



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Kampus A Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo no. 47 Surabaya 60132
Telp. (031) 5030255 Fax. (031) 5020256
Laman://www.fkg.unair.ac.id; e-mail: mail@fkg.unair.ac.id

SALINAN

KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOMOR: 577/UN3.1.2/2021

TENTANG

TUGAS MENJADI TIM PENGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SEMESTER GASAL TAHUN AJARAN 2021/2022

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA

Menimbang : a. bahwa untuk menjamin kelancaran pelaksanaan pendidikan/pengajaran pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga khususnya dalam melaksanakan kurikulum sistem kredit semester, maka perlu menugaskan tenaga pengajar untuk menguji sesuai dengan kondisi pandemi pada bidangnya masing-masing;

b. bahwa pembelajaran semester gasal secara sesuai bidangnya dilakukan sehubungan dengan adanya Surat Edaran nomor : 529/UN3/PK/2021 tanggal 28 September 2021 tentang Pelaksanaan Proses Belajar Mengajar *Blended* Dan *Hybrid* Semester Gasal 2021/2022 Di Lingkungan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Akibat Dampak Pandemi COVID-19;

c. bahwa tenaga pengajar yang namanya tersebut dalam daftar terlampir memenuhi syarat untuk menjadi penguji pada ujian Disertasi Tertutup sesuai bidangnya;

d. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a, b dan c, perlu diterbitkan Keputusan Dekan tentang Tugas Menjadi Tim Penguji Pada Ujian Disertasi Tertutup Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Semester Gasal Tahun Ajaran 2021/2022.

Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 20 tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78 Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia nomor 4301);

2. Undang - Undang nomor 14 tahun 2005 tentang Guru dan Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2005 Nomor 157 Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4586);

3. Peraturan Menteri Pendayagunaan Aparatur Negara dan Reformasi Birokrasi Nomor 17 Tahun 2013 tentang Jabatan Fungsional Dosen dan Angka Kreditnya;

4.Peraturan.....

4. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 36 tahun 2017 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor Berbasis Riset Universitas Airlangga;
5. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 39 Tahun 2017 tentang Perubahan atas Peraturan Rektor Nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga;
6. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 11/UN3/2020 tentang Pedoman Pendidikan Universitas Airlangga;
7. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 20/UN3/2020 tentang Perubahan Atas Peraturan Rektor Nomor 36/UN3/2017 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor Berbasis Riset Universitas Airlangga;
8. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 762/UN3/2020 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas dan Direktur Sekolah Pascasarjana, dan Direktur Rumah Sakit Universitas Airlangga Periode 2020 – 2025.

MEMUTUSKAN :

- Menetapkan : KEPUTUSAN DEKAN TENTANG TUGAS MENJADI TIM PENGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA SEMESTER GASAL TAHUN AJARAN 2021/2022.
- KESATU : Menugaskan kepada tenaga pengajar yang namanya tercantum dalam daftar terlampir, untuk menjadi Tim Penguji pada Ujian Disertasi Tertutup sebagaimana tersebut dalam lampiran Keputusan Dekan ini.
- KEDUA : Dalam melaksanakan tugasnya sebagai penguji tersebut bertanggung jawab kepada Dekan melalui Koordinator Program Studi.
- KETIGA : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Surabaya
pada tanggal 19 Oktober 2021
DEKAN

ttd.

AGUNG SOSIAWAN
NIP. 197112112008121003

SALINAN disampaikan Yth.

1. Koordinator Program Studi
2. Ketua Departemen
3. Ketua Bagian
4. Yang Bersangkutan

Salinan sesuai dengan aslinya
Kepala Bagian Tata Usaha,


SOETJOKO
NIP. 196402081987091001

KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA

MOR : 577/UN3.1.2/2021 TANGGAL 19 OKTOBER 2021

UNTANG : TUGAS MENJADI TIM PENGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA SEMESTER GASAL TAHUN AJARAN 2021/2022

No.	Nama Calon Doktor	Judul Disertasi	Nama Penguji		Tanggal Ujian
			Ketua	Anggota	
	Debby Saputera, drg.,Sp.Pros. NIM : 021820173001	Mekanisme Osteogenesis Setelah Pemberian Kombinasi Eilagic Acid Dan Bovine Bone Xenograft Pasca Ekstraksi Gigi (Penelitian Eksprimental Pada <i>Cavia Cobaya</i>)	Prof. Dr. David B. Kamadjaja,drg.,MDS.,Sp.BM.(K)	1. Prof. Dr. Intan Nirwana,drg.,M.Kes. 2. Dr. Michael Josef Kridanto K.,drg.,M.Kes.,Sp.Pros.(K). 3. Prof. Dr. Aulanni'am,drh., DES. 4. Prof.Dr. A. Retno Pudji Rahayu,drg.M.Kes. 5. Prof.Dr. Ida Bagus Narmada,drg.,Sp.Ort.(K) 6. Dr. Taufan Bramantoro,drg.,M.Kes.	21 Oktober 2021

Salinan sesuai dengan aslinya
Kepala Bagian Tata Usaha,



SOETJOKO
NIP. 196402081987091001

Surabaya, 19 Oktober 2021
Dekan,

ttd

AGUNG SOSIAWAN
NIP. 197112112008121003



BERITA ACARA UJIAN DISERTASI TERTUTUP

Pada hari Kamis, tanggal 21 Oktober 2021 staf pengajar Universitas Airlangga dan Universitas Brawijaya yang tercantum dalam susunan kepanitiaan seperti tersebut dibawah ini :

No	Nama	Pangkat/Jabatan	Kedudukan dalam Panitia
1.	Prof. Dr. David B. Kamadjaja, drg., MDS., Sp.BM(K)	Pembina Utama Muda (IV/c) / Guru Besar	Ketua Ujian
2.	Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes.	Pembina Utama Muda (IV/c) / Guru Besar	Anggota/ Promotor
3.	Dr. Michael Josef Kridanto K., drg., M.Kes., Sp.Prof.(K)	Pembina ((IV/a) / Lektor Kepala	Anggota/ Ko-Promotor
4.	Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.	Pembina Utama (IV/e) / Guru Besar	Anggota
5.	Prof. Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg. M.Kes.	Pembina Tk. I (IV/b) / Guru Besar	Anggota
6.	Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort.(K)	Pembina Utama Muda (IV/c) / Guru Besar	Anggota
7.	Dr. Taufan Bramantoro, drg., M.Kes.	Penata Tk.I (III/d) / Lektor Kepala	Anggota

Telah menguji ujian Disertasi Tertutup, Calon Doktor :

NAMA : Debby Saputera, drg., Sp.Prof.
N.I.M. : 021820173001
JUDUL : "Mekanisme Osteogenesis Setelah Pemberian Kombinasi Ellagic Acid Dan Bovine Bone Xenografi Pasca Ekstraksi Gigi (Penelitian Eksperimental Pada *Cavia Cobaya*)".

H a s i l : diterima:----- dengan *)
Tanpa *) perbaikan

Demikian.....


*) Coret yang tidak perlu




KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
Kampus AJL. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132
Telp.(031) 5030255 Fax. (031) 5020256
Laman://www.fkg.unair.ac.id e-mail: prodi.doktor@fkg.unair.ac.id

Demikian berita acara ini dibuat sebagai bahan pertimbangan dalam surat keputusan menguji ujian Disertasi Tertutup.

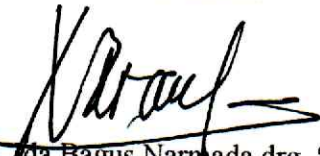
Calon Doktor yang diuji,


Debby Saputera, drg.,Sp.Pro.
NIM. 021820173001

Surabaya, 21 Oktober 2021
Ketua Penguji,


Prof. Dr. David B. K.,drg.,MDS.,Sp.BM(K)
NIP. 196502121991031003

Mengetahui,
KPS Doktor Ilmu Kedokteran Gigi


Prof. Dr. Ida Bagus Narmada,drg.,Sp.Ort.(K)
NIP. 195601071981031003

LEMBAR PENGESAHAN

**MEKANISME OSTEOGENESIS SETELAH PEMBERIAN
KOMBINASI ELLAGIC ACID DAN *BOVINE BONE*
XENOGRAFT PASCA EKSTRAKSI GIGI**

(Penelitian Eksperimental Pada *Cavia cobaya*)

DISERTASI

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan
Pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya**

Oleh :
DEBBY SAPUTERA
NIM : 021820173001

Menyetujui

Promotor

Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes
NIP. 195704301977032001

Ko Promotor

Dr. Michael Josef, drg., M.Kes, Sp.Prof (K)
NIP. 196305311989021001

**Ketua Program Studi
Doktor Ilmu Kedokteran Gigi**

Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort (K)
NIP. 195601071981031003

**MEKANISME OSTEOGENESIS SETELAH PEMBERIAN
KOMBINASI ELLAGIC ACID DAN *BOVINE BONE*
XENOGRAFT PASCA EKSTRAKSI GIGI**

(Penelitian Eksprimental Pada *Cavia cobaya*)

DISERTASI



Oleh :

DEBBY SAPUTERA

NIM : 021820173001

**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

**MEKANISME OSTEOGENESIS SETELAH PEMBERIAN
KOMBINASI ELLAGIC ACID DAN *BOVINE BONE*
XENOGRAFT PASCA EKSTRAKSI GIGI**

(Penelitian Eksprimental Pada *Cavia cobaya*)

DISERTASI



Oleh :

DEBBY SAPUTERA

NIM : 021820173001

**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2022

LEMBAR PENGESAHAN
MEKANISME OSTEOGENESIS SETELAH PEMBERIAN
KOMBINASI ELLAGIC ACID DAN *BOVINE BONE*
***XENOGRAFT* PASCA EKSTRAKSI GIGI**

(Penelitian Eksperimental Pada *Cavia cobaya*)

DISERTASI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan
Pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya

Oleh :

DEBBY SAPUTERA

NIM : 021820173001

Menyetujui

Promotor

Ko Promotor

Prof.Dr.Intan Nirwana,drg., M.Kes
NIP. 195704301977032001

Dr.Michael Josef, drg.,M.Kes,Sp.Pros (K)
NIP. 196305311989021001

Ketua Program Studi
Doktor Ilmu Kedokteran Gigi

Prof. Dr. Ida Bagus Narmada,drg.,Sp.Ort (K)
NIP. 195601071981031003

PENETAPAN PANITIA PENGUJI

PANITIA PENGUJI DISERTASI TERTUTUP

**Ketua : Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes
(Promotor)**

**Sekretaris : Dr. Michael Josef K, drg., M.Kes, Sp.Pros (K)
(Ko-Promotor)**

Anggota :

- 1. Prof. Dr. A. Retno Pudji R, drg., M.Kes, Sp.PA (K)**
- 2. Prof. Dr. David Buntoro K., drg., MDS., Sp.BMM (K)**
- 3. Dr. Taufan Bramantoro, drg., M.Kes**
- 4. Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort (K)**
- 5. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES**

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi Tertutup
Nomor : 3584/UN3.1.2/PK/2021
Tanggal : 21 Oktober 2021**

UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT yang Maha Pengasih Lagi Maha Penyayang atas semua rahmat, taufiq dan hidayahNya sehingga disertasi ini dapat saya selesaikan.

Disertasi ini dapat terselesaikan berkat bimbingan, semangat, arahan, saran dan koreksi dari Tim Promotor, oleh karena itu pada kesempatan ini perkenankan saya untuk menyampaikan rasa terimakasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Dr. Agung Sosiawan drg., M.Kes, Dekan periode 2015-2020; Prof. Dr. R. Darmawan Setijanto, drg., M.Kes, selaku Wakil Dekan I ; Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes, Sp.KG(K), Wakil dekan I periode 2015-2020; Prof. Dr. Anita Yuliati, drg., M.Kes, selaku Wakil Dekan II ; Dr. Muhammad Luthfi, drg., M.Kes, Wakil Dekan II periode 2015-2020; Dr. Agung Sosiawan, drg., M.Kes dan Andra Rizqiawan, drg., Ph.D., Sp. BMM, selaku Wakil Dekan III, Wakil Dekan III periode 2015-2020; Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes beserta seluruh jajarannya, atas kesempatan yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Doktor Universitas Airlangga pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort (K) selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor, KPS periode 2015-2020; Prof. Dr. Sri Kunarti, drg., MS., Sp.KG(K) yang telah membantu, memberikan semangat, dukungan dan arahan akademik selama mengikuti dan menyelesaikan Program Doktor Universitas Airlangga pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes, sebagai Promotor sekaligus Penasehat Akademik, yang dengan penuh pengertian, perhatian, kesabaran serta keikhlasan telah membimbing, memberikan dukungan, motivasi, arahan, meluangkan waktu untuk berdiskusi, memberikan koreksi dan masukan pada penelitian dan Disertasi ini serta memberikan wawasan yang luas kepada saya, sehingga disertasi ini dapat diselesaikan dengan baik. Kepada Beliau saya ucapkan terimakasih tidak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dr. Michael Josef K, drg., M.Kes, Sp.Pros (K), sebagai Ko-Promotor yang dengan penuh pengertian, perhatian, kesabaran dan keikhlasan telah membimbing, memberikan dukungan, semangat, meluangkan waktu untuk diskusi serta memberi

masukan dan saran pada penelitian dan Disertasi ini. Kepada Beliau saya ucapkan terima kasih tidak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dengan selesainya disertasi ini, maka saya mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada :

Ucapan terima kasih kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan, KEMRISTEKDIKTI (Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi) ID Proposal : 1ab4deec-b87a-4440-a80a-fa6770836778 atas hibah penelitian Doktorat tahun 2019 yang sangat membantu dalam biaya penelitian dan biaya jurnal terindeks scopus.

Prof. Dr. Muhammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA, selaku Rektor Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas Pendidikan yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Prof. Dr. H. Sutarto Hadi, M.Si., M.Sc selaku Rektor Universitas Lambung Mangkurat ; Prof. Dr. H. Aminuddin Prahatama Putra, M.Pd selaku Wakil Rektor I ; Dr. Ir. H. Achmad Syamsu Hidayat, M.P selaku Wakil Rektor II ; Dr. Ir. H. Muhammad Fauzi, MP selaku Wakil Rektor III ; Prof. Dr. Ir. H. Yudi Firmanul Arifin, M.Sc selaku Wakil Rektor IV beserta staf yang telah memberikan kesempatan dan dukungan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor Universitas Airlangga pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat, Dr. drg. Maharani Laillyza Apriasari, Sp.PM; Prof. Dr. drg. Rosihan Adhani, S.Sos, M.S. selaku Dekan periode 2015-2019., drg. Irham Taufiqurrahman, M.Si., Med., Sp.BMM selaku Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat., drg. Widodo, M.M., M.Kes selaku Wakil Dekan periode 2015-2019 beserta staf yang telah memberi kesempatan dan dukungan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor Universitas Airlangga pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Terima kasih yang tulus saya ucapkan kepada para dosen staf pengajar di Program Doktor Universitas Airlangga pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes., Prof. Dr. Theresia Indah Budhy S., drg., M.Kes., Prof. Dr. A.Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes., Dr. Pratiwi Soesilawati, drg., M.Kes dan segenap dosen Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu pengetahuan dasar dan terapan yang sangat berharga dan bermanfaat dalam membantu saya Menyusun Disertasi ini.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Pembimbing dan Panitia Penguji mulai dari Ujian Kualifikasi sampai Ujian Disertasi Tertutup : Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes., Dr. Michael Josef K, drg., M.Kes, Sp.Pros (K)., 1. Prof. Dr. A. Retno Pudji R, drg., M.Kes, Sp.PA (K)., 2. Prof. Dr. David Buntoro K., drg., MDS., Sp.BMM (K)., Dr. Taufan Bramantoro, drg., M.Kes., Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort (K)., penguji eksternal dari Universitas Brawijaya Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES atas waktu yang diberikan, pencerahan, masukan, saran dan bimbingan yang sangat luar biasa kepada saya sehingga Disertasi ini dapat diselesaikan.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada sejawat saya di Departemen Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat; drg. Rahmad Arifin, Sp.Pros., drg. Nida Amalia., drg. Haluanry Doane Santoso yang telah membantu dan memberikan semangat dan bantuan kerjasama serta pengertiannya selama saya melaksanakan pendidikan dan menyelesaikan Disertasi ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada teman-teman sejawat dosen Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Lambung Mangkurat drg. Dewi Puspitasari, M.Si., drg. Amy Nindia Carabelly , M.Si., drg. Bayu Indra Sukmana, M.Kes., Riky Hamdani, S.K.M., M.Epid., drg. Agung Satria Wardhana., drg. I Wayan Arya Krishnawan Firdaus, M.Kes dan teman-teman sejawat dosen yang lain yang telah membantu dan memberikan semangat kepada saya dalam menyelesaikan Disertasi ini.

Komite Kelaikan Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, atas masukan yang telah diberikan untuk terlaksananya penelitian dengan baik dan lancar.

Para staf administrasi di Tata Usaha Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, mbak Erna Rachmawati, A.Md, mbak Dian, pak Sam, pak Nurlikan yang selalu membantu saya dalam kelancaran administrasi di Pendidikan sampai selesainya Disertasi ini.

Kepada staf di Unit Hewan Coba Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Pak Heri Soemantoro, Mas Udin dan rekan-rekan atas bantuan dan waktu yang telah diberikan dalam menyelesaikan penelitian Disertasi ini. Staf di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga pak Didik dan staf yang lain, atas bantuan dan waktunya dalam menyelesaikan penelitian Disertasi ini. Mas Yoni Abdurrahman Agung, A.Md. A.K staf di Research Center Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga; pak Wibi Riawan, SSi. M.Boimed staf di Laboratorium Biokimia-Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya; pak Kusaeri staf di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga; Pak Lesmono di Bank Jaringan Dr. Soetomo; Prof. Widodo, M.Si., PhD.Med.Sc, mba Galuh dan Tim Inbio Indonesia; Tim dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada; Tim dari Laboratorium Metalurgi Institut Teknologi Sepuluh November;

atas bantuan dan waktu yang telah diberikan dalam menyelesaikan penelitian Disertasi ini

Kepada teman seperjuangan program Studi Ilmu Kedokteran Gigi jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Angkatan 2018B : drg. Widodo, M.M., M.Kes ; teman-teman angkatan 2018A serta teman-teman angkatan 2019, angkatan 2020, angkatan 2021, terima kasih atas persahabatan, kekompakan yang telah terjalin selama ini, saling memberikan semangat dan motivasi untuk lulus, sukses selalu untuk kita semua.

Hal yang paling utama, pada kesempatan ini saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang serta terima kasih yang terdalem dari lubuk hati saya kepada kedua orang tua saya, Bapak Tonny Kaswardy dan Ibu Murniasih (almarhumah) atas segala cinta kasih, doa, didikan dan teladan yang telah diberikan kepada saya, untuk Bapak Ibu tercinta penghargaan tertinggi atas pencapaian Pendidikan ini saya persembahkan. Kepada Bapak mertua saya Romeo Roghinald Mahidin (almarhum) dan Ibu Elly Kholifah, terima kasih yang tidak terhingga untuk seluruh doa Bapak Ibu, papa mama yang telah menuntun dan mendukung semua Langkah untuk mencapai hal terbaik dalam kehidupan saya.

Kepada Isteri saya, Anthea Carolina, S.Farm., Apt, terima kasih atas cinta, doa, dukungan, semangat, pengertian dan kesabaran sehingga pendidikan ini bisa terselesaikan. Kepada kedua anak saya, Keysya Rama Putera dan Audi Zohra, terima kasih atas waktu yang telah diberikan kepada papa, senantiasa memahami kesibukan papa dalam menyelesaikan Disertasi ini

Terima kasih kepada adik kandung saya drg. Roy Kurniady., MM ; adik ipar saya Puteri Cahyani, SE.,MM ; kaka ipar saya Arnold Leonardo, Amd.Kep.An, Desti H.S, Amd. Keb ; Anastacia Victoria, S.Psi serta para keponakan tercinta : Bella, Nabilla, Royan, Celine, Nana dan Yaya atas doa dan segala dukungannya. Terima kasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memberi motivasi, mendukung dan membantu kelancaran studi dan terselesaikannya Disertasi ini. Semoga bermanfaat dan memberikan sumbangsih untuk pengembangan kemajuan Ilmu Kedokteran Gigi dan bermanfaat untuk masyarakat. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat-Nya kepada semua pihak yang telah membantu.

Wassalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Penulis

ABSTRACT

OSTEOGENESIS MECHANISM AFTER COMBINATION ELLAGIC ACID AND BOVINE BONE XENOGRAFT POST DENTAL EXTRACTION

Background: Ellagic acid is a polyphenol found in pomegranates, has a stimulant of osteoblastogenesis, is osteoinductive, and has anti-inflammatory properties. Bovine bone xenograft is osteoconductive, the property of the bone graft matrix that supports the attachment of bone-forming cells. The combination of ellagic acid and bovine bone xenograft is a combination form that can provide a synergistic effect on the process of woven bone growth along with bone formation. **Objective:** The aim of this study is to investigate the mechanism of osteogenesis after a combination of ellagic acid and bovine bone xenograft post-dental extraction. **Material and Method:** Thirty-six males cavia cobaya were divided into six groups. Mandibular left incisor was extracted. K(-) group as a negative control, K(+) group as the positive control group which was applied with bovine bone xenograft and P group were applied combination of ellagic acid and bovine bone xenograft. Cavia cobaya was decapitated at 7 and 14 days after treatment and the jaw was cut for immunohistochemistry examination to observe the expression of TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phospatase*, *Osteocalcin*, and Hematoxillin Eosin examination to observe woven bone formation. Data were analyzed with a univariate test followed by post hoc-test ($P < 0.05$). **Result:** The result showed TNF- α expression decreased, the expression of IL-10, BMP-2, ALP, OCN, and woven bone formation were increased at 7th and 14th days. Path analysis correlation showed the causal relationship between ellagic acid and bovine bone xenograft affect the expression of TNF- α , IL-10, BMP-2, ALP, OCN and woven bone formation. **Conclusion:** Combination of ellagic acid and bovine bone xenograft could effectively accelerate woven bone formation post-dental extraction.

Keywords: bovine bone xenograft, ellagic acid, woven bone

ABSTRAK

MEKANISME OSTEOGENESIS SETELAH PEMBERIAN KOMBINASI ELLAGIC ACID DAN BOVINE BONE XENOGRAFT PASCA EKSTRAKSI GIGI

Latar belakang: *Ellagic acid* adalah polifenol yang ditemukan dalam buah delima, memiliki stimulan osteoblastogenesis, osteoinduktif dan memiliki sifat anti-inflamasi. *Bovine bone xenograft* bersifat osteokonduktif, sifat matriks *bone graft* yang mendukung perlekatan sel-sel pembentuk tulang. Kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* merupakan bentuk kombinasi yang dapat memberikan efek sinergis pada proses pertumbuhan *woven bone* seiring dengan pembentukan tulang. **Tujuan:** untuk mengetahui mekanisme osteogenesis setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pasca ekstraksi gigi. **Bahan dan metode:** Tiga puluh enam cavia cobaya jantan dibagi menjadi enam kelompok. Insisif kiri mandibula diekstraksi. Kelompok K(-) sebagai kontrol negatif, kelompok K(+) sebagai kelompok kontrol positif yang diberi *bovine bone xenograft* dan kelompok P yang diberi kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft*. Cavia cobaya didekapitasi pada hari ke-7 dan hari ke-14 setelah perawatan dan rahang dipotong untuk pemeriksaan imunohistokimia untuk mengamati pemeriksaan ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* dan Hematoxillin Eosin untuk mengamati pembentukan *woven bone*. Data dianalisis dengan uji univariat dilanjutkan dengan uji post hoc ($P < 0,05$). **Hasil:** menunjukkan ekspresi TNF- α menurun, ekspresi IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* dan pembentukan *woven bone* meningkat pada hari ke-7 dan ke-14. Korelasi analisis jalur menunjukkan hubungan kausalitas antara *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* mempengaruhi ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* dan pembentukan *woven bone*. **Kesimpulan:** Kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* dapat secara efektif mempercepat pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi.

Kata kunci : *bovine bone xenograft, ellagic acid, woven bone*

RINGKASAN DISERTASI

Perubahan tulang alveolar setelah ekstraksi gigi dapat mengganggu rehabilitasi prostodontik dalam menjaga dimensi *alveolar ridge*. *Alveolar Ridge Preservation* diindikasikan untuk meminimalkan hilangnya volume *ridge* yang terjadi setelah ekstraksi gigi. Salah satu cara yaitu preservasi soket untuk regenerasi tulang alveolar dan menghambat terjadinya resorpsi tulang alveolar melalui penggunaan bahan dengan augmentasi *bone graft* pada *implant placement*. Bahan *bone graft* yang ideal harus biokompatibel, memungkinkan pembentukan tulang atau penggantian tulang baru melalui proses osteokonduksi. *Bovine bone xenograft* (BBX) lebih bersifat osteokonduktif yang akan mempermudah sel tumbuh dan menyatukan fragmen tulang yang terpisah. Bahan ini telah diterapkan dalam prosedur augmentasi sinus, tersedia dalam jumlah yang dibutuhkan dan mempertahankan *volume ridge* selama penyembuhan. *Bovine bone xenograft* memiliki komposisi kimia dan geometri arsitektur yang mirip dengan tulang manusia dan dapat mendukung pembentukan tulang baru.

Penggunaan BBX banyak diaplikasikan pada kerusakan tulang alveolar namun dari beberapa studi menunjukkan penggunaan *xenograft* pada *vertical alveolar bone* memiliki sifat sangat *brittle* dan tidak cukup kuat. Oleh karena itu diperlukan suatu inovasi bahan yang merupakan stimulan osteoblastogenesis yang merangsang aktifitas *graft* untuk mempercepat pertumbuhan tulang dan sebagai anti inflamasi yang dapat menghambat resorpsi tulang. Salah satu tanaman obat yang banyak dipelajari untuk

masalah kesehatan adalah delima atau *Punica Granatum Linn* (PGL). Aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi dari delima disebabkan oleh kandungan polifenol yang sangat tinggi. Polifenol yang terkandung dalam buah delima adalah *Ellagic Acid* (EA), gallotannins, antocyanin dan lainnya. *Ellagic acid* dianggap mempunyai stimulan osteoblastogenesis, bersifat osteoinduksi dan memiliki anti inflamasi. Kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* merupakan bentuk kombinasi yang dapat memberikan efek sinergis pada proses pembentukan *woven bone* seiring dengan pembentukan tulang.

Penelitian ini merupakan penelitian experimental pada hewan coba *cavia cobaya* dengan rancangan penelitian *randomized factorial disain (true experimental design)*. Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah *cavia cobaya* jantan, usia 3-3,5 bulan, berat badan 300-375gram. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui mekanisme osteogenesis setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pasca ekstraksi gigi.

Manfaat teoritis adalah menjelaskan mekanisme osteogenesis setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi melalui ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phospatase*, *Osteocalcin* dan pembentukan *woven bone*. Manfaat praktis adalah dengan pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* diharapkan dapat mempercepat pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dalam upaya mencegah *Resorpsi Ridge Residual* dan menjaga *Alveolar Ridge Preservation*.

Tiga puluh enam *cavia cobaya* jantan dibagi menjadi enam kelompok. Gigi insisif kiri mandibula diekstraksi. Kelompok K(-) sebagai kontrol negatif, kelompok K(+) sebagai kelompok kontrol positif yang diberi *bovine bone xenograft* dan kelompok P yang diberi kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft*. Hewan coba dianestesi dengan menggunakan ketamin-xylazine dengan perbandingan dosis 0,1 ml : 0,1 ml yang dilarutkan dalam isotonic saline solution steril (0,2 ml/ 50gr bb) pada paha atas kanan. Dilakukan ekstraksi gigi insisif satu kiri rahang bawah pada *cavia cobaya* menggunakan alat modifikasi tang dan *elevator*, soket gigi diirigasi dengan cairan *aquadest sterile* untuk menghilangkan sisa debris yang tertinggal didalam soket gigi. Perlakuan dilakukan oleh orang yang *expert* dengan kriteria arah tarikan dan kekuatan sama. Trauma sekecil mungkin untuk mendapatkan homogenitas sampel. *Ellagic Acid* dan *bovine bone xenograft* dimasukkan di soket gigi hingga bagian ujung apikal gigi segera setelah dilakukan ekstraksi gigi, kemudian dijahit lukanya dengan *non resorbable suture*.

Hewan coba didekapitasi pada hari ke 7 dan 14 setelah pemberian perlakuan. Tulang rahang di daerah interdental gigi insisif rahang bawah dipotong dan dimasukkan dalam larutan fiksasi buffer formalin 10% dan *cavia cobaya* yang telah mati dikubur. Dilakukan dekalsifikasi pada jaringan dengan menggunakan EDTA 10% selama 30 hari. Proses dekalsifikasi bertujuan untuk menghilangkan garam-garam kalsium dari jaringan tulang sehingga tulang menjadi lunak, dan memudahkan dalam proses pemotongan. Alat yang digunakan untuk memotong blok paraffin adalah *rotary*

microtom. Gelas obyek disiapkan dan diberi label sesuai dengan nomor spesimen. Blok paraffin diletakkan pada *head microtom* dan diatur ketebalan yaitu 4 μ m. Untuk pemeriksaan ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phospatase*, *Osteocalcin* menggunakan pemeriksaan imunohistokimia. Untuk pemeriksaan *woven bone* menggunakan pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan HE.

Data dianalisis dengan uji univariat dilanjutkan dengan post hoc-test ($P < 0,05$). Hasil penelitian menunjukkan ekspresi TNF- α menurun, IL-10, BMP-2, *Alkaline Phospatase* dan *Osteocalcin* meningkat pada hari ke-7 dan ke-14. Analisis jalur korelasi menunjukkan hubungan kausalistik antara *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* mempengaruhi ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phospatase*, *Osteocalcin* dan pembentukan *woven bone*. Kesimpulan penelitian ini, kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* dapat secara efektif mempercepat pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi pada hari ke-7 dan hari ke-14 dalam upaya mencegah *Resorpsi Ridge Residual* dan menjaga *Alveolar Ridge Preservation*.

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	iii
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRACT.....	ix
RINGKASAN DISERTASI.....	xi
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xxii
DAFTAR GAMBAR	xxiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxv
DAFTAR SINGKATAN	xxvii
BAB I	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan.....	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
BAB II.....	8
2.1 <i>Punica Granatum Linn</i> (PGL).....	8
2.1.1 Ellagic Acid (EA).....	9
2.1.2 Peran EA pada parameter anti inflamasi.....	9
2.1.3 Peran EA dalam pembentukan tulang.....	10
2.1.4 Konsentrasi pada EA.....	11
2.2 <i>Bone Graft</i> Kedokteran Gigi	11
2.2.1 Dasar Pemikiran Untuk <i>Bone Graft</i>	11
2.2.2 Lokasi/ Indikasi Untuk <i>Bone Graft</i>	12
2.2.3 Persyaratan Ideal Untuk <i>Bone Graft</i>	13
2.2.4 Klasifikasi <i>Bone Graft</i> Berdasarkan Sumber Bahan.....	14

2.2.4.1	<i>Bovine Bone Xenograft (BBX)</i>	17
2.3	Trauma.....	18
2.3.1	Trauma Pada Gigi	18
2.3.2	Luka.....	19
2.4	Proses Penyembuhan Luka Ekstraksi Gigi.....	19
2.4.1	Koagulasi dan hemostasis	20
2.4.2	Peradangan	22
2.4.3	Fase Proliferasi.....	23
2.4.4	Modeling dan Remodeling.....	24
2.5	<i>Alveolar Ridge Preservation (ARP)</i>	25
2.5.1	Prosedur preservasi <i>ridge</i>	25
2.5.2	Indikasi dan Kontraindikasi <i>Preservasi Alveolar Ridge</i>	26
2.5.3	Alveolar Ridge Remodeling.....	27
2.5.4	Socket Healing	29
2.5.5	Rasional Ekstraksi Soket Preservasi	30
2.5.6	Fitur mikroskopis dari tulang.....	30
2.6	Mekanisme Hantaran Sinyal Pada Proses Inflamasi	31
2.6.1	DAMPs dan Proses Inflamasi	31
2.7	<i>Tool Like Receptor (TLR)</i>	33
2.7.1	Tool Like Receptor 2 (TLR2).....	34
2.8	Makrofag	34
2.9	Inflamasi (Radang).....	35
2.9.1	Aktivasi Pattern Recognition Receptors (PRRs).....	37
2.9.2	Peran PRRs: DAMPs endogen oleh TLR	38
2.9.3	Aktivasi Jalur Inflamasi	38
2.9.3.1	NF- κ B signaling pada inflamasi	38
2.9.4	Pelepasan Marker Inflamasi.....	39
2.9.5	Rekrutmen Sel Inflamasi.....	39
2.10	Pensinyalan molekuler di balik anabolisme tulang yang diinduksi polifenol	
	40	

2.10.1	Jalur respon inflamasi	42
2.10.2	Jalur pensinyalan Akt.....	42
2.10.3	Jalur pensinyalan TGF-b/BMP	43
2.11	Sitokin proinflamasi	44
2.11.1	Tumor Necrotic Factor Alpha (TNF α).....	44
2.11.1.1	Peran TNF α dalam inflamasi	44
2.11.1.2	Peran TNF α dalam Aktivasi Makrofag.....	45
2.11.2	<i>Interleukin 6</i> (IL-6)	45
2.11.2.1	Peran IL-6 dalam inflamasi.....	45
2.11.3	<i>Interleukin 1</i> (IL-1)	45
2.11.3.1	Peran IL-1 dalam inflamasi.....	46
2.12	Sitokin Anti inflamasi	46
2.12.1	<i>Interleukin 10</i> (IL-10)	46
2.12.2	Peran IL-10 dalam anti inflamasi.....	47
2.12.3	<i>Interleukin 10</i> menghambat pembentukan osteoklas	47
2.12.4	<i>Interleukin 10</i> memicu diferensiasi osteoblas	47
2.12.5	Regulasi molekular osteoblas.....	48
2.12.6	Sel Osteoprogenitor.....	48
2.13	Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2).....	49
2.13.1	Jalur smad dari BMP-2 dalam osteogenesis	50
2.13.2	Jalur Smad dari BMP 2 terhadap TNF- α	51
2.14	<i>Runt-related transcription factor 2</i> (Runx-2).....	52
2.15	<i>Extracellular Matrix</i> (ECM)	53
2.16	<i>Bone Remodeling</i>	53
2.16.1	Osteoprotogerin (OPG).....	54
2.16.2	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL).....	55
2.16.3	Receptor activator of NF- κ B (RANK).....	55
2.17	Marker untuk <i>bone formation</i>	56
2.17.1	Alkalin Phospatase (ALP).....	56
2.17.1.1	Struktur <i>Alkaline phosphatase</i>	57

2.17.1.2	Ekspresi Alkaline phosphatase.....	57
2.17.1.3	Mekanisme pensinyalan dalam mineralisasi sel tulang	58
2.17.2	<i>Osteocalcin</i> (OCN).....	58
2.17.2.1	<i>Osteocalcin dan Runt related transcription factor 2</i>	59
2.17.3	<i>Osteopontin</i> (OPN)	59
2.18	Osteoblas.....	59
2.18.1	Diferensiasi dan Fungsi Osteoblas	60
2.18.2	Regulasi Transkripsi dalam Osteoblastogenesis	62
2.18.3	Jalur Pensinyalan dalam Osteoblastogenesis	62
2.18.4	Regulasi Sitokin Osteoblastogenesis	63
2.19	Osteoklas	63
2.19.1	Jalur Sinyal dalam Diferensiasi Osteoklas	64
2.19.2	Sitokin Osteoclastogenesis.....	65
2.19.3	Sitokin Anti Osteoklastogenik	66
2.20	<i>Woven bone</i>	66
2.21	Hewan coba <i>Cavia cobaya</i>	67
2.22	Pemeriksaan Imunohistokimia	68
2.22.1	Pewarnaan Imunohistokimia	69
2.22.2	Metode perhitungan IHC.....	70
2.23	Pemeriksaan Histopatologi Anatomi (HPA)	71
2.23.1	Sistem scoring histopatologi	72
2.24	Pengukuran <i>Woven Bone</i>	72
BAB III	75
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	75
3.2	Keterangan Konsep Penelitian	76
3.3	Hipotesis.....	78
BAB IV	80
4.1	Jenis Penelitian	80
4.2	Populasi, Teknik penghitungan sampel dan Besar sampel.....	81
4.2.1	Populasi.....	81

4.2.2	Tehnik penghitungan sampel	81
4.2.3	Besar sampel	82
4.3	Pembagian kelompok penelitian	82
4.4	Variabel Penelitian	83
4.5	Definisi Operasional.....	83
4.6	Luaran Penelitian.....	85
4.7	Bahan dan Alat Penelitian	85
4.7.1	Bahan.....	85
4.7.2	Alat.....	86
4.8	Lokasi Penelitian	87
4.8.1	Lokasi.....	87
4.8.2	Waktu	87
4.9	Kerangka Operasional Penelitian	88
4.10	Prosedur penelitian	88
4.10.1	Perijinan Ethical clearance.....	88
4.10.2	Ellagic Acid.....	88
4.10.3	Bovine Bone Xenograft (BBX).....	88
4.10.4	Poly Ethylen Glycol (PEG).....	89
4.10.5	Pencampuran ellagic acid dengan <i>bovine bone xenograft</i>	89
4.11	Perlakuan Hewan Coba	89
4.11.1	Tahapan persiapan Hewan Coba.....	89
4.11.2	Tahapan perlakuan Hewan Coba	90
4.11.3	Ekstraksi gigi Hewan Coba.....	90
4.11.4	Aplikasi Ellagic Acid dan <i>bovine bone xenograft</i>	90
4.11.5	Tahap Euthanasia Hewan Coba	90
4.12	Pembuatan Preparat Histologis (HPA).....	91
4.12.1	Perendaman Jaringan dengan Larutan Phosphate Buffered Formalin ..	91
4.12.2	Perendaman larutan dekalsifikasi.....	91
4.12.3	Pemrosesan Jaringan	91
4.13	Pembuatan Preparat Imunohistokimia (IHC)	93

4.14	Cara analisis dan pengolahan data.....	94
BAB V.....		95
5.1	Hasil penelitian.....	95
5.1.1	Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia	95
5.1.1.1.2	Pemeriksaan Ekspresi IL-10	96
5.1.1.1.3	Pemeriksaan Ekspresi BMP-2.....	97
5.1.1.1.4	Pemeriksaan Ekspresi <i>Alkaline Phospatase</i>	98
5.1.1.1.5	Pemeriksaan Ekspresi <i>Osteocalcin</i>	99
5.1.2	Hasil Pemeriksaan Histopatologi.....	100
5.1.2.1	Pemeriksaan <i>Woven bone</i>	100
5.2	Analisis Hasil Penelitian	101
5.2.1	Rerata dan Standar deviasi.....	101
5.2.2	Uji Normalitas.....	108
5.2.3	Uji Homogenitas	109
5.2.4	Uji One-Way Anova	109
5.2.5	Uji <i>post Hoc</i> LSD	111
5.2.6	Hubungan antar variabel yang diteliti.....	116
5.2.7	Analisis jalur mekanisme pembentukan <i>woven bone</i> setelah pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada hari ke-7.....	116
5.2.8	Analisis jalur mekanisme pembentukan <i>woven bone</i> setelah pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada hari ke-14.....	120
BAB VI		124
6.1	Pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada pembentukan <i>woven bone</i> pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi TNF- α	124
6.2	Pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada pembentukan <i>woven bone</i> pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi IL-10	127
6.3	Pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada pembentukan <i>woven bone</i> pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi BMP-2.....	130
6.4	Pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada pembentukan <i>woven bone</i> pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi <i>Alkaline Phospatase</i>	133

6.5 Pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada pembentukan <i>woven bone</i> pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi <i>Osteocalcin</i>	136
6.6 Pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada pembentukan <i>woven bone</i> pasca ekstraksi gigi terhadap luas <i>woven bone</i>	138
6.7 Analisis jalur hubungan kausalistik, mekanisme pembentukan <i>woven bone</i> pada pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i>	141
6.7.1 Analisis jalur berdasarkan <i>literature</i>	141
6.7.2 Analisis jalur berdasarkan <i>pathway analisis</i>	155
6.8 Temuan baru.....	158
6.9 Tindak lanjut terhadap temuan	159
6.10 Keterbatasan penelitian	159
BAB VII.....	160
7.1 Kesimpulan.....	160
7.2 Saran	161
DAFTAR PUSTAKA	162
LAMPIRAN.....	191

DAFTAR TABEL

Tabel 5. 1 : Rerata Ekspresi TNF- α , IL-10 dan BMP-2.....	101
Tabel 5. 2 : Rerata Ekspresi Alkaline Phospatase, Osteocalcin dan Woven Bone	103
Tabel 5. 3 : Hasil Uji Normalitas Data <i>Shapiro-wilk</i>	108
Tabel 5. 4 : Hasil Uji Homogenitas <i>Levene Test</i>	109
Tabel 5. 5 : Hasil uji <i>One-way Anova</i> hari ke-7	110
Tabel 5. 6 : Hasil uji <i>One-Way Anova</i> hari ke-14	110
Tabel 5. 7 : Hasil Uji <i>post Hoc</i> LSD kelompok TNF- α	111
Tabel 5. 8 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok IL-10	112
Tabel 5. 9 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok BMP-2	113
Tabel 5. 10 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok <i>Alkaline Phospatase</i>	113
Tabel 5. 11 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok <i>Osteocalcin</i>	114
Tabel 5. 12 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok <i>Woven Bone</i>	115
Tabel 5. 13 : Hubungan antar variabel, nilai <i>standardized coefficient</i> dan signifikansi antar variabel pada analisis jalur mekanisme pembentukan <i>woven bone</i> setelah pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada hari ke-7	116
Tabel 5. 14 : Hubungan antar variabel, nilai <i>standardized coefficient</i> dan signifikansi antar variabel pada analisis jalur mekanisme pembentukan <i>woven bone</i> setelah pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada hari ke-14	120

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1: Punica Granatum Linn (Jorgensen and Agent, 2005)	8
Gambar 2. 2 : Struktur Ellagic Acid (Liu <i>et al.</i> 2015)	9
Gambar 2. 3 : Setelah ekstraksi, <i>bone loss</i> bisa mencapai 60 persen dari tinggi dan lebar asli dari <i>alveolar ridge</i> (Dentclinic 2016)	12
Gambar 2. 4 : Penempatan blok tulang autogen diambil dari daerah dagu.....	16
Gambar 2. 5 : Protokol klinis untuk pemasangan foundation, sebuah <i>bovine bone xenograft</i> berbasis kolagen (Dentclinic 2016).....	16
Gambar 2. 6 : Peristiwa biologis yang terjadi di soket setelah pencabutan gigi dijelaskan ke dalam urutan empat fase tergantung waktu (Gomes <i>et al.</i> 2019).....	20
Gambar 2. 7 : Resorpsi tulang terjadi dalam 2 fase (Pagni <i>et al.</i> 2012).....	28
Gambar 2. 8 : Hantaran sinyal pada proses pelepasan sitokin proinflamasi ketika makrofag terinduksi oleh DAMPs (Mueller 2013)	33
Gambar 2. 9 : Sifat anti-inflamasi polifenol dalam mengontrol resorpsi tulang. Aktivasi NF- κ B yang diinduksi inflamasi dihambat oleh polifenol, yang efektif dalam memicu apoptosis osteoklas dan menghambat diferensiasi osteoklas (Torre 2017).....	42
Gambar 2. 10 : Polifenol melawan <i>bone disease</i> juga melalui pensinyalan BMP. BMP-2, BMP-6 dan BMP-7 diinduksi oleh polifenol untuk mengaktifkan kaskade SMAD dan dengan mengekspresikan gen osteoblastik yang penting dalam diferensiasi dan fungsi osteoblas (Torre 2017).....	44
Gambar 2. 11 : Skematis dari berbagai penanda tulang (Markus 2006).....	54
Gambar 2. 12 : Mekanisme pensinyalan utama untuk mineralisasi tulang yang menginduksi ekspresi ALP (Vimalraj 2020)	58
Gambar 2. 13 : Representasi skema diferensiasi osteoblas (OB) (Amarasekara <i>et al.</i> 2021). 60	
Gambar 2. 14 : Representasi skematis dari diferensiasi dan aktivasi OC (Amarasekara <i>et al.</i> 2021).....	64
Gambar 2. 15 : Diagram skematik teknik imunohistokimia (Schacht and Kern 2015)	69
Gambar 2. 16 : Sistem skor histopatologi Lane dan Shandu modifikasi oleh Heiple (Ferdiansyah Mahyudin and Fedik Abdul Rantam 2011).....	72
Gambar 2. 17 : Pengukuran <i>woven bone</i> 1.....	73

Gambar 2. 18 : Pengukuran <i>woven bone</i> 2.....	73
Gambar 2. 19 : Pengukuran <i>woven bone</i> 3.....	74
Gambar 3. 1: Kerangka Konsep Penelitian.....	75
Gambar 4. 1 : Rancangan Penelitian.....	80
Gambar 4. 2 : Kerangka Operasional Penelitian.....	88
Gambar 5. 1 : Ekspresi TNF- α pada pembesaran 1000x	95
Gambar 5. 2 : Ekspresi IL-10 pada pembesaran 1000x	96
Gambar 5. 3 : Ekspresi BMP-2 pada pembesaran 1000x.....	97
Gambar 5. 4 : Ekspresi <i>Alkaline Phospatase</i> pada pembesaran 1000x.....	98
Gambar 5. 5 : Ekspresi <i>Osteocalcin</i> pada pembesaran 1000x	99
Gambar 5. 6 : <i>Woven bone</i> pada pembesaran 1000x	100
Gambar 5. 7 : Diagram batang rerata Ekspresi TNF- α	104
Gambar 5. 8 : Diagram batang rerata Ekspresi IL-10	105
Gambar 5. 9 : Diagram batang rerata Ekspresi BMP-2	105
Gambar 5. 10 : Diagram batang rerata Ekspresi <i>Alkaline Phospatase</i>	106
Gambar 5. 11 : Diagram batang rerata Ekspresi <i>Osteocalcin</i>	107
Gambar 5. 12 : Diagram batang rerata <i>Woven bone</i>	107
Gambar 5. 13 : Analisis jalur pembentukan <i>woven bone</i> setelah pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada hari ke-7	118
Gambar 5. 14 : Analisis jalur pembentukan <i>woven bone</i> setelah pemberian kombinasi <i>ellagic acid</i> dan <i>bovine bone xenograft</i> pada hari ke-14	121

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Sertifikat Laik Etik	191
Lampiran 2 : Certificate Of Analysis Ellagic Acid.....	192
Lampiran 3 : Bovine Bone Xenograft.....	192
Lampiran 4 : Permohonan Ijin Penelitian	193
Lampiran 5 : Permohonan Ijin Penelitian Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga	194
Lampiran 6 : Permohonan Ijin Penelitian ke Research Center Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga	195
Lampiran 7 : Permohonan Ijin Penelitian ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya	196
Lampiran 8 : Prosedur Penelitian.....	197
Lampiran 9 : Hasil pemeriksaan IHC TNF-a pembesaran 100x, 400x, 1000x.....	207
Lampiran 10 : Hasil pemeriksaan IHC IL-10 pembesaran 100x, 400x, 1000x	208
Lampiran 11 : Hasil pemeriksaan IHC BMP-2 pembesaran 100x, 400x, 1000x.....	209
Lampiran 12 : Hasil pemeriksaan IHC ALP pembesaran 100x, 400x, 1000x	210
Lampiran 13 : Hasil pemeriksaan IHC OCN pembesaran 100x, 400x, 1000x	211
Lampiran 14 : Hasil pemeriksaan HE <i>Woven bone</i> pembesaran 400x, 1000x	212
Lampiran 15 : Analisis deskriptif TNF- α	213
Lampiran 16 : Analisis deskriptif IL-10	216
Lampiran 17 : Analisis deskriptif BMP-2.....	219
Lampiran 18 : Analisis deskriptif <i>Alkaline Phospatase</i>	222
Lampiran 19 : Analisis deskriptif <i>Osteocalcin</i>	225
Lampiran 20 : Analisis deskriptif <i>Woven Bone</i>	228
Lampiran 21 : Hasil Uji Normalitas TNF- α	231
Lampiran 22 : Hasil Uji Normalitas IL-10.....	231
Lampiran 23 : Hasil Uji Normalitas BMP-2.....	232
Lampiran 24 : Hasil Uji Normalitas <i>Alkaline Phospatase</i>	232
Lampiran 25 : Hasil Uji Normalitas <i>Osteocalcin</i>	233
Lampiran 26 : Hasil Uji Normalitas <i>Woven Bone</i>	233

Lampiran 27 : Hasil Uji Homogenitas	234
Lampiran 28 : Hasil Uji One-Way Anova hari ke-7	235
Lampiran 29 : Hasil Uji One-Way Anova hari ke-14	236
Lampiran 30 : Hasil Uji LSD	237
Lampiran 31 : Nilai Mean dan Standar Deviasi	243
Lampiran 32 : Regresi Linear TNF-a terhadap variabel bebas hari ke-7	244
Lampiran 33 : Regresi Linear BMP-2 terhadap variabel bebas hari ke-7	245
Lampiran 34 : Regresi Linear IL-10 terhadap variabel bebas hari ke-7	246
Lampiran 35 : Regresi Linear BMP-2 terhadap TNF- α , IL-10 pada hari ke-7	247
Lampiran 36 : Regresi Linear ALP terhadap TNF- α , IL-10 dan BMP-2 pada hari ke-7	248
Lampiran 37: Regresi Linear OCN terhadap TNF- α , IL-10 dan BMP-2 pada hari ke-7	249
Lampiran 38 : Regresi Linear woven bone terhadap ALP dan OCN pada hari ke-7	250
Lampiran 39 : Regresi Linear TNF-a terhadap variabel bebas hari ke-14	251
Lampiran 40 : Regresi Linear BMP-2 terhadap variabel bebas hari ke-14	252
Lampiran 41 : Regresi Linear IL-10 terhadap variabel bebas hari ke-14	253
Lampiran 42 : Regresi Linear BMP-2 terhadap TNF- α , IL-10 pada hari ke-14	254
Lampiran 43 : Regresi Linear ALP terhadap TNF- α , IL-10 dan BMP-2 pada hari ke-14	255
Lampiran 44 : Regresi Linear OCN terhadap TNF- α , IL-10 dan BMP-2 pada hari ke-14	256
Lampiran 45 : Regresi Linear woven bone terhadap ALP dan OCN pada hari ke-14	257
Lampiran 46 : SEA Target protein target EA	258
Lampiran 47 : Publikasi Internasional	259

DAFTAR SINGKATAN

AATB	: <i>The American Association of Tissue Bank</i>
ADAM	: <i>A Disintegrin and Metalloprotease Domain</i>
PKB/AKT	: <i>Protein kinase B</i>
ALP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
APASTB	: <i>Asia Pacific Association of Surgical Tissue Bank</i>
AP-1	: <i>Activating Protein-1</i>
ARP	: <i>Alveolar Ridge Preservation</i>
ATP	: <i>Adenosine triphosphate</i>
BBX	: <i>Bovine Bone Xenograft</i>
BGLAP	: <i>Bone Gamma-carboxyglutamic Acid containing Protein</i>
BMP	: <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMPRs	: <i>Reseptors BMP</i>
BMP-2	: <i>Bone Morphogenetic Protein-2</i>
BMPs	: <i>Bone morphogenetic proteins</i>
BMS	: <i>Bone Substitute Material</i>
BMU	: <i>Basic Multicellular Unit</i>
BSP	: <i>Bone Sialo Protein</i>
BTM	: <i>Bone Turnover Marker</i>
BW	: <i>Betweenness Centrality</i>
CIA	: <i>Collagen Induced Arthritis</i>
COX-2	: <i>Cyclooxygenase</i>
CSF-1	: <i>Colony Stimulating Factor-1</i>
DAMPs	: <i>Damage Associated Molecule Patterns</i>
DC	: <i>Dendritic Cell</i>

DFDBBX	: <i>Demineralized Freeze Dried Bovine Bone Xenograft</i>
EA	: <i>Ellagic Acid</i>
EATB	: <i>European Association of Tissue Bank</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ETs	: <i>Ellagitannins</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGF-2	: <i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
GBR	: <i>Guided Bone Regeneration</i>
GM-CSF	: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
Gprc6a	: <i>G Protein Coupled Receptor</i>
HA	: <i>Hidroksiapatit</i>
hBMSC	: <i>human bone marrow mesenchymal stem cells</i>
HE	: <i>Hematoxilen-Eosin</i>
HS	: <i>Heat Shock</i>
HSCs	: <i>Hemaphoitic stem cells</i>
HMGb1	: <i>High-Mobility Group box 1</i>
HSPs	: <i>Heat Shock Proteins</i>
IGFs	: <i>Insulin like Growth Factors</i>
IHC	: <i>Imunohistochemistry</i>
IKK	: <i>Ikb kinase</i>
IL-1	: <i>Interleukin-1</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IL-1 β	: <i>Interleukin-1 beta</i>
iNOS	: <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>

IRAK-1	: <i>IL-1 receptor-associated kinases 1</i>
IRAK-4	: <i>IL-1-receptor associated kinase 4</i>
JAK	: <i>Janus kinase</i>
JNK	: <i>C-Jun N-terminal kinase</i>
LPS	: <i>lipopolysaccharide</i>
M1	: <i>Macrophage 1</i>
M2	: <i>Macrophage 2</i>
MAPK	: <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MyD88	: <i>Myeloid Differentiation primary response 88</i>
mRNA	: <i>messenger-RNA</i>
NF- κ B	: <i>Nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells</i>
NFAT	: <i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
Ni	: <i>Nicotine</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
ODAR	: <i>Osteoclast Differentiation and Activation Receptors</i>
ODF	: <i>Osteoclast Differentiation Factor</i>
OPG	: <i>Osteoprotegerin</i>
OPGL	: <i>Osteoprotegerin Ligand</i>
OPN	: <i>Osteopontin</i>
OSC	: <i>Osteocalcin</i>
OSx	: <i>Osterix</i>
PAMPs	: <i>Pathogen Associated Molecule Pattern</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin</i>
PGL	: <i>Punica Granatum Linn</i>

PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
RAGE	: <i>Receptor Advanced Glycation End products</i>
RANK	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RRR	: <i>Resorbsi Ridge Residual</i>
RSV	: <i>Rosuvastatin</i>
Runx2	: <i>Runt-related Transcription Factor 2</i>
SEA	: <i>Similarity Ensemble Approach</i>
SMAD	: <i>Small mother against decapentaplegic</i>
STAT	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAK1	: <i>TGF-β-associated kinase 1</i>
TCP	: <i>Tricalcium Fosfat</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor Betha</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
TLR-2	: <i>Toll Like Receptor -2</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TNFR-I	: <i>TNF-α Reseptor I</i>
TNFSF11	: <i>Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily member 11</i>
TRAF 6	: <i>TNF receptor associated factor 6</i>
TRANCE	: <i>TNF-Related Activation Induced Cytokine</i>
TRANCER	: <i>TNF-Related Activation Induced Cytokine Receptor</i>
TREM	: <i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Pencegahan atrofi tulang setelah ekstraksi gigi menjadi hal yang sangat perlu untuk dibahas dan sangat berkaitan dengan penempatan *dental implant*. Tingkat resorpsi tulang setelah ekstraksi gigi secara signifikan mempengaruhi penempatan implan (Kasat *and* Ladda 2012). Saat ini, mayoritas (48,2% implan) untuk perawatan *full edentulous*, diikuti oleh *partial edentulous* (23,2% implan) (Bural *et al.* 2013). Sebelum awal tahun 2000, tingkat pemasangan implan telah meningkat menjadi lebih dari 1 juta per tahun (Bornstein *et al.* 2008).

Resorpsi Ridge Residual (RRR) dimulai segera setelah ekstraksi dan dapat mengakibatkan resorpsi hingga 50% bahkan dalam 3 bulan resorpsi tersebut akan berlanjut. Pasca ekstraksi gigi resorpsi *alveolar ridge* berdampak pada penempatan *dental implant* karena volume *alveolar* vertikal dan horizontal yang memadai idealnya sesuai di tempat insersi (Horváth *et al.* 2013). Tulang *alveolar* dipertahankan sebaik mungkin untuk stabilitas, posisi yang benar secara prostetik dan keberhasilan fungsional jangka panjang dari perawatan implantologis (Schnutenhaus *et al.* 2017). Berbagai upaya sudah dilakukan oleh peneliti dan praktisi dalam mengurangi resorpsi *alveolar ridge* (Pagni *et al.* 2012).

Perubahan tulang alveolar setelah ekstraksi gigi dapat mengganggu rehabilitasi prostodontik dalam menjaga dimensi *alveolar ridge* (Ma *et al.* 2017). *Alveolar Ridge Preservation* diindikasikan untuk meminimalkan hilangnya volume *ridge* yang terjadi setelah ekstraksi gigi (Avila-Ortiz *et al.* 2014). Salah satu cara yaitu preservasi soket untuk regenerasi tulang alveolar dan menghambat terjadinya resorpsi tulang *alveolar* melalui penggunaan bahan dengan augmentasi *bone graft* pada *implant placement* (Steigmann 2008).

Bahan *bone graft* yang ideal harus biokompatibel, memungkinkan pembentukan tulang atau penggantian tulang baru melalui proses osteokonduksi (Uzbek *et al.*, 2014). *Bovine bone xenograft* (BBX) lebih bersifat osteokonduktif yang akan mempermudah sel tumbuh dan menyatukan fragmen tulang yang terpisah (Purnomo *et al.* 2012). Bahan ini telah diterapkan dalam prosedur augmentasi sinus, tersedia dalam jumlah yang dibutuhkan dan mempertahankan volume *ridge* selama penyembuhan. *Bovine bone xenograft* memiliki komposisi kimia dan geometri arsitektur yang mirip dengan tulang manusia dan dapat mendukung pembentukan tulang baru, dianggap sebagai bahan *graft* osteokompatibel dan sebagai *bone formation* (Uzbek *et al.* 2014).

Penggunaan BBX banyak diaplikasikan pada kerusakan tulang *alveolar* namun dari beberapa studi menunjukkan penggunaan *xenograft* pada *vertical alveolar bone* memiliki sifat sangat *brittle* dan tidak cukup kuat (Sheikh, Sima and Glogauer, 2015). Dari penelitian Baharuddin bahwa *Demineralized freeze dried bovine bone xenograft* (DFDBBX) tidak efektif dalam meminimalkan kedalaman poket periodontal. *Bovine bone xenograft* lebih cepat terjadi *bone healing* daripada *xenograft hydroxyapatite bovine*, *allograft freeze-dried* dan *xenograft freeze-dried cortical bovine* pada proses *bone healing* pada kelinci putih di Selandia Baru (Ferdiansyah, Utomo and Suroto, 2018). Oleh karena itu diperlukan suatu inovasi bahan yang merupakan stimulan osteoblastogenesis yang merangsang aktifitas *graft* untuk mempercepat pertumbuhan tulang dan sebagai anti inflamasi yang dapat menghambat resorpsi tulang (Torre 2017).

Salah satu tanaman obat yang banyak dipelajari untuk masalah kesehatan adalah delima atau *Punica Granatum Linn* (PGL) (No *et al.* 2017). Aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi dari delima disebabkan oleh kandungan polifenol yang sangat tinggi. Polifenol yang terkandung dalam buah delima adalah *Ellagic Acid* (EA), *gallotannins*, *antocyanin* dan lainnya (Madrigal-Carballo *et al.* 2009). *Ellagic acid* dianggap mempunyai stimulan osteoblastogenesis, bersifat osteoinduksi dan memiliki anti inflamasi (Torre, 2017).

Penelitian sebelumnya bahwa EA memiliki potensi anti inflamasi (BenSaad *et al.* 2017). *Ellagic acid* efektif melawan inflamasi kombinasi dengan adjuvant anestesi (Corbett *et al.* 2010). Pemberian topical salep EA selama 14 hari mampu memperbaiki kondisi kulit dan meningkatkan penyembuhan luka (Primarizky, Yuniarti and Lukiswanto, 2018). *Treatment* EA telah menginduksi deposisi tulang trabekuler, menghasilkan matriks tulang yang lebih terorganisir pada hari ke 14, 21, dan 28 pasca ekstraksi gigi. Efek EA pada *alveolar bone* hari ke 14 menunjukkan bahwa pembentukan tulang sangat meningkat dikombinasikan dengan Rosuvastatin (RSV) pada soket gigi tikus diabetes pasca ekstraksi gigi (Al-obaidi *et al.* 2014a).

Fase awal setelah ekstraksi gigi menyebabkan stress mekanis yang diterima fibroblas ligament periodontal. Fibroblas ligament periodontal mengalami kerusakan sehingga *Damage Associated Molecule Patterns* (DAMPs) kemudian ditangkap oleh *Toll Like Receptor -2* (TLR-2) (Weiss and Schaible, 2015). *Signaling pathway* dari komponen botani ditandai dengan signaling TLR-2 (Pugh *et al.* 2008) kemudian membentuk kompleks sinyaling mengaktifasi faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa β* (NF- κ) yang akan menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi seperti *Interleukin-1* (IL-1), *Interleukin 6* (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) (Anders and Schaefer, 2014).

Sitokin proinflamasi IL-1 menyebabkan resorpsi tulang terus berlangsung. *Interleukin-1* upregulasi ekspresi *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (RANKL) pada osteoblas dan berikatan dengan *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B* (RANK) (Belibasakis *et al.* 2007). *Interleukin 6* diproduksi secara cepat dan sementara sebagai respons terhadap infeksi dan cedera jaringan (Tanaka *et al.* 2014). *Tumor Necrosis Factor- α* adalah agen proinflamasi yang kuat yang mengatur banyak sisi fungsi makrofag. Tikus yang diinduksi *Nicotine* (Ni) yang diberikan dengan senyawa EA menurunkan konsentrasi sitokin proinflamasi (TNF α), *Interleukin-1 beta* (IL-1 β) dan IL-6 pada hari ke 14 dan 28 secara signifikan bila dibandingkan dengan tikus yang hanya diinduksi Ni (M. Jamil Al-Obaidi *et al.* 2016).

Sel makrofag mengaktifkan beberapa sitokin proinflamasi juga melepas *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Vascular Endothelial Growth Factor-A* (VEGF-A) dan *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) (Krzyszczyk *et al.* 2018). *Vascular endothelial growth factor-A* adalah salah satu faktor pertumbuhan paling penting untuk regulasi perkembangan vaskular dan angiogenesis. *Vascular endothelial growth factor-A* pada periosteum meningkat hari ke 1 sampai hari ke 10. *Vascular Endothelial Growth Factor-A* mempengaruhi pembentukan *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2), membentuk lebih banyak tulang secara signifikan pada minggu ke 4 (Samee *et al.* 2008). Keterlibatan pensinyalan BMP menunjukkan peningkatan pertumbuhan tulang baru melalui peningkatan aktivitas BMP-2 dan ekspresi messenger-RNA dari real-time PCR analyses (*Real-time* PCR verification dari ekspresi genes of caveolin-1, ATF-3, calcitonin and Sost (sclerostin) pada tulang) dan ekspresi protein BMP-2 (J. Zhang *et al.* 2012). Penggunaan BMP-2 telah dilakukan pada kasus-kasus tertentu, namun pada bidang kedokteran gigi seperti terapi periodontal, *implant placement*, ekstraksi gigi sampai saat ini jarang dilakukan sehingga perlu dikembangkan bahan alami yang dapat meningkatkan ekspresi BMP-2 (Torre 2017).

Terdapat sitokin lain yaitu *Interleukin 10* (IL-10) merupakan sitokin kuat anti-inflamasi yang berperan penting dalam mencegah patologi inflamasi dan autoimun (Iyer and Cheng 2012). *Interleukin-10* dapat merangsang pembentukan pre-osteoblas yang akan berdiferensiasi menjadi sel osteoblas melalui regulasi oleh gen *Runt-related Transcription Factor 2* (Runx2) (Bruderer *et al.* 2014). *Runt-related Transcription Factor 2* adalah faktor transkripsi kunci yang terkait dengan diferensiasi osteoblas. Peningkatan IL-10 dapat menyebabkan peningkatan *Osteoprotegerin* (OPG) dan peningkatan ekspresi RANKL yang diproduksi oleh sel osteoblas. *Osteoprotegerin* berfungsi untuk mencegah RANKL berikatan dengan RANK sehingga resorpsi tulang terhambat dan aposisi tulang *alveolar* meningkat (W. Zhang *et al.* 2016).

Sel osteoblas yang terbentuk dari osteoprogenitor akan mengekspresikan *Alkaline Phosphatase* (ALP), memproduksi protein kolagen terutama kolagen tipe I dan protein non-kolagen, seperti, *Osteocalcin* (OSC) dan *Osteopontin* (OPN) (Luvizuto *et al.* 2010, Thomas *and* Thomas, 2017). Tingkat ekspresi ALP kuat pada kelompok yang dirawat EA terhadap kelompok diabetes pada hari 28 (Al-obaidi *et al.* 2014a). Ekspresi OSC dan OPN tinggi pada sel-sel osteoblas, osteosit, dan lapisan tulang, pada hari ke 14 dan 21 pasca operasi pada kelompok yang dirawat EA (Al-Obaidi *et al.* 2014). Ekspresi ALP dan OSC lebih kuat pada tikus yang diinduksi Ni yang diobati dengan EA pada hari ke 14 dan 28 (M. Jamil Al-Obaidi *et al.* 2016). Penting untuk mempertimbangkan kekhasan proses penyembuhan *alveolar*, yang ditreatment oleh EA, terutama untuk lebih memahami pembentukan jaringan tulang pada fase awal melalui pembentukan *woven bone*.

Dalam menghasilkan bahan yang dapat menunjang regenerasi jaringan tulang, kombinasi dua bahan yang sinergis diperlukan sehingga memberi fungsi optimal. Kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* merupakan bentuk kombinasi yang dapat memberikan efek sinergis pada proses pembentukan *woven bone*. *Bovine bone xenograft* bersifat osteokonduksi, sifat dari matriks *bone graft* yang menunjang perlekatan sel pembentuk tulang (Uzbek *et al.* 2014) sedangkan *ellagic acid* bersifat osteoinduksi yaitu sifat bahan yang menstimulasi diferensiasi sel osteoprogenitor menjadi sel osteoblas (Torre 2017).

Pemberian kombinasi *ellagic acid* dengan *bovine bone xenograft* pada luka pasca ekstraksi gigi belum pernah dilakukan dan mekanismenya masih belum dapat dijelaskan sehingga diharapkan dapat mempercepat proses pembentukan *woven bone*.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana mekanisme osteogenesis setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pasca ekstraksi gigi

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan mekanisme osteogenesis setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pasca ekstraksi gigi

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan penurunan ekspresi TNF- α pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
2. Membuktikan peningkatan ekspresi IL-10 pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
3. Membuktikan peningkatan ekspresi BMP-2 pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
4. Membuktikan peningkatan ekspresi *Alkaline Phosphatase* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
5. Membuktikan peningkatan ekspresi *Osteocalcin* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
6. Membuktikan peningkatan *woven bone* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
7. Membuktikan adanya hubungan antara ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* dan *woven bone* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14

1.4 Manfaat Penelitian

Diharapkan penelitian ini dapat digunakan:

1. Manfaat Teoritis :

Menjelaskan mekanisme osteogenesis setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi melalui ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* dan *woven bone*.

2. Manfaat Praktis :

Pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* diharapkan dapat mempercepat pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dalam upaya mencegah *Resorpsi Ridge Residual* dan menjaga *Alveolar Ridge Preservation*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Punica Granatum Linn (PGL)*

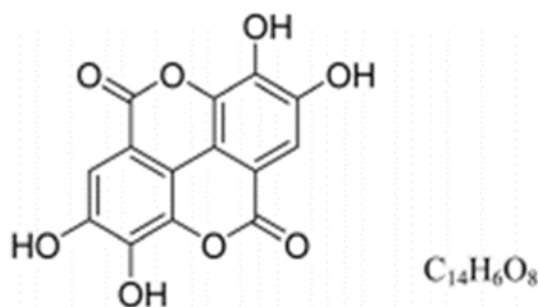
Delima (*Punica granatum*) adalah semak daun sulung yang berbuah di *Lythraceae family* yang tumbuh setinggi antara 5 dan 10 m (16 dan 33 kaki) (Phillips *et al.* 2010). Buah ini biasanya musim di belahan bumi utara dari September hingga Februari. Delima berasal dari wilayah yang membentang dari Iran hingga India utara (Holland *et al.* 2009). Polifenol yang terkandung dalam buah delima adalah Ellagic Acid (EA), gallotannins, antocyanin dan lainnya (Madrigal-Carballo *et al.* 2009). Ellagic Acid, anggota flavonoid (C₁₄H₆O₈; MW: 302.202; 3,7,8-tetrahydroxy-benzopyrano [5,4,3-cde] benzopyran-5,10-dione), biasanya diproduksi oleh tanaman dan dibentuk sebagai tanin, yang dikenal sebagai Ellagitannins (Al-Obaidi *et al.* 2014). Ellagic acid berisi dua kelompok lakton dan empat kelompok hidroksil, di mana kelompok hidroksil diketahui meningkatkan aktivitas antioksidan dalam peroksidasi lipid dan melindungi sel dari kerusakan oksidatif (Pari and Sivasankari, 2008). Dalam beberapa tahun terakhir, penggunaan terapi zat-zat non-obat seperti makanan herbal dan obat-obatan semakin meningkat. Dari zat-zat ini, pomegranate merupakan buah yang sangat khas, telah disarankan untuk pengobatan beberapa penyakit yang berbeda (Sheets, Bois and Williamson, 2013).



Gambar 2. 1: *Punica Granatum Linn* (Jorgensen and Agent, 2005)

2.1.1 Ellagic Acid (EA)

Ellagic Acid (EA) adalah salah satu molekul biologis yang ditemukan di delima dan memiliki terapi potensial dalam banyak penyakit. Ellagic Acid telah terdeteksi tidak hanya pada buah delima tetapi juga secara luas berbagai buah-buahan dan kacang-kacangan seperti raspberry, stroberi, walnut, anggur dan blackcurrant, dan menjadi suplemen makanan yang semakin populer selama beberapa tahun terakhir. Mirip dengan yang lain ellagitannins (ETs), EA cukup stabil dalam kondisi fisiologis di lambung. Ellagic acid dan ET sebagai agen aktif menginduksi vasorelaksasi, radikal bebas, hipolipidemik, antiinflamasi dan anti-karsinogenik (Usta *et al.* 2013). Ellagic acid sebagai komponen polifenol alami, ada banyak di berbagai jenis buah, kacang dan juga merupakan salah satu komponen dominan dalam buah delima (Liu *et al.* 2015).



Gambar 2. 2 : Struktur Ellagic Acid (Liu *et al.* 2015)

2.1.2 Peran EA pada parameter anti inflamasi

Ellagic acid sebagai anti-inflamasi mampu menghambat produksi NO, PGE₂, dan IL-6 pada makrofag RAW267,4 yang diinduksi LPS (BenSaad *et al.* 2017). *Ellagic acid* adalah inhibitor Cyclooxygenase (COX-2), merupakan anti inflamasi yang kuat dan agen anti-nosiseptif yang diamati melalui penghambatan siklooksigenase (Banihani *et al.* 2015). *Ellagic acid* memberikan perbaikan yang signifikan pada *gingival oxidative stress* dan *inflammatory markers* dan *alveolar bone resorption* dalam proses perbaikan yang terkait dengan periodontitis eksperimental (ÖNGÖZ DEDE *et al.* 2021). *Ellagic acid* sebagai anti-inflamasi memiliki kemampuan

menurunkan regulasi diinduksi *nitric oxide synthase* (iNOS), *cyclooxygenase* (COX-2), TNF- α , dan IL-6 dengan menekan NF κ B karsinogenesis pada tikus (Umesalma and Sudhandiran 2010).

2.1.3 Peran EA sebagai stimulan osteoblas

Ellagic acid adalah polifenol yang dilaporkan memiliki sifat antikanker, antioksidan dan anti-inflamasi. Penelitian ini menunjukkan bahwa EA menghambat diferensiasi osteoklas yang diinduksi RANKL dalam murine makrofag RAW264.7 in vitro dan CD14 manusia monosit ex vivo. *Ellagic acid* menghambat osteoklastogenesis dengan menekan jalur pensinyalan p38 hilir RANKL dan memberikan efek penghambatan pada resorpsi tulang dan pembentukan cincin aktin (Rantlha *et al.* 2017). *Ellagic acid* meningkatkan aktivitas *alkaline hospatase* dan mineralisasi. Selain itu, *ellagic acid* memulihkan diferensiasi osteoblas yang diinduksi lipopolisakarida. Hasil ini menunjukkan bahwa *ellagic acid* dapat meningkatkan diferensiasi osteoblas (Son *et al.* 2019).

2.1.3 Peran EA dalam pembentukan tulang

Peran EA dalam pembentukan tulang dapat diamati secara pemeriksaan histologi pada hari ke 14 dan 28. Penelitian pada tikus yang telah dilakukan ekstraksi gigi, menunjukkan bahwa kelompok studi dengan penambahan EA memiliki trabekula yang jauh lebih besar, dengan jaringan ikat dan osteoblas yang lebih banyak dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada imunohistokimia, dilaporkan bahwa ekspresi tikus diabetes yang diobati dengan EA menunjukkan ekspresi ALP lebih tinggi daripada tikus diabetes yang tidak diobati (Al-obaidi *et al.* 2014a). Dalam penelitian Al-Obaidi pada hari ke-7, 14 dan 21 pada kelompok yang dirawat EA hasilnya menunjukkan ekspresi OSC dan OPN lebih tinggi dalam sel-sel osteoblas, osteosit, dan lapisan tulang jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada hari ke 28, osteoblas kurang aktif terlihat (Al-Obaidi *et al.* 2014).

2.1.4 Konsentrasi pada EA

Berdasarkan hasil penelitian Primarizky, untuk mendapatkan hasil penyembuhan luka yang baik, 2,5% dari ellagic acid harus diberikan pada cedera fase awal (Primarizky *et al.* 2018). *Ellagic Acid* memiliki komponen polifenol yang sebagian besar tersusun punicalagin dan menunjukkan aktivitas antitumor. Konsentrasi EA 1 hingga 3% menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dan antikanker pada sel kanker paru-paru, prostat, dan otak (Li *et al.* 2019).

2.2 *Bone Graft* Kedokteran Gigi

Restorasi *implant* adalah perawatan yang penting untuk mengganti gigi yang hilang, fungsi mastikasi dan meningkatkan estetika untuk pasien dalam praktik kedokteran gigi. Pemahaman tentang desain dan penempatan *implant* untuk hasil klinis yang optimal adalah pengetahuan umum bagi praktisi gigi. Ini tidak terjadi ketika memahami kebutuhan dan prosedur *bone graft* yang merupakan dasar untuk perawatan *implant* (Dentclinic 2016).

2.2.1 Dasar Pemikiran Untuk *Bone Graft*

Penempatan *implant* membutuhkan volume tulang yang cukup dan kualitas biologis. Ini karena desain makro *implant*, yang menuntut sifat dimensi tertentu untuk kesuksesan jangka panjang. Faktor lain yang membuat *bone graft* diperlukan adalah: (Klein and Al-Nawas 2011)

- 1) Resorpsi *edentulous ridge* post ekstraksi
- 2) Adanya *bone defect* akibat trauma atau infeksi
- 3) Kebutuhan untuk meletakkan *implant* di tempat-tempat strategis untuk kesuksesan fungsional dan estetika. Di daerah estetika, jaringan lunak membutuhkan basis bertulang karena “jaringan lunak mengikuti jaringan keras”

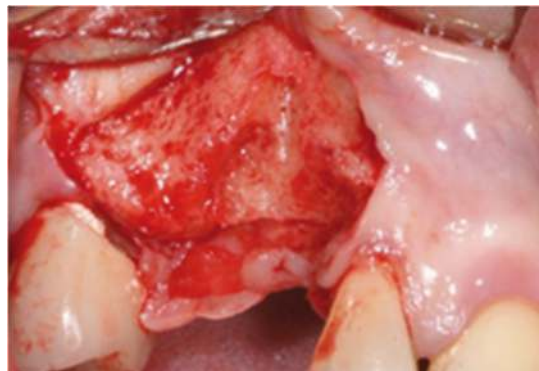
Perencanaan perawatan untuk penempatan *bone graft* membutuhkan pemilihan teknik bedah dan bahan *graft* yang tepat. Perencanaan atau pelaksanaan yang buruk dapat menyebabkan resorpsi bahan *graft* atau kegagalan untuk berintegrasi. Selain itu, jaringan yang hilang dapat diganti dengan jaringan fibrosa daripada tulang fungsional (Smiler and Soltan 2006).

2.2.2 Lokasi/ Indikasi Untuk *Bone Graft*

Bahan *bone graft* ditempatkan di lokasi yang berbeda untuk berbagai indikasi: (Klein and Al-Nawas 2011)

- 1) Di soket alveolar pasca ekstraksi
- 2) Untuk mengisi ulang kerusakan tulang akibat trauma atau infeksi
- 3) Untuk mengisi ulang defek peri-implan karena peri-implantitis
- 4) Untuk augmentasi mandibula dan rahang atas secara vertical
- 5) Untuk augmentasi mandibula dan rahang atas secara horizontal

Setelah ekstraksi gigi, 40 hingga 60 persen dari tinggi dan lebar tulang alveolar diperkirakan akan hilang, kerugian terbesar adalah dalam dua tahun pertama.



Gambar 2. 3 : Setelah ekstraksi, *bone loss* bisa mencapai 60 persen dari tinggi dan lebar asli dari *alveolar ridge* (Dentclinic 2016)

Dengan hilangnya jaringan keras dan lunak, kondisinya kurang menguntungkan untuk dinding aksial *implant* yang tepat untuk fungsi dan estetika. Untuk meminimalkan atrofi alveolar pasca ekstraksi, prosedur penyembuhan yang

disebut "*socket preservation*" atau "*ridge preservation*" telah dikembangkan. Prosedur ini melibatkan mengisi soket dengan tulang atau bahan pengganti tulang, dengan atau tanpa membran (Vignoletti *et al.* 2012).

2.2.3 Persyaratan Ideal Untuk *Bone Graft*

Penyembuhan tulang dan pembentukan tulang baru setelah *graft* terjadi melalui osteogenesis, osteoinduksi dan osteokonduksi (Wang *et al.* 2004)

- 1) Bahan *graft* osteogenik memasok osteoblas yang dapat hidup sendiri
- 2) Bahan osteoinduktif merangsang sel-sel mesenkimal primitif yang dibawa melalui pasokan darah dari tulang atau periosteum yang berdekatan untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas
- 3) Bahan osteokonduktif hanya bertindak sebagai kisi atau kerangka kerja untuk pertumbuhan sel, memungkinkan osteoblas dari batas luka untuk masuk ke defek dan bermigrasi melintasi *graft*.

Kriteria keberhasilan *bone graft* : (Smiler and Soltan 2006)

- 1) Osteoblas harus ada : Hanya osteoblas yang menciptakan tulang baru. Agar suatu *graft* berhasil, matriks *graft* harus mengandung osteoblas. Jika jumlah osteoblas tidak mencukupi, *graft* akan gagal.
- 2) Pasokan darah harus mencukupi untuk nutrisi : *Bone graft* adalah regenerasi yang tidak diperbaiki. Istilah "*repair*" yaitu pemulihan jaringan yang hilang; regenerasi adalah proses biologis di mana tidak hanya jaringan kembali, tetapi juga bentuk dan fungsinya. Ini membutuhkan suplai darah yang baik ke *graft* dan jaringan di sekitarnya. Darah dibutuhkan untuk kelangsungan hidup sel dan pembentukan *clot formation*. *Clot formation* berfungsi sebagai matriks awal di mana sel bermigrasi dan kemudian berfungsi sebagai penjangkaran untuk osteoblas.
- 3) *Graft* harus distabilkan selama penyembuhan : Tekanan mekanis pada *graft* selama penyembuhan dapat menyebabkan gangguan bekuan fibrin. Gerakan itu

akan menyebabkan jaringan berserat mengisi *defect* tulang. Ini adalah bentuk *repair* dan bukan regenerasi. Fiksasi seperti GBR (*Guided Bone Regeneration*) membran kolagen, *titanium mesh* dan *bone screws* dapat digunakan.

- 4) Jaringan lunak tidak boleh *under tension* : Tulang adalah jaringan yang tumbuh paling lambat. Regenerasi tulang yang dipandu didasarkan pada pemisahan *graft* dari jaringan lunak di sekitarnya. Membran GBR menjaga jaringan yang tumbuh lebih cepat seperti epitel, jaringan berserat atau jaringan ikat gingiva dari *defect* sehingga memungkinkan regenerasi terkontrol dengan pembentukan tulang (Smiler and Soltan 2006). Penerapan bahan *bone graft* ke dalam *defect* mencegah kolaps membran kolagen dan bertindak sebagai tempat untuk tulang regenerasi baru dan osteokonduktif *scaffold* untuk pertumbuhan pembuluh darah dan osteoblas (Rothamal Daniel 2012)

2.2.4 Klasifikasi *Bone Graft* Berdasarkan Sumber Bahan

Graft autogenous (di mana jaringan dipindahkan dari satu lokasi ke lokasi lain dalam individu yang sama) dianggap sebagai *gold standard*. Ini adalah osteogenik, osteoinduktif dan osteokonduktif. Terdapat aktivitas biologis karena sel-sel vital dan faktor pertumbuhan. Tidak ada risiko penularan penyakit. Namun ada peningkatan risiko rasa sakit, infeksi, morbiditas donor, kompleksitas dalam prosedur bedah, dan terbatasnya pasokan tulang (Wang *et al.* 2004).

Bone Substitute Material (BSM) dikembangkan untuk mengatasi kesulitan *graft autogenous*. Dapat mengganti tulang autogen sepenuhnya atau memperluas *graft autogenous*. Bahan-bahan harus efektif untuk prosedur, baik sebelum pemasangan *implant* (prosedur tertunda waktu) dan untuk optimalisasi lokasi penerima pada saat penempatan *implant* (prosedur simultan) (Klein and Al-Nawas 2011)

Klasifikasi *Bone Graft* :

- 1) *Autograft* (*Graft autogenous*) : Jaringan ditransfer dari satu lokasi ke lokasi lain dalam satu individu yang sama. *Autograft* adalah tulang pasien sendiri. Ini

terutama diambil secara intraoral atau dari krista iliaka. Ini adalah pengganti tulang yang ideal karena mengandung sel-sel hidup dan faktor pertumbuhan manusia. Ini memiliki potensi osteogenik yang lebih besar daripada pengganti tulang lainnya serta biokompatibilitas yang melekat (Kolk *et al.* 2012)

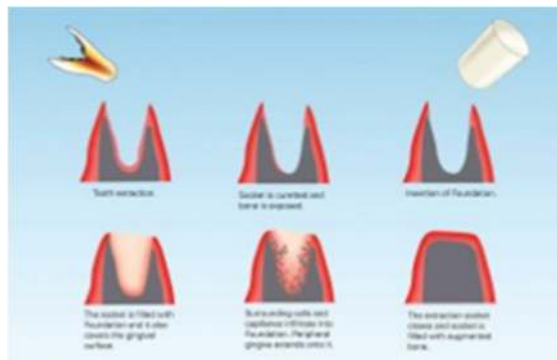
- 2) *Allograft* : *Graft* antara anggota genetik yang berbeda dari spesies yang sama yaitu jaringan manusia. *Allograft* dapat berasal dari mayat atau donor hidup (jaringan diambil dari operasi penggantian pinggul). Ini memiliki komposisi dan struktur tulang alami. Jaringan ini bersifat osteoinduktif dan juga osteokonduktif tetapi tidak memiliki sifat osteogenik karena tidak adanya sel yang layak. Ada kontroversi mengenai hubungan bahan alogenetik dan risiko penularan infeksi seperti HIV, hepatitis B dan C, prion, keganasan, gangguan sistemik atau racun (Kolk *et al.* 2012)
- 3) *Xenograft* : *Graft* yang diambil dari donor spesies lain yaitu sapi, babi, dll. *Xenograft* berasal dari organisme lain, terutama sapi. Ini memberikan stabilitas volume jangka panjang. Tulang sapi memiliki bukti yang terdokumentasi dengan baik. Ini dideproteinisasi dengan pemanasan untuk menghilangkan risiko reaksi alergi dan penularan penyakit (Murugan *et al.* 2003). *Xenograft* tulang sapi bersifat osteokonduktif dan tersedia dalam berbagai volume dan ukuran partikel. Pilihan lain adalah penggunaan kolagen sapi. Kolagen yang tidak ditreatment (bertindak sebagai *scaffold*) dan kolagen yang didenaturasi panas (yang merangsang pertumbuhan) dicampur, dibekukan, dikeringkan dan dihubungkan oleh panas. Bahan tersebut kemudian diproses menjadi blok spons dan dibentuk menjadi bentuk peluru untuk memudahkan penempatan ke soket ekstraksi (Rasubala *et al.* 2011)



Gambar 2. 4 : Penempatan blok tulang autogen diambil dari daerah dagu

(Dentclinic 2016)

- 4) *Alloplast* : Bahan asing anorganik, sintetis atau inert ditanamkan ke dalam jaringan. *Alloplast* diproduksi secara sintetis sehingga tidak ada risiko penularan penyakit. Bahan alloplastik yang paling umum adalah keramik berbasis kalsium fosfat seperti *hidroksiapatit* (HA) dan *tricalcium fosfat* (TCP), kalsium fosfat *Bioactive* dan *Resorbable*. (Kolk *et al.* 2012)



Gambar 2. 5 : Protokol klinis untuk pemasangan foundation, sebuah *bovine bone xenograft* berbasis kolagen (Dentclinic 2016)

Berbagai jenis bahan pengganti tulang dapat digabungkan dan bahkan digabungkan untuk mengakomodasi kebutuhan situasi klinis. Penyesuaian komposisi bahan dan karakteristik fisik memungkinkan untuk berbagai tingkat penyerapan serta bentuk fisik seperti bubuk, butiran, pasta, balok dan bahkan *graft* yang dibuat khusus.

Pemilihan produk memungkinkan dokter gigi untuk mendapatkan hasil klinis yang optimal.

2.2.4.1 *Bovine Bone Xenograft* (BBX)

Bovine bone adalah tulang sapi yang digunakan sebagai alternatif *xenograft*, dimana tingginya permintaan terhadap *bone graft* sementara source donor yang berasal dari human sangatlah minim (Masaki *et al.* 2015). Tulang sapi yang diproses terlebih dahulu harus lolos dari screening penyakit-penyakit menular yang terdapat pada sapi. Sapi yang digunakan harus memiliki kualitas bagus dan bebas penyakit, selanjutnya akan diproses melalui proses diseksi untuk menghilangkan soft tissue yang masih menempel. Lalu dilakukan proses pemotongan, pencucian, pengeringan, proses *deep frozen*, *freeze dried*, pengepakan dan yang terakhir adalah proses sterilisasi dengan menggunakan sinar gamma. Sebelum di distribusikan akan menjalani standarisasi mutu yaitu harus bebas bakteri dan pemeriksaan kadar air (Vignoletti *et al.* 2012).

Penggunaan *bovine bone* : (Rothamal Daniel 2012)

1. *Bovine bone* dapat digunakan dalam bentuk seperti bubuk atau cuboid berpori. Untuk mengisi gab tulang yang terlalu besar yang terjadi karena kecacatan atau karena penyakit seperti kanker. Juga dapat digunakan ketika terjadi augmentasi tulang (misalnya rekonstruksi rahang atas atau aplikasi gigi).
2. *Bovine bone* merupakan scaffold yang baik untuk tempat melekatnya stem cell
3. *Bovine bone* orbital dapat digunakan sebagai pengganti bola mata.

Keunggulan *bovine bone* : (Rothamal Daniel 2012)

1. *Bovine bone* didapat dari donor *bovine* yang telah terstandarisasi oleh dinas pertanian dan dinyatakan bahwa sapi yang digunakan bebas dari penyakit menular dan dinyatakan sehat.
2. Melalui prosesing sesuai standart *The American Association of Tissue Bank* (AATB), *European Association of Tissue Bank* (EATB) dan *Asia Pacific*

Association of Surgical Tissue Bank (APASTB) dengan menggunakan sterilisasi sinar gamma, sehingga penggunaannya aman dari reaksi inflamasi

2.3 Trauma

Selama hidup, setiap orang pasti pernah mengalami trauma, khususnya trauma fisik (Health and Events 2018). Adapun yang dimaksud dengan trauma fisik adalah suatu kejadian yang tidak terduga yang dialami oleh tubuh. Sebagai contoh misalnya karena tubuh mengalami benturan yang hebat, atau juga akibat luka/ patah tulang baik disebabkan oleh benda tajam/ tumpul (MacLeod 2005). Pada kondisi ini sel mengalami kerusakan/ kematian, baik secara langsung yang disebabkan oleh trauma, maupun secara tidak langsung yang disebabkan karena adanya kerusakan vaskuler akibat trauma (Lateef Wani *et al.* 2013). Kematian sel yang disebabkan oleh kerusakan vaskuler, prosesnya dimulai dari faktor iskemia, yang mengakibatkan gangguan pembentukan energi pada sel. Gangguan pembentukan energi inilah selanjutnya akan memicu terjadinya kerusakan atau kematian sel (Kalogeris *et al.* 2012) Terbentuknya sel debris yang berasal dari sel mati/ nekrotik, didalam tubuh akan memicu reaksi inflamasi (Hebner *et al.* 2008).

2.3.1 Trauma Pada Gigi

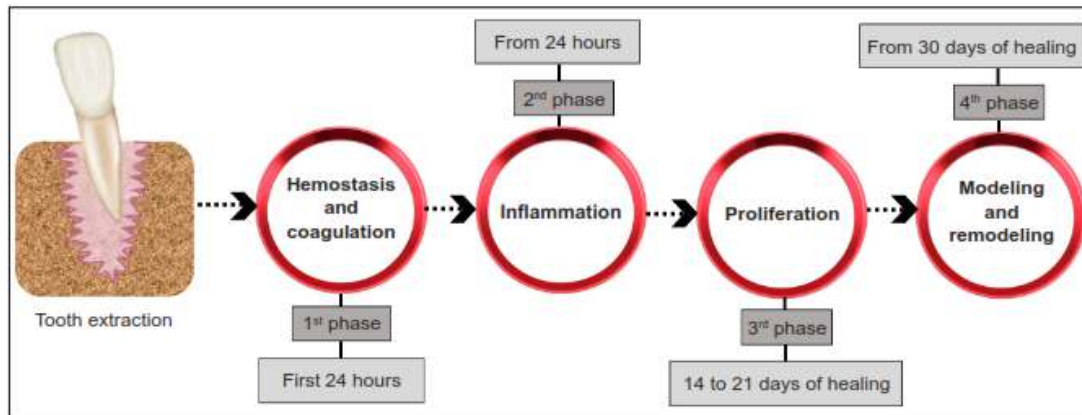
Ekstraksi pada gigi merupakan trauma pada prosedur bedah yang dapat menyebabkan kehilangan tulang atau fraktur pada tulang *alveol*. Jaringan lunak dan keras biasanya mengalami trauma selama ekstraksi gigi, sehingga mengganggu estetika pada jaringan (Caplanis *et al.* 2013). Kerusakan tulang marginal dapat menyebabkan resesi gingiva marginal dan elongasi koronal pada restorasi *implant* (Buser *et al.* 2017). *Dental implant* merupakan perawatan pilihan untuk penggantian gigi yang hilang akibat ekstraksi gigi (Assistant 2012). Ekstraksi gigi pada dasarnya adalah perawatan bedah yang tidak dapat menghindari produksi luka pada tubuh yang hidup (Schulze 2008).

2.3.2 Luka

Setiap orang selama hidupnya dapat dipastikan pernah mengalami luka, seperti luka yang dialami oleh seseorang ketika melakukan suatu aktivitas, dan atau karena trauma lainnya (Health and Safety Executive 2013). Selain itu juga ada luka yang dibuat secara sengaja yang dilakukan oleh ahli bedah dimeja operasi (Chetter *et al.* 2017). Berdasarkan hal tersebut, maka luka yang dialami oleh setiap orang, pada dasarnya dapat dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu luka steril dan luka tidak steril. Luka steril adalah luka yang tidak tercemar oleh mikroorganisme, seperti contoh yang disebutkan diatas yaitu luka sayatan yang dilakukan oleh ahli bedah dimeja operasi. Sedangkan luka tidak steril adalah luka yang tercemar oleh mikroorganisme, seperti luka yang terjadi secara tidak sengaja. Contohnya luka yang terjadi ketika melakukan suatu aktivitas, baik disebabkan oleh benda tajam atau benda tumpul, atau juga karena rupture tendon atau patah tulang terbuka karena trauma (Wolcott and Fletcher 2014)

2.4 Proses Penyembuhan Luka Ekstraksi Gigi

Ada atau tidak adanya gigi mempengaruhi remodeling soket alveolar. Setelah pencabutan gigi, serangkaian peristiwa biologis yang teratur terjadi di alveolus, yang menghasilkan penyembuhan soket (Pagni *et al.* 2012). Penyembuhan terdiri dari berbagai proses termasuk perubahan vaskular; aktivasi inflamasi; migrasi, proliferasi dan diferensiasi populasi sel yang berbeda; produksi dan pematangan matriks ekstraseluler; pembentukan tulang, pemodelan dan remodelling, yang berpuncak pada pemulihan jaringan yang hilang (Araújo *et al.* 2015). Hal ini dicapai melalui interaksi koreografi yang bergantung pada ruang dan waktu dari sitokin, kemokin dan faktor pertumbuhan, aktivasi jalur pensinyalan dengan modulasi ekspresi gen dan faktor transkripsi, yang menentukan keadaan seluler dalam lingkungan penyembuhan (Vieira *et al.* 2015).



Gambar 2. 6 : Peristiwa biologis yang terjadi di soket setelah pencabutan gigi dijelaskan ke dalam urutan empat fase tergantung waktu (Gomes *et al.* 2019)

2.4.1 Koagulasi dan hemostasis

Segera setelah pencabutan gigi, soket penuh dengan darah yang dihasilkan dari proses hemoragik, diikuti oleh pembentukan darah yang stabil dan bekuan tertanam dalam jaringan fibrin (Scala *et al.* 2014). Gumpalan awalnya mengisi volume soket hingga margin dari jaringan lunak, berada dalam kontak langsung dengan ligamen periodontal yang cedera (Farina and Trombelli 2013). Pembentukan bekuan bertujuan dua kali lipat - mencegah kehilangan darah, dan memberikan *scaffold* terstruktur untuk adhesi sel yang direkrut yang akan mengatur penyembuhan di fase-fase berikutnya dari proses (Davies and Hosseini 2000). Hemostasis, di alveolus soket, hasil dari interaksi dinamis dari trombosit dan sel endotel, serta keseimbangan antara koagulasi dan fibrinolisis, sehingga menimbulkan pembentukan bekuan yang stabil. Gumpalan darah tampak sepenuhnya diremodeling sepanjang minggu pertama pasca ekstraksi, seperti yang ditunjukkan dalam penelitian pada manusia, dengan hanya eritrosit yang tersebar yang diidentifikasi pada titik waktu berikutnya (Trombelli *et al.* 2008).

Secara mekanis, pencabutan gigi menyebabkan kerusakan mikrovaskuler dan ekstrasvasi darah, proses yang dengan cepat dikendalikan oleh refleks vasokonstriksi, yang bertanggung jawab oleh retrenchment sel otot polos pembuluh darah - mampu mengontrol perdarahan di arteriol dengan diameter hingga 0,5 cm (Broughton *et al.*

2006). Meskipun demikian, kontrol tonus vaskular hanya efektif sementara sampai asidosis dan hipoksia berkembang dalam lingkungan mikro, yang mengarah ke relaksasi pasif, dan melanjutkan perdarahan. Jika itu bukan untuk pembentukan jaringan fibrin yang tidak larut - dihasilkan dari aktivasi koagulasi kaskade melalui jalur yang berbeda untuk agregasi trombosit dan pembentukan bekuan – hemostatik mekanisme akan menjadi tidak efektif (Monroe and Hoffman 2012).

Trombosit melepaskan faktor pembekuan pada saat aktivasi, yang terjadi setelah kontak dengan ekstraseluler molekul matriks. Bekuan darah dan terkait trombosit, selain fungsi hemostatik, berperan lebih lanjut peran mendasar untuk penyembuhan jaringan yang tepat karena dengan adanya banyak sitokin (seperti yang berasal dari keluarga kemokin dan interleukin) dan pertumbuhan faktor (misalnya, *tumour necrosis factor alfa family*, *transforming growth factor beta family*, *fibroblast growth factor family*, *epidermal growth factor family* dan individual factors seperti *platelet-derived growth factor*, *vascular endothelial growth factor*, *granulocyte macrophage colony stimulating factor* dan *connective tissue growth factor* dan yang lainnya) itu mampu memodulasi proses seluler berikutnya - migrasi sel, proliferasi dan diferensiasi - fundamental untuk mempromosikan angiogenesis dan tulang regenerasi (Barrientos *et al.* 2008). Bahkan, kumpulan gumpalan, pemeliharaan dan pencabutan adalah faktor penentu dari fase berikutnya yang melibatkan *connective tissue formation*, seperti yang ditunjukkan secara eksperimental dalam socket studi penyembuhan di mana gumpalan darah dihilangkan 6 - 8 menit pasca operasi, sangat membahayakan hasil penyembuhan selanjutnya (Gomes *et al.* 2019).

Trombosit juga mengandung dan melepaskan amina vasoaktif dan produk metabolisme yang diturunkan dari asam arakidonat yang berperan mendasar dalam inisiasi dan modulasi fase inflamasi berikutnya. Dalam konteks ini, molekul adhesi - sebagai vitronectin dan integrin yang berbeda - ditemukan positif diatur selama acara awal, membantu perekrutan sel berikutnya, adhesi dan aktivasi (Garlet *et al.* 2012).

2.4.2 Peradangan

Proses inflamasi sementara dan sedang adalah penting untuk penyembuhan/regenerasi tulang yang memadai, seperti konsep konstruktif inflamasi, dengan aktivasi baik humoral maupun respon inflamasi seluler (Eming *et al.* 2009). Setelah pembentukan bekuan darah, perekrutan dan migrasi sel inflamasi diverifikasi, sepanjang hari-hari pertama setelah pencabutan gigi (Velnar *et al.* 2009). Sistem komplemen diaktifkan dan neutrophil awal menjajah jaringan bekuan, bermigrasi sesuai ke gradien konsentrasi kemokin yang mapan - sebagian besar diatur oleh molekul komplemen C3a dan C5a, TGF- dan bakteri melepaskan produk. Neutrofil mendaftarkan fagositosis aktif, menghilangkan struktur bekuan, bakteri dan akhirnya benda asing, melalui pelepasan spesies radikal bebas dan enzim proteolitik (Amara *et al.* 2010). Studi eksperimental di soket penyembuhan tikus mengungkapkan infiltrasi neutrofilik awal, memisahkan jaringan yang layak dari sisa-sisa jaringan dan bakteri. Neutrofil yang terletak lebih apikal dicirikan oleh struktur granular padat dan fagosom, apakah terletak lebih koronal memiliki granula lebih sedikit, tetapi distribusi tinggi fagosom menelan bakteri - mendukung peran mendasar neutrofil dalam pembersihan bakteri dan pengendalian infeksi (Gomes *et al.* 2019).

Makrofag mengikuti direkrut, dari monosit yang bersirkulasi yang mengalami pematangan fenotipik, bertanggung jawab atas kelanjutan fagositosis dan selanjutnya menyediakan pelepasan faktor pertumbuhan yang efektif - mengubah *effective growth factors*, *transforming growth factor-alfa*, *transforming growth factor-beta*, *fibroblast growth factor* dan *epidermal growth factor* yang mengaktifkan kemudian merekrut fibroblas dan osteoblas (Koh and DiPietro 2011). Limfosit terakhir direkrut, secara luas sebagai respons terhadap interleukin-1 dan produk pemecahan molekul lokal (De Coster *et al.* 2011).

2.4.3 Fase Proliferasi

Fase proliferasi dimulai oleh fibroplasia. Pada saat terjadi migrasi dan proliferasi fibroblas yang intens, serta peningkatan sintesis kolagen dan protein matriks ekstraseluler lainnya. Matriks ekstraseluler berlimpah yang baru terbentuk selanjutnya mendukung migrasi sel, memungkinkan untuk meningkatkan adhesi sel dan ekstensi filopodia dan pseudopodia menyeluruh yang menempelkan fibronectin dan protein kolagen dari matriks (Pagni *et al.* 2012). Data histologis mengungkapkan bahwa, selama minggu pertama penyembuhan, soket ekstraksi diliputi oleh jaringan granulasi kaya sel yang terorganisir secara longgar dengan infiltrasi sel inflamasi yang intens, pembuluh darah dan fibroblas menggantikan bekuan darah awal yang mengalami nekrosis koagulatif, dalam sentrifugal proses (Farina and Trombelli 2013).

Aktivasi awal TGF- β 1 dan FGF-2 memodulasi aktivasi dan proliferasi populasi fibroblastik, sangat menentukan sintesis dan pematangan matriks ekstraseluler dan organisasi jaringan granulasi (LIEBERMAN *et al.* 2002). Pada saat yang sama, komponen utama dari matriks ekstraseluler, seperti kolagen tipe I dikodekan oleh gen COL1A1 dan COL1A2 - selanjutnya diakui sebagai penanda tulang awal. Ekspresi yang melimpah pada fase penyembuhan awal (Berendsen *et al.* 2014), secara paralel dengan ekspresi tinggi enzim yang bertanggung jawab untuk remodeling matriks ekstraseluler sebagai matriks metalloproteinase (MMPs), khususnya MMP-2 dan MMP-9 diketahui memodulasi pergerakan populasi sel inflamasi serta proses angiogenik (Kanyama *et al.* 2003).

Pemodelan dan pembentukan kembali sirkulasi darah sangat penting dari keseimbangan faktor pro dan anti-angiogenik yang mengisi lingkungan mikro, memodulasi sel endotel, fungsionalitas (Araújo *et al.* 2015). Hipoksia kondisi lebih lanjut mendorong proliferasi dan diferensiasi endotel, membantu angiogenesis dalam proses yang diatur secara tepat waktu yang dicirikan oleh degradasi lamina basal yang diperantarai enzim yang memungkinkan perayapan pembuluh darah, kemotaksis sel,

proliferasi dan diferensiasi sel dan akhirnya pematangan dan remodeling dari struktur yang baru terbentuk (Carano and Filvaroff 2003). Pada fase penyembuhan ini, pembentukan *woven bone* dimulai melalui penetrasi sel mesenkim yang tidak berdiferensiasi yang berdiferensiasi menjadi garis keturunan osteogenik. Penonjolan jaringan mineral seperti jari diidentifikasi secara luas, yang secara progresif memanjang dari dinding soket ke pusat luka, dalam matriks jaringan ikat yang dilapisi serat kolagen, tanpa organisasi terstruktur (Pagni *et al.* 2012).

2.4.4 Modeling dan Remodeling

Fase terakhir dari proses penyembuhan soket meliputi perubahan struktur jaringan tulang, yang dapat terjadi dengan modifikasi arsitektur dan bentuk (modelling), atau tanpa modifikasi parameter (remodelling). Secara organisasi, substitusi *woven bone* dengan jaringan tulang pipih/sumsum tulang dianggap sebagai remodelling, sedangkan perubahan dimensi yang dihasilkan dari *alveolar ridge*, pada dinding soket, terdiri dari pemodelan jaringan tulang (Pagni *et al.* 2012, Trombelli *et al.* 2008).

Proses modeling/remodelling dihasilkan dari interaksi aktif antara osteoblas dan osteoklas, yang sangat termodulasi oleh adanya faktor-faktor seperti *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF), *receptor activator of nuclear factor kappa B* (RANK), *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* (RANKL) dan *osteoprotegerin* (OPG) (Trombelli *et al.* 2008). Proses ini biasanya dimulai dengan perekrutan osteoklas, diidentifikasi sebagai lapisan pada dinding soket dan melalui struktur trabekular marginal dari *woven bone*. Pemodelan didistribusikan secara serupa antara permukaan bukal dan lingual, tetapi karena lempeng lingual biasanya lebih lebar, peningkatan kehilangan tulang vertikal tercapai pada pelat bukal yang lebih tipis. Tambahan relevansi, pemodelan terjadi lebih awal dari remodelling, karena sekitar dua pertiga dari proses terjadi hingga 3 bulan pasca operasi (Schropp 2004).

2.5 *Alveolar Ridge Preservation (ARP)*

Ekstraksi umumnya ketika gigi tidak dapat dipertahankan atau dirawat untuk kesehatan jangka panjang, fungsi, dan/ atau estetika. Kehilangan gigi memiliki dampak langsung pada kualitas hidup dengan merusak kemampuan untuk mengunyah, berbicara dan dalam beberapa kasus, bersosialisasi (Gerritsen *et al.* 2010). Ekstraksi gigi menghasilkan perubahan resorpsi pada *alveolar ridge* (Tan *et al.* 2012). Secara khusus, akan ada kehilangan volume tulang yang signifikan pada aspek bukal dari soket (Pagni *et al.* 2012). *Bone loss* setelah ekstraksi mengurangi *volume ridge* (reduksi horizontal) dengan rata-rata 3,8 mm dan ketinggian ridge (reduksi vertikal) dengan rata-rata 1,2 mm di 6 bulan pertama (Masaki *et al.* 2015)

Setelah proses ekstraksi gigi, resorpsi tulang alveolar dapat terjadi, resorpsi ini disebut *Resorpsi Ridge Residual (RRR)*, bersifat kronis, progresif, irreversibel, dan akumulatif. Penyembuhan soket pencabutan gigi adalah proses yang kompleks, yang melibatkan perbaikan dan regenerasi jaringan. Soket diisi dengan bekuan darah, yang kemudian digantikan oleh jaringan granulasi seperti vascularisasi (Knezoviê-zlatariê 2002). Untuk mencegah *bone loss*, upaya dapat dilakukan untuk mempengaruhi tulang dan penyembuhan jaringan lunak dengan mengambil langkah-langkah tepat seperti ekstraksi gigi. Identy adalah untuk mengurangi proses resorpsi selama soket remodeling (Jamjoom and Cohen 2015). Atropi *alveolar ridge* memiliki dampak yang besar pada terapi penggantian gigi, terutama ketika restorasi yang didukung *implant*. Oleh karena itu, *Alveolar Ridge Preservation (ARP)* telah menjadi komponen kunci dari kedokteran gigi klinis (Avila-Ortiz *et al.* 2014).

2.5.1 Prosedur preservasi *ridge*

1) *Filling the extraction socket (wound care)*

Soket ekstraksi adalah luka pada tulang. *Preservasi ridge* adalah prosedur perawatan luka. Mencakup luka untuk melindungi dari luka rongga mulut dan memiliki fungsi hemostatik. Tujuan *preservasi ridge* yaitu menjaga volume tulang alveolar. Hal

ini belum tentu terkait dengan pembentukan tulang baru dalam soket. Sebaliknya, prosedur *preservasi ridge* menunda pembentukan tulang dalam fase penyembuhan awal, terlepas dari pengganti *bone graft* (Jamjoom and Cohen 2015). Khususnya dalam situasi anatomi dan biologis yang tidak menguntungkan (contoh : hilang bukal plate atau perforasi apikal), pembentukan tulang pada defek mungkin tidak lengkap atau tidak ada (Lee *et al.* 2010).

2) *Preservasi dari volume ridge (ridge preservation)*

Prosedur *preservasi ridge*, atrofi alveolar yang pertama 6 bulan setelah ekstraksi gigi secara signifikan lebih rendah dari atrofi pada kelompok kontrol yang tidak diobati (Vignoletti *et al.* 2012). *Alveolar bundle bone*, di mana kolagen serat periodonsium berada, secara fungsional berada di depan akar gigi beserta kehilangan gigi (Hansson and Halldin 2012). Karena itu, prosedur *preservasi ridge* tidak bisa sepenuhnya mencegah hilangnya *volume ridge* yang di ikuti ekstraksi, tetapi secara signifikan dapat menguranginya (Schug and Biomaterials 2013).

3) *New bone formation (osteogenesis)*

Tulang memiliki kapasitas substansial untuk perbaikan dan regenerasi sebagai respons terhadap *injury* atau perawatan bedah. Kedua proses tersebut melibatkan integrasi sel yang kompleks, faktor pertumbuhan, dan matriks ekstraseluler. Perbaikan hanya mengembalikan kontinuitas jaringan yang terluka, tanpa meningkatkan volume tulang. Regenerasi, sebaliknya, melibatkan diferensiasi sel-sel baru dan pembentukan jaringan tulang baru yang menghasilkan peningkatan keseluruhan volume jaringan *skeletal tissues* (Al-Aql *et al.* 2008).

2.5.2 Indikasi dan Kontraindikasi *Preservasi Alveolar Ridge*

Soket yang utuh dengan cedera marginal ringan pada *bucal plate*, mengikuti ekstraksi gigi berakar tunggal dan gigi berakar ganda dengan *preservasi septum interradicular* (Crespi *et al.* 2014)

1) Indikasi :

- ✓ Perforasi apikal kecil di *bucal plate*
- ✓ *Interradicular bone loss* (mis. sebagai akibat dari proses inflamasi), dalam kondisi ini, pembentukan tulang dapat berkurang
- ✓ Volume *ridge* akan dipertahankan

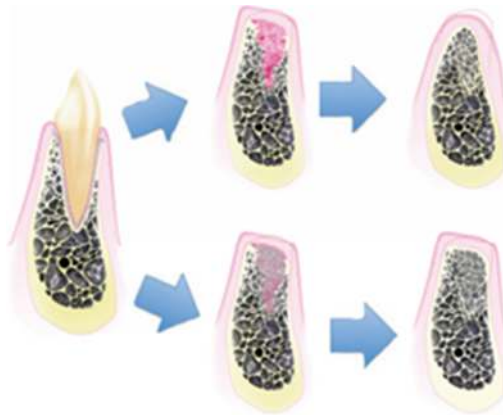
2) Kontraindikasi :

- ✓ *Injury* besar atau kehilangan *bucal plate*: *surgical bone augmentation* / *Guided Bone regeneration* diperlukan
- ✓ Soket yang terinfeksi akut (supuratif)
- ✓ Gigi avital dengan fistula apikal

2.5.3 Alveolar Ridge Remodeling

Kompleks tulang maksila dan mandibula terdiri oleh beberapa struktur anatomi dengan fungsi yang tepat, komposisi, dan fisiologi (Chaudhary *et al.* 2017)

- 1) *Basal bone* yang berkembang bersama dengan *skeletal* keseluruhan, dan membentuk mandibula dan maksila
- 2) Proses alveolar yang berkembang berupa erupsi gigi dan mengandung alveolus gigi
- 3) *Bundle bone* yang melapisi soket alveolar, memanjang koronal membentuk puncak tulang bukal, dan membuat bagian dari struktur periodontal karena membungkus eksternal terminasi serat periodontal (*serat Sharpey*).



Gambar 2. 7 : Resorpsi tulang terjadi dalam 2 fase (Pagni *et al.* 2012)

Penyembuhan soket ekstraksi dengan dan tanpa *graft*. Ketika *graft* pada soket tidak dipakai, *alveolar ridge* terjadi resorpsi. Pada fase pertama, awalnya *blood clot*, jaringan granulasi kemudian matriks sementara dan *woven bone* mengisi alveolus. *Bundle bone* sepenuhnya diserap menyebabkan pengurangan *vertical ridge*. Pada fase kedua, dinding bukal dan *woven bone* diremodeling sehingga menyebabkan pengurangan *horizontal ridge* dan *vertikal ridge* lebih jauh. Ketika *graft* soket dipakai, yang pertama reduksi tulang vertikal masih terjadi, namun fase kedua reduksi horizontal berkurang (Pagni *et al.* 2012).

Selama yang pertama *bundle bone* cepat diserap dan diganti dengan *woven bone* yang mengarah ke pengurangan tinggi tulang terutama pada aspek bukal dari soket, sebagai puncaknya hanya terdiri dari *bundle bone* (Araújo and Lindhe 2005). Daerah bukal mengalami lebih banyak resorpsi bahkan umumnya lebih tipis, rata-rata 0,8 mm pada gigi anterior dan 1,1 mm regio premolar (Huynh-Ba *et al.* 2010).

Kelompok penelitian melaporkan bahwa ada atau tidak adanya periodontal ligament dalam ekstraksi soket tidak mempengaruhi fitur penyembuhan setelah 3 bulan. Selama fase kedua, bagian luar permukaan tulang alveolar diremodeling sehingga menyebabkan keseluruhan jaringan horizontal dan vertikal. Remodeling tulang adalah proses yang kompleks melibatkan faktor struktural, fungsional, dan

fisiologis dan bahwa trauma bedah akibat ekstraksi menyebabkan mikrotrauma (Avila-Ortiz *et al.* 2014).

Laju resorpsi dari *alveolar ridge* lebih cepat selama enam bulan pertama setelah ekstraksi (Pagni *et al.* 2012). Ketinggian soket yang disembuhkan tidak pernah mencapai koronal tingkat tulang yang menempel pada gigi yang diekstraksi, dan horizontal resorpsi tampaknya lebih besar di daerah molar dibandingkan ke area premolar (Hämmerle *et al.* 2012). Diperkirakan dua pertiga dari perubahan jaringan keras dan lunak terjadi pada 3 bulan pertama. Para penulis melaporkan 50% dari lebar crestal hilang dalam periode 12 bulan (sesuai dengan 6,1 mm; kisaran 2,7 hingga 12,2 mm), 2/3 di antaranya (3,8 mm; 30%) terjadi di 12 minggu pertama. Saat memeriksa area premolar saja, hilangnya lebar *alveolar ridge* 4,9 mm (45%) dilaporkan, dari yang 3,1 mm (28,4%) terjadi dalam 12 minggu pertama (Schropp *et al.* 2003). Lebih besar pengurangan ridge alveolar horizontal (29-63%; 3,79 mm) dibandingkan kehilangan tulang vertikal (11-22%; 1,24 mm pada bukal, 0,84 mm pada mesial, dan 0,80 pada distal) pada 6 bulan (Tan *et al.* 2012).

2.5.4 Socket Healing

Segera setelah ekstraksi gigi, soket alveolar diisi dengan blood clot yang digantikan oleh jaringan granulasi dalam 1 minggu (Pagni *et al.* 2012). Dalam penyembuhan luka kulit, sel-sel epitel bermigrasi di bawahnya dan dilindungi *blood clot*. Dalam penyembuhan soket sebagai gantinya, epitel bermigrasi di atas jaringan granulasi untuk menutupi penyembuhan soket. Ini terjadi karena jaringan radang sebagai jaringan ikat oleh sel-sel epitel, oleh karena itu migrasi seluler terjadi di permukaannya. Ini penting ketika kita memeriksa panduan regenerasi tulang yang diterapkan pada *graft*. Mulai dari apikal dan dinding tulang *residual lateral*, jaringan granulasi cepat direnovasi menjadi matriks sementara. Proses mineralisasi mengarah pada pembentukan anyaman tulang yang akhirnya digantikan oleh *mature bone* (Trombelli *et al.* 2008)

2.5.5 Rasional Ekstraksi Soket Preservasi

Pembentukan tulang di soket alveolar terjadi secara alami selama dinding alveolar di sekitarnya tetap utuh. Untuk mengurangi kehilangan tulang alveolar yang dapat diterima, beberapa teknik bedah telah dilakukan. Mengurangi trauma ekstraksi dan pembatasan *flap* sangat penting untuk memperoleh kesuksesan dalam setiap prosedur ini (Fickl *et al.* 2008). Penelitian pada hewan menunjukkan hasil yang beragam ketika mengevaluasi perbedaan remodeling *ridge* antara *flap* dan *nonflap* soket ekstraksi (Caneva *et al.* 2010) meskipun telah dihipotesiskan bahwa dengan mengganggu lapisan tipis sel yang terdiri lapisan osteogenik dari periosteum dewasa, ketinggian *flap* dapat mengurangi kemampuan sel periosteal meregenerasi tulang, sementara periosteum yang tidak terganggu mempertahankan potensi osteogeniknya (Araújo and Lindhe 2005).

Ada kemungkinan ketinggian *flap* hanya mempengaruhi perubahan dimensi alveolar jangka pendek (Tan *et al.* 2012) sedangkan dalam jangka panjang tidak cukup berarti perbedaan yang ditemukan (Caneva *et al.* 2010). Dalam regenerasi tulang terdapat metode yang dapat digunakan untuk meningkatkan laju pembentukan tulang dan untuk menambah volume tulang: (Clarke and Khosla 2010)

- 1) osteoinduksi oleh penggunaan faktor pertumbuhan yang tepat
- 2) osteokonduksi, di mana bahan *graft* berfungsi sebagai *scaffold* untuk pertumbuhan tulang baru
- 3) osteogenesis distraksi, dimana fraktur dilakukan dengan pembedahan diinduksi dan fragmen tulang kemudian perlahan-lahan ditarik terpisah. Akhirnya, memandu regenerasi jaringan yang memungkinkan adanya ruang, dipertahankan oleh membran penghalang untuk diisi dengan tulang baru.

2.5.6 Fitur mikroskopis dari tulang

Jaringan tulang dapat diklasifikasikan berdasarkan susunan serat kolagen menjadi dua jenis: *woven bone* dan *lamellar bone* (Khurana 2009).

1) *Woven bone* :

Bentuk tulang ini terdiri dari serat kolagen yang diorientasikan secara acak, dengan sejumlah besar osteoblas dan sel-sel osteoprogenitor berdampingan. Di bawah cahaya terpolarisasi, *woven bone* memiliki struktur tidak beraturan yang sangat kontras dengan tulang pipih. *Woven bone* mengandung relatif lebih banyak sel per satuan luas dari *mature bone*.

2) *Lamellar bone* :

Lamellar bone adalah bentuk *mature* dari tulang dewasa. Ini mudah diidentifikasi pada mikroskop cahaya terpolarisasi sebagai garis paralel dari tulang yang diendapkan. Penelitian telah menunjukkan bahwa *lamellar bone* memiliki susunan serat kolagen yang teratur.

2.6 Mekanisme Hantaran Sinyal Pada Proses Inflamasi

Banyak faktor yang menginduksi terjadinya radang/ inflamasi, pada dasarnya dikelompokkan menjadi dua yaitu *pathogen associated molecule pattern* (PAMPs) dan *damage associated molecular pattern* (DAMPs) atau juga disebut *danger associated molecular pattern*. *Pathogen Associated Molecule Pattern* PAMPs adalah merupakan suatu bahan bisa berupa tubuh mikroba (bakteri patogen) itu sendiri atau bahan yang dilepaskan oleh patogen seperti toksin, ketika patogen tersebut berada didalam tubuh inang. Sedangkan DAMPs adalah suatu bahan yang berasal dari kerusakan sel inang yang berupa debris sel, dimana bahan ini terjadi karena di induksi oleh suatu rangsang yang bersifat *irreversible* (Calfee and Matthay 2010).

2.6.1 DAMPs dan Proses Inflamasi

Ketika didalam tubuh inang terjadi pembentukan *damage associated molecular pattern* (DAMPs) atau *danger associated molecular pattern* (Land, 2015) baik berasal dari protein inti atau protein sitoplasma yang terlepas ke luar sel akibat cedera sel, maka pelepasan DAMPs ke ekstraseluler diikat oleh sel inflamatori seperti monosit/ makrofag, melalui suatu system reseptor permukaan. Reseptor yang dapat

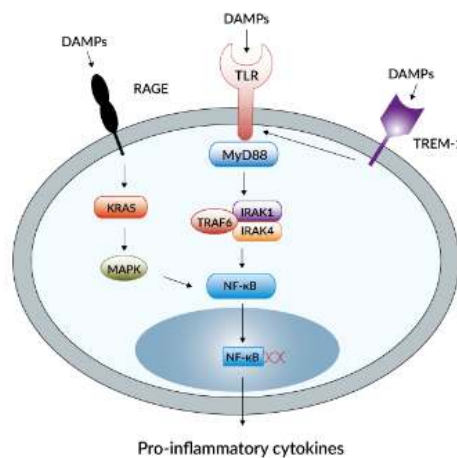
mengikat DAMPs tersebut antara lain *Toll Like Receptor* (TLR), *receptor advanced glycation end products* (RAGE) dan *triggering receptor expressed on myeloid cells* (TREM) (Srikrishna and Freeze 2015).

Dalam kondisi stres seluler atau cedera, molekul-molekul ini kemudian dapat dilepaskan ke dalam lingkungan ekstraseluler dengan *dying cells* dan trigger inflamasi dalam kondisi steril. Jenis sel kematian terutama mempengaruhi imunogenisitas dan kemampuannya untuk melepaskan DAMPs imunostimulator. DAMPs dapat diartikan sebagai sinyal potensi bahaya bagi host. Nekrosis biasanya terjadi di bawah kondisi kerusakan ekstrem (misalnya, iskemia atau trauma) ketika apoptosis gagal terjadi. Konsekuensi dari kematian sel nekrotik adalah hilangnya plasma integritas membran, dengan demikian memungkinkan lepasnya intraseluler bahan dari sel. *Sterile inflammatory signal* DAMPs berasal dari sel nekrotik termasuk kromatin protein kelompok *high-mobility group box 1* (HMGB1), *heat shock protein* (HSPs), dan metabolit purin, seperti *Adenosine triphosphate* (ATP) dan *uric acid* (Chen and Nuñez 2010). Sebagai tambahan DAMPs dari sumber intraseluler, ada juga DAMPs yang terletak di luar sel. Ini dirilis oleh degradasi matriks ekstraseluler selama cedera jaringan. fragmen matriks ekstraseluler, seperti hyaluronan, heparan sulfat dan biglycan, dihasilkan sebagai hasil dari proteolisis oleh enzim yang dilepaskan dari *dying cells* atau dengan protease yang diaktifkan untuk tissue repair dan remodelling (Chen and Nuñez 2010)

Pada signaling inflamasi yang di induksi antara ikatan DAMPs dengan reseptornya dipermukaan sel inflamatori seperti RAGE, TLR, maupun TREM, maka di dalam sitosol sel tersebut akan terjadi suatu proses signaling (Vénéreau *et al.* 2015). Bila DAMPs mengikat TLR atau TREM, maka didalam sitosol sel inflamasi terjadi aktivasi MyD-88, selanjutnya MyD-88 ini akan mengaktifkan *TNF receptor associated factor 6* (TRAF-6), kemudian TRAF-6 mengaktifkan *IL1-receptor associated kinases 1* (IRAK-1) dan *IL1-receptor associated kinases 4* (IRAK-4), kedua bahan ini mengaktifkan Nfk β . Selanjutnya Nfk β yang aktif akan translokasi ke inti untuk

menginduksi DNA melakukan sintesis pada sitokin proinflamasi (Piccinini and Midwood 2010).

Selanjutnya apabila DAMPs berikatan dengan RAGE dipermukaan sel inflamatori, maka didalam sitosolik sel tersebut akan terjadi signalling yang dimulai dari aktivitas KRAS, selanjutnya KRAS mengaktifkan *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK), kemudian MAPK mengaktifkan Nfk β . Selanjutnya Nfk β yang aktif translokasi ke inti sel menginduksi DNA untuk melakukan sintesis pada sitokin proinflamasi. Adapun sitokin proinflamasi yang disintesis pada proses ini antara lain IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α (Rosin and Okusa 2011).



Gambar 2. 8 : Hantaran sinyal pada proses pelepasan sitokin proinflamasi ketika makrofag terinduksi oleh DAMPs (Mueller 2013)

2.7 *Tool Like Receptor* (TLR)

Tool Like Receptor adalah family *Pattern Recognition Receptors* (PRR) tipe I patogen yang menyerang atau *endogenous damage signals* dan memulai respons imun bawaan dan adaptif. Ada sepuluh TLR fungsional pada manusia (TLR1-10) dan dua belas pada tikus (TLR1-9, 11-13). Berbagai kombinasi TLR diekspresikan oleh beberapa bagian yang berbeda dari tipe sel imun dan non-imun seperti monosit, makrofag, sel dendritik, neutrofil, sel B, sel T, fibroblas, sel endotel, dan sel epitel. Dari TLR manusia, TLR1, 2, 4, 5,6, dan 10 diekspresikan pada permukaan sel dan terutama

mengenali membran mikroba dan / atau komponen dinding sel, sedangkan TLR3, 7, 8, dan 9 diekspresikan dalam membran kompartemen endolisosom dan mengenali asam nukleat (Takeda *et al.* 2003).

2.7.1 Toll Like Receptor 2 (TLR2)

Toll-like receptor (TLR) adalah regulator utama dari *innate immunity* dan memainkan peran integral dalam aktivasi respon inflamasi selama infeksi. Selain itu, TLR mempengaruhi respons tubuh terhadap berbagai bentuk *injury* (Gesuete *et al.* 2014). Adanya trauma akan melepaskan sinyal DAMPs dan sekresi ligan endogenous (Vourc'h, Roquilly and Asehnoune, 2018). *Damage Associated Molecular Patterns* juga dikenal sebagai alarmin, adalah molekul yang dilepaskan oleh sel-sel stres yang mengalami nekrosis yang bertindak sebagai sinyal bahaya endogen dan memperburuk respon inflamasi. Peningkatan kadar serum DAMPs ini telah dikaitkan dengan banyak penyakit radang, termasuk sepsis, radang sendi, aterosklerosis, lupus, penyakit Crohn, dan kanker. Strategi terapi sedang dikembangkan untuk memodulasi ekspresi DAMPs ini untuk pengobatan. Ekspresi atau sekresi ligan endogenous, akan langsung menstimuli sinyal TLR2 untuk merespons adanya kerusakan jaringan (Zanin-Zhorov and Cohen, 2013) (Vartanian and Stenzel-Poore, 2010). TLR2 membutuhkan MyD88 sebagai adaptor protein (Sacre *et al.* 2007). MyD88 mengaktifasi IRAK dan IRAK mengaktifasi TRAF6 (Muroi and Tanamoto 2007). Aktivitas TRAF6 mengaktifasi *TGF- β -associated kinase 1* (TAK1) kinase. Aktivasi TAK1 menyebabkan fosforilasi, sehingga ikatan I κ B dengan Nf κ B di sitoplasma terlepas. Nf κ B yang tidak aktif, menjadi aktif dan masuk ke nukleus (Sorrentino *et al.* 2008). Nf κ B merupakan pengatur ekspresi gen proinflamasi yang paling penting (Lawrence 2009).

2.8 Makrofag

Sel yang paling berperan pada reaksi inflamasi adalah makrofag dan neutrophil, karena kedua sel ini mempunyai kemampuan yang sangat unik dalam mengeliminasi atau memfagositosis patogen (Weiss and Schaible 2015). Makrofag dibentuk

disumsum tulang dari sel punca darah yang disebut *hemaphoitic stem cells* (HSCs) yaitu melalui proses hematopoitik, dimana sel punca tersebut di sumsum tulang mengalami deferensiasi dan proliferasi menjadi monoblast, selanjutnya *monoblast* maturasi menjadi monosit. Selanjutnya monosit yang terbentuk pada sumsum tulang akan migrasi ke perifer (Mikkola 2006).

Ketika monosit migrasi ke perifer, monosit tersebut dapat berdiferensiasi menjadi dua yaitu makrofag yang berperan pada inflamasi/ proinflamasi (makrofag M-1) dan makrofag yang berperan pada anti inflamasi (makrofag M-2) (Atri *et al.* 2018). Makrofag- M1, pada inflamasi mengekspresikan *tool like receptor* (TLR) (Matsumoto *et al.* 2013) yang mengatur pola patogen dan kerusakan sel, yang terkait dengan *pathogen associated molecule pattern* (PAMPs) dan *damage associated molecule pattern* (DAMPs) (Coyne *et al.* 2012).

Berdasarkan fungsinya, makrofag M-1 selain mengeliminasi patogen yang masuk ke dalam tubuh juga bertanggung jawab pada pengelolaan bahan atau komponen yang dilepas patogen atau juga pengelolaan komponen sel yang rusak (sel debris). Aktivitas makrofag M-1 pada pengelolaan berbagai bahan tersebut mengakibatkan didalam tubuh makrofag terjadi proses *signalling intraseluler* (Coyne *et al.* 2012) dan selanjutnya dilepas beberapa molekul seperti sitokin (IL-1, IFN- γ , TNF- α) myeloperoksidase, superoksid yang mengawali terjadinya reaksi inflamasi, apabila terjadi reaksi inflamasi berlebihan, maka salah satu sel yang berperan untuk meregulasi reaksi tersebut adalah makrofag M-2, dimana sel ini mengekspresikan IL-10 yang berperan sebagai anti inflamasi (Shouval *et al.* 2014)

2.9 Inflamasi (Radang)

Inflamasi adalah respon sistem imun bawaan terhadap berbagai stimulus yang merusak, seperti patogen, luka, atau stress metabolik. Respon ini akan bekerja ketika pertahanan otonomi jaringan tidak cukup atau tidak mampu mengendalikan stimulus. Respon inflamasi merupakan strategi protektif yang memungkinkan tubuh

menghilangkan stimulus tersebut serta memulai proses penyembuhan jaringan yang rusak. Fungsi utama terjadinya inflamasi adalah untuk mengembalikan tubuh ke dalam kondisi homeostatik yang optimal (Antonelli and Kushner 2017, Ahmed 2011).

Inflamasi telah dijabarkan sejak ratusan tahun lalu, di mana lima gejala klasiknya hingga saat ini dapat dikenali dengan mudah, yaitu : *rubor* (kemerahan), *dolor* (rasa sakit), *kalor* (panas), *tumor* (pembengkakan), dan *functio laesa* (gangguan fungsi). Selain itu, terdapat pula gejala tambahan yang dapat ditemukan pada gambaran umum inflamasi, yaitu perubahan keseimbangan asam-basa akibat pH asam (asidosis) oleh karena terjadinya hipoksia (Kuprash and Nedospasov 2016, Ahmed 2011).

Umumnya, selama respon inflamasi akut, interaksi dan regulasi seluler serta molekuler secara efisien akan meminimalisir kerusakan atau infeksi yang terjadi. Namun, apabila inflamasi akut tidak terkontrol atau stimulus sulit dihilangkan, inflamasi dapat berlanjut menjadi kronis dan dapat berkontribusi dalam munculnya kondisi patologis seperti penyakit autoimun, diabetes, dan kanker (Fang *et al.* 2017). Inflamasi akan dimulai dalam hitungan menit setelah adanya stimulus apabila host memiliki sistem imun bawaan yang fungsional. Oleh karena sistem imun bawaan adalah kontributor terbesar bagi inflamasi, maka sel imun seperti makrofag, sel dendritik, sel mast, netrofil, dan limfosit memiliki peran penting dalam respon inflamasi. Selain sel imun, sel non-imun seperti sel epitel, endotel, dan fibroblas juga berkontribusi dalam proses inflamasi (Ahmed 2011).

Respon inflamasi merupakan suatu program yang sangat terkontrol dan proses responnya berbeda-beda tergantung pada ciri stimulus awal yang diterima tubuh serta lokasi stimulus tersebut diterima. Namun, terdapat mekanisme sederhana terjadinya proses inflamasi yang dapat disimpulkan menjadi: 1) reseptor pengenalan pola pada permukaan sel mengenali stimulus; 2) aktivasi jalur inflamasi; 3) marker inflamasi dilepaskan; dan 4) perekrutan sel inflamasi (Fang *et al.* 2017).

2.9.1 Aktivasi Pattern Recognition Receptors (PRRs)

Aktivasi reseptor pengenalan pola (*pattern-recognition receptors/PRRs*) pada sel imun maupun non-imun terjadi setelah interaksi struktur mikroba, yaitu pola molekuler terkait patogen (*pathogen-associated molecular patterns/PAMPs*), dengan permukaan sel. PRRs akan mengenali molekul lipid, karbohidrat, peptida, dan asam nukleat yang secara struktural tersimpan sebagai komponen patogen mikroba dan virus. Beberapa PRRs juga dapat mengenali sejumlah sinyal endogen yang teraktivasi saat terjadi kerusakan jaringan atau sel dan dikenali sebagai pola molekuler terkait kerusakan (*danger-associated molecular patterns/DAMPs*). DAMPs adalah biomolekul host yang dapat memulai dan melangsungkan suatu respon inflamasi non-infeksius, seperti ATP, ion kalium, asam urat, high-mobility group box 1 (HMGB1), dan *heat-shock protein* yang dilepaskan oleh kematian sel nekrotik abnormal, biasanya ditemukan pada jaringan adiposa diabetik dan plak aterosklerotik (Fang *et al.* 2017, Huang and Glass 2010).

Terdapat empat famili utama dari PRRs, yaitu :

1. Famili reseptor seperti-domain oligomerisasi pengikat-nukleotida (*NOD-like receptors/NLRs*) (reseptor domain oligomerisasi pengikat-nukleotida, dan protein mengandung domain NACHT, LRR dan PYD).
2. Reseptor seperti-Toll (*Toll-like receptors/TLRs*).
3. Molekul seperti-tipe-C lektin (*C-type lectin-like molecules/CLRs*), termasuk reseptor mannanose dan reseptor β -glukan.
4. Famili reseptor dengan RNA-helikase dan domain rekrutmen-kaspase (gen I yang dapat diinduksi asam retinoat (*retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors/RLRs*) dan gen 5 terkait diferensiasi melanoma) (Huang and Glass 2010), TLRs merupakan famili PRR yang paling banyak diteliti, di mana lebih dari sepuluh anggota famili TLR telah diidentifikasi (Fang *et al.* 2017).

2.9.2 Peran PRRs: DAMPs endogen oleh TLR

Rangsangan endogen dapat menyebabkan respon inflamasi steril melalui TLR. Beberapa molekul endogen murni, termasuk HSP, HMGB1 dan uric acid, bisa menginduksi produksi proinflamasi sitokin melalui TLR2 dan / atau TLR4 secara in vitro. Relevansi dari pengamatan ini sebelumnya telah dipertanyakan karena kemungkinan kontaminasi mikroba beberapa protein termasuk HSP dan HMGB1, bind lipopolysaccharide (LPS), membuat interpretasi dari respon proinflamasi menjadi sulit. bahwa pensinyalan TLR2 dan TLR4 bukan mekanisme utama dimana faktor intraseluler menginduksi respons inflamasi terhadap kematian sel nekrotik (Chen and Nuñez 2010)

2.9.3 Aktivasi Jalur Inflamasi

Transduksi sinyal dari PRR akan mengaktifasi suatu faktor transkripsi yang memproduksi sitokin dan kemokin proinflamasi, seperti *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α), *Interleukin-1 β* (IL-1 β), dan *Interleukin-6* (IL-6) yang diekspresikan sebagai respon terhadap infeksi bakteri (Ahmed 2011). Faktor transkripsi teraktivasi melalui jalur penghantaran sinyal intraseluler, di antaranya jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *nuclear factor kappa-B* (NF- κ B), dan *Janus kinase* (JAK)-*signal transducer and activator of transcription* (STAT) (Fang et al. 2017).

2.9.3.1 NF- κ B signaling pada inflamasi

NF- κ B merupakan faktor transkripsi pertama yang teridentifikasi dengan aktivitas pengikat DNA spesifik-sekuens yang diinduksi hanya oleh stimulus yang sesuai. NF- κ B juga merupakan salah satu faktor transkripsi yang paling banyak diteliti, sehingga telah banyak pengetahuan mengenai mekanisme inflamasi yang sangat kompleks dari aktivasi selektif ekspresi suatu set gen (Ahmed 2011).

Faktor transkripsi NF- κ B memiliki peran penting dalam proses inflamasi, respon imun, bertahan hidup, dan apoptosis. Famili NF- κ B meliputi lima faktor transkripsi terkait, yaitu P50, p52, RelA (p65), RelB, dan c-Rel. Apabila dalam kondisi

fisiologis, protein I κ B dalam sitoplasma akan menghambat NF- κ B. Namun, apabila diinduksi oleh stimulus seperti substansi patogen, sitokin inflamasi interseluler, dan enzim, I κ B kinase (IKK) akan teraktivasi oleh PRR. IKK terdiri dari dua subunit kinase, IKK α dan IKK β , dan satu subunit regulatori, seperti IKK γ . IKK mengatur aktivasi jalur NF- κ B melalui fosforilasi I κ B, dan menyebabkan degradasi I κ B oleh proteasom dan dilepaskannya NF- κ B untuk aktivasi translokasi dan transkripsi gen. Jalur ini meregulasi produksi sitokin pro-inflamasi dan rekrutmen sel inflamasi (Fang *et al.* 2017, Ahmed 2011).

2.9.4 Pelepasan Marker Inflamasi

Marker inflamasi digunakan dalam aplikasi klinis untuk menentukan proses biologis patogenik atau normal, serta menilai respon pasien terhadap intervensi terapeutik. Molekul-molekul seperti sel inflamasi, yaitu makrofag, dan adiposit, serta sitokin inflamasi seperti IL-1 β , IL-6, TNF- α , protein dan enzim inflamasi dapat menjadi biomarker untuk penentuan diagnosis, prognosis, dan rencana perawatan (Fang *et al.* 2017).

2.9.5 Rekrutmen Sel Inflamasi

Respon inflamasi melibatkan jejaring yang sangat terkoordinasi dari banyak tipe sel. Makrofag teraktivasi, monosit, dan sel lain memediasi respon lokal terhadap kerusakan jaringan dan infeksi. Ketika terjadi kerusakan jaringan, sel epitel dan endotel yang rusak melepaskan faktor yang merangsang kaskade inflamasi, bersama dengan kemokin dan *growth factor*, yang menarik netrofil dan monosit. Sel yang paling pertama muncul di tempat kerusakan adalah netrofil, kemudian monosit, limfosit (sel *natural killer*/NK, sel T, dan sel B), dan sel mast. Monosit dapat berdiferensiasi menjadi makrofag dan sel dendritik dan direkrut ke jaringan yang rusak melalui kemotaksis (Fang *et al.* 2017).

Netrofil yang melawan mikroorganisme dalam tubuh juga dapat merusak sel dan jaringan host. Netrofil merupakan mediator utama respon inflamasi, dan

merancang sel pembawa antigen untuk mengaktivasi sel T dan melepaskan faktor terlokalisir untuk menarik monosit dan sel dendritik. Makrofag merupakan komponen penting dari sistem fagosit mononuklear, dan penting dalam inisiasi, pemeliharaan, dan pengakhiran inflamasi. Selama inflamasi, makrofag membawa antigen, melalui fagositosis, dan memodulasi respon imun dengan menghasilkan sitokin dan *growth factor*. Sel mast, yang berdiam dalam matriks jaringan ikat dan pada permukaan epitel, merupakan sel efektor yang memulai respon inflamasi. Sel mast teraktivasi melepaskan sejumlah mediator inflamasi, termasuk sitokin, kemokin, histamin, protease, prostaglandin, leukotrien, dan proteoglikan serglisin. Selain itu, interaksi platelet dengan sel inflamasi juga dapat memediasi terjadinya kondisi pro-inflamasi (Fang *et al.* 2017).

Ketika stimulus yang berpotensi merusak telah dihilangkan, di mana secara seluler tidak lagi terdeteksi PAMP dan DAMP, maka reaksi inflamasi akan dihentikan oleh tubuh. Pengembalian dari respon inflamasi ke kondisi homeostatik disebut sebagai resolusi atau pengakhiran inflamasi, yang biasanya berlangsung cukup cepat. Resolusi inflamasi didominasi oleh mediator anti-inflamasi seperti IL-10, TGF- β (*Transforming growth factor- β*), dan glukokortikoid, serta melibatkan monosit untuk membersihkan debris-debris sel. Setelah gradien kemokin larut seiring waktu, maka infiltrasi netrofil ke jaringan akan menurun atau dihentikan, terjadi apoptosis netrofil yang telah bekerja, regulasi balik kemokin dan sitokin, transformasi makrofag dari sel teraktivasi secara klasik menjadi secara alternatif, lalu proses penyembuhan akan dimulai (Fang *et al.* 2017, Janssen and Henson 2012, Ahmed 2011).

2.10 Pensinyalan molekuler di balik anabolisme tulang yang diinduksi polifenol

Bone loss merupakan konsekuensi dari perubahan yang terjadi pada aktivitas sel tulang selama remodeling tulang, yang menyebabkan ketidakseimbangan antara resorpsi dan pembentukan tulang dan menyebabkan gangguan tulang, seperti osteoporosis dan peningkatan risiko patah tulang (Stavros C. Manolagas 2000). Selama remodeling fisiologis normal, di mana kerangka dewasa mengalami proses terus

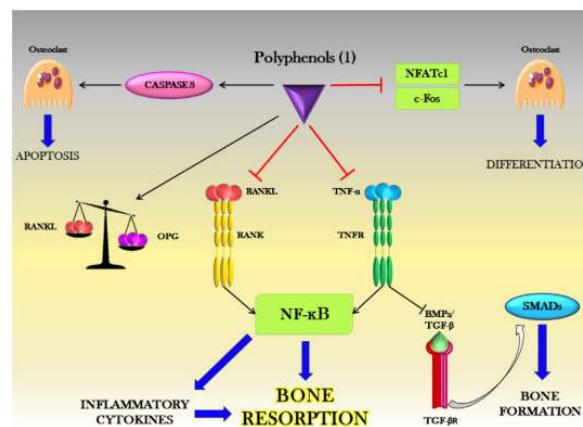
menerus regenerasi, pembentukan tulang mengikuti resorpsi dalam mekanisme "digabungkan" yang dikendalikan oleh berbagai faktor molekuler. Efek yang tidak seimbang dari faktor-faktor ini dapat menyebabkan ketidakseimbangan yang bertanggung jawab atas penurunan massa tulang, di mana perpanjangan masa kerja osteoklas berdampingan dengan pemendekan masa kerja osteoblas (Torre 2017). Berbagai jenis sel terlibat dalam proses remodeling, masing-masing jenis memainkan peran berbeda dalam pergantian tulang: osteoblas mendukung pembentukan tulang, osteoklas terlibat dalam resorpsi tulang dan osteosit memainkan peran sentral dengan bertindak sebagai sensor sinyal utama, integrator dan transduser dalam remodeling. kompartemen, dengan berbagai fungsi endokrin mereka yang terlibat dalam regulasi aktivitas osteoklas dan osteoblas (Bonewald 2011).

Polifenol adalah fitokimia yang biasa ditemukan di *plant kingdom*, yang beberapa efek biologisnya telah dilaporkan melindungi terhadap penyakit kronis, termasuk penyakit neurodegeneratif dan kardiovaskular, kanker dan osteoporosis (Scalbert *et al.* 2005). Tindakan menguntungkan senyawa fenolik terutama karena sifat antioksidannya, karena mereka dapat bertindak sebagai scavengers dari *reactive oxygen species* (ROS), tetapi juga interaksinya dengan kaskade sinyal intraseluler seperti *phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate 3-kinase* (PI3K), *protein kinase B* (PKB)/Akt, *tyrosine kinases*, *protein kinase C* (PKC) and *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) yang mengarah pada aktivitas anti-inflamasi, kemopreventif dan kemoterapi. (Torre 2017).

Banyak laporan telah memberikan bukti manfaat yang diperoleh dari suplemen makanan polifenol dalam pencegahan dan pengobatan osteoporosis. Polifenol mampu melindungi tulang, berkat sifat antioksidannya, serta tindakan anti-inflamasinya dengan melibatkan jalur pensinyalan yang beragam, sehingga mengarah pada efek anabolik tulang dan penurunan resorpsi tulang.

2.10.1 Jalur respon inflamasi

Inflamasi adalah proses di mana sistem kekebalan merespons infeksi dan cedera, sehingga memungkinkan penghapusan rangsangan berbahaya dan penyembuhan jaringan yang rusak, yang bertujuan memulihkan host homeostasis. Ini adalah rangkaian peristiwa yang kompleks yang mencakup inisiasi, regulasi dan resolusi, dengan berbagai bentuk dipicu oleh rangsangan yang berbeda dan berbagai mekanisme molekuler *cross-talking* (Torre 2017). Beberapa penelitian telah menyelidiki anti-inflamasi aktivitas anti-inflamasi dan imunomodulator polifenol, menunjukkan interaksi mereka dengan spektrum yang luas dari target molekul pusat sinyal inflamasi, sehingga mengarahkan efek penghambatan pada produksi mediator inflamasi dan tindakan detoksifikasi antioksidan (González-Gallego *et al.* 2010). Polifenol yang berbeda mengarahkan efek osteoprotektifnya melalui penekanan NF- κ B yang diinduksi RANKL, sehingga mempengaruhi diferensiasi osteoklas dan remodeling tulang.



Gambar 2. 9 : Sifat anti-inflamasi polifenol dalam mengontrol resorpsi tulang. Aktivasi NF- κ B yang diinduksi inflamasi dihambat oleh polifenol, yang efektif dalam memicu apoptosis osteoklas dan menghambat diferensiasi osteoklas (Torre 2017)

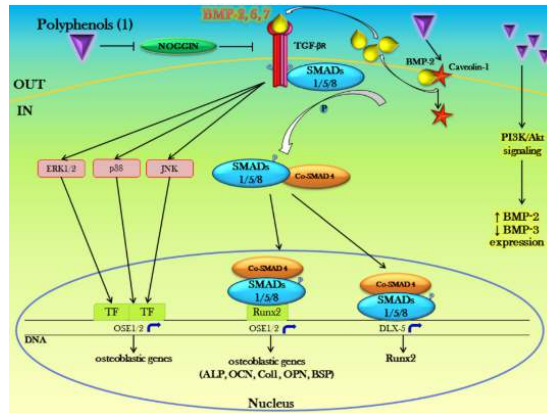
2.10.2 Jalur pensinyalan Akt

Beberapa tirosin kinase, seperti reseptor insulin dan reseptor sitokin, mengambil bagian dalam *promotion of cell survival* dan proliferasi sel, melalui

pengaktifan jalur fosfoinositida. Setelah diaktifkan, reseptor ini merekrut enzim PI3K, yang secara langsung mengaktifkan kinase bernama Akt (Torre 2017). Di antara beberapa TF yang diaktifkan oleh PI3K/Akt jalur, NF- κ B, FoxOs dan *cAMP response element binding protein* (CREB) telah terbukti memiliki peran dalam mengatur jalur osteogenik yang terlibat dalam diferensiasi osteoblas. Secara khusus, aktivasi Akt juga mempengaruhi FoxO3, Runx2, Osx dan *activating transcription factor* (Atf)-4, yang secara langsung terlibat dalam perkembangan tulang dan fungsi sel tulang. *Cross-talk* dengan jalur pensinyalan osteogenik lainnya, seperti Wnt, BMP dan NO/cGMP juga dapat terjadi, sehingga berkontribusi untuk meningkatkan atau mempertahankan perkembangan tulang (Guntur and Rosen 2011). Penargetan jalur PI3K/Akt oleh polifenol mengarah pada pengendalian serangkaian mekanisme yang terlibat dalam kelangsungan hidup sel, pertumbuhan dan proliferasi dan, mengenai sistem tulang, induksi proliferasi dan diferensiasi osteoblas, sementara penghambatan proliferasi dan diferensiasi osteoklas, menghasilkan efek osteoanabolik (Torre 2017).

2.10.3 Jalur pensinyalan TGF- β /BMP

BMP adalah sekelompok faktor pertumbuhan yang termasuk dalam superfamili TGF- β . Peran ganda mereka bervariasi dari pengaturan induksi tulang, pemeliharaan dan perbaikan, hingga penentuan proses perkembangan embriologis non-osteogenik dan pemeliharaan homeostasis jaringan dewasa (Chen *et al.* 2004). Keterlibatan pensinyalan BMP dalam polifenol-anabolisme tulang yang dimediasi sebagian besar telah diselidiki dan beberapa bukti menunjukkan peningkatan pertumbuhan tulang baru melalui peningkatan aktivitas promotor BMP-2 dan mRNA BMP-2 dan ekspresi protein (J. Zhang *et al.* 2012).



Gambar 2. 10 : Polifenol melawan *bone disease* juga melalui pensinyalan BMP. BMP-2, BMP-6 dan BMP-7 diinduksi oleh polifenol untuk mengaktifkan kaskade SMAD dan dengan mengekspresikan gen osteoblastik yang penting dalam diferensiasi dan fungsi osteoblas (Torre 2017)

2.11 Sitokin proinflamasi

Sitokin proinflamasi diproduksi terutama oleh makrofag teraktivasi dan terlibat dalam pengaturan reaksi inflamasi (Zhang and An 2009). TNF- α , IL-6, dan IL-1 merupakan sitokin proinflamasi yang meningkatkan peradangan

2.11.1 Tumor Necrotic Factor Alpha (TNF α)

Tumor Necrosis Factor- α (TNF α) telah dikloning lebih dari 2 dekade dan identifikasi sebagian mengarah pada penemuan *super family* (TNF) dan reseptornya. Sinyal TNF α melalui dua reseptor transmembran, TNFR1 dan TNFR2, dan mengatur sejumlah fungsi sel kritis termasuk proliferasi sel, survival, diferensiasi, dan apoptosis. (Zhang and An 2009).

2.11.1.1 Peran TNF α dalam inflamasi

Tumor Necrosis Factor- α adalah agen proinflamasi yang kuat yang mengatur banyak sisi fungsi makrofag. Ini cepat dilepaskan setelah trauma, infeksi, atau paparan LPS yang berasal dari bakteri dan telah terbukti menjadi salah satu mediator awal yang paling melimpah dalam jaringan yang meradang. Di antara berbagai fungsinya adalah perannya yang sangat penting dalam mengatur produksi suatu sitokin inflamasi dan

sebagai “*master regulator*” produksi sitokin proinflamasi. Berdasarkan peran ini, TNF α memiliki sentral dalam aktivasi dan rekrutmen sel radang dan berperan penting dalam pengembangan banyak penyakit radang kronis (Musco and van Staden 2010)

2.11.1.2 Peran TNF α dalam Aktivasi Makrofag

TLR menginduksi produksi TNF- α dari makrofag dan mengaktifkan makrofag, Studi tentang pensinyalan TNF α pada makrofag sebagian besar berfokus pada kondisi akut dan sementara aktivasi jalur transduksi sinyal dan faktor transkripsi seperti NF κ B (Musco and van Staden 2010)

2.11.2 *Interleukin 6* (IL-6)

Interleukin-6 adalah sitokin pleiotropik yang tidak hanya mengatur respon imun dan inflamasi tetapi juga mempengaruhi hematopoiesis, metabolisme, dan perkembangan organ. *Interleukin-6* secara bersamaan dapat memperoleh proses fisiopatologis yang berbeda atau bahkan kontradiktif, yang kemungkinan didiskriminasi oleh kaskade jalur pensinyalan, disebut klasik dan trans-pensinyalan. Selain memainkan beberapa peran fisiologis penting, disregulasi IL-6 telah terbukti mendasari sejumlah penyakit autoimun dan inflamasi, kelainan metabolisme, dan keganasan (Su *et al.* 2017).

2.11.2.1 Peran IL-6 dalam inflamasi

Telah diketahui bahwa IL-6 memodulasi diferensiasi monosit antara makrofag dan sel dendritik (DC). Makrofag memainkan peran penting dalam respons inflamasi dengan mengeluarkan sitokin, kemokin, dan matriks metalloproteinase (Su *et al.* 2017)

2.11.3 *Interleukin 1* (IL-1)

Interleukin-1 (IL-1) mewakili kelompok sitokin 17-20 kDa dengan berbagai fungsi biologis proses inflamasi. Anggotanya adalah IL-1 α , IL-1 β , dan IL-1Ra (antagonis reseptor). Kesamaan antara *family* IL-1 relatif kecil. Menurut struktur

protein primer, IL-1 α dan IL-1 β sekitar 30% berbeda satu sama lain (Dembic and Dembic 2015)

2.11.3.1 Peran IL-1 dalam inflamasi

Sumber fisiologis utama IL-1 adalah makrofag teraktivasi dan itu dibuat sebagai prekursor yang disebut pro-IL-1. Sekresi itu bisa dipicu oleh berbagai rangsangan proinflamasi, termasuk cedera sel, produk dari bakteri membran sel, zymosan, leukotrien, komponen komplemen yang diaktifkan, TNF, kompleks imun (Ig-antigen), faktor stimulasi koloni granulosit-makrofag (GM-CSF), dan IL-1 sendiri (autokrin) (Dembic and Dembic 2015).

2.12 Sitokin Anti inflamasi

Sitokin antiinflamasi adalah serangkaian molekul imunoregulator yang mengendalikan respons sitokin proinflamasi. Sitokin bekerja bersama dengan inhibitor sitokin spesifik dan reseptor sitokin terlarut untuk mengatur respon imun manusia. Berperan dalam inflamasi dan peran patologis dalam keadaan inflamasi sistemik. Interleukin 10 merupakan sitokin anti inflamasi yang menurunkan peradangan dan meningkatkan penyembuhan (Zhang and An 2007).

2.12.1 *Interleukin 10* (IL-10)

IL-10 memiliki nama lain seperti *Cytokine synthesis inhibitory factor* dan *T-cell growth inhibition factor* (Dembic and Dembic 2015). Di antara semua sitokin anti-inflamasi, IL-10 adalah sitokin dengan sifat anti-inflamasi yang kuat, menekan ekspresi sitokin inflamasi seperti TNF- α , IL-6 dan IL-1 oleh makrofag yang diaktifkan. Selain itu, IL-10 dapat mengatur-up anti-sitokin endogen dan menurunkan reseptor sitokin pro-inflamasi. Dengan demikian, ini dapat melawan pengaturan produksi dan fungsi sitokin proinflamasi pada berbagai tingkatan (Zhang and An 2009).

2.12.2 Peran IL-10 dalam anti inflamasi

Interleukin 10 diproduksi oleh banyak jenis sel lainnya, termasuk sel B, sel mast, eosinophil, makrofag dan sel dendritic (DC) dan sejumlah besar subset sel T seperti sel T CD8 dan sel T CD4 regulator yang dstimulasi oleh antigen. Interleukin 10 dapat menurunkan regulasi sintesis sitokin proinflamasi dan kemokin, seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α menurunkan regulasi sintesis nitratoksida, gelatinase dan kolagenase. Netralisasi spesifik IL-10 menghasilkan upregulasi sintesis IL-1 dan TNF- α , karena itu IL-10 juga dianggap sebagai pengatur penting homeostasis tulang dalam homeostatis dan kondisi inflamasi (Zhang *et al.* 2014).

2.12.3 *Interleukin 10* menghambat pembentukan osteoklas

Resorpsi tulang dilakukan terutama oleh produksi lokal sitokin proinflamasi, seperti IL-1 dan TNF- α . Sitokin ini dapat bertindak dengan meningkatkan secara langsung proliferasi dan aktivitas sel osteoklas atau dengan cara tidak langsung mempengaruhi produksi faktor-faktor diferensiasi osteoklas seperti RANKL dan OPG melalui osteoblas/ stroma sel. Interleukin 10 diakui memiliki aktivitas anti inflamasi yang kuat dalam jangka waktu yang lama dan hal tersebut berperan penting sebagai supresor endogen dari infeksi yang dstimulasi resorpsi tulang secara *in vivo*. Kesimpulannya IL-10 menekan diferensiasi osteoklastik melalui beberapa aspek (Zhang *et al.* 2014).

2.12.4 *Interleukin 10* memicu diferensiasi osteoblas

Van Vlasselaer dan rekan menyatakan bahwa IL-10 sebagai langkah awal dalam menurunkan diferensiasi osteogenik pada sumsum tulang sel tikus melalui penghambatan produksi TGF- β 1. Efek penghambatan ditahap awal diferensiasi osteogenik dinetralkan dengan down regulation sitokin inflamasi infeksi seperti TNF- α . Akhirnya IL-10 menghambat resorpsi tulang osteoklastik dan stimulasi pembentukan tulang osteoblastik (Zhang *et al.* 2014)

2.12.5 Regulasi molekular osteoblas

Regulasi pertumbuhan dan diferensiasi osteoblas dipengaruhi oleh growth factor yaitu *transforming growth factor- β* (TGF- β), *insulin-like growth factors* (IGFs), *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sedangkan faktor transkripsi meliputi Runx2, Osterix (Osx) dan Wnt/ β catenin. Diferensiasi osteoblas dimulai dengan pembentukan sel osteoprogenitor dari sel mesenchymal, diikuti oleh diferensiasi progresif mereka menjadi osteoblas matur yang mengekspresikan gen osteoblas, dan berakhir dengan menjadi osteosit dalam matriks tulang (Papachroni *et al.* 2009)

Runx2 berinteraksi dengan beberapa protein dalam inti sel untuk mengaktifkan gen yang mengontrol program proliferasi dan diferensiasi osteoblas. Transkripsi osx diatur oleh runx2 dengan berikatan dengan *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) yang mengakibatkan aktivasi COLIA1. Pada studi lain juga menunjukkan osx-NFAT mengaktifasi wnt/ β catenin yang menyebabkan meningkatnya pembentukan dan massa tulang (Papachroni *et al.* 2009)

2.12.6 Sel Osteoprogenitor

Sel osteoprogenitor merupakan sel yang belum berdiferensiasi, berasal dari jaringan ikat mesenkim. Sel ini memiliki daya mitotic dan kemampuan untuk berkembang menjadi dewasa. Sel ini biasanya ditemukan pada permukaan tulang di lapisan dalam periosteum, pada endosteum dan dalam saluran vascular dari tulang kompak (Kargozar *et al.* 2019). Ada 2 jenis sel osteoprogenitor :

- 1) Preosteoblas : memiliki sedikit retikulum endoplasma dan akan menghasilkan osteoblas
- 2) Preosteoklas : mengandung lebih banyak mitokondria dan ribosom bebas dan menghasilkan osteoklas

Sel osteoprogenitor juga distimulasi oleh bone morphogenetic protein (BMP), yaitu non kolagenus glikoprotein yang berada di dalam tulang dan juga oleh beberapa mediator kimiawi berupa sitokin yaitu platelet derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), zat morfogenik dan zat-zat eicosanoid seperti prostaglandin (PGE₂). Pada proses pembentukan tulang sebagian osteoblas akan berubah menjadi osteosit dan sebagian yang lainnya akan berada di permukaan periosteal atau endosteal tulang (lining cell) dengan karakteristik berbentuk pipih dan beberapa sel osteoblas berbentuk persegi panjang (Ardhiyanto 2012).

2.13 Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)

Bone Morphogenetic Protein adalah kelompok faktor-faktor pertumbuhan yang juga diketahui sebagai *sitogen* dan sebagai *metablogens*. Asalnya dari kemampuannya untuk menginduksi pembentukan tulang dan kartilago. *Bone Morphogenetic Protein* merupakan grup yang sangat penting dalam *morphogenetic signals*, yang menyusun arsitektur jaringan pada tubuh (Capra and Conti 2009).

Secara alami terdapat 7 ekson BMP, 6 diantaranya BMP (BMP2-BMP7) terdapat TGF- β yang merupakan protein *superfamily* dan BMP1 adalah *metalloprotease* (El Bialy *et al.* 2017). BMP akan berinteraksi dengan reseptor-reseptor spesifik pada pertumbuhan sel, diproduksi sebagai reseptor BMP (BMPRs) (Glister *et al.* 2004). *Signal transduction* melalui BMPRs mengakibatkan pergerakan dari anggota-anggota SMAD *family of protein* (Bonor *et al.* 2012). BMP-2 bekerja sebagai “*disulfida-linked homodimer*” dan menginduksi pembentukan tulang dan kartilago yang berperan penting pada diferensiasi osteoblas (O Carreira *et al.* 2014).

BMP adalah sekelompok faktor pertumbuhan yang termasuk dalam Superfamili TGF- β . Peran ganda bervariasi dari regulasi induksi tulang, *maintenance* dan *repair*, untuk penentuan embriologis non-osteogenik proses pengembangan dan pemeliharaan homeostasis jaringan dewasa (Joseph and Kalyanaraman 2004). Keterlibatan pensinyalan BMP dalam polifenol anabolisme tulang telah banyak

diselidiki dan beberapa bukti menunjukkan peningkatan tulang baru pertumbuhan melalui peningkatan BMP-2 aktivitas promotor dan mRNA dan protein ekspresi BMP-2 (L. Zhang *et al.* 2012).

Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) adalah salah satu faktor osteogenik yang paling sering digunakan untuk osteogenesis. Makrofag, bertindak sebagai sel imun dan prekursor osteoklas, memiliki input fungsional yang sangat diperlukan selama beberapa tahap penyembuhan tulang. Inflamasi yang seimbang sangat penting untuk penyembuhan tulang yang efektif, respon inflamasi yang parah atau berkepanjangan dapat merusak proses remodeling. Sekresi lokal BMP-2 di lokasi remodeling, yang berpotensi memicu komitmen M2, dapat meningkatkan respons anti-inflamasi oleh makrofag terpolarisasi. Oleh karena itu, BMP-2 saja, atau dikemas dalam bahan scaffold, dapat bertindak sebagai imunomodulator penting melalui jalur yang bergantung pada makrofag untuk mendukung penyembuhan tulang (Wei *et al.* 2018).

Protein morfogenetik tulang 2 (BMP-2) adalah penginduksi kuat pembentukan tulang melalui stimulasi diferensiasi osteoblas. Efek ini melalui dua jenis reseptor serin / treonin kinase: BMP-2 mengikat reseptor tipe II, yang kemudian mengaktifkan reseptor tipe I oleh asosiasi langsung. Sinyal dari reseptor tipe I teraktivasi ditransmisikan ke nukleus melalui berbagai molekul mediator, yang paling penting di antaranya adalah keluarga protein yang disebut Smads. Smad diklasifikasikan ke dalam tiga subkelompok, yaitu, Smad1, Smad5, dan Smad8 diklasifikasikan sebagai Smads yang diatur reseptor (R-Smads), Smad4 diklasifikasikan sebagai Smad (Co-Smad), dan Smad6 serta Smad7 digolongkan sebagai penghambatan Smads (I-Smads) (Ogasawara *et al.* 2004)

2.13.1 Jalur smad dari BMP-2 dalam osteogenesis

Ekspresi BMP-2 pada makrofag menunjukkan bahwa makrofag mampu mengatur fisiologis yang konsisten dengan peran kunci dalam osteoinduksi untuk

penyembuhan luka tulang. (Champagne *et al.* 2002). Selama perkembangannya, BMP adalah induktor dan stimulator sel terkuat diferensiasi. BMP tidak hanya merangsang osteoprogenitor untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas dewasa, tetapi juga menginduksi sel-sel non-osteogenik untuk berdiferensiasi menjadi sel-sel garis turunan osteoblas. Jalur transduksi sinyal BMP termasuk *main Smad pathway* 19 dan *non-Smad pathway*. Banyak penelitian menunjukkan bahwa R-Smads termasuk Smad 1, 4, 7, 5, dan 8, molekul reseptor BMP, berperan sentral dalam jalur transduksi sinyal BMP. Smad memediasi beberapa efek biologis berikutnya yang berbeda. Sebagai sinyal jalur transduksi BMP-2 di osteogenesis, reseptor BMP ligand-dependen hanya memfosforilasi R-Smad 1 dan 5 (Wu, C-J, Lu 2008).

2.13.2 Jalur Smad dari BMP 2 terhadap TNF- α

Dalam osteoimunologi, makrofag adalah komponen utama dalam tahap awal respons fisiologis setelah cedera tulang dan remodeling tulang pada tahap akhir. Selama proses ini, perubahan fenotipe makrofag dari pro-inflamasi (M1) menjadi anti-inflamasi (M2) diamati. Pilihan yang menarik untuk regenerasi tulang adalah memanfaatkan peran pengaturan ini untuk keuntungan diferensiasi osteogenik sel osteoprogenitor (misalnya, sel punca mesenkim; MSC) dan pada akhirnya memanfaatkan pengetahuan ini untuk meningkatkan hasil terapeutik dari pengobatan regeneratif tulang (Zhang *et al.* 2017).

Secara khusus, makrofag M2 mempromosikan proliferasi dan diferensiasi osteogenik MSC, sementara makrofag M0 dan M1 hanya merangsang diferensiasi osteogenik MSC pada tahap awal dan tengah selama kultur bersama. Sekresi faktor terlarut oncostatin M (OSM) dan protein morfogenetik tulang 2 (BMP-2) oleh makrofag menunjukkan korelasi dengan tingkat ekspresi gen MSC untuk reseptor OSM dan BMP-2, menunjukkan keterlibatan kedua jalur pensinyalan dalam diferensiasi osteogenik dari MSC (Zhang *et al.* 2017).

Khususnya TNF- α secara signifikan menekan aktivitas transkripsi Runx2 tetapi tidak mempengaruhi fosforilasi Smad1 / 5/8. TNF- α menghambat ekspresi dan aktivasi Runx2 yang diinduksi oleh BMP-2 tetapi tidak mempengaruhi pensinyalan BMP / Smad. Perawatan dengan TNF- α selama 2 jam tidak mempengaruhi fosforilasi yang diinduksi BMP-2 dari smad1 / 5/8, tetapi ekspresi Runx2 menurun dalam dosis yang tergantung setelah pengobatan dengan TNF- α selama 48 jam (Huang *et al.* 2014).

2.14 *Runt-related transcription factor 2 (Runx-2)*

Faktor transkripsi Runt 2 (RUNX2) adalah faktor transkripsi yang terkait erat dengan fenotip osteoblas. RUNX2 dikenal sebagai regulator utama diferensiasi osteoblas dan ekspresi gen penanda osteoblas serta fungsi osteoblas. Dalam biologi osteoblas, RUNX2 mengatur proses diferensiasi osteoblas pada berbagai tahap. Selama proses diferensiasi osteoblas, Runx2 sangat penting untuk komitmen sel punca mesenkim terhadap mesenchymal stem cells osteoblas dan secara positif memengaruhi tahap awal diferensiasi osteoblas. Selama proses diferensiasi osteoblas, Runx2 terlibat dalam ekspresi gen matriks tulang Coll, osteopontin (OPN), BSP, dan osteocalcin (OCN) dan mempertahankan ekspresi OPN dan BSP. Untuk bone maturation lebih lanjut, ekspresi Runx2 harus diturunkan regulasinya (Bruderer *et al.* 2014).

Runt-related transcription factor 2 adalah salah satu dari tiga gen mamalia yang mengkode protein yang homolog dengan Drosophila Runt, dan sangat penting untuk perkembangan embrio yang tepat. Runx2/ *core-binding factor subunit alpha-1 (Cbfa1)* diperlukan untuk kondensasi mesenkim, diferensiasi osteoblas dari sel punca mesenkim, hipertrofi kondrosit, dan invasi vaskular dari kerangka yang sedang berkembang (Schroeder *et al.* 2005). Pengenalan Runx2 ke dalam mesenchymal stem cells menstimulasi diferensiasi sepanjang *osteoblast lineage* (Byers and Garcia 2004). Sebaliknya, ekspresi berlebihan Runx2 dalam osteoblas kolagen-positif dan garis keturunan tipe I menghambat diferensiasi terminal dan meningkatkan resorpsi tulang (Geoffroy *et al.* 2002). Aktivitas transkripsi Runx2 juga dapat dimodulasi oleh kontak sel dengan *extracellular matrix* (ECM). Diferensiasi osteoblas membutuhkan ECM

yang mengandung kolagen tipe I. Kaskade MAP kinase mentransmisikan sinyal dari integrin di permukaan sel ke Runx2 di nucleus (Xiao *et al.* 2000).

2.15 Extracellular Matrix (ECM)

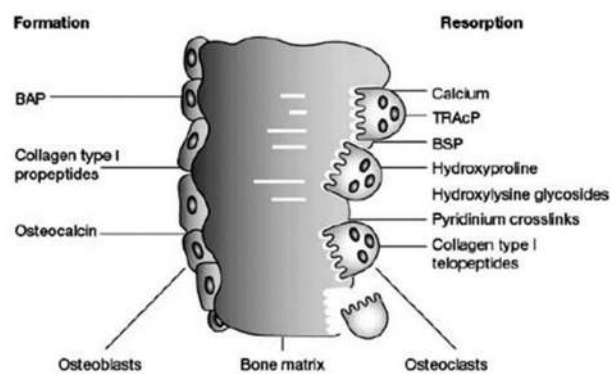
Selama regenerasi tulang, homing *mesenchymal stem cells* (MSCs), pembentukan osteoblas, matriks ekstraseluler (ECM) dan mineralisasi osteoid, dan pembentukan osteosit yang berdiferensiasi akhir berperan penting dalam pembentukan tulang (Wang *et al.* 2013). *Extracellular Matrix* adalah struktur tiga dimensi non-seluler disekresikan oleh sel ke dalam ruang ekstraseluler. Ini terdiri dari protein dan polisakarida spesifik. *Extracellular Matrix* dari setiap jenis jaringan memiliki komposisi dan topologi yang unik selama perkembangannya (Frantz *et al.* 2010). *Extracellular Matrix* menyediakan jaringan dengan integritas dan elastisitas, dan terus-menerus direformasi karena perubahan kelimpahan reseptor, faktor pertumbuhan, dan pH lingkungan lokal untuk mengontrol perkembangan, fungsi, dan homeostasis jaringan dan organ (Bonnans *et al.* 2014). *Extracellular Matrix* dianggap mewakili elemen keempat dalam pengembangan rekayasa jaringan tulang (Ravindran *et al.* 2012).

2.16 Bone Remodeling

Tulang dibangun melalui 3 proses: osteogenesis, modeling, dan remodeling. Semua proses ini dimediasi oleh osteoblas, yang bekerja dalam kerja sama yang erat dengan osteoklas penyerap tulang, bersama-sama membentuk "*bone multicellular unit*" (Papachroni *et al.* 2009). Osteoblas mensintesis matriks ekstraseluler tulang (osteogenesis), dan osteoklas mengukir bentuk agar sesuai dengan lingkungan fisik (modeling) dan menyesuaikannya dengan pertumbuhan tubuh dan perubahan lingkungan (remodeling) (Rutkovskiy *et al.* 2016).

Keseimbangan yang tepat antara pembentukan tulang dan resorpsi adalah penting untuk pemeliharaan kepadatan massa tulang dan sistemik homeostasis mineral. Gangguan pada keseimbangan ini dapat menyebabkan berbagai penyakit tulang,

termasuk osteoporosis, yaitu didefinisikan sebagai penurunan kepadatan tulang dengan risiko tinggi terjadinya fraktur. Osteoblas dan osteoklas memiliki kegiatan terintegrasi erat meskipun berasal dari seluler yang berbeda dan memiliki fungsi yang berlawanan dalam remodeling tulang. Renovasi tulang terjadi pada *basic multicellular units* (BMU), terutama terdiri osteoblas, osteoklas, dan osteosit (Khosla *et al.* 2008). *Basic multicellular units* yang terdiri dari sel-sel lapisan tulang, dan jaringan kapiler terkait membentuk struktur fungsional dikenal sebagai kompartemen remodeling tulang (Hauge EM *et al.* 2001). Osteosit memiliki fungsi khusus untuk memicu remodeling tulang. Sel ini mendeteksi microcracks, strain mekanis, dan perubahannya di lingkungan hormonal tulang (Khosla *et al.* 2008).



Gambar 2. 11 : Skematis dari berbagai penanda tulang (Markus 2006)

2.16.1 Osteoprotogerin (OPG)

Osteoprotogerin adalah kunci pada sistem “*Receptor activator of necrosis factor kappa β ligand*” (RANKL) untuk differensiasi maturasi dari osteoklas dan resorpsi tulang dimana sistem ini sangat berperan pada pertumbuhan dan remodeling tulang pada regenerasi jaringan periodontal (Liu and Zhang 2015). Dengan mengikat RANKL maka OPG akan mampu menghambat Nfk β yang merupakan pusat dan cepatnya aksi faktor transkripsi yang berkaitan dengan gen imunitas dan merupakan kunci regulator terhadap inflamasi, imunitas alami, *cell cervical* dan *differentiation* (Slavic *et al.* 2015).

OPG diekspresikan dalam banyak jaringan selain osteoblas, termasuk jantung, ginjal, hati, limpa, dan sumsum tulang (Wada *et al.* 2006). Ekspresinya diatur oleh sebagian besar faktor yang menyebabkan ekspresi RANKL oleh osteoblast. Banyak laporan mendukung pernyataan bahwa rasio RANKL / OPG adalah utama penentu massa tulang (Hofbauer and Schoppet 2004).

2.16.2 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)

Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand sebagai *tumor necrosis factor ligand superfamily member 11* (TNFSF11), TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), *osteoprotegerin ligand* (OPGL), dan *osteoclast differentiation factor* (ODF), adalah protein yang pada manusia dikodekan oleh TNFSF11 gen (Hanada *et al.* 2011).

Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand adalah protein transmembran homotrimerik tipe II dinyatakan sebagai membran-terikat dan protein yang dikeluarkan, yang berasal dari bentuk membran sebagai hasil dari kedua pembelahan proteolitik atau splicing alternatif (Ikeda *et al.* 2001). Proteolitik pemisahan RANKL membutuhkan ADAM (*a disintegrin and metalloprotease domain*) (Hikita *et al.* 2006) dan matrix metalloproteases (Lynch *et al.* 2005). Ekspresi RANKL distimulasi dalam osteoblas / stroma. Sel-sel oleh sebagian besar faktor yang diketahui merangsang pembentukan dan aktivitas osteoklas, diungkapkan dalam kelenjar getah bening, timus dan paru-paru, dan pada tingkat yang rendah bervariasi dari jaringan lain termasuk limpa dan sumsum tulang (Wada *et al.* 2006).

2.16.3 Receptor activator of NF- κ B (RANK)

Receptor Activator of NF- κ B adalah protein transmembran homotrimerik tipe I yang ekspresi awalnya terdeteksi hanya pada OCP, osteoklas mature, dan sel dendritic (Boyce and Xing 2007, Boyce and Xing, 2008). Aktivator reseptor NF- κ B, alternatifnya diidentifikasi sebagai *TNF is related to activation-induced cytokine receptors* (TRANCE-R) atau *osteoclast differentiation and activation receptors*

(ODAR) adalah reseptor pensinyalan untuk RANKL (Salerno-Goncalves *et al.* 2013). RANK telah ditentukan TNFRSF11A, dan merupakan trimerisasi asam amino tipe I 616 asam amino protein transmembran yang mengandung empat cysteine-rich ekstra seluler pseudorepeats. Trimerisasi melalui interaksi dengan RANKL (Kanazawa and Kudo 2005).

2.17 Marker untuk *bone formation*

Marker *bone formation* adalah produk dari osteoblas aktif yang diekspresikan selama berbagai fase perkembangannya dan dianggap mencerminkan berbagai aspek fungsi osteoblas dan pembentukan tulang. Semua marker *bone formation* diukur dalam serum atau plasma (Shetty *et al.* 2016). Marker dapat digunakan untuk membantu menentukan risiko *bone fracture* seseorang dan untuk memantau terapi obat bagi orang yang menerima pengobatan untuk *bone disorders*. (Greenblatt, Tsai and Wein, 2017). Marker *bone formation* dikategorikan sebagai : (Shetty *et al.* 2016)

1. Produk sintesis kolagen: Propeptida kolagen tipe 1: (terminal-C: P1CP, terminal-N: P1NP)
2. Enzim osteoblas: *Alkaline phosphatase* (ALP) (total dan *bone specific*)
3. Matrix proteins: *Osteocalcin* (OC)

2.17.1 Alkalin Phospatase (ALP)

Matriks termineralisasi ekstraseluler adalah karakteristik khusus dari sistem rangka vertebrata. Fungsi jaringan mineral tidak dibatasi untuk mempertahankan massa tubuh, menjaga jaringan lunak internal, atau bahkan mempromosikan gerakan fisik dan pengunyahan; mereka sering bertindak sebagai sumber yang mudah digunakan untuk mineral penting yang diperlukan untuk beberapa proses fisiologis. Akumulasi mineral terbuat dari kalsium fosfat, hidroksiapatit, yang terkandung dalam matriks ekstraseluler. Mineralisasi biokimia terjadi di jaringan keras seperti tulang dan tulang rawan, di mana banyak jaringan spesifik sel terlibat dalam proses mineralisasi ini. Di

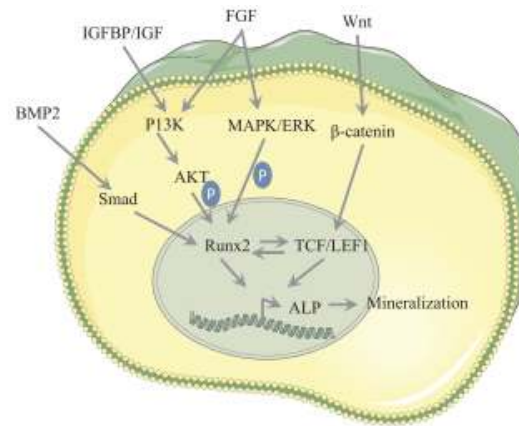
dalam tulang, osteoblas yang membungkus osteoid bertanggung jawab atas hidroksiapatit produksi (Murshed 2018).

2.17.1.1 Struktur *Alkaline phosphatase*

Alkaline phosphatase adalah metaloenzim yang terdiri dari sejumlah isoenzim. Setiap isoenzim adalah glikoprotein yang melekat pada membran yang dikodekan oleh gen lokus tertentu dan diyakini berevolusi dari gen cestral umum. 3 gen ALP terletak pada kromosom 2 dan gen keempat yaitu L/B/K ALP berada di kromosom 1 Nomenklatur gen-gen ini adalah berdasarkan jaringan di mana mereka sangat diekspresikan (Vimalraj 2020).

2.17.1.2 Ekspresi *Alkaline phosphatase*

Ekspresi gen selama diferensiasi osteoblastik dan *growth plate calcification* menawarkan jalan untuk memahami fungsi ALP dalam mineralisasi. ALP diproduksi di awal pertumbuhan dan mudah ditemukan di permukaan sel dan di vesikel matriks semua jaringan, tulang dan *calcifying cartilages* (Siller and Whyte 2018). Selanjutnya, sedangkan gen tertentu diregulasi (misalnya osteocalcin), ekspresi ALP berkurang. Pada tahap awal proses ini, ALP akan jelas bekerja. Jelas, ALP harus berfungsi pada fase awal proses. Mekanisme yang mengatur ekspresi ALP adalah kompleks, BMP/RUNX2 (CBAf1, AML3)/Osterix dan kaskade pensinyalan WNT, yang berkomunikasi satu sama lain, adalah jalur regulasi yang mengatur diferensiasi osteoblastik, kondrogenesis dan ekspresi ALP (Salazar *et al.* 2016).



Gambar 2. 12 : Mekanisme pensinyalan utama untuk mineralisasi tulang yang menginduksi ekspresi ALP (Vimalraj 2020)

2.17.1.3 Mekanisme pensinyalan dalam mineralisasi sel tulang

Alkaline phosphatase adalah salah satu gen yang berfungsi pertama dalam mekanisme kalsifikasi. Setidaknya salah satu fungsinya dalam siklus mineralisasi juga diharapkan terjadi pada titik awal. Vesikel matriks adalah vesikel bekas dengan diameter 50-200 nm yang tertanam dalam membran, dibentuk oleh tunas terpolarisasi dari kondrosit dan osteoblas pada membran permukaan mereka. Fungsi ini mungkin memerlukan sejumlah besar kalsium intraseluler dan fosfat ekstraseluler. Kandungan lipid bervariasi dari membran matriks vesikel ke membrane sel yang memproduksinya. Vesikel matriks, khususnya fosfat dilserin, berlimpah dalam beberapa fosfolipid, yang kuat Ca^{2+} mengikat lipid (Anderson 2007).

2.17.2 *Osteocalcin* (OCN)

Osteocalcin (OCN) secara khusus diekspresikan dalam osteoblas dan merupakan senyawa non-kolagen yang paling melimpah dalam protein tulang. *Osteocalcin* memperoleh afinitas tinggi terhadap Ca^{2+} melalui karboksilasi tiga asam glutamat (Komori 2020a). Sebelum generasi tikus yang kekurangan *Ocn*, *Ocn* terkarboksilasi terlibat dalam tulang mineralisasi. *Osteocalcin* terkarboksilasi juga dilaporkan menghambat pertumbuhan hidroksiapatit di mineralisasi (Komori 2020b).

2.17.2.1 *Osteocalcin dan Runt related transcription factor 2*

Tikus memiliki kluster gen osteocalcin yang terdiri dari Bglap, Bglap2, dan Bglap3 dalam jarak 23-kb rentang DNA genom, sedangkan satu gen osteocalcin (BGLAP) telah diidentifikasi pada manusia dan tikus. Bglap dan Bglap2 (disebut sebagai Ocn) secara khusus diekspresikan dalam osteoblas di tulang, sedangkan Bglap3 diekspresikan dalam jaringan non-osteoid, termasuk ginjal, paru-paru, dan gonad pria jaringan. Ekspresi Ocn diatur oleh *runt related transcription factor 2* (Runx2), yang merupakan faktor transkripsi penting untuk diferensiasi osteoblas (Komori 2019).

2.17.3 *Osteopontin (OPN)*

Osteopontin juga dikenal sebagai sialoprotein tulang I (BSP-1 atau BNSP), aktivasi T-limfosit awal (ETA-1), disekresikan fosfoprotein 1 (SPP1), resistensi 2ar dan Rickettsia (Ric).(Wang and Denhardt 2008). *Osteopontin* sebagai faktor penting pada proses “remodeling” tulang dan berperan dalam menjembatani osteoblast dengan matriks mineral tulang. *Osteopontin* mengatur sistem kekebalan pada berbagai tingkatan. Berfungsi sebagai molekul chemotactic untuk mendorong migrasi sel-sel inflamasi ke tempat luka dan bertindak sebagai protein perekat untuk mempertahankan sel pada tempatnya. *Osteopontin* juga berfungsi sebagai sitokin proinflamasi dan dapat memodulasi respons imun dengan meningkatkan ekspresi sitokin Th1 dan enzim pengurai matriks (Lund *et al.* 2009). *Osteopontin* memainkan peran penting dalam respon sel T dan makrofag selama respon imun yang dimediasi sel terhadap patogen bakteri dan virus (Ashkar *et al.* 2000).

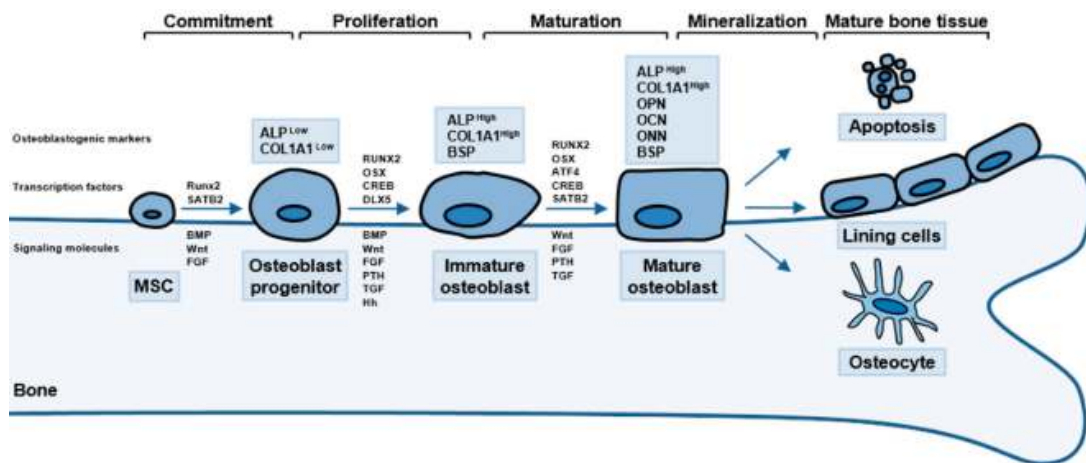
2.18 Osteoblas

Bone modeling awalnya terjadi selama perkembangan, di mana ada dua mode *bone development: intramembranous ossification* dan *endochondral ossification*. Pada *intramembranous ossification*, jaringan mesenkim langsung diubah menjadi tulang, sedangkan pada *endochondral ossification*, jaringan mesenkim berdiferensiasi menjadi kartilago sebelum digantikan oleh tulang (Berendsen and Olsen 2015). *Bone*

remodeling adalah *life-long process* di mana volume tulang yang diserap oleh osteoklas (OC) direstorasi oleh pembentuk tulang osteoblas (OB) (Amarasekara *et al.* 2021). Keseimbangan antara aktivitas OC dan OB sangat penting dalam mempertahankan tingkat *bone turnover* fisiologis, dan kekurangan dalam keseimbangan ini dapat menyebabkan penyakit tulang yang melemahkan, seperti rheumatoid arthritis (RA), penyakit periodontal, dan osteoporosis (Amarasekara *et al.* 2015). Dengan demikian, mempertahankan integritas biomekanik tulang baik dengan pemodelan atau remodeling adalah proses kompleks yang diatur oleh banyak garis keturunan sel, regulasi transkripsi, jaringan sitokin, dan faktor pertumbuhan (Huang 2007).

2.18.1 Diferensiasi dan Fungsi Osteoblas

Osteoblas, yang merupakan sel pembentuk tulang, adalah sel mononuklear kecil dari *mesenchymal stem cell* (MSC) (Huang 2007). Osteoblas biasanya berbentuk kubus tetapi dapat ditemukan dalam morfologi beragam bentuk bulat, datar dan silinder (Wu *et al.* 2020). Tindakan berurutan dari jaringan sitokin dan faktor transkripsi menghasilkan diferensiasi OB lineage cells dari prekursor mesenkim.



Gambar 2. 13 : Representasi skema diferensiasi osteoblas (OB) (Amarasekara *et al.* 2021)

OB lineage progenitor cells menjalani tiga tahap perkembangan: (1) *cell proliferation*, (2) *extracellular matrix (ECM) secretion* dan *matrix maturation* (3)

matrix mineralization (Amarasekara *et al.* 2021). Mengikuti komitmen *OB lineage*, pra-OB menjalani proliferasi aktif dan mengekspresikan kolagen, fibronectin, osteopontin (OPN) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) receptor 1 (Glass *et al.* 2005). Pada tahap kedua, proliferasi sel diturunkan regulasinya, dan OB imatur berdiferensiasi menjadi OB matur yang mensekresi *collagen type 1 alpha 1 chain* (COL1A1) sebagai konstituen utama ECM dan mengekspresikan *alkaline phosphatase* (ALP) untuk mematangkan ECM (Glass *et al.* 2005). Setelah pematangan matriks selesai, *matrix mineralization* terjadi dalam proses yang sangat teratur melalui ekspresi berbagai penanda osteoblastogenik, seperti OPN, *osteocalcin* (OCN), dan *bone sialoprotein* (BSP), dengan ekspresi lanjutan dari ALP dan COL1A1 (Huang 2007). *Osteocalcin* mengatur metabolisme kalsium dan mempromosikan deposisi mineral dalam ECM, OPN mempromosikan pembentukan tulang dan mineralisasi, dan BSP mempromosikan mineralisasi mengatur pembentukan kristal hidroksiapatit (Lin *et al.* 2020). Akhirnya, OB matang menjalani apoptosis, menjadi sel pelapis tulang atau secara progresif bergabung ke dalam matriks tulang sebagai osteosit yang berdiferensiasi akhir *osteocytes* (OS) (Amarasekara *et al.* 2021).

Osteoblas mengatur proses *bone remodeling* dengan mengatur perbedaan OC penyerapan tulang aktivasi dan fungsi melalui produksi dua sitokin penting: *receptor activator of nuclear factor-kappa B* (RANK) ligand (RANKL) dan *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) (Amarasekara *et al.* 2021). Pengikatan RANKL dan M-CSF ke reseptor RANK dan c-fms, masing-masing, pada permukaan progenitor OC, menginduksi sejumlah kaskade *downstream signaling*, yang akhirnya mengaktifkan *nuclear factor of activated T cells c1*, faktor transkripsi master osteoklastogenesis, mengarah ke peningkatan diferensiasi OC, proliferasi dan kelangsungan hidup (Amarasekara *et al.* 2021). Terlebih lagi, OB mensekresikan osteoprotegerin (OPG), sebuah regulator negatif kunci dari osteoklastogenesis yang berikatan dengan RANKL, sehingga menghambat interaksi RANKL-RANK. Oleh karena itu, OB sangat penting

untuk menjaga keseimbangan dalam homeostasis tulang dengan mengatur sumbu RANK/RANKL/OPG (Boyce and Xing 2008).

2.18.2 Regulasi Transkripsi dalam Osteoblastogenesis

Osteoblastogenesis diatur oleh beberapa sitokin dan kaskade *hormone signaling*, menghasilkan aktivasi selanjutnya dari *downstream transcription factors* (Karsenty 2001). Di antara *downstream transcription factors*, faktor transkripsi terkait 2 runt-related (RUNX2/CBFA1/AML3/PEBP2 α A) bertindak sebagai faktor *master transcription* yang mengarah pada ekspresi penanda osteoblastogenik, seperti ALP, OCN, OPN, osteonektin (ONN), BSP, dan COL1A1, dalam osteoblastogenesis (Komori 2010). Tikus yang kekurangan Runx2 menunjukkan defek pada *endochondral* dan *intramembranous bone formation* (Schroeder *et al.* 2005). Dalam osteoblastogenesis, RUNX2 sedikit diekspresikan dalam MSC yang tidak terikat dan meningkat sepanjang proliferasi pra-OB (Maruyama *et al.* 2007).

2.18.3 Jalur Pensinyalan dalam Osteoblastogenesis

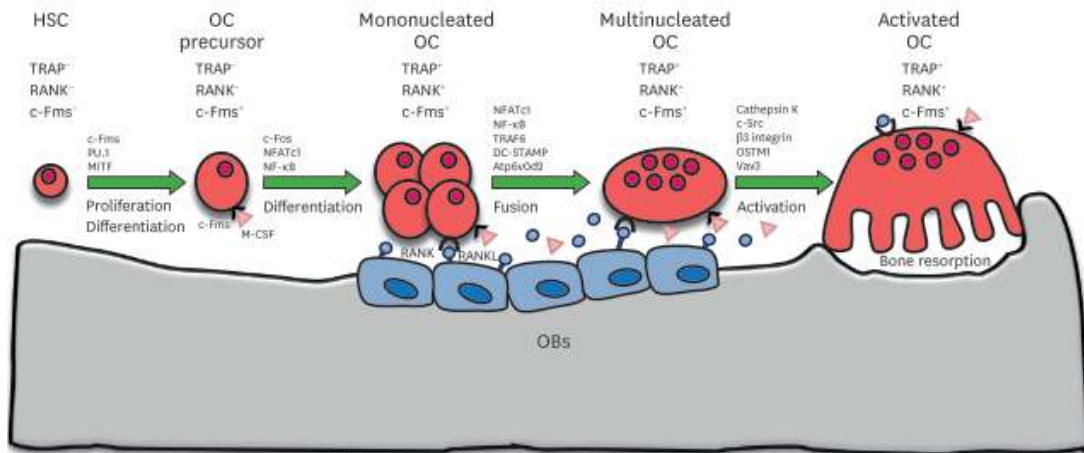
BMP termasuk dalam superfamili TGF- β dan dilaporkan bersifat osteoblastogenik factor. Telah didokumentasikan dengan baik bahwa BMP-2 adalah penginduksi osteoblastogenesis yang poten dengan mengaktifkan jalur pensinyalan Smad (Ogasawara *et al.* 2004). BMP mengikat serin/treonin kinase reseptor II dan mengaktifkan reseptor I untuk mengirimkan sinyal melalui Smad1/5/8. Smad1/5/8 yang dikomplekskan dengan Smad4 ditranslokasi ke nukleus untuk mengaktifkan RUNX2, yang mengarah pada peningkatan ekspresi penanda osteoblastogenik. Selain itu, pengobatan dengan antibodi antagonis terhadap BMP-2, -4, dan -7 dapat menurunkan regulasi ekspresi penanda osteoblastogenik, seperti ALP, OCN, dan BSP, mengungkapkan bahwa pensinyalan yang dimediasi BMP sangat penting untuk osteoblastogenesis yang dimediasi RUNX2 (Phimphilai *et al.* 2006)

2.18.4 Regulasi Sitokin Osteoblastogenesis

Osteoblastogenesis diatur secara ketat oleh jaringan sitokin kompleks di bawah kondisi fisiologis dan patofisiologis. Sitokin osteoblastogenik, seperti *interleukin-10* (IL-10), IL-11, IL-18, interferon- γ (IFN- γ), cardiotrophin-1 (CT-1), dan oncostatin M (OSM), mempromosikan osteoblastogenesis, sedangkan sitokin anti-osteoblastogenik, seperti *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), TNF- β , IL-1 α , IL-4, IL-7, IL-12, IL-13, IL-23, IFN- α , IFN- β , *leukemia inhibitory factor* (LIF), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) dan *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), menurunkan regulasi osteoblastogenesis (Amarasekara *et al.* 2021).

2.19 Osteoklas

Integritas jaringan tulang dipertahankan dengan menjaga keseimbangan yang baik antara aktivitas osteoblas pembentuk tulang (OB) dan osteoklas penyerap tulang (Osteoklas), yang memastikan tidak ada perubahan bersih dalam massa tulang (Lorenzo *et al.* 2015). Penemuan aktivator reseptor dari sumbu NF- κ B (RANK)/RANK ligand (RANKL)/ osteoprotegerin (OPG) pada pertengahan 1990-an telah menghasilkan kemajuan besar dalam bidang osteoimunologi (Walsh *et al.* 2006). RANKL sebagai sitokin yang diinduksi aktivasi terkait *tumor necrosis factor related activation-induced cytokine*, OPG ligand, OC differentiation factor dan TNF ligand *superfamily member* diekspresikan oleh OB, sel stroma, dan sel T teraktivasi (Wong *et al.* 1997). Sumbu pensinyalan RANKL-RANK terutama mengatur diferensiasi OC dan resorpsi tulang. OPG, juga dikenal sebagai faktor penghambat osteoklastogenesis dan anggota superfamili reseptor TNF (TNFR) 11b, disekresikan oleh OB dan sel stroma. OPG bertindak sebagai regulator negatif osteoklastogenesis dengan mengikat RANKL dan menghambat interaksi RANKL-RANK. Tikus yang kekurangan OPG menunjukkan penurunan kepadatan mineral tulang dan mengembangkan fenotipe osteoporosis (Lorenzo *et al.* 2008). Oleh karena itu, RANK/RANKL/OPG berperan penting dalam homeostasis tulang (Amarasekara *et al.* 2021).



Gambar 2. 14 : Representasi skematis dari diferensiasi dan aktivasi OC (Amarasekara *et al.* 2021)

2.19.1 Jalur Sinyal dalam Diferensiasi Osteoklas

Diferensiasi, kelangsungan hidup, dan aktivitas OC terutama diatur oleh dua sitokin penting, M-CSF dan RANKL (Lorenzo *et al.* 2008). Pentingnya M-CSF dalam osteoklastogenesis telah ditunjukkan oleh beberapa penelitian *in vivo* dan *in vitro*. Tikus-tikus yang kekurangan M-CSF menunjukkan fenotipe osteopetrotik yang parah karena hilangnya pembentukan OC dan resorpsi tulang. Pengikatan M-CSF ke *colony-stimulating factor-1 receptor* (c-Fms) mengaktifkan *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) dan *growth factor receptor bound protein 2* (Grb2), yang selanjutnya menginduksi pensinyalan Akt dan ERK pada prekursor OC atau OC *mature* (Amarasekara *et al.* 2021). Dengan demikian, M-CSF adalah sitokin penting untuk regulasi proliferasi OC, kelangsungan hidup, dan diferensiasi, serta fusi prekursor OC dan resorpsi tulang OC *mature* (Lorenzo *et al.* 2008).

RANK, juga dikenal sebagai anggota superfamili TNFR 11a, berperan penting dalam osteoklastogenesis. Pengikatan RANKL-RANK merekrut faktor terkait TNFR (TRAFs) untuk memulai aktivasi *downstream signaling cascades* dari adaptor/kinase seperti modulator esensial NF- κ B, penghambat I κ B kinase, c-Src, Vav3, dan protein kinase yang diaktifkan mitogen (MAPK), termasuk p38, JNK, dan ERK (Lorenzo *et*

al. 2015). Konsekuensi akhir dari pensinyalan RANKL-RANK adalah aktivasi faktor transkripsi osteoklastogenik seperti NF- κ B, *activator protein 1* (AP-1), *cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein* (CREB), dan *nuclear factor of activated T cells 1* (NFATc1), yang semuanya menginduksi ekspresi penanda osteoklastogenik, seperti *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP), *dendritic cell-specific transmembrane protein* (DC-STAMP), *v-ATPase subunit d2* (Atp6v0d2), *OC-associated receptor* (OSCAR), *β 3 integrin*, *osteopetrosis-associated transmembrane protein 1* (OSTM1), *B-lymphocyte induced maturation protein 1* (BLIMP1) dan *cathepsin K* (Takayanagi 2007).

2.19.2 Sitokin Osteoclastogenesis

TNF- α , IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, IL-17, IL-23, dan IL-34 telah dilaporkan sebagai sitokin osteoklastogenik. Sitokin proinflamasi TNF- α adalah penginduksi kuat resorpsi tulang dan berperan penting dalam *bone metabolism* dan *inflammatory bone diseases* (Walsh *et al.* 2006). TNF- α secara langsung menginduksi pembentukan TRAP⁺ OC berinti banyak dari prekursor OC dengan adanya M-CSF dan tanpa adanya RANKL dengan mengaktifkan pensinyalan NF- κ B (Azuma *et al.* 2000). TNF- α dapat menginduksi ekspresi RANK dalam prekursor OC (Komine *et al.* 2001). TNF- α juga dapat mempercepat osteoklastogenesis yang diinduksi RANKL melalui aktivasi TRAF2/5 dan MAPKs dalam pensinyalan yang dimediasi TNFR1, yang mengarah ke aktivasi NF- κ B dan AP-1 (Zhang *et al.* 2001).

Penelitian baru-baru ini melaporkan bahwa osteoklastogenesis yang diinduksi TNF- α ditingkatkan dalam TRAF6. Prekursor OC dengan menginduksi autophagosomal degradasi TRAF3 oleh stimulasi RANKL. Dengan demikian, RANKL juga dapat meningkatkan osteoklastogenesis yang diinduksi TNF- α melalui jalur pensinyalan independen-TRAF6 (Yao *et al.* 2017). TNF- α dapat secara tidak langsung mempengaruhi osteoklastogenesis dengan menginduksi ekspresi M-CSF dan RANKL dalam sel stroma, OB, dan sel T teraktivasi (Kitaura *et al.* 2013). TNF- α

berperan penting dalam mempromosikan osteoklastogenesis secara langsung dan tidak langsung (Amarasekara *et al.* 2021).

2.19.3 Sitokin Anti Osteoklastogenik

IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-27, dan IL-33 telah terlibat sebagai sitokin antiosteoklastogenik. IL-10, sebuah sitokin Th2, dikenal sebagai penekan potensial osteoklastogenesis melalui penghambatan ekspresi NFATc1 dan translokasi nuklirnya (Evans and Fox 2007). IL-10 meningkatkan regulasi ekspresi OPG, dan menurunkan regulasi ekspresi RANKL dan M-CSF (Liu *et al.* 2006). IL-10 menghambat osteoklastogenesis dengan menurunkan regulasi produksi sitokin osteoklastogenik seperti TNF- α , IL-1, dan IL-6. Oleh karena itu, IL-10 dapat dianggap sebagai sitokin anti-osteoklastogenik (Amarasekara *et al.* 2021).

2.20 *Woven bone*

Perkembangan *cortical bone* ditandai dengan pembentukan awal *woven bone* diikuti oleh deposisi tulang pipih pada *woven scaffold*. Ini terjadi dalam pembentukan tulang normal sebagai *integral obligate self-assembly pattern* di seluruh kelompok vertebrata, dengan fitur temporal dan spasial yang spesifik. Itu juga terjadi pada *repair bone, modified by the biophysical/mechanical environment* dan pada *pathological bone, modified by the specific disorder* dan tingkat keparahannya. Dua populasi sel osteoblas yang berbeda secara spasial mensintesis *woven* dan *lamellar bone*. *mesenchymal osteoblasts* mengelilingi diri mereka secara melingkar dengan kolagen secara acak untuk membentuk *woven bone*. *Surface osteoblasts* menyelaraskan diri dalam susunan linier pada *woven bone surface* (atau *adjacent lamellar bone*) untuk mensintesis *parallel-fibred lamellar bone*. Empat tahap spesifik dari anyaman tulang pembentukan didefinisikan: (Shapiro and Wu 2019)

- ✓ tahap I : diferensiasi awal pra-osteoblas dari *undifferentiated mesenchymal cells*
- ✓ tahap II : *mesenchymal osteoblasts* mengelilingi diri mereka sendiri dalam busur 360 ° dengan *randomly oriented matrix fibres*

- ✓ tahap III : *woven matrix* bertindak sebagai scaffold di mana *surface osteoblas* mulai mensintesis tulang pada *parallel-fibred lamellar conformation*
- ✓ tahap IV, *progressive relative diminution* dari *woven bone* pada *woven bone/lamellar bone complex*.

2.21 Hewan coba *Cavia cobaya*

Cavia cobaya (*guinea pig*) merupakan spesies hewan pengerat yang masuk ke dalam family *Caviidae* dan genus *Cavia* (Wagner 2013)

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordate
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Hystricomorpha
Family	: Caviidae
Subfamily	: Caviinae
Genus	: <i>Cavia</i>
Spesies	: <i>Cavia cobaya</i>

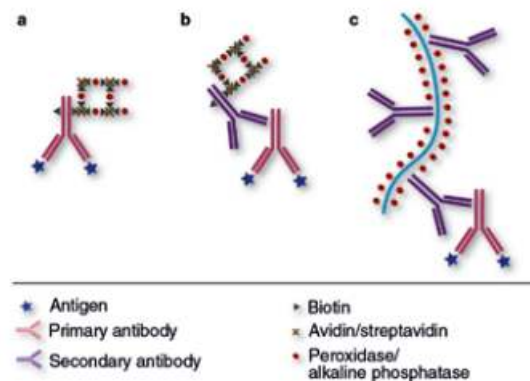
Penggunaan hewan *Cavia cobaya* sebagai hewan coba pada penelitian ini disebabkan mudah penanganannya, memiliki fase hidup yang pendek dan cepat, jumlahnya tidak terbatas serta telah diketahui interaksi fisiologi anatominya dengan manusia. *Cavia cobaya* memiliki aspek biologi yang mirip dengan manusia karena termasuk dalam mamalia sehingga berguna untuk banyak bidang penelitian. Reaksi penyembuhan pada hewan pada prinsipnya mirip dengan reaksi yang terjadi pada manusia. Perbedaan proses penyembuhan luka terletak pada proses kecepatan waktu penyembuhan, penyembuhan luka pada hewan lebih cepat daripada penyembuhan luka pada manusia (Burgos-paz *et al.* 2011).

2.22 Pemeriksaan Imunohistokimia

Immunohistochemistry (IHC) merupakan suatu metode untuk melokalisir antigen-antigen spesifik pada jaringan atau sel berdasarkan pengenalan antibody-antigen tersebut dapat diamati pada tingkat mikroskop cahaya. Antigen merupakan molekul yang memiliki sifat dari kombinasi spesifik dengan molekul sekunder. Antibodi merupakan molekul-molekul immunoglobulin yang terdiri dari 2 unit dasar, yaitu sepasang cincin ringan dan sepasang cincin berat (Höftberger *et al.* 2015)

Terdapat 2 aspek latar belakang pengecatan pada jaringan yang bersifat atribut, baik pada ikatan antibody non spesifik maupun adanya enzim endogenous. Molekul antibody tidak dapat terlihat dengan mikroskop cahaya atau mikroskop electron jika tidak dilabeli atau ditandai dengan beberapa metode seperti adanya visualisasi. Secara esensial sistem deteksi menempelkan beberapa label atau tanda pada antibody primer atau sekunder untuk memvisualisasikan target antibody-antigen yang terlokalisir pada jaringan. Berbagai macam label dan tanda telah digunakan termasuk senyawa fluoresen dan enzim aktif. Metode dengan menambahkan label secara kimia pada antibody dan kemudian secara langsung diaplikasikan pada jaringan yang telah dilabeli telah secara luas digunakan dalam imunohistologi (Petersen Kenneth and Pedersen Hans Christian 2013).

Adapun prosedur secara tidak langsung, juga memiliki beberapa keuntungan seperti : meningkatnya fleksibilitas, proses labelling hanya diaplikasikan pada antibody sekunder, antibody primer dapat digunakan pada pengerjaan dilusi yang tinggi sedangkan metode unlabelling jarang digunakan. Quality control dideskripsikan sebagai kumpulan proses dan tehnik yang meliputi deteksi, reduksi dan defisiensi yang benar pada proses analisis. Formalin merupakan fiksasi yang umum digunakan pada imunohistokimia (Schacht and Kern 2015).



Gambar 2. 15 : Diagram skematik teknik imunohistokimia (Schacht and Kern 2015)

2.22.1 Pewarnaan Imunohistokimia

Blok paraffin berisi jaringan tulang dipotong dengan ketebalan 4 μm menggunakan mikrotom, kemudian dilakukan deparafinasi dengan xilol. Selanjutnya dilakukan rehidrasi dengan etanol konsentrasi menurun, diikuti pembilasan dengan Phosphate Buffer Saline (PBS) selama 3x5 menit. Sediaan jaringan kemudian diinkubasi pada DAKO® Buffer Antigen Retrieval pada microwave dengan suhu 94C selama 20 menit dan dilanjutkan dengan pendinginan pada suhu ruang selama 20 menit. Langkah selanjutnya, sediaan dicuci dengan PBS selama 3x5 menit, dan diinkubasi pada Blok Peroksidase (Novocastra®) selama 20 menit. Selanjutnya sediaan dicuci kembali dengan PBS selama 3 \times 5 menit dan diinkubasi pada Blok Protein selama 20 menit. Setelah itu dicuci kembali dengan PBS selama 3 \times 5 menit dan diinkubasi overnight (12-18 jam) dengan antibodi primer protein (TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin*) pada suhu 4°C. Langkah selanjutnya adalah pembilasan dengan PBS selama 3 \times 5 menit dan diinkubasi dengan larutan post primary dan post protein selama 45 menit dan dilanjutkan dengan inkubasi antibodi sekunder (Novolink® Horse Radish Peroxidase (HRP)) selama 60 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, sediaan dicuci dengan PBS selama 3 \times 5 menit dan dilakukan counterstain dengan hematoksin (Novocastra). Selanjutnya, dilakukan dehidrasi

menggunakan etanol konsentrasi meningkat. Proses selanjutnya adalah dilakukan penjernihan dengan xilol, kemudian dilakukan mounting.

2.22.2 Metode perhitungan IHC

1. Penelitian ini menggunakan jaringan tulang, pada soket gigi *cavia cobaya*.
2. Dengan nilai konfidensi interfasal 90% dan kekuatan uji 80% maka dengan desain eksperimental, subjek penelitian terdiri dari 36 sampel penelitian.
3. Terdapat 36 slide (jumlah slide), yang terdiri dari 6 x 6 kelompok pemeriksaan
4. Setiap sampel jaringan dibuat sediaan irisan dengan ketebalan 4 μ m, kemudian dideteksi immunohistokimia terhadap ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin*.
5. Untuk keperluan perhitungan, slide yang sudah berkode ditutup nomer kodenya dan diberi nomer baru secara acak. Sehingga pemeriksa tidak mengetahui slide yang diperiksa merupakan sampel kelompok apa (Blind)
6. Pemeriksa terdiri dari 2 orang,
7. Pemeriksaan dan perhitungan ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* diamati dengan melihat adanya warna coklat pada makrofag.
8. Perhitungan didasarkan menurut Soini et al, (1998) dan Pizem and Cor (2003) yang dimodifikasi untuk kepentingan sel osteoblast dengan ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* pada masing-masing slide dengan mengkalkulasi pada 20 lapang/bidang pandang dengan perbesaran 1000x mikroskop (okuler – objektif).
9. Hasil setiap perhitungan ditulis pada lembar kerja dan diambil nilai rata-rata per lapang pandang
10. Dilakukan pemulasan Hematoxilen-Eosin yang digunakan sebagai pembanding struktural
11. Analisis statistik bila semua hasil sudah dikembalikan ke kode sebenarnya .

12. Dalam rangka menjamin representasi dan mengurangi kesalahan hasil, diperlukan pengamatan pada kurang lebih sejumlah 20 lapang pandang dengan perbesaran 1000x yang masing-masing berisi lebih kurang 1500 sel (Soini et al, 1998, Pizem and Cor, 2003).

2.23 Pemeriksaan Histopatologi Anatomi (HPA)

Histopatologi merupakan cabang biologi yang mempelajari kondisi dan fungsi jaringan dalam hubungannya dengan penyakit. Teknik pemeriksaan histopatologi berguna untuk mendeteksi adanya komponen patogen yang bersifat infeksius melalui pengamatan secara mikroskopis. Histopatologi sangat penting dalam kaitan dengan diagnosis penyakit karena salah satu pertimbangan dalam penegakan diagnosis adalah melalui hasil pengamatan terhadap jaringan yang diduga terganggu. Oleh karena itu, dengan proses diagnosis yang benar akan dapat ditentukan jenis penyakitnya sehingga dapat dipilih tindakan preventif dan kuratif (Netto *et al.* 2003)

Adapun tahapan teknik histopatologi adalah sebagai berikut : (Comanescu *et al.* 2012)

1. Fiksasi ; bertujuan agar jaringan diusahakan mati secepatnya sehingga tidak terjadi perubahan pasca mati (autolisis post mortem) sehingga struktur jaringan sampel dapat dipertahankan seperti saat sampel masih hidup.
2. Preparasi organ atau jaringan target dari sampel ; Seluruh organ target dalam pemeriksaan dimasukkan dalam embedding cassette.
3. Dehidrasi ; Tahap ini merupakan proses menarik air dari jaringan dengan menggunakan bahan kimia tertentu.
4. Clearing ; Tahap ini bertujuan untuk menghilangkan bahan kimia dehidrasi sehingga contoh sampel menjadi transparan.

5. Infiltrasi ; Teknis histologi ini untuk menyusupkan paraffin ke dalam jaringan sampel untuk menggantikan xylol yang telah hilang, sehingga sampel tidak rusak waktu pemotongan dengan mikrotom.
6. Teknik embedding ; Sampel yang sudah diiris pada bagian yang mengalami perubahan dimasukkan ke dalam cassette embedding yang sudah diberi label dengan menggunakan pensil.
7. Pemotongan ; Pemotongan dilakukan dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan irisan 4-6 um.
8. Pewarnaan jaringan dan sediaan preparat ; Pewarnaan ini dipergunakan dengan teknik pewarnaan ganda haematoksilin dengan eosin.
9. Pengamatan ; Pengamatan hasil untuk diagnosis dengan metode komparasi dibawah mikroskop cahaya pada pembesaran 100-1000 x

2.23.1 Sistem scoring histopatologi

Union (distal dan proksimal)	Tidak terjadi union	0
	Union fibrosa	1
	Union osteochondral	2
	Union tulang	3
	Organisasi komplitt tulang	4
Tulang kanelous	Tidak ada aktivitas sel tulang	0
	Aposisi awal tulang baru	1
	Aposisi aktif tulang baru	2
	Reorganisasi tulang kanelous	3
	Komplitt reorganisasi tulang kanelous	4
Tulang kortikal	Tidak terbentuk	0
	Gambaran awal	1
	Formasi tulang dalam pembentukan	2
	Hampir semua reorganisasi	3
	Terbentuk komplitt	4
Sumsum tulang (marrow)	Tidak ada	0
	Mulai terlihat	1
	Ada pada lebih dari setengah celah	2
	Kolonisasi komplitt oleh sumsum tulang merah (<i>red marrow</i>)	3
	Sumsum lemak matur	4
Nilai total per kategori	Union proksimal	4
	Union distal	4
	Tulang kanelous	4
	Kortek	4
	Sumsum tulang	4
	Nilai maksimal	20

Gambar 2. 16 : Sistem skor histopatologi Lane dan Shandu modifikasi oleh Heiple (Ferdiansyah Mahyudin and Fedik Abdul Rantam 2011)

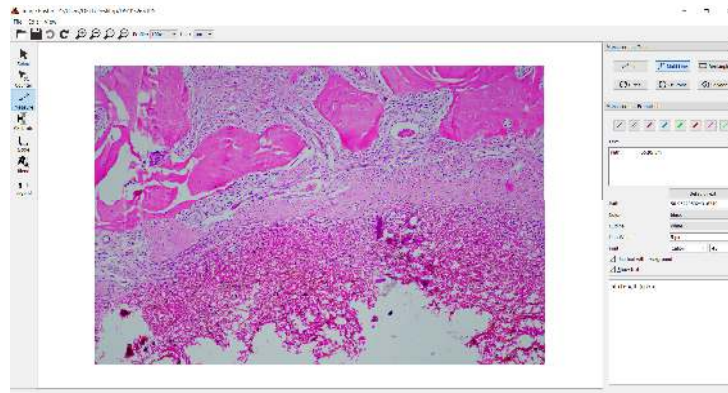
2.24 Pengukuran *Woven Bone*

Pengukuran luas *woven bone* dilakukan menggunakan *software image raster*

4.1 (OptiLab). Sediaan diwarnai menggunakan teknik *Hematoxilen-Eosin* kemudian

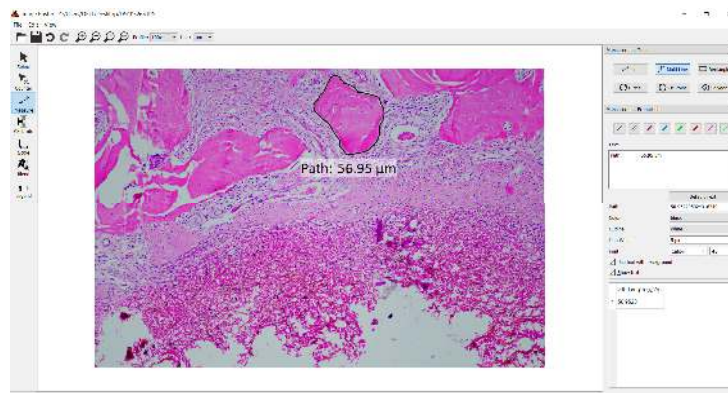
dilakukan foto sediaan pada 200x perbesaran mikroskop, sebanyak 10x lapang pandang.

Gambaran dalam format JPG dibuka pada image raster.



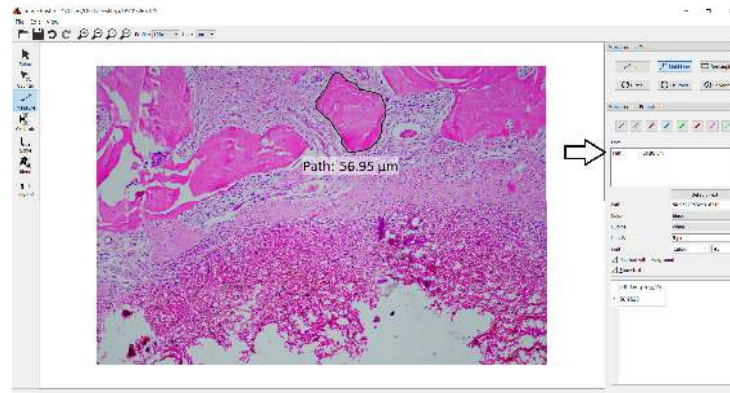
Gambar 2. 17 : Pengukuran *woven bone* 1

Pilih (klik) menu pilihan pada “*measure*” (pada bagian kiri) dan pilih (klik) menu pilihan pada “*multi line*” (pada bagian kanan tampilan).



Gambar 2. 18 : Pengukuran *woven bone* 2

Ukur bagian *woven bone*, menggunakan mode “*multi line*”, sesuai alur dari *woven bone* mengelilingi sampai bertemunya dua titik (dan kemudian lakukan klik kanan pada titik terakhir dan klik *Finish*).

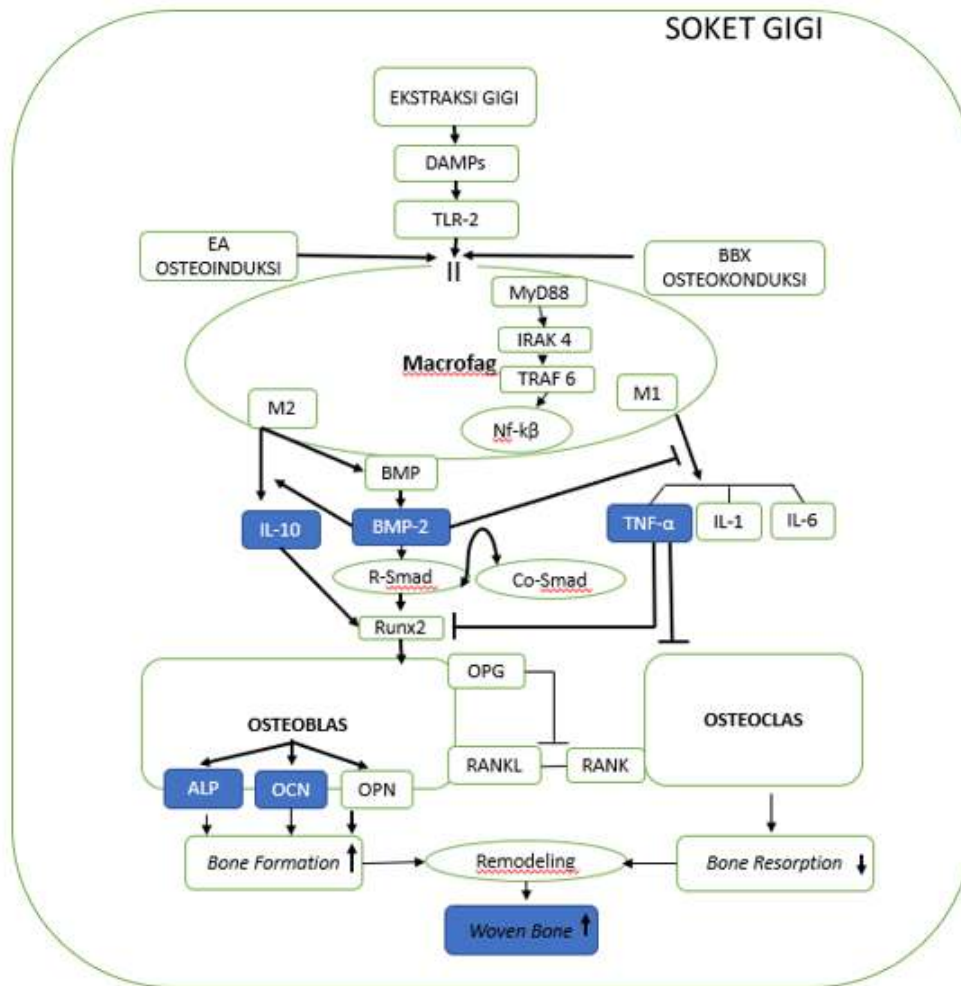


Gambar 2. 19 : Pengukuran *woven bone* 3

Hasil pengukuran akan tampak pada gambar dan bagian *communication box* (kanan). Salin hasil pengukuran dan lakukan tabulasi. Hasil pengukuran kemudian dianalisis menggunakan uji beda (rata-rata) menggunakan uji *Anova* pada *software* SPSS ver. 21. Hasil disajikan dalam bentuk gambar, tabel data rata-rata dan \pm SD serta grafik.

BAB III KONSEP PENELITIAN DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3. 1: Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan Gambar :

- : Mempengaruhi/ Menyebabkan
- Kotak Biru : Variabel yang akan diteliti
- | : Menghambat

3.2 Keterangan Konsep Penelitian

Proses penyembuhan luka merupakan proses memperbaiki atau mengubah jaringan dan kapasitas fungsional yang rusak karena cedera. Secara fisiologis dibagi menjadi empat fase berurutan, mereka adalah fase hemostasis, fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase pematangan/remodeling. Fase inflamasi diawali dengan pelepasan *Polymorphonuclear Neutrophilic* (PMN)/neutrofil yang berperan sebagai fagositosis. Neutrofil adalah sel motil yang masuk ke soket setelah luka terjadi dan berfungsi selama 24-48 jam. Setelah 2-3 hari, populasi neutrophil bergeser dan area luka didominasi oleh monosit yang berdiferensiasi menjadi makrofag.

Pada kasus ekstraksi gigi akan terjadi trauma mekanis pada ligament periodontal yang mengalami kerusakan sehingga melepas molekul endogen DAMPs. *Damage Associated Molecule Patterns* kemudian ditangkap oleh *Toll Like Receptor - 2. Signaling pathway* dari komponen botani ditandai dengan signaling TLR-2 kemudian membentuk kompleks sinyaling mengaktifasi faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa β (NF- $\kappa\beta$)* yang akan menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi dan anti inflamasi.

Makrofag mengaktifkan M1 dengan mengaktifasi faktor transkripsi NF- $\kappa\beta$ yang menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi yaitu TNF- α , IL-1 dan IL-6. TNF- α dapat menstimulasi proliferasi prekursor osteoklas, meningkatkan ekspresi RANK dan bersama faktor pertumbuhan seperti RANKL, IL-6, dan TGF- β untuk secara sinergis mendorong pembentukan osteoklas dan resorpsi tulang. TNF- α menghambat ekspresi Runx-2 dan ekspresi penanda osteoblastogenik yang diinduksi RUNX2 dalam prekursor osteoblas dan sel preosteoblastik. TNF- α juga menghambat osteoblastogenesis yang diinduksi BMP dengan mengaktifkan pensinyalan JNK dan menekan pensinyalan BMP/Smad.

Selanjutnya modulasi M2, makrofag akan mengaktifkan M2 yang akan menstimulasi sitokin anti inflamasi yaitu IL-10. IL-10 dapat menstimulasi

pembentukan pre-osteoblas yang akan berdiferensiasi menjadi sel osteoblas melalui regulasi oleh gen Runx-2. Peningkatan IL-10 dapat menyebabkan peningkatan ekspresi OPG dan peningkatan ekspresi RANKL yang diproduksi oleh sel osteoblas. OPG berfungsi untuk mencegah RANKL berikatan dengan RANK sehingga resorpsi tulang tidak akan terjadi dan aposisi tulang alveolar meningkat.

Runx2 adalah faktor transkripsi dari *runt domain gene family*. Runx2 dapat mengatur ekspresi gen dari beberapa jenis osteoblas dan berperan penting dalam perkembangan skeletal pada 2 tahap: komitmen *skeletal lineage cells* dan maturasi osteoblas dalam *postnatal development*. Selain itu, Runx2 dapat mengatur kemampuan resorpsi tulang osteoklas dengan mempengaruhi tingkat mRNA dari RANKL. Oleh karena itu, Runx2 adalah faktor transkripsi penting yang mengatur diferensiasi osteoblas dan *bone formation*.

Makrofag juga mengaktifkan M2 yang akan menstimulasi BMP yang termasuk dalam superfamili TGF- β dan bersifat osteoblastogenik. BMP-2 adalah penginduksi osteoblastogenesis yang poten dengan mengaktifkan jalur pensinyalan Smad. BMP-2 dapat mengurangi ekspresi dari penanda fenotipik M1, termasuk interleukin (IL)-1b, IL-6, dan iNOS di M1 makrofag terpolarisasi, menunjukkan peran imunoregulasi positif BMP-2 pada jalur inflamasi. BMP-2 mengaktifkan makrofag melalui jalur pensinyalan pSmad1/5/8 dan menghasilkan loop umpan balik positif dengan meningkatkan ekspresi faktor angiogenik dan mempercepat diferensiasi osteogenik.

Smad proteins adalah salah satu substrat BMPRI, dan berperan penting dalam menyampaikan sinyal BMP dari reseptor ke gen target dalam nukleus. Setelah ligan dimer mengikat *heterotetrameric BMP receptors*, *intrinsic serine/threonine kinase activity* diaktifkan, dan kemudian R-Smads terfosforilasi. Aktivasi reseptor BMP dimulai fosforilasi dari *downstream effector proteins*, yang dikenal sebagai *receptor-regulated Smads*, Smad 1 dan 5 yang mengarah ke transduksi sinyal. Setelah diaktifkan R-Smads dilepaskan dari reseptornya, mereka bergabung dengan Co-Smad (juga

disebut *common-mediator* Smad atau *common-partner* Smad) yaitu, Smad 4, untuk membentuk *hetero-oligomeric complexes*. Kompleks ini kemudian ditranslokasikan ke nukleus untuk berinteraksi dengan faktor transkripsi lain untuk memediasi transkripsi gen target. Untuk memberi sinyal jalur transduksi BMP-2 pada osteogenesis, reseptor BMP bergantung pada ligan dan hanya memfosforilasi R-Smad 1 dan 5.

BMP-2 dapat meningkatkan regulasi Runx2 mRNA ekspresi dari *immortalized human bone marrow stromal cell line*. Smad 1 atau 5 dan Cbfa1 kompleks yang terbentuk, menunjukkan *close interactions* di antara molekul-molekul selama diferensiasi osteoblas sehingga dijadikan target pensinyalan BMP di nukleus selama diferensiasi osteoblas. Runx-2 juga menginduksi sekresi *Alkaline phosphatase* (ALP), *osteocalcin* (OCN), *osteopontin* (OPN) dan kolagen tipe 1 yang disekresi oleh osteoblas yang mature dan memicu pembentukan matriks tulang atau mineralisasi. *Alkaline phosphatase* (ALP) dan *osteocalcin* secara luas sebagai penanda tulang yang diterima. Perawatan dengan BMP-2 dapat menstimulasi ekspresi ALP dengan mengaktifkan reseptor BMP (BMPR), *reseptor specific Smads* (R-Smads), dan ekspresi dari Dlx5 dan Runx2.

Penurunan TNF- α , peningkatan IL-10 dan peningkatan BMP-2 dapat menyebabkan peningkatan ekspresi OPG dan RANKL yang diproduksi oleh osteoblas melalui regulasi Runx-2. OPG berfungsi untuk mencegah RANKL berikatan dengan RANK sehingga resorpsi tulang tidak terjadi dan pembentukan *woven bone* meningkat serta cepat terbentuk. Kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* dapat mempercepat pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi.

3.3 Hipotesis

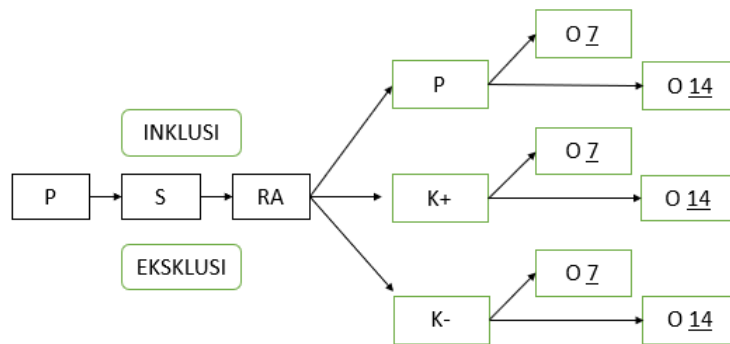
1. Ekspresi TNF- α menurun pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14

2. Ekspresi IL-10 meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid 3%* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
3. Ekspresi BMP-2 meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid 3%* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
4. Ekspresi *Alkaline Phospatase* meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid 3%* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
5. Ekspresi *Osteocalcin* meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid 3%* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
6. *Woven bone* meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid 3%* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
7. Terdapat hubungan antara ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phospatase*, *Osteocalcin* dan pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid 3%* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian experimental pada hewan coba *Cavia cobaya* dengan rancangan penelitian randomized factorial disain (true experimental design)



Gambar 4. 1 : Rancangan Penelitian

Keterangan :

- 1) P : Populasi
- 2) S : Subyek Penelitian
- 3) RA : *Random Allocation*
- 4) P : Kelompok perlakuan yang diberikan EA 3% + BBX + PEG
- 5) K+ : Kelompok perlakuan kontrol positif diberikan BBX + PEG
- 6) K- : Kelompok perlakuan kontrol negatif hanya diberikan PEG
- 7) O7 : Observasi pada hari ke 7
- 8) O14 : Observasi pada hari ke 14

Kriteria inklusi :

- 1) *Cavia cobaya* jenis kelamin jantan
- 2) Berat badan 300-375gr
- 3) Umur 3-3,5 bulan
- 4) Sehat dan aktif bergerak
- 5) Nafsu makan normal,
- 6) Tidak mengalami luka pada anggota badan
- 7) Kulit tidak ada cacat luka

- 8) Panca indera normal, anggota badan tidak cacat dan berjalan normal, suhu badan normal.
- 9) Gigi *Incisive* satu kiri rahang bawah, utuh, tidak karies dan tidak fraktur
- 10) Ekstraksi gigi yang dilakukan dengan sempurna, tidak mengalami fraktur akar, gigi dikeluarkan dengan utuh

Kriteria eksklusi : Hewan dinyatakan oleh dokter hewan terbukti tidak berpenyakit atau tidak memenuhi syarat secara fisik dalam kurun waktu evaluasi klinis didalam kondisi lingkungan yang sesuai \pm 1 minggu

4.2 Populasi, Teknik penghitungan sampel dan Besar sampel

4.2.1 Populasi

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *Cavia Cobaya* jantan dengan berat 300-375 gram dengan kondisi yang sehat.

4.2.2 Tehnik penghitungan sampel

Pada penelitian ini, jumlah sampel yang akan diteliti dihitung dengan menggunakan rumus Lemenshow sebagai berikut:

$$n_1 = \left(\frac{2\sigma^2 (Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta})^2}{\mu_1 - \mu_2} \right)^2$$

$$n_1 = \frac{2 (1,364)^2 (1,64 + 1,282)^2}{(9,0000 - 2,6425)^2}$$

$$n_1 = \frac{3,720992 (8,528084)}{6,9828}$$

$$n_1 = 4,5444 \approx 5$$

Keterangan:

- n = besar sampel masing-masing kelompok
 σ = Standar deviasi dari kelompok kontrol
 $Z\alpha$ = *Adjusted* Standar deviasi pada α (untuk $\alpha = 0,05$ adalah 1,64)

Z_{β}
 $\mu_1 - \mu_2$

= *Adjusted* Standar deviasi pada β sebesar 95% ($\beta = 0,95t \rightarrow Z = 1,282$)
 = selisih dari rata-rata sampel kelompok kontrol dan perlakuan, dimana
 $\mu_1 = 13,000 - 4,000 = 9,0000$ dan $\mu_2 = 47,3092 - 44,6667 = 2,6425$
 (Suryatno 1997)

Jadi jumlah minimal sampel yang diperlukan untuk tiap kelompok adalah 5 ekor untuk masing-masing kelompok. Sehingga jumlah sampel secara keseluruhan yaitu 5 ekor x 2 x 3 perlakuan = 30 sampel.

4.2.3 Besar sampel

Besar sampel tiap kelompok adalah 5 sampel, dengan 6 kelompok yang dibedakan berdasarkan 3 perlakuan dan 2 hari dekapitasi pada hari ke tujuh dan hari ke14, yaitu:

- 1) P = Perlakuan, soket gigi diisi dengan EA 3%, BBX dan PEG
- 2) K+ = Kontrol positif, soket gigi diisi dengan BBX dan PEG
- 3) K- = Kontrol negatif, soket gigi hanya diisi dengan PEG

4.3 Pembagian kelompok penelitian

Sampel dibagi dalam 6 kelompok :

- 1) Kelompok 1 (P1) :
Cavia cobaya diekstraksi giginya, diberi Ellagic Acid 3% dan *bovine bone xenograft* + PEG kemudian diperiksa setelah 7 hari
- 2) Kelompok 2 (P2) :
Cavia cobaya diekstraksi giginya, diberi Ellagic Acid 3% dan *bovine bone xenograft* + PEG kemudian diperiksa setelah 14 hari
- 3) Kelompok 3 (K+ 1) :
Cavia cobaya diekstraksi giginya, diberi *bovine bone xenograft* + PEG kemudian diperiksa setelah 7 hari
- 4) Kelompok 4 (k+ 2) :

Cavia cobaya di ekstraksi giginya, diberi *bovine bone xenograft* + PEG kemudian diperiksa setelah 14 hari

5) Kelompok 5 (K- 1) :

Cavia cobaya diekstraksi giginya, diberi PEG sebagai kontrol kemudian diperiksa setelah 7 hari

6) Kelompok 6 (K- 2) :

Cavia cobaya diekstraksi giginya, diberi PEG sebagai kontrol kemudian diperiksa setelah 14 hari

4.4 Variabel Penelitian

1) Variabel Bebas :

Kombinasi Ellagic Acid 3% dan *bovine bone xenograft*

Jadikan dalam 1 gram dengan perbandingan 0,03 gram EA dan 0,97 gram BBX

Lama waktu perlakuan 7 hari dan 14 hari

2) Variabel Tergantung :

Ekspresi TNF- α , ekspresi IL-10, ekspresi BMP-2, ekspresi ALP, ekspresi OSC dan luas *woven bone* alveolar

3) Variabel Terkendali :

Tindakan ekstraksi, jenis anestesi, dosis anestesi, ukuran soket gigi, lokasi ekstraksi gigi, cara pemberian, makanan, lingkungan kandang, berat, umur dan jenis hewan coba.

4.5 Definisi Operasional

- 1) *Ellagic acid* sediaan bentuk bubuk warna kecoklatan yang diisolasi dari *Punica Granatum L.* Diproduksi oleh Xi'an Biof Bio-Technology Co., Ltd. (People Republic of China).

- 2) *Bovine bone xenograft* adalah bahan *xenograft* berupa bubuk warna putih yang telah diradiasi dengan sinar γ dan telah dihilangkan sifat imunogenik dan soft tisuennya, dibuat di Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
- 3) Kombinasi Ellagic Acid 3% dan *bovine bone xenograft* yang dibuat dengan mencampur kedua bahan + *poly ethilen glycol* /PEG diberikan setelah ekstraksi gigi *incisive* bawah kiri pada hewan coba.
- 4) Ekspresi TNF- α adalah jumlah sel makrofag pada jaringan tulang yang bereaksi positif terhadap antibodi monoklonal anti TNF- α pada 1/3 apikal soket gigi yang diperiksa dengan metode imunohistokimia yang diperiksa dibawah mikroskop cahaya lensa trinokuler dengan pembesaran 400x, 20 lapang pandang, 2 pengamat.
- 5) Ekspresi IL-10 adalah jumlah sel makrofag pada jaringan tulang yang bereaksi positif terhadap antibodi monoklonal anti IL-10 pada 1/3 apikal soket gigi yang diperiksa dengan metode imunohistokimia yang diperiksa dibawah mikroskop cahaya lensa trinokuler dengan pembesaran 400x, 20 lapang pandang, 2 pengamat.
- 6) Ekspresi BMP-2 adalah jumlah sel makrofag yang mengekspresikan BMP-2, memberikan reaksi positif terhadap antibodi monoklonal anti *Bone Morphogenetic Protein-2* pada 1/3 apikal soket gigi yang diperiksa dengan metode imunohistokimia yang diperiksa dibawah mikroskop cahaya lensa trinokuler dengan pembesaran 400x, 20 lapang pandang, 2 pengamat.
- 7) Ekspresi *Alkaline Phospatase* adalah jumlah sel osteoblas yang memendarkan warna kecoklatan didalam sitoplasma setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi *alkaline phospatase*, pada 1/3 apikal soket gigi dengan metode imunohistokimia yang diperiksa dibawah mikroskop cahaya lensa trinokuler dengan pembesaran 400x, 20 lapang pandang, 2 pengamat.

- 8) Ekspresi *Osteocalcin* adalah jumlah sel osteoblas yang memendarkan warna kecoklatan didalam sitoplasma setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi *Osteocalcin*, pada 1/3 apikal soket gigi dengan metode imunohistokimia yang diperiksa dibawah mikroskop cahaya lensa trinokuler dengan pembesaran 400x, 20 lapang pandang, 2 pengamat.
- 9) *Woven bone* adalah luas tulang alveolar baru/ immature pada 1/3 apikal soket gigi yang diperiksa dengan pemeriksaan histopatologi anatomi dengan pewarnaan HE yang dihitung pada spesimen dibawah mikroskop lensa trinokuler pembesaran 400x, 20 lapang pandang, oleh 2 pengamat menggunakan *Software Image Raster 3* dengan satuan μm .

4.6 Luaran Penelitian

Menghasilkan suatu bahan untuk memperbaiki kondisi tulang alveol untuk menghambat *Resorpsi Residual Ridge* dan menjaga *Alveolar Ridge Preservation* sehingga dapat meningkatkan fungsi kunyah bagi pegguan gigi tiruan.

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

4.7.1 Bahan :

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Hewan coba yang digunakan adalah *Cavia cobaya*
2. Ellagic acid (ekstrak dari *Punica Granatum L*) satuan g
3. *bovine bone xenograft* (RSUD Dr.SOetomo)
4. NaOH 2% (Merck Germany)
5. NaCl (Merck Hexindo)
6. CH₃COOH (asam asetat)
7. *Aqudest, aquabidest, ethanol 70%* (Merck Germany)
8. Ketamin (Ketalar, Pfizer)
9. Xylazine (Merck Germany)
10. Larutan saline/ PZ (Pharmaceutical Laboratories)
11. Benang silk 3/0 (Polysuture Luxembourg)
12. Betadine (Onemed)
13. Hipavic (Onemed)
14. Kapas

15. Tampon
16. Ether 10%
17. Larutan *buffer* formalin 10%
18. Alkohol 80%
19. Alkohol 95%
20. Alkohol 100% (absolute)
21. Xylene (Merck Germany)
22. *Buffer* paraffin
23. EDTA 10% (JT Baker, USA)
24. NaSO₄ 2 % (Merck Germany)
25. PBS
26. Trypsin 0,125%
27. H₂O₂ 0,5% (Merk Hexindo)
28. Methanol (Merk Germany)
29. Kit Imunohistokimia dan antibodi monoklonal

4.7.2 Alat :

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Timbangan binatang
2. Kandang hewan coba dengan dinding jaring-jaring kawat ukuran 30x20x10 cm³
3. Tempat makan dan minum cavia cobaya
4. Alat untuk ekstraksi gigi hewan coba : syringe 1 cc dan 3 cc, *nierbeken*, gunting, needle holder, jarum jahit 16 G, pinset anatomis, pinset chirurgis, pinset dental, handle dan scalpel
5. Wadah untuk fiksasi dan dekalsifikasi
6. Kotak untuk menyimpan slide preparat HE dan IHC : *glass slide*, *disposable pipet*, *cover glass*
7. Alat untuk melihat hasil pemeriksaan HPA dan IHC : mikroskop cahaya, kamera mikroskop dan software *Image Raster 3*, Program Molegro Virtual Docker 5.0 untuk pemodelan molekul.
8. Alat yang dipergunakan dalam penelitian ini seperangkat alat untuk teknik pemeriksaan imunohistokimia, spektrofotometer UVVIS, MTT

assay reader, untuk pembuatan preparat, mikropipet, tip (yellow, white, blue), mikroskop cahaya, object glass dan cover glass dan mikroskop cahaya (Shimadzu, Japan).

4.8 Lokasi Penelitian

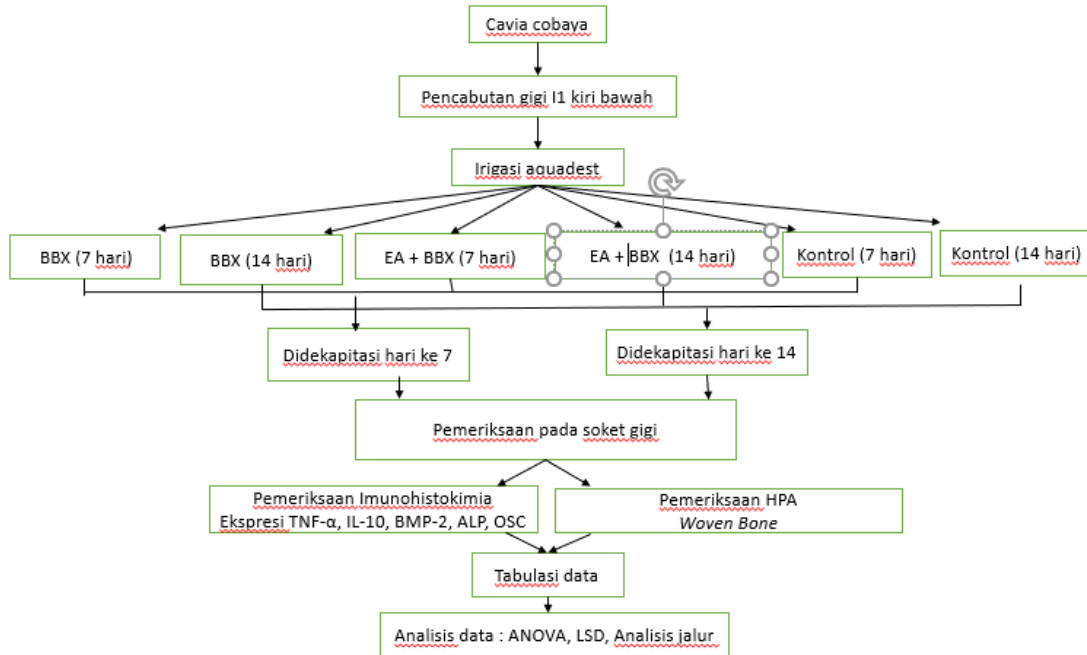
4.8.1 Lokasi

1. Kombinasi bahan *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
2. Persiapan dan pemeliharaan hewan coba di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
3. Perlakuan hewan coba di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
4. Pembuatan preparat HPA di Research Center Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
5. Pemeriksaan HE dan IHC di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.8.2 Waktu

Bulan Januari sampai dengan desember 2020

4.9 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4. 2 : Kerangka Operasional Penelitian

4.10 Prosedur penelitian

4.10.1 Perijinan Ethical clearance

Sebelum penelitian dilakukan, mengajukan proposal ke komisi etik di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

4.10.2 Ellagic Acid

Ellagic acid terstandart (*Certificate Of Analysis*) diproduksi oleh *Xi'an Biof Bio-Technology Co., Ltd. (Room 1-1111, High-tech Venture Park, No. 69 Jinye Road, Gaoxin Distric of Xi'an, People Republic of China)*.

4.10.3 Bovine Bone Xenograft (BBX)

Tulang sapi yang diproses terlebih dahulu, lolos dari screening penyakit-penyakit menular. Sapi yang digunakan memiliki kualitas bagus dan bebas penyakit, selanjutnya diproses melalui proses diseksi untuk menghilangkan soft tissue yang

masih menempel. Lalu dilakukan proses pemotongan, pencucian, pengeringan, proses *deep frozen, freeze dried*, pengepakan dan yang terakhir adalah proses sterilisasi dengan menggunakan sinar gamma. Sebelum di distribusikan akan menjalani standarisasi mutu yaitu harus bebas bakteri dan pemeriksaan kadar air. Dibuat di Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya.

4.10.4 Poly Etylen Glycol (PEG)

Sebagai bahan pembawa dipakai PEG, dipergunakan campuran PEG dari campuran PEG 400 dan PEG 4000 dengan perbandingan 1 : 1. Semua bahan pengisi ditambah dengan PEG, baik *bovine bone xenograft* , dan kombinasi ellagic acid + *bovine bone xenograft*

4.10.5 Pencampuran ellagic acid dengan *bovine bone xenograft*

Gel BBX dibuat dengan cara mencampurkan BBX dengan PEG dengan perbandingan 1 : 0,25. Sedangkan pembuatan gel kombinasi BBX + EA dilakukan dengan mencampurkan bubuk BBX dan bubuk EA dengan perbandingan BBX 97% : EA 3%.

4.11 Perlakuan Hewan Coba

4.11.1 Tahapan persiapan Hewan Coba

Pada penelitian ini hewan coba yang digunakan adalah *Cavia cobaya* jantan, usia 3-3,5 bulan, berat badan 300-375 gram, diadaptasikan dengan tempat penelitian selama kira-kira 1 minggu. Hewan coba diletakkan dalam kandang yang jauh dari kebisingan, setiap kandang berisi 2 ekor *cavia cobaya* setiap kandangnya dengan diberi penyekat, diberi makan dengan pelet ayam dan diberi minum *adlibitum* dengan menggunakan air PDAM. Kandang hewan coba terbuat dari kotak plastik dengan ukuran 40x30x20 cm dan ditutup dengan anyaman kawat yang dapat dilepas sehingga mudah dibersihkan. Alas kandang diberi sekam dan diganti setiap dua hari dan dilakukan oleh orang yang *expert* dibidangnya.

4.11.2 Tahapan perlakuan Hewan Coba

Hewan coba dianestesi dengan menggunakan ketamin-*xylazine* dengan perbandingan dosis 0,1 ml : 0,1 ml yang dilarutkan dalam *isotonic saline solution steril* (0,2 ml/ 50gr bb) pada paha atas kanan.

4.11.3 Ekstraksi gigi Hewan Coba

Prinsip kerja aseptis, semua alat disterilkan dengan panas kering 160⁰ C selama 1 jam, desinfeksi pada paha kanan atas marmut dengan betadine sebelum melakukan anestesi intramuscular. Setelah itu dilakukan pembersihan pada daerah ekstraksi dengan semprotan air dan cairan antiseptik untuk aseptis daerah ekstraksi. Kemudian dilakukan ekstraksi gigi *incisive* satu kiri rahang bawah pada *cavia cobaya* menggunakan alat modifikasi tang dan elevator, soket gigi diirigasi dengan cairan *aquadest* steril untuk menghilangkan sisa debris yang tertinggal didalam soket gigi. Perlakuan dilakukan oleh orang yang *expert* dengan kriteria arah tarikan dan kekuatan sama. Trauma sekecil mungkin untuk mendapatkan homogenitas sampel.

4.11.4 Aplikasi Ellagic Acid dan *bovine bone xenograft*

Ellagic Acid dan *bovine bone xenograft* dimasukkan di soket gigi hingga bagian ujung apikal gigi segera setelah dilakukan ekstraksi gigi, kemudian dijahit lukanya dengan *non resorbable suture*.

4.11.5 Tahap Euthanasia Hewan Coba

Hewan coba didekapitasi pada hari ke 7 dan 14 setelah pemberian perlakuan. Tulang rahang di daerah interdental gigi *Incisive* rahang bawah dipotong dan dimasukkan dalam larutan fiksasi *buffer formalin* 10 % dan *Cavia cobaya* yang telah mati dikubur.

4.12 Pembuatan Preparat Histologis (HPA)

4.12.1 Perendaman Jaringan dengan Larutan Phosphate Buffered Formalin

Jaringan yang sudah terambil, dilakukan fiksasi dengan menggunakan larutan Phosphate Buffer 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 (y w li 2001). Fiksasi jaringan dilakukan selama minimal 24 jam

4.12.2 Perendaman larutan dekalsifikasi

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

4.12.3 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 benzen. Pada penelitian ini menggunakan xylol. Tahapan clearing sebagai berikut :

- a) Xylol = 1 jam
- b) Xylol = 2 jam
- c) Xylol = 2 jam

3) *Impregnasi*

Merupakan proses infiltrasi bahan embedding dalam jaringan pada suhu 56°-60°C. Tahapan ini dilakukan dengan cara 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.

4) Pembuatan Blok Jaringan (embedding)

Embedding merupakan proses penanaman jaringan ke dalam suatu bahan *embedding*, yaitu *paraffin*, *cellulose*, atau *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) Pemotongan Blok Parafin

Alat yang digunakan untuk memotong blok paraffin adalah *rotary microtom*. Gelas obyek disiapkan dan diberi label sesuai dengan nomor spesimen. Blok paraffin diletakkan pada *head microtom* dan diatur ketebalan yaitu 4µm. *Water bath (tissue flotation bath)* disiapkan pada suhu 40⁰ C. Sayatan yang diperoleh diletakkan pada *water bath* agar sayatan dapat mengembang dengan baik lalu ditiriskan.

6) Pewarnaan (*Staining*)

Dengan tahapan deparanisasi yaitu menghilangkan paraffin dengan *xylol* sebanyak 3 kali, hidrasi dengan menggunakan alkohol dari konsentrasi tinggi ke

rendah, pengecatan *mayer hematoxylin* selama 15 menit, diferensiasi menggunakan air mengalir, preparat dimasukkan ke dalam larutan eosin 1% selama 30 detik dengan *counter stain/ cat* pembeding, dehidrasi, *clearing* dan *mounting* yaitu menutup jaringan dengan menggunakan perekat atau *cover glass*.

4.13 Pembuatan Preparat Imunohistokimia (IHC)

Tahapan untuk melakukan pengecatan imunohistokimia dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1) Sediaan dilakukan deparafinisasi preparat dengan larutan xylene sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit.
- 2) Rehidrasi dengan menggunakan etanol 100%, etanol 95% dan etanol 70% masing-masing selama dua menit, satu menit dan terakhir dengan air selama satu menit.
- 3) Object glass direndam dengan *peroxidase blocking solution* pada suhu kamar selama 10 menit.
- 4) Inkubasi preparat dalam *prediluted blocking serum 25°C* selama 10 menit.
- 5) Preparat direndam di dalam antibodi poliklonal 25°C selama 10 menit.
- 6) Preparat dicuci dengan fosfatase buffer saline (PBS) selama 5 menit.
- 7) Inkubasi preparat dengan antibody sekunder pada suhu 25°C selama 10 menit.
- 8) Preparat dicuci dengan fosfatase buffer salien (PBS) selama 5 menit.
- 9) Inkubasi preparat dengan peroxidase pada suhu 25°C selama 10 menit.
- 10) Preparat dicuci dengan fosfatase buffer salien (PBS) selama 5 menit.
- 11) Inkubasi preparat dengan kromoden diaminobenzidine (DAB) pada suhu 25° C selama 10 menit.
- 12) Inkubasi preparat Hematoxylin selama 3 menit.
- 13) Preparat dicuci dengan air mengalir.
- 14) Preparat dibersihkan dan ditetesi dengan mounting media kemudian ditutup dengan cover glass.

15) Pengamatan hasil ekspresi dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dalam 20 lapangan pandang. Ekspresi dianalisis melalui warna coklat oleh DAB yang terlihat saat dilakukan identifikasi preparat Imunohistokimia. Hasil didapatkan dengan menghitung jumlah ekspresi pada 20 lapangan pandang pada tiap sampel.

4.14 Cara analisis dan pengolahan data

Analisis data terhadap hasil pemeriksaan jumlah sel yang mengekspresikan TNF- α , IL-10, BMP-2, ALP, *Osteocalcin* dan pembentukan *woven bone* pada setiap kelompok yaitu dengan menganalisis rerata dan simpang baku yang bertujuan untuk memperoleh gambaran distribusi dan peringkasan data untuk memperjelas hasil. Selanjutnya dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk*, selanjutnya untuk mengetahui antar kelompok memiliki variasi yang homogen digunakan *Levene's test* tingkat kemaknaan 5%.

Jika data berdistribusi normal dan memiliki variasi data homogen dilanjutkan dengan uji statistik komparasi *analysis of variance* dan dilanjutkan dengan uji *multiple comparison LSD test* jika $p < 0,05$. Apabila data tidak berdistribusi normal dilakukan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*, sedangkan untuk mengetahui pasangan kelompok yang berbeda dilakukan analisis *Wilcoxon-Mann Whitney*. Analisis jalur digunakan untuk mengetahui hubungan antara variable ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, ALP, *Osteocalcin* dan pembentukan *woven bone*.

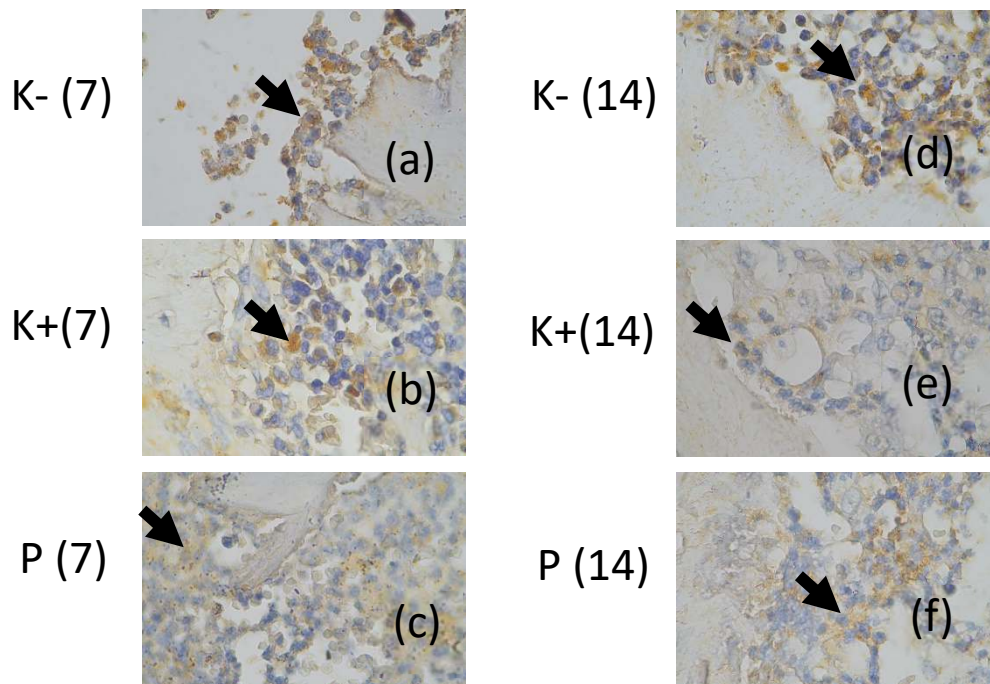
BAB V
HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil penelitian

5.1.1 Hasil Pemeriksaan Imunohistokimia

Sampel *Cavia Cobaya* dilakukan dekapitasi pada hari ke-7 dan ke-14 kemudian diambil jaringan tulang untuk dilakukan pembuatan sediaan histologi. Sediaan histologi dalam bentuk paraffin blok dilakukan uji imunohistokimia dan uji histopatologi untuk melihat aktivitas seluler selama penyembuhan tulang, yang ditandai dengan adanya ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phospatase*, *Osteocalcin* serta *Woven Bone*.

5.1.1.1 Pemeriksaan Ekspresi TNF- α



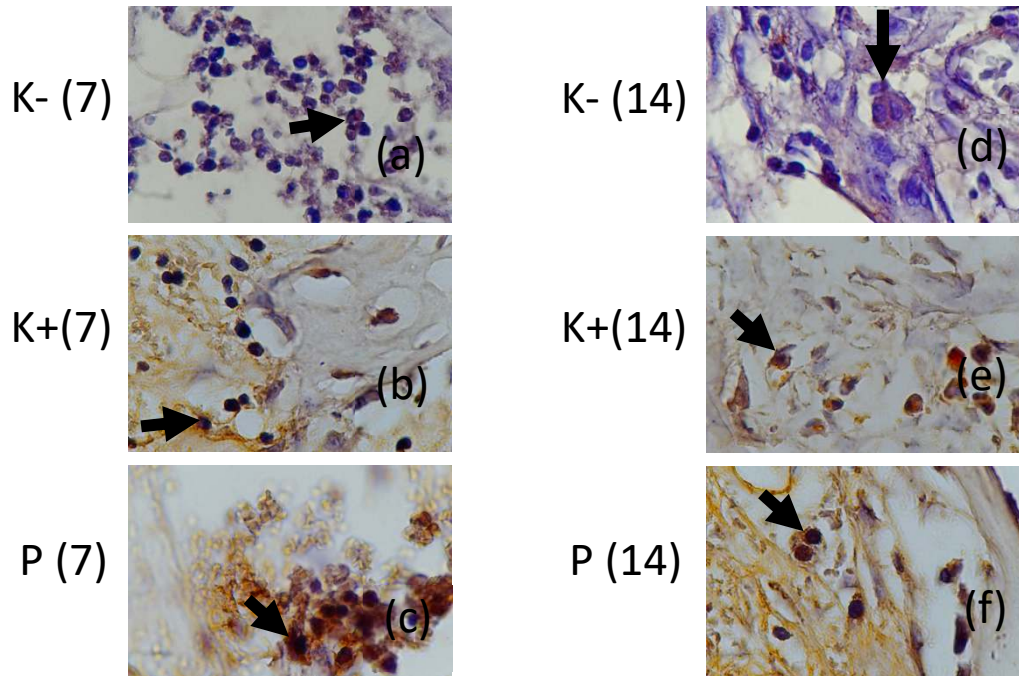
Gambar 5. 1 : Ekspresi TNF- α pada pembesaran 1000x

Keterangan :

- a. Ekspresi TNF- α pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-7
- b. Ekspresi TNF- α pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-7
- c. Ekspresi TNF- α pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-7
- d. Ekspresi TNF- α pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-14
- e. Ekspresi TNF- α pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-14
- f. Ekspresi TNF- α pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-14

Ekspresi TNF- α pada makrofag yang menunjukkan warna coklat *Diamino Benzidine* (DAB) ditandai dengan ujung panah. Kelompok kontrol negatif hari ke-7 (a), kelompok kontrol positif hari ke-7 (b), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-7 (c), kelompok kontrol negatif hari ke-14 (d), kelompok kontrol positif hari ke-14 (e), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-14 (f) dengan pembesaran 1000x.

5.1.1.2 Pemeriksaan Ekspresi IL-10



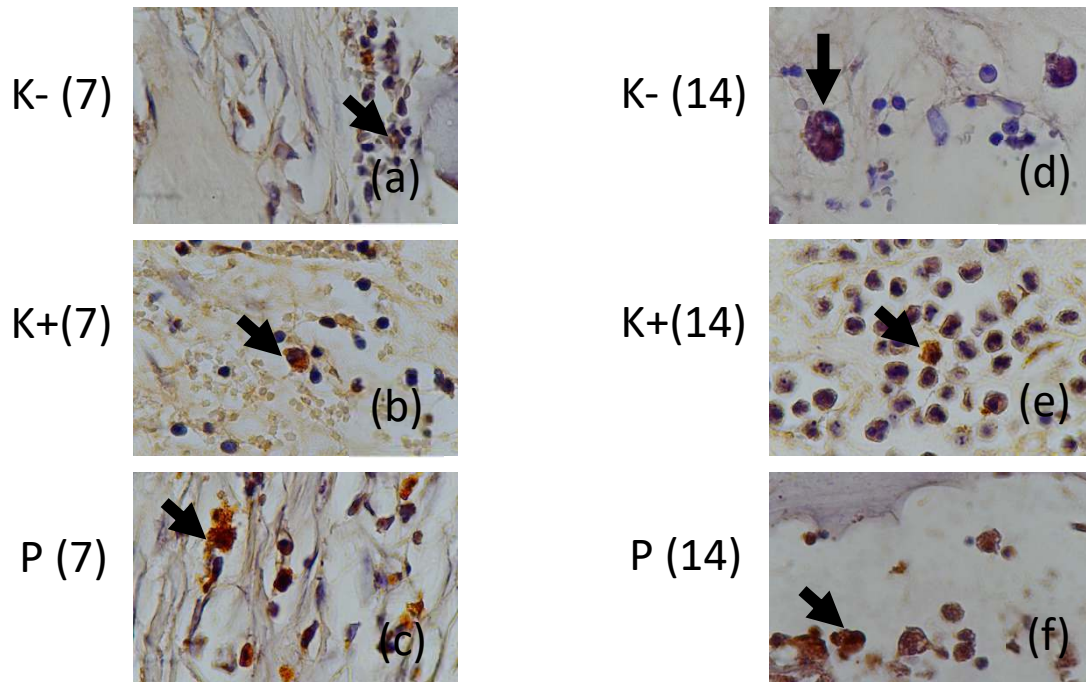
Gambar 5. 2 : Ekspresi IL-10 pada pembesaran 1000x

Keterangan :

- a. Ekspresi IL-10 pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-7
- b. Ekspresi IL-10 pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-7
- c. Ekspresi IL-10 pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-7
- d. Ekspresi IL-10 pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-14
- e. Ekspresi IL-10 pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-14
- f. Ekspresi IL-10 pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-14

Ekspresi IL-10 pada makrofag yang menunjukkan warna coklat *Diamino Benzidine* (DAB) ditandai dengan ujung panah. Kelompok kontrol negatif hari ke-7 (a), kelompok kontrol positif hari ke-7 (b), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-7 (c), kelompok kontrol negatif hari ke-14 (d), kelompok kontrol positif hari ke-14 (e), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-14 (f) dengan pembesaran 1000x.

5.1.1.3 Pemeriksaan Ekspresi BMP-2



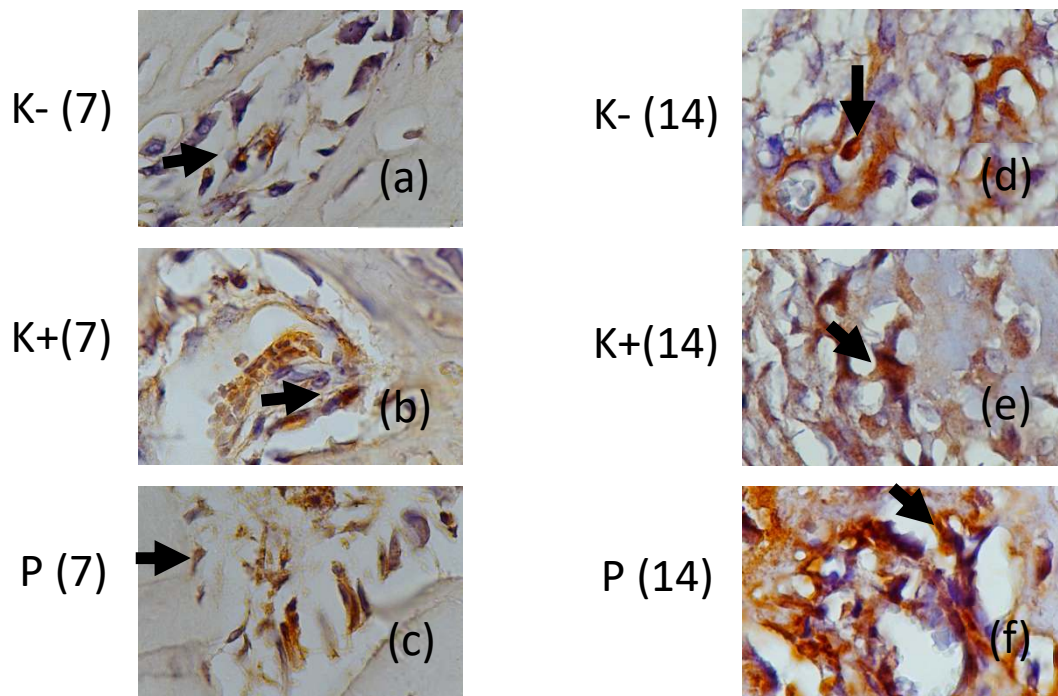
Gambar 5. 3 : Ekspresi BMP-2 pada pembesaran 1000x

Keterangan :

- Ekspresi BMP-2 pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-7
- Ekspresi BMP-2 pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-7
- Ekspresi BMP-2 pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-7
- Ekspresi BMP-2 pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-14
- Ekspresi BMP-2 pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-14
- Ekspresi BMP-2 pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-14

Ekspresi BMP-2 pada makrofag yang menunjukkan warna coklat *Diamino Benzidine* (DAB) ditandai dengan ujung panah. Kelompok kontrol negatif hari ke-7 (a), kelompok kontrol positif hari ke-7 (b), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-7 (c), kelompok kontrol negatif hari ke-14 (d), kelompok kontrol positif hari ke-14 (e), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-14 (f) dengan pembesaran 1000x.

5.1.1.4 Pemeriksaan Ekspresi *Alkaline Phosphatase*



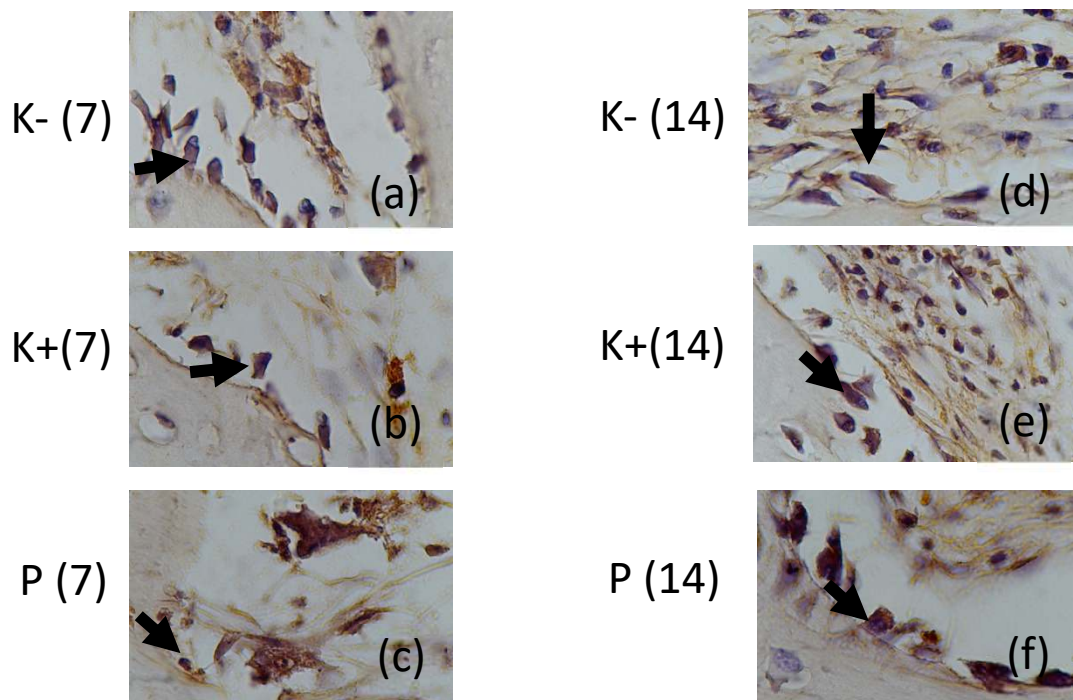
Gambar 5. 4 : Ekspresi *Alkaline Phosphatase* pada pembesaran 1000x

Keterangan :

- a. Ekspresi ALP pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-7
- b. Ekspresi ALP pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-7
- c. Ekspresi ALP pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-7
- d. Ekspresi ALP pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-14
- e. Ekspresi ALP pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-14
- f. Ekspresi ALP pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-14

Ekspresi *Alkaline Phosphatase* pada osteoblas yang menunjukkan warna coklat *Diamino Benzidine* (DAB) ditandai dengan ujung panah. Kelompok kontrol negatif hari ke-7 (a), kelompok kontrol positif hari ke-7 (b), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-7 (c), kelompok kontrol negatif hari ke-14 (d), kelompok kontrol positif hari ke-14 (e), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-14 (f) dengan pembesaran 1000x.

5.1.1.5 Pemeriksaan Ekspresi *Osteocalcin*



Gambar 5. 5 : Ekspresi *Osteocalcin* pada pembesaran 1000x

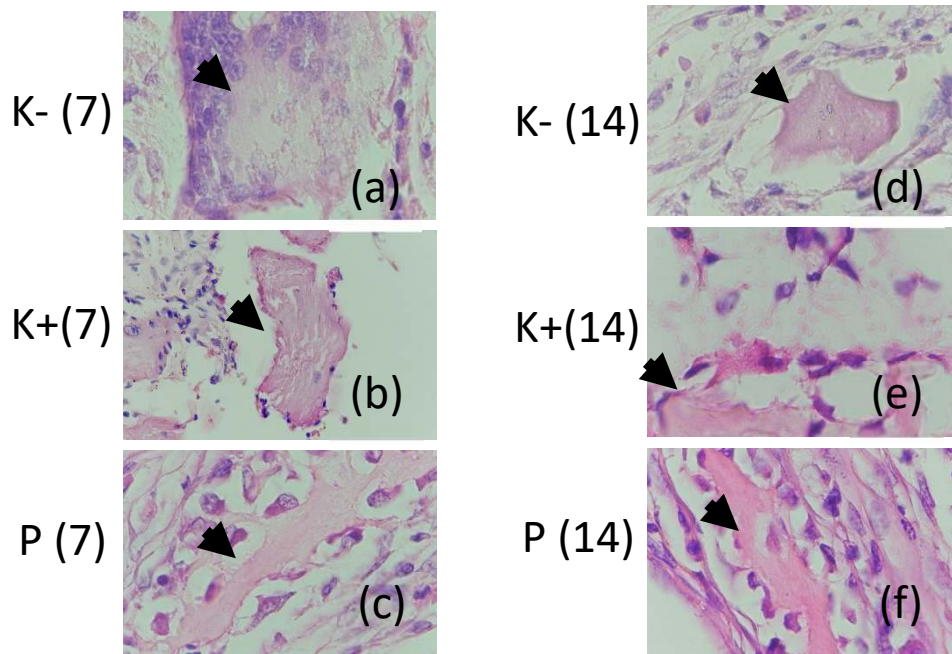
Keterangan :

- Ekspresi OCN pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-7
- Ekspresi OCN pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-7
- Ekspresi OCN pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-7
- Ekspresi OCN pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-14
- Ekspresi OCN pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-14
- Ekspresi OCN pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-14

Ekspresi *Osteocalcin* pada osteoblas yang menunjukkan warna coklat *Diamino Benzidine* (DAB) ditandai dengan ujung panah. Kelompok kontrol negatif hari ke-7 (a), kelompok kontrol positif hari ke-7 (b), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-7 (c), kelompok kontrol negatif hari ke-14 (d), kelompok kontrol positif hari ke-14 (e), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-14 (f) dengan pembesaran 1000x.

5.1.2 Hasil Pemeriksaan Histopatologi

5.1.2.1 Pemeriksaan *Woven bone*



Gambar 5. 6 : *Woven bone* pada pembesaran 1000x

Keterangan :

- a. Ekspresi WB pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-7
- b. Ekspresi WB pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-7
- c. Ekspresi WB pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-7
- d. Ekspresi WB pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol negatif hari ke-14
- e. Ekspresi WB pada pemeriksaan IHC kelompok kontrol positif hari ke-14
- f. Ekspresi WB pada pemeriksaan IHC kelompok perlakuan hari ke-14

Woven Bone pada tulang alveolar baru/ *immature* menunjukkan warna biru ditandai dengan ujung panah. Kelompok kontrol negatif hari ke-7 (a), kelompok kontrol positif hari ke-7 (b), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-7 (c), kelompok kontrol negatif hari ke-14 (d), kelompok kontrol positif hari ke-14 (e), kelompok perlakuan EA dan BBX hari ke-14 (f) dengan pembesaran 1000x.

5.2 Analisis Hasil Penelitian

Data hasil penelitian dicatat dan dikumpulkan. Kemudian yang telah diperoleh ditabulasi dan dianalisa data dengan program SPSS 25 *for Windows*.

5.2.1 Rerata dan Standar deviasi

Tabel 5. 1 : Rerata Ekspresi TNF- α , IL-10 dan BMP-2

Kelompok	TNF- α		IL-10		BMP-2	
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
K- 7	11.66	2.65	3.83	1.47	5.33	2.80
K+7	7.83	3.18	9.83	2.31	9.66	1.75
P 7	7.16	2.31	9.33	2.58	12.33	2.58
K- 14	12.16	1.94	6.66	1.86	4.83	2.13
K+ 14	6.83	1.47	13.50	3.01	12.50	3.08
P 14	5.83	2.71	14.33	2.73	13.16	2.78

Keterangan :

- K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
- K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
- P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
- K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14
- K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
- P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata pada TNF- α tertinggi terdapat pada kelompok K-14 sebesar 12,16 dengan nilai standar deviasi sebesar 1,94. Nilai rata-rata TNF- α terendah terdapat pada kelompok P14 sebesar 5,83 dengan nilai standar deviasi sebesar 2,71.

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata pada IL-10 tertinggi terdapat pada kelompok P14 sebesar 14,33 dengan nilai standar deviasi sebesar 2,73. Nilai rata-rata IL-10 terendah terdapat pada kelompok K-7 sebesar 3,83 dengan nilai standar deviasi sebesar 1,47.

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata pada BMP-2 tertinggi terdapat pada kelompok P14 sebesar 13,16 dengan nilai standar deviasi sebesar 2,78. Nilai rata-rata BMP-2 terendah terdapat pada kelompok K-14 sebesar 4,83 dengan nilai standar deviasi sebesar 2,13.

Tabel 5. 2 : Rerata Ekspresi Alkaline Phospatase, Osteocalcin dan Woven Bone

Kelompok	<i>Alkaline Phospatase</i>		<i>Osteocalcin</i>		<i>Woven Bone</i>	
	Rerata	SD	Rerata	SD	Rerata	SD
K- 7	2.66	1.36	5.00	0.89	58.50	9.69
K+ 7	9.00	2.36	9.50	1.76	39.83	13.09
P 7	8.66	2.33	11.66	1.63	94.50	15.21
K- 14	4.50	1.37	8.00	1.26	72.83	19.86
K+ 14	14.16	2.78	13.33	1.36	109.00	13.46
P 14	14.16	2.71	14.50	2.16	168.50	24.35

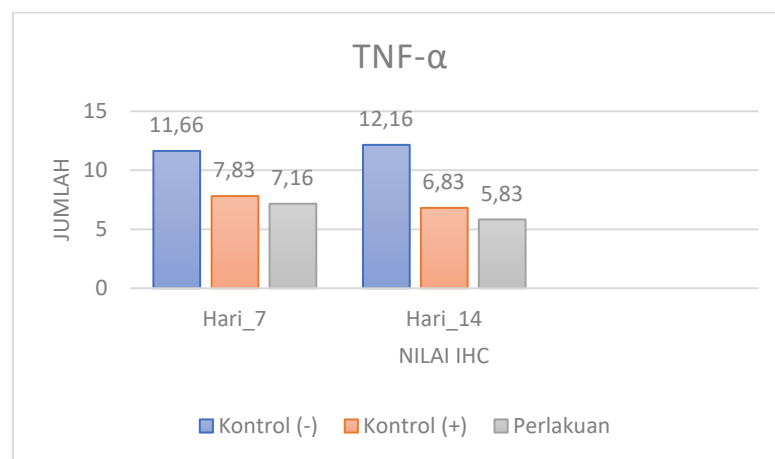
Keterangan :

- K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
- K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
- P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
- K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14
- K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
- P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata pada *Alkaline Phospatase* tertinggi terdapat pada kelompok K+14 sebesar 14,16 dengan nilai standar deviasi sebesar 2,78. Nilai rata-rata *Alkaline Phospatase* terendah terdapat pada kelompok K-7 sebesar 2,66 dengan nilai standar deviasi sebesar 1,36.

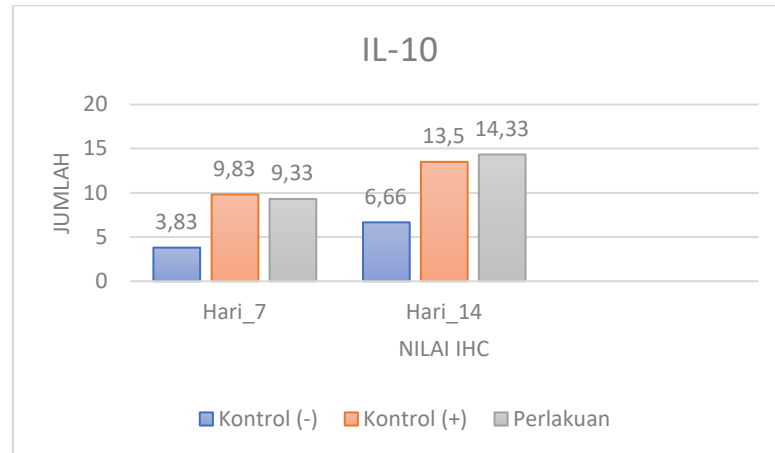
Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata pada *Osteocalcin* tertinggi terdapat pada kelompok P14 sebesar 14,50 dengan nilai standar deviasi sebesar 2,16. Nilai rata-rata *Osteocalcin* terendah terdapat pada kelompok K-7 sebesar 5,00 dengan nilai standar deviasi sebesar 0,89.

Hasil penelitian menunjukkan nilai rata-rata pada *Woven Bone* tertinggi terdapat pada kelompok P14 sebesar 168,50 dengan nilai standar deviasi sebesar 24,35. Nilai rata-rata *Woven Bone* terendah terdapat pada kelompok K+7 sebesar 39,83 dengan nilai standar deviasi sebesar 13,09. Uji statistik selanjutnya adalah uji normalitas data dengan menggunakan *Shapiro-Wilk*.



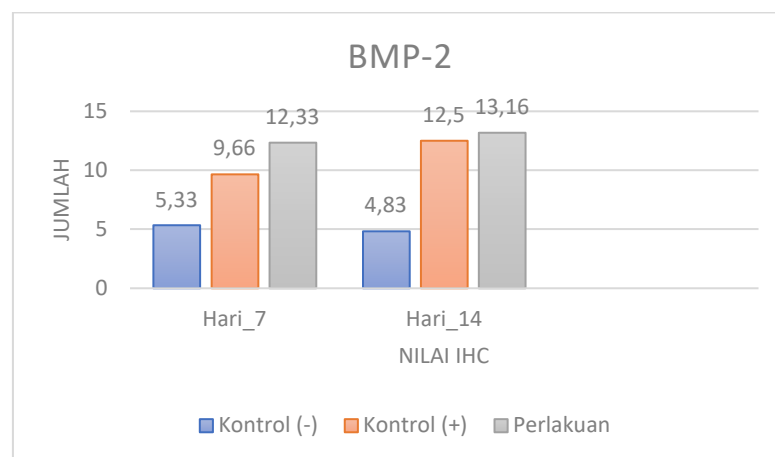
Gambar 5. 7 : Diagram batang rerata Ekspresi TNF- α

Pada pemeriksaan IHC untuk ekspresi TNF- α , didapatkan hasil nilai rerata tertinggi terdapat pada kelompok kontrol negatif (K-) yaitu sebesar 12,16 pada hari ke-14. Sedangkan rerata nilai ekspresi TNF- α terendah pada kelompok perlakuan (P) yaitu sebesar 5,83 pada hari ke-14. Peran anti-inflamasi EA pada kelompok perlakuan (EA+BBX) tidak terbukti karena kelompok kontrol positif (BBX) juga mempunyai tingkat ekspresi TNF-a yang setara dengan kelompok perlakuan.



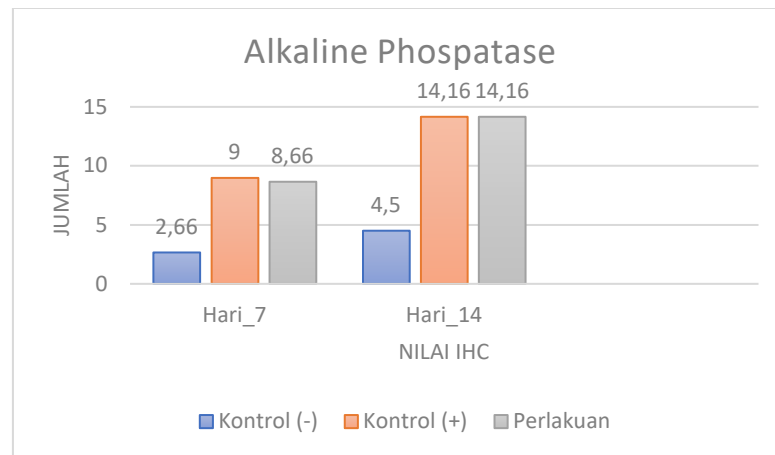
Gambar 5. 8 : Diagram batang rerata Ekspresi IL-10

Pada pemeriksaan IHC untuk ekspresi IL-10, didapatkan hasil nilai rerata tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan (P) yaitu sebesar 14,33 pada hari ke-14. Sedangkan rerata nilai ekspresi IL-10 terendah pada kelompok kontrol negatif (K-) yaitu sebesar 3,83 pada hari ke-7. Peran anti-inflamasi EA pada kelompok perlakuan (EA+BBX) tidak terbukti karena kelompok kontrol positif (BBX) juga mempunyai tingkat ekspresi IL-10 yang setara dengan kelompok perlakuan.



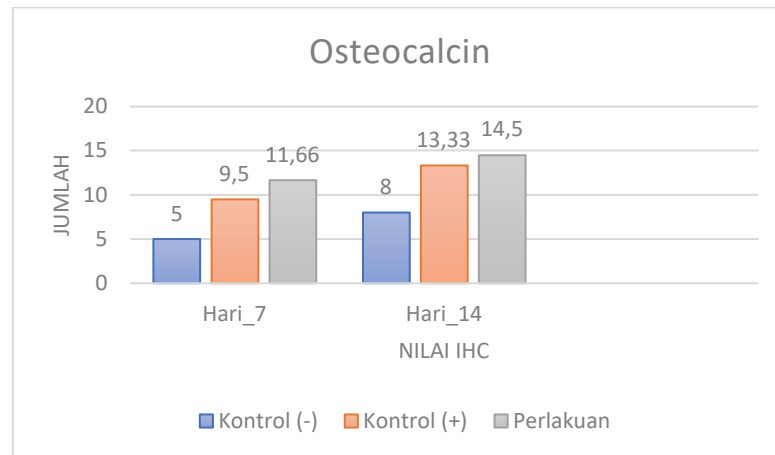
Gambar 5. 9 : Diagram batang rerata Ekspresi BMP-2

Pada pemeriksaan IHC untuk ekspresi BMP-2, didapatkan hasil nilai rerata tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan (P) yaitu sebesar 13,16 pada hari ke-14. Sedangkan rerata nilai ekspresi BMP-2 terendah pada kelompok kontrol negatif (K-) yaitu sebesar 4,83 pada hari ke-14. Peran EA pada kelompok perlakuan (EA+BBX) dalam meningkatkan ekspresi BMP2 tidak terbukti karena tingkat BMP2 pada kelompok kontrol positif (BBX) setara dengan kelompok perlakuan.



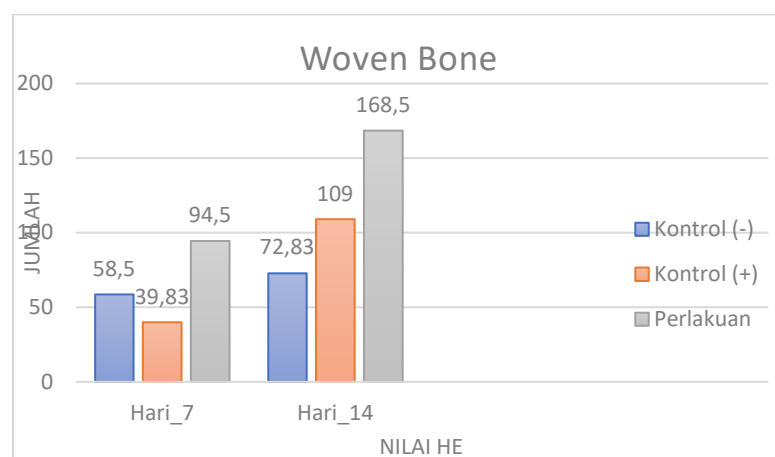
Gambar 5. 10 : Diagram batang rerata Ekspresi *Alkaline Phospatase*

Pada pemeriksaan IHC untuk ekspresi *Alkaline Phospatase*, didapatkan hasil nilai rerata tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan (P) yaitu sebesar 14,16 pada hari ke-14 juga kelompok kontrol positif (K+) yaitu sebesar 14,16 pada hari ke-14. Sedangkan rerata nilai ekspresi *Alkaline Phospatase* terendah pada kelompok kontrol negatif (K-) yaitu sebesar 2,66 pada hari ke-7. Peran EA pada kelompok perlakuan (EA+BBX) akan meningkatkan ekspresi *Alkaline Phospatase* tidak terbukti karena ekspresi *Alkaline Phospatase* pada kelompok kontrol positif (BBX) setara dengan kelompok perlakuan.



Gambar 5. 11 : Diagram batang rerata Ekspresi *Osteocalcin*

Pada pemeriksaan IHC untuk ekspresi, didapatkan hasil nilai rerata tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan (P) yaitu sebesar 14,5 pada hari ke-14. Sedangkan rerata nilai ekspresi *Osteocalcin* terendah pada kelompok kontrol negatif (K-) yaitu sebesar 5 pada hari ke-7. Peran EA pada kelompok perlakuan (EA+BBX) akan meningkatkan ekspresi *Osteocalcin* tidak terbukti karena ekspresi *Osteocalcin* pada kelompok kontrol positif (BBX) setara dengan kelompok perlakuan.



Gambar 5. 12 : Diagram batang rerata *Woven bone*

Pada pemeriksaan HE untuk *Woven Bone*, didapatkan hasil nilai rerata tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan (P) yaitu sebesar 168,5 hari ke-14. Sedangkan rerata nilai *Woven Bone* terendah pada kelompok kontrol positif (K+) yaitu sebesar 39,83 pada hari ke-7. Peran EA pada kelompok perlakuan (EA+BBX) akan meningkatkan osteogenesis terbukti karena pembentukan *woven bone* pada kelompok perlakuan lebih tinggi dari pada kelompok kontrol positif (BBX).

5.2.2 Uji Normalitas

Uji normalitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Shapiro-wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50. Hasil uji normalitas dapat di lihat pada tabel 5.13.

Tabel 5. 3 : Hasil Uji Normalitas Data *Shapiro-wilk*

Kelompok	TNF- α	IL-10	BMP-2	ALP	OCN	WB
K- 7	0.204	0.804	0.660	0.554	0.167	0.083
K+ 7	0.653	0.801	0.059	0.739	0.505	0.525
P 7	0.781	0.945	0.184	0.421	0.505	0.448
K- 14	0.452	0.737	0.875	0.191	0.110	0.406
K+ 14	0.804	0.315	0.755	0.540	0.554	0.705
P 14	0.191	0.554	0.525	0.459	0.215	0.936

Keterangan :

- K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
- K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
- P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
- K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14
- K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
- P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa semua data pada tiap masing kelompok terdistribusi normal. Hal ini ditunjukkan dengan nilai signifikansi *Saphiro-Wilk* pada

tiap kelompok lebih besar dari 0,05. Uji statistik selanjutnya adalah uji homogenitas data dengan menggunakan *Levene's test*.

5.2.3 Uji Homogenitas

Uji homogenitas yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Levene's test*. Hasil uji homogenitas dapat di lihat pada tabel 5.14

Tabel 5. 4 : Hasil Uji Homogenitas *Levene Test*

Kelompok	TNF- α	IL-10	BMP-2	ALP	OCN	WB
<i>Sig.</i>	0.572	0.507	0.688	0.294	0.178	0.107

Hasil uji homogenitas menunjukkan data yang diperoleh memiliki varian yang homogen. Hal ini ditunjukkan dengan nilai signifikansi yang lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Uji statistik selanjutnya adalah uji *One-way Anova*.

5.2.4 Uji One-Way Anova

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan data berdistribusi normal dan homogen sehingga analisis data dilanjutkan dengan menggunakan uji *One-way Anova*. Uji *one-way Anova* bertujuan untuk melihat adanya pengaruh pemberian bahan kombinasi EA 3% dan *bovine bone xenograft* terhadap ekspresi TNF- α , IL_10, BMP-2, *alkaline phosphatase*, *osteocalcin* dan *woven bone* pada pasca ekstraksi gigi *cavia cobaya*. Hasil uji one-way anova dapat dilihat pada tabel 5.15

Tabel 5. 5 : Hasil uji *One-way Anova* hari ke-7

Kelom pok	TNF- α		IL-10		BMP-2		ALP		OCN		WB	
	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>
K- 7	6		6		6		6		6		6	
K+ 7	6	0.026	6	0.000	6	0.001	6	0.000	6	0.000	6	0.000
P 7	6		6		6		6		6		6	

Keterangan :

K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7

K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7

P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7

Hasil uji *One-way Anova* hari ke-7 menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$. Hal ini dapat diartikan bahwa setidaknya ada beberapa kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan bermakna pada jumlah ekspresi TNF- α , IL_10, BMP-2, *alkaline phosphatase*, *osteocalcin* dan *woven bone*. Uji statistik selanjutnya adalah uji *Post Hoc* LSD.

Tabel 5. 6 : Hasil uji *One-Way Anova* hari ke-14

Kelom pok	TNF- α		IL-10		BMP-2		ALP		OCN		WB	
	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>	N	<i>p</i>
K- 14	6		6		6		6		6		6	
K+ 14	6	0.000	6	0.000	6	0.000	6	0.000	6	0.000	6	0.000
P 14	6		6		6		6		6		6	

Keterangan :

K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14

K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14

P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil uji *One-way Anova* hari ke-14 menunjukkan nilai signifikansi $p < 0,05$. Hal ini dapat diartikan bahwa setidaknya ada beberapa kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan bermakna pada jumlah ekspresi TNF- α , IL_10, BMP-2, *alkaline phosphatase*, *osteocalcin* dan *woven bone*. Uji statistik selanjutnya adalah uji *Post Hoc LSD*.

5.2.5 Uji *post Hoc LSD*

Uji *post Hoc LSD* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan yang bermakna. Hasil uji *post Hoc LSD* pada masing-masing variabel dapat dilihat pada tabel 5.16

Tabel 5. 7 : Hasil Uji *post Hoc LSD* kelompok TNF- α

	K+ 7	P 7	K- 14	K+ 14	P 14
K- 7	0.011*	0.003*	0.726	0.002*	0.000*
K+ 7	-	0.640	0.005*	0.484	0.167
P 7	-	-	0.001*	0.815	0.353
K- 14	-	-	-	0.001*	0.000*
K+ 14	-	-	-	-	0.484
P 14	-	-	-	-	-

Keterangan :

- K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
- K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
- P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
- K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14
- K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
- P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan pada 8 kelompok dengan nilai signifikansi $< 0,05$. Yaitu pada kelompok K-7 dengan kelompok K+7, kelompok K-7 dengan kelompok P7, kelompok K-7 dengan kelompok K+14, kelompok K-7 dengan kelompok P14, kelompok K+7 dengan kelompok K-14, kelompok P7 dengan

kelompok K-14, kelompok K-14 dengan kelompok K+14, kelompok K-14 dengan kelompok P14.

Tabel 5. 8 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok IL-10

	K+7	P 7	K- 14	K+ 14	P 14
K- 7	0.000*	0.000*	0.049*	0.012*	0.000*
K+ 7	-	0.719*	0.029*	0.005*	0.001*
P 7	-	-	0.063	0.005*	0.001*
K- 14	-	-	-	0.000*	0.000*
K+ 14	-	-	-	-	0.550
P 14	-	-	=	-	-

Keterangan :

- K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
- K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
- P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
- K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14
- K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
- P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan pada 13 kelompok dengan nilai signifikansi $< 0,05$. Yaitu pada kelompok K-7 dengan kelompok K+7, kelompok K-7 dengan kelompok P7, kelompok K-7 dengan kelompok K-14, kelompok K-7 dengan kelompok K+14, kelompok K-7 dengan kelompok P14, kelompok K+7 dengan kelompok P7, kelompok K+7 dengan kelompok K-14, kelompok K+7 dengan kelompok P14, kelompok P7 dengan kelompok K-14, kelompok P7 dengan kelompok K+14, kelompok P7 dengan kelompok P14, kelompok K-14 dengan kelompok K+14, kelompok K-14 dengan kelompok P14.

Tabel 5. 9 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok BMP-2

	K+ 7	P 7	K- 14	K+ 14	P 14
K- 7	0.006*	0.000*	0.738	0.000*	0.000*
K+ 7	-	0.082	0.003*	0.065	0.025*
P 7	-	-	0.000*	0.911	0.578
K- 14	-	-	-	0.000*	0.000*
K+ 14	-	-	-	-	0.656
P 14	-	-	-	-	-

Keterangan :

- K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
 K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
 P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
 K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14
 K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
 P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan pada 9 kelompok dengan nilai signifikansi $< 0,05$. Yaitu pada kelompok K-7 dengan kelompok K+7, kelompok K-7 dengan kelompok P7, kelompok K-7 dengan kelompok K+14, kelompok K-7 dengan kelompok P14, kelompok K+7 dengan kelompok K-14, kelompok K+7 dengan kelompok P14, kelompok P7 dengan kelompok K-14, kelompok K-14 dengan kelompok K+14, kelompok K-14 dengan kelompok P14.

Tabel 5. 10 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok *Alkaline Phospatase*

	K+ 7	P 7	K- 14	K+ 14	P 14
K- 7	0.000*	0.000*	0.166	0.000*	0.000*
K+ 7	-	0.798	0.002*	0.000*	0.000*
P 7	-	-	0.003*	0.000*	0.000*
K- 14	-	-	-	0.000*	0.000*
K+ 14	-	-	-	-	1.000
P 14	-	-	-	-	-

Keterangan :

- K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
 K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
 P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
 K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14

K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
 P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan pada 12 kelompok dengan nilai signifikansi $< 0,05$. Yaitu pada kelompok K-7 dengan kelompok K+7, kelompok K-7 dengan kelompok P7, kelompok K-7 dengan kelompok K+14, kelompok K-7 dengan kelompok P14, kelompok K+7 dengan kelompok K-14, kelompok K+7 dengan kelompok K+14, kelompok K+7 dengan kelompok P14, kelompok P7 dengan kelompok K-14, kelompok P7 dengan kelompok K+14, kelompok P7 dengan kelompok P14, kelompok K-14 dengan kelompok K+14, kelompok K-14 dengan kelompok P14.

Tabel 5. 11 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok *Osteocalcin*

	K+ 7	P 7	K- 14	K+ 14	P 14
K- 7	0.000*	0.000*	0.002*	0.000*	0.000*
K+ 7	-	0.023*	0.108	0.000*	0.000*
P 7	-	-	0.000*	0.075	0.004*
K- 14	-	-	-	0.000*	0.000*
K+ 14	-	-	-	-	0.207
P 14	-	-	-	-	-

Keterangan :

K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
 K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
 P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
 K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14
 K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
 P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan pada 12 kelompok dengan nilai signifikansi $< 0,05$. Yaitu pada kelompok K-7 dengan kelompok K+7, kelompok K-7 dengan kelompok P7, kelompok K-7 dengan kelompok K-14, kelompok K-7 dengan

kelompok K+14, kelompok K-7 dengan kelompok P14, kelompok K+7 dengan kelompok P7, kelompok K+7 dengan kelompok K+14, kelompok K+7 dengan kelompok P14, kelompok P7 dengan kelompok K-14, kelompok P7 dengan kelompok P14, kelompok K-14 dengan kelompok K+14, kelompok K-14 dengan kelompok P14.

Tabel 5. 12 : Hasil Uji post Hoc LSD kelompok *Woven Bone*

	K+ 7	P 7	K- 14	K+14	P 14
K- 7	0.062	0.001*	0.147	0.000*	0.000*
K+ 7	-	0.000*	0.002*	0.000*	0.000*
P 7	-	-	0.032*	0.142	0.000*
K- 14	-	-	-	0.001*	0.000*
K+ 14	-	-	-	-	0.000*
P 14	-	-	-	-	-

Keterangan :

- K-7 : Kelompok kontrol negatif hari ke-7
- K+7 : Kelompok kontrol positif hari ke-7
- P7 : Kelompok Perlakuan hari ke-7
- K-14 : Kelompok kontrol negatif hari ke-14
- K+14 : Kelompok kontrol positif hari ke-14
- P14 : Kelompok Perlakuan hari ke-14

Hasil uji LSD menunjukkan terdapat perbedaan pada 12 kelompok dengan nilai signifikansi $< 0,05$. Yaitu pada kelompok K-7 dengan kelompok P7, kelompok K-7 dengan kelompok K+14, kelompok K-7 dengan kelompok P14, kelompok K+7 dengan kelompok P7, kelompok K+7 dengan kelompok K-14, kelompok K+7 dengan kelompok K+14, kelompok K+7 dengan kelompok P14, kelompok P7 dengan kelompok K-14, kelompok P7 dengan kelompok P14, kelompok K-14 dengan kelompok K+14, kelompok K-14 dengan kelompok P14, kelompok K+14 dengan kelompok P14

5.2.6 Hubungan antar variabel yang diteliti

Analisis regresi dilakukan untuk mengetahui hubungan kausalistik antar variabel penelitian serta penyebab perubahan variabel penelitian. Penentuan variabel yang dilibatkan dalam analisis regresi menggunakan pertimbangan dari analisis multivariat variabel tergantung serta dasar teori yang melatar belakangi penelitian ini. Nilai positif menunjukkan arti bahwa apabila variabel bebas mengalami perubahan peningkatan maka variabel tergantung juga mengalami perubahan peningkatan sebesar nilai b , sedangkan nilai negatif yaitu apabila variabel bebas mengalami perubahan peningkatan, maka variabel tergantung akan menurun sebesar nilai b . variabel bebas dinyatakan dapat mempengaruhi variabel tergantung bila didapatkan nilai signifikan $p < 0,05$. Hasil hubungan antar variabel bebas dan variabel tergantung dengan uji regresi pada penelitian ini dapat pada tabel dan model hipotetik analisis jalur dibawah ini.

5.2.7 Analisis jalur mekanisme pembentukan *woven bone* setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke-7

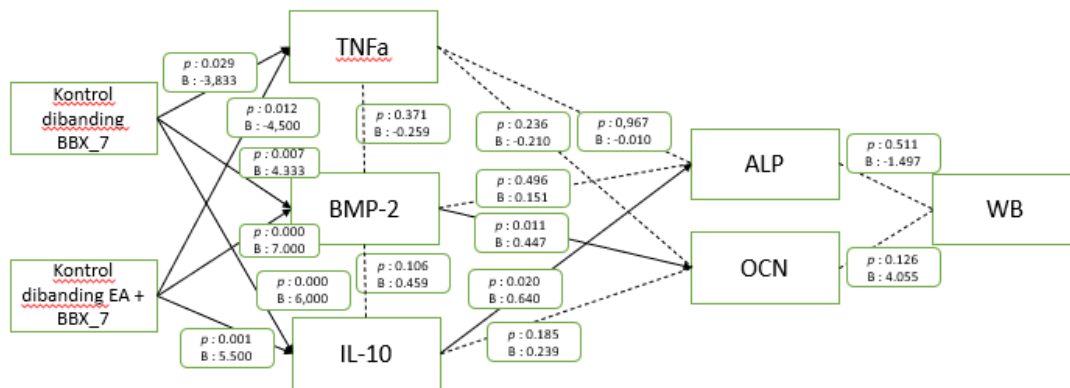
Tabel 5. 13 : Hubungan antar variabel, nilai *standardized coefficient* dan signifikansi antar variabel pada analisis jalur mekanisme pembentukan *woven bone* setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke-7

Variabel	unstandardized (B)	Signifikansi (p)	R Square
Kontrol dibanding BBX_7 → TNF-a	-3.833	0.029	0.385
Kontrol dibanding EA+BBX_7 → TNF-a	-4.500	0.012	
Kontrol dibanding BBX_7 → BMP-2	4.333	0.007	0.630

Kontrol dibanding EA+BBX_7 → BMP-2	7.000	0.000	
Kontrol dibanding BBX_7 → IL-10	6.000	0.000	0.652
Kontrol dibanding EA+BBX_7 → IL-10	5.500	0.001	
BMP-2 → TNF-a	-0.259	0.371	0.333
BMP-2 → IL-10	0.459	0.106	
TNF-a → ALP	-0.010	0.967	0.524
BMP-2 → ALP	0.151	0.496	
IL-10 → ALP	0.640	0.020	
TNF-a → OCN	-0.210	0.236	0.702
BMP-2 → OCN	0.447	0.011	
IL-10 → OCN	0.239	0.185	
ALP → WB	-1.497	0.511	0.158
OCN → WB	4.055	0.126	

Keterangan : Nilai signifikansi $p < 0.05$

Pola hubungan kausalistik variabel pada tabel 5.18 dapat digambarkan pada model kausal analisis jalur sebagai berikut :



Gambar 5. 13 : Analisis jalur pembentukan *woven bone* setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke-7

Berdasarkan gambar 5.13 pola hubungan antar variabel pembentukan woven bone setelah pemberian kombinasi ellagic acid dan bovine bone xenograft pada hari ke-7 dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Penggunaan BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam menurunkan nilai ekspresi TNF-a, meningkatkan nilai ekspresi BMP-2 dan IL-10.
2. Penggunaan EA+ BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam menurunkan nilai ekspresi TNF-a, meningkatkan nilai ekspresi BMP-2 dan IL-10.
3. Penggunaan BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai TNF-a dan tidak berpengaruh terhadap ALP, OCN dan WB jika melewati TNF-a.
4. Penggunaan BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap OCN jika melewati BMP-2 namun tidak berpengaruh terhadap ALP dan WB jika melewati BMP-2.

5. Penggunaan BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan tidak berpengaruh terhadap TNF-a dan IL-10 jika melewati BMP-2.
6. Penggunaan BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai IL-10 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap ALP jika melewati IL-10 namun tidak berpengaruh terhadap OCN dan WB jika melewati IL-10.
7. Penggunaan EA+BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai TNF-a dan tidak berpengaruh terhadap ALP, OCN dan WB jika melewati TNF-a.
8. Penggunaan EA+BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap OCN jika melewati BMP-2 namun tidak berpengaruh terhadap ALP dan WB jika melewati BMP-2.
9. Penggunaan EA+BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan tidak berpengaruh terhadap TNF-a dan IL-10 jika melewati BMP-2.
10. Penggunaan EA+BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai IL-10 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap ALP jika melewati IL-10 namun tidak berpengaruh terhadap OCN dan WB jika melewati IL-10.
11. TNF-a tidak berpengaruh terhadap ALP dan OCN
12. BMP-2 berpengaruh terhadap OCN namun tidak berpengaruh terhadap ALP
13. IL-10 berpengaruh terhadap ALP namun tidak berpengaruh terhadap OCN
14. ALP dan OCN tidak berpengaruh terhadap WB

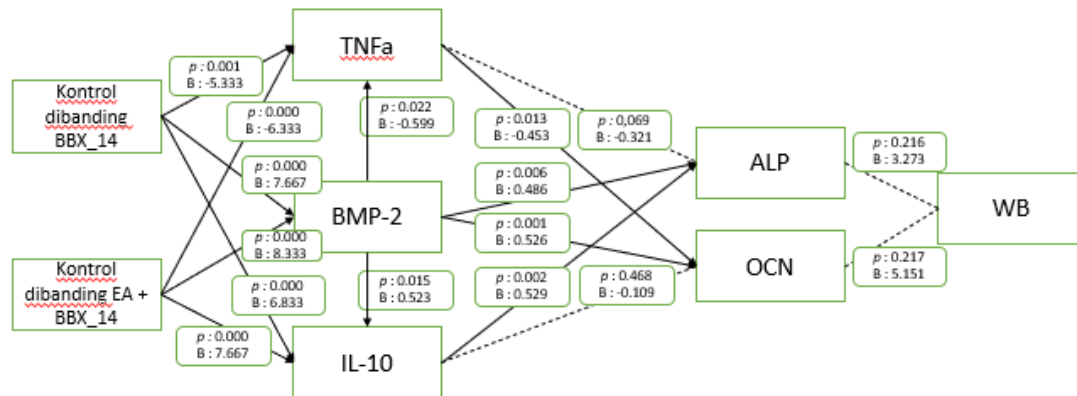
5.2.8 Analisis jalur mekanisme pembentukan woven bone setelah pemberian kombinasi ellagic acid dan bovine bone xenograft pada hari ke-14

Tabel 5. 14 : Hubungan antar variabel, nilai standardized coefficient dan signifikansi antar variabel pada analisis jalur mekanisme pembentukan woven bone setelah pemberian kombinasi ellagic acid dan bovine bone xenograft pada hari ke-14

Variabel	unstandardized (B)	Signifikansi (p)	R Square
Kontrol dibanding BBX_14 → TNF-a	-5.333	0.001	0.677
Kontrol dibanding EA+BBX_14 →TNF-a	-6.333	0.000	
Kontrol dibanding BBX_14 → BMP-2	7.667	0.000	0.702
Kontrol dibanding EA+BBX_14 →BMP-2	8.333	0.000	
Kontrol dibanding BBX_14 → IL-10	6.833	0.000	0.679
Kontrol dibanding EA+BBX_14 →IL-10	7.667	0.000	
BMP-2 → TNF-a	-0.599	0.022	0.646
BMP-2 → IL-10	0.523	0.015	
TNF-a → ALP	-0.321	0.069	0.911
BMP-2 → ALP	0.486	0.006	
IL-10 → ALP	0.529	0.002	
TNF-a → OCN	-0.453	0.013	0.791
BMP-2 → OCN	0.526	0.001	
IL-10 → OCN	-0.109	0.468	
ALP → WB	3.273	0.216	0.521
OCN → WB	5.151	0.217	

Keterangan : Nilai signifikansi $p < 0.05$

Pola hubungan kausalistik variabel pada tabel 5.21 dapat digambarkan pada model kausal analisis jalur sebagai berikut



Gambar 5. 14 : Analisis jalur pembentukan woven bone setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke-14

Berdasarkan gambar 5.14 pola hubungan antar variabel pembentukan woven bone setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke-14 dapat dijelaskan sebagai berikut:

1. Penggunaan BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam menurunkan nilai ekspresi TNF-a, meningkatkan nilai BMP-2 dan IL-10.
2. Penggunaan EA+ BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam menurunkan nilai ekspresi TNF-a, meningkatkan nilai ekspresi BMP-2 dan IL-10.
3. Penggunaan BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai TNF-a dan berpengaruh tidak

langsung terhadap OCN namun tidak berpengaruh terhadap WB jika melewati TNF-a.

4. Penggunaan BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai TNF-a dan tidak berpengaruh terhadap ALP dan WB jika melewati TNF-a
5. Penggunaan BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap ALP dan OCN namun tidak berpengaruh terhadap WB jika melewati BMP-2.
6. Penggunaan BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap TNF-a dan IL-10 jika melewati BMP-2.
7. Penggunaan BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai IL-10 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap ALP namun tidak berpengaruh terhadap OCN dan WB jika melewati IL-10.
8. Penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai TNF-a dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap OCN namun tidak berpengaruh terhadap ALP dan WB jika melewati TNF-a.
9. Penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap ALP dan OCN namun tidak berpengaruh terhadap WB jika melewati BMP-2.
10. Penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap TNF-a dan IL-10 jika melewati BMP-2.
11. Penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai IL-10 dan berpengaruh secara tidak

langsung terhadap ALP namun tidak berpengaruh terhadap WB jika melewati IL-10.

12. Penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai IL-10 dan tidak berpengaruh terhadap OCN dan WB jika melewati IL-10.
13. TNF-a tidak berpengaruh terhadap ALP dan berpengaruh terhadap OCN
14. BMP-2 berpengaruh terhadap ALP dan OCN
15. IL-10 berpengaruh terhadap ALP dan tidak berpengaruh terhadap OCN
16. ALP dan OCN tidak berpengaruh terhadap WB

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dan menjelaskan mekanisme penggunaan kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi melalui ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *alkaline phosphatase*, *osteocalcin* dan luas *woven bone*. Pemeriksaan variabel diperiksa pada daerah sepertiga apikal soket gigi insisif rahang bawah karena osteoblas yang baru terdeferensiasi membentuk matriks tulang dan tulang immature atau *woven bone* alveolar dimulai dari daerah apikal soket ke dinding lateral soket dan meluas ke pusat soket yang mengarah pada pertemuan tulang trabekula.

6.1 Pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi TNF- α

Ekspresi TNF- α pada soket alveolar hari ke-7 dan hari ke-14 setelah pemberian *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* menunjukkan terjadinya penurunan ekspresi TNF- α yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif namun pada kelompok kontrol positif (BBX) nilainya setara dengan kelompok perlakuan (EA+BBX). Sesuai dengan hipotesis bahwa ekspresi TNF- α menurun pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14. Menurunnya ekspresi protein pada kelompok perlakuan menunjukkan *ellagic acid* mampu menurunkan aktivitas sitokin proinflamasi. *Ellagic acid* menghambat produksi mediator inflamasi dengan

memblokir aktivasi NF- κ B in vitro (Chao *et al.* 2009). *Nuclear factor kappa-B* (NF- κ B) dan inflamasi merupakan umpan balik positif dalam inflamasi untuk menginduksi kerusakan seluler dan DNA dengan *promote cell proliferation* (Yamamoto and Gaynor 2001). *Nuclear factor kappa-B* berperan penting dalam mengatur ekspresi gen yang bertanggung jawab untuk peradangan, proliferasi dan apoptosis (Surh *et al.* 2001). *Ellagic acid* secara efisien mengurangi ekspresi TNF- α dan IL-6 pada tikus yang diinduksi 1,2-dimethylhydrazine dan menunjukkan aktivitas antiinflamasi (Chao *et al.* 2009). *Ellagic acid* menunjukkan sifat anti-inflamasi dengan inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2, TNF- α dan IL_6 down regulation karena *Nuclear factor kappa-B* teraktivasi dan memberikan efek kemopreventivenya pada karsinogenesis usus besar pada tikus (Umesalma and Sudhandiran 2010). *Ellagic acid* efektif melawan inflamasi, memiliki onset dan durasi kerja yang lama, dan dapat berinteraksi dengan inhibitor siklooksigenase (Corbett *et al.* 2010).

Ellagic acid menghambat produksi sitokin dengan mengurangi transkripsi NF- κ B, menghasilkan peningkatan apoptosis osteoklas (Ahad *et al.* 2014). *Tumor necrosis factor- α* (TNF- α) adalah salah satu dari beberapa sitokin proinflamasi yang terlibat dalam remodeling tulang (Amarasekara *et al.* 2021). *Tumor necrosis factor- α* bekerja melalui beberapa jalur termasuk *activation of nuclear factor kappa-B* (NF- κ B) yang terlibat dalam inflamasi dan apoptosis (Aggarwal 2003). Dengan adanya RANKL, berbagai sitokin pro-inflamasi, termasuk TNF- α , IL-6, dan IL-1, secara kooperatif mengatur peningkatan osteoklastogenesis. Aktivasi osteoklas dengan mekanisme

inflamasi menyebabkan kehilangan tulang sistemik dan lokal yang berlebihan (Osta *et al.* 2014).

Tumor necrosis factor-alpha adalah asitokin yang diproduksi oleh makrofag terutama di respon terhadap infeksi, antigen atau cedera. *Tumor necrosis factor-alpha* adalah sitokin yang dilepaskan dengan cepat setelah trauma atau infeksi (mis. paparan bakteri) dan merupakan salah satu mediator yang paling melimpah di jaringan inflamasi. Konsep *bone healing* pada *bone graft* adalah proses inflamasi yang diikuti oleh penyembuhan tulang berupa proliferasi dan diferensiasi batang mesenkim sumsum tulang sel yang pada gilirannya akan menghasilkan jaringan tulang baru. Sistem imun dan respon imun berperan penting dalam konsep *bone healing*.

Pada hasil penelitian ini nilai ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan (EA+BBX) setara dengan kelompok kontrol positif (BBX) pada hari ke-7 dan hari ke-14. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa tingkat sekresi TNF- α di *human peripheral blood mononuclear cells* (hPBMCs) setelah media dikondisikan *freeze-dried bovine bone xenograft* (FDBBX) pada hari 1 (24 jam), hari ke 3 (72 jam), dan hari ke 5 (120 jam) adalah berbeda secara signifikan. Jumlah TNF- α sekresi meningkat pada hari 1 (24 jam), dan menurun setelah hari ke 3 (72 jam) dan hari ke 5 (120jam) (Humidat *et al.* 2018). Hasil penelitian lain menunjukkan konsentrasi TNF- α pada hewan percobaan memuncak 24 jam setelah kerusakan tulang dan kembali ke level normal setelah 72 jam (Mountziaris and Mikos 2008).

Hal ini juga sesuai dengan teori yang mengatakan dalam proses penyembuhan tulang, ekspresi TNF- α dan reseptornya akan mengikuti biphasic pola. Selama periode ini, TNF- α diekspresikan oleh makrofag dan sel inflamasi lainnya. Peningkatan sinyal TNF- α akan menginduksi sinyal sekunder dan menghasilkan efek kemotaktik, mengaktifkan sel yang berperan penting dalam proses regenerasi tulang (Mountziaris and Mikos 2008).

Pada hasil penelitian ini, pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi pada hari ke-7 dan ke-14 ekspresi TNF- α menurun pada kelompok perlakuan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa *ellagic acid* mampu menurunkan aktivitas sitokin proinflamasi TNF- α dan IL-6 pada soket tikus diabetes. (Al-obaidi *et al.* 2014b). *Ellagic acid* memberikan perbaikan yang signifikan pada stres oksidatif gingiva dan *inflammatory markers* dan resorpsi tulang alveolar dalam proses perbaikan terkait dengan periodontitis eksperimental (Ongoz Dede *et al.* 2021). Penurunan yang signifikan dalam TNF- α dan IL-6 pada serum tikus diabetes yang tidak diobati, dibandingkan dengan tikus diabetes yang diobati dengan EA (Ahad *et al.* 2014). *Ellagic acid* secara signifikan melemahkan sitokin proinflamasi pada kelompok kontrol normal, dibandingkan dengan tikus diabetes (Kitaura *et al.* 2013).

6.2 Pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi IL-10

Ekspresi IL-10 pada soket alveolar hari ke-7 dan hari ke-14 setelah pemberian *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi

IL-10 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif namun pada kelompok kontrol positif (BBX) nilainya setara dengan kelompok perlakuan (EA+BBX). Sesuai dengan hipotesis bahwa ekspresi IL-10 meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14. Meningkatnya ekspresi protein pada kelompok perlakuan menunjukkan *ellagic acid* mampu meningkatkan aktivitas sitokin anti-inflamasi. *Interleukin-10* mampu mengaktifkan makrofag/ fungsi monosit dan penurunan produksi sitokin pro-inflamasi (Hacat *et al.* 2005). *Treatment EA* menyebabkan penurunan kadar IL-6 dan peningkatan kadar IL-10 melalui penurunan aktivasi NF- κ B dan AP-1 (Cornélio Favarin *et al.* 2013). *Protective effect ellagic acid* pada *acute lung injury* (ALI) yang diinduksi oleh *lipopolysaccharides* (LPS) melalui penekanan aktivasi jalur NF- κ B meningkatkan produksi IL-10 secara *in vitro* dan *in vivo* (Guan *et al.* 2017).

Interleukin-10 sebagai pengatur penting homeostasis tulang, dalam kondisi homeostatis dan inflamasi (Scheerens and Tatakis 2003). *Interleukin-10* dapat secara langsung menghambat pembentukan osteoklas (Evans and Fox 2007). Mekanisme molekuler penghambatan ini menunjukkan bahwa IL-10 meningkatkan ekspresi OPG dan menurunkan ekspresi aktivator reseptor ligan NF- κ B (RANKL) dan *colony-stimulating factor-1* (CSF-1) (Liu *et al.* 2006). *Interleukin-10* menghambat resorpsi tulang sebagai terapi potensial pada periodontitis dan *bone loss disease* lainnya (Zhang *et al.* 2014).

Interleukin-10 berkontribusi pada pemeliharaan massa tulang melalui penghambatan resorpsi tulang osteoklastik dan regulasi pembentukan tulang osteoblastik. Makrofag dicirikan oleh kemampuannya untuk berpolarisasi menuju makrofag M1 pro-inflamasi atau sebagai alternatif menuju penyembuhan luka M2 makrofag. Pada *deproteinized bovine bone matrix* (DBBM) mempromosikan fusi dan polarisasi makrofag menuju fenotipe penyembuhan luka M2, selanjutnya menciptakan lingkungan mikro mendukung osteogenesis yang diinduksi biomaterial (Shi *et al.* 2018).

Pada hasil penelitian ini nilai ekspresi IL-10 pada kelompok perlakuan (EA+BBX) setara dengan kelompok kontrol positif (BBX) pada hari ke-7 dan hari ke-14. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, ditemukan bahwa kadar mRNA IL-4 dan IL-10 adalah secara signifikan lebih tinggi pada kelompok *deproteinized bovine bone matrix* (DBBM) bahkan jika dibandingkan dengan kontrol positif kelompok IL-4. Data ini menyarankan bahwa IL-10 berperan penting dalam DBBM osteogenesis yang diinduksi yang disekresikan oleh makrofag (Shi *et al.* 2018). Pada hasil penelitian ini, pembentukan woven bone pasca ekstraksi gigi pada hari ke-7 dan hari ke-14 ekspresi IL-10 meningkat pada kelompok perlakuan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa *Ellagic acid* menunjukkan efek anti-inflamasi yang kuat terhadap peradangan yang diinduksi karagenan pada tikus dengan peningkatan IL-10, dan penurunan TNF- α dan IL-1 β (El-Shitany *et al.* 2014).

Treatment EA memodulasi tingkat sitokin pro dan anti-inflamasi pada dosis (7 mg/kg) dapat mengurangi sitokin pro-inflamasi (TNF- α , IL-1b, dan IL-6) dan secara bersamaan meningkatkan IL-10 pada tikus rematik sehingga memberikan efek penyembuhannya (Chatterjee *et al.* 2012). Tikus yang diobati dengan EA (15 mg/kg) dapat mengurangi IL-6 dan TNF- α dan peningkatan kadar IL-10 pada jaringan gingiva (Ongoz Dede *et al.* 2021). Kehilangan tulang alveolar dengan tidak adanya IL-10 dikaitkan dengan penurunan ekspresi penanda osteoblas dan osteosit (Claudino *et al.* 2010).

6.3 Pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi BMP-2

Ekspresi BMP-2 pada soket alveolar hari ke-7 dan hari ke-14 setelah pemberian *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi BMP-2 yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif namun pada kelompok kontrol positif (BBX) nilainya setara dengan kelompok perlakuan (EA+BBX). Sesuai dengan hipotesis bahwa ekspresi BMP-2 meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14. Meningkatnya ekspresi BMP-2 menunjukkan *ellagic acid* mampu melakukan perbaikan pada tulang alveolar yang disebabkan oleh luka ekstraksi gigi, mempengaruhi pelepasan *growth factor* yang berperan pada perbaikan tulang yaitu BMP-2. Sekresi lokal BMP-2 di lokasi remodeling, yang berpotensi memicu komitmen M2, dapat mendorong respon anti-

inflamasi oleh makrofag terpolarisasi (Wei *et al.* 2018). *Ellagic acid* adalah salah satu molekul biologis yang ditemukan dalam *pomegranate* dan merupakan senyawa polifenol dan (Usta *et al.* 2013). Polifenol dapat mempengaruhi metabolisme tulang melalui penurunan regulasi mediator inflamasi (Bodet *et al.* 2007). Berbagai mekanisme pensinyalan molekuler di balik anabolisme tulang yang diinduksi polifenol salah satunya melalui jalur BMP (Torre 2017). Menginduksi BMP-2/SMAD mengontrol diferensiasi dan proliferasi osteoblas, melalui pengaturan ekspresi Runx2 (Sheu *et al.* 2012). Peningkatan ekspresi Runx2, faktor transkripsi osteogenik berperan utama dalam pematangan osteoblas yang merupakan stimulasi osteoblastogenesis dari *ellagic acid* (Spilmont *et al.* 2013).

Pada hasil penelitian ini nilai ekspresi BMP-2 pada kelompok perlakuan (EA+BBX) setara dengan kelompok kontrol positif (BBX) pada hari ke-7 dan hari ke-14. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, bahwa penggunaan *Demineralized freeze dried bovine bone xenograft* (DFDBBX) tidak memiliki perbedaan yang mencolok pada ekspresi BMP-2, yang dimulai dari minggu ke 2 hingga minggu ke 8. Hasil tersebut menunjukkan bahwa aktifitas osteogenik dimulai sejak minggu 2 hingga batas akhir kesembuhan (Purnomo *et al.* 2012). Hasil penelitian lain menunjukkan evaluasi histopatologis menggunakan teknologi immunohistokimia membuktikan bahwa proses perbaikan dalam kaitannya dengan proliferasi sel dan jaringan terbaca dimulai dari minggu 2 dengan ditemukannya antigen *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2). Berturut-turut BMP-2 ditemukan baik pada kelompok tikus tanpa bahan

cangkok (Kelompok I) maupun kelompok tikus yang diberi *bone graft* (Kelompok II) dimulai minggu 2, 4, 6 dan 8. Kondisi tersebut menggambarkan bahwa BMP -2 terekspresi pada akhir fase radang dan terus bekerja sampai semua jaringan tulang sudah tersambung dengan baik (Purnomo *et al.* 2012).

Pada hasil penelitian ini, pembentukan woven bone pasca ekstraksi gigi pada hari ke-7 dan hari ke-14 ekspresi BMP-2 meningkat pada kelompok perlakuan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa ellagic acid meningkatkan ekspresi *bone morphogenetic proteins-2* (BMP2), *runt-related transcription factor 2* (Runx2) dan *alkaline phosphatase* (ALP). Selain itu, *ellagic acid* menginduksi tingkat ekspresi protein BMP2, distal-less homeobox 5 (Dlx5), and Runx2 menurut uji western blots. *Ellagic acid* dapat meningkatkan aktivitas ALP, mineralisasi dan memulihkan diferensiasi osteoblas yang diinduksi lipopolisakarida (Son *et al.* 2019). *Ellagic acid* mempercepat pembentukan tulang setelah ekstraksi gigi pada tikus normal (Al-Obaidi *et al.* 2014). BMP-2 merupakan *growth factor* yang banyak berperan pada pembentukan tulang baru dan terlibat dalam tahapan *signaling molecules* percepatan pembentukan tulang (Zou *et al.* 2011).

Berbagai bahan *bone graft* digunakan untuk tujuan meningkatkan kemampuan tulang dan penyembuhan tulang. Keberhasilannya sangat relatif tergantung oleh banyak faktor termasuk teknik aplikasi bedah dan sifat bahan itu sendiri. Selain sifat fisik bahan, *bone graft* dapat bersifat osteokonduktif atau osteoinduktif (Wozney 2002). *Bovine bone xenograft* lebih bersifat osteokondusif dibanding sifat osteoinduktif.

Biomaterial tersebut bermanfaat untuk penanganan kasus ortopedi terutama pada fraktur dengan sebagian jaringan tulang hilang. Karena sifat osteokondusif akan mempermudah sel tumbuh dan menyatukan fragmen tulang yang terpisah (Purnomo, Agus., Adji 2012). Oleh karena itu, BMP-2 saja, atau dikemas dalam scaffold, dapat bertindak sebagai imunomodulator penting melalui jalur yang bergantung pada makrofag untuk mendukung penyembuhan tulang. BMP-2 dapat berfungsi sebagai pengatur utama untuk meningkatkan respons imun bawaan awal dalam penyembuhan tulang dan dapat memediasi perekrutan lebih lanjut dan diferensiasi osteogenik MSC (Wei et al., 2018).

6.4 Pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi *Alkaline Phosphatase*

Ekspresi *Alkaline Phosphatase* pada soket alveolar hari ke-7 dan hari ke-14 setelah pemberian *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi *Alkaline Phosphatase* yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negati namun pada kelompok kontrol positif (BBX) nilainya setara dengan kelompok perlakuan (EA+BBX). Sesuai dengan hipotesis bahwa ekspresi *Alkaline Phosphatase* meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke-7 dan hari ke-14. Meningkatnya ekspresi *Alkaline Phosphatase* menunjukkan bahwa EA dapat meningkatkan *Alkaline Phosphatase* terlihat pada kedua tikus diabetes. Imunolabel ALP

menurun pada soket tikus diabetes yang tidak diobati terhadap soket tikus diabetes yang diobati dengan EA (Al-obaidi *et al.* 2014b). Hasil penelitian lain menunjukkan analisis histomorfometrik bahwa *ellagic acid* adalah senyawa fenolik utama yang dapat meningkatkan kadar mRNA ALP sebesar 75%, pada tikus dengan tulang yang rusak (Deyhim *et al.* 2006).

Pada hasil penelitian ini nilai ekspresi ALP pada kelompok perlakuan (EA+BBX) setara dengan kelompok kontrol positif (BBX) pada hari ke-7 dan hari ke-14. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, ekspresi ALP dari *demineralized freeze-dried bovine bone xenograft* (DFDBBX) lebih tinggi dari *Deproteinized Bovine Bone Material* (DBBM) pada hari 2 dan 7, namun menurun pada hari ke 14. Kolagen tipe I dan ALP adalah indikator awal aktivitas seluler dan diferensiasi osteoblas, dan ALP dapat menjadi prediktor mineralisasi jaringan baru (Xu *et al.* 2015). Faktor pertumbuhan yang terkandung dalam DFDBBX dianggap berperan dalam peningkatan sel proliferasi. Viabilitas sedikit menurun setelah 72 jam, mungkin karena nutrisi sel yang tidak mencukupi sebagai akibat dari peningkatan sel proliferasi dan diferensiasi sel, tetapi tidak ada perbedaan yang signifikan dari kontrol dan DBBM, menunjukkan bahwa DFDBBX pada 2,5% adalah biokompatibel untuk penggunaan *in vitro* (Barus *et al.* 2021). Peningkatan level mRNA ALP dimulai secara bertahap 2 hari setelah induksi osteogenik dengan peningkatan yang stabil disertai dengan peningkatan osteoblas diferensiasi hingga 14 hari (Xu *et al.* 2015). Penelitian lain menyatakan bahwa proses diferensiasi osteogenik dalam MSC *in vitro* menyebabkan peningkatan

kadar ALP sampai hari 14 dan akan berkurang setelah hari ke-14 ke atas, yang diikuti oleh peningkatan *osteocalcin* dan ekspresi osteopontin dan menghasilkan deposisi kalsium dan fosfat (Birmingham *et al.* 2012). Ada kemungkinan nilai *alkaline phosphatase* meningkat jika dilihat dari aktivitas enzim *alkaline phosphatase* (Sharma *et al.* 2014). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa ekspresi mRNA untuk sintesis protein ALP terjadi di seluruh proses luka penyembuhan, dan tidak hanya pada tahap awal. Ada peningkatan yang signifikan dalam ekspresi gen pada 14 hari dibandingkan dengan tujuh hari. Meskipun ekspresi gen pada hari ke 28 sedikit lebih tinggi dari pada hari ke 14, tidak ada perbedaan yang signifikan antara kedua periode tersebut (Rodrigues *et al.* 2016). Pengamatan dalam penelitian ini dibatasi pada hari ke 14 sehingga ekspresi puncak ALP tidak diamati.

Pada hasil penelitian ini, pembentukan woven bone pasca ekstraksi gigi pada hari ke-7 dan hari ke-14 ekspresi ALP meningkat pada kelompok perlakuan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa *ellagic acid* pada *osteocalcin* dan *alkaline phosphatase* pada hari ke-14 dan hari ke-28 telah menunjukkan ekspresi yang lebih kuat pada tikus yang diinduksi *nicotine* yang diobati dengan *ellagic acid*, dibandingkan dengan tikus yang hanya diinduksi *nicotine* (Allam *et al.* 2016a). Tikus diabetes yang diobati dengan EA ekspresi ALP lebih tinggi daripada tikus diabetes yang tidak diobati (Al-obaidi *et al.* 2014b).

6.5 Pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi terhadap ekspresi *Osteocalcin*

Ekspresi *osteocalcin* pada soket alveolar hari ke-7 dan hari ke-14 setelah pemberian *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi *osteocalcin* yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif namun pada kelompok kontrol positif (BBX) nilainya setara dengan kelompok perlakuan (EA+BBX). Sesuai dengan hipotesis bahwa ekspresi *osteocalcin* meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan hari ke-14. Meningkatnya ekspresi *osteocalcin* menunjukkan *ellagic acid* mampu meningkatkan *osteocalcin* dan *osteopontin* tertinggi pada hari ke 14 (Al-Obaidi *et al.* 2014). Secara alamiah pada proses penyembuhan tulang, *osteocalcin* akan dikeluarkan secara intensif pada fase proliferasi atau fase akhir dari fase pembentukan tulang, yaitu pada hari ke 14 hingga tahunan (Paldánus 2017).

Pada hasil penelitian ini nilai ekspresi *osteocalcin* pada kelompok perlakuan (EA+BBX) setara dengan kelompok kontrol positif (BBX) pada hari ke-7 dan hari ke-14. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, perbedaan tidak signifikan ekspresi *osteocalcin* antara kelompok kontrol dan kelompok dengan DFDBBX menunjukkan bahwa DFDBBX sebagai *socket preservation graft* tidak berpengaruh pada ekspresi *osteocalcin*, DFDBBX hanya berfungsi sebagai *scaffold* (Kresnoadi *et al.* 2018). Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa jumlah *osteocalcin* pada kelompok yang hanya

diberikan DFDBBX pada kedua hari 7 dan 30 lebih besar dari pada kelompok kontrol. DFDBBX dikenal sebagai zat yang merangsang osteogenesis. Dengan demikian, DFDBBX dapat meningkatkan osteoblas. Osteoblas menghasilkan protein nonkolagen, salah satunya adalah *osteocalcin*. Akibatnya, jumlah *osteocalcin* yang terbentuk akan lebih besar dari pada kelompok kontrol (Kresnadi *et al.* 2019). Penelitian lain menyatakan bahwa *bone graft* yang diberikan ke soket ekstraksi dapat memicu osteoinduksi dan merangsang pertumbuhan tulang (Diwan *et al.* 2005).

Pada hasil penelitian ini, pembentukan woven bone pasca ekstraksi gigi pada hari ke-7 dan hari ke-14 ekspresi *osteocalcin* meningkat pada kelompok perlakuan. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa *ellagic acid* menunjukkan peningkatan level ekspresi *osteocalcin* dan osteopontin pada tikus normal setelah ekstraksi gigi (Al-Obaidi *et al.* 2014) Mekanisme dimana EA menghambat resorpsi tulang dengan mengontrol produksi dan stimulasi sitokin dan protein, yang mempromosikan diferensiasi osteoklas (Al-Obaidi *et al.* 2014). Mekanisme aksi lainnya untuk EA adalah penghambatan aktivasi *transcription factor NF-kappa B* (NF-kB), sebagai lawan dari bertahan dan aktivasi osteoklas (Cornélio Favarin *et al.* 2013).

Proses mineralisasi dalam tulang menjadi ciri langkah terakhir dari perbaikan tulang alveolar, dan itu terjadi sebagai akibat dari deposisi kalsium pada matriks organik jaringan tulang, yang terutama terdiri dari kolagen. Partisipasi protein matriks tulang non-kolagen, seperti *osteocalcin* disintesis oleh osteoblas selama proses deposisi kalsium (Luvizuto *et al.* 2010). *Ellagic acid* memiliki kandungan utama polifenol (Saldanha *et al.* 2014). Menurut penelitian terdahulu, polifenol memiliki efek

antioksidan yang dapat mengurangi stres oksidatif pada osteoblas. Aktivitas antioksidan ini penting dalam merangsang aktivitas osteoblastik melalui reseptor spesifik, sehingga meningkatkan *osteocalcin* yang dihasilkan oleh osteoblas (Herniyati 2017).

Peningkatan dalam pembentukan tulang alveolar pada *cavia cobaya* yang diberi kombinasi dengan *ellagic acid* menunjukkan bahwa mineralisasi telah terjadi. Selama periode evaluasi, terdapat ekspresi *osteocalcin* yang tinggi pada kelompok perlakuan, terutama pada hari ke-14. Kelompok kontrol menunjukkan ekspresi *osteocalcin* yang lebih rendah, karena apoptosis osteoblastik yang diinduksi oleh ekstraksi. Kelompok kontrol telah mengalami penundaan tersendiri dalam proses penyembuhan alveolar dengan ekspresi *osteocalcin* yang lebih sedikit, jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Kandungan flavonoid yang ada dalam *ellagic acid* mampu meningkatkan pembentukan tulang secara simultan (Horcajada-Molteni *et al.* 2000).

6.6 Pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi terhadap luas *woven bone*

Luas *woven bone* pada soket alveolar pada hari ke-7 dan hari ke-14 setelah pemberian *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* menunjukkan terjadinya peningkatan luas *woven bone* pada kelompok perlakuan (EA+BBX) dibandingkan kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif (BBX). Sesuai dengan hipotesis bahwa *woven bone* meningkat pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada hari ke-7 dan hari ke-14. Meningkatnya *woven*

bone pada kelompok perlakuan menunjukkan *ellagic acid* telah menginduksi deposisi tulang trabekula lebih awal pada kelompok yang dirawat, menghasilkan matriks tulang yang lebih terorganisir pada hari ke 14, 21, dan 28 setelah ekstraksi gigi dibandingkan dengan kelompok kontrol (Al-obaidi *et al.* 2014b). Penelitian lain menyatakan *ellagic acid* mempercepat pembentukan tulang setelah ekstraksi gigi pada tikus normal (Al-Obaidi *et al.* 2014).

Pada proses penyembuhan tulang alveolar pasca ekstraksi gigi terjadi beberapa proses yaitu pembekuan darah (*blood clot*), inflamasi, granulasi, proliferasi, angiogenesis dan pembentukan tulang alveolar. Pada hari ke-7 pada daerah sepertiga apikal soket gigi, osteoblas yang baru terdeferensiasi membentuk matriks tulang dan tulang *immature/ woven bone* alveolar dimulai dari daerah apikal soket ke dinding lateral soket dan meluas ke pusat soket yang mengarah pada pertemuan tulang trabekula. Seiring dengan penyembuhan tulang alveolar pasca ekstraksi gigi secara lengkap, luas *woven bone* alveolar akan semakin besar (Vieira *et al.* 2015). Hal ini terlihat pada hasil penelitian pada hari ke-7 pembentukan *woven bone* alveolar sudah terjadi baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Luas *woven bone* alveolar dari hari ke-7 menuju hari ke-14 akan semakin besar pada semua kelompok.

Woven bone pada soket alveolar hari ke-7 dan hari ke-14 setelah pemberian *ellagic acid* dengan *bovine bone xenograft* menunjukkan terjadinya peningkatan *woven bone* yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif. Pada hari ke-7 luas *woven bone* alveolar pada kelompok perlakuan kombinasi

ellagic acid dan *bovine bone xenograft* terlihat lebih kecil dibandingkan pada hari ke-14. Pada proses penyembuhan tulang pasca ekstraksi gigi tulang *immature/ woven bone* alveolar baru mulai terbentuk pada hari ke-7. Pada hari ke-7 sel osteoblas dalam mensekresi *growth factor* penting untuk proses mineralisasi seperti osteopontin, osteokalsin dan kolagen tipe 1 belum maksimal jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan hari ke-14, sehingga luas *woven bone* pada hari ke-7 lebih kecil dibanding hari ke-14 (Chantarawatit *et al.* 2014, Boonyagul *et al.* 2014). Pada hari ke-14 *woven bone* alveolar dari daerah apikal soket akan semakin luas seiring dengan proses mineralisasi yang lengkap (Vieira *et al.* 2015).

Proses *bone healing* pada *xenograft demineralized bone matrix bovine* lebih efektif dari pada *xenograft hydroxyapatite bovine*, *allograft freeze-dried*, *xenograft freeze-dried cortical bovine*, dan kontrol dengan kalsifikasi *woven bone* sudah terlihat pada minggu ke-2 pada kelompok terakhir (Ferdiansyah *et al.* 2018). Pada penelitian lain menyatakan ada perbedaan *bone healing* antara *xenograft demineralized bone matrix bovine* dengan kelompok lain pada minggu keempat dimana kelompok *xenograft demineralized bone matrix bovine bone healing* sudah menyerupai *native bone*, seperti tulang di tepi, dengan lebih kecil dan kurang berpori, dan berserat jaringan yang tidak setebal kelompok lainnya. Pada kelompok lain, kelompok *freeze-dried Bovine cortical*, kelompok *freeze-dried allograft cortical New Zealand White Rabbit*, kelompok *hydroxyapatite bovine* dapat terlihat jelas melihat batas antara proses penyembuhan dengan *native bone* (Utomo *et al.* 2017).

6.7 Analisis jalur hubungan kausalistik, mekanisme pembentukan *woven bone* pada pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft*

6.7.1 Analisis jalur berdasarkan *literature*

1). Jalur mekanisme pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi pada hari ke-7

Pada hari ke-7, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat menurunkan TNF- α . Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-7, penggunaan EA+ BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam menurunkan nilai ekspresi TNF-a. Hal ini dimungkinkan karena sebelum hari ke-7, fase inflamasi masih berlangsung dan dibutuhkan jeda waktu menuju ke fase proliferasi. Resorpsi tulang menurun dan pembentukan *woven bone alveolar* meningkat terlihat dari luas *woven bone alveolar* pada hari ke-14 semakin meningkat jika dibandingkan dengan hari ke-7. *Ellagic acid* menunjukkan sifat anti-inflamasi oleh iNOS, COX-2, TNF- α dan IL-6 down-regulation karena penghambatan NF-kB dan memberikan efek kemopreventif pada karsinogenesis usus besar (Umesalma and Sudhandiran 2010). *Ellagic acid* mampu mengurangi aktivitas sitokin proinflamasi seperti TNF-a dan IL-6 pada soket diabetes. Sitokin proinflamasi mampu menghambat pembentukan tulang/osteogenesis in vivo (Al-obaidi *et al.* 2014b). *Ellagic acid* sebagai antioksidan dapat menghambat *reactive oxygen species* (ROS) atau radikal bebas karena adanya kondisi stress pada sel osteoblas akibat terjadinya trauma. Hambatan pada ROS mengakibatkan translokasi

NF- κ B ke nukleus juga terhambat sehingga sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , IL-1 β , IL-8, dan IL-6 mengalami penurunan (Wardhana *et al.* 2021).

Tumor Necrosis Factor- α berperan dalam proses inflamasi pada healing fase setelah grafting . Selain itu, dapat juga disebabkan oleh adanya kandungan (FDBBX) yang dianggap sebagai benda asing oleh host. Jumlah TNF- α sekresi meningkat pada hari ke 1 (24 jam), dan menurun setelah hari ke 3 (72 jam) dan hari ke 5 (120 jam) (Humidat *et al.* 2018).

Pada hari ke-7 pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat meningkatkan ekspresi IL-10. Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-7, penggunaan EA+ BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam meningkatkan nilai ekspresi IL-10. *Ellagic acid* melindungi terhadap peradangan akut yang diinduksi karagenan melalui penghambatan faktor nuklir kappa B, siklooksigenase yang dapat diinduksi dan sitokin proinflamasi dan peningkatan interleukin-10 melalui mekanisme antioksidan (El-Shitany *et al.* 2014). *Ellagic acid* mengurangi sekresi TNF- α , IL-6 dan IL-1 β , meningkatkan produksi IL-10 oleh makrofag RAW 264.7 yang dirangsang LPS *in vitro* (Guan *et al.* 2017).

Interleukin-10 tidak mempengaruhi sintesis ALP dan kolagen selama 9 hari pertama kultur (Vlasselaer *et al.* 1993). Efek penghambatan pada tahap awal diferensiasi osteogenik pada akhirnya dinetralisir oleh penurunan regulasi sitokin inflamasi infeksi seperti TNF- α , IL-10 yang akhirnya meningkatkan diferensiasi

osteoblastik (Zhang *et al.* 2014). Peningkatan osteoblas dapat meningkatkan ekspresi OPG melalui jalur ERK $\frac{1}{2}$ dan AP-1 (Chantarawaratit *et al.* 2014). Penelitian pada hewan telah mengkonfirmasi bahwa kurangnya IL-10 menyebabkan keropos tulang femur dan kehilangan tulang alveolar (Scheerens and Tatakis 2003).

Pada hari ke-7, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat meningkatkan BMP-2. Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-7, penggunaan EA+ BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam meningkatkan nilai ekspresi BMP-2. Efek dari *ellagic acid* pada ekspresi mRNA dari osteogenik genes pada C3H10T1/2 cells ditentukan oleh real-time PCR. *Ellagic acid* meningkatkan ekspresi dari *bone morphogenetic proteins 2* (BMP2), *runt-related transcription factor 2* (Runx2), dan *alkaline phosphatase* (ALP) (Son *et al.* 2019). Penanda seluler yang dapat diamati pada proses osteogenesis yaitu ekspresi pada BMP-2. *Vascular endothelial growth factor* merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang dapat membantu meningkatkan ekspresi bone morphogenic protein-2 (BMP-2) dan diferensiasi osteoblas sehingga proses penyembuhan tulang dapat berlangsung baik pada defek tulang tersebut (Wardhana *et al.* 2021). Selain itu, ellagic acid menginduksi tingkat ekspresi BMP2, *distal-less homeobox 5* (Dlx5), dan Runx2 menurut uji western blots (Son *et al.* 2019).

Evaluasi persendian dilakukan secara rutin pada 1 minggu, 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu pasca operasi masing-masing dengan memilih secara acak

masing-masing kelompok sebanyak 2 ekor tikus. Tikus pada setiap pengamatan dikumpulkan dua ekor kelompok I, tikus kemudian dibunuh, bagian tulang yang akan disambung diambil dan disimpan dalam formalin 10% untuk pemeriksaan histopatologi. Beberapa potongan tulang digunakan untuk analisis *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) dengan metode imunohistokimia. Hasil keseluruhan dari penelitian ini menunjukkan bahwa bahan cangkok DFDBBX lebih bersifat osteokondusif daripada sifat osteoinduktif. Karena sifatnya yang osteokondusif DFDBBX akan membuat sel-sel tumbuh dan menyatukan fragmen-fragmen tulang yang terpisah (Purnomo, Agus., Adji 2012).

Kekurangan BMP-2 dapat menghambat transformasi sel osteoprogenitor menjadi osteoblas. Osteoblas berasal dari diferensiasi sel mesenkim multipotensial (Yin and Li 2006). Transduksi sel punca mesenkim dengan vektor recombinant adenoviral yang membawa gen untuk BMP-2 sehingga sel-sel ini akan menghasilkan BMP-2, berdiferensiasi menjadi garis osteoprogenitor, dan menginduksi pembentukan tulang baik in vitro maupun in vivo. Selain itu, inkubasi sel yang ditransduksi Adv-BMP2 selama 7 hari tambahan dalam kultur sebelum transplantasi meningkatkan tingkat keberhasilan dalam pembentukan tulang (Cheng *et al.* 2001).

Ellagic acid adalah polifenol yang dilaporkan memiliki sifat antikanker, antioksidan dan anti-inflamasi (Vattem and Shetty 2005). Flavonoid adalah senyawa-senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon

(Damanik 2020). Flavonoid utama dari *Rhus verniciflua* Stokes yaitu sulfuretin, memiliki berbagai aksi biologis, efek in vitro dan in vivonya pada potensi osteogenik. Sulfuretin menunjukkan diferensiasi osteogenik dari osteoblas primer, dengan peningkatan aktivitas dan mineralisasi ALP, dan penanda diferensiasi yang diregulasi, termasuk ALP, *osteocalcin*, dan osteopontin, dengan cara yang bergantung pada konsentrasi. Sulfuretin meningkatkan fosforilasi Akt, mTOR, ERK, dan JNK. Studi in vivo dengan defek tulang calvarial mengungkapkan bahwa sulfuretin secara signifikan meningkatkan pembentukan tulang baru dengan tomografi komputer mikro dan analisis histologis. Sulfuretin bertindak melalui aktivasi sinyal BMP, mTOR, Wnt/ β -catenin, dan Runx2 menunjukkan diferensiasi osteoblas in vitro dan memfasilitasi regenerasi tulang in vivo, dan memiliki manfaat terapeutik pada penyakit tulang dan regenerasi (Auh *et al.* 2016).

Pada hari ke-7, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat meningkatkan *alkaline phosphatase*. Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-7, penggunaan EA+BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai IL-10 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap ALP jika melewati IL-10 namun tidak berpengaruh terhadap OCN dan WB. Pewarnaan ALP dan deposit kalsium masing-masing dianggap sebagai penanda awal dan akhir, dari diferensiasi osteoblastik (Chen *et al.* 2017). Penelitian Chen menjelaskan bahwa IL-10 meningkatkan aktivitas ALP dan mempercepat mineralisasi pada konsentrasi yang

lebih rendah dan sebaliknya. Puncak teosteogenik muncul pada konsentrasi rendah 0,1-1,0 ng/ml, menunjukkan kisaran regeneratif IL-10. Konsentrasi IL-10 yang lebih tinggi mengganggu osteogenesis, berpotensi karena efek patologis pada hBMSC. Hasil tersebut menunjukkan bahwa IL-10 memiliki peran ganda dalam memodulasi osteogenesis hBMSCsin vitro. IL-10 memiliki peran ganda dalam diferensiasi osteogenik human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSC) melalui jalur pensinyalan NF-kB dan p38/MAPK. Dosis rendah IL-10 meningkatkan diferensiasi osteogenik terutama dengan mengaktifkan jalur p38/MAPK, sedangkan dosis IL-10 yang lebih tinggi memberikan efek penghambatan terutama melalui jalur NF-kB (Chen *et al.*, 2018).

Ellagic acid adalah polifenol yang dilaporkan memiliki sifat antikanker, antioksidan dan anti-inflamasi (Vattem and Shetty 2005). Polifenol yang berbeda mengerahkan fungsi efek osteoprotektifnya melalui penekanan NF-kB yang diinduksi RANKL, sehingga mempengaruhi diferensiasi osteoklas dan remodeling tulang (González-Gallego *et al.* 2010). Kemampuan senyawa fenolik untuk menjadi efektif dalam menghambat sitokin inflamasi yang terlibat dalam fase akut inflamasi, tetapi juga dalam meningkatkan sitokin antiinflamasi, seperti IL-10 yang menargetkan sel makrofag dan osteoblas (Comalada *et al.* 2006). Meningkatkan jalur pensinyalan PI3K/AKT ditemukan untuk meningkatkan produksi IL-10 (Zhu *et al.* 2015).

Pada hari ke-7, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat meningkatkan *osteocalcin*.

Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-7, penggunaan EA+BBX_7 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap OCN jika melewati BMP-2 namun tidak berpengaruh terhadap ALP dan WB jika melewati BMP-2. *Ellagic acid* meningkatkan aktivitas ALP dan mineralisasi. Selain itu, *ellagic acid* memulihkan diferensiasi osteoblas yang diinduksi lipopolisakarida dan menunjukkan bahwa *ellagic acid* dapat meningkatkan diferensiasi osteoblas. *Ellagic acid* meningkatkan ekspresi dari *bone morphogenetic proteins 2* (BMP2), *runt-related transcription factor 2* (Runx2), dan *alkaline phosphatase* (ALP) (Son *et al.* 2019). Efek antioksidan dari EA mengurangi stres oksidatif pada osteoblas dan merangsang aktivitasnya, sehingga meningkatkan produksi OCN (Wardhana *et al.* 2021). Banyak penelitian pada hewan yang mendukung efek positif dari antioksidan pada *bone density*. Beberapa menghambat *bone turnover* dan *bone resorption* sementara yang lain menstimulasi *bone formation*. (Kimball *et al.* 2021). Upregulasi RANKL dan downregulasi OPG terjadi melalui jalur Wnt/b-catenin dan dimediasi oleh aktivasi protein kinase (ERK1/2 dan JNK) (Fontani *et al.* 2015). Antioksidan untuk melawan dengan mengurangi ekspresi RANKL dan meningkatkan ekspresi OPG. Antioksidan terbukti meningkatkan *bone density* dengan mengurangi aktivasi RANKL dari aktivitas osteoklas (Domazetovic *et al.* 2017).

Penelitian ini konsisten dengan laporan sebelumnya bahwa EA meningkatkan ekspresi OCN dan osteopontin (Al-Obaidi *et al.* 2014). *Ellagic acid* juga mampu menghambat resorpsi tulang dengan cara menghambat produksi sitokin dan protein

yang memicu diferensiasi osteoklas. *Ellagic acid* menghambat produksi sitokin dengan menghambat transkripsi NF- κ B. Proses ini akan meningkatkan diferensiasi osteoblas dan osteosit, meningkatkan apoptosis osteoklas, dan menekan pembentukan osteoklas, sehingga menghambat resorpsi tulang (Ahad *et al.* 2014).

2). Jalur mekanisme pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada penyembuhan tulang alveolar pasca ekstraksi gigi pada hari ke-14

Pada hari ke-14, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat menurunkan TNF- α . Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-14, penggunaan EA+ BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam meningkatkan nilai ekspresi TNF- α . *Ellagic acid* mengurangi kadar TNF- α dan IL-6 *in vivo* dan *in vitro* (Gupta *et al.* 2014). Tikus yang diobati dengan EA (15 mg/kg) telah secara signifikan mengurangi kadar IL-6 dan TNF- α dan meningkatkan kadar IL-10 pada jaringan gingiva (ÖNGÖZ DEDE *et al.* 2021). Penelitian lain menyatakan bahwa EA menurunkan kadar IL-6 dan peningkatan kadar IL-10 dalam cairan *lavage bronchoalveolar* (Umesalma and Sudhandiran 2010).

Resorpsi tulang dimediasi sebagian besar oleh produksi lokal sitokin proinflamasi, seperti TNF- α dan IL-1 (Boyle *et al.* 2003, Zhao and Ivashkiv 2011 Kobayashi *et al.* 2000). Sitokin-sitokin ini dapat bertindak dengan secara langsung meningkatkan proliferasi dan aktivitas sel-sel dalam garis keturunan osteoklas atau dengan secara tidak langsung mempengaruhi produksi faktor-faktor diferensiasi

osteoklas seperti RANKL dan OPG melalui sel-sel osteoblas/stroma (Boyle *et al.* 2003). *Interleukin-10* diakui memiliki aktivitas anti-inflamasi yang kuat untuk waktu yang lama, dan terbukti menjadi penekan endogen penting dari resorpsi tulang yang dirangsang infeksi (Sasaki *et al.* 2015).

Pada hari ke-14, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat meningkatkan IL-10. Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-14, penggunaan EA+ BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung dalam meningkatkan nilai ekspresi IL-10 dan BMP-2. *Ellagic acid* yang termasuk flavonoid sebagai anti-inflamasi juga dapat menstimulasi makrofag fenotip M2 untuk menstimulasi pelepasan IL-10, IL-4 dan beberapa growth factor seperti VEGF, FGF-2, BMP-2, TGF- β , dan PDGF untuk merangsang atau mendukung diferensiasi dari sel punca mesenkim sehingga terjadi peningkatan jaringan vaskuler, fibroblas, dan osteoblas. VEGF juga berperan dalam proses remodeling tulang dengan menghambat proses apoptosis sel osteoblas, meningkatkan aktivitas osteokalsin dan alkaline phosphatase (ALP) sehingga terjadi stimulasi, migrasi, proliferasi dari sel osteoblas dan meningkatkan mineralisasi matriks ekstraseluler (Wardhana *et al.* 2021). Pada penelitian lain menunjukkan bahwa IL-10 bertindak sebagai stimulator proliferasi kondrosit dan diferensiasi kondrogenik atau hipertrofik melalui aktivasi jalur pensinyalan BMP (Jung *et al.* 2013).

Pada hari ke-14, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat menurunkan TNF- α . Pada

pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-14, penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai TNF- α dan berpengaruh tidak langsung terhadap OCN namun tidak berpengaruh terhadap WB jika melewati TNF- α . *Ellagic acid* mengatur proses inflamasi dengan mengurangi produksi sitokin inflamasi melalui penghambatan ekspresi NF- κ B (Umesalma and Sudhandiran 2010). Efek EA sebagai anti inflamasi dapat terjadi karena penekanan aktivasi protein siklooksigenase (COX) (Usta *et al.* 2013). *Ellagic acid* memiliki efek menguntungkan pada inflamasi gingiva karena menurunkan kadar TNF- α karena efeknya pada neutrofil dan dapat digunakan pada inflamasi mukositis, gingivitis, dan periodontitis (Granica *et al.* 2016).

Peningkatan dalam pembentukan tulang alveolar dan pengamatan ekspresi *osteocalcin* yang diamati pada tikus yang diobati dengan EA menunjukkan bahwa, mineralisasi telah terjadi dengan integritas yang lebih besar. Selama periode evaluasi, terdapat ekspresi *osteocalcin* dan osteopontin yang intens pada kelompok EA, terutama pada hari ke-14 dan ke-21 (Al-Obaidi *et al.* 2014). Pemberian EA saja mungkin telah meningkatkan hasil, berbeda dengan kelompok kontrol, dalam hal kekuatan pembentukan tulang pada tikus yang diekstraksi giginya (Horcajada-Molteni *et al.* 2000). *Osteocalcin* sering digunakan sebagai penanda serum pembentukan tulang osteoblastik dan diyakini bertindak dalam matriks tulang untuk mengatur mineralisasi. *G protein coupled receptor* (Gprc6a), diekspresikan oleh berbagai jenis sel termasuk yang ditemukan untuk merespons *osteocalcin* (Kuang *et al.* 2005).

Ellagic acid adalah polifenol yang dilaporkan memiliki sifat antikanker, antioksidan dan anti-inflamasi (Vattem and Shetty 2005). Resveratrol (RES) adalah salah satu senyawa polifenol yang terdapat pada tumbuhan dan dimanfaatkan dalam bidang medis. Perawatan RES meningkatkan level OCN dan Runx2 yang diregulasi ke bawah dalam *Bone mesenchymal stem cells* (BMSC) yang menjalani induksi TNF- α . Tingkat protein yang diregulasi dari (NF- κ B) dan -catenin dalam BMSC yang diinduksi TNF- α diturunkan regulasinya dengan pengobatan RES. Efek perlindungan dari Resveratrol (RES) pada penghambatan diferensiasi osteogenik yang diinduksi TNF- α , dapat mengurangi perkembangan osteoporosis (Zhu *et al.* 2015).

Pada hari ke-14, pemberian kombinasi ellagic acid dan bovine bone xenograft pada pembentukan woven bone pasca ekstraksi gigi dapat meningkatkan BMP-2. Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-14, penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap TNF-a dan IL-10 jika melewati BMP-2. *Bone Morphogenetic Protein-2* berperan penting dalam merangsang diferensiasi sel mesenkim menjadi osteoblas melalui stimulasi jalur sinyal Smad, mengatur transkripsi gen terkait osteogenesis seperti ALP, kolagen tipe-I, *osteocalcin*, dan gen sialoprotein tulang. Smad1 adalah *immediate downstream mediator* dari transduksi reseptor BMP (Wang *et al.* 2011, Yoon and Lyons 2004). Penghapusan spesifik kondrosit dari gen Smad1 mengakibatkan perkembangan tulang calvarial tertunda. Penghapusan spesifik osteoblas mengakibatkan penghambatan parsial pensinyalan BMP dan fenotipe

osteopenik, dengan gangguan proliferasi dan diferensiasi osteoblas. Temuan ini menunjukkan peran penting transduksi sinyal Smad1 dan BMP dalam pembentukan tulang pasca kelahiran (Yoon and Lyons 2004, Beederman *et al.* 2016). Selain itu, BMP-2 menginduksi ekspresi banyak sitokin dan kemokin inflamasi termasuk interleukin dan faktor nekrosis tumor (TNF)- α , mengaktifkan osteoklas melalui RANKL (James *et al.* 2016).

Aktivitas ALP, sintesis kolagen dan *osteocalcin*, dan penggabungan kalsium dalam matriks ekstraseluler maksimal sekitar hari ke 15, 18, 24. dan 27 (Vlasselaer *et al.* 1993). IL-10 mempengaruhi peristiwa seluler yang menentukan osteogenik diferensiasi dan yang mendahului perolehan aktivitas ALP, sintesis kolagen, *osteocalcin*, dan potensi sel sumsum untuk membentuk matriks ekstraseluler termineralisasi. IL-10 banyak diproduksi oleh sel-sel positif *osteocalcin*, dengan kuat menunjukkan bahwa produksi IL-10 tidak mengganggu induksi yang dimediasi oleh Runx2 dari *osteoblast-like phenotypes* (Fujioka *et al.* 2015). IL 10 menekan diferensiasi osteoblas melalui penghambatan pensinyalan *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) dengan menginduksi ekspresi Runx2 (Lee *et al.* 2000).

Pada hari ke-14, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat meningkatkan BMP-2. Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-14, penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh secara langsung terhadap nilai BMP-2 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap ALP dan OCN namun tidak berpengaruh

terhadap WB jika melewati BMP-2. *Alkaline phosphatase* sebagai penanda dari diferensiasi osteoblas dan diferensiasi trans osteogenik yang diinduksi BMP-2 dari sel-sel miogenik (Lee *et al.* 2005). Dlx5 adalah faktor transkripsi yang menginduksi tulang yang diekspresikan dalam membedakan osteoblas (Ryoo 2003). Dlx5 mengatur ekspresi ALP dengan mengikat langsung ke promotor ALP. Penelitian Ryoo menjelaskan bahwa Dlx5 memediasi Diferensiasi osteoblas yang diinduksi BMP-2 dengan merangsang dua gen master kunci, yaitu, Runx2 dan Osx (Ryoo 2003). Penelitian Kim menjelaskan bahwa ekspresi berlebih Dlx5 di Runx2 / sel adalah cukup untuk merangsang ekspresi mRNA ALP. Dlx5 dapat mengatur secara langsung ekspresi ALP dan menunjukkan bahwa Dlx5 adalah mediator penting dari ekspresi ALP. Dlx5 dan Runx2 secara independen terlibat dalam BMP-2 yang diinduksi. Ekspresi ALP, dan Dlx5 dapat mengatur ekspresi ALP baik secara langsung dengan mengikat promotor ALP atau secara tidak langsung dengan merangsang ekspresi Runx2 (Kim *et al.*, 2004).

Aktivitas ALP sebagai penanda diferensiasi menjadi fenotipe osteoblas, penelitian (Cheng *et al.* 2001) mengukur aktivitas ALP dari ketiga tipe sel. Aktivitas ALP dari transduksi Adv-BMP2 sel adalah yang tertinggi di antara ketiga jenis sel ini (1,7 kali lipat dari sel induk dan 3,4 kali lipat sel Adv. Sel punca mesenkimal yang ditransduksi dengan AdBMP2 menunjukkan peningkatan osteoblastik. *Bone Morphogenetic Protein-2*, 6, dan 9 secara signifikan menginduksi aktivitas *alkaline phosphatase* dalam sel *mesenchymal progenitor* C3H10T1/2 pluripotensial, sedangkan

BMP-2, 4, 6, 7 dan 9 secara signifikan menginduksi aktivitas *alkaline phosphatase* dalam sel C2C12 preosteoblastik (Cheng *et al.* 2004). Telah diketahui dengan baik bahwa protein BMP-2 dapat menginduksi pembentukan tulang baik *in vivo* dan *in vitro*, meskipun konsentrasi tinggi (hingga miligram) (Cheng *et al.* 2001).

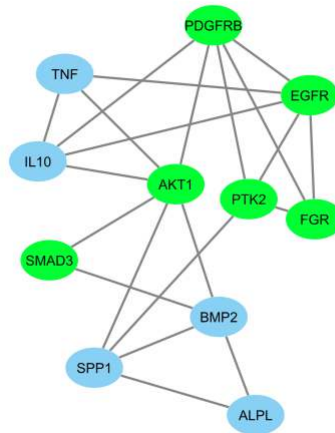
Pada hari ke-14, pemberian kombinasi *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft* pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi dapat meningkatkan IL-10. Pada pola hubungan kausalistik variabel pada hari ke-14, penggunaan EA+BBX_14 jika dibandingkan dengan kontrol berpengaruh signifikan secara langsung terhadap nilai IL-10 dan berpengaruh secara tidak langsung terhadap ALP namun tidak berpengaruh terhadap OCN dan WB jika melewati IL-10. *Treatment* EA secara signifikan meningkatkan tingkat sistem IL-10 pada tikus rematik ke tingkat normal (Allam *et al.* 2016b). *Ellagic acid* menunjukkan efek anti-inflamasi yang kuat terhadap inflamasi yang diinduksi karagenan pada tikus dengan peningkatan IL-10, dan penurunan TNF- α dan IL-1 β (El-Shitany *et al.* 2014). *Ellagic acid* meredakan patologi terkait AIA pada tikus dengan menghambat sitokin inflamasi (TNF- α , IL-1 β , IL-17) dan dengan merangsang produksi sitokin anti-inflamasi (IL-10) (Allam *et al.* 2016b).

Jalur pensinyalan PI3K/AKT ditemukan untuk meningkatkan produksi IL-10 (X. Zhang *et al.* 2016, Bai *et al.* 2014, Zheng *et al.* 2013). *Interleukin-10* bertindak sebagai stimulator diferensiasi khondrogenik atau hipertrofik dalam pembentukan tulang endokondral pada tikus melalui aktivasi jalur pensinyalan BMP-Smad (Jung *et al.* 2013). IL-10 tidak memengaruhi AKT, STAT3, atau Smad jalur pensinyalan dalam

hBMSCs selama diferensiasi osteogenik, tetapi mengatur osteogenesis hBMSC melalui aktivasi jalur pensinyalan NF- κ B dan p38/MAPK (Chen *et al.*, 2018).

6.7.2 Analisis jalur berdasarkan *pathway analysis*

Ellagic Acid dilakukan analisa prediksi target protein dengan *Similarity Ensemble Approach* (SEA) TARGET (<https://sea.bkslab.org/>) dan dipilih prediksi protein dengan nilai *maxTC* (kemiripan struktur dengan database) yaitu 1 (nilai maksimal) pada tabel 6.1. Berdasarkan analisa tersebut EA dapat mentarget beberapa protein (warna hijau) memfasilitasi interaksi dengan ALPL (*alkaline phosphatase*) dan SPP1 (*osteopontin*), IL10, BMP, dan TNF- α . Sementara GPRC6A (*osteocalcin*) belum ada interaksi. Interaksi ini dicoba dengan webserver STRING V11 (<https://string-db.org/>) dengan model *Homo sapiens* dan *confidence score medium score high* (0.7). Data hasil STRING kemudian divisualisasikan dengan program *Cytoscape* 3.8.0. Analisa networking dilakukan dengan *network analysis tools* plugin pada *Cytoscape*. Pada analisa tersebut didapatkan nilai *betweenness centrality* (BC). Nilai ini menggambarkan peranan suatu protein pada *pathway*, semakin besar nilainya maka semakin besar fungsinya pada *pathway* analisa. Dalam hal ini AKT adalah protein yang memiliki BC paling tinggi yaitu 0.353. *Similarity Ensemble Approach* TARGET adalah *webserver* yang digunakan untuk memprediksi target protein dengan cara mencari similaritas struktur dengan ligan yang telah diketahui targetnya, semakin mirip maka semakin tinggi scorenya. Pada penelitian ini menggunakan nilai maksimal 1 (protein warna hijau).



Gambar 6. 1 : Analisa protein target EA dengan protein interest (*confidence score* 0.7).

Tumor necrosis factor- α (TNF- α) adalah salah satu dari beberapa sitokin pro-inflamasi yang terlibat dalam remodeling tulang. Berperan utama dalam regulasi homeostasis tulang dengan merangsang osteoklastogenesis dan menghambat fungsi osteoblas. Peran TNF- α dalam diferensiasi osteoklas melalui jalur Akt dapat mengaktivasi osteoklas dengan mekanisme inflamasi yang kehilangan tulang sistemik dan lokal yang berlebihan (Osta *et al.* 2014). *Tumor necrosis factor- α* mendukung osteoklas melalui aktivasi jalur Akt dan ERK (Lee *et al.* 2001). Akt juga dapat meregulasi IL-10 yang dapat memediasi supresi TNF- α (Dhingra *et al.* 2011).

Akt suatu serin-treonin kinase, mengatur metabolisme sel adalah efek pro-survival dan proliferasif/pertumbuhan. Di antara banyak jalur pensinyalan yang terlibat dalam regulasi apoptosis seluler, Akt berperan penting (Engel *et al.* 2004). Ini diaktifkan di bagian *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) sebagai respons terhadap stimulasi reseptor tirosin kinase (Heart *et al.* 2000). Setelah aktivasi, Akt dianggap

untuk mengatur transkripsi gen pro-survival melalui jalur. Terbukti bahwa IL-10 mempromosikan kelangsungan hidup astrosit melalui mekanisme yang melibatkan aktivasi *PI 3-kinase* (Pahan *et al.* 2000). Dalam laporan lain, IL-10 mempromosikan myeloid dengan mengaktifkan jalur Akt melalui keterlibatan ERK 1/2 dan tirosin kinase (Akuta *et al.* 2003).

Peran kunci untuk PI3-kinase-Akt yang diaktifkan jalur IGF dalam diferensiasi osteoblas yang dimediasi BMP dari sel-sel prekursor mesenkim yang tidak terikat dan sel-sel yang maturasi. Pensinyalan yang diatur Akt sangat penting untuk pertumbuhan tulang longitudinal dan memberikan tindakan positif pada keduanya diferensiasi dan fungsi kondrosit dan osteoblas dalam tulang yang sedang berkembang. Jalur PI3-kinase-Akt yang distimulasi IGF adalah komponen utama dalam jaringan pensinyalan osteogenik interaktif yang diperlukan untuk baik perkembangan tulang maupun remodeling (Mukherjee and Rotwein 2009). Stimulasi yang dimediasi IGF dari reseptor IGF-I memicu reseptor autofosforilasi untuk membuat *docking sites* terfosforilasi residu tirosin untuk molekul adaptor. Ini memulai serangkaian interaksi protein-protein yang mengarah pada aktivasi jalur transduksi sinyal intraseluler (Receptors *et al.* 2014). Jaringan PI3-kinase-Akt sangat penting untuk diferensiasi osteoblas dan pertumbuhan tulang (Giustina *et al.* 2008).

Diferensiasi osteoblas dapat dibagi menjadi beberapa fase, termasuk *lineage*, yang sebagian dicirikan oleh ekspresi dari Runx2 dan Osx (Komori, 2008). Diferensiasi di mana mRNA dan protein spesifik sel tulang lainnya diproduksi dan maturase (Deng

et al. 2021), yang ditandai dengan akumulasi *alkaline phosphatase* spesifik tulang, deposisi matriks ekstraseluler dan mineralisasi (Balcerzak *et al.* 2003, Zaidi 2007). Aktivitas Akt yang dimediasi IGF muncul untuk menjadi kolaborator yang diperlukan dengan pensinyalan yang distimulasi jalur BMP2 untuk memulai diferensiasi osteoblas. Pewarnaan *alkaline phosphatase* dalam sel setelah inkubasi dalam media osteogenik dengan atau tanpa BMP2 selama 7 hari (Mukherjee and Rotwein 2009).

Aktivitas Akt diperlukan untuk masing-masing tahap diferensiasi karena Akt dapat memblokir kemajuan dari satu langkah ke langkah berikutnya. Tindakan penghambatan Akt pada mineralisasi, yang terlihat bahkan ketika Akt ditambahkan relatif terlambat di proses diferensiasi, pada saat aktivitas alkaline phosphatase sudah maksimal (Mukherjee and Rotwein 2009). Efek penghambatan Akt pada pematangan dan fungsi osteoblas pada tulang metatarsal yang dikultur dan juga konsisten dengan fenotipe mineralisasi yang rusak yang terlihat pada tikus yang tidak memiliki Reseptor IGF-I pada osteoblas dewasa (Zhang *et al.* 2002).

6.8 Temuan baru

1. Pada hari ke-7 melalui peningkatan ekspresi BMP-2 dapat meningkatkan ekspresi *osteocalcin* dan peningkatan ekspresi IL-10 dapat meningkatkan ekspresi *alkaline phosphatase*
2. Pada hari ke-14 melalui 2 jalur. Jalur pertama melalui peningkatan ekspresi BMP-2 dapat menurunkan TNF-a dan meningkatkan IL-10. Jalur kedua, penurunan ekspresi TNF-a dapat meningkatkan ekspresi *osteocalcin*,

peningkatan ekspresi BMP-2 dapat meningkatkan ekspresi *alkaline phosphatase* dan ekspresi *osteocalcin*, peningkatan ekspresi IL-10 dapat meningkatkan ekspresi *alkaline phosphatase*.

6.9 Tindak lanjut terhadap temuan

Hasil penelitian ini nantinya dapat dikembangkan menjadi bahan stimulan osteoblastogenesis yang mengkombinasikan antara *ellagic acid* dan *bovine bone xenograft*.

6.10 Keterbatasan penelitian

1. Pemeriksaan ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* dan *Woven Bone* dilakukan pada hari ke-7 dan hari ke-14, dimana proses penyembuhan tulang pasca ekstraksi gigi belum lengkap terbentuk.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Ekspresi TNF- α menurun pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi ellagic acid 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
2. Ekspresi IL-10 meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi ellagic acid 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
3. Ekspresi BMP-2 meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi ellagic acid 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
4. Ekspresi *Alkaline Phosphatase* meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi ellagic acid 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
5. Ekspresi *Osteocalcin* meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi ellagic acid 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
6. *Woven bone* meningkat pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi ellagic acid 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 dan 14
7. Jalur mekanisme pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi ellagic acid 3% dan *bovine bone xenograft* pada hari ke 7 melalui peningkatan ekspresi BMP-2 dapat meningkatkan ekspresi

osteocalcin dan peningkatan ekspresi IL-10 dapat meningkatkan ekspresi *alkaline phosphatase*

8. Jalur mekanisme pada pembentukan *woven bone* pasca ekstraksi gigi setelah pemberian kombinasi ellagic acid 3% dan bovine bone xenograft pada hari ke 14 melalui 2 jalur. Jalur pertama melalui peningkatan ekspresi BMP-2 dapat menurunkan TNF- α dan meningkatkan IL-10. Jalur kedua, penurunan ekspresi TNF- α dapat meningkatkan ekspresi osteocalcin, peningkatan ekspresi BMP-2 dapat meningkatkan ekspresi alkaline phosphatase dan ekspresi osteocalcin, peningkatan ekspresi IL-10 dapat meningkatkan ekspresi alkaline phosphatase.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian dengan pengamatan ekspresi TNF- α , IL-10, BMP-2, *Alkaline Phosphatase*, *Osteocalcin* dan *Woven Bone* alveolar pada waktu yang lebih lama dimana pembentukan tulang lebih lengkap terbentuk.
2. Saat ini penelitian dilakukan pada hewan coba, sebagai langkah selanjutnya dapat dipertimbangkan untuk dilakukan penelitian penggunaan kombinasi bahan *bone graft* dengan *ellagic acid* pada hewan coba dengan spesies yang lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* **3**(9):745–756. doi: <https://doi.org/10.1038/nri1184>.
- Ahad, A., Ganai, A.A., Mujeeb, M. and Siddiqui, W.A. (2014). Ellagic acid, an NF- κ B inhibitor, ameliorates renal function in experimental diabetic nephropathy. *Chemico-Biological Interactions* **219**:64–75. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.05.011>.
- Ahmed, A.U. (2011). An overview of inflammation: Mechanism and consequences. *Frontiers of Biology in China* **6**(4):274–281. doi: <https://doi.org/10.1007/s11515-011-1123-9>.
- Akuta, Y.M., Onoda, Y.S., Amamoto, D.Y., Ago, F.U., Okota, E.A.I.Z.U., Akebe, Y.T. and Asahara, T.K. (2003). Interleukin-10-Induced CCR5 Expression in Macrophage Like HL-60 Cells : Involvement of Erk1 / 2 and STAT-3. **26**(8):1076–1081.
- Al-Aql, Z.S., Alagl, A.S., Graves, D.T., Gerstenfeld, L.C. and Einhorn, T.A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *Journal of Dental Research* **87**(2):107–118. doi: <https://doi.org/10.1177/154405910808700215>.
- Al-Obaidi, M.M.J., Al-Bayat, F.H., Al Batran, R., Hassandarvish, P. and Rouhollahi, E. (2014). Protective effect of ellagic acid on healing alveolar bone after tooth extraction in rat - A histological and immunohistochemical study. *Archives of Oral Biology* **59**(9):987–999. doi: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.06.001>.
- Al-obaidi, M.M.J., Al-bayat, F.H., Batran, R. Al, Hussaini, J. and Khor, G.H. (2014a). Ellagic Acid in Bone Formation after Tooth extr..pdf. **2014**.
- Al-obaidi, M.M.J., Al-bayat, F.H., Batran, R. Al, Hussaini, J. and Khor, G.H. (2014b). Impact of Ellagic Acid in Bone Formation after Tooth extraction in rats. **2014**.
- Allam, G., Mahdi, E.A., Alzahrani, A.M. and Abuelsaad, A.S. (2016a). Ellagic acid alleviates adjuvant induced arthritis by modulation of pro- and antiinflammatory cytokines. *Central European Journal of Immunology* **41**(4):339–349. doi: <https://doi.org/10.5114/ceji.2016.65132>.
- Allam, G., Mahdi, E.A., Alzahrani, A.M. and Abuelsaad, A.S. (2016b). Ellagic acid alleviates adjuvant induced arthritis by modulation of pro- and antiinflammatory cytokines. *Central European Journal of Immunology* **41**(4):339–349. doi: <https://doi.org/10.5114/ceji.2016.65132>.
- Amara, U., Flierl, M.A., Rittirsch, D., Klos, A., Chen, H., Acker, B., ... Huber-Lang, M. (2010). Molecular Intercommunication between the Complement and Coagulation

Systems. *The Journal of Immunology* **185**(9):5628–5636. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903678>.

Amarasekara, D.S., Kim, S. and Rho, J. (2021). Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. *International Journal of Molecular Sciences* **22**(6):2851. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e>.

Amarasekara, D.S., Yu, J. and Rho, J. (2015). Bone Loss Triggered by the Cytokine Network in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Journal of Immunology Research* **2015**. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/832127>.

Anderson, H.C. (2007). The role of matrix vesicles in physiological and pathological calcification. *Current Opinion in Orthopaedics* **18**(5):428–433. doi: <https://doi.org/10.1097/BCO.0b013e3282e9ab49>.

Antonelli, M. and Kushner, I. (2017). It's time to redefine inflammation. *FASEB Journal* **31**(5):1787–1791. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.201601326R>.

Araújo, M.G. and Lindhe, J. (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of clinical periodontology* **32**(2):212–8. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00642.x>.

Araújo, M.G., Silva, C.O., Misawa, M. and Sukekava, F. (2015). Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontology 2000* **68**(1):122–134. doi: <https://doi.org/10.1111/prd.12082>.

Ardhiyanto, hengky bowo (2012). Stimulasi osteoblas oleh hidroksiapatit sebagai material. *Stomatognatic (J. K. G Unej)* **9**:162–164.

Ashkar, S., Weber, G.F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M.E., Jansson, M., Zawaideh, S., ... Cantor, H. (2000). Eta-1 (osteopontin): An early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* **287**(5454):860–864. doi: <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.860>.

Assistant, C. (2012). Dental implants : replacement of missing teeth or to replace teeth ? *Implants dentaires* : **32**(January):1–15.

Atri, C., Guerfali, F.Z. and Laouini, D. (2018). Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **19**(6). doi: <https://doi.org/10.3390/ijms19061801>.

Auh, Q.S., Park, K.R., Yun, H.M., Lim, H.C., Kim, G.H., Lee, D.S., ... Kim, E.C. (2016). Sulfuretin promotes osteoblastic differentiation in primary cultured osteoblasts and in vivo bone healing. *Oncotarget* **7**(48):78320–78330. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12460>.

Avila-Ortiz, G., Elangovan, S., Kramer, K.W.O., Blanchette, D. and Dawson, D. V. (2014). Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: A systematic review

- and meta-analysis. *Journal of Dental Research* **93**(10):950–958. doi: <https://doi.org/10.1177/0022034514541127>.
- Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S. and Kudo, A. (2000). Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *Journal of Biological Chemistry* **275**(7):4858–4864. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4858>.
- Bai, W., Liu, H., Ji, Q., Zhou, Y., Liang, L., Zheng, R. and Chen, J. (2014). TLR3 regulates mycobacterial RNA-induced IL-10 production through the PI3K / AKT signaling pathway. *Cellular Signalling* **26**(5):942–950. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.015>.
- Balcerzak, M., Hamade, E., Zhang, L., Pikula, S., Azzar, G., Radisson, J., ... Buchet, R. (2003). The roles of annexins and alkaline phosphatase in. **50**(4):1019–1038.
- Banihani, S., Swedan, S., Alguraan, Z., Cheng, I., Witte, J.S., McClure, L.A., ... Khan, F. (2015). Degradation Kinetics of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Pom...: ‘Start Your Research’. *Food chemistry* **18**(3):575–84. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.003>.
- Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H. and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* **16**(5):585–601. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x>.
- Barus, L., Airlangga, U., Airlangga, U. and Airlangga, U. (2021). Journal of International Dental and Medical Research ISSN 1309-100X <http://www.jidmr.com> Bone Xenograft Granules as Alveolar Bone Substitutes Liska Barus and et al.
- Beederman, M., Lamplot, J.D., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., ... Shi, L.L. (2016). HHS Public Access. **6**:32–52. doi: <https://doi.org/10.4236/jbise.2013.68A1004.BMP>.
- Belibasakis, G.N., Bostanci, N., Hashim, A., Johansson, A., Aduse-Opoku, J., Curtis, M.A. and Hughes, F.J. (2007). Regulation of RANKL and OPG gene expression in human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by *Porphyromonas gingivalis*: A putative role of the Arg-gingipains. *Microbial Pathogenesis* **43**(1):46–53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2007.03.001>.
- BenSaad, L.A., Kim, K.H., Quah, C.C., Kim, W.R. and Shahimi, M. (2017). Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **17**(1):1–10. doi: <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1555-0>.
- Berendsen, A.D. and Olsen, B.R. (2015). Bone development. *Bone* **80**:14–18. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.04.035>.
- Berendsen, A.D., Pinnow, E.L., Maeda, A., Brown, A.C., McCartney-Francis, N., Kram, V., ... Young, M.F. (2014). Biglycan modulates angiogenesis and bone

formation during fracture healing. *Matrix Biology* **35**:223–231. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.12.004>.

El Bialy, I., Jiskoot, W. and Reza Nejadnik, M. (2017). Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharmaceutical Research* **34**(6):1152–1170. doi: <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2147-x>.

Birmingham, E., Niebur, G.L., Mchugh, P.E., Shaw, G., Barry, F.P. and McNamara, L.M. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European Cells and Materials* **23**(353):13–27. doi: <https://doi.org/10.22203/eCM.v023a02>.

Bodet, C., Chandad, F. and Grenier, D. (2007). Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. *European Journal of Oral Sciences* **115**(1):64–70. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2007.00415.x>.

Bonewald, L.F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research* **26**(2):229–238. doi: <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>.

Bonnans, C., Chou, J. and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **15**(12):786–801. doi: <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.

Bonor, J., Adams, E.L., Bragdon, B., Moseychuk, O., Czymmek, K.J. and Nohe, A. (2012). Initiation of BMP2 signaling in domains on the plasma membrane. *Journal of Cellular Physiology* **227**(7):2880–2888. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.23032>.

Boonyagul, S., Banlunara, W., Sangvanich, P. and Thunyakitpisal, P. (2014). Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. *Odontology* **102**(2):310–317. doi: <https://doi.org/10.1007/s10266-012-0101-2>.

Bornstein, M.M., S., H., H., H., Weber, H. and Buser, D. (2008). A Retrospective analysis of patients referred for implant placement to a speciality clinic: indications, surgical procedures, and early failures. *Int J Oral Maxillofac Implants* **23**(6):1109–1116.

Boyce, B.F. and Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research and Therapy* **9**(SUPPL.1). doi: <https://doi.org/10.1186/ar2165>.

Boyce, B.F. and Xing, L. (2008). Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **473**(2):139–146.

Boyle, W.J., Simonet, W.S. and Lacey, D.L. (2003). and activation. **423**(May):337–

342.

Broughton, G., Janis, J.E. and Attinger, C.E. (2006). The basic science of wound healing. *Plastic and Reconstructive Surgery* **117**(7 SUPPL.):12–34. doi: <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>.

Bruderer, M., Richards, R.G., Alini, M. and Stoddart, M.J. (2014). Role and regulation of runx2 in osteogenesis. *European Cells and Materials* **28**:269–286. doi: <https://doi.org/10.22203/eCM.v028a19>.

Bural, C., Bilhan, H., Çilingir, A. and Geçkili, O. (2013). Assessment of demographic and clinical data related to dental implants in a group of Turkish patients treated at a university clinic. *The Journal of Advanced Prosthodontics* **5**(3):351. doi: <https://doi.org/10.4047/jap.2013.5.3.351>.

Burgos-paz, W., Cerón-muñoz, M. and Solarte-portilla, C. (2011). Genetic diversity and population structure of the Guinea pig (*Cavia porcellus*). *Genetics and Molecular Biology*, **718**:711–718.

Buser, D., Chappuis, V., Belser, U.C. and Chen, S. (2017). Implant placement post extraction in esthetic single tooth sites: when immediate, when early, when late? *Periodontology 2000* **73**(1):84–102. doi: <https://doi.org/10.1111/prd.12170>.

Byers, B.A. and García, A.J. (2004). Exogenous Runx2 Expression Enhances. **10**(11):1623–1632.

Calfee, C.S. and Matthay, M.A. (2010). Clinical immunology: Culprits with evolutionary ties. *Nature* **464**(7285):41–42. doi: <https://doi.org/10.1038/464041a>.

Caneva, M., Botticelli, D., Salata, L.A., Souza, S.L.S., Bressan, E. and Lang, N.P. (2010). Flap vs. ‘flapless’ surgical approach at immediate implants: A histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research* **21**(12):1314–1319. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2010.01959.x>.

Caplanis, N., Lozada, J.L. and Mesquida, J. (2013). *Tooth Extraction and Site Preservation*. Elsevier Inc.

Capra, P. and Conti, B. (2009). Articles The role of Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in bone tissue engineering : a mini review. *Scientifica Acta* **3**(1):25–32.

Carano, R.A.D. and Filvaroff, E.H. (2003). Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* **8**(21):980–989. doi: [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02866-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02866-6).

Champagne, C.M., Takebe, J., Offenbacher, S. and Cooper, L.F. (2002). Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone* **30**(1):26–31. doi: [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00638-X](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00638-X).

Chantarawatit, P., Sangvanich, P., Banlunara, W., Soontornvipart, K. and Thunyakitpisal, P. (2014). Acemannan sponges stimulate alveolar bone, cementum and periodontal ligament regeneration in a canine class II furcation defect model. *Journal of Periodontal Research* **49**(2):164–178. doi: <https://doi.org/10.1111/jre.12090>.

Chao, P.C., Hsu, C.C. and Yin, M.C. (2009). Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutrition and Metabolism* **6**:1–8. doi: <https://doi.org/10.1186/1743-7075-6-33>.

Chatterjee, A., Chatterjee, S., Das, S., Saha, A., Chattopadhyay, S. and Bandyopadhyay, S.K. (2012). Ellagic acid facilitates indomethacin-induced gastric ulcer healing via COX-2 up-regulation. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **44**(7):565–576. doi: <https://doi.org/10.1093/abbs/gms034>.

Chaudhary, P., Sidhu, M.S., Grover, S., Malik, V., Dogra, N. and Kumar, S. (2017). Original article Evaluation of morphology of maxillary and mandibular alveolar bone in vertical and horizontal growers : A cone beam computed tomography study. **2**(2):19–29.

Chen, D., Zhao, M. and Mundy, G.R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* **22**(4):233–241. doi: <https://doi.org/10.1080/08977190412331279890>.

Chen, E., Liu, G., Zhou, X., Zhang, W., Wang, C., Hu, D., ... Pan, Z. Concentration-dependent , dual roles of IL-10 in the osteogenesis of human BMSCs via P38 / MAPK and NF- κ B signaling pathways. (88):4917–4929. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.201701256RRR>.

Chen, E.E.M., Zhang, W., Ye, C.C.Y., Gao, X., Jiang, L.L.J., Zhao, T.T.F. and Pan, Z.Z.J. (2017). Knockdown of SIRT7 enhances the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partly via activation of the Wnt / β -catenin signaling pathway. **8**(9):e3042-11. doi: <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.429>.

Chen, G.Y. and Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: Sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology* **10**(12):826–837. doi: <https://doi.org/10.1038/nri2873>.

Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F., Haydon, R., Peng, Y., Zhou, L., ... He, T. (2004). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* **22**(1):79–80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2003.12.008>.

Cheng, S.-L., Lou, J., Wright, N.M., Lai, C.-F., Avioli, L. V and Riew, K.D. (2001). Calcified Tissue International Laboratory Investigations In Vitro and In Vivo Induction of Bone Formation Using a Recombinant Adenoviral Vector Carrying the Human BMP-2 Gene. *Calcif Tissue Int* **68**:87–94. doi: <https://doi.org/10.1007/s002230001205>.

Chetter, I.C., Oswald, A. V., Fletcher, M., Dumville, J.C. and Cullum, N.A. (2017). A

survey of patients with surgical wounds healing by secondary intention; an assessment of prevalence, aetiology, duration and management. *Journal of Tissue Viability* **26**(2):103–107. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.12.004>.

Clarke, B.L. and Khosla, S. (2010). Physiology of Bone Loss. *Radiologic Clinics of North America* **48**(3):483–495. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rcl.2010.02.014>.

Claudino, M., Tp, G., Crb, C., Gf, D.A., Taga, R., Fq, C., ... Garlet, G.P. (2010). Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. :19–28.

Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., ... Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship. *Biochemical Pharmacology* **72**(8):1010–1021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.016>.

Comanescu, M., Annaratone, L., D'Armento, G., Cardos, G., Sapino, A. and Bussolati, G. (2012). Critical steps in tissue processing in histopathology. *Recent Patents on DNA and Gene Sequences* **6**(1):22–32. doi: <https://doi.org/10.2174/187221512799303190>.

Corbett, S., Daniel, J., Drayton, R., Field, M., Steinhardt, R. and Garrett, N. (2010). Evaluation of the anti-inflammatory effects of ellagic acid. *Journal of Perianesthesia Nursing* **25**(4):214–220. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jopan.2010.05.011>.

Cornélio Favarin, D., Martins Teixeira, M., Lemos De Andrade, E., De Freitas Alves, C., Lazo Chica, J.E., Artério Sorgi, C., ... Paula Rogerio, A. (2013). Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. *Mediators of Inflammation* **2013**. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/164202>.

De Coster, P., Browaeys, H. and De Bruyn, H. (2011). Healing of Extraction Sockets Filled with BoneCeramic® Prior to Implant Placement: Preliminary Histological Findings. *Clinical Implant Dentistry and Related Research* **13**(1):34–45. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2009.00184.x>.

Coyne, C.B., Zeh, H.J. and Lotze, M.T. (2012). Imr_1146 158..175. **249**:1–18.

Crespi, R., Capparè, M.S.P. and Gherlone, E.F. (2014). A Cone Beam Computed Tomography Study. *Int J Oral Maxillofac Implants* **29**:863–868.

Damanik, O. dreamy (2020). Isolasi dan identifikasi golongan senyawa Flavonoud dari daun tumbuhan benalu cempedak.

Davies, J.E. and Hosseini, M.H. (2000). Histodynamics of Endosseous Wound Healing. *Bone Engineering*(January):1–14.

Dembic, Z. and Dembic, Z. (2015). *Chapter 6 – Cytokines of the Immune System:*

Interleukins.

Deng, Z., Sharff, K.A., Tang, N., Song, W., Luo, J., Luo, X., ... Haydon, R.C. (2021). Table of contents 1. :2001–2021.

Dentclinic, H.L. (2016). Dentistry : The Basics. (July).

Deyhim, F., Garica, K., Lopez, E., Gonzalez, J., Ino, S., Garcia, M. and Patil, B.S. (2006). Citrus juice modulates bone strength in male senescent rat model of osteoporosis. *Nutrition* **22**(5):559–563. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.12.002>.

Dhingra, S., Bagchi, A.K., Ludke, A.L., Sharma, A.K. and Singal, P.K. (2011). Akt Regulates IL-10 Mediated Suppression of TNF α - Induced Cardiomyocyte Apoptosis by Upregulating Stat3 Phosphorylation. **6**(9):1–9. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025009>.

Diwan, A.D., Girardi, F.P. and Lane, J.M. (2005). The Biology of Bone Grafting Functions of Bone Grafts. **13**(1):77–86.

Domazetovic, V., Marcucci, G., Iantomasi, T., Brandi, M.L. and Vincenzini, M.T. (2017). Oxidative stress in bone remodeling: Role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* **14**(2):209–216. doi: <https://doi.org/10.11138/ccmbm/2017.14.2.209>.

El-Shitany, N.A., El-Bastawissy, E.A. and El-Desoky, K. (2014). Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *International Immunopharmacology* **19**(2):290–299. doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.02.004>.

Eming, S.A., Hammerschmidt, M., Krieg, T. and Roers, A. (2009). Interrelation of immunity and tissue repair or regeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **20**(5):517–527. doi: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.04.009>.

Engel, D., Peshock, R., Armstrong, R.C., Sivasubramanian, N., Mann, D.L., Peshock, R., ... Mann, D.L. (2004). Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. **77030**.

Evans, K.E. and Fox, S.W. (2007). Interleukin-10 inhibits osteoclastogenesis by reducing NFATc1 expression and preventing its translocation to the nucleus. **9**:1–9. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2121-8-4>.

Fang, J., Zhao, L., Deng, J., Chen, L., Li, Y., Cui, H., ... Deng, H. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* **9**(6):7204–7218. doi: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>.

Farina, R. and Trombelli, L. (2013). Wound Healing of Extraction Sockets. *Oral Wound Healing: Cell Biology and Clinical Management*:195–228. doi:

<https://doi.org/10.1002/9781118704509.ch8>.

Ferdiansyah, F., Utomo, D.N. and Suroto, H. (2018). Immunogenicity of Bone Graft Using Xenograft Freeze-Dried Cortical Bovine, Allograft Freeze-Dried Cortical New Zealand White Rabbit, Xenograft Hydroxyapatite Bovine, And Xenograft Demineralized Bone Matrix Bovine In Bone Defect Of Femoral Diaphysis White . *KnE Life Sciences* **3**(6):344. doi: <https://doi.org/10.18502/kl.v3i6.1143>.

Ferdiansyah Mahyudin, N. and Fedik Abdul Rantam, N. (2011). Regenerasi pada Massive Bone Defect dengan Bovine Hydroxyapatite sebagai Scaffold Mesenchymal Stem Cell. *Journal Biosains Pascasarjana* **13**(3):179–195.

Fickl, S., Zuhr, O., Wachtel, H., Bolz, W. and Huerzeler, M. (2008). Tissue alterations after tooth extraction with and without surgical trauma: A volumetric study in the beagle dog. *Journal of Clinical Periodontology* **35**(4):356–363. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01209.x>.

Fontani, F., Marcucci, G., Iantomasi, T., Brandi, M.L. and Vincenzini, M.T. (2015). Glutathione, N-acetylcysteine and Lipoic Acid Down-Regulate Starvation-Induced Apoptosis, RANKL/OPG Ratio and Sclerostin in Osteocytes: Involvement of JNK and ERK1/2 Signalling. *Calcified Tissue International* **96**(4):335–346. doi: <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9961-0>.

Frantz, C., Stewart, K.M. and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science* **123**(24):4195–4200. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.

Fujioka, K., Kishida, T., Ejima, A., Yamamoto, K., Fujii, W., Murakami, K., ... Yamamoto, T. (2015). Biochemical and Biophysical Research Communications Inhibition of osteoclastogenesis by osteoblast-like cells genetically engineered to produce interleukin-10. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **456**(3):785–791. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.12.040>.

Garlet, G.P., Horwat, R., Ray, H.L., Garlet, T.P., Silveira, E.M., Campanelli, A.P., ... Silva, R.M. (2012). Expression analysis of wound healing genes in human periapical granulomas of progressive and stable nature. *Journal of Endodontics* **38**(2):185–190. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.09.011>.

Geoffroy, V., Kneissel, M., Fournier, B., Boyde, A. and Matthias, P. (2002). High Bone Resorption in Adult Aging Transgenic Mice Overexpressing Cbfa1/Runx2 in Cells of the Osteoblastic Lineage. *Molecular and Cellular Biology* **22**(17):6222–6233. doi: <https://doi.org/10.1128/mcb.22.17.6222-6233.2002>.

Gerritsen, A.E., Allen, P.F., Witter, D.J., Bronkhorst, E.M. and Creugers, N.H.J. (2010). Tooth loss and oral health-related quality of life: A systematic review and meta-analysis. *Health and Quality of Life Outcomes* **8**:1–11. doi:

<https://doi.org/10.1186/1477-7525-8-126>.

Gesuele, R., Kohama, S.G. and Stenzel-Poore, M.P. (2014). Toll-like receptors and ischemic brain injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **73**(5):378–386. doi: <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000068>.

Giustina, A., Mazziotti, G. and Canalis, E. (2008). Skeleton. **29**(5):535–559. doi: <https://doi.org/10.1210/er.2007-0036>.

Glass, D.A., Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., ... Karsenty, G. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental Cell* **8**(5):751–764. doi: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.02.017>.

Glister, C., Kemp, C.F. and Knight, P.G. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: Actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation of follistatin. *Reproduction* **127**(2):239–254. doi: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00090>.

Gomes, P. de S., Daugela, P., Poskevicius, L., Mariano, L. and Fernandes, M.H. (2019). Molecular and Cellular Aspects of Socket Healing in the Absence and Presence of Graft Materials and Autologous Platelet Concentrates: a Focused Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research* **10**(3):1–18. doi: <https://doi.org/10.5037/jomr.2019.10302>.

González-Gallego, J., García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S. and Tuñó, M.J. (2010). Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition* **104**(SUPPL.3). doi: <https://doi.org/10.1017/S0007114510003910>.

Granica, S., Agnieszka, K., Piwowarski, J.P., Dudek, M.K. and Kiss, A.K. (2016). Effects of *Geum urbanum* L. root extracts and its constituents on polymorphonuclear leucocytes functions. Significance in periodontal diseases. **188**:1–12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.030>.

Guan, S., Zheng, Y., Yu, X., Li, W., Han, B. and Lu, J. (2017). Ellagic acid protects against LPS-induced acute lung injury through inhibition of nuclear factor kappa B, proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10. *Food and Agricultural Immunology* **28**(6):1347–1361. doi: <https://doi.org/10.1080/09540105.2017.1339670>.

Guntur, A.R. and Rosen, C.J. (2011). The skeleton: A multi-functional complex organ. New insights into osteoblasts and their role in bone formation: The central role of PI3Kinase. *Journal of Endocrinology* **211**(2):123–130. doi: <https://doi.org/10.1530/JOE-11-0175>.

Gupta, S.C., Tyagi, A.K., Deshmukh-taskar, P., Hinojosa, M., Prasad, S. and Aggarwal, B.B. (2014). Downregulation of tumor necrosis factor and other proinflammatory biomarkers by polyphenols. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND*

BIOPHYSICS(June). doi: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.06.006>.

Hacat, U., Skiba, B., Neill, B. and Piva, T.J. (2005). Gene expression profiles of TNF- α , TACE, furin, IL-1 β and matrilysin in UVA- and UVB-irradiated HaCat cells. *10*(15):173–182.

Hämmerle, C.H.F., Araújo, M.G. and Simion, M. (2012). Evidence-based knowledge on the biology and treatment of extraction sockets. *Clinical Oral Implants Research* **23**(SUPPL. 5):80–82. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02370.x>.

Hanada, R., Hanada, T., Sigl, V., Schramek, D. and Penninger, J.M. (2011). RANKL/RANK-beyond bones. *Journal of Molecular Medicine* **89**(7):647–656. doi: <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0749-z>.

Hansson, S. and Halldin, A. (2012). Alveolar ridge resorption after tooth extraction: A consequence of a fundamental principle of bone physiology. *Journal of Dental Biomechanics* **3**(1):1–8. doi: <https://doi.org/10.1177/1758736012456543>.

Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, M.F. (2001). Hauge EM, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res* **16**(9):1575–1582.

Health and Safety Executive (2013). Reporting injuries, diseases and dangerous occurrences in health and social care Guidance for employers. *Reporting injuries, diseases and dangerous occurrences in health and social care:7*.

Health, M. and Events, T. (2018). What is physical trauma? How has basic research improved trauma patient care? What are researchers learning about how the body responds to major trauma? What is on the horizon for trauma research supported by the National Institute of General Medical S. (January):1–2.

Heart, M., Kitsis, R.N. and Walsh, K. (2000). Akt Promotes Survival of Cardiomyocytes In Vitro and Protects Against Ischemia-Reperfusion Injury in. :660–668.

Hebner, C., Weaver, V. and Debnath, J. (2008). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annual Review of Pathology-mechanisms of Disease* **3**:67–97. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.path>.

Herniyati, H. (2017). Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta Terhadap Ekspresi Osteokalsin Pada Osteoblas Selama Pergerakan Gigi Ortodonti. *Jurnal Teknosains* **6**(1):31. doi: <https://doi.org/10.22146/teknosains.23158>.

Hikita, A., Yana, I., Wakeyama, H., Nakamura, M., Kadono, Y., Oshima, Y., ... Tanaka, S. (2006). Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF- κ B ligand. *Journal of Biological Chemistry* **281**(48):36846–

36855. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M606656200>.

Hofbauer, L.C. and Schoppet, M. (2004). CLINICIAN ' S CORNER Clinical Implications of the Osteoprotegerin / RANKL / RANK System for Bone. *The Journal of the American Medical Association* **292**(4):490–5. doi: <https://doi.org/10.1145/2713168.2713186>.

Höftberger, R., Mader, S. and Reindl, M. (2015). Immunohistochemistry. *Cerebrospinal Fluid in Clinical Neurology*(November):143–158. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-01225-4_12.

Holland, D., Hatib, K. and Bar-Ya'akov, I. (2009). Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. *Horticultural Reviews* **35**:127–191. doi: <https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch2>.

Horcajada-Molteni, M.N., Crespy, V., Coxam, V., Davicco, M.J., Remesy, C. and Barlet, J.P. (2000). Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *Journal of Bone and Mineral Research* **15**(11):2251–2258. doi: <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.11.2251>.

Horváth, A., Mardas, N., Mezzomo, L.A., Needleman, I.G. and Donos, N. (2013). Alveolar ridge preservation. A systematic review. *Clinical Oral Investigations* **17**(2):341–363. doi: <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0758-5>.

Huang, R.L., Yuan, Y., Tu, J., Zou, G.M. and Li, Q. (2014). Opposing TNF-/IL-1 β - and BMP-2-activated MAPK signaling pathways converge on Runx2 to regulate BMP-2-induced osteoblastic differentiation. *Cell Death and Disease* **5**(4):1–11. doi: <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.101>.

Huang, W. (2007). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in Bioscience* **12**(8–12):3068. doi: <https://doi.org/10.2741/2296>.

Huang, W. and Glass, C.K. (2010). Nuclear receptors and inflammation control: Molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30**(8):1542–1549. doi: <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.191189>.

Humidat, A.K.M., Kamadjaja, D.B., Bianto, C., Rasyida, A.Z., Purwati and Harijadi, A. (2018). Effect of freeze-dried bovine bone xenograft on tumor necrosis factor-alpha secretion in human peripheral blood mononuclear cells. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences* **20**(December):S88–S92.

Huynh-Ba, G., Pjetursson, B.E., Sanz, M., Cecchinato, D., Ferrus, J., Lindhe, J. and Lang, N.P. (2010). Analysis of the socket bone wall dimensions in the upper maxilla in relation to immediate implant placement. *Clinical Oral Implants Research* **21**(1):37–42. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01870.x>.

- Ikeda, T., Kasai, M. and Utsuyama, M. (2001). Determination of Three Isoforms of the Receptor Activator of Nuclear Factor- κ Ligand and Their. *Endocrinology* **142**(4):1419–1426.
- Iyer, S.S. and Cheng, G. (2012). Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology* **32**(1):23–63.
- James, A.W., LaChaud, G., Shen, J., Asatrian, G., Nguyen, V., Zhang, X., ... Soo, C. (2016). A Review of the Clinical Side Effects of Bone Morphogenetic Protein-2. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* **22**(4):284–297. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0357>.
- Jamjoom, A. and Cohen, R.E. (2015). Grafts for Ridge Preservation. *Journal of functional biomaterials* **6**(3):833–48. doi: <https://doi.org/10.3390/jfb6030833>.
- Janssen, W.J. and Henson, P.M. (2012). Cellular Regulation of the Inflammatory Response. *Toxicologic Pathology* **40**(2):166–173. doi: <https://doi.org/10.1177/0192623311428477>.
- Joseph, J. and Kalyanaraman, B. (2004). JBC Papers in Press. Published on April 21, 2004 as Manuscript M400977200 1. (612).
- Jung, Y.K., Kim, G.W., Park, H.R., Lee, E.J., Choi, J.Y., Beier, F. and Han, S.W. (2013). Role of interleukin-10 in endochondral bone formation in mice: Anabolic effect via the bone morphogenetic protein/Smad pathway. *Arthritis and Rheumatism* **65**(12):3153–3164. doi: <https://doi.org/10.1002/art.38181>.
- Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M. and Korthuis, R.J. (2012). *Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury*. 1st ed. Elsevier Inc.
- Kanazawa, K. and Kudo, A. (2005). Self-assembled RANK induces osteoclastogenesis ligand-independently. *Journal of Bone and Mineral Research* **20**(11):2053–2060. doi: <https://doi.org/10.1359/JBMR.050706>.
- Kanyama, M., Kuboki, T., Akiyama, K., Nawachi, K., Miyauchi, F.M., Yatani, H., ... Takigawa, M. (2003). Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. *Archives of Oral Biology* **48**(10):723–730. doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(03\)00153-5](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(03)00153-5).
- Kargozar, S., Milan, P.B., Bairo, F. and Mozafari, M. (2019). *Nanoengineered Biomaterials for Bone/Dental Regeneration*. Elsevier Inc.
- Karsenty, G. (2001). Minireview: Transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology* **142**(7):2731–2733. doi: <https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8306>.
- Kasat, V. and Ladda, R. (2012). Smoking and dental implants. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry* **2**(2):38. doi: <https://doi.org/10.4103/2231-0762.109358>.

- Khosla, S., Westendorf, J.J. and Oursler, M.J. (2008). Jci0833612. **118**(2). doi: <https://doi.org/10.1172/JCI33612>. Bone.
- Khurana, J.S. (2009). *Bone Pathology*.
- Kimball, J.S., Johnson, J.P. and Carlson, D.W.A. (2021). Oxidative Stress and Osteoporosis. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **103**(15):1451–1461. doi: <https://doi.org/10.2106/JBJS.20.00989>.
- Kitaura, H., Kimura, K., Ishida, M., Kohara, H., Yoshimatsu, M. and Takano-Yamamoto, T. (2013). Immunological reaction in TNF- α -mediated osteoclast formation and bone resorption in vitro and in vivo. *Clinical and Developmental Immunology* **2013**. doi: <https://doi.org/10.1155/2013/181849>.
- Klein, M. and Al-Nawas, B. (2011). For which clinical indications in dental implantology is the use of bone substitute materials scientifically substantiated? *Eur J Oral Implantol.* **4**(January):11–29.
- Knezoviê-zlatariê, D. (2002). Resorptive Changes of Maxillary and Mandibular Bone Structures in Removable Denture Wearers. *Bone* **36**(6):261–265.
- Kobayashi, B.K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N., Takami, M., Kotake, S., ... Suda, T. (2000). Tumor Necrosis Factor α Stimulates Osteoclast Differentiation by a Mechanism Independent of the ODF / RANKL – RANK Interaction. **191**(2).
- Koh, T.J. and DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert reviews in molecular medicine* **13**(July 2011):e23. doi: <https://doi.org/10.1017/S1462399411001943>.
- Kolk, A., Handschel, J., Drescher, W., Rothamel, D., Kloss, F., Blessmann, M., ... Smeets, R. (2012). Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **40**(8):706–718. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2012.01.002>.
- Komine, M., Kukita, A., Kukita, T., Ogata, Y., Hotokebuchi, T. and Kohashi, O. (2001). Tumor necrosis factor- α cooperates with receptor activator of nuclear factor κ B ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone* **28**(5):474–483. doi: [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00420-3](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00420-3).
- Komori, T. (2010). Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell and Tissue Research* **339**(1):189–195. doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0832-8>.
- Komori, T. (2019). Regulation of proliferation, differentiation and functions of osteoblasts by runx2. *International Journal of Molecular Sciences* **20**(7). doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20071694>.

Komori, T. (2020a). What is the function of osteocalcin? *Journal of Oral Biosciences* **62**(3):223–227. doi: <https://doi.org/10.1016/j.job.2020.05.004>.

Komori, T. (2020b). Functions of osteocalcin in bone, pancreas, testis, and muscle. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(20):1–15. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21207513>.

Kresnoadi, U., Raharjo, T. and Rostiny, R. (2018). Effects of mangosteen peel extract combined with demineralized freeze - dried bovine bone xenograft on osteocalcin , collagen 1 , and osteoblast as alveolar bone regeneration in socket preservation. :117–121. doi: <https://doi.org/10.4103/jips.jips>.

Kresnoadi, U., Rahmania, P.N., Caesar, H.U., Djulaeha, E., Agustono, B., Dimas, M. and Ari, A. (2019). The role of the combination of Moringa oleifera leaf extract and demineralized freeze - dried bovine bone xenograft (xenograft) as tooth extraction socket preservation materials on osteocalcin and transforming growth factor - beta 1 expressions in alveo. doi: <https://doi.org/10.4103/jips.jips>.

Krzyszczuk, P., Schloss, R., Palmer, A. and Berthiaume, F. (2018). The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Frontiers in Physiology* **9**(MAY):1–22. doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00419>.

Kuang, D., Yao, Y., Lam, J., Tsushima, R.G. and Hampson, D.R. (2005). Cloning and characterization of a Family C orphan G-protein coupled receptor. *Journal of Neurochemistry* **93**(2):383–391. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03025.x>.

Kuprash, D. V. and Nedospasov, S.A. (2016). Molecular and cellular mechanisms of inflammation. *Biochemistry (Moscow)* **81**(11):1237–1239. doi: <https://doi.org/10.1134/S0006297916110018>.

Land, W.G. (2015). The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos University medical journal* **15**(2):e157-70.

Lateef Wani, M., Gani Ahangar, A., Ahmad Ganie, F., Nabi Wani, S. and Wani, N. (2013). Vascular Injuries: Trends in Management. *Trauma Monthly* **17**(2):266–269. doi: <https://doi.org/10.5812/traumamon.6238>.

Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappa B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(6):1–10. doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.

Lee, K., Kim, H., Li, Q., Chi, X., Ueta, C., Komori, T., ... Iol, M.O.L.C.E.L.L.B. (2000). Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor \square 1 and Bone Morphogenetic Protein 2 , and Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces

Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12. **20**(23):8783–8792.

Lee, K.S., Kwon, Y.H., Herr, Y., Shin, S. Il, Lee, J.Y. and Chung, J.H. (2010). Incomplete bone formation after sinus augmentation: A case report on radiological findings by computerized tomography at follow-up. *Journal of Periodontal and Implant Science* **40**(6):283–288. doi: <https://doi.org/10.5051/jpis.2010.40.6.283>.

Lee, M., Kim, Y., Yoon, W., Kim, J., Kim, B., Hwang, Y., ... Ryoo, H. (2005). Dlx5 Specifically Regulates Runx2 Type II Expression by Binding to Homeodomain-response Elements in the Runx2 Distal Promoter *. **280**(42):35579–35587. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M502267200>.

Lee, S.E., Chung, W.J., Bok, H., Chung, C., Kwack, K., Lee, Z.H., ... Kim, H. (2001). TRANSDUCTION : Tumor Necrosis Factor- α Supports the Survival of Osteoclasts through the Activation of Akt and ERK Tumor Necrosis Factor- α Supports the Survival of Osteoclasts through the Activation of Akt and ERK *. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M103642200>.

Li, Jia, Wang, G., Hou, C., Li, Jianke, Luo, Y. and Li, B. (2019). Punicalagin and ellagic acid from pomegranate peel induce apoptosis and inhibits proliferation in human HepG2 hepatoma cells through targeting mitochondria. *Food and Agricultural Immunology* **30**(1):897–912. doi: <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1642857>.

LIEBERMAN, J.R., DALUISKI, A. and EINHORN, T.A. (2002). the Role of Growth Factors in the Repair of Bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* **84**(6):1032–1044. doi: <https://doi.org/10.2106/00004623-200206000-00022>.

Lin, X., Patil, S., Gao, Y.G. and Qian, A. (2020). The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Frontiers in Pharmacology* **11**(May):1–15. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>.

Liu, D., Yao, S. and Ge, W. (2006). Effect of interleukin-10 on gene expression of osteoclastogenic regulatory molecules in the rat dental follicle. (18):42–49.

Liu, R., Li, J., Cheng, Y., Huo, T., Xue, J., Liu, Y., ... Chen, X. (2015). Effects of ellagic acid-rich extract of pomegranates peel on regulation of cholesterol metabolism and its molecular mechanism in hamsters. *Food and Function* **6**(3):780–787. doi: <https://doi.org/10.1039/c4fo00759j>.

Liu, W. and Zhang, X. (2015). Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (Review). *Molecular Medicine Reports* **11**(5):3212–3218. doi: <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3152>.

Lorenzo, J., Choi, Y., Horowitz, M.C., Takayanagi, H. and Schett, G. (2015). Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems: Second Edition.

Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems: Second Edition 9:1–363. doi: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-12825-5>.

Lorenzo, J., Horowitz, M. and Choi, Y. (2008). Osteoimmunology: Interactions of the bone and immune system. *Endocrine Reviews* 29(4):403–440. doi: <https://doi.org/10.1210/er.2007-0038>.

Lund, S.A., Giachelli, C.M. and Scatena, M. (2009). The role of osteopontin in inflammatory processes. *Journal of Cell Communication and Signaling* 3(3–4):311–322. doi: <https://doi.org/10.1007/s12079-009-0068-0>.

Luvizuto, E.R., Dias, S.M.D., Queiroz, T.P., Okamoto, T., Garcia, I.R., Okamoto, R. and Dornelles, R.C.M. (2010). Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone* 46(4):1021–1029. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.12.016>.

Lynch, C.C., Hikosaka, A., Acuff, H.B., Martin, M.D., Kawai, N., Singh, R.K., ... Futakuchi, M. (2005). MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell* 7(5):485–496. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.04.013>.

M. Jamil Al-Obaidi, M., Hussain Al-Bayaty, F., Al Batran, R., Emad Ibrahim, O. and M. daher, A. (2016). Ellagic Acid Increases Osteocalcin and Alkaline Phosphatase After Tooth Extraction in Nicotinic-Treated Rats. *Current Pharmaceutical Design* 22(16):2403–2410.

Ma, A., Nhm, A., Agt, P., Duncan, W., Cm, F. and Esposito, M. (2017). Interventions for replacing missing teeth : alveolar ridge preservation techniques for dental implant site development (Review). (5). doi: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010176.pub2.www.cochranelibrary.com>.

MacLeod, J.B.A. (2005). Guidelines for Essential Trauma Care. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 58(3):652–653. doi: <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000157822.40227.f2>.

Madriral-Carballo, S., Rodriguez, G., Krueger, C.G., Dreher, M. and Reed, J.D. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) supplements: Authenticity, antioxidant and polyphenol composition. *Journal of Functional Foods* 1(3):324–329. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.02.005>.

Markus, J. (2006). Clinical Application of Biochemical Markers. *Arq Bras Endocrinol metab* 50:603–620.

Maruyama, Z., Yoshida, C.A., Furuichi, T., Amizuka, N., Ito, M., Fukuyama, R., ... Komori, T. (2007). Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Developmental Dynamics* 236(7):1876–1890. doi: <https://doi.org/10.1002/dvdy.21187>.

- Masaki, C., Nakamoto, T., Mukaibo, T., Kondo, Y. and Hosokawa, R. (2015). Strategies for alveolar ridge reconstruction and preservation for implant therapy. *Journal of Prosthodontic Research* **59**(4):220–228. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2015.04.005>.
- Matsumoto, M., Funami, K., Oshiumi, H. and Seya, T. (2013). *Toll-IL-1-Receptor-Containing Adaptor Molecule-1: A Signaling Adaptor Linking Innate Immunity to Adaptive Immunity*. 1st ed. Copyright © 2013, Elsevier Inc. All Rights Reserved.
- Mikkola, H.K.A. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**(19):3733–3744. doi: <https://doi.org/10.1242/dev.02568>.
- Monroe, D.M. and Hoffman, M. (2012). The clotting system - A major player in wound healing. *Haemophilia* **18**(SUPPL.5):11–16. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2516.2012.02889.x>.
- Mountziaris, P.M. and Mikos, A.G. (2008). Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Engineering - Part B: Reviews* **14**(2):179–186. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0038>.
- Mueller, C. (2013). Danger-associated molecular patterns and inflammatory bowel disease: Is there a connection? *Digestive Diseases* **30**(SUPPL. 3):40–46. doi: <https://doi.org/10.1159/000342600>.
- Mukherjee, A. and Rotwein, P. (2009). Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *Journal of Cellular Biochemistry* **111**(3):716–726. doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.042770>.
- Muroi, M. and Tanamoto, K. (2007). TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- κ B. *Journal of Leukocyte Biology* **83**(3):702–707. doi: <https://doi.org/10.1189/jlb.0907629>.
- Murshed, M. (2018). Mechanism of bone mineralization. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **8**(12):1–12. doi: <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A031229>.
- Murugan, R., Rao, K.P. and Sampath Kumar, T.S. (2003). Heat-deproteinized xenogeneic bone from slaughterhouse waste: Physico-chemical properties. *Bulletin of Materials Science* **26**(5):523–528. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02707351>.
- Musco, F. and van Staden, M. (2010). Conclusion. *Advances in Global Change Research* **39**(2):415–419. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9531-3_7.
- Netto, G.J., Saad, R.D. and Dysert, P.A. (2003). Diagnostic Molecular Pathology: Current Techniques and Clinical Applications, Part I. *Baylor University Medical Center Proceedings* **16**(4):379–383. doi: <https://doi.org/10.1080/08998280.2003.11927931>.

- No, V., Hayati, N., Handayani, D., Bahtiar, A. and Louisa, M. (2017). Efek Kapsul Ekstrak Etanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum L.*) terhadap Penanda Pembentukan dan Kualitas Tulang pada Wanita Pascamenopause The Effect of Pomegranate Peel Ethanol Extract (*Punica granatum L.*) on Marker of Bone Formation and Bone Qual. *7*(2):77–86.
- O Carreira, A.C., Halcsik, E., de Sá, P.M., Zattar, F., Granjeiro, J.M. and Sogayar, M.C. (2014). Recombinant human BMPs 2 and 4 expressed in mammalian cells aiming at bone tissue engineering and stem cell proliferation and differentiation. *BMC Proceedings* **8**(S4):1–2. doi: <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-s4-p84>.
- Ogasawara, T., Kawaguchi, H., Jinno, S., Hoshi, K., Itaka, K., Takato, T., ... Okayama, H. (2004). Bone Morphogenetic Protein 2-Induced Osteoblast Differentiation Requires Smad-Mediated Down-Regulation of Cdk6. *Molecular and Cellular Biology* **24**(15):6560–6568. doi: <https://doi.org/10.1128/mcb.24.15.6560-6568.2004>.
- ÖNGÖZ DEDE, F., BOZKURT DOĞAN, Ş., BALLI, U., DURMUŞLAR, M.C., AVCI, B., GÜLLE, K. and AKPOLAT FERAH, M. (2021). The effect of ellagic acid on the repair process of periodontal defects related to experimental periodontitis in rats. *Journal of Applied Oral Science* **29**:1–12. doi: <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2021-0160>.
- Osta, B., Benedetti, G. and Miossec, P. (2014). Classical and paradoxical effects of TNF- α on bone homeostasis. *Frontiers in Immunology* **5**(FEB):1–10. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048>.
- Pagni, G., Pellegrini, G., Giannobile, W. V. and Rasperini, G. (2012). Postextraction Alveolar Ridge Preservation: Biological Basis and Treatments. *International Journal of Dentistry* **2012**:1–13. doi: <https://doi.org/10.1155/2012/151030>.
- Pahan, K., Khan, M. and Singh, I. (2000). Interleukin-10 and Interleukin-13 Inhibit Proinflammatory Cytokine-Induced Ceramide Production Through the Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase. :576–582.
- Paldánus, P.M. (2017). THE ROLE OF OSTEOCALCIN IN HUMAN BONE METABOLISM AND GLUCOSE HOMEOSTASIS ACADEMIC DISSERTATION To be presented , with the permission of the Faculty of Medicine of the University of Helsinki , for public examination in Auditorio XII on Fabianinkatu 33 , on. **00**:1–95.
- Papachroni, K.K., Karatzas, D.N., Papavassiliou, K.A., Basdra, E.K. and Papavassiliou, A.G. (2009). Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends in Molecular Medicine* **15**(5):208–216. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.03.001>.
- Petersen Kenneth and Pedersen Hans Christian (2013). Introduction to Immunohistochemistry. *Immunohistochemical Staining Methods*:10–12.

- Phillips, B., Gardens, R.B. and Office, K.P. (2010). MISSOURI BOTANICAL GARDEN, ROYAL BOTANIC GARDENS, KEW ANNOUNCE COMPLETION OF THE PLANT LIST. **44**(314).
- Phimphilai, M., Zhao, Z., Boules, H., Roca, H. and Franceschi, R.T. (2006). BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *Journal of Bone and Mineral Research* **21**(4):637–646. doi: <https://doi.org/10.1359/jbmr.060109>.
- Piccinini, A.M. and Midwood, K.S. (2010). DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators of Inflammation* **2010**:1–21. doi: <https://doi.org/10.1155/2010/672395>.
- Primarizky, H., Yuniarti, W.M. and Lukiswanto, B.S. (2018). Ellagic Acid Activity in Healing Process of Incision Wound on Male Albino Rats (*Rattus norvegicus*). *KnE Life Sciences* **3**(6):224. doi: <https://doi.org/10.18502/cls.v3i6.1131>.
- Pugh, N.D., Tamta, H., Balachandran, P., Wu, X., Howell, J., Dayan, F.E. and Pasco, D.S. (2008). The majority of in vitro macrophage activation exhibited by extracts of some immune enhancing botanicals is due to bacterial lipoproteins and lipopolysaccharides. *International Immunopharmacology* **8**(7):1023–1032. doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.03.007>.
- Purnomo, Agus., Adji, D. (2012). Ekspresi Bone Morphogenetic Protein-2 untuk Mengukur Efektivitas Biomaterial Freeze Dried Bovine Bone Xenograft (FDBBX) sebagai Bahan Penyambung Tulang. *Sain Veteriner* **30**(1):93–98.
- Purnomo, A., Pertanian, D., Yogyakarta, D.I., Bedah, B., Hewan, F.K. and Mada, U.G. (2012). Ekspresi Bone Morphogenetic Protein-2 untuk Mengukur Efektivitas Biomaterial Freeze Dried Bovine Bone Xenograft (FDBBX) sebagai Bahan Penyambung Tulang Expression of Bone Morphogenetic Protein-2 for Measuring Effectiveness of Freeze Dried. **30**(1):93–98.
- Rantlha, M., Sagar, T., Kruger, M.C., Coetzee, M. and Deepak, V. (2017). Ellagic acid inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation by suppressing the p38 MAP kinase pathway. *Archives of Pharmacal Research* **40**(1):79–87. doi: <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0790-0>.
- Rasubala, L., Zhang, X., Hicks, D., Puzas, J.E., Malmstrom, H. and Ren, Y. (2011). R Ochester. *Morita USA Products Magazine*.
- Ravindran, S., Gao, Q., Kotecha, M., Magin, R.L., Karol, S., Bedran-Russo, A. and George, A. (2012). Biomimetic extracellular matrix-incorporated scaffold induces osteogenic gene expression in human marrow stromal cells. *Tissue Engineering - Part A* **18**(3–4):295–309. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0136>.
- Receptors, I., Nakae, J.U.N., Kido, Y., Accili, D., Berrie, N., Physicians, C. and

Columbia, S. (2014). Distinct and Overlapping Functions of Insulin and. **22**(August):818–835. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0452>.

Rodrigues, W.C., Fabris, A.L.D.S., Hassumi, J.S., Gonçalves, A., Sonoda, C.K. and Okamoto, R. (2016). Kinetics of gene expression of alkaline phosphatase during healing of alveolar bone in rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **54**(5):531–535. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2016.02.018>.

Rosin, D.L. and Okusa, M.D. (2011). Dangers Within: DAMP Responses to Damage and Cell Death in Kidney Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* **22**(3):416–425. doi: <https://doi.org/10.1681/asn.2010040430>.

Rothamal Daniel (2012). Current issues in soft- and hard-tissue augmentation. *Edi* **8**(1):62–70.

Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O. and Vaage, I.J. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research* **22**:95–106. doi: <https://doi.org/10.12659/msmbr.901142>.

Ryoo, H. (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. **309**:689–694. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.058>.

Sacre, S.M., Andreakos, E., Kiriakidis, S., Amjadi, P., Lundberg, A., Giddins, G., ... Foxwell, B.M. (2007). The toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *American Journal of Pathology* **170**(2):518–525. doi: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060657>.

Salazar, V.S., Gamer, L.W. and Rosen, V. (2016). BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature Reviews Endocrinology* **12**(4):203–221. doi: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.12>.

Saldanha, E., Joseph, N., Ravi, R. and Kumar, A. (2014). *Polyphenols in the Prevention of Acute Pancreatitis : Preclinical Observations*. Elsevier Inc.

Salerno-Goncalves, R., Rezwani, T. and Szein, M.B. (2013). B cells modulate mucosal associated invariant T cell immune responses. *Frontiers in Immunology* **4**(DEC):1–12. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00511>.

Samee, M., Kasugai, S., Kondo, H., Ohya, K., Shimokawa, H. and Kuroda, S. (2008). Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *Journal of Pharmacological Sciences* **108**(1):18–31. doi: <https://doi.org/10.1254/jphs.08036FP>.

Sasaki, H., Hou, L., Belani, A., Wang, C., Uchiyama, T., Müller, R. and Stashenko, P. (2015). IL-10, But Not IL-4, Suppresses Infection-Stimulated Bone Resorption In

Vivo. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3626>.

Scala, A., Lang, N.P., Schweikert, M.T., de Oliveira, J.A., Rangel-Garcia, I. and Botticelli, D. (2014). Sequential healing of open extraction sockets. An experimental study in monkeys. *Clinical Oral Implants Research* **25**(3):288–295. doi: <https://doi.org/10.1111/clr.12148>.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**(4):287–306. doi: <https://doi.org/10.1080/1040869059096>.

Schacht, V. and Kern, J.S. (2015). Basics of Immunohistochemistry. *Journal of Investigative Dermatology* **135**(3):1–4. doi: <https://doi.org/10.1038/jid.2014.541>.

Scheerens, H. and Tatakis, D.N. (2003). Accelerated Alveolar Bone Loss in Mice Lacking Interleukin-10. :632–635.

Schnutenhaus, S., Dreyhaupt, J., Doering, I., Rudolph, H. and Luthardt, R. (2017). Alveolar Ridge Preservation as a Way to Reduce the Need for Bone Augmentation: Implementation of a New, Non-invasive Method of Measuring Bone Preservation: Study Protocol of a Randomized Controlled Clinical Trial and Feasibility Testing Results. *International Journal of Clinical Research & Trials* **2**(2). doi: <https://doi.org/10.15344/2456-8007/2017/116>.

Schroeder, T.M., Jensen, E.D. and Westendorf, J.J. (2005). Runx2: A master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews* **75**(3):213–225. doi: <https://doi.org/10.1002/bdrc.20043>.

Schropp, L. (2004). Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **91**(1):92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2003.10.022>.

Schropp, L., Wenzel, A., Kostopoulos, L. and Karring, T. (2003). Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *The International journal of periodontics & restorative dentistry* **23**(4):313–23.

Schug, J. and Biomaterials, A. (2013). Post Extraction Alveolar Ridge Preservation Scientific Background, Minimally Invasive Treatment Protocols and Expert Reports using. *GUIDOR and easy-graft are trademarks of Sunstar Suisse S.A. in the U.S. and in other countries.*

Schulze, A. (2008). Dental traumatic injuries in sports accidents. **1**(8):13–15.

Shapiro, F. and Wu, J.Y. (2019). Woven bone overview: Structural classification based on its integral role in developmental, repair and pathological bone formation

throughout vertebrate groups. *European Cells and Materials* **38**:137–167. doi: <https://doi.org/10.22203/eCM.v038a11>.

Shetty, S., Kapoor, N., Bondu, J., Thomas, N. and Paul, T. (2016). Bone turnover markers: Emerging tool in the management of osteoporosis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* **20**(6):846–852. doi: <https://doi.org/10.4103/2230-8210.192914>.

Sheu, S. yunn, Tsai, C. chung, Sun, J. sheng, Chen, M. hong, Liu, M. hai and Sun, M.G. (2012). Stimulatory effect of puerarin on bone formation through co-activation of nitric oxide and bone morphogenetic protein-2/ mitogen-activated protein kinases pathways in mice. *Chinese Medical Journal* **125**(20):3646–3653. doi: <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.20.009>.

Shi, M., Wang, C., Wang, Y., Tang, C., Miron, R.J. and Zhang, Y. (2018). Deproteinized bovine bone matrix induces osteoblast differentiation via macrophage polarization. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* **106**(5):1236–1246. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36321>.

Shouval, D.S., Biswas, A., Goettel, J.A., McCann, K., Conaway, E., Redhu, N.S., ... Snapper, S.B. (2014). Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity* **40**(5):706–719. doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.011>.

Siller, A.F. and Whyte, M.P. (2018). Alkaline Phosphatase: Discovery and Naming of Our Favorite Enzyme. *Journal of Bone and Mineral Research* **33**(2):362–364. doi: <https://doi.org/10.1002/jbmr.3225>.

Slavic, S., Andrukhova, O., Zeitz, U., Ford, K., Kleiter, M., Handschuh, S., ... Erben, R.G. (2015). Selective inhibition of receptor activator of NFκB ligand (RANKL) in hematopoietic cells improves outcome after experimental myocardial infarction in mice. *European Heart Journal* **36**:584. doi: <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv400>.

Smiler, D. and Soltan, M. (2006). The bone-grafting decision tree: A systematic methodology for achieving new bone. *Implant Dentistry* **15**(2):122–128. doi: <https://doi.org/10.1097/01.id.0000217780.69637.cc>.

Son, H.E., Kim, E., Byun, M. and Jang, W.G. (2019). Effect of ellagic acid on osteoblast differentiation. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* **48**(3):313–318. doi: <https://doi.org/10.3746/jkfn.2019.48.3.313>.

Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., Von Bulow, V., Schuster, N., ... Landström, M. (2008). The type I TGF-β receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nature Cell Biology* **10**(10):1199–1207. doi: <https://doi.org/10.1038/ncb1780>.

Spilmont, M., Léotoing, L., Davicco, M.J., Lebecque, P., Mercier, S., Miot-Noirault,

E., ... Coxam, V. (2013). Pomegranate seed oil prevents bone loss in a mice model of osteoporosis, through osteoblastic stimulation, osteoclastic inhibition and decreased inflammatory status. *Journal of Nutritional Biochemistry* **24**(11):1840–1848. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.04.005>.

Srikrishna, G. and Freeze, H.H. (2015). Endogenous Damage-Associated Molecular Pattern Molecules at the Crossroads of Inflammation and Cancer. *Neoplasia* **11**(7):615–628. doi: <https://doi.org/10.1593/neo.09284>.

Stavros C. Manolagas (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews* **21**(2):115–137.

Steigmann, M. (2008). A bovine-bone mineral block for the treatment of severe ridge deficiencies in the anterior region: a clinical case report. *The International journal of oral & maxillofacial implants* **23**(1):123–8.

Su, H., Lei, C.T. and Zhang, C. (2017). Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: An update. *Frontiers in Immunology* **8**(APR):1–10. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00405>.

Surh, Y.J., Chun, K.S., Cha, H.H., Han, S.S., Keum, Y.S., Park, K.K. and Lee, S.S. (2001). Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: Down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- κ B activation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **480–481**:243–268. doi: [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00183-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00183-X).

Suryatno (1997). Menghitung besar sampel penelitian kesehatan masyarakat. (*Pengajar Bagian Gizi, Fakultas Kesehatan Masyarakat-UNDIP Semarang*) Dalam **2**:1–4.

Takayanagi, H. (2007). Osteoimmunology: Shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews Immunology* **7**(4):292–304. doi: <https://doi.org/10.1038/nri2062>.

Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003). Toll-Like Receptors. *Annu. Rev. Immunol* **21**:335–76. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126>.

Tan, W.L., Wong, T.L.T., Wong, M.C.M. and Lang, N.P. (2012). A systematic review of post-extraction alveolar hard and soft tissue dimensional changes in humans. *Clinical Oral Implants Research* **23**(SUPPL. 5):1–21. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02375.x>.

Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014). Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **6**(10). doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.

- Torre, E. (2017). Molecular signaling mechanisms behind polyphenol-induced bone anabolism. *Phytochemistry Reviews* **16**(6):1183–1226. doi: <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9529-x>.
- Trombelli, L., Farina, R., Marzola, A., Bozzi, L., Liljenberg, B. and Lindhe, J. (2008). Modeling and remodeling of human extraction sockets. *Journal of Clinical Periodontology* **35**(7):630–639. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01246.x>.
- Umesalma, S. and Sudhandiran, G. (2010). Differential inhibitory effects of the polyphenol ellagic acid on inflammatory mediators NF- κ B, iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **107**(2):650–655. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00565.x>.
- Usta, C., Ozdemir, S., Schiariti, M. and Puddu, P.E. (2013). The pharmacological use of ellagic acid-rich pomegranate fruit. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **64**(7):907–913. doi: <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.798268>.
- Utomo, D.N., Suroto, H. and Gaol, I.L. (2017). Immunogenicity of Bone Graft Using Xenograft Freeze-Dried Cortical Bovine , Allograft Freeze-Dried Cortical New Zealand White Rabbit , Xenograft Hydroxyapatite Bovine , And Xenograft Demineralized Bone Matrix Bovine In Bone Defect Of Femoral Diaphysis Whi. **2017**:344–355. doi: <https://doi.org/10.18502/cls.v3i6.1143>.
- Uzbek, U.H., Rahman, S.A.B., Alam, M.K. and Gillani, S.W. (2014). Bone forming potential of an-organic bovine bone graft: A cone beam CT study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **8**(12):ZC73–ZC76. doi: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/8557.5352>.
- Vattem, D.A. and Shetty, K. (2005). BIOLOGICAL FUNCTIONALITY OF ELLAGIC ACID: A REVIEW - VATTEM - 2005 - Journal of Food Biochemistry -. *Journal of Food Biochemistry* **29**(413):234–266.
- Velnar, T., Bailey, T. and Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: An overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of International Medical Research* **37**(5):1528–1542. doi: <https://doi.org/10.1177/147323000903700531>.
- Vénéreau, E., Ceriotti, C. and Bianchi, M.E. (2015). DAMPs from cell death to new life. *Frontiers in Immunology* **6**(AUG):1–11. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00422>.
- Vieira, A.E., Repeke, C.E., De Barros Ferreira, S., Colavite, P.M., Biguetti, C.C., Oliveira, R.C., ... Garlet, G.P. (2015). Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: Micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. *PLoS ONE* **10**(5):1–22. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124444>.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128021>.

Vignoletti, F., Matesanz, P., Rodrigo, D., Figuero, E., Martin, C. and Sanz, M. (2012). Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clinical Oral Implants Research* **23**(SUPPL. 5):22–38. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02331.x>.

Vimalraj, S. (2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. *Gene* **754**(April):144855. doi: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855>.

Vlasselaer, B.P. Van, Borremans, B., Heuvel, R. Van Den, Gorp, U. Van and Malefyt, R.D.W. (1993). Interleukin-10 Inhibits the Osteogenic Activity of Mouse Bone Marrow. :2361–2370.

Wada, T., Nakashima, T., Hiroshi, N. and Penninger, J.M. (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends in Molecular Medicine* **12**(1):17–25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.11.007>.

Wagner, J.E. (2013). Introduction and Taxonomy. *The Biology of the Guinea Pig*:1–4.

Walsh, M.C., Kim, N., Kadono, Y., Rho, J., Lee, S.Y., Lorenzo, J. and Choi, Y. (2006). Osteoimmunology: Interplay between the immune system and bone metabolism. *Annual Review of Immunology* **24**:33–63. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090646>.

Wang, H.L., Kiyonobu, K. and Neiva, R.F. (2004). Socket augmentation: Rationale and technique. *Implant Dentistry* **13**(4):286–296. doi: <https://doi.org/10.1097/01.id.0000148559.57890.86>.

Wang, K.X. and Denhardt, D.T. (2008). Osteopontin: Role in immune regulation and stress responses. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **19**(5–6):333–345. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.08.001>.

Wang, M., Jin, H., Tang, D., Huang, S., Zuscik, M.J. and Chen, D. (2011). Smad1 plays an essential role in bone development and postnatal bone formation. *Osteoarthritis and Cartilage* **19**(6):751–762. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joca.2011.03.004>.

Wang, X., Wang, Y., Gou, W., Lu, Q., Peng, J. and Lu, S. (2013). Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: A review. *International Orthopaedics* **37**(12):2491–2498. doi: <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2059-2>.

Wardhana, A.S., Nirwana, I., Budi, H.S. and Surboyo, M.D.C. (2021). Role of Hydroxyapatite and Ellagic Acid in the Osteogenesis. *European Journal of Dentistry* **15**(1):8–12. doi: <https://doi.org/10.1055/s-0040-1714039>.

Wei, F., Zhou, Y., Wang, J., Liu, C. and Xiao, Y. (2018). The Immunomodulatory Role of BMP-2 on Macrophages to Accelerate Osteogenesis. *Tissue Engineering - Part A*

24(7–8):584–594. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2017.0232>.

Weiss, G. and Schaible, U.E. (2015). Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunological Reviews* **264**(1):182–203. doi: <https://doi.org/10.1111/imr.12266>.

Wolcott, R. and Fletcher, J. (2014). Products and Technology The role of wound cleansing in the management of wounds. *Wounds International* **1**(1):25–31.

Wong, B.B.R., Josien, R., Lee, S.Y., Sauter, B., Li, H., Steinman, R.M. and Choi, Y. (1997). TRANCE (Tumor Necrosis Factor [TNF]-related Activation-induced Cytokine), a New TNF Family Member Cell – specific Survival Factor. *The Journal of Experimental Medicine* **186**(12):2075–2080.

Wozney, J.M. (2002). Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* **27**(16 SUPPL.).

Wu, C-J, Lu, H.-K. (2008). Smad signal pathway in BMP-2-induced osteogenesis — a mini review. *J Dent Sci* **3**(250):13–21.

Wu, X., Walsh, K., Hoff, B.L. and Camci-Unal, G. (2020). Mineralization of biomaterials for bone tissue engineering. *Bioengineering* **7**(4):1–24. doi: <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040132>.

Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M.D., Guan, K., Karsenty, G. and Franceschi, R.T. (2000). MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *Journal of Biological Chemistry* **275**(6):4453–4459. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.6.4453>.

Xu, J., Li, Z., Hou, Y. and Fang, W. (2015). Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *7*(12):2527–2535.

y w li, P.R.H. (2001). Teknik Pembuatan Preparat Dengan Pewarnaan Hematoksilin Dan. *Balai Penelitian Veteriner*:156–163.

Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B. (2001). Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **107**(2):135–142.

Yao, Z., Lei, W., Duan, R., Li, Y., Luo, L. and Boyce, B.F. (2017). RANKL cytokine enhances TNF-induced osteoclastogenesis independently of TNF receptor associated factor (TRAF) 6 by degrading TRAF3 in osteoclast precursors. *Journal of Biological Chemistry* **292**(24):10169–10179. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771816>.

Yin, T. and Li, L. (2006). The stem cell niches in bone. *Journal of Clinical Investigation* **116**(5):1195–1201. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI28568>.

Yoon, B.S. and Lyons, K.M. (2004). Multiple functions of BMPs in chondrogenesis.

Journal of Cellular Biochemistry **93**(1):93–103. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.20211>.

Zaidi, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. **13**(7):791–801. doi: <https://doi.org/10.1038/nm1593>.

Zhang, J.-M. and An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics* **45**(2):27–37.

Zhang, J.-M. and An, J. (2009). Cytokines, Inflammation, Pain. *Int Anesthesiol Clin.* **69**(2):482–489. doi: <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>. Cytokines.

Zhang, J., Lazarenko, O.P., Wu, X., Tong, Y., Blackburn, M.L., Gomez-Acevedo, H., ... Chen, J.R. (2012). Differential effects of short term feeding of a soy protein isolate diet and estrogen treatment on bone in the pre-pubertal rat. *PLoS ONE* **7**(4). doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035736>.

Zhang, L., Li, D. and Gao, P. (2012). Expulsion of selenium/protein nanoparticles through vesicle-like structures by *Saccharomyces cerevisiae* under microaerophilic environment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**(12):3381–3386. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1150-y>.

Zhang, M., Xuan, S., Bouxsein, M.L., Stechow, D. Von, Akeno, N., Claude, M., ... Clemens, T.L. (2002). Osteoblast-specific Knockout of the Insulin-like Growth Factor (IGF) Receptor Gene Reveals an Essential Role of IGF Signaling in Bone Matrix Mineralization *. **277**(46):44005–44012. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M208265200>.

Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S. and Yang, W. (2014). Interleukin-10 inhibits bone resorption: A potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Research International* **2014**. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/284836>.

Zhang, W., Zhu, C., Wu, Y., Ye, D., Wang, S., Zou, D., ... Jiang, X. (2016). VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation. *European Cells and Materials* **27**:1–12. doi: <https://doi.org/10.22203/ecm.v027a01>.

Zhang, X., Li, N., Shao, H., Meng, Y., Wang, L., Wu, Q. and Yao, Y. (2016). Methane limit LPS-induced NF- κ B / MAPKs signal in macrophages and suppress immune response in mice by enhancing PI3K / AKT / GSK-3 β - mediated IL-10 expression. (June):1–14. doi: <https://doi.org/10.1038/srep29359>.

Zhang, Y., Böse, T., Unger, R.E., Jansen, J.A., Kirkpatrick, C.J. and van den Beucken, J.J.J.P. (2017). Macrophage type modulates osteogenic differentiation of adipose tissue MSCs. *Cell and Tissue Research* **369**(2):273–286. doi: <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2598-8>.

Zhang, Y.H., Heulsmann, A., Tondravi, M.M., Mukherjee, A. and Abu-Amer, Y. (2001). Tumor necrosis factor- α (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* **276**(1):563–568. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M008198200>.

Zhao, B. and Ivashkiv, L.B. (2011). Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. **1**:1–10.

Zheng, Y., Yang, Y., Li, Y., Xu, L., Wang, Y., Guo, Z. and Song, H. (2013). Ephedrine hydrochloride inhibits PGN-induced inflammatory responses by promoting IL-10 production and decreasing proinflammatory cytokine secretion via the PI3K / Akt / GSK3 β pathway. (November 2012):330–337. doi: <https://doi.org/10.1038/cmi.2013.3>.

Zhu, Y.P., Brown, J.R., Sag, D., Zhang, L. and Suttles, J. (2015). Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Regulates IL-10-Mediated Anti-Inflammatory Signaling Pathways in Macrophages. *The Journal of Immunology* **194**(2):584–594. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401024>.

Zou, D., Zhang, Z., Ye, D., Tang, A., Deng, L., Han, W., ... Jiang, X. (2011). Repair of critical-sized rat calvarial defects using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hypoxia-inducible factor-1 α . *Stem Cells* **29**(9):1380–1390. doi: <https://doi.org/10.1002/stem.693>.

(2008). Department of Cell Biology, Unit of Basic Medical Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki 852-8588, Japan. :898–903.

LAMPIRAN

Lampiran 1 : Sertifikat Laik Etik



**UNIVERSITAS AIRLANGGA FACULTY OF DENTAL MEDICINE
HEALTH RESEARCH ETHICAL CLEARANCE COMMISSION**

ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE
Number : 406/HRECC.FODM/IX/2020

Universitas Airlangga Faculty Of Dental Medicine Health Research Ethical Clearance Commission has studied the proposed research design carefully, Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011, and therefore, shall herewith certify that the research entitled :

**"OSTEOGENESIS MECHANISM AFTER
GIVING COMBINATION ELLAGIC ACID AND BOVINE BONE
XENOGRAFT POST TOOTH EXTRACTION"**

Principal Researcher : **DEBBY SAPUTERA**

Unit/Institution/Place of Research : - Pharmacy Laboratory of the Faculty of
Medicine, Universitas Airlangga Surabaya
- Biochemistry Laboratory, Faculty of
Medicine, Universitas Airlangga Surabaya
- Research Center of the Faculty of Dental
Medicine, Universitas Airlangga Surabaya
- Laboratory of Anatomical Pathology,
Faculty of Medicine, Brawijaya University

CERTIFIED TO BE ETHICALLY CLEARED


September 9, 2020
Chairman,


Prof. Dr. M. Rubianto, drg., MS., Sp.Perio(K)
Official No.195009081978021001

Lampiran 2 : Certificate Of Analysis Ellagic Acid

BioF Xi'an Biof Bio-Technology Co.,Ltd

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Ellagic Acid	Batch Number: BIOF110112
Botanical Name: <i>Punica granatum L.</i>	Manufacture Date: Mar. 12,2020
Plant Part Used: Fruit	Analysis Date: Mar. 13,2020
Quantity: 200kg	Certificate Date: Mar. 13,2020

ITEM	SPECIFICATION	RESULTS
Physical & Chemical Control		
Appearance	Fine powder	Complies
Color	Gray-White	Complies
Odor & Taste	Characteristic	Complies
Loss On Drying	<5.0%	2.15%
Ash	<5.0%	3.10%
Assay (Ellagic Acid, By HPLC)	≥90%	90.51%
Sieve Analysis	95% pass 50 mesh	Complies
Heavy Metal	<30ppm	Complies
Residual Solvents	Eur Pham. 2000	Complies
Microbiological Control		
Total plate count	<1000 CFU/g	Complies
Yeast & mold	<100 CFU/g	Complies
E.coli	Negative	Negative
Salmonella	Negative	Negative

Conclusion: Conform with specification
Storage: Stored in dry and cool place, keep away from strong light and heat.
Shelf Life: Two years when stored properly

Quality Control: Xiaoning Yang

Lampiran 3 : Bovine Bone Xenograft



BIOMATERIAL CENTER Dr. SOETOMO TISSUE BANK
 Dr. Soetomo General Hospital
 J. Majes Prof. Dr. Soetomo 9 - 8
 Telp: +6231 8333436 Fax: +6231 8333333
 SURABAYA - INDONESIA

BOVINE POWDER



Standart Produk: AKTS, ECTS, dan APACTS
 Steriliasi dengan gamma radiasi
 ISO 9001 : 2008
 by PT. LINDA's Register Indonesia

Size Of Powder :

- 150 - 355 µm
- 355 - 710 µm

HANYA BEKAL PAKAJ
SINGLE USE ONLY

Lampiran 4 : Permohonan Ijin Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132 Telp. (031) 5030255, Fax (031) 5020256
Website : <http://www.fkg.unair.ac.id> – E-mail : fkgua.skrt@gmail.com

Nomor : 571/UN3.1.2-PPd/2019 10 Oktober 2019
Lampiran : 1 lembar
Hal : 1 ijin melakukan penelitian

Kepada Yth.

1. Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada
2. Laboratorium Metalurgi ITS Surabaya
3. Laboratorium INBIO Indonesia di Malang
4. Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya
5. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya
6. Laboratorium Research Center FKG Universitas Airlangga Surabaya
7. Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya Malang

Bersama ini kami sampaikan surat pengantar Calon Doktor di Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

Nama : Debby Saputera, drg., Sp.Pro.
NIM : 021820173001
Promotor : Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes.
Calon Doktor Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang sedang melakukan penelitian dalam rangka penulisan Disertasi dengan judul :
"MEKANISME OSTEOGENESIS PADA PEMBERIAN KOMBINASI ELLAGIC ACID DAN BOVINE BONE XENOGRAFT PASCA EKSTRAKSI GIGI"

Sehubungan dengan hal itu, kami mohon kesediaan Saudara untuk memberikan ijin bagi Calon Doktor tersebut guna melakukan penelitian yang akan dilakukan sejak tanggal 15 Oktober 2019 sampai dengan 15 April 2020.

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya disampaikan terima kasih.

a.n. Dekan
Wakil Dekan I,



Anita Yuliaty, drg., M.Kes.
5807091985032001

Lampiran 5 : Permohonan Ijin Penelitian Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Kampus A Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132
Telp. (031) 5030255 Fax. (031) 5020256
<http://www.fkg.unair.ac.id> e-mail: mail@fkg.unair.ac.id

Nomor : 2628 /UN3.1.2/PK/2020 23 September 2020
Lampiran : - lembar
Hal : Permohonan Ijin Penelitian

Yth. Dekan
Fakultas Kedokteran
Universitas Airlangga
Surabaya

Bersama ini kami hadapkan mahasiswa Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga :
Nama : Debby Saputera, drg., Sp.Pro.
NIM : 021820173001
Promotor : Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes

Yang sedang melaksanakan penelitian dalam rangka penulisan Disertasi dengan judul :

“Osteogenesis Pada Pasca Pencabutan Gigi Cavia Cobaya Setelah Pemberian Kombinasi Ellagic Acid Dan Freeze Dried Bovine Bone Xenograft.”

Sehubungan dengan itu kami mohon yang bersangkutan diberikan ijin untuk melaksanakan penelitian di :

1. Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
2. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya saudara, kami sampaikan terima kasih.

a.n Dekan
Wakil Dekan I



Yuliati, drg., M.Kes
NRP. 195802091985032001

Tembusan :
Ketan Research Center FKG UNAIR

Lampiran 6 : Permohonan Ijin Penelitian ke Research Center Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Kampus A Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132
Telp. (031) 5030255 Fax. (031) 5020256
<http://www.fkg.unair.ac.id> e-mail: mail@fkg.unair.ac.id

Nomor : 2627 /UN3.1.2/PK/2020 23 September 2020
Lampiran : 1 lembar
Hal : Permohonan Ijin Penelitian

Yth. Ketua Research Center
Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Airlangga
Surabaya

Bersama ini kami hadapkan mahasiswa Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga :
Nama : Debby Saputera, drg., Sp.Prod.
NIM : 021820173001
Promotor : Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes

Yang sedang melaksanakan penelitian dalam rangka penulisan Disertasi dengan judul :

"Osteogenesis Pada Pasca Pencabutan Gigi Cavia Cobaya Setelah Pemberian Kombinasi Ellagic Acid Dan Freeze Dried Bovine Bone Xenograf."

Sehubungan dengan itu kami mohon yang bersangkutan diberikan ijin untuk melaksanakan penelitian di Research Center Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

Demikian atas perhatian dan kerjasamanya saudara, kami sampaikan terima kasih.

a.n Dekan
Fakultas Kedokteran Gigi
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes
NIP. 19580709 1985032001

Lampiran 7 : Permohonan Ijin Penelitian ke Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
Kampus A Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132
Telp. (031) 5030255 Fax. (031) 5020256
<http://www.fkg.unair.ac.id> e-mail: mail@fkg.unair.ac.id

Nomor : 2624 /UN3.1.2/PK/2020 23 September 2020
Lampiran : - lembar
Hal : Permohonan Ijin Penelitian

Yth. Yth. Dekan
Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya
Malang

Bersama ini kami hadapkan mahasiswa Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga :

Nama : Debby Saputera, drg., Sp.Pro.
NIM : 021820173001
Promotor : Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes

Yang sedang melaksanakan penelitian dalam rangka penulisan Disertasi dengan judul :

“Osteogenesis Pada Pasca Pencabutan Gigi Cavia Cobaya Setelah Pemberian Kombinasi Ellagic Acid Dan Freeze Dried Bovine Bone Xenograft.”

Sehubungan dengan itu kami mohon yang bersangkutan diberikan ijin untuk melaksanakan penelitian di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.




Demikian atas perhatian dan kerjasamanya saudara, kami sampaikan terima kasih.


a.n Dekan
Wakil Dekan I














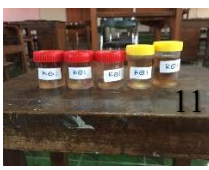





Amita Yulianti, drg., M.Kes
NIP. 19807091985032001












Lampiran 8 : Prosedur Penelitian

No	Tanggal	Deskripsi	Dokumentasi
1	20 Agustus 2020 Kamis	Persiapan alat perlakuan 1. tang modifikasi 2. needle holder 3. pinset kecil 4. scalpel 5. pisau bedah 6. neirbekken	
2	27 Agustus 2020 Kamis	Persiapan bahan perlakuan 1. PEG 2. bovine bone xenograft 3. Ellagic acid	
3	31 Agustus 2020 Senin	Persiapan berkas laik etik	
4	3 Sept 2020 Kamis	Persiapan hewan coba 1. kelompok perlakuan (P1) 2. kelompok perlakuan (P2) 3. kelompok kontrol positif (K+1) 4. kelompok kontrol positif (K+2) 5. kelompok kontrol negatif (K-1)	




		6. kelompok kontrol negatif (K-2)	
5	9 Sept 2020 Rabu	Sertifikat Laik Etik	
6	10 Sept 2020 Kamis	<p>Perlakuan hewan coba</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. anestesi ketamin + xylazine (hewan coba dibaringkan) 2. pemasangan kasa 3. pemisahan ligament periodontal (scalpel) 4. ekstraksi (tang modifikasi) 5. gigi dikeluarkan utuh sampai apical gigi 5. pemberian bahan peg, 6. pemberian bahan bone graft 7. pemberian bahan ellagic acid 8. suturing (needle holder dan jarum disposable) 9. setelah perlakuan 10. siap dikembalikan ke kandang 	

			  
7	17 sept 2020 Kamis	<p>Pemotongan jaringan Hari ke 7</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Persiapan alat 2. Anestesi ketamin + xylazine (hewan coba dibaringkan) 3. Pemotongan bagian leher belakang 4. Pemotongan bagian leher dari belakang ke depan 5. Pemotongan jaringan seluruh leher 6. Pemisahan jaringan dengan tulang 7. Pemotongan rahang bawah 8. Sediakan buffer formalin 10% 	     

		<p>9. Jaringan rahang bawah dibilas</p> <p>10. Masukkan dalam pot kecil</p> <p>11. Diberi label K(-)1</p> <p>12. Diberi label K(+)-1</p> <p>13. Diberi label P1</p> <p>14. Dimasukkan dalam tas</p>	 <p>7</p>  <p>9</p>  <p>11</p>  <p>13</p>	 <p>8</p>  <p>10</p>  <p>12</p>  <p>14</p>
--	--	---	--	---

8	24 sept 2020 Kamis	<p>Pemotongan jaringan Hari ke 14</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Persiapan alat 2. Anestesi ketamin + xylazine (hewan coba dibaringkan) 3. Pemotongan bagian leher belakang 4. Pemotongan bagian leher dari belang ke depan 5. Pemotongan jaringan seluruh leher 6. Pemisahan jaringan dengan tulang 7. Pemotongan rahang bawah 8. Sediakan buffer formalin 10% 9. Jaringan rahang bawah dibilas 10. Masukkan dalam pot kecil 11. Diberi label K(-)2 12. Diberi label K(+)2 13. Diberi label P2 14. Dimasukkan dalam tas 	     	     
---	--------------------------	--	--	--

			 
9	25 Sept 2020 Jumat	<ol style="list-style-type: none"> 1. Jaringan dibersihkan 2. Pemisahan jaringan tampak sagital 3. Jaringan pada soket setelah di buka 4. Jaringan yang sudah dipisahkan 5. Jaringan siap dimasukkan ke dalam pot 6. Jaringan dimasukkan dalam EDTA 7. Bahan baku EDTA 	      
10	23 Nov 2020 Senin	Jaringan belum lunak pada 5 kelompok (kelompok K-1 yang sudah lunak)	

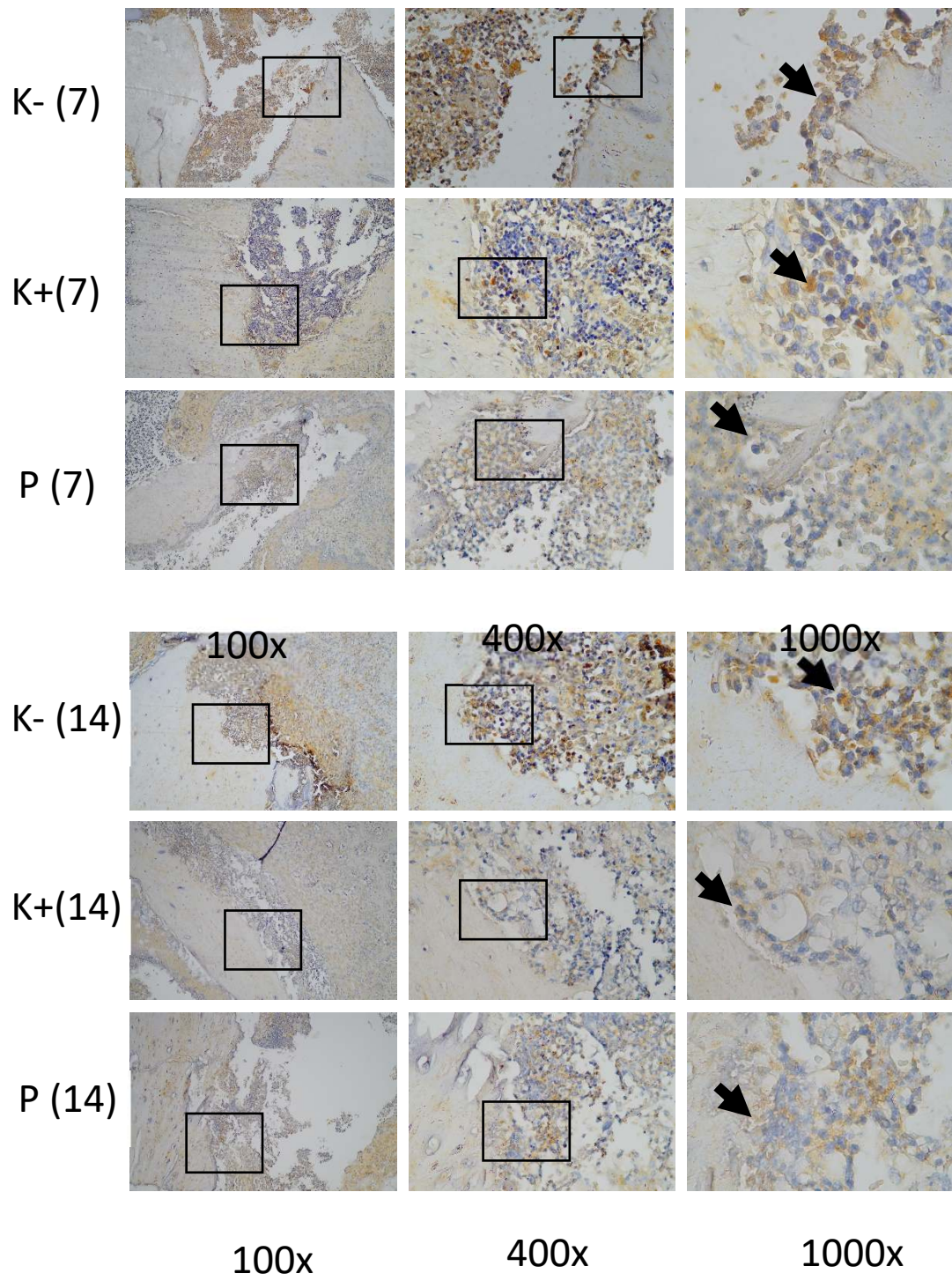
11	8 Des 2020 Selasa	Jaringan lunak pada 5 kelompok (kelompok P2 yang belum lunak)	
12	22 Des 2020 Selasa	<ol style="list-style-type: none"> 1. Trial jaringan Kelompok P2 Kelompok K-2 Kelompok K+2 2. Trial jaringan Kelompok P1 Kelompok K-1 Kelompok K+2 3. Prosesing 	
13	30 Des 2020 Rabu	<ol style="list-style-type: none"> 1. Pengecatan pada HE Kelompok P2 Kelompok K-2 Kelompok K+2 2. Pengecatan pada HE Kelompok P1 Kelompok K-1 Kelompok K+2 3. Terlihat bentukan soket pada mikroskop 	

<p>14</p>	<p>1 Jan 2021 Jumat</p>	<p>Kampus FKG Unair Lockdown mulai senin tgl 4 jan-17 jan 2021</p>	 <p>KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA Kampus C Mahkota Surabaya 60111 Telp. (031) 594100, 594101, Fax (031) 594121 Laman: http://www.uin-sura.ac.id / e-mail: info@uain-sura.ac.id</p> <p>No. : 157/UNSKP/2021 Tgl. : 2 Januari 2021 Lampiran : 1 (satu) Lembar Perihal : Penerapan dan Penanganan Covid-19</p> <p>Kepada Yang terhormat : (Dua) Lembaga : Universitas Airlangga Surabaya</p> <p>Menindaklanjuti surat kami nomor : 2233/UNSKP/2021 perihal seperti yang tertera pada pokok surat serta adanya perkembangan penanganan kasus Covid-19 baik secara regional maupun nasional, diperlukan langkah-langkah strategis guna mencegah dan menangani kasus tersebut agar tidak semakin meluas. Adapun langkah-langkah yang perlu dilakukan adalah sebagai berikut :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Seluruh pegawai melakukan tugas kelurahan dan rumah (WPH) mulai tanggal 4 s.d 17 Januari 2021, sesuai yang ditetapkan oleh prosedur Fakultas/Dan dan mendapatkan persetujuan dari Direktur Senter Ilmu-Manusia; 2. Pegawai yang melakukan tugas kelurahan di kantor (WPH) harus selalu yang dibuktikan dengan hasil tes SWAB PCR negatif maksimal H-3; 3. Semua pegawai harus mematuhi protokol kesehatan baik ketika di kantor maupun di luar kampus; 4. Selama masa tersebut, pegawai dilarang bepergian ke luar kota kecuali ada keperluan yang sangat penting dan atas izin dari Direktur Senter Ilmu-Manusia. Apabila diberikan izin pegawai yang bersangkutan akan diberikan surat kelulusan khusus; 5. Semua orang yang tidak bisa menunjukkan hasil tes SWAB PCR negatif maksimal H-3, dilarang masuk lingkungan kampus; 6. Surat edaran ini ini berlaku sejak tanggal 4 s.d 17 Januari 2021. <p>Demikian, atas perhatiannya kami sampaikan terima kasih.</p> <p>Dr. Ratu Ketua Senter II</p>  <p>Dr. Ratu Ketua Senter II, M.S., M.Pd. NIP. 197008011981001</p> <p>Terselamat Yth. - Kepala Uin - Wakil Kepala AMM - Wakil Kepala KICDI - Wakil Kepala IRI</p>
<p>15</p>	<p>20 Jan 20201 Rabu</p>	<p>Jaringan sudah lunak 1. Kelompok P1 2. Kelompok K+1 3. Kelompok K-1 4. Kelompok P2 5. Kelompok K+2 6. Kelompok K-2</p>	 <p>1 P1.4 P1.3 P1.2</p> <p>2 K+1.4 K+1.3 K+1.2</p> <p>3 K-1.4 K-1.3 K-1.2</p> <p>4 P2.4 P2.3 P2.2</p> <p>5 K+2.4 K+2.3 K+2.2</p> <p>6 K-1.4 K-1.3 K-1.2</p>

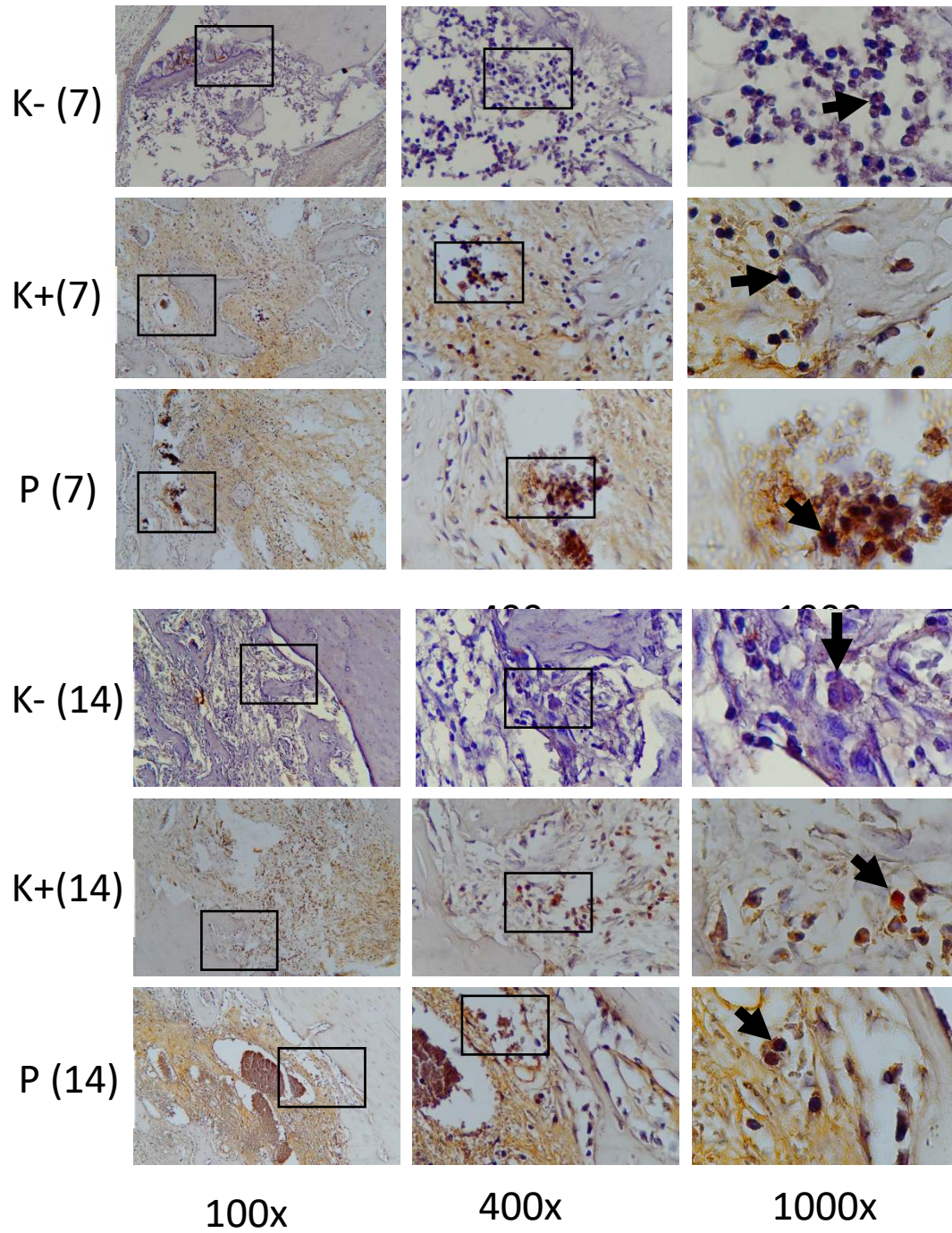
16	26 Jan 2021 Selasa	Potongan di masukkan dalam preparat	
17	1 Feb 2021 Senin	<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparat pada hot plate 2. Mikrotom 3. Water bath 	
18	8 Feb 2021 Senin	<p>Preparat IHC siap dibawa ke Universitas Brawijaya Malang</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kelompok P1 2. Kelompok K+1 3. Kelompok K-1 4. Kelompok P2 5. Kelompok K+2 6. Kelompok K-2 	

			
19	9 Feb 2021 Selasa	<p>Preparat HE siap dibawa ke Universitas Brawijaya Malang</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kelompok perlakuan 2. Kelompok kontrol 	

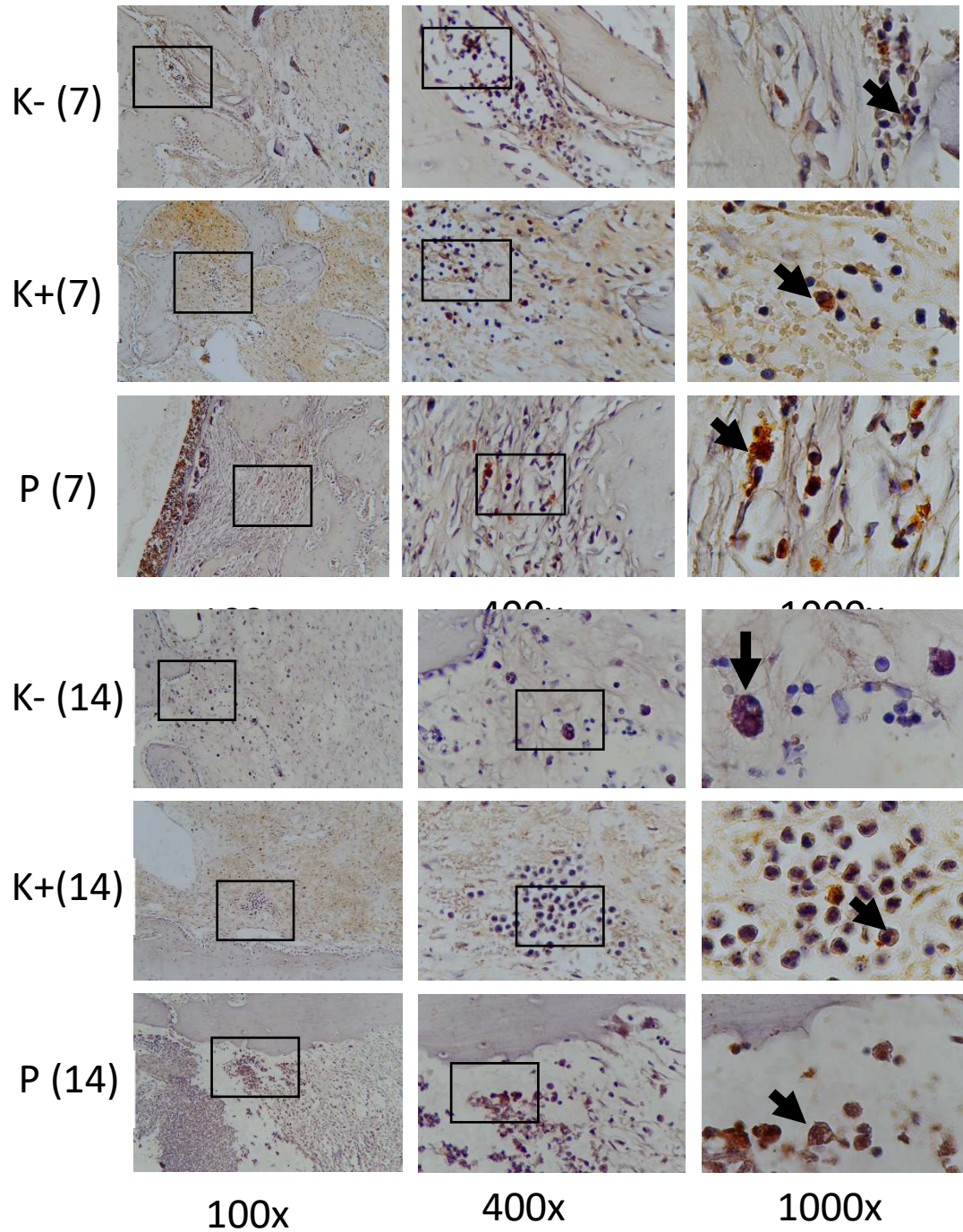
Lampiran 9 : Hasil pemeriksaan IHC TNF-a pembesaran 100x, 400x, 1000x



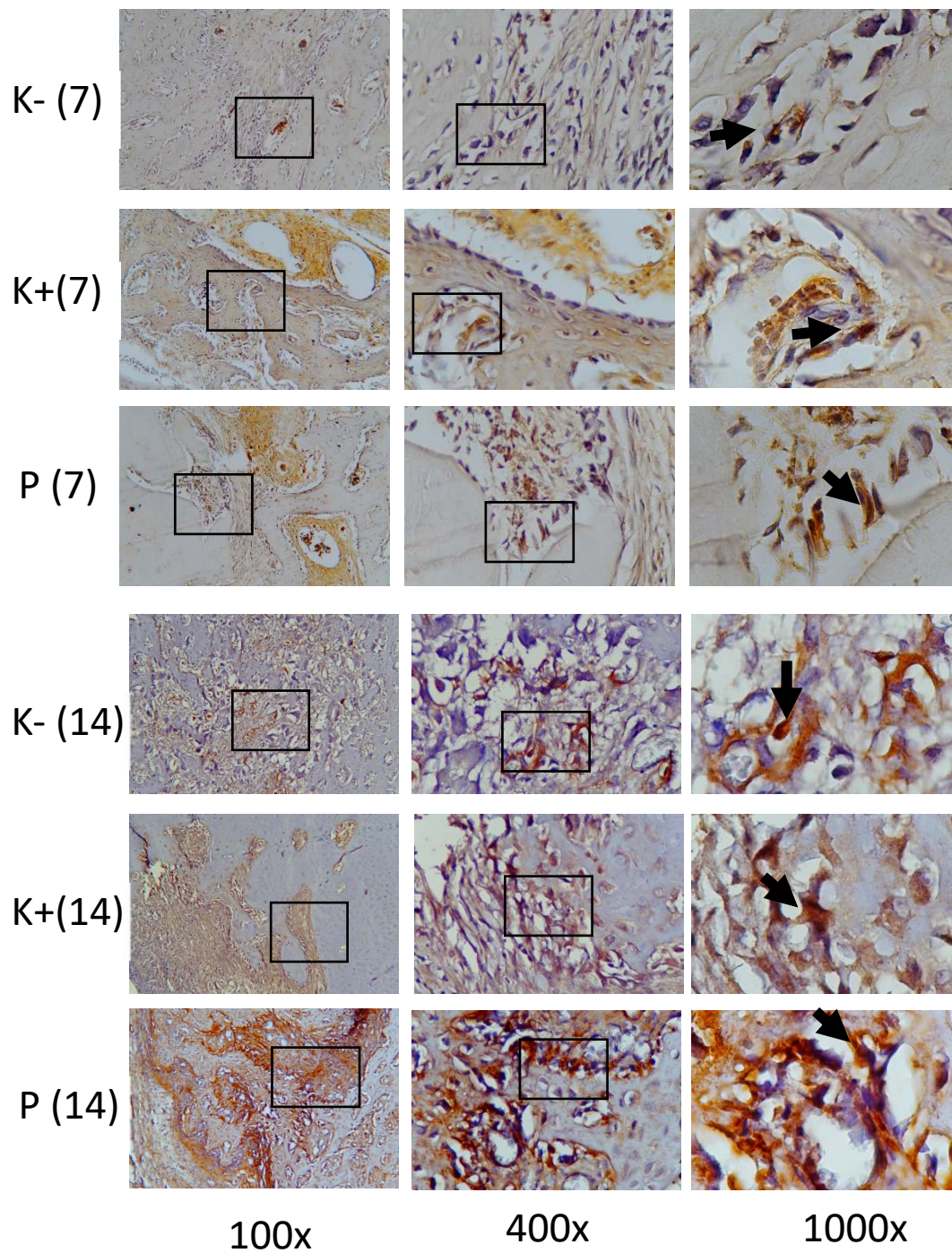
Lampiran 10 : Hasil pemeriksaan IHC IL-10 pembesaran 100x, 400x, 1000x



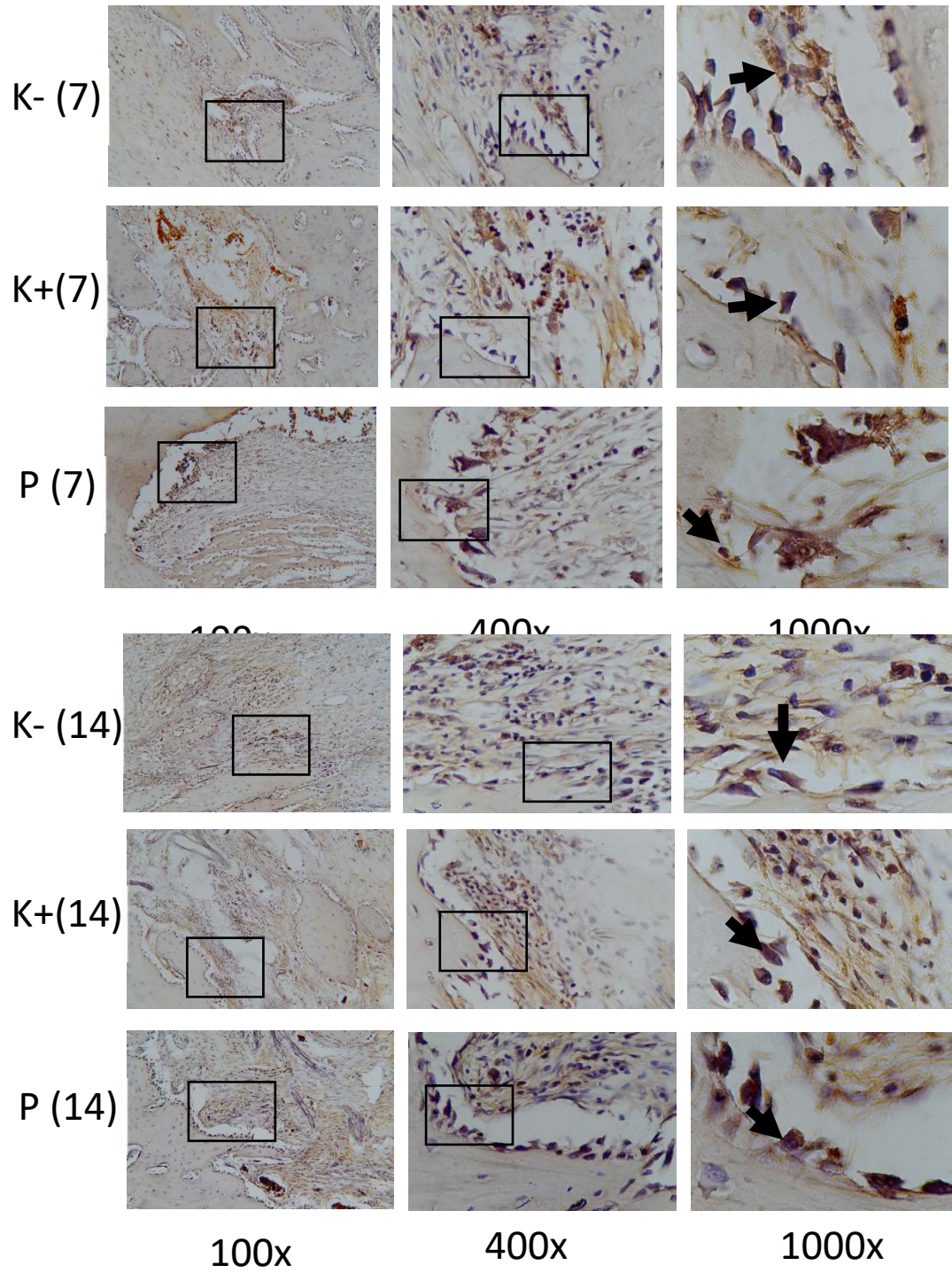
Lampiran 11 : Hasil pemeriksaan IHC BMP-2 pembesaran 100x, 400x, 1000x

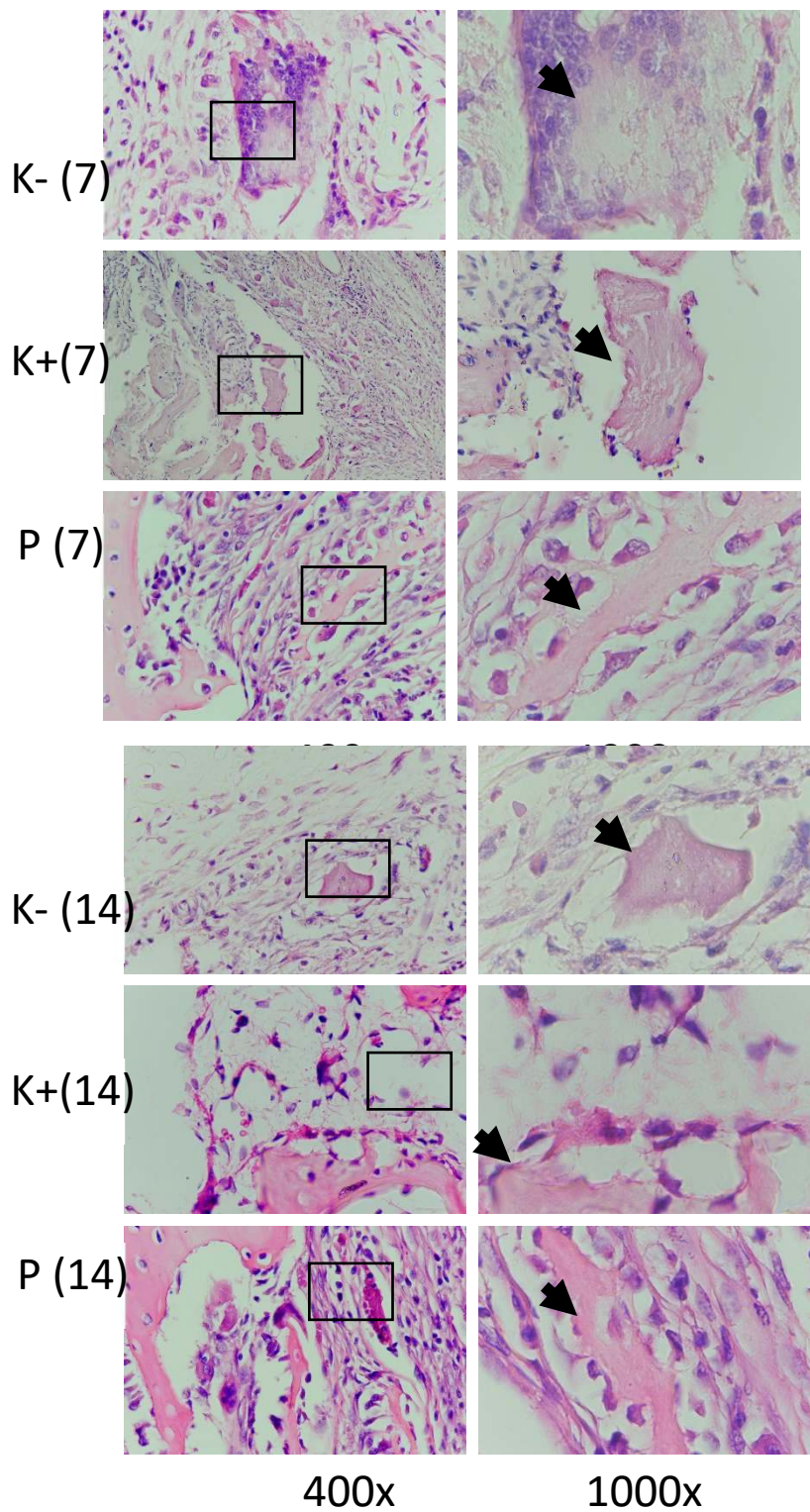


Lampiran 12 : Hasil pemeriksaan IHC ALP pembesaran 100x, 400x, 1000x



Lampiran 13 : Hasil pemeriksaan IHC OCN pembesaran 100x, 400x, 1000x



Lampiran 14 : Hasil pemeriksaan HE *Woven bone* pembesaran 400x, 1000x

Lampiran 15 : Analisis deskriptif TNF- α **Case Processing Summary**

	TNFa	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
NilaiTNFa	kontrol_PEG_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	kontrol_PEG_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Descriptives

	TNFa		Statistic	Std. Error	
NilaiTNFa	kontrol_PEG_7	Mean	11.6667	1.08525	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	8.8769	
			Upper Bound	14.4564	
		5% Trimmed Mean		11.6296	
		Median		11.5000	
		Variance		7.067	
		Std. Deviation		2.65832	
		Minimum		9.00	
		Maximum		15.00	
		Range		6.00	
		Interquartile Range		5.25	
		Skewness		.153	.845
		Kurtosis		-2.534	1.741
		BBX_7		Mean	7.8333
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			4.4872	
	Upper Bound			11.1795	
5% Trimmed Mean				7.7593	
Median				8.0000	
Variance				10.167	
Std. Deviation				3.18852	

	Minimum		4.00	
	Maximum		13.00	
	Range		9.00	
	Interquartile Range		5.25	
	Skewness		.559	.845
	Kurtosis		.487	1.741
EA+BBX_7	Mean		7.1667	.94575
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	4.7355	
	Mean	Upper Bound	9.5978	
	5% Trimmed Mean		7.1296	
	Median		7.0000	
	Variance		5.367	
	Std. Deviation		2.31661	
	Minimum		4.00	
	Maximum		11.00	
	Range		7.00	
	Interquartile Range		3.25	
	Skewness		.568	.845
	Kurtosis		1.499	1.741
kontrol_PEG_14	Mean		12.1667	.79232
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	10.1299	
	Mean	Upper Bound	14.2034	
	5% Trimmed Mean		12.1296	
	Median		12.5000	
	Variance		3.767	
	Std. Deviation		1.94079	
	Minimum		10.00	
	Maximum		15.00	
	Range		5.00	
	Interquartile Range		3.50	
	Skewness		.146	.845
	Kurtosis		-.848	1.741
BBX_14	Mean		6.8333	.60093
		Lower Bound	5.2886	

	95% Confidence Interval for	Upper Bound	8.3781	
	Mean			
	5% Trimmed Mean		6.8148	
	Median		6.5000	
	Variance		2.167	
	Std. Deviation		1.47196	
	Minimum		5.00	
	Maximum		9.00	
	Range		4.00	
	Interquartile Range		2.50	
	Skewness		.418	.845
	Kurtosis		-.859	1.741
EA+BBX_14	Mean		5.8333	1.10805
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	2.9850	
	Mean	Upper Bound	8.6817	
	5% Trimmed Mean		5.8148	
	Median		5.5000	
	Variance		7.367	
	Std. Deviation		2.71416	
	Minimum		3.00	
	Maximum		9.00	
	Range		6.00	
	Interquartile Range		6.00	
	Skewness		.262	.845
	Kurtosis		-1.987	1.741

Lampiran 16 : Analisis deskriptif IL-10

Case Processing Summary

		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
NilaiIL10	kontrol_PEG_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	kontrol_PEG_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Descriptives

				Statistic	Std. Error
NilaiIL10	kontrol_PEG_7	Mean		3.8333	.60093
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.2886	
			Upper Bound	5.3781	
		5% Trimmed Mean		3.8148	
		Median		3.5000	
		Variance		2.167	
		Std. Deviation		1.47196	
		Minimum		2.00	
		Maximum		6.00	
		Range		4.00	
		Interquartile Range		2.50	
		Skewness		.418	.845
		Kurtosis		-.859	1.741
		BBX_7	Mean		9.8333
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound		7.4022		
	Upper Bound		12.2645		
5% Trimmed Mean			9.8148		
Median			9.5000		

	Variance		5.367	
	Std. Deviation		2.31661	
	Minimum		7.00	
	Maximum		13.00	
	Range		6.00	
	Interquartile Range		4.50	
	Skewness		.300	.845
	Kurtosis		-1.418	1.741
EA+BBX_7	Mean		9.3333	1.05409
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	6.6237	
	Mean	Upper Bound	12.0430	
	5% Trimmed Mean		9.3148	
	Median		9.5000	
	Variance		6.667	
	Std. Deviation		2.58199	
	Minimum		6.00	
	Maximum		13.00	
	Range		7.00	
	Interquartile Range		4.75	
	Skewness		.077	.845
	Kurtosis		-.867	1.741
kontrol_PEG_14	Mean		6.6667	.76012
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	4.7127	
	Mean	Upper Bound	8.6206	
	5% Trimmed Mean		6.6852	
	Median		7.0000	
	Variance		3.467	
	Std. Deviation		1.86190	
	Minimum		4.00	
	Maximum		9.00	
	Range		5.00	
	Interquartile Range		3.50	
	Skewness		-.392	.845
	Kurtosis		-.943	1.741

BBX_14	Mean		13.5000	1.23153
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	10.3343	
		Upper Bound	16.6657	
	5% Trimmed Mean		13.5000	
	Median		14.0000	
	Variance		9.100	
	Std. Deviation		3.01662	
	Minimum		10.00	
	Maximum		17.00	
	Range		7.00	
	Interquartile Range		6.25	
	Skewness		-.262	.845
	Kurtosis		-2.071	1.741
	EA+BBX_14	Mean		14.3333
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	11.4657	
		Upper Bound	17.2009	
5% Trimmed Mean			14.2593	
Median			14.0000	
Variance			7.467	
Std. Deviation			2.73252	
Minimum			11.00	
Maximum			19.00	
Range			8.00	
Interquartile Range			3.50	
Skewness			.889	.845
Kurtosis			1.339	1.741

Lampiran 17 : Analisis deskriptif BMP-2

Case Processing Summary

	BMP2	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
NilaiBMP2	kontrol_PEG_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	kontrol_PEG_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Descriptives

	BMP2		Statistic	Std. Error	
NilaiBMP2	kontrol_PEG_7	Mean	5.3333	1.14504	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.3899	
			Upper Bound	8.2767	
		5% Trimmed Mean		5.3148	
		Median		5.0000	
		Variance		7.867	
		Std. Deviation		2.80476	
		Minimum		2.00	
		Maximum		9.00	
		Range		7.00	
		Interquartile Range		5.50	
		Skewness		.224	.845
		Kurtosis		-1.864	1.741
		BBX_7		Mean	9.6667
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			7.8289	
	Upper Bound			11.5044	
5% Trimmed Mean				9.7407	
Median				10.5000	
Variance				3.067	

	Std. Deviation		1.75119	
	Minimum		7.00	
	Maximum		11.00	
	Range		4.00	
	Interquartile Range		3.25	
	Skewness		-.919	.845
	Kurtosis		-1.205	1.741
EA+BBX_7	Mean		12.3333	1.05409
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	9.6237	
	Mean	Upper Bound	15.0430	
	5% Trimmed Mean		12.2593	
	Median		11.5000	
	Variance		6.667	
	Std. Deviation		2.58199	
	Minimum		10.00	
	Maximum		16.00	
	Range		6.00	
	Interquartile Range		5.25	
	Skewness		.705	.845
	Kurtosis		-1.623	1.741
kontrol_PEG_14	Mean		4.8333	.87242
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	2.5907	
	Mean	Upper Bound	7.0760	
	5% Trimmed Mean		4.8148	
	Median		5.0000	
	Variance		4.567	
	Std. Deviation		2.13698	
	Minimum		2.00	
	Maximum		8.00	
	Range		6.00	
	Interquartile Range		3.75	
	Skewness		.137	.845
	Kurtosis		-.270	1.741
BBX_14	Mean		12.5000	1.25831

	95% Confidence Interval for	Lower Bound	9.2654	
	Mean	Upper Bound	15.7346	
	5% Trimmed Mean		12.4444	
	Median		12.0000	
	Variance		9.500	
	Std. Deviation		3.08221	
	Minimum		9.00	
	Maximum		17.00	
	Range		8.00	
	Interquartile Range		5.75	
	Skewness		.461	.845
	Kurtosis		-1.260	1.741
EA+BBX_14	Mean		13.1667	1.13774
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	10.2420	
	Mean	Upper Bound	16.0913	
	5% Trimmed Mean		13.0741	
	Median		13.0000	
	Variance		7.767	
	Std. Deviation		2.78687	
	Minimum		10.00	
	Maximum		18.00	
	Range		8.00	
	Interquartile Range		4.25	
	Skewness		.992	.845
	Kurtosis		1.511	1.741

Lampiran 18 : Analisis deskriptif *Alkaline Phospatase***Case Processing Summary**

	ALP	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
NilaiALP	kontrol_PEG_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	kontrol_PEG_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Descriptives

	ALP		Statistic	Std. Error	
NilaiALP	kontrol_PEG_7	Mean	2.6667	.55777	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.2329	
			Upper Bound	4.1005	
		5% Trimmed Mean		2.6296	
		Median		2.5000	
		Variance		1.867	
		Std. Deviation		1.36626	
		Minimum		1.00	
		Maximum		5.00	
		Range		4.00	
		Interquartile Range		1.75	
		Skewness		.889	.845
		Kurtosis		1.339	1.741
BBX_7		Mean	9.0000	.96609	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6.5166	
			Upper Bound	11.4834	
		5% Trimmed Mean		9.0000	
		Median		9.0000	
		Variance		5.600	

	Std. Deviation		2.36643	
	Minimum		6.00	
	Maximum		12.00	
	Range		6.00	
	Interquartile Range		4.50	
	Skewness		.000	.845
	Kurtosis		-1.875	1.741
EA+BBX_7	Mean		8.6667	.95452
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	6.2130	
	Mean	Upper Bound	11.1203	
	5% Trimmed Mean		8.7407	
	Median		9.0000	
	Variance		5.467	
	Std. Deviation		2.33809	
	Minimum		5.00	
	Maximum		11.00	
	Range		6.00	
	Interquartile Range		4.50	
	Skewness		-.668	.845
	Kurtosis		-.446	1.741
kontrol_PEG_14	Mean		4.5000	.56273
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	3.0535	
	Mean	Upper Bound	5.9465	
	5% Trimmed Mean		4.5000	
	Median		4.5000	
	Variance		1.900	
	Std. Deviation		1.37840	
	Minimum		3.00	
	Maximum		6.00	
	Range		3.00	
	Interquartile Range		3.00	
	Skewness		.000	.845
	Kurtosis		-2.299	1.741
BBX_14	Mean		14.1667	1.13774

	95% Confidence Interval for	Lower Bound	11.2420	
	Mean	Upper Bound	17.0913	
	5% Trimmed Mean		14.2407	
	Median		14.5000	
	Variance		7.767	
	Std. Deviation		2.78687	
	Minimum		10.00	
	Maximum		17.00	
	Range		7.00	
	Interquartile Range		5.50	
	Skewness		-.505	.845
	Kurtosis		-.995	1.741
EA+BBX_14	Mean		14.1667	1.10805
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	11.3183	
	Mean	Upper Bound	17.0150	
	5% Trimmed Mean		14.2407	
	Median		14.0000	
	Variance		7.367	
	Std. Deviation		2.71416	
	Minimum		10.00	
	Maximum		17.00	
	Range		7.00	
	Interquartile Range		4.75	
	Skewness		-.442	.845
	Kurtosis		-.646	1.741

Lampiran 19 : Analisis deskriptif *Osteocalcin***Case Processing Summary**

	OCN	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
NilaiOCN	kontrol_PEG_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	kontrol_PEG_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Descriptives

	OCN		Statistic	Std. Error	
NilaiOCN	kontrol_PEG_7	Mean	5.0000	.36515	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.0614	
			Upper Bound	5.9386	
		5% Trimmed Mean		5.0000	
		Median		5.0000	
		Variance		.800	
		Std. Deviation		.89443	
		Minimum		4.00	
		Maximum		6.00	
		Range		2.00	
		Interquartile Range		2.00	
		Skewness		.000	.845
		Kurtosis		-1.875	1.741
		BBX_7		Mean	9.5000
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			7.6523	
	Upper Bound			11.3477	
5% Trimmed Mean				9.5000	
Median				9.0000	
Variance				3.100	

	Std. Deviation		1.76068	
	Minimum		7.00	
	Maximum		12.00	
	Range		5.00	
	Interquartile Range		2.75	
	Skewness		.165	.845
	Kurtosis		-.177	1.741
EA+BBX_7	Mean		11.6667	.66667
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	9.9529	
	Mean	Upper Bound	13.3804	
	5% Trimmed Mean		11.6296	
	Median		11.5000	
	Variance		2.667	
	Std. Deviation		1.63299	
	Minimum		10.00	
	Maximum		14.00	
	Range		4.00	
	Interquartile Range		3.25	
	Skewness		.383	.845
	Kurtosis		-1.481	1.741
kontrol_PEG_14	Mean		8.0000	.51640
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	6.6726	
	Mean	Upper Bound	9.3274	
	5% Trimmed Mean		8.0556	
	Median		8.5000	
	Variance		1.600	
	Std. Deviation		1.26491	
	Minimum		6.00	
	Maximum		9.00	
	Range		3.00	
	Interquartile Range		2.25	
	Skewness		-.889	.845
	Kurtosis		-.781	1.741
BBX_14	Mean		13.3333	.55777

	95% Confidence Interval for	Lower Bound	11.8995	
	Mean	Upper Bound	14.7671	
	5% Trimmed Mean		13.3704	
	Median		13.5000	
	Variance		1.867	
	Std. Deviation		1.36626	
	Minimum		11.00	
	Maximum		15.00	
	Range		4.00	
	Interquartile Range		1.75	
	Skewness		-.889	.845
	Kurtosis		1.339	1.741
EA+BBX_14	Mean		14.5000	.88506
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	12.2249	
	Mean	Upper Bound	16.7751	
	5% Trimmed Mean		14.5000	
	Median		14.0000	
	Variance		4.700	
	Std. Deviation		2.16795	
	Minimum		12.00	
	Maximum		17.00	
	Range		5.00	
	Interquartile Range		4.25	
	Skewness		.265	.845
	Kurtosis		-2.214	1.741

Lampiran 20 : Analisis deskriptif *Woven Bone***Case Processing Summary**

	WB	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
NilaiWB	kontrol_PEG_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_7	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	kontrol_PEG_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%
	EA+BBX_14	6	100.0%	0	0.0%	6	100.0%

Descriptives

	WB		Statistic	Std. Error	
NilaiWB	kontrol_PEG_7	Mean	58.5000	3.95601	
		95% Confidence Interval for	Lower Bound	48.3308	
		Mean	Upper Bound	68.6692	
		5% Trimmed Mean		58.0000	
		Median		57.0000	
		Variance		93.900	
		Std. Deviation		9.69020	
		Minimum		49.00	
		Maximum		77.00	
		Range		28.00	
		Interquartile Range		10.75	
		Skewness		1.745	.845
		Kurtosis		3.772	1.741
		BBX_7		Mean	39.8333
95% Confidence Interval for	Lower Bound			26.0955	
Mean	Upper Bound			53.5712	
5% Trimmed Mean				39.6481	
Median				36.0000	

	Variance		171.367	
	Std. Deviation		13.09071	
	Minimum		24.00	
	Maximum		59.00	
	Range		35.00	
	Interquartile Range		23.75	
	Skewness		.572	.845
	Kurtosis		-.913	1.741
EA+BBX_7	Mean		94.5000	6.21155
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	78.5327	
	Mean	Upper Bound	110.4673	
	5% Trimmed Mean		94.0556	
	Median		91.0000	
	Variance		231.500	
	Std. Deviation		15.21512	
	Minimum		79.00	
	Maximum		118.00	
	Range		39.00	
	Interquartile Range		26.25	
	Skewness		.662	.845
	Kurtosis		-.965	1.741
kontrol_PEG_14	Mean		72.8333	8.10932
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	51.9877	
	Mean	Upper Bound	93.6790	
	5% Trimmed Mean		73.0370	
	Median		75.5000	
	Variance		394.567	
	Std. Deviation		19.86370	
	Minimum		47.00	
	Maximum		95.00	
	Range		48.00	
	Interquartile Range		37.50	
	Skewness		-.229	.845
	Kurtosis		-2.248	1.741

BBX_14	Mean		109.0000	5.49545
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	94.8735	
		Upper Bound	123.1265	
	5% Trimmed Mean		109.3889	
	Median		109.5000	
	Variance		181.200	
	Std. Deviation		13.46105	
	Minimum		86.00	
	Maximum		125.00	
	Range		39.00	
	Interquartile Range		20.25	
	Skewness		-.877	.845
	Kurtosis		1.332	1.741
	EA+BBX_14	Mean		168.5000
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	142.9424	
		Upper Bound	194.0576	
5% Trimmed Mean			168.3889	
Median			164.5000	
Variance			593.100	
Std. Deviation			24.35364	
Minimum			135.00	
Maximum			204.00	
Range			69.00	
Interquartile Range			39.00	
Skewness			.197	.845
Kurtosis			-.327	1.741

Lampiran 21 : Hasil Uji Normalitas TNF- α

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	TNF α	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NilaiTNF α	kontrol_PEG_7	.235	6	.200*	.864	6	.204
	BBX_7	.191	6	.200*	.939	6	.653
	EA+BBX_7	.195	6	.200*	.955	6	.781
	kontrol_PEG_14	.201	6	.200*	.912	6	.452
	BBX_14	.214	6	.200*	.958	6	.804
	EA+BBX_14	.212	6	.200*	.861	6	.191

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

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 22 : Hasil Uji Normalitas IL-10

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	IL10	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NilaiIL10	kontrol_PEG_7	.214	6	.200*	.958	6	.804
	BBX_7	.159	6	.200*	.958	6	.801
	EA+BBX_7	.150	6	.200*	.979	6	.945
	kontrol_PEG_14	.238	6	.200*	.950	6	.737
	BBX_14	.210	6	.200*	.889	6	.315
	EA+BBX_14	.237	6	.200*	.927	6	.554

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

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 23 : Hasil Uji Normalitas BMP-2

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	BMP2	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NilaiBMP2	kontrol_PEG_7	.183	6	.200*	.940	6	.660
	BBX_7	.277	6	.168	.800	6	.059
	EA+BBX_7	.218	6	.200*	.859	6	.184
	kontrol_PEG_14	.198	6	.200*	.967	6	.875
	BBX_14	.187	6	.200*	.952	6	.755
	EA+BBX_14	.216	6	.200*	.923	6	.525

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

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 24 : Hasil Uji Normalitas *Alkaline Phospatase*

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	ALP	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NilaiALP	kontrol_PEG_7	.237	6	.200*	.927	6	.554
	BBX_7	.164	6	.200*	.950	6	.739
	EA+BBX_7	.223	6	.200*	.908	6	.421
	kontrol_PEG_14	.195	6	.200*	.861	6	.191
	BBX_14	.179	6	.200*	.925	6	.540
	EA+BBX_14	.185	6	.200*	.913	6	.459

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

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 25 : Hasil Uji Normalitas *Osteocalcin*

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	OCN	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NilaiOCN	kontrol_PEG_7	.202	6	.200*	.853	6	.167
	BBX_7	.278	6	.161	.920	6	.505
	EA+BBX_7	.180	6	.200*	.920	6	.505
	kontrol_PEG_14	.285	6	.138	.831	6	.110
	BBX_14	.237	6	.200*	.927	6	.554
	EA+BBX_14	.255	6	.200*	.867	6	.215

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

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 26 : Hasil Uji Normalitas *Woven Bone*

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	WB	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
NilaiWB	kontrol_PEG_7	.354	6	.018	.817	6	.083
	BBX_7	.282	6	.148	.923	6	.525
	EA+BBX_7	.255	6	.200*	.912	6	.448
	kontrol_PEG_14	.246	6	.200*	.905	6	.406
	BBX_14	.217	6	.200*	.946	6	.705
	EA+BBX_14	.182	6	.200*	.977	6	.936

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

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 27 : Hasil Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
NilaiTNFa	Based on Mean	.780	5	30	.572
	Based on Median	.706	5	30	.623
	Based on Median and with adjusted df	.706	5	19.771	.626
	Based on trimmed mean	.804	5	30	.556
NilaiIL10	Based on Mean	.880	5	30	.507
	Based on Median	.840	5	30	.532
	Based on Median and with adjusted df	.840	5	26.264	.534
	Based on trimmed mean	.881	5	30	.506
NilaiBMP2	Based on Mean	.617	5	30	.688
	Based on Median	.540	5	30	.745
	Based on Median and with adjusted df	.540	5	27.098	.745
	Based on trimmed mean	.610	5	30	.693
NilaiALP	Based on Mean	1.292	5	30	.294
	Based on Median	1.161	5	30	.351
	Based on Median and with adjusted df	1.161	5	22.288	.359
	Based on trimmed mean	1.267	5	30	.304
NilaiOCN	Based on Mean	1.648	5	30	.178
	Based on Median	1.128	5	30	.367
	Based on Median and with adjusted df	1.128	5	22.724	.374
	Based on trimmed mean	1.644	5	30	.179
NilaiWB	Based on Mean	2.003	5	30	.107
	Based on Median	1.769	5	30	.150
	Based on Median and with adjusted df	1.769	5	23.111	.159
	Based on trimmed mean	2.045	5	30	.101

Lampiran 28 : Hasil Uji One-Way Anova hari ke-7

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NilaiWB	Between Groups	9265.778	2	4632.889	27.978	.000
	Within Groups	2483.833	15	165.589		
	Total	11749.611	17			
NilaiTNFa	Between Groups	70.778	2	35.389	4.698	.026
	Within Groups	113.000	15	7.533		
	Total	183.778	17			
NilaiBMP2	Between Groups	149.778	2	74.889	12.765	.001
	Within Groups	88.000	15	5.867		
	Total	237.778	17			
NilaiOCN	Between Groups	138.778	2	69.389	31.701	.000
	Within Groups	32.833	15	2.189		
	Total	171.611	17			
NilaiIL10	Between Groups	133.000	2	66.500	14.049	.000
	Within Groups	71.000	15	4.733		
	Total	204.000	17			
NilaiALP	Between Groups	152.444	2	76.222	17.680	.000
	Within Groups	64.667	15	4.311		
	Total	217.111	17			

Lampiran 29 : Hasil Uji One-Way Anova hari ke-14

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NilaiWB	Between Groups	28000.778	2	14000.389	35.933	.000
	Within Groups	5844.333	15	389.622		
	Total	33845.111	17			
NilaiTNFa	Between Groups	139.111	2	69.556	15.689	.000
	Within Groups	66.500	15	4.433		
	Total	205.611	17			
NilaiBMP2	Between Groups	257.333	2	128.667	17.679	.000
	Within Groups	109.167	15	7.278		
	Total	366.500	17			
NilaiOCN	Between Groups	144.111	2	72.056	26.469	.000
	Within Groups	40.833	15	2.722		
	Total	184.944	17			
NilaiIL10	Between Groups	212.333	2	106.167	15.899	.000
	Within Groups	100.167	15	6.678		
	Total	312.500	17			
NilaiALP	Between Groups	373.778	2	186.889	32.916	.000
	Within Groups	85.167	15	5.678		
	Total	458.944	17			

Lampiran 30 : Hasil Uji LSD

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) WB	(J) WB	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
NilaiTNFa	kontrol_PEG_7	BBX_7	3.83333*	1.41225	.011	.9491	6.7175
		EA+BBX_7	4.50000*	1.41225	.003	1.6158	7.3842
		kontrol_PEG_14	-.50000	1.41225	.726	-3.3842	2.3842
		BBX_14	4.83333*	1.41225	.002	1.9491	7.7175
		EA+BBX_14	5.83333*	1.41225	.000	2.9491	8.7175
	BBX_7	kontrol_PEG_7	-3.83333*	1.41225	.011	-6.7175	-.9491
		EA+BBX_7	.66667	1.41225	.640	-2.2175	3.5509
		kontrol_PEG_14	-4.33333*	1.41225	.005	-7.2175	-1.4491
		BBX_14	1.00000	1.41225	.484	-1.8842	3.8842
		EA+BBX_14	2.00000	1.41225	.167	-.8842	4.8842
	EA+BBX_7	kontrol_PEG_7	-4.50000*	1.41225	.003	-7.3842	-1.6158
		BBX_7	-.66667	1.41225	.640	-3.5509	2.2175
		kontrol_PEG_14	-5.00000*	1.41225	.001	-7.8842	-2.1158
		BBX_14	.33333	1.41225	.815	-2.5509	3.2175
		EA+BBX_14	1.33333	1.41225	.353	-1.5509	4.2175
	kontrol_PEG_14	kontrol_PEG_7	.50000	1.41225	.726	-2.3842	3.3842
		BBX_7	4.33333*	1.41225	.005	1.4491	7.2175
		EA+BBX_7	5.00000*	1.41225	.001	2.1158	7.8842
		BBX_14	5.33333*	1.41225	.001	2.4491	8.2175
		EA+BBX_14	6.33333*	1.41225	.000	3.4491	9.2175
BBX_14	kontrol_PEG_7	-4.83333*	1.41225	.002	-7.7175	-1.9491	
	BBX_7	-1.00000	1.41225	.484	-3.8842	1.8842	
	EA+BBX_7	-.33333	1.41225	.815	-3.2175	2.5509	
	kontrol_PEG_14	-5.33333*	1.41225	.001	-8.2175	-2.4491	
	EA+BBX_14	1.00000	1.41225	.484	-1.8842	3.8842	
EA+BBX_14	kontrol_PEG_7	-5.83333*	1.41225	.000	-8.7175	-2.9491	
	BBX_7	-2.00000	1.41225	.167	-4.8842	.8842	

		EA+BBX_7	-1.33333	1.41225	.353	-4.2175	1.5509	
		kontrol_PEG_14	-6.33333*	1.41225	.000	-9.2175	-3.4491	
		BBX_14	-1.00000	1.41225	.484	-3.8842	1.8842	
NilaiIL10	kontrol_PEG_7	BBX_7	-6.00000*	1.37908	.000	-8.8164	-3.1836	
		EA+BBX_7	-5.50000*	1.37908	.000	-8.3164	-2.6836	
		kontrol_PEG_14	-2.83333*	1.37908	.049	-5.6498	-.0169	
			BBX_14	-9.66667*	1.37908	.000	-12.4831	-6.8502
			EA+BBX_14	-10.50000*	1.37908	.000	-13.3164	-7.6836
	BBX_7	kontrol_PEG_7	6.00000*	1.37908	.000	3.1836	8.8164	
		EA+BBX_7	.50000	1.37908	.719	-2.3164	3.3164	
		kontrol_PEG_14	3.16667*	1.37908	.029	.3502	5.9831	
		BBX_14	-3.66667*	1.37908	.012	-6.4831	-.8502	
			EA+BBX_14	-4.50000*	1.37908	.003	-7.3164	-1.6836
	EA+BBX_7	kontrol_PEG_7	5.50000*	1.37908	.000	2.6836	8.3164	
		BBX_7	-.50000	1.37908	.719	-3.3164	2.3164	
		kontrol_PEG_14	2.66667	1.37908	.063	-.1498	5.4831	
		BBX_14	-4.16667*	1.37908	.005	-6.9831	-1.3502	
		EA+BBX_14	-5.00000*	1.37908	.001	-7.8164	-2.1836	
	kontrol_PEG_14	kontrol_PEG_7	2.83333*	1.37908	.049	.0169	5.6498	
		BBX_7	-3.16667*	1.37908	.029	-5.9831	-.3502	
		EA+BBX_7	-2.66667	1.37908	.063	-5.4831	.1498	
		BBX_14	-6.83333*	1.37908	.000	-9.6498	-4.0169	
		EA+BBX_14	-7.66667*	1.37908	.000	-10.4831	-4.8502	
	BBX_14	kontrol_PEG_7	9.66667*	1.37908	.000	6.8502	12.4831	
		BBX_7	3.66667*	1.37908	.012	.8502	6.4831	
		EA+BBX_7	4.16667*	1.37908	.005	1.3502	6.9831	
		kontrol_PEG_14	6.83333*	1.37908	.000	4.0169	9.6498	
EA+BBX_14		-.83333	1.37908	.550	-3.6498	1.9831		
EA+BBX_14	kontrol_PEG_7	10.50000*	1.37908	.000	7.6836	13.3164		
	BBX_7	4.50000*	1.37908	.003	1.6836	7.3164		
	EA+BBX_7	5.00000*	1.37908	.001	2.1836	7.8164		
	kontrol_PEG_14	7.66667*	1.37908	.000	4.8502	10.4831		
	BBX_14	.83333	1.37908	.550	-1.9831	3.6498		
NilaiBMP2	kontrol_PEG_7	BBX_7	-4.33333*	1.48012	.006	-7.3561	-1.3105	

		EA+BBX_7	-7.00000*	1.48012	.000	-10.0228	-3.9772
		kontrol_PEG_14	.50000	1.48012	.738	-2.5228	3.5228
		BBX_14	-7.16667*	1.48012	.000	-10.1895	-4.1439
		EA+BBX_14	-7.83333*	1.48012	.000	-10.8561	-4.8105
BBX_7		kontrol_PEG_7	4.33333*	1.48012	.006	1.3105	7.3561
		EA+BBX_7	-2.66667	1.48012	.082	-5.6895	.3561
		kontrol_PEG_14	4.83333*	1.48012	.003	1.8105	7.8561
		BBX_14	-2.83333	1.48012	.065	-5.8561	.1895
		EA+BBX_14	-3.50000*	1.48012	.025	-6.5228	-4.772
EA+BBX_7		kontrol_PEG_7	7.00000*	1.48012	.000	3.9772	10.0228
		BBX_7	2.66667	1.48012	.082	-.3561	5.6895
		kontrol_PEG_14	7.50000*	1.48012	.000	4.4772	10.5228
		BBX_14	-.16667	1.48012	.911	-3.1895	2.8561
		EA+BBX_14	-.83333	1.48012	.578	-3.8561	2.1895
kontrol_PEG_14		kontrol_PEG_7	-.50000	1.48012	.738	-3.5228	2.5228
		BBX_7	-4.83333*	1.48012	.003	-7.8561	-1.8105
		EA+BBX_7	-7.50000*	1.48012	.000	-10.5228	-4.4772
		BBX_14	-7.66667*	1.48012	.000	-10.6895	-4.6439
		EA+BBX_14	-8.33333*	1.48012	.000	-11.3561	-5.3105
BBX_14		kontrol_PEG_7	7.16667*	1.48012	.000	4.1439	10.1895
		BBX_7	2.83333	1.48012	.065	-.1895	5.8561
		EA+BBX_7	.16667	1.48012	.911	-2.8561	3.1895
		kontrol_PEG_14	7.66667*	1.48012	.000	4.6439	10.6895
		EA+BBX_14	-.66667	1.48012	.656	-3.6895	2.3561
EA+BBX_14		kontrol_PEG_7	7.83333*	1.48012	.000	4.8105	10.8561
		BBX_7	3.50000*	1.48012	.025	.4772	6.5228
		EA+BBX_7	.83333	1.48012	.578	-2.1895	3.8561
		kontrol_PEG_14	8.33333*	1.48012	.000	5.3105	11.3561
		BBX_14	.66667	1.48012	.656	-2.3561	3.6895
NilaiALP	kontrol_PEG_7	BBX_7	-6.33333*	1.29028	.000	-8.9684	-3.6982
		EA+BBX_7	-6.00000*	1.29028	.000	-8.6351	-3.3649
		kontrol_PEG_14	-1.83333	1.29028	.166	-4.4684	.8018
		BBX_14	-11.50000*	1.29028	.000	-14.1351	-8.8649
		EA+BBX_14	-11.50000*	1.29028	.000	-14.1351	-8.8649

BBX_7	kontrol_PEG_7	6.33333*	1.29028	.000	3.6982	8.9684	
	EA+BBX_7	.33333	1.29028	.798	-2.3018	2.9684	
	kontrol_PEG_14	4.50000*	1.29028	.002	1.8649	7.1351	
	BBX_14	-5.16667*	1.29028	.000	-7.8018	-2.5316	
	EA+BBX_14	-5.16667*	1.29028	.000	-7.8018	-2.5316	
EA+BBX_7	kontrol_PEG_7	6.00000*	1.29028	.000	3.3649	8.6351	
	BBX_7	-.33333	1.29028	.798	-2.9684	2.3018	
	kontrol_PEG_14	4.16667*	1.29028	.003	1.5316	6.8018	
	BBX_14	-5.50000*	1.29028	.000	-8.1351	-2.8649	
	EA+BBX_14	-5.50000*	1.29028	.000	-8.1351	-2.8649	
kontrol_PEG_14	kontrol_PEG_7	1.83333	1.29028	.166	-.8018	4.4684	
	BBX_7	-4.50000*	1.29028	.002	-7.1351	-1.8649	
	EA+BBX_7	-4.16667*	1.29028	.003	-6.8018	-1.5316	
	BBX_14	-9.66667*	1.29028	.000	-12.3018	-7.0316	
	EA+BBX_14	-9.66667*	1.29028	.000	-12.3018	-7.0316	
BBX_14	kontrol_PEG_7	11.50000*	1.29028	.000	8.8649	14.1351	
	BBX_7	5.16667*	1.29028	.000	2.5316	7.8018	
	EA+BBX_7	5.50000*	1.29028	.000	2.8649	8.1351	
	kontrol_PEG_14	9.66667*	1.29028	.000	7.0316	12.3018	
	EA+BBX_14	.00000	1.29028	1.000	-2.6351	2.6351	
EA+BBX_14	kontrol_PEG_7	11.50000*	1.29028	.000	8.8649	14.1351	
	BBX_7	5.16667*	1.29028	.000	2.5316	7.8018	
	EA+BBX_7	5.50000*	1.29028	.000	2.8649	8.1351	
	kontrol_PEG_14	9.66667*	1.29028	.000	7.0316	12.3018	
	BBX_14	.00000	1.29028	1.000	-2.6351	2.6351	
NilaiOCN	kontrol_PEG_7	BBX_7	-4.50000*	.90472	.000	-6.3477	-2.6523
		EA+BBX_7	-6.66667*	.90472	.000	-8.5144	-4.8190
		kontrol_PEG_14	-3.00000*	.90472	.002	-4.8477	-1.1523
		BBX_14	-8.33333*	.90472	.000	-10.1810	-6.4856
		EA+BBX_14	-9.50000*	.90472	.000	-11.3477	-7.6523
	BBX_7	kontrol_PEG_7	4.50000*	.90472	.000	2.6523	6.3477
		EA+BBX_7	-2.16667*	.90472	.023	-4.0144	-.3190
		kontrol_PEG_14	1.50000	.90472	.108	-.3477	3.3477
		BBX_14	-3.83333*	.90472	.000	-5.6810	-1.9856

	EA+BBX_14	-5.00000*	.90472	.000	-6.8477	-3.1523	
EA+BBX_7	kontrol_PEG_7	6.66667*	.90472	.000	4.8190	8.5144	
	BBX_7	2.16667*	.90472	.023	.3190	4.0144	
	kontrol_PEG_14	3.66667*	.90472	.000	1.8190	5.5144	
	BBX_14	-1.66667	.90472	.075	-3.5144	.1810	
	EA+BBX_14	-2.83333*	.90472	.004	-4.6810	-.9856	
kontrol_PEG_14	kontrol_PEG_7	3.00000*	.90472	.002	1.1523	4.8477	
	BBX_7	-1.50000	.90472	.108	-3.3477	.3477	
	EA+BBX_7	-3.66667*	.90472	.000	-5.5144	-1.8190	
	BBX_14	-5.33333*	.90472	.000	-7.1810	-3.4856	
	EA+BBX_14	-6.50000*	.90472	.000	-8.3477	-4.6523	
BBX_14	kontrol_PEG_7	8.33333*	.90472	.000	6.4856	10.1810	
	BBX_7	3.83333*	.90472	.000	1.9856	5.6810	
	EA+BBX_7	1.66667	.90472	.075	-.1810	3.5144	
	kontrol_PEG_14	5.33333*	.90472	.000	3.4856	7.1810	
	EA+BBX_14	-1.16667	.90472	.207	-3.0144	.6810	
EA+BBX_14	kontrol_PEG_7	9.50000*	.90472	.000	7.6523	11.3477	
	BBX_7	5.00000*	.90472	.000	3.1523	6.8477	
	EA+BBX_7	2.83333*	.90472	.004	.9856	4.6810	
	kontrol_PEG_14	6.50000*	.90472	.000	4.6523	8.3477	
	BBX_14	1.16667	.90472	.207	-.6810	3.0144	
NilaiWB	kontrol_PEG_7	BBX_7	18.66667	9.61952	.062	-.9790	38.3123
		EA+BBX_7	-36.00000*	9.61952	.001	-55.6457	-16.3543
		kontrol_PEG_14	-14.33333	9.61952	.147	-33.9790	5.3123
		BBX_14	-50.50000*	9.61952	.000	-70.1457	-30.8543
		EA+BBX_14	-110.00000*	9.61952	.000	-129.6457	-90.3543
	BBX_7	kontrol_PEG_7	-18.66667	9.61952	.062	-38.3123	.9790
		EA+BBX_7	-54.66667*	9.61952	.000	-74.3123	-35.0210
		kontrol_PEG_14	-33.00000*	9.61952	.002	-52.6457	-13.3543
		BBX_14	-69.16667*	9.61952	.000	-88.8123	-49.5210
		EA+BBX_14	-128.66667*	9.61952	.000	-148.3123	-109.0210
	EA+BBX_7	kontrol_PEG_7	36.00000*	9.61952	.001	16.3543	55.6457
		BBX_7	54.66667*	9.61952	.000	35.0210	74.3123
		kontrol_PEG_14	21.66667*	9.61952	.032	2.0210	41.3123

	BBX_14	-14.50000	9.61952	.142	-34.1457	5.1457
	EA+BBX_14	-74.00000*	9.61952	.000	-93.6457	-54.3543
kontrol_PEG_14	kontrol_PEG_7	14.33333	9.61952	.147	-5.3123	33.9790
	BBX_7	33.00000*	9.61952	.002	13.3543	52.6457
	EA+BBX_7	-21.66667*	9.61952	.032	-41.3123	-2.0210
BBX_14	BBX_14	-36.16667*	9.61952	.001	-55.8123	-16.5210
	EA+BBX_14	-95.66667*	9.61952	.000	-115.3123	-76.0210
	kontrol_PEG_7	50.50000*	9.61952	.000	30.8543	70.1457
BBX_14	BBX_7	69.16667*	9.61952	.000	49.5210	88.8123
	EA+BBX_7	14.50000	9.61952	.142	-5.1457	34.1457
	kontrol_PEG_14	36.16667*	9.61952	.001	16.5210	55.8123
EA+BBX_14	EA+BBX_14	-59.50000*	9.61952	.000	-79.1457	-39.8543
	kontrol_PEG_7	110.00000*	9.61952	.000	90.3543	129.6457
	BBX_7	128.66667*	9.61952	.000	109.0210	148.3123
EA+BBX_14	EA+BBX_7	74.00000*	9.61952	.000	54.3543	93.6457
	kontrol_PEG_14	95.66667*	9.61952	.000	76.0210	115.3123
	BBX_14	59.50000*	9.61952	.000	39.8543	79.1457

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

Lampiran 31 : Nilai Mean dan Standar Deviasi

WB		Report					
		NilaiTNFa	NilaiIL10	NilaiBMP2	NilaiALP	NilaiOCN	NilaiWB
kontrol_PEG_7	Mean	11.6667	3.8333	5.3333	2.6667	5.0000	58.5000
	Std. Deviation	2.65832	1.47196	2.80476	1.36626	.89443	9.69020
BBX_7	Mean	7.8333	9.8333	9.6667	9.0000	9.5000	39.8333
	Std. Deviation	3.18852	2.31661	1.75119	2.36643	1.76068	13.09071
EA+BBX_7	Mean	7.1667	9.3333	12.3333	8.6667	11.6667	94.5000
	Std. Deviation	2.31661	2.58199	2.58199	2.33809	1.63299	15.21512
kontrol_PEG_14	Mean	12.1667	6.6667	4.8333	4.5000	8.0000	72.8333
	Std. Deviation	1.94079	1.86190	2.13698	1.37840	1.26491	19.86370
BBX_14	Mean	6.8333	13.5000	12.5000	14.1667	13.3333	109.0000
	Std. Deviation	1.47196	3.01662	3.08221	2.78687	1.36626	13.46105
EA+BBX_14	Mean	5.8333	14.3333	13.1667	14.1667	14.5000	168.5000
	Std. Deviation	2.71416	2.73252	2.78687	2.71416	2.16795	24.35364
Total	Mean	8.5833	9.5833	9.6389	8.8611	10.3333	90.5278
	Std. Deviation	3.34984	4.30531	4.18946	4.87649	3.58569	44.84926

Lampiran 32 : Regresi Linear TNF-a terhadap variabel bebas hari ke-7

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.621 ^a	.385	.303	2.74469	2.759

a. Predictors: (Constant), kontrol dibanding EA+BBX_7, kontrol dibanding BBX_7

b. Dependent Variable: NilaiTNFa

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	11.667	1.121		10.412	.000
	kontrol dibanding BBX_7	-3.833	1.585	-.566	-2.419	.029
	kontrol dibanding EA+BBX_7	-4.500	1.585	-.664	-2.840	.012

a. Dependent Variable: NilaiTNFa

Lampiran 33 : Regresi Linear BMP-2 terhadap variabel bebas hari ke-7

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.794 ^a	.630	.581	2.42212	1.878

a. Predictors: (Constant), kontrol dibanding EA+BBX_7, kontrol dibanding BBX_7

b. Dependent Variable: NilaiBMP2

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.333	.989		5.394	.000
	kontrol dibanding BBX_7	4.333	1.398	.562	3.099	.007
	kontrol dibanding EA+BBX_7	7.000	1.398	.908	5.006	.000

a. Dependent Variable: NilaiBMP2

Lampiran 34 : Regresi Linear IL-10 terhadap variabel bebas hari ke-7

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.807 ^a	.652	.606	2.17562	2.539

a. Predictors: (Constant), kontrol dibanding EA+BBX_7, kontrol dibanding BBX_7

b. Dependent Variable: NilaiIL10

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	3.833	.888		4.316	.001
	kontrol dibanding BBX_7	6.000	1.256	.840	4.777	.000
	kontrol dibanding EA+BBX_7	5.500	1.256	.770	4.379	.001

a. Dependent Variable: NilaiIL10

Lampiran 35 : Regresi Linear BMP-2 terhadap TNF- α , IL-10 pada hari ke-7

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.577 ^a	.333	.244	3.25155

a. Predictors: (Constant), NilaiIL10, NilaiTNFa

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	7.895	4.037		1.956	.069
	NilaiTNFa	-.259	.281	-.228	-.922	.371
	NilaiIL10	.459	.267	.425	1.722	.106

a. Dependent Variable: NilaiBMP2

Lampiran 36 : Regresi Linear ALP terhadap TNF- α , IL-10 dan BMP-2 pada hari ke-7**Model Summary^b**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.724 ^a	.524	.422	2.71725	1.411

a. Predictors: (Constant), NilaiBMP2, NilaiTNFa, NilaiIL10

b. Dependent Variable: NilaiALP

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.584	3.779		.154	.879
	NilaiTNFa	-.010	.241	-.009	-.042	.967
	NilaiIL10	.640	.244	.621	2.627	.020
	NilaiBMP2	.151	.216	.158	.700	.496

a. Dependent Variable: NilaiALP

Lampiran 37: Regresi Linear OCN terhadap TNF- α , IL-10 dan BMP-2 pada hari ke-7**Model Summary^b**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.838 ^a	.702	.638	1.91085	2.014

a. Predictors: (Constant), NilaiBMP2, NilaiTNFa, NilaiIL10

b. Dependent Variable: NilaiOCN

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	4.687	2.658		1.764	.100
	NilaiTNFa	-.210	.170	-.217	-1.238	.236
	NilaiIL10	.239	.171	.260	1.393	.185
	NilaiBMP2	.447	.152	.526	2.946	.011

a. Dependent Variable: NilaiOCN

Lampiran 38 : Regresi Linear woven bone terhadap ALP dan OCN pada hari ke-7

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.397 ^a	.158	.045	25.68642

a. Predictors: (Constant), NilaiOCN, NilaiALP

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	39.057	18.206		2.145	.049
	NilaiALP	-1.497	2.224	-.204	-.673	.511
	NilaiOCN	4.055	2.502	.490	1.621	.126

a. Dependent Variable: NilaiWB

Lampiran 39 : Regresi Linear TNF-a terhadap variabel bebas hari ke-14

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.823 ^a	.677	.633	2.10555	2.057

a. Predictors: (Constant), Kontrol dibernading EA + BBX_14, Kontrol dibernading BBX_14

b. Dependent Variable: NilaiTNFa

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	12.167	.860		14.154	.000
	Kontrol dibernading BBX_14	-5.333	1.216	-.744	-4.387	.001
	Kontrol dibernading EA + BBX_14	-6.333	1.216	-.883	-5.210	.000

a. Dependent Variable: NilaiTNFa

Lampiran 40 : Regresi Linear BMP-2 terhadap variabel bebas hari ke-14

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.838 ^a	.702	.662	2.69774	2.130

a. Predictors: (Constant), Kontrol dibnading EA + BBX_14, Kontrol dibnading BBX_14

b. Dependent Variable: NilaiBMP2

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	4.833	1.101		4.389	.001
	Kontrol dibnading BBX_14	7.667	1.558	.801	4.922	.000
	Kontrol dibnading EA + BBX_14	8.333	1.558	.871	5.350	.000

a. Dependent Variable: NilaiBMP2

Lampiran 41 : Regresi Linear IL-10 terhadap variabel bebas hari ke-14

Model Summary^b

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.824 ^a	.679	.637	2.58414	2.330

a. Predictors: (Constant), Kontrol dibernading EA + BBX_14, Kontrol dibernading BBX_14

b. Dependent Variable: NilaiIL10

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	6.667	1.055		6.319	.000
	Kontrol dibernading BBX_14	6.833	1.492	.773	4.580	.000
	Kontrol dibernading EA + BBX_14	7.667	1.492	.867	5.139	.000

a. Dependent Variable: NilaiIL10

Lampiran 42 : Regresi Linear BMP-2 terhadap TNF- α , IL-10 pada hari ke-14

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.804 ^a	.646	.599	2.94031

a. Predictors: (Constant), NilaiIL10, NilaiTNFa

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	9.111	3.634		2.507	.024
	NilaiTNFa	-.599	.235	-.449	-2.552	.022
	NilaiIL10	.523	.190	.483	2.747	.015

a. Dependent Variable: NilaiBMP2

Lampiran 43 : Regresi Linear ALP terhadap TNF- α , IL-10 dan BMP-2 hari ke-14

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.955 ^a	.911	.892	1.70648

a. Predictors: (Constant), NilaiIL10, NilaiTNFa, NilaiBMP2

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	2.578	2.512		1.026	.322
	NilaiTNFa	-.321	.163	-.215	-1.969	.069
	NilaiBMP2	.486	.150	.434	3.243	.006
	NilaiIL10	.529	.136	.437	3.906	.002

a. Dependent Variable: NilaiALP

Lampiran 44 : Regresi Linear OCN terhadap TNF- α , IL-10 dan BMP-2 pd hari ke-14**Model Summary^b**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Durbin-Watson
1	.889 ^a	.791	.746	1.66328	2.275

a. Predictors: (Constant), NilaiBMP2, NilaiTNFa, NilaiIL10

b. Dependent Variable: NilaiOCN

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	10.756	2.449		4.392	.001
	NilaiTNFa	-.453	.159	-.478	-2.850	.013
	NilaiIL10	.526	.132	.684	3.982	.001
	NilaiBMP2	-.109	.146	-.153	-.746	.468

a. Dependent Variable: NilaiOCN

Lampiran 45 : Regresi Linear woven bone terhadap ALP dan OCN pada hari ke-14

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.722 ^a	.521	.457	32.86500

a. Predictors: (Constant), NilaiOCN, NilaiALP

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	19.431	31.589		.615	.548
	NilaiALP	3.273	2.535	.381	1.291	.216
	NilaiOCN	5.151	3.994	.381	1.290	.217

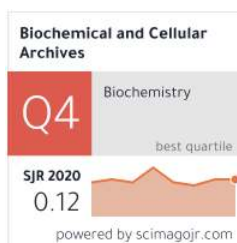
a. Dependent Variable: NilaiWB

Lampiran 46 : SEA Target protein target EA

<i>Target Key</i>	<i>Target Name</i>	<i>Description</i>	<i>P-value</i>	<i>MaxTc</i>
AKT1_HUMAN	AKT1	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>	0,9338	1
FGR_RAT	Fgr	<i>Tyrosine-protein kinase Fgr</i>	0,0000	1
SMAD3_HUMAN	SMAD3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>	0,0000	1
FAK1_HUMAN	PTK2	<i>Focal adhesion kinase 1</i>	0,4508	1
EGFR_HUMAN	EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	0,9998	1
PGFRB_HUMAN	PDGFRB	<i>Platelet-derived growth factor receptor beta</i>	0,3881	1

Lampiran 47 : Publikasi Internasional

1. Nama jurnal : Biochem. Cell. Arch
 Peran penulis : author EISSN : 0972-5075
 Nama lembaga pengindek : Dr. P. R. Yadav, India
 URL jurnal : www.connectjournals.com/bca
 Judul artikel : Molecular Docking Ellagic Acid and Calcium Phosphate
 Against Inflammatory Protein TLR2 and TLR4 In Silico Tahun : 2020 I
 Volume : 20 I Nomor : 2
 Halaman awal : 4857 I Akhir : 4863
 URL artikel : <http://connectjournals.com/03896.2020.20.4857>
 DOI: <http://connectjournals.com/03896.2020.20.4857>



MOLECULAR DOCKING ELLAGIC ACID AND CALCIUM PHOSPHATE AGAINST INFLAMMATORY PROTEIN TLR2 AND TLR4 *IN SILICO*

Debby Saputera^{1,2}, Intan Nirwana^{3*} and Michael Joseph Kridanto⁴

¹Graduate School of Dental Science, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

²Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Lambung Mangkurat University, Banjarmasin, South Borneo, Indonesia.

³Department of Dental Materials, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia.

⁴Department of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia.

*e-mail: intan-n@fkg.unair.ac.id

Received 30 June 2020, Revised 11 September 2020, Accepted 26 September 2020)

ABSTRACT : Inflammation is an innate immune system response to various injury stimuli, such as pathogens, injury, or metabolic stress. Inflammatory proteins that play a role in inflammatory sterile conditions (trauma) or bacterial-induced circumstances, played by TLR2 and TLR4. Ellagic acid (EA) is one of the biological molecules found in pomegranate and it has the potential anti-inflammatory. Calcium phosphate is included as the main ingredient in osteogenesis bone graft. The activity test is done to determine the potential of ellagic acid and calcium phosphate as an anti-inflammatory agent. To test the potential of ellagic acid and calcium phosphate as an anti-inflammatory agent, the biological activity was tested using the PASS Server. To understand the interaction between ellagic acid and calcium phosphate with TLR2 and TLR4, molecular docking analysis specifically used PyRx software v.0.9.5. The results of the exploration of the PubChem database of 3D structures and data SMILE shows that ellagic acid has a Pa (probability of activity) as an anti-inflammatory by 0.749. Ellagic acid and calcium phosphate tend to bind strongly to TLR2 compared to TLR4, as indicated by the results of a stronger binding affinity. Ellagic acid and calcium phosphate will remain attached to TLR but do not have a strong potential for induction of inflammation.

Key words : Calcium phosphates, ellagic acid, medicine, socket preservation, *in silico*.

2. Nama jurnal : Chiang Mai University Journal of Natural Sciences
 Peran penulis : author EISSN : 0972-5075
 Nama lembaga pengindek : Anak Iamaroon, Chiang Mai University,
 Thailand
 URL jurnal : <http://cmuj.cmu.ac.th>
 Judul artikel : The Role of Ellagic Acid on Inflammatory Protein NFKB1 and
 HSP70 with STITCH Prediction. Tahun : 2021
 Published online : 28 september 2021

**Research article****The Role of Ellagic Acid on Inflammatory Protein NFKB1 and HSP70 with STITCH Prediction**

Debby Saputera^{1, 2}, Intan Nirwana^{3,*}, Michael Josef Kridanto⁴, and Meircurius Dwi Condro Surboyo⁵

1 Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya, East Java 60132, Indonesia.
 2 Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Lambung Mangkurat University, Banjarmasin, South Borneo 70132, Indonesia
 3 Department of Dental Materials, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya, East Java 60132, Indonesia
 4 Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya, East Java 60132, Indonesia
 5 Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya, East Java 60132, Indonesia



Editor:
 Anak Iamaroon,
 Chiang Mai University, Thailand

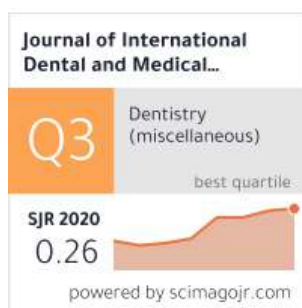
Article history:
 Received: March 21, 2021;
 Revised: September 5, 2021;
 Accepted: September 9, 2021;
 Published online: September 28,
 2021

Corresponding author:
 Intan Nirwana,
 E-mail: intan-n@fkg.umair.ac.id

Abstract The objective of this study was to determine the intervention mechanism of Ellagic Acid (ES) against inflammatory proteins NFKB1 and HSP70. Target Protein Analysis using SeaTarget (<http://sea.bkslab.org>). The compound is then analyzed for its target protein in the human body using the STITCH database (<http://stitch.embl.de/>). Then analyzed the interactions between proteins using the STRINGdb database (<https://string-db.org/cgi/input.pl>). In the analysis results with SEA, Ellagic Acid can target HSP70. Based on the results of interactions using STITCH, ellagic acid can target the Alpha Protein Kinase Catalytic Sub-unit (PRKCA). Protein Kinase Catalytic Sub-unit Alpha facilitates ellagic acid interactions with Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NFKB1) and Heat Shock 60kDa Protein 1 (HSPD1). Where NFKB1 is a pleiotropic transcription factor in various processes such as inflammation, immunity, differentiation, cell growth, tumorigenesis, and apoptosis. Ellagic acid can help reduce inflammation. It is predicted that the active compound in ellagic acid acts as an anti-inflammatory. The NFKB1 and HSP70 pathways play a role in inflammation and have activity for inflammation regulation.

Keywords: Ellagic acid, HSP70, Human & Health; Inflammation, NFKB1, STITCH

3. Nama jurnal : Journal of International Dental and Medical Research
 Peran penulis : author ISSN : 1309100X
 Nama lembaga pengindek : Ektodermal Displazi Grubu, Turkey
 URL jurnal : <http://www.jidmr.com/journal/>
 Judul artikel : Spectroscopy Structure Analysis of Ellagic Acid and Calcium Phosphate. Tahun : 2021
 Published online : 26 oktober 2021 2021



Journal of International Dental and Medical Research ISSN 1309-100X
<http://www.jidmr.com>

Ellagic Acid and Calcium Phosphate
 Debby Saputera and et al

Spectroscopy Structure Analysis of Ellagic Acid and Calcium Phosphate

Debby Saputera¹, Intan Nirwana^{2*}, Michael Josef Kridanto Kamadjaja³

1. Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

2. Department of Dental Materials, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

3. Department of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

Abstract

Ellagic acid is a polyphenol found in pomegranates. It contains a stimulant of osteoblast genesis and anti-inflammatory properties, and it is osteo inductive. Bovine bone xenograft is also osteoconductive and becomes one of the properties of the bone graft matrix that supports the attachment of bone-forming cells. Fourier transform infrared (FTIR) is an instrument that uses spectroscopic principles. Infrared spectroscopy is useful for identifying organic compounds because of its very complex spectrum consisting of many peaks. This study determined the chemical bonds of ellagic acid, calcium phosphate, and their combination to the spectrum of functional groups produced. FTIR characterization was carried out with ellagic acid powder, bovine bone xenograft powder, and a combination of samples with a ratio of 50:50. The FTIR results from the combination of ellagic acid and calcium phosphate showed a shift in wavenumber. This research shows the combination of calcium phosphate and ellagic acid contain different functional groups. When combined, the compounds are still strong in ellagic acid.

Experimental article (J Int Dent Med Res 2021; 14(4): 1435-1441)

Keywords: Calcium phosphate, ellagic acid, FTIR, Human and Medicine.

Received date: 01 July 2021

Accept date: 26 October 2021



BERITA ACARA UJIAN DISERTASI TERTUTUP

Pada hari Kamis, tanggal 21 Oktober 2021 staf pengajar Universitas Airlangga dan Universitas Brawijaya yang tercantum dalam susunan kepanitiaan seperti tersebut dibawah ini :

No	Nama	Pangkat/Jabatan	Kedudukan dalam Panitia
1.	Prof. Dr. David B. Kamadjaja, drg., MDS., Sp.BM(K)	Pembina Utama Muda (IV/c) / Guru Besar	Ketua Ujian
2.	Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes.	Pembina Utama Muda (IV/c) / Guru Besar	Anggota/ Promotor
3.	Dr. Michael Josef Kridanto K., drg., M.Kes., Sp.Pros.(K)	Pembina ((IV/a) / Lektor Kepala	Anggota/ Ko-Promotor
4.	Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.	Pembina Utama (IV/e) / Guru Besar	Anggota
5.	Prof. Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg. M.Kes.	Pembina Tk. I (IV/b) / Guru Besar	Anggota
6.	Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort.(K)	Pembina Utama Muda (IV/c) / Guru Besar	Anggota
7.	Dr. Taufan Bramantoro, drg., M.Kes.	Penata Tk.I (III/d) / Lektor Kepala	Anggota

Telah menguji ujian Disertasi Tertutup, Calon Doktor :

NAMA : Debby Saputera, drg., Sp.Pros.
N.I.M. : 021820173001
JUDUL : "Mekanisme Osteogenesis Setelah Pemberian Kombinasi Ellagic Acid Dan Bovine Bone Xenografi Pasca Ekstraksi Gigi (Penelitian Eksperimental Pada *Cavia Cobaya*)".

H a s i l : diterima:----- dengan *)
Tanpa *) perbaikan

Demikian.....


*) Coret yang tidak perlu




KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN
RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
Kampus AJL. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132
Telp.(031) 5030255 Fax. (031) 5020256
Laman://www.fkg.unair.ac.id e-mail: prodi.doktor@fkg.unair.ac.id

Demikian berita acara ini dibuat sebagai bahan pertimbangan dalam surat keputusan menguji ujian Disertasi Tertutup.

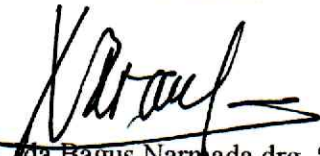
Calon Doktor yang diuji,


Debby Saputera, drg.,Sp.Pro.
NIM. 021820173001

Surabaya, 21 Oktober 2021
Ketua Penguji,


Prof. Dr. David B. K.,drg.,MDS.,Sp.BM(K)
NIP. 196502121991031003

Mengetahui,
KPS Doktor Ilmu Kedokteran Gigi


Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort.(K)
NIP. 195601071981031003



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

Kampus A Jl. Mayjen. Prof. Dr. Moestopo no. 47 Surabaya 60132
Telp. (031) 5030255 Fax. (031) 5020256
Laman://www.fkg.unair.ac.id; e-mail: mail@fkg.unair.ac.id

SALINAN

KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOMOR: 577/UN3.1.2/2021

TENTANG

TUGAS MENJADI TIM PENGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SEMESTER GASAL TAHUN AJARAN 2021/2022

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA

Menimbang : a. bahwa untuk menjamin kelancaran pelaksanaan pendidikan/pengajaran pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga khususnya dalam melaksanakan kurikulum sistem kredit semester, maka perlu menugaskan tenaga pengajar untuk menguji sesuai dengan kondisi pandemi pada bidangnya masing-masing;

b. bahwa pembelajaran semester gasal secara sesuai bidangnya dilakukan sehubungan dengan adanya Surat Edaran nomor : 529/UN3/PK/2021 tanggal 28 September 2021 tentang Pelaksanaan Proses Belajar Mengajar *Blended* Dan *Hybrid* Semester Gasal 2021/2022 Di Lingkungan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Akibat Dampak Pandemi COVID-19;

c. bahwa tenaga pengajar yang namanya tersebut dalam daftar terlampir memenuhi syarat untuk menjadi penguji pada ujian Disertasi Tertutup sesuai bidangnya;

d. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a, b dan c, perlu diterbitkan Keputusan Dekan tentang Tugas Menjadi Tim Penguji Pada Ujian Disertasi Tertutup Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Semester Gasal Tahun Ajaran 2021/2022.

Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 20 tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78 Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia nomor 4301);

2. Undang - Undang nomor 14 tahun 2005 tentang Guru dan Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2005 Nomor 157 Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4586);

3. Peraturan Menteri Pendayagunaan Aparatur Negara dan Reformasi Birokrasi Nomor 17 Tahun 2013 tentang Jabatan Fungsional Dosen dan Angka Kreditnya;

4.Peraturan.....

4. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 36 tahun 2017 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor Berbasis Riset Universitas Airlangga;
5. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 39 Tahun 2017 tentang Perubahan atas Peraturan Rektor Nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga;
6. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 11/UN3/2020 tentang Pedoman Pendidikan Universitas Airlangga;
7. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 20/UN3/2020 tentang Perubahan Atas Peraturan Rektor Nomor 36/UN3/2017 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor Berbasis Riset Universitas Airlangga;
8. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 762/UN3/2020 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas dan Direktur Sekolah Pascasarjana, dan Direktur Rumah Sakit Universitas Airlangga Periode 2020 – 2025.

MEMUTUSKAN :

- Menetapkan : KEPUTUSAN DEKAN TENTANG TUGAS MENJADI TIM PENGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA SEMESTER GASAL TAHUN AJARAN 2021/2022.
- KESATU : Menugaskan kepada tenaga pengajar yang namanya tercantum dalam daftar terlampir, untuk menjadi Tim Penguji pada Ujian Disertasi Tertutup sebagaimana tersebut dalam lampiran Keputusan Dekan ini.
- KEDUA : Dalam melaksanakan tugasnya sebagai penguji tersebut bertanggung jawab kepada Dekan melalui Koordinator Program Studi.
- KETIGA : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Surabaya
pada tanggal 19 Oktober 2021
DEKAN

ttd.

AGUNG SOSIAWAN
NIP. 197112112008121003

- SALINAN disampaikan Yth.
1. Koordinator Program Studi
 2. Ketua Departemen
 3. Ketua Bagian
 4. Yang Bersangkutan

Salinan sesuai dengan aslinya
Kepala Bagian Tata Usaha,


SOETJOKO
NIP. 196402081987091001

KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA

MOR : 577/UN3.1.2/2021 TANGGAL 19 OKTOBER 2021

UNTANG : TUGAS MENJADI TIM PENGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA SEMESTER GASAL TAHUN AJARAN 2021/2022

No.	Nama Calon Doktor	Judul Disertasi	Nama Penguji		Tanggal Ujian
			Ketua	Anggota	
	Debby Saputera, drg.,Sp.Pros. NIM : 021820173001	Mekanisme Osteogenesis Setelah Pemberian Kombinasi Eilagic Acid Dan Bovine Bone Xenograft Pasca Ekstraksi Gigi (Penelitian Eksprimental Pada <i>Cavia Cobaya</i>)	Prof. Dr. David B. Kamadjaja,drg.,MDS.,Sp.BM.(K)	1. Prof. Dr. Intan Nirwana,drg.,M.Kes. 2. Dr. Michael Josef Kridanto K.,drg.,M.Kes.,Sp.Pros.(K). 3. Prof. Dr. Aulanni'am,drh., DES. 4. Prof.Dr. A. Retno Pudji Rahayu,drg.M.Kes. 5. Prof.Dr. Ida Bagus Narmada,drg.,Sp.Ort.(K) 6. Dr. Taufan Bramantoro,drg.,M.Kes.	21 Oktober 2021

Salinan sesuai dengan aslinya
Kepala Bagian Tata Usaha,



SOETJOKO
NIP. 196402081987091001

Surabaya, 19 Oktober 2021
Dekan,

ttd

AGUNG SOSIAWAN
NIP. 197112112008121003

LEMBAR PENGESAHAN

**MEKANISME OSTEOGENESIS SETELAH PEMBERIAN
KOMBINASI ELLAGIC ACID DAN *BOVINE BONE*
XENOGRAFT PASCA EKSTRAKSI GIGI**

(Penelitian Eksperimental Pada *Cavia cobaya*)

DISERTASI

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan
Pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya**

Oleh :
DEBBY SAPUTERA
NIM : 021820173001

Menyetujui

Promotor



Prof. Dr. Intan Nirwana, drg., M.Kes
NIP. 195704301977032001

Ko Promotor



Dr. Michael Josef, drg., M.Kes, Sp.Prof (K)
NIP. 196305311989021001

**Ketua Program Studi
Doktor Ilmu Kedokteran Gigi**



Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort (K)
NIP. 195601071981031003