffin* diletakkan pada mikrotom.
 2. Pisau mikrotom harus dalam keadaan bersih, kemudian memasang pisau mikrotom pada posisinya.
 3. Mengatur ketebalan sayatan antara 4-6 mikron dengan arah bukolingual.
 4. Memindahkan hasil sayatan yang berupa pita tipis dari mikrotom menggunakan kuas ke atas permukaan air dalam *waterbath* dengan temperatur 56°C-58°C agar sayatan jaringan dapat mengembang dan terpisah satu sama lainnya.
 5. Hasil sayatan dipindahkan dari *waterbath* ke atas *object glass* yang telah diolesi *meyer albumin* menggunakan kuas dan diberi label sesuai dengan label jaringan yang dipotong.

Sediaan jaringan dibiarkan kering diatas *object glass* dan dipanaskan dengan *slide warmer* suhu 30°C-35°C selama minimal 12 jam dan selanjutnya dilakukan tahap pengecatan jaringan (Akbari, 2017; Kurniasari, 2017; Sumarna, 2017).

3.7.7 Imunohistokimia

Berikut adalah tahap pewarnaan jaringan menggunakan metode imunohistokimia.

1. Deparafinisasi dan rehidrasi bagian jaringan.
 - a. Proses deparafinasi dilakukan dengan cara merendam *object glass* dalam larutan *xylol* I, *xylol* II, dan *xylol* III, masing-masing selama 3 menit.
 - b. Selanjutnya adalah proses rehidrasi dengan cara merendam *object glass* dalam alkohol dengan konsentrasi absolut (100%) I, absolut (100%) II, alkohol 95% I dan alkohol 95% II. Perendaman pada masing-masing konsentrasi direndam secara berturut-turut selama 3 menit.

2. Mengurangi enzim peroksidase endogen menggunakan H_2O_2 sebanyak 0.3 ml (disiapkan sesaat sebelum gelas objek dimasukkan) kemudian preparat dicelupkan ke dalam larutan selama 10-15 menit.
3. Lakukan pencucian menggunakan PBS masing-masing 4 kali selama 5 menit. Permukaan preparat di sekitar jaringan dikeringkan menggunakan tisu namun jaringan tidak dibiarkan kering.
4. Gunakan *Super Block* (tutup biru), dan inkubasi selama 8 menit pada suhu kamar.
5. Lakukan pencucian menggunakan PBS masing-masing 1 kali selama 5 menit.
6. Gunakan antibodi primer *Anti-TLR2* (1:300) dan inkubasi selama 24 jam.
7. Lakukan pencucian menggunakan PBS masing-masing 4 kali selama 5 menit.
8. Gunakan satu tetes *UltraTek Anti-Polyvalent* (tutup kuning), dan inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
9. Lakukan pencucian menggunakan PBS masing-masing 4 kali selama 5 menit.
10. Gunakan satu tetes *UltraTek HRP* (tutup merah), dan inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar.
11. Lakukan pencucian menggunakan PBS masing-masing 4 kali selama 5 menit.
12. Tambahkan 4 tetes *DAB Chromogen* ke *DAB Substrate*, campur dengan cara diaduk dan aplikasikan ke jaringan. Inkubasi selama 5-15 menit.
13. Kemudian preparat dicuci dengan PBS sebanyak 4 kali masing-masing selama 5 menit, lalu dicuci dengan *aquadest* selama 5 menit.
14. Cat *Mayer hematoxylin (counterstain)* ditambahkan ke preparat, kemudian diinkubasi selama 1 menit, dicuci dengan *aquadest* selama 10 menit, dan dikeringkan.

15. Proses selanjutnya adalah dehidrasi pada alkohol bertingkat 70%, 80%, 90%, 95%, absolut I, II, dan III. Kemudian dilanjutkan penjernihan dengan *xylol* I, II, dan III selama 1 menit, dikeringkan dan dibersihkan.
16. Proses pewarnaan diakhiri dengan *mounting* (penutupan dengan *cover glass*) menggunakan *entellan*. Kemudian dilakukan pemberian label pada preparat histologinya. Preparat yang telah selesai diwarnai kemudian diamati di bawah mikroskop cahaya.

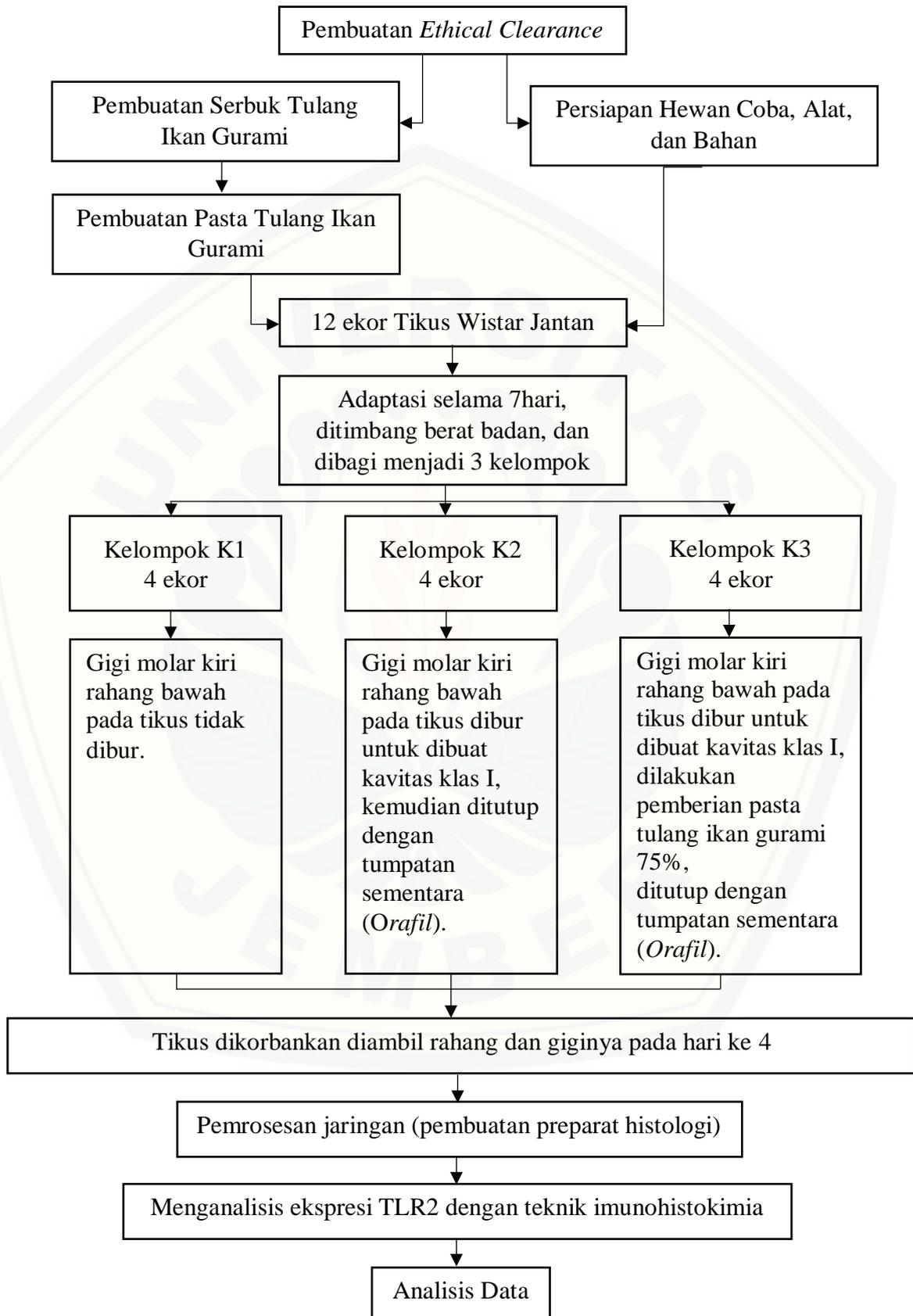
3.7.8 Pengamatan Ekspresi TLR2

Ekspresi TLR2 akan diamati dengan menggunakan uji imunohistokimia yang apabila terekspresi akan tampak sitoplasma berwarna kecoklatan yang diamati dibawah mikroskop perbesaran 1000x dengan dibagi menjadi empat lapang pandang (Kusumawardani dkk., 2013; Meizarini dkk., 2016).

3.8 Analisis Statistik

Data penelitian yang telah diperoleh diuji normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan di uji *Levene's* untuk menguji homogenitasnya. Dilanjutkan uji parametrik menggunakan *One Way ANOVA* dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) dan dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significance Difference*) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) untuk mengetahui kelompok mana saja yang memiliki perbedaan bermakna.

3.9 Alur Penelitian



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa pemberian pasta tulang ikan gurami (*Osphronemus gouramy*) dapat menghambat ekspresi TLR2 pada jaringan pulpa gigi.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, saran yang dapat diberikan penulis adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai ketahanan umur simpan dari pasta tulang ikan gurami.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian pasta tulang ikan gurami terhadap induksi bakteri.
3. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan perbandingan hari yang berbeda.
4. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan pasta tulang ikan gurami sebagai bahan *pulp capping*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Andrew, H.L., dan Shiv, P. 2016. *Imunologi Dasar Abbas: Fungsi dan Kelainan Sistem Imun*. Edisi Indonesia Kelima. Elsevier (Singapore) Pte Ltd. Singapore. h. 15-18.
- Ahsani, D.N. 2014. Respon Imun pada Infeksi Jamur. *JKKI*. 6(2): 55-66.
- Akbari, M.M. 2017. Efektifitas Pasta Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea Canephora*) sebagai Bahan Alternatif untuk *Pulp Capping* terhadap Jumlah Odontoblas pada Pulpa Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*). *Skripsi*. Jember: Universitas Jember. h. 29-36.
- Andreas, M.S. 2016. Identifikasi dan Prevalensi Jamur pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) di Pasar Modern Surabaya. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga. h. 5-6.
- Aryani, R., Kismiyati, dan Gunanti M. 2013. Identifikasi dan Prevalensi Cacing pada Saluran Pencernaan Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) di Desa Ngrajek Magelang Jawa Tengah. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 5(1): 43-47.
- Baratawidjaja, K.G., dan Iris, R. 2014. *Imunologi Dasar*. Edisi Kesebelas (Cetakan Kedua). Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. h. 64-66; 295-298.
- Brizuela, C., Andrea, O., Carolina, C., Roxana, C., Carolina, I.S., Valeria, R., dan Montse, M. 2017. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Endodontics*. 43(11): 1776-1780.
- Carolia, N., dan Wulan, N. 2016. Potensi Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) sebagai Alternatif Terapi *Acne vulgaris*. *Medical Journal of Lampung University*. 5(1): 140-145.
- Chen, E., Mahmoud, M.B., Norman, F., dan Robert, M.L. 2018. Inflammatory Cell Expression of Toll-like Receptor-2 (TLR2) within Refractory Periapical Granuloma. *F1000 Research*. 7: 1-19.
- Cooper, P.R., Michelle, J.H., dan Anthony, J.S. 2014. Inflammation and Regeneration in the Dentin-Pulp Complex: a Doubled –Edged Sword. *Journal of Endodontics*. 40: S46-S51.
- Crew, F.T., Dipak, K.S., Liya, Q., Jian, Z., Nadka, B., dan Ryan, P.V. 2015. Neuroimmune Function and the Consequences of Alcohol Exposure. *Alcohol Res*. 37(2): 331–351.

- Dammaschke, T. 2010. Rat Molar Teeth as a Study Model for Direct Pulp Capping Research in Dentistry. *Laboratory Animals*. 44(1): 1-6.
- Daniel, W. D. 2013. *Biostatistic a Foundation for Analysis in Health Science*. 10th Edition. United States of America: John Wiley & Sons, Inc. h.189.
- Dewanti, I.D.A.R., Susilawati, I.D.A, Purwanto, P., Lestari, P.E., Budirahardjo, R., Setyorini, D., Yani, R.W.E., Wulandari, E. & Wahyukundari, M.A. 2019. The Role of Kuniran (*U. moluccensis*) and Gurami (*O. goramy*) Fish Thorns and Scales in Increasing Salivary Leukocyte and Monocyte Cells Viability against *Streptococcus mutans*. *Dent. J. (Majalah Kedokteran Gigi)*. 52(1): 45–50.
- Enggardipta, R.A., Tetiana, H., dan Juni, H. 2016. Efek eugenol terhadap jumlah sel inflamasi pada pulpa gigi molar tikus *Sprague Dawley*. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. 2(2): 66-73.
- Elmitra. 2017. *Dasar-dasar Farmasetika dan Sediaan Semi Solid Edisi 1 Cetakan 1*. Yogyakarta: Deepublish CV Budi Utama. h. 213-216.
- Erdogan, O., M. Malek, M.N. Janal, dan J.L. Gibbs. 2018. Descriptors of Pain Quality Associate with Pulpal and Periapical Diagnostic Tests in Patients Experiencing Acute Tooth Pain. h. 1-20.
<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/02/08/262022.full.pdf>
[Diakses pada 13 April 2019].
- Farges, J.C., Brigitte, A.L., Emmanuelle, R., Maxime, D., Alexis, G., Anthony, J.S., dan Paul, R.C. 2015. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. h. 1-16.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4619960/pdf/MI2015-230251.pdf>. [Diakses pada 14 Juni 2019].
- Fatmawaty, A., Michrun, N., dan Radhia, R. 2019. *Teknologi Sediaan Farmasi*. Yogyakarta: Deepublish CV Budi Utama.hanaa. h. 565.
- Feriyanto, F.R. 2014. Pengaruh Diet Tinggi Protein terhadap Penyembuhan Luka pada Pasien Post Operasi Sectio Sesarea di Ruang Nifas RSD Balung Jember. *Skripsi*. Jember: Program Studi S1 Keperawatan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Jember. h. 1-12.
- Gay, W.I. 2013. *Methods of Animal Experimentation Volume 3*. Academic Press New York and London. h. 266.
- Giraud, T., Charlotte, J., Charlotte, R., Hengameh, B., Patrick, L., dan Imad, A. 2018. Pulp Capping Materials Modulate the Balance between Inflammation and Regeneration. *The Academy Dental Materials by Elsevier Inc*. 35(1): 24-35.

- Garg, N., dan Amit, G. 2014. *Textbooks of Endodontics*. Third Edition. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers. h. 22-30.
- Haq, M.B. 2015. Perendaman Infusa Meniran (*Phyllanthus niruri*) pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) yang Diinfeksi *Vibrio anguillarum* terhadap Kadar Hemoglobin, *Packed Cell Volume*, dan Eritrosit. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. h. 6-7.
- Henrick, B.M., Xiao-Dan, Y., Ameer, Y.T., J.Bruce, G., dan Kenneth, L.R. 2016. Insights into Soluble Toll-Like Receptor 2 as a Downregulator of Virally Induced Inflammation. *Frontiers in Immunology*. 7: 1-9.
- IAS Veterinary Staff. 2014. Recommended Methods of Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia for Laboratory Animal Species. Van Etten: Albert Einstein College of Medicine Institute for Animal Studies. h. 4.
- Juwariyah, Adika, Z.A., Ester, T.R., Linda, R., Rozan, M.I. 2017. Aktivitas Leukosit Pro Inflamasi pada Kasus Penyakit Paru Obstruktif Kronis Eksaserbasi Akut. *Mutiara Medika Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. 17(2): 67-71.
- Kartika, A.A., Siregar, H.C.H., dan Fuah, A.M. 2013. Strategi Pengembangan Usaha Ternak Tikus (*Rattus novergicus*) dan Mencit (*Mus musculus*) di Fakultas Peternakan IPB. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*. 01(3): 147-154.
- Kementerian Kelautan dan Perikanan. 2018. Refleksi 2018 & Outlook 2019. Jakarta: Kementerian Kelautan dan Perikanan. h. 12.
- Khusna, U.A. 2017. Pengaruh Perbedaan Suhu terhadap Hatching Rate (HR) dan Survival Rate (SR) Telur Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). *Skripsi*. Malang: Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Peternakan Universitas Muhammadiyah Malang. h. 4-5.
- Kumar, K.P., Alyce, J.N., dan Conni, H.Y.W. 2018. Partners in Crime: Neutrophils and Monocytes/Macrophages in Inflammation and Disease. *Cell and Tissue Research*. 371: 551-565.
- Kusumawardani, B., Marsetyawan, H.S., Djaswadi, D., dan Widya, A. 2013. Placental Trophoblast Responses to *Prophyromonas gingivalis* Mediated by Toll-Like Receptor- 2 and -4. *Journal of Dentistry Indonesia*. 20(2): 32-38.
- Kurniasari, A. 2017. Efektifitas Pasta Biji Kopi Robusta (*Coffea robusta*) sebagai Bahan Direct Pulp Capping terhadap Sel Makrofag dan Sel Limfosit Pulpa Gigi. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember. h. 31-39.

- Kolasa, M., dan Joanna, S. 2018. Direct pulp capping in permanent teeth in children—types of pulp exposure, therapeutic indications. Part I. *Nowa Stomatologia*. 23(1): 38-41.
- Makiah, S.N.N., dan Rizka U.A. 2018. Ekstrak Etanol Buah Semangka (*Citrullus lanatus*) sebagai Anti-inflamasi melalui Pengamatan Tebal Epitel Duodenum Mencit BALB/c. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 30(1): 24-28.
- Marbun, E.M.A., dan Martina, R. 2015. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Buas-Buas (*Premna pubescens Blume*) Sebagai Antiinflamasi Pada Edema Kaki Tikus Putih (*Rattus novergicus*). *Jurnal Biosains*. 1(3): 107-112.
- Meizarini, A., Siswandono, dan Anita, Y. 2016. The Role of TLR2, NF- κ B, TNF α as an Inflammation Markers of Wound Dressing Combination of Zinc Oxide with Turmeric Liquid Extract. *Journal of International Dental and Medical Research*. 9(3): 173-177.
- Moliz, M.T.A., Cher, F., Christie, Y.K.L., Pierre, S.W., dan Josette, C. 2017. Antimicrobial and Biological Activity of Leachate from Light Curable Pulp Capping Materials. *Journal of Dentistry*. 64: 45-51.
- Molfino, A., Maria, I.A., Massimo, M., dan Maurizio, M. 2017. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Critical Illness: Anti-Inflammatory, Proresolving, or Both?. h. 1-6.
<https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/5987082/abs/>. [Diakses pada 13 Juni 2019].
- Mutiara, G., Nurdiana., Dan Yulian W.U. 2015. Efektifitas Hidrogel Binahong (*Anredera cordifolia (Ten.) Steenis*) terhadap Penurunan Jumlah Makrofag pada Penyembuhan Luka Fase Proliferasi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Galur Wistar Kondisi Hiperglikemia. *Majalah Kesehatan FKUB*. 2(1): 29-40.
- Natarajan, M.M. 2018. Characterisation of Pulpal Responses to Bacterial Challenge and Novel Antimicrobial for Management of Bacterial Contamination of Infected Pulp. *Tesis*. United Kingdom: Cardiff University. h. 10-12; 23-27.
- Nicodemus, Mohammad, A., dan Sri, L. 2014. Uji Efek Penyembuhan Luka Sayat Ekstrak Ikan Toman (*Channa micropeltes*) secara Oral pada Tikus Putih Jantan Wistar. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*. 1(1): 1-14.
- Nirwana, I. 2012. Aktivitas Ekstrak Buah Merah Delima (*Punica granatum linn*) sebagai Material Pulp Capping terhadap Ekspresi IL-6, IL-10, TGF- β , MMP-1, dan Kolagen Tipe I pada Gigi Perforasi Mekanik. *Disertasi*. Surabaya: Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. h. 139-144.

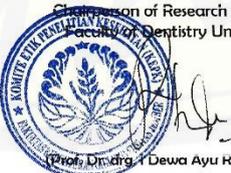
- Nur, A., Verawati, B., dan Harahap, D.A. 2018. Formulasi dan Karakteristik Bihun Tinggi Protein dan Kalsium dengan Penambahan Tepung Tulang Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*) untuk Balita Stunting. *Jurnal MKMI*. 14(2): 157-164.
- Nyirenda, M.H., Elena, M., Uwe, V., Dumitru, C.T., Sophie, D., Maureen, M., Llyod, K., Giulio, P., Guang-Xian, Z., Amir, G., Cris, S.C., Amit, B., dan Bruno, G. 2015. TLR2 Stimulation Regulate the Balance between Regulatory T cell Th17 Function: A Novel Mechanism of Reduced Regulatory T Cell Function in Multiple Sclerosis. *Journal Immunology*. 194: 5761-5774.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., dan Bowie, A.G. 2013. The History of Toll-like Receptors – Redefining Innate Immunity. *Nature Reviews Immunology*. 13(6): 453-460.
- Park, S.H., Ling, Y., Robert, M.L., Jean, C.F., dan Hiromichi, Y. 2015. Inflammation of the Dental Pulp. *Hindawi Publishing Corporation*. 1-2.
- Pratama, B.A., Titik, S., dan Tristiana, Y. 2018. Pengaruh Perbedaan Suhu terhadap Penetasan Telur, Daya Tetas Telur, Kelulushidupan, dan Pertumbuhan Benih Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) Strain Bastar. *Jurnal Sains Akuakultur Tropis*. 2(1): 59-65.
- Pratama, R.I., Iis, R., dan Emma, R. 2018. Profil Asam Amino, Asam lemak, dan Komponen Volatil Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) Segar dan Kukus. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 21(2): 218-231.
- Praptomo, A.J., Khoirul, A., dan Siti, R. 2017. *Metodologi Riset Kesehatan Teknologi Laboratorium Medik dan Bidang Kesehatan Lainnya*. Edisi 1 Cetakan 2. Yogyakarta: Deepublish. h. 31.
- Purwaningsih, E., Lasiyem, dan Dewi, M. 2016. Hubungan Konsumsi Makanan dengan Protein Hewani pada Ibu Nifas dengan Penyembuhan Luka Perineum di Wilayah Kerja Puskesmas Klaten Tengah Kabupaten Klaten. *Jurnal Involusi Kebidanan*. 7(12): 26-40.
- Putranto, H.F., Andi, N.A., dan Indrati, K. 2015. Karakterisasi Tepung Tulang Ikan Belida (*Chitala* sp.) sebagai Sumber Kalsium dengan Metode Hidrolisis Protein. *Ziraa'ah*. 40(1): 11-20.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. 9(2): 196-202.
- Ren, C., Qiuxiang, Z., Bart, J.D.H., Hao, Z., Marijke, M.F., dan Paul, D.V. 2016. Identification of TLR2/TLR6 Signalling Lactic Acid Bacteria for Supporting Immune Regulation. *Scientific Reports*. 6(1): 1-12.

- Romansyah, M.A. 2015. Teknik Pembuatan Pakan Buatan Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) di CV. Mentari Nusantara Desa Batokan Kecamatan Ngantru, Kabupaten Tulungagung, Propinsi Jawa Timur. *Skripsi*. Surabaya: Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Airlangga. h. 19.
- Santosa, W.R., dan Riyono. 2018. Perbandingan Efektivitas Pemberian Kompres Madu dan Kompres Gula Kristal terhadap Penyembuhan Luka pada Tikus Putih. *Strada Jurnal Ilmiah Kesehatan*. 7(1): 28-35.
- Skevaki, C., Michail, P., Kalliopi, K., Athanassios, T., John, G.R. 2014. Single Nucleotide Polymorphisms of Toll-like Receptors and Susceptibility to Infectious Diseases. *Clinical & Experimental Immunology*. 180(2): 165-177.
- Soleha, T.U., dan M. Agung Y.P. 2016. Blueberry (*Vaccinium corymbosum*) dalam Menghambat Proses Inflamasi. *Medical Journal of Lampung University*. 5(1): 63-67.
- Spiraliga, R.R., Y.S. Darmanto, dan Ulfah, A. 2017. Karakteristik Nasi Analog Tepung Mocaf dengan Penambahan Tepung Rumput Laut *Gracilaria verrucosa* dan Tiga Jenis Kolagen Tulang Ikan. *Jurnal Pengetahuan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. 6(1): 1-10.
- Subandiyono, dan Sri, H. 2016. *Buku Ajar Nutrisi Ikan*. Semarang: Lembaga Pengembangan dan Penjaminan Mutu Pendidikan Universitas Diponegoro. h. 98-103.
- Sumarna, A.H. 2017. Pengaruh Pasta kopi Robusta (*coffea robusta*) sebagai Bahan *Direct Pulp Capping* terhadap Jumlah Neutrofil. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. h. 22; 34-39; 49-50.
- Tarigan, R., dan Gita, T. 2013. *Perawatan Pulpa Gigi (Endodonti)*. Edisi ketiga. Jakarta: EGC. h.26-36.
- Tridhar, N.A. 2016. Perbandingan Produksi Kolagen dari Sisik dan Tulang Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*) secara Kimia dan Enzimatis. *Skripsi*. Bandung: Program Studi Teknologi Pangan Fakultas Teknik Universitas Pasundan. h. 1-17.
- Widjiastuti, I., Nadia, I., dan Mandojo, R. 2017. Stimulasi Ekstrak Propolis pada *Odontoblast Like Cells* yang Diinduksi *Lactobacillus Achidophilus* Inaktif terhadap Ekspresi TLR2 dan TNF α . *Odonto Dental Journal*. 4(2): 85-93.
- Wijaya, U., Mohammad, A., dan Andhi, F. 2015. Uji Aktivitas Salep Fase Minyak Ekstrak Ikan Toman (*Channa micropeltes*) terhadap Luka Sayat pada Tikus Jantan Galur Wistar. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*. 3(1): 1-10.

- Wright, H.L., Robert, J.M., Roger, C.B., dan Steven, W.E. 2010. Neutrophil Function in Inflammation and Inflammatory Diseases. *Rheumatology*. 49: 1618-1631.
- Yanti, A., Uleng, B., dan Mansyur, A. 2016. Angka Bnading Netrofil/Limfosit di Populasi Dewasa Muda. *Indonesian Journal of Clinical Pathology and Medical Laboratory*. 22: 105-108.
- Zaini, M., Agung, B., dan Khoerul, A. 2016. Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Herba Lampasau (*Diplazium esculentum Swartz*) Terhadap Mencit Jantan Yang Diinduksi Karagenin- Λ . *Jurnal Pharmasciences*. 3(2): 119-130.
- Zheng, J., Zhou, W., Kaijun, N., Yanan, X., Xiaoli, H., Jieni, F., Dongtao, T., Kaiyu, F., Bo, Z., Weiyang, K., Cuicui, S., dan Ligeng, W. 2019. Microbiome of Deep Dentinal Caries from Reversible Pulpitis to Irreversible Pulpitis. *Journal of Endodontics*. 45(3): 302-309.e1.

LAMPIRAN

A. Ethical Clearance

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER <i>(THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)</i></p> | |
| <p>ETHIC COMMITTEE APPROVAL <u>No.580/UN25.8/KEPK/DI/2019</u></p> | |
| Title of research protocol | : *Analysis of TNF Alpha, IL-10, TLR 2 Expression in Dental Pulp and Alveolar Bone of Wistar Rats that given With Scales, Thorns of Gouramy and Kuniran Fishes " |
| Document Approved | : Research Protocol |
| Principal investigator | : Prof. Dr.drg I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si |
| Member of research | : 1. Prof. Dr.drg I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si 2. Dheamira Rosida 3. Shintia Dwi Pramesty 4. Sunana Ageng Hikmawati |
| Responsible Physician | : Prof. Dr.drg I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si |
| Date of approval | : September- November 2019 |
| Place of research | : Laboratorium Biomedik FKG Universitas Jember |
| <p>The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.</p> | |
| <p>Jember, September 10th 2019</p> | |
|  Dean of Faculty of Dentistry Universitas Jember |  Chairperson of Research Ethics Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember |
| <p>(drg. R. Rahardyan P. M. Kes, Sp. Pros.)</p> | <p>(Prof. Dr.drg. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si)</p> |

B. Surat Keterangan Analisa Hewan

PEMERINTAH KABUPATEN JEMBER
DINAS PERIKANAN
Jl. Letjen Suprpto Nomor 139 Telp. (0331) 5101342
Jember 68122

SURAT KETERANGAN HASIL ANALISA HEWAN

No. 523/510/35.09.329/2019

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen hewan yang dikirim ke Dinas Perikanan Kabupaten Jember oleh mahasiswa :

Nama : SHINTIA DWI PRAMESTY
N IM : 161610101048
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember

maka disimpulkan hasil identifikasi spesimen tersebut adalah :

Kingdom : Animalia
Filum : Chordata
Kelas : Pisces
Sub Kelas : Teleostei
Ordo : Labyrinthici
Sub Ordo : Anabantoidae
Famili : Anabantidae
Genus : *Osphronemus*
Spesies : *Osphronemus gouramy* (Lacapede)
Nama Indonesia : Ikan Gurami

Demikian surat keterangan ini dibuat, untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 26 September 2019

An. KEPALA DINAS PERIKANAN
KABUPATEN JEMBER
Kepala Bidang Sumberdaya Perikanan
Dan Kelautan

**Ir. TIGO DEWANTO**

Pembina
NIP. 19670829 199303 1 002

C. Surat Ijin Penelitian



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

Nomor : 5584 /UN25.8/TL/2019
Perihal : Ijin Penelitian

27 AUG 2019

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

Dalam rangka pengumpulan data penelitian maka, dengan hormat kami mohon bantuan dan kesediaannya untuk memberikan ijin penelitian bagi dosen kami dibawah ini :

- | | | |
|----|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Nama | : Prof. Dr. drg. IDA Ratna Dewanti, MSi |
| 2 | NIP | : 196705021997022001 |
| 3 | Semester/Tahun | : 2019/2020 |
| 4 | Fakultas | : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 5 | Alamat | : Jl. Danau Toba I/18 A Jember |
| 6 | Judul Penelitian | : Analisis Biokompabilitas Dan ogenitas Limbah Ikan (Duri Dan Sisik) Sebagai Material Tissue Engeneerins |
| 7 | Lokasi Penelitian | : Laboratorium Patologi Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember |
| 8 | Data/alat yang dipinjam | : Imunohistokimia |
| 9 | Waktu | : Agustus 2019 s/d Selesai |
| 10 | Tujuan Penelitian | : Untuk Menganalisis Imunogenitas |

Demikian atas perkenan dan kerja sama yang baik disampaikan terimakasih

an. Dekan
Wakil Dekan I,



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

D. Data Hasil Perhitungan Jumlah Rata-rata Sel inflamasi

| KELOMPOK | TIKUS | LAPANG PANDANG | | | | JML | RATA LP |
|----------|-------|----------------|-----|-----|-----|-----|---------|
| | | LP1 | LP2 | LP3 | LP4 | | |
| K1 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 4 | 2,5 |
| | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | |
| | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 | |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | |
| P1 | 1 | 2 | 6 | 0 | 6 | 14 | 13,25 |
| | 2 | 6 | 2 | 1 | 3 | 12 | |
| | 3 | 4 | 4 | 2 | 3 | 13 | |
| | 4 | 4 | 3 | 6 | 1 | 14 | |
| P2 | 1 | 1 | 0 | 3 | 4 | 8 | 8,75 |
| | 2 | 3 | 0 | 1 | 3 | 7 | |
| | 3 | 1 | 1 | 1 | 5 | 8 | |
| | 4 | 6 | 1 | 2 | 3 | 12 | |

E. Uji Normalitas dan Homogenitas

E.1 Uji Normalitas Data

| KELOMPOK | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | | |
|----------|---------------------------------|------|------|--------------|------|------|------|
| | Statistic | df | Sig. | Statistic | df | Sig. | |
| SEL | K1 | .151 | 4 | . | .993 | 4 | .972 |
| | P1 | .283 | 4 | . | .863 | 4 | .272 |
| | P2 | .382 | 4 | . | .801 | 4 | .103 |

a. Lilliefors Significance Correction

E.2 Uji Homogenitas Data

| | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. | |
|-----|--------------------------------------|-------|-----|-------|------|
| SEL | Based on Mean | 1.286 | 2 | 9 | .323 |
| | Based on Median | .180 | 2 | 9 | .838 |
| | Based on Median and with adjusted df | .180 | 2 | 4.002 | .842 |
| | Based on trimmed mean | 1.053 | 2 | 9 | .388 |

F. Uji Parametrik *One Way ANOVA* dan *LSD*

F.1 *One Way ANOVA*

Descriptives

| SEL | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------|----|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| K1 | 4 | 2.5000 | 1.29099 | .64550 | .4457 | 4.5543 | 1.00 | 4.00 |
| P1 | 4 | 13.2500 | .95743 | .47871 | 11.7265 | 14.7735 | 12.00 | 14.00 |
| P2 | 4 | 8.7500 | 2.21736 | 1.10868 | 5.2217 | 12.2783 | 7.00 | 12.00 |
| Total | 12 | 8.1667 | 4.82104 | 1.39171 | 5.1035 | 11.2298 | 1.00 | 14.00 |

ANOVA

| SEL | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 233.167 | 2 | 116.583 | 46.633 | .000 |
| Within Groups | 22.500 | 9 | 2.500 | | |
| Total | 255.667 | 11 | | | |

F.2 Uji *LSD*

Multiple Comparisons

Dependent Variable: SEL

LSD

| (I) KELOMPOK | (J) KELOMPOK | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|--------------|--------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| K1 | P1 | -10.75000* | 1.11803 | .000 | -13.2792 | -8.2208 |
| | P2 | -6.25000* | 1.11803 | .000 | -8.7792 | -3.7208 |
| P1 | K1 | 10.75000* | 1.11803 | .000 | 8.2208 | 13.2792 |
| | P2 | 4.50000* | 1.11803 | .003 | 1.9708 | 7.0292 |
| P2 | K1 | 6.25000* | 1.11803 | .000 | 3.7208 | 8.7792 |
| | P1 | -4.50000* | 1.11803 | .003 | -7.0292 | -1.9708 |

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

G. Foto Hasil Penelitian

G.1 Bahan dan Alat Pembuatan Serbuk dan Pasta Tulang Ikan Gurami

Bahan Pembuatan Serbuk Tulang Ikan Gurami



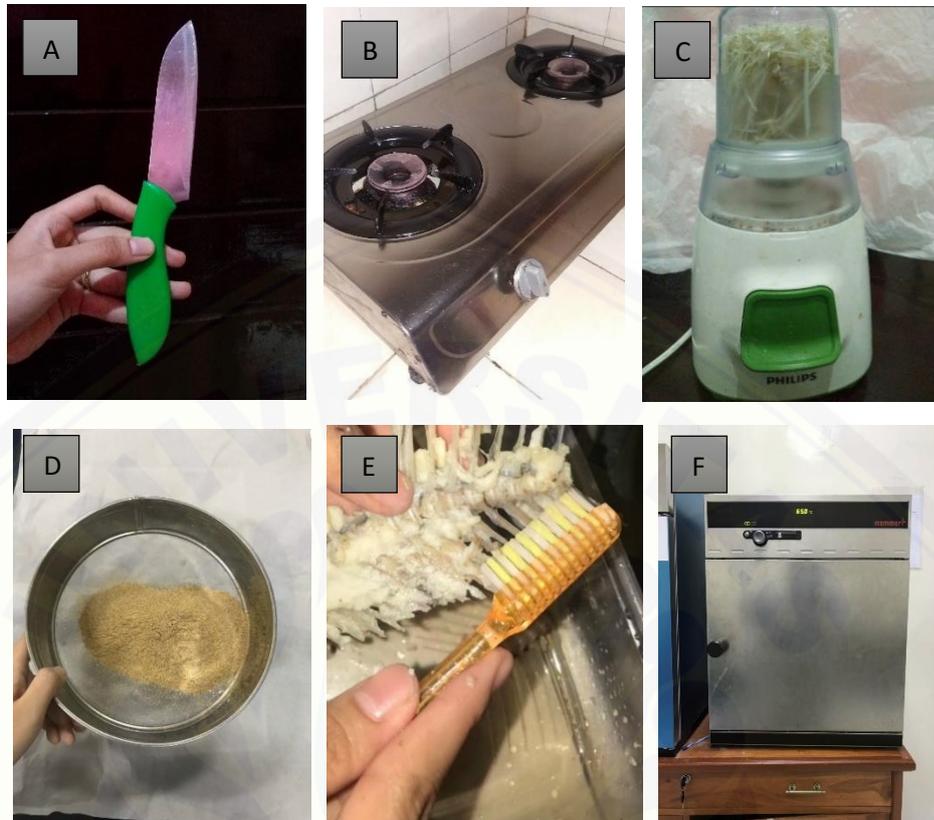
Tulang ikan gurami

Bahan Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami



Keterangan:

- A. *Calcium carbonat* 25gr
- B. *Magnesium carbonat* 22gr
- C. Serbuk tulang ikan gurami 100%
- D. Gliserin 9ml
- E. Propilen Glikol 7ml
- F. *Aquadest ad* 100gr

Alat Pembuatan Serbuk Tulang Ikan Gurami

Keterangan:

- A. Pisau
- B. Kompor
- C. Blender
- D. Ayakan
- E. Sikat gigi
- F. Oven

Alat Pembuatan Pasta Tulang Ikan Gurami

Keterangan:

- A. Mortar dan stamper
- B. Kaca arloji
- C. Gelas ukur 10ml
- D. Timbangan

G.2 Bahan dan Alat Perlakuan Hewan Coba

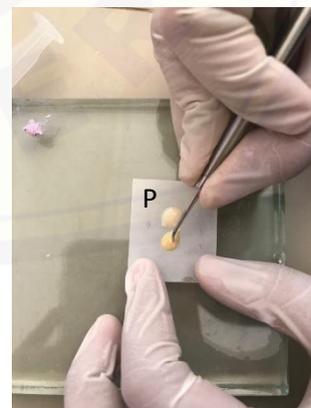
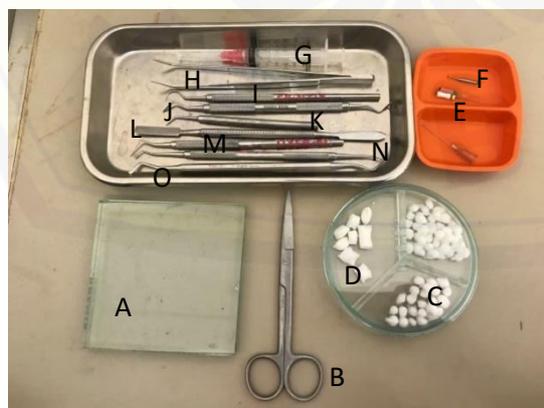
Bahan Perlakuan Hewan Coba



Keterangan:

- A. Aquadest steril
- B. Alkohol 70%
- C. Pasta tulang ikan Gurami 75%
- D. Xylazin (*Xxyla, Interchemie*)
- E. Ketamin (*KTM-100*)
- F. Tumpatan sementara (*Orafil*)
- G. NaOCl 2,5%

Alat Perlakuan Hewan Coba





Keterangan:

- A. *Glass plate*
- B. *Gunting*
- C. *Cotton pellet*
- D. *Cotton roll*
- E. *K-file endodontik No.15*
- F. *Round bur ukuran ¼*
- G. *Syringe irigasi*
- H. *Pinset*
- I. *Sonde half moon*
- J. *Ekskavator*
- K. *Liner Aplicator*
- L. *Spatula semen*
- M. *Sonde lurus*
- N. *Stopper sement*
- O. *Plastic Filling Instrument (PFI)*
- P. *Papper pad*
- Q. *Syringe anastesi*
- R. *Mikromotor (STRONG 204) dan Low speed contra angle (NSK EX-203C)*
- S. *Rat dental chair*

G.3 Bahan dan Alat Pembuatan dan Pewarnaan Jaringan

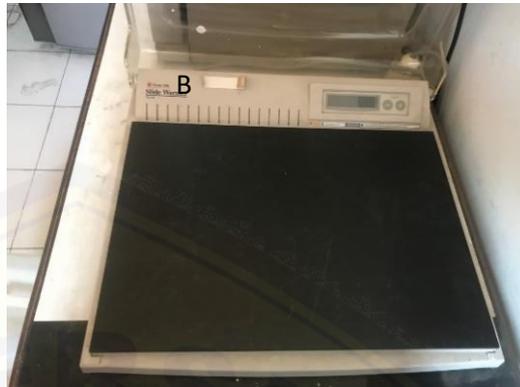
Bahan Pembuatan dan Pewarnaan Jaringan

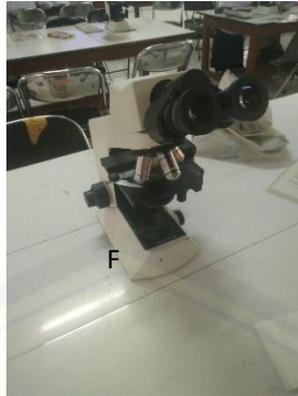


Keterangan:

- 1) Etanol absolut
- 2) *Formid acid (Merck)*
- 3) *Entelan (Merck KGaA)*
- 4) *Xylo*
- 5) Alkohol 95%
- 6) *Antibodi sekunder (SensiTek HRP (DAB) Anti-Polyvalent, ScyTek)*
- 7) *Object glass (Poly-L-Lysine Coated Slides, Cat. # 63410-01)*
- 8) *Glass cover*
- 9) *Cat Mayer Hematoxylin (ScyTek)*
- 10) *Antibodi primer Anti-TLR2 (Abbiotec, Cat. No. 251110)*

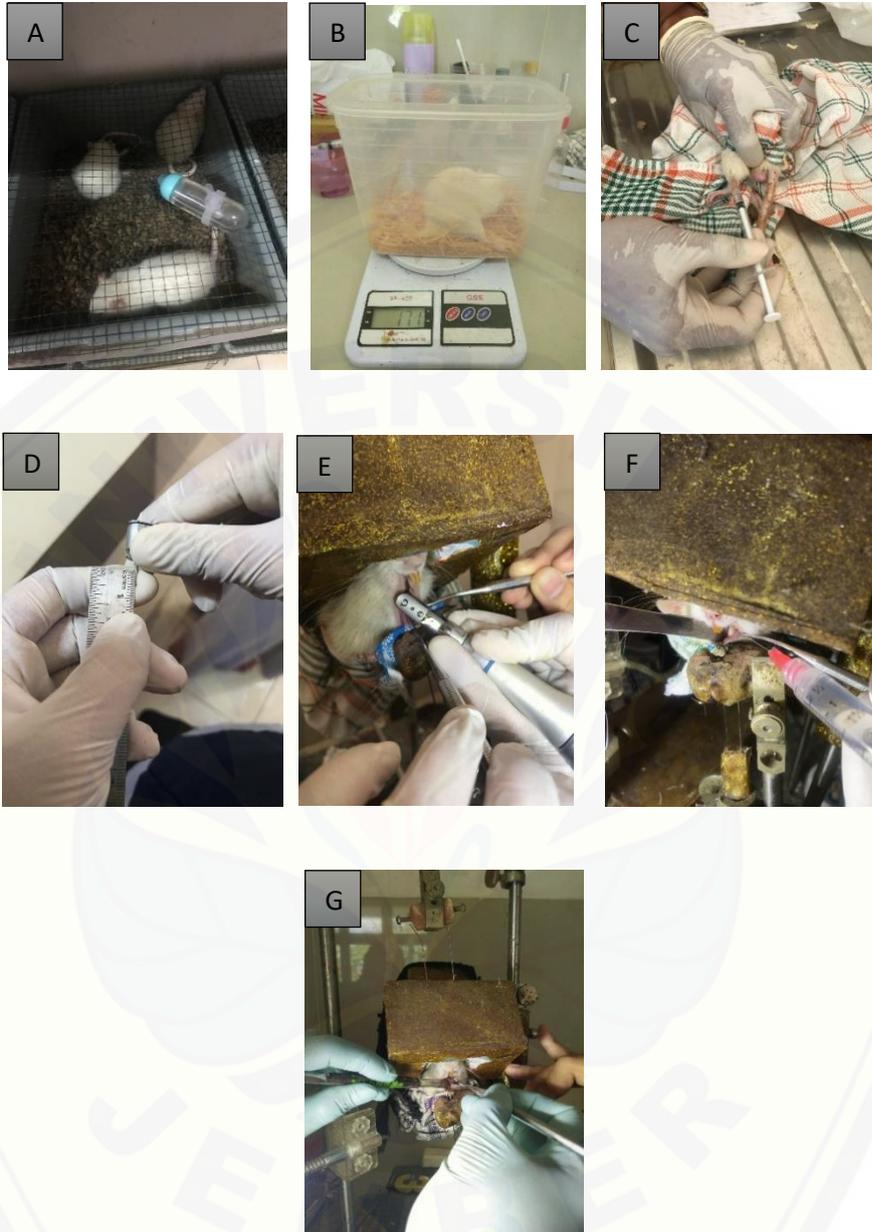
Alat Pembuatan dan Pewarnaan Jaringan





Keterangan:

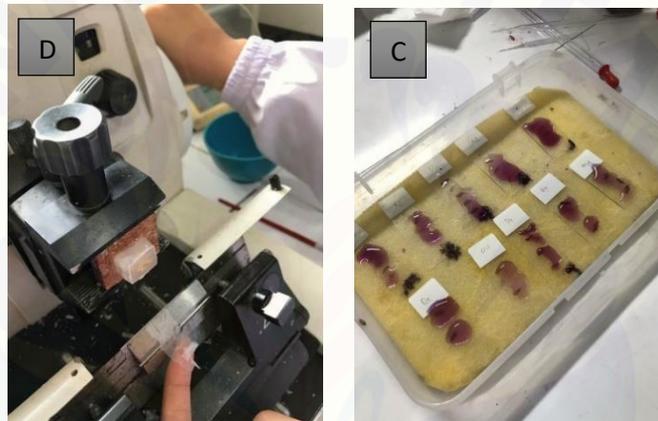
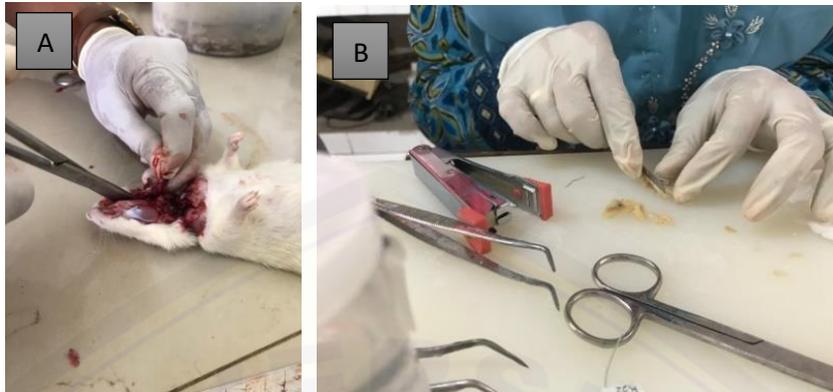
- A. Mikrotom (*Leica RM2135*)
- B. Slide warmer (*Tissue-Tek Slide Warmer PS-53*)
- C. Waterbath (*Memmert*)
- D. Kompor listrik
- E. Automatic tissue prosesor (*Tissue-Tek VIP 5Jr.*)
- F. Mikroskop Binokuler (*Olympus CX21*)
- G. Oven (*Memmert*)

H. Proses Persiapan dan Perlakuan Hewan Coba

Keterangan:

- A. Adaptasi hewan coba
- B. Menimbang hewan coba
- C. Anastesi intramuskular pada hewan coba
- D. Mengukur kedalaman bur
- E. Preparasi gigi molar satu rahang bawah kiri pada hewan coba
- F. Irigasi gigi molar satu rahang bawah kiri pada hewan coba
- G. Aplikasi pasta tulang ikan gurami dan tumpatan sementara

I. Proses Pembuatan dan Pewarnaan Jaringan

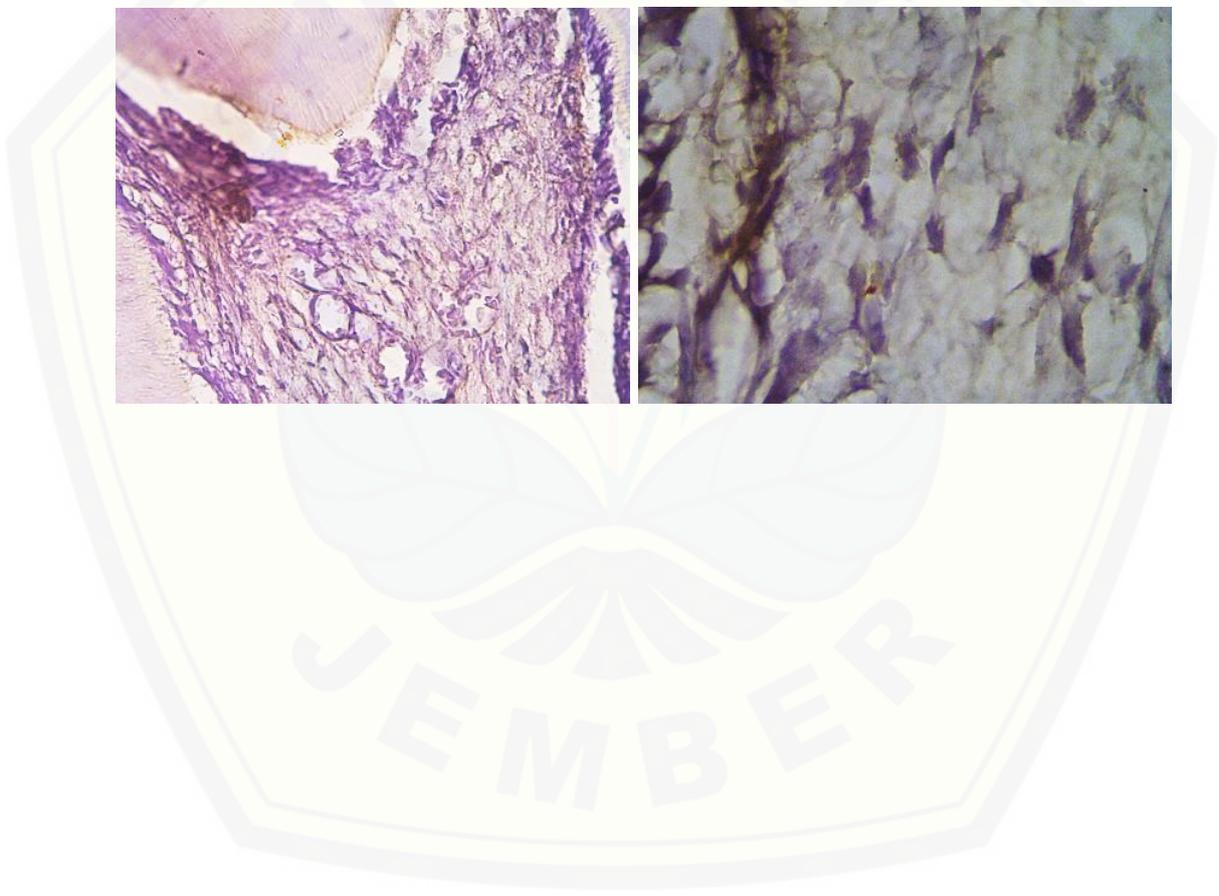
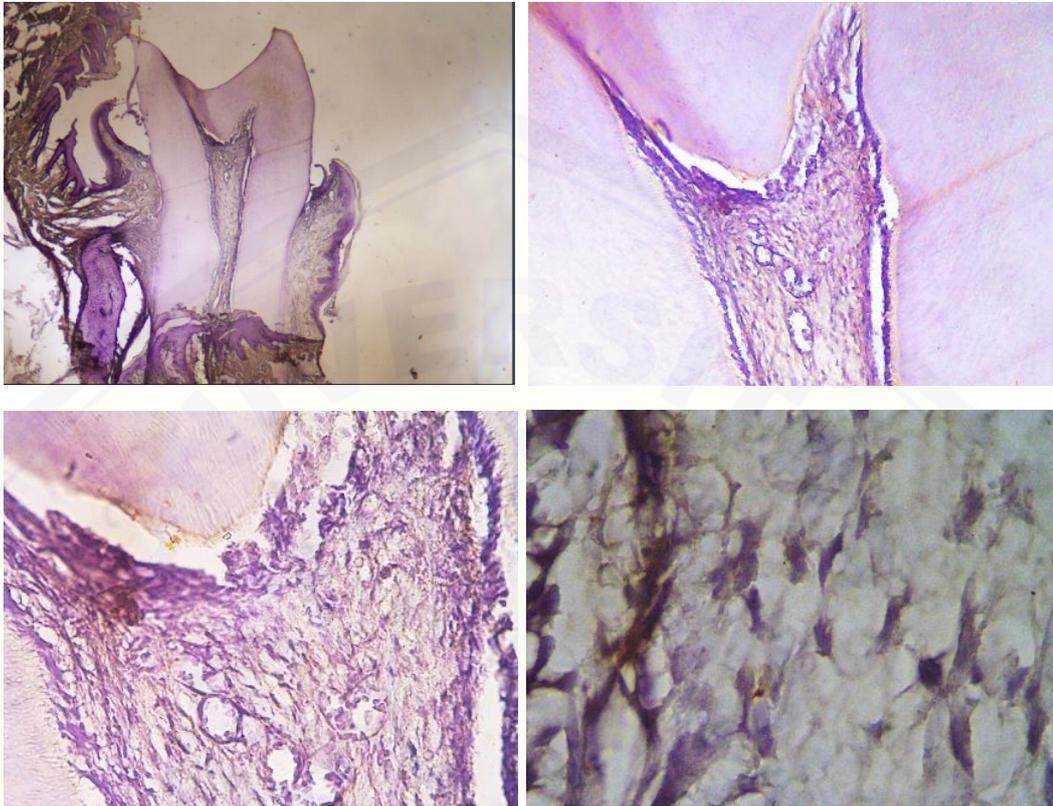


Keterangan:

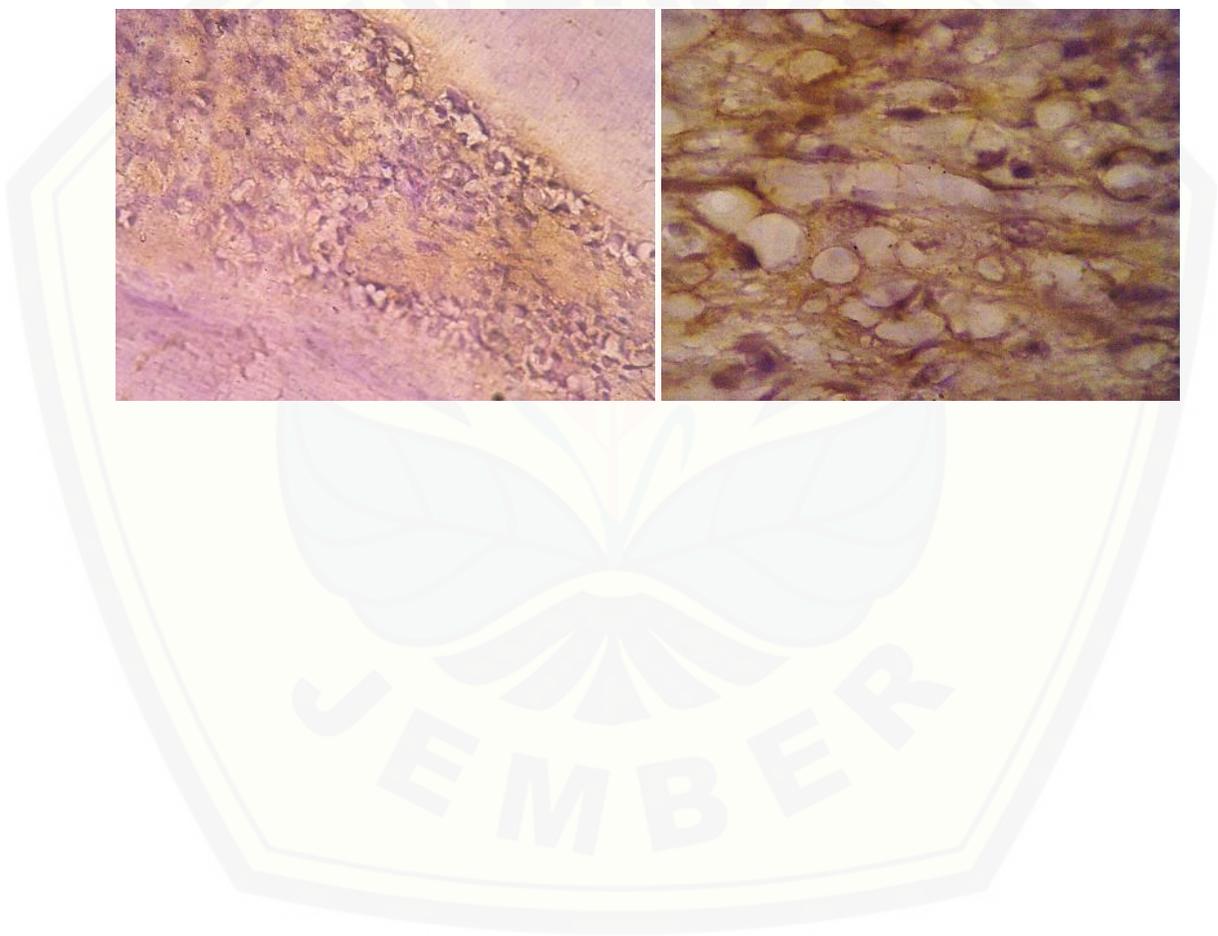
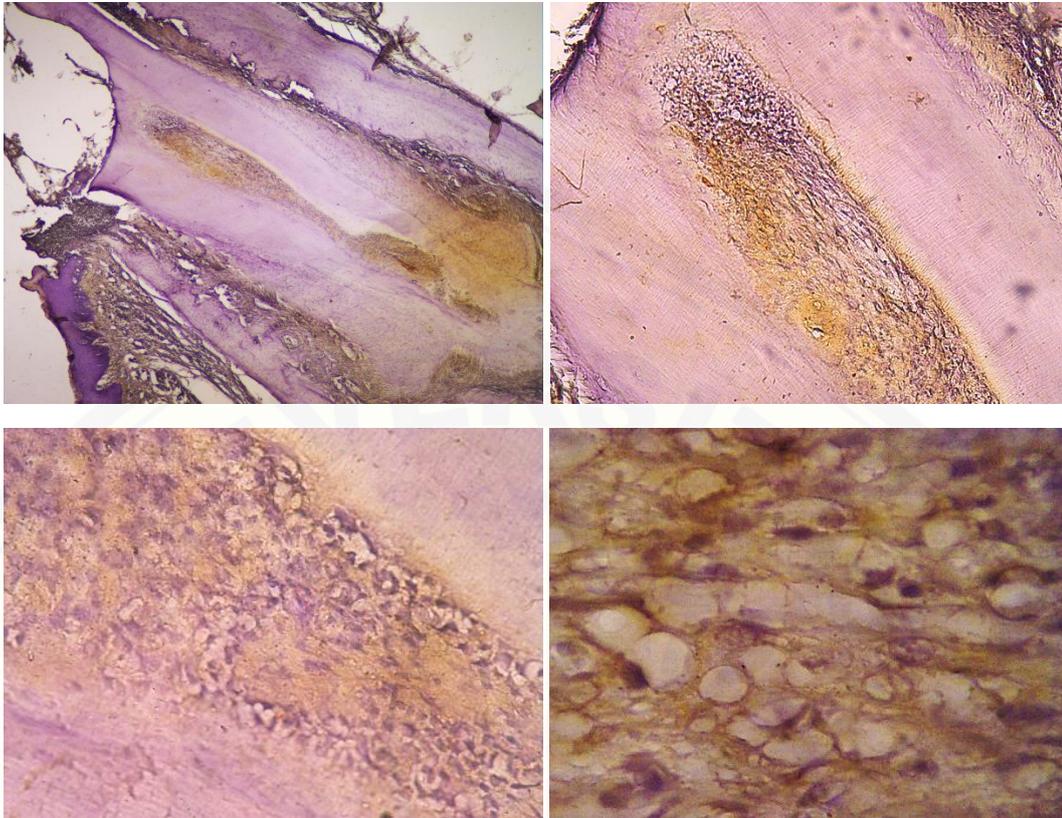
- A. Dekapitasi
- B. Persiapan jaringan
- C. Pemotongan jaringan
- D. Pewarnaan jaringan
- E. Pengamatan preparat jaringan

J. Hasil Pengamatan Histologis

Kelompok Kontrol Negatif (K1)



Kelompok Kontrol Positif (K2)



Kelompok Pasta Tulang Ikan Gurami (K3)

