

**EKSPRESI NFATc1 DAN RUNX2 PADA  
PERGERAKAN GIGI ORTODONTI DENGAN  
PENINGKATAN KEKUATAN SECARA BERTAHAP  
(Penelitian Eksperimental Laboratoris)**

**KARYA TULIS AKHIR**



**IR  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

19CA  
PPDGS-ORT-12/17  
Hati  
C

Oleh :

**NDHUK RATIH MUSTIQO HATI**  
**NIM. 021318066303**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS  
PROGRAM STUDI ORTODONSIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2017**



**EKSPRESI NFATc1 DAN RUNX2 PADA  
PERGERAKAN GIGI ORTODONTI DENGAN  
PENINGKATAN KEKUATAN SECARA BERTAHAP  
(Penelitian Eksperimental Laboratoris)**

**KARYA TULIS AKHIR**

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat  
Untuk Menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis  
Program Studi Ortodonsia di Fakultas Kedokteran Gigi  
Universitas Airlangga Surabaya

Oleh :

**NDHUK RATIH MUSTIQO HATI**  
**NIM. 021318066303**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER GIGI SPESIALIS  
PROGRAM STUDI ORTODONSIA  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2017**



**LEMBAR PENGESAHAN**

**KARYA TULIS AKHIR INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL : 12 JULI 2017**

**Oleh:**

**Pembimbing Ketua :**

**H. Jusuf Sjamsudin, drg., Sp.Ort (K)**  
NIP. 19541126 197901 1 001

**Pembimbing :**

**Dr. I. G. A. Wahyu Ardani, drg., M.Kes., Sp.Ort**  
NIP. 19630806 198902 2 001

**Mengetahui:**

**Ketua Program Studi Spesialis Ortodonsia  
Fakultas Kedokteran Gigi  
Universitas Airlangga Surabaya**

**Dr. Ari Triwardhani, drg., M.Sc., Sp.Ort (K)**  
NIP. 19620202 198703 2 001

**LEMBAR PENGUJI**  
**TELAH DIUJI OLEH**  
**PANITIA PENGUJI KARYA TULIS AKHIR**

**Tanggal 16 Juni 2017**

**Ketua : Dr. Ari Triwardani, drg., M.Sc., Sp.Ort(K)**

**Sekretaris : Jusuf Sjamsudin, drg., Sp.Ort(K)**

**Anggota : Dr. I .G.A. Wahyu Ardhana, drg., M.Kes., Sp.Ort**

**Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort.(K)**

**Achmad Sjafei, drg., MS., Sp.Ort.(K)**

## SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini, saya :

Nama : Ndhuk Ratih Mustiqo Hati  
NIM : 021318066303  
Program Studi : Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Ortodonsia  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Universitas : Airlangga  
Jenjang : Spesialis (Sp)

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penelitian tugas akhir saya yang berjudul :

### **EKSPRESI NFATc1 DAN RUNX2 PADA PERGERAKAN GIGI ORTODONTI DENGAN PENINGKATAN KEKUATAN SECARA BERTAHAP (Penelitian Experimental Laboratoris)**

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya. Apabila pada suatu saat terbukti melakukan tindakan plagiat maka saya bersedia menerima sanksi yang telah ditetapkan.



Surabaya, 7 Agustus 2017  
  
Ndhuk Ratih Mustiqo Hati

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur yang tak terhingga penulis panjatkan kehadirat Allah SWT karena hanya dengan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas karya tulis akhir sebagai salah satu syarat yang harus dipenuhi untuk menyelesaikan Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Ortodonti pada Fakultas Kedokteran Gigi di Universitas Airlangga, Surabaya.

Selesainya penulisan karya tulis akhir ini tidak terlepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar - besarnya kepada:

1. Dr. R. Darmawan Setijanto, drg., M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk dapat mengikuti dan menyelesaikan pendidikan ini.
2. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort(K), selaku Ketua Departemen Ortodontia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, yang telah memberikan banyak waktunya untuk berbagi ilmu pengetahuan dan pengalaman, motivasi yang sangat berharga selama masa studi di Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Ortodonti Universitas Airlangga.
3. Prof. Thalca Hamid, drg., MHPed., Sp.Ort(K)., Ph.D, selaku Guru Besar Bidang Ortodonti, instruktur klinik Spesialis Ortodonti Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, pengarahan dan bimbingan serta motivasi selama penulis

menempuh masa studi di Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Ortodonti Universitas Airlangga.

4. Dr. Ari Triwardhani, drg, M.Sc., Sp.Ort(K), selaku Ketua Program Studi Ortodonti Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, semangat, masukan dan bimbingan yang sangat berharga sampai terselesainya karya tulis ini.
5. H. Achmad Sjafei, drg., MS., Sp.Ort (K), staf pengajar dan instruktur klinik Spesialis Ortodonti Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, yang telah banyak memberikan ilmu pengetahuan, saran serta motivasi kepada penulis sehingga penulisan karya tulis akhir ini dapat terselesaikan.
6. H. Jusuf Sjamsudin, drg., Sp.Ort.(K), staf pengajar dan instruktur klinik Spesialis Ortodonti Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Pembimbing pertama penulisan karya tulis akhir ini yang telah memberikan banyak ilmu pengetahuan, nasehat, bantuan, serta dukungan yang sangat berarti dalam menyelesaikan penulisan karya tulis akhir ini.
7. Dr. I G.A Wahyu Ardani, drg., M.Kes., Sp.Ort, staf pengajar dan instruktur klinik Spesialis Ortodonti Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Pembimbing kedua penulisan karya tulis akhir ini yang telah memberikan saran, nasehat, motivasi, dan ilmu pengetahuan yang sangat berarti dalam menyelesaikan penulisan karya tulis akhir ini.
8. Seluruh Staf Pengajar Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Ortodonti yang banyak memberikan ilmu pengetahuan yang bermanfaat, pengalaman

- klinik dan pengarahan yang sangat berharga selama penulis mengikuti pendidikan.
9. Asisten Laboratorium Farmasi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas bantuan dan kerja kerasnya dalam membantu proses penelitian hingga karya tulis ini dapat terselesaikan dengan baik.
  10. Kedua orang tua saya Bapak Sun'an Arif (Alm) dan Ibu Driyati yang senantiasa memberikan doa, dukungan, kasih sayang dan semangat yang tiada putus. Serta kepada Bapak Amien (Alm) dan Ibu Sri Hartini, Bapak dan Ibu mertua yang selalu memberikan doa, motivasi dan dukungan.
  11. Suamiku, Rokhmad Irfan Susanto., ST, beserta putra kami tercinta Rafan Dhiwa Arkananta yang senantiasa mendukung penuh disetiap waktu dan keadaan, selalu memberi semangat yang tiada pernah putus selama penulis menempuh pendidikan. Terima kasih yang tak terhingga atas semua doa dan dukungannya.
  12. Adikku, Nduk Riha Naila Adibah yang senantiasa mendukung dan berjuang bersama dalam mewujudkan semua cita-cita demi menjadi kebanggaan orang tua.
  13. Teman-teman sejawat PPDGS Ortodonti Angkatan 2013, yang telah bekerja sama dengan baik, saling membantu dan berbagi suka dan duka selama

penulis menempuh pendidikan. Terima kasih atas kebersamaannya selama ini.

14. Teman-teman sejawat PPDGS Ortodonti yang telah membantu dan bekerja sama dengan baik selama penulis menempuh pendidikan.
15. Para Staf dan perawat Klinik Pendidikan Spesialis Ortodonti Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah membantu memperlancar pendidikan yang penulis tempuh
16. Berbagai pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu yang telah membantu penulis selama menempuh pendidikan dan sampai selesainya penulisan karya tulis ilmiah akhir ini.

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam penulisan karya tulis ilmiah ini, namun penulis berharap semoga karya tulis ilmiah ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan menambah pengetahuan dalam bidang studi ortodonti, dan akhir kata penulis mohon saran untuk dapat lebih menyempurnakan karya tulis ilmiah ini

Surabaya, 7 Agustus 2017

Penulis



## NFATc1 AND RUNX2 EXPRESSION ON ORTHODONTIC TOOTH MOVEMENT WITH GRADUALLY INCREASING FORCE (Experimental Laboratory Research)

### ABSTRACT

**Background:** Orthodontic tooth movement occurs due to resorption and bone apposition on the pressure and strain side of the PDL, respectively. Orthodontic pressure initiates biochemical and cellular changes that form the contours of alveolar bone. The transcription factor associated with osteoclast differentiation is NFATc1 and the transcription factor associated with osteoblast differentiation is RUNX2. NFATc1 is the main regulator of osteoclast differentiation. RUNX2 is a multifunctional transcription factor that controls skeletal development by regulating the differentiation of chondrocytes, osteoblasts and the expression of many genes of extracellular matrix proteins during differentiation of chondrocytes and osteoblasts. **Objective:** The purpose of this study was to determine the difference of expression of NFATc1 and RUNX2 in mouse orthodontic movement. **Methods:** This type of research is a laboratory experimental study. The research design used in this research is the post test control group design. The sample used in this study each group amounted to four rats in 7 groups. The results were calculated by immunohistochemical methods. **Results:** Indicates a significant difference between the control group and the treatment group at both NFATc1 and RUNX2 ( $P > 0.05$ ) values. The highest NFATc1 value was seen in group P2 and the highest RUNX2 value was seen in group P6. **Conclusion:** Increased orthodontic forces gradually results in better osteoclast and osteoblast formation.

**Keywords:** NFATc1, RUNX2, Orthodontic Tooth Movement, Gradually Increasing Force.

## **EKSPRESI NFATc1 DAN RUNX2 PADA PERGERAKAN GIGI ORTODONTI DENGAN PENINGKATAN KEKUATAN SECARA BERTAHAP (Penelitian Eksperimental Laboratoris)**

### **ABSTRAK**

**Latar belakang:** Pergerakan gigi ortodontik terjadi karena adanya resorpsi dan aposisi tulang pada sisi tekanan dan regangan di PDL, berturut-turut. Tekanan ortodontik menginisiasi perubahan biokimia dan seluler yang membentuk kontur tulang alveolar. Faktor transkripsi yang berhubungan dengan diferensiasi osteoklast adalah NFATc1 dan faktor transkripsi yang berhubungan dengan diferensiasi osteoblast adalah RUNX2. NFATc1 merupakan regulator utama diferensiasi osteoklast. RUNX2 merupakan faktor transkripsi multifungsional yang mengontrol perkembangan skeletal dengan meregulasi diferensiasi kondrosit, osteoblast dan ekspresi banyak gen protein matriks ekstraseluler selama diferensiasi kondrosit dan osteoblast. **Tujuan:** Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan ekspresi NFATc1 dan RUNX2 pada pergerakan ortodonti tikus. **Metode:** Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah the post test control group design. Sampel yang digunakan pada penelitian ini tiap kelompok berjumlah empat ekor tikus pada 7 kelompok. Hasil penelitian dihitung dengan metode imunohistokimia. **Hasil:** Menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan baik pada nilai NFATc1 dan RUNX2 ( $P > 0.05$ ). Nilai NFATc1 tertinggi terlihat pada kelompok P2 dan nilai RUNX2 tertinggi terlihat pada kelompok P6. **Simpulan:** Peningkatan kekuatan ortodonti secara bertahap menghasilkan pembentukan osteoklas dan osteoblas yang lebih baik.

**Kata kunci :** NFATc1, RUNX2, Pergerakan gigi ortodonti, Pemberian kekuatan bertahap.



## SUMMARY

Mechanical forces applied to the tooth are transmitted to the surrounding alveolar bone through the periodontal ligament (PDL). Thus the provision of this power will activate the process of bone remodeling, resorption and/or apposition that facilitates the movement of the teeth within the alveolar bone. (Driel et al., 2000).

Based on the data analysis in Table 5.1, it can be seen that the NFATc1 values of all groups appear to be significantly changed when compared to the control group. The highest increase occurred in the group with 10 gr/mm<sup>2</sup> (group P1 and P2). This group produces good tooth movement because the strength of 10 gr/mm<sup>2</sup> is the optimum force to move the teeth in mice.

While in the group with gradual strengthening showed the formation of low osteoclast in the group given strength of 5 gr/mm<sup>2</sup> to 10 gr/mm<sup>2</sup> (P3-P4). In contrast to the P3-P4 group, a group with a strength increase of 10 gr/mm<sup>2</sup> to 20 gr/mm<sup>2</sup> showed good osteoclast formation starting from 10 gr/mm<sup>2</sup>, but osteoclast formation at 20 gr/mm<sup>2</sup> increased in strength compared to group 10 gr/mm<sup>2</sup> (P2). In Table 5.4 the average value of RUNX2 in the strain area showed that the whole group showed significant value when compared to the control group.



## RINGKASAN

Kekuatan mekanis yang diberikan pada gigi ditransmisikan ke tulang alveolar sekitarnya melalui ligament periodontal (PDL). Sehingga pemberian kekuatan ini akan mengaktifkan proses remodeling tulang, resorpsi dan/atau aposisi yang memfasilitasi pergerakan gigi di dalam tulang alveolar. (Driel et al., 2000).

Berdasarkan analisis data pada tabel 5.1 terlihat bahwa nilai NFATc1 seluruh kelompok terlihat mengalami perubahan yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan tertinggi terjadi pada kelompok dengan pemberian kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup> (kelompok P1 dan P2). Kelompok ini menghasilkan pergerakan gigi yang baik karena kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup> merupakan kekuatan optimum untuk menggerakkan gigi pada tikus.

Sedangkan pada kelompok dengan pemberian kekuatan secara bertahap menunjukkan pembentukan osteoklast yang rendah pada kelompok yang diberikan kekuatan 5 gr/mm<sup>2</sup> menjadi 10 gr/mm<sup>2</sup> (P3-P4). Berbeda dengan kelompok P3-P4, kelompok dengan peningkatan kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup> menjadi 20 gr/mm<sup>2</sup> menunjukkan pembentukan osteoklast yang baik mulai dari pemberian kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup>, namun pembentukan osteoklast pada peningkatan kekuatan 20 gr/mm<sup>2</sup> lebih rendah dibandingkan dengan kelompok 10 gr/mm<sup>2</sup> (P2). Pada tabel hasil 5.4 tentang nilai rata-rata RUNX2 pada daerah regangan didapatkan hasil bahwa seluruh kelompok menunjukkan nilai yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.



DAFTAR ISI

|                              | Halaman |
|------------------------------|---------|
| LEMBAR JUDUL .....           | i       |
| LEMBAR PRASYARAT GELAR ..... | ii      |
| LEMBAR PENGESAHAN .....      | iii     |
| PANITIA PENGUJI .....        | iv      |
| SURAT ORISINALITAS .....     | v       |
| KATA PENGANTAR.....          | vi      |
| ABSTRACT.....                | x       |
| ABSTRAK.....                 | xi      |
| SUMMARY.....                 | xii     |
| RINGKASAN.....               | xiii    |
| DAFTAR ISI .....             | xiv     |
| DAFTAR GAMBAR .....          | xvii    |
| DAFTAR TABEL .....           | xviii   |
| DAFTAR LAMPIRAN.....         | xix     |
| BAB 1. PENDAHULUAN.....      | 1       |
| 1.1. Latar Belakang.....     | 1       |
| 1.2. Rumusan Masalah.....    | 6       |
| 1.3. Tujuan Penelitian.....  | 6       |
| 1.3.1. Tujuan Umum.....      | 6       |
| 1.3.2. Tujuan Khusus.....    | 6       |
| 1.4. Manfaat Penelitian..... | 7       |

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>                    | <b>7</b>  |
| 2.1. Pergerakan Gigi Ortodonti.....                    | 7         |
| 2.1.1 Teori Pergerakan Gigi .....                      | 10        |
| 2.1.2 Tahap-Tahap Pergerakan Gigi.....                 | 12        |
| 2.1.3 Mekanisme Seluler dan Molekuler .....            | 15        |
| 2.2 Nuclear Factor Of Activated T-Cells (NFAT).....    | 17        |
| 2.2.1 Struktur dan Peran NFAT.....                     | 17        |
| 2.2.2 NFATc1 dan Perkembangan Tulang .....             | 19        |
| 2.3 Run-Related Transcription Factor 2 (Runx2).....    | 21        |
| 2.3.1 Struktur dan Peran Runx2.....                    | 21        |
| 2.3.2 Ekspresi Runx2 Selama Perkembangan Tulang...     | 22        |
| 2.3.3 Diferensiasi Osteoblast dan Maturasi Tulang..... | 23        |
| <b>BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS</b>        | <b>26</b> |
| <b>PENELITIAN.....</b>                                 |           |
| 3.1. Kerangka Konsep.....                              | 26        |
| 3.2. Hipotesis Penelitian.....                         | 29        |
| <b>BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN.....</b>               | <b>30</b> |
| 4.1. Jenis dan Rancangan Penelitian.....               | 30        |
| 4.2. Sample Penelitian.....                            | 30        |
| 4.3. Kriteria Sampel.....                              | 31        |
| 4.4. Variabel Penelitian.....                          | 31        |
| 4.5. Definisi Operasional.....                         | 32        |
| 4.6. Tempat Penelitian.....                            | 32        |

|                                                       |           |
|-------------------------------------------------------|-----------|
| 4.7. Waktu Penelitan.....                             | 32        |
| 4.8. Bahan dan Alat Penelitian.....                   | 33        |
| 4.8.1 Bahan Penelitian.....                           | 33        |
| 4.8.2 Alat Penelitian.....                            | 33        |
| 4.9. Prosedur Penelitian.....                         | 34        |
| 4.9.1 Persiapan Sample.....                           | 34        |
| 4.9.2 Pemasangan <i>Niti closed coil spring</i> ..... | 35        |
| 4.9.3 Ekstraksi Jaringan.....                         | 36        |
| 4.9.4 Pemeriksaan Histologi.....                      | 36        |
| 4.10 Analisis Statistik Penelitian.....               | 37        |
| 4.11 Skema Cara Kerja Penelitian.....                 | 38        |
| <b>BAB 5. HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....</b> | <b>39</b> |
| 5.1 Hasil Perhitungan Nilai NFATc1.....               | 39        |
| 5.2 Hasil Perhitungan Nilai RUNX2.....                | 43        |
| <b>BAB 6. PEMBAHASAN.....</b>                         | <b>48</b> |
| <b>BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>               | <b>52</b> |
| 7.1 Kesimpulan.....                                   | 52        |
| 7.2 Saran.....                                        | 52        |
| <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>                            | <b>53</b> |
| <b>LAMPIRAN.....</b>                                  | <b>58</b> |

## DAFTAR GAMBAR

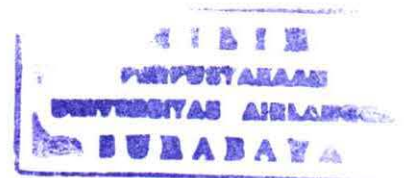
|                                                                                         | Halaman |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Gambar 2.1 Aplikasi tekanan ortodontik pada gigi .....                                  | 9       |
| Gambar 2.2 Skema pergerakan gigi .....                                                  | 11      |
| Gambar 2.3 Teori pergerakan gigi.....                                                   | 17      |
| Gambar 2.4 Skema kaskade signaling pada diferensiasi osteoklas .....                    | 20      |
| Gambar 2.5 Regulasi diferensiasi osteoblast dan odontoblast oleh<br>RUNX2.....          | 24      |
| Gambar 4.1 Pemasangan Niti closed coil spring pada tikus.....                           | 36      |
| Gambar 5.1 Hasil pewarnaan imunohistokimia NFATc1 pada sisi<br>tekanan.....             | 39      |
| Grafik 5.1    Nilai rata-rata NFATc1 pada daerah tekanan.....                           | 40      |
| Gambar 5.2 Hasil pewarnaan hematosillin eosin (HE) osteoklas pada<br>sisi tekanan.....  | 41      |
| Grafik 5.2    Nilai rata-rata osteoklas pada daerah tekanan.....                        | 41      |
| Gambar 5.3 Hasil pewarnaan imunohistokimia RUNX2 pada sisi<br>regangan.....             | 43      |
| Grafik 5.3    Nilai rata-rata RUNX2 pada daerah regangan.....                           | 44      |
| Gambar 5.4 Hasil pewarnaan hematosillin eosin (HE) osteoblas pada<br>sisi regangan..... | 45      |
| Grafik 5.4    Nilai rata-rata osteoblas pada daerah regangan.....                       | 45      |

DAFTAR TABEL

|           |                                                       | Halaman |
|-----------|-------------------------------------------------------|---------|
| Table 2.1 | Respon fisiologis jaringan.....                       | 15      |
| Tabel 2.2 | NFAT Family .....                                     | 19      |
| Tabel 4.1 | Perlakuan pada tiap kelompok.....                     | 34      |
| Tabel 5.1 | Perhitungan nilai NFATc1 pada daerah tekanan....      | 40      |
| Tabel 5.2 | Hasil uji <i>Tukey HSD</i> NFATc1 pada daerah tekanan | 42      |
| Tabel 5.3 | Perhitungan nilai RUNX2 pada daerah regangan....      | 43      |
| Tabel 5.4 | Hasil uji <i>Tukey HSD</i> RUNX2 pada daerah regangan | 46      |

## DAFTAR LAMPIRAN

|                                                                                 | Halaman |
|---------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Hasil Perhitungan NFATc1 dan RUNX2 Pada Daerah Tekanan dan Regangan.....        | 54      |
| Hasil Analisis Statistik NFATc1.....                                            | 55      |
| Hasil Analisis Statistik RUNX2.....                                             | 59      |
| Hasil Analisis Statistik Perhitungan Osteoklast.....                            | 63      |
| Hasil Analisis Statistik Perhitungan Osteoblast.....                            | 67      |
| Hasil Analisis Statistik Korelasi NFATc1, RUNX2, Osteoklast dan Osteoblast..... | 70      |
| Foto Penelitian.....                                                            | 71      |
| Gambar Hasil Pewarnaan Imunohistokimia RUNX2.....                               | 76      |
| Gambar Hasil Pewarnaan Imunohistokimia NFATc1.....                              | 78      |
| Gambar Hasil Pewarnaan HE Osteoklast.....                                       | 80      |
| Gambar Hasil Pewarnaan HE Osteoblast.....                                       | 83      |



# **BAB 1**

## **PENDAHULUAN**



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Pergerakan gigi karena pemberian tekanan ortodonti ditandai dengan adanya remodeling pada jaringan dental dan paradental, termasuk pulpa gigi, ligamen periodontal (PDL), tulang alveolar, dan gingiva. Jaringan-jaringan ini, ketika terkena berbagai macam derajat kekuatan, frekuensi dan durasi dari tekanan mekanik, akan menunjukkan perubahan makroskopik dan mikroskopik. Pergerakan gigi ortodonti memiliki gambaran yang berbeda dari pergerakan gigi fisiologis atau erupsi gigi. Karakteristiknya sangat unik terlihat pada adanya pembentukan sisi tekanan dan regangan pada PDL (Krishnan et al., 2006). Pemberian tekanan ortodonti akan menyebabkan terbentuknya sisi tekanan dan regangan pada ligamen periodontal (Dolce et al., 2002). Resorpsi tulang alveolar pada sisi tekanan dilakukan oleh osteoklas dan aposisi tulang alveolar pada sisi regangan dilakukan oleh osteoblas (Krishnan et al., 2006; Wise et al., 2008).

Pergerakan gigi ortodonti dapat muncul secara cepat atau lambat, tergantung pada karakteristik fisik, penggunaan tekanan, ukuran dan respon biologis PDL. Tekanan ini menginduksi regangan yang merubah vaskularisasi dan aliran darah, yang menghasilkan sintesis lokal dan menyebabkan pengeluaran berbagai molekul, seperti neurotransmitter, sitokin, *growth factor*, *colony-stimulating factor*, dan metabolit asam arachidonat. Molekul ini dapat merangsang respon sel oleh berbagai tipe sel didalam dan disekitar gigi, menyediakan

lingkungan mikro yang sesuai untuk aposisi dan resorpsi jaringan (Krishnan et al., 2006).

Tekanan ortodonti diartikan sebagai pemberian gaya pada gigi dengan tujuan untuk menggerakkan gigi (Daskalogiannakis., 2000). Pergerakan gigi ortodonti terjadi karena adanya resorpsi dan aposisi tulang pada sisi tekanan dan regangan di PDL, berturut-turut. Tekanan ortodonti, berdasarkan perubahan aliran darah dan lingkungan elektrokimia lokal, mengganggu lingkungan homeostatik yang terdapat pada ruang PDL. Perubahan mendadak ini akan menginisiasi perubahan biokimia dan seluler yang membentuk kontur tulang alveolar (Toms et al., 2002). Hal ini artinya bahwa tekanan ortodonti optimal menggerakkan gigi secara efisiensi menuju posisi yang diinginkan, tanpa menyebabkan ketidaknyamanan dan kerusakan jaringan pasien (Krishnan et al., 2006).

Tekanan ortodonti ringan yang diberikan pada gigi menghasilkan obstruksi partial vaskuler PDL dan resorpsi frontal tulang. Tekanan ortodonti besar menyumbat pembuluh darah dan membuat nekrosis pada jaringan sekitarnya karena jaringan tersebut kekurangan oksigen dan nutrisi. Berbeda dengan remodeling tulang fisiologis oleh tekanan ringan, tekanan berat menyebabkan hialinisasi PDL, *undermining bone resorption*, dan mengakibatkan resorpsi akar (Toms et al., 2002)

Tulang terdiri atas 4 tipe sel: osteoblas, osteosit, *bone lining cell*, dan osteoklast. Osteoblas, *bone lining cell* dan osteosit berasal dari mesenkim stem sel dan mewakili berbagai tahap perkembangan dari satu tipe sel. Osteoblas merupakan sel bulat dengan organel yang kaya akan sitoplasma. Osteoklas dan osteoblas berfungsi untuk pembentukan tulang, pertama dengan meletakkan osteoid dan

memineralisasinya. Osteosit membentuk osteoblast yang akan terperangkap pada matriks tulang. Gambaran khas dari osteosit adalah merupakan sebuah perpanjangan sel yang menghubungkan antar sel dan antara permukaan tulang dengan sel. Sesuai dengan namanya, *bone-lining cell* mengelilingi permukaan tulang. Fungsinya belum begitu jelas diketahui, tetapi sel ini mungkin merupakan sel yang sangat penting dalam regulasi resorpsi dan aposisi tulang. Osteoklas merupakan sel yang besar dan multinukelus yang berfungsi untuk meresorpsi tulang. Osteoklas berasal dari sel hematopoetik dan mewakili tahap terminal pada diferensiasi sel hematopoetik (Dolce et al., 2002).

Faktor transkripsi yang berhubungan dengan diferensiasi osteoklas adalah NFATc1 dan faktor transkripsi yang berhubungan dengan diferensiasi osteoblas adalah RUNX2. Famili gen NFAT teridentifikasi sekitar 25 tahun yang lalu sebagai kelompok faktor transkripsi yang dapat berikatan dengan *interleukin 2 (IL-2) promoter* pada sel T teraktivasi. Sejak ditemukannya protein NFAT pertama, NFAT telah diketahui terlibat dalam aktivasi sel imun, pembentukan katup jantung, hipertropi kardiak, dan perkembangan osteoklas (Kim et al., 2014; Takayanagi., 2007). Fungsi dan regulasi protein NFAT paling dipahami pada sel T. Famili NFAT terdiri atas 5 kelompok: NFAT1 (disebut juga NFATp atau NFATc2), NFAT2 (disebut juga NFATc atau NFATc1), NFAT3 (disebut juga NFATc4), NFAT4 (disebut juga NFATx atau NFATc3), dan NFAT5. Semua protein dari family NFAT, kecuali NFAT5, diregulasi oleh *calcium signaling pathway* (Lopez et al., 2001).

Ekspresi NFATc1 diinduksi selama diferensiasi osteoklas. Beberapa faktor transkripsi telah diketahui berikatan dengan *NFATc1 promoter* selama osteoklastogenesis (Kim et al., 2014). NFATc1 merupakan regulator utama diferensiasi osteoklas. NFATc1 meregulasi beberapa gen osteoklas spesifik seperti TRAP, cathepsin K, reseptor calcitonin, dan *osteoclast-associated receptor* (OSCAR) melalui ikatannya dengan MITF dan c-Fos (Takayanagi et al., 2002; Matsumoto et al., 2004; Kim et al., 2005; Kim et al., 2005).

Peran NFATc1 dalam diferensiasi osteoklas telah banyak dikemukakan oleh berbagai penelitian yang dilakukan pada tikus yang dimodifikasi genetik. Kim et al (2014) mengatakan bahwa NFATc1 sangat diperlukan dalam diferensiasi osteoklas. Negishi-koga *et al* (2009) menyebutkan bahwa NFATc1 sebagai faktor transkripsi utama dalam osteoklastogenesis yang menunjukkan pentingnya  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pada diferensiasi osteoklas. Crotti et al (2008) mengatakan bahwa NFATc1 memainkan peran penting pada aktivasi osteoklas melalui regulasi berbagai gen pada tiap tahapan proses, seperti adesi, migrasi, oksidasi, dan degradasi osteoklas terhadap matrik tulang anorganik dan organik.

Famili RUNX terdiri atas 3 gen, RUNX1/Cbfa2/PeBP2 $\alpha$ B, RUNX2/Cbfa1/PeBP2 $\alpha$ A, dan RUNX3/Cbfa3/PeBP2 $\alpha$ C. RUNX1 dan Cbfb berpengaruh dalam diferensiasi hematopoietik. RUNX2 berpengaruh pada diferensiasi osteoblas (Komori., 2005). RUNX2 merupakan faktor transkripsi multifungsional yang mengontrol perkembangan skeletal dengan meregulasi diferensiasi kondrosit, osteoblas dan ekspresi banyak gen protein matriks ekstraseluler selama diferensiasi kondrosit dan osteoblas. Selama diferensiasi

osteoblast, RUNX2 meregulasi ekspresi gen protein matriks tulang termasuk *Colla2*, *Spp1*, *Ibsp*, *Bglap*, dan *Fnl* *in vitro* dan aktivasi banyak promotor termasuk *Colla1*, *Colla2*, *Spp1*, *Bglap*, dan *MMP13* (Komori., 2010).

Peran RUNX2 dalam diferensiasi osteoblast telah banyak dikemukakan pada beberapa penelitian. Yamashiro et al (2002) menjelaskan bahwa RUNX2 dibutuhkan untuk pembentukan tulang dan gigi dan ekspresinya terutama terbatas dalam kondensasi osteoblast dan mesenkim dalam pembentukan tulang, kartilago dan gigi. Miyazaki et al (2008) mengemukakan bahwa overekspresi RUNX2 pada odontoblast akan menghambat diferensiasi terminal odontoblast dan mencetuskan transdiferensiasi odontoblast menjadi osteoblast, yang membentuk struktur tulang.

Secara teori, tidak diragukan lagi bahwa *countinuous light forces* menghasilkan pergerakan gigi yang lebih efisien. *Countinuous light forces* menghasilkan pergerakan gigi ringan melalui resorpsi frontal. Sedangkan pada pemberian kekuatan ortodonti yang besar (*heavy forces*) akan menghasilkan hyalinisasi yang akan menghambat pergerakan gigi. Namun, penelitian yang dilakukan oleh Tomizuka et al (2006) menunjukkan bahwa penggunaan kekuatan ortodonti secara bertahap dengan pemberian kekuatan ringan pada awal dan ditingkatkan secara bertahap menghasilkan pergerakan gigi yang efektif pada tikus tanpa menginduksi berbagai perubahan patologi.

Penelitian mengenai ekspresi NFATc1 dan RUNX2 dengan pemberian kekuatan ortodonti secara bertahap terhadap pergerakan gigi ortodonti belum pernah dilakukan. Oleh karena itu peneliti ingin mengetahui ekspresi NFATc1 dan

RUNX2 terhadap pergerakan gigi ortodonti dengan peningkatan kekuatan secara bertahap.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Apakah ada perbedaan ekspresi NFATc1 dan RUNX2 pada pergerakan ortodonti gigi tikus yang diberikan kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup>, 5 gr/mm<sup>2</sup> – 10 gr/mm<sup>2</sup> dan 10 gr/mm<sup>2</sup> - 20 gr/mm<sup>2</sup>?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan ekspresi NFATc1 dan RUNX2 pada pergerakan ortodonti tikus.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

Tujuan khusus penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui perbedaan ekspresi NFATc1 dan RUNX2 pada pergerakan gigi tikus dengan pemberian kekuatan sebesar 10 gr/mm<sup>2</sup> dan dengan pemberian 5 gr/mm<sup>2</sup> - 10 gr/mm<sup>2</sup>.
2. Untuk mengetahui perbedaan ekspresi NFATc1 dan RUNX2 pada pergerakan gigi tikus dengan pemberian kekuatan sebesar 10 gr/mm<sup>2</sup> dan dengan pemberian 10 gr/mm<sup>2</sup> - 20 gr/mm<sup>2</sup>.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai peran NFATc1 dan RUNX2 terhadap pergerakan gigi ortodonti tikus.

## **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Pergerakan Gigi Ortodonti

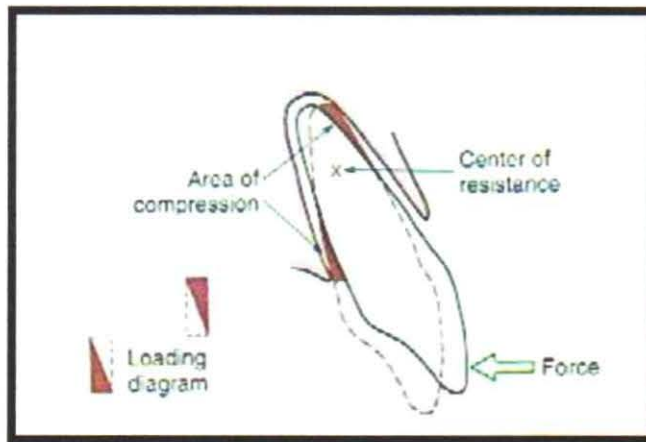
Pergerakan gigi ortodonti berasal dari tekanan pada gigi. Tekanan ini berasal dari piranti yang digunakan (kawat, braket, elastomer dsb) yang dipasang dan diaktivasi oleh klinisi. Gigi geligi dan jaringan pendukungnya merespons gaya tersebut dengan suatu reaksi biologis yang kompleks sehingga terjadi pergerakan gigi melalui tulang. Sel-sel dalam periodonsium yang bereaksi akibat tekanan yang diberikan, tidak tergantung dari desain braket, bentuk kawat atau campuran logam, tetapi aktivitasnya tergantung dari tekanan dan regangan yang terjadi di sekelilingnya. Untuk mendapatkan respon yang tepat, rangsangan mekanis yang diberikan juga harus tepat. Pengetahuan akan prinsip-prinsip mekanis mengenai gaya diperlukan untuk mengontrol perawatan ortodonti. Dasar dari perawatan ortodonti adalah aplikasi klinis konsep biomekanik, yaitu mekanika yang berhubungan dengan sistem biologis (Williams *et al*, 2000).

Pergerakan gigi secara ortodonti dihasilkan dari kombinasi reaksi biologis terhadap tekanan biomekanik oleh gaya ortodonti di ligamen periodontal dan tulang alveolar. Pergerakan gigi disebabkan oleh aplikasi tekanan ortodonti yang ditandai oleh terjadinya perubahan pada gigi dan jaringan periodontal. Keberhasilan perawatan ortodonti dipengaruhi oleh berbagai faktor termasuk kesehatan jaringan periodontal, kebersihan mulut dan tekanan ortodonti. Pergerakan gigi secara ortodonti merupakan hasil dari reaksi biologis terhadap stres biomekanik yang

dihasilkan tekanan ortodonti dalam ligamen periodontal dan tulang alveolar. Ligamen periodontal terutama terdiri dari kolagen tipe I dan III yang menghubungkan tulang alveolar dengan akar gigi, yang akan memberikan stabilitas mekanik dinamis terhadap gigi (Takahashi *et al*, 2006).

Periodontal ligamen (PDL) memegang peranan sangat penting dalam proses pergerakan gigi secara ortodonti karena kemampuannya dalam merespons kekuatan mekanik yang diterima menyebabkan terjadinya remodeling tulang alveolar sehingga memungkinkan gigi bergerak. Apabila suatu tekanan diberikan pada gigi maka PDL yang mengalami tarikan akan terjadi aposisi tulang dan di daerah tekanan akan terjadi resorpsi tulang (gambar 2.4). PDL terdiri atas matriks ekstraseluler yang terutama terdiri atas serat kolagen dengan bahan dasar proteoglikans dan glukoprotein serta serat oksitalin. Pada PDL juga terdapat beberapa sel yaitu fibroblas, osteoblas, osteoklas dan sementoblas, selain itu masih ada sel lain misalnya makrofag, dan kadang-kadang terdapat sisa-sisa sel Malassez serta banyak pembuluh darah kapiler yang merupakan pleksus (Rahardjo, 2009).

Skeleton secara kontinyu mengalami remodeling sepanjang hidup melalui resorpsi oleh osteoklas dan pembentukan tulang baru oleh osteoblas. Peristiwa ini terjadi bergantian untuk mempertahankan integritas struktur tulang. Remodeling dipelopori oleh osteoblas dan melibatkan suatu jaringan kerja yang kompleks dari interaksi sel-sel dan sel matriks yang melibatkan hormon, sitokin, faktor pertumbuhan, yang kebanyakan terpusat di matriks tulang dan lingkungan mekanis dari sel-sel (Meikle, 2006).



Gambar 2.1 Aplikasi tekanan ortodontik pada gigi (Nanda, 2005)

Ortodonti dan ortopedi berhubungan dengan remodeling, sehingga memerlukan pengetahuan tentang biologi tulang, terutama yang berhubungan dengan tekanan mekanis dan berbagai jenis pada tulang. Akan tetapi, proses pergerakan gigi lebih rumit karena memerlukan perubahan-perubahan pada ligamentum periodontal dan juga tulang alveolar pendukung, yang mempunyai populasi sel dan ciri-ciri remodeling yang berbeda. Tulang alveolar menerima beban secara intermitent selama pengunyahan, tetapi mengalami deformasi atau tekanan secara kontinyu dan jika dikenai tekanan yang memadai akan terjadi *bone bending* dari alveolar. Tulang alveolar mengalami resorpsi dan deposisi selama pergerakan gigi ortodonti yang selanjutnya tergantung dari besar, arah dan durasi dari tekanan yang diberikan (Meikle, 2006).

Tekanan yang besar menyebabkan ligamen periodontal akan tertekan sehingga terjadi trombosis kapiler, kematian sel dan terbentuk area terlokalisasi yang bebas sel atau hialinisasi karena mirip kartilago hialin. Pada sisi ini, resorpsi osteoklas pada dinding alveolar di dekatnya tidak terjadi secara langsung, tetapi

dimulai oleh suatu proses yang disebut resorpsi *undermining* dari ruang sumsum di dekatnya (Person, 2005).

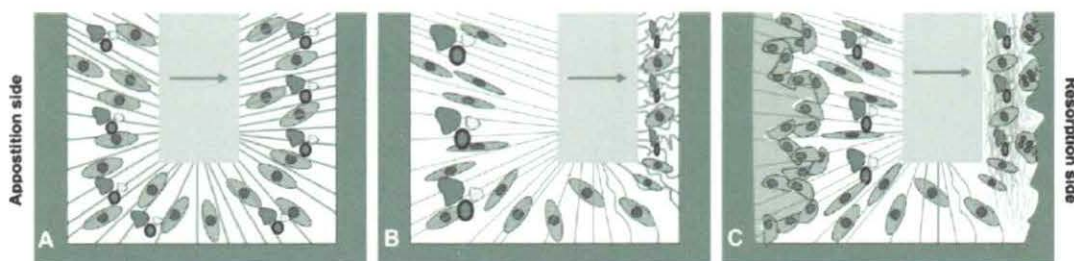
### 2.1.1 Teori Pergerakan Gigi

Ada berbagai teori pergerakan gigi, secara umum dapat dibagi :

#### 1. *Pressure Tension Theory*

Lebih dari 100 tahun yang lalu Sandstedt, Oppenheim dan Scwharz menyatakan bahwa jika gigi mendapatkan gaya ortodonti maka akan terjadi daerah tekanan dan regangan. Daerah tekanan adalah daerah periodonsium yang mengalami tekanan karena gigi bergerak mendekat dan daerah tarikan adalah daerah periodonsium yang mengalami tarikan karena gigi bergerak menjauh. Daerah tekanan akan mengalami resorpsi tulang sedangkan daerah tarikan akan mengalami aposisi tulang. Di sisi tekanan, dengan tekanan ringan, tulang alveolar yang diresorpsi langsung oleh banyak multinukleat osteoklas di *Howship lacunae* (Meikle, 2006).

Penelitian histologis klasik tentang pergerakan gigi oleh Sandstedt (1904), Oppenheim (1911), dan Schwarz (1932) menyebabkan mereka berhipotesis bahwa gigi bergerak dalam ruang periodontal dengan menghasilkan sisi tekanan dan sisi tarikan. Hipotesis pada sisi tekanan, PDL menunjukkan adanya disorganisasi dan berkurangnya produksi serat. Di sisi tarikan, peregangan serat PDL mestimulasi peningkatan replikasi sel. Aktivitas proliferasi menyebabkan peningkatan produksi serat (Krishnan and Davidovitch, 2006).



Gambar 2.2 Skema pergerakan gigi (a) Gaya eksternal diaplikasikan (tanda panah). (b) Pada sisi aposisi, serat meregang. Serat tertekan pada sisi resorpsi. (C) Setelah aplikasi gaya dalam waktu lama, formasi tulang oleh osteoblast dapat dilihat pada sisi aposisi dan resorpsi tulang oleh osteoklas pada sisi resorpsi.

## 2. *Blood Flow Theory*

Teori ini disebut juga sebagai *fluid dynamic theory* yang diperkenalkan oleh Bien pada tahun 1966. Berdasar teori ini, pergerakan gigi timbul karena cairan yang dinamis di dalam PDL. PDL terdapat pada ruangan periodontal yang dibatasi oleh permukaan akar gigi dan tulang alveolar, terdiri dari sistem cairan yang terbuat dari cairan interstitial, elememn selular, pembuluh darah dan perlekatan substansi dasar berisi serat-serat periodontal. Kandungan PDL menghasilkan kondisi hidrodinamik yang unik dan menyerupai mekanisme hidrolik dan *shock absorber* (Singh, 2004). Aplikasi gaya eksternal pada gigi menyebabkan terjadinya pergerakan cairan di dalam kanalikuli. Ketika cairan kanalikuli berkurang, terjadilah apoptosis osteosit yang terdapat dalam tulang kemudian akan menarik osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang (Henneman *et al*, 2008).

## 3. *Bone Bending and Piezoelectric Theory*

*Bone bending* pada tulang alveolar merupakan hal yang penting dalam pergerakan gigi secara ortodonti, hal ini pertamakali dikemukakan oleh Farrar (1988). Ketika alat ortodonti diaktivasi, gaya yang diberikan pada gigi disalurkan

ke semua jaringan di sekelilingnya sehingga gigi akan bergerak lebih besar dibandingkan dengan lebar PDL yang menyebabkan terjadinya defleksi pada tulang alveolar. Defleksi pada tulang juga memicu keluarnya potensial elektrik pada permukaan tulang atau *piezoelectric* yang sering ditemukan pada material kristalin (Krishnan and Davidovitch, 2006).

Deformasi atau perubahan bentuk struktur kristal menghasilkan arus listrik seperti elektron yang berpindah dari molekul kristal yang satu ke molekul kristal yang lain. Bila struktur kristal mengalami deformasi, elektron bermigrasi sehingga terjadi aliran listrik. Jika terdapat tekanan maka struktur kristal masih stabil dan tidak terjadi perpindahan elektron, namun jika tekanan dilepaskan, kristal akan kembali ke bentuk semula dan aliran elektron akan terjadi pada arah yang berlawanan. Sumber struktur kristal tidak hanya pada mineral tulang, tapi terdapat juga pada kolagen, hidroksi apatit, batas antara kolagen hidroksiapatit dan mukopolisakarida pada substansi dasar. Pada saat gigi diberi tekanan, tulang alveolar di sekitarnya akan mengalami tekukan. Daerah yang cekung diasosiasikan dengan arus negatif dan menyebabkan deposisi tulang sedangkan daerah yang cembung diasosiasikan dengan arus positif dan menyebabkan resorpsi tulang (Singh, 2004).

### **2.1.2 Tahap-Tahap Pergerakan Gigi**

Pergerakan gigi ortodontik menurut Burstone (1962) terdiri dari tiga fase: *Initial phase*, *Lag phase* dan *Postlag phase* (Krishnan and Davidovitch, 2006; Arifin *et al*, 2011).

### *1. Initial phase*

Tahap awal ditandai dengan gerakan segera dan cepat dan terjadi 24 jam sampai 48 jam setelah aplikasi pertama kekuatan untuk gigi dan merupakan gerakan awal dari gigi dalam soket tulang. Tingkat ini sebagian besar disebabkan oleh perpindahan gigi di ruang PDL. Reaksi seluler dan jaringan dimulai pada fase awal perpindahan gigi, segera setelah aplikasi kekuatan. Karena kompresi dan peregangan dari serat dan sel tekanan PDL dan daerah ketegangan, masing-masing proses kompleks perekrutan osteoklas dan nenek moyang osteoblas, serta ekstrasvasi dan chemoattraction sel-sel inflamasi, dimulai (Krishnan and Davidovitch, 2006).

### *2. Lag phase*

Berlangsung 20 sampai 30 hari dan menunjukkan yang relatif sedikit atau tidak ada perpindahan gigi. Fase ini ditandai dengan terjadinya hialianisasi PDL di wilayah kompresi. Tidak ada gerakan selanjutnya gigi terjadi sampai sel menyelesaikan penghapusan semua jaringan nekrotik. Kehadiran zona hialinisasi di daerah tekanan dibuktikan dalam percobaan terakhir bahkan di tahap awal. Pada tahap kedua, daerah kompresi yang mudah diakui oleh penampilan terdistorsi normal pengaturan serat PDL. Gangguan aliran darah karena distorsi ini mengarah pada pengembangan daerah hialinisasi dan penangkapan perpindahan gigi, yang dapat berlangsung dari 4 sampai 20 hari. Hanya penghapusan jaringan nekrotik dan resorpsi tulang sumsum yang berdekatan (tidak langsung resorpsi) dan dari arah dari PDL (*undermining resorbtion*) memungkinkan pergerakan gigi. Proses komprehensif membutuhkan perekrutan sel fagosit seperti makrofag, *giant cells bodies*, dan osteoklas dari daerah

tidak rusak yang berdekatan dari PDL dan rongga alveolar sumsum tulang. Sel-sel ini bertindak tandem untuk menghapus jaringan nekrotik dari kompresi area PDL dan tulang alveolar yang berdekatan. Di daerah-daerah tarikan, osteoblas diam (lapisan permukaan tulang sel) yang membesar dan mulai memproduksi matriks tulang baru (Osteoid). Nenek moyang osteoblas baru direkrut dari populasi *fibroblast-like cells* (pericytes) sekitar kapiler PDL. preosteoblas Ini berkembang biak dan bermigrasi ke arah permukaan tulang alveolar, bersama membentang serat Sharpey. Bersamaan, fibroblas PDL di zona tarikan mulai bertambah banyak dan *remodelling* matriks sekitarnya (Singh, 2004).

### 3. *Postlag phase*

Mengikuti *lag fase*, di mana tingkat pergerakan meningkat. Pergerakan gigi dipercepat, sebagian besar pergerakan gigi total selama perawatan ortodontik. Juga dikenal sebagai percepatan dan linier tahap, masing-masing mulai sekitar 40 hari setelah awal aplikasi kekuatan. Tekanan sisi gigi menunjukkan serat kolagen tanpa orientasi yang tepat. Di sini, permukaan tulang yang tidak teratur ditemukan, menunjukkan resorpsi langsung atau resorpsi frontal. Namun, sebuah laporan baru-baru ini mempresentasikan data pada zona hialinisasi pada daerah tekanan bahkan selama tahap ini, terutama di daerah di mana tekanan yang tinggi diberikan. Temuan ini menunjukkan bahwa pembangunan selama perpindahan gigi, bukan peristiwa tunggal. Kesimpulan ini didukung oleh Melsen yang hypothesis bahwa "resorpsi tulang langsung di sisi tekanan tidak reaksi terhadap kekerasan tetapi upaya untuk menghapus iskemik tulang terjadi berdekatan dengan jaringan hialin. Selanjutnya

resorpsi tulang langsung bisa dianggap sebagai bagian dari proses renovasi (Krishnan and Davidovitch, 2006; Singh, 2004).

Tabel 2.1 Respon fisiologis jaringan terhadap gaya yang diaplikasikan pada gigi (Proffit, 2007)

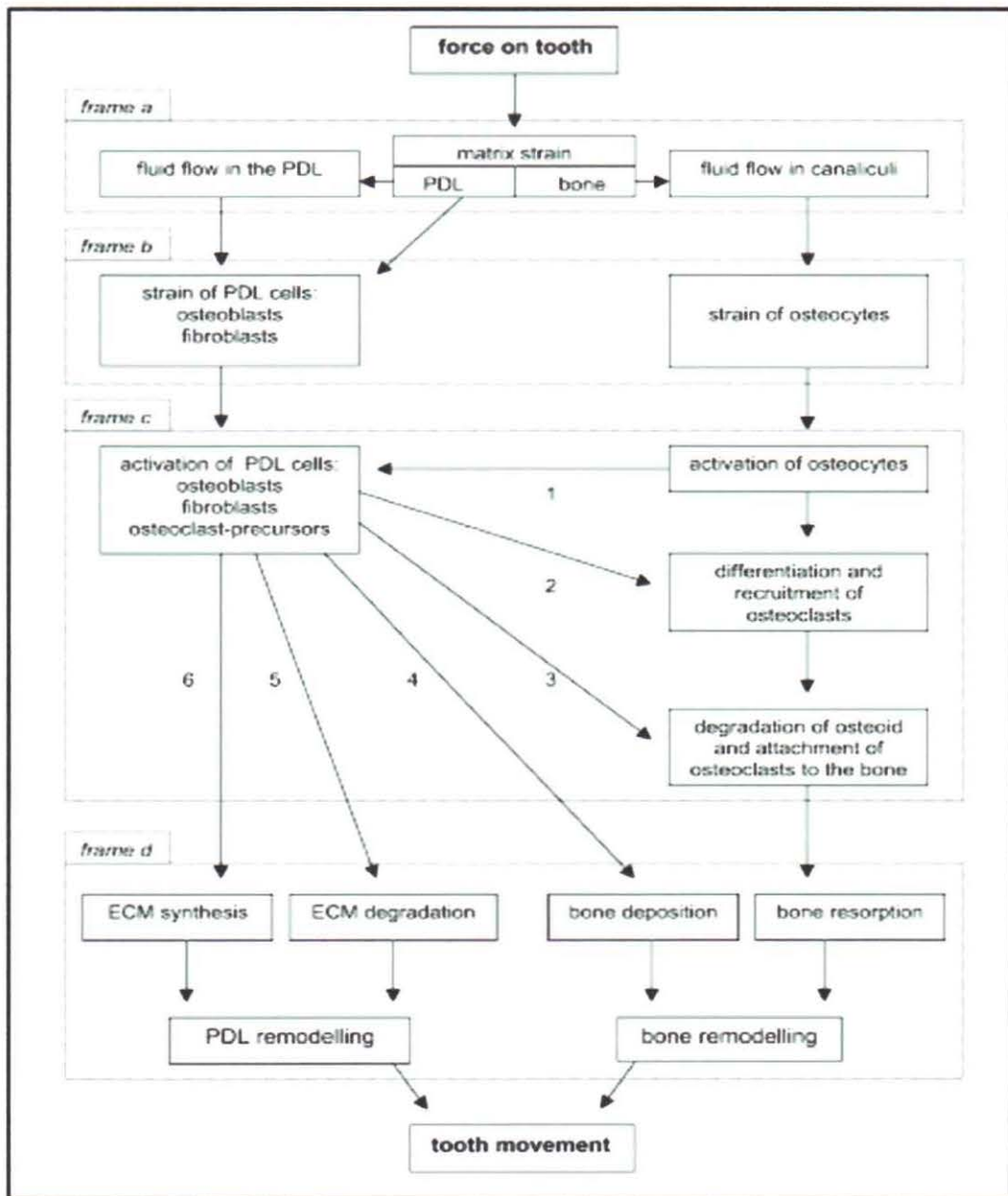
| Waktu       |            | Peristiwa                                                                                   |
|-------------|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gaya Ringan | Gaya Berat |                                                                                             |
| < 1 detik   | < 1 detik  | Cairan PDL tertekan, tulang alveolar menekuku, sinyal piezoelektrik terjadi.                |
| 1-2 detik   | 1-2 detik  | Cairan PDL keluar, gigi bergerak sebatas ruang PDL                                          |
| 3-5 detik   |            | Pembuluh darah pada PDL menyempit pada daerah tekanan, dan melebar pada daerah regangan     |
| Menit       |            | Perubahan aliran darah, perubahan pada oksigen darah, PGE dan sitokin dilepasakan           |
| Jam         |            | Perubahan metabolisme: aktivitas seluler berubah                                            |
| 4 jam       |            | Peningkatan cAMP, diferensiasi sel PDL                                                      |
| 2 hari      |            | Pergerakan gigi terjadi karena osteoklas dan osteoblast me-remodeling tulang disekitar gigi |
|             | 3-5 detik  | Pembuluh darah pada PDL tertutup pada sisi tekanan                                          |
|             | Menit      | Aliran darah pada daerah tekanan tertutup                                                   |
|             | Jam        | Kematian sel-sel pada daerah tekanan                                                        |
|             | 3-5 hari   | Mulai terjadi <i>undermining resorption</i>                                                 |
|             | 7-14 hari  | <i>Undermining resorption</i> sampai pada lamina dura dan terjadi pergerakan gigi           |

2.1.3 Mekanisme Seluler dan Molekuler

Aplikasi tekanan yang kontinyu pada mahkota gigi akan menuntun pergerakan gigi dalam alveolus yang ditandai oleh penyempitan membran periodontal terutama daerah marginal. Setelah beberapa periode tertentu, osteoklas berdiferensiasi sepanjang dinding tulang alveolar, biasanya pada usia muda terjadi setelah 30-40 jam. Fase awal pergerakan gigi secara ortodontik selalu melibatkan respons inflamasi akut yang ditandai oleh vasodilatasi kapiler dan migrasi leukosit ke kapiler. Sel-sel yang bermigrasi ini memproduksi berbagai sitokin. Sitolin ini merangsang sintesis dan sekresi berbagai substansi untuk sel target seperti

prostaglandin, *growth factor* dan berbagai sitokin (Krishnan and Davidovitch, 2006).

Inflamasi akut yang terjadi merupakan *initial phase* dan bersifat eksudatif. 1 atau 2 hari kemudian fase inflamasi akut menjadi inflamasi kronik bersifat proliferaatif yang melibatkan fibroblas, sel-sel endotel, osteoblas dan sel-sel tulang alveolar. Selama periode ini leukosit terus bermigrasi ke jaringan paradental dan mengatur proses *remodelling* (Capelli *et al*, 2010) Ada dua jalur pergerakan gigi menurut Mostafa *et al* yaitu jalur I dan jalur II. Jalur I: pada jalur ini tekanan ortodontik menciptakan tekanan dan tarikan, mengarah pada *bone bending*, menimbulkan polarisasi bioelektrik jaringan dan *remodelling* tulang berikutnya. Jalur ini juga menggambarkan arah atau kontrol pergerakan gigi dengan bantuan antara bagian cekung dan cembung tulang alveolar yang mengalami tarikan. Jalur II: jalur alternatif selain jalur klasik dalam pergerakan gigi. Tekanan ortodontik bersamaan dengan peningkatan permeabilitas vaskular dan infiltrasi selular memicu proses inflamasi pada gigi dan jaringan paradental. Limfosit, monosit dan makrofag menginvasi jaringan ini, mempertinggi pelepasan prostaglandin dan sekresi enzim hidrolitik. Peninggian lokal prostaglandin dan berikut peningkatan pada konsentrasi cAMP selular meningkatkan aktivitas osteoklas. Pengeluaran enzim hidrolitik seperti Kolagenase, melarutkan matriks ekstraselular yang secara mekanis menerima tarikan (Krishnan and Davidovitch, 2006).



Gambar 2.3 Teori pergerakan gigi. Grafik diatas menunjukkan empat tahapan berbeda pada pergerakan gigi. Tahapan (a) mewakili *matrix strain* dan *fluid flow*, (b) cell strain, (c) aktivasi dan differensiasi sel, dan (d) remodeling ligament periodontal (PDL) dan tulang (Henneman, 2008)

## 2.2 Nuclear Factor Of Activated T-Cells (NFAT)

### 2.2.1 Struktur dan Peran NFAT

Protein NFAT terdapat dalam sitoplasma *resting cells*; selama aktivasi NFAT difosforilasi oleh *calmodulin-dependent phosphatase calcineurin* dan

dipindahkan menuju nukleus. Meskipun fenomena dasar ini telah diketahui, namun mekanisme yang terlibat masih belum jelas (Kiani., et al, 2000)

*NFAT transcription factors* mempunyai peran utama dalam regulasi transkripsi gen, namun mekanisme tepatnya bagaimana NFAT meregulasi respon seluler belum sepenuhnya dipahami. Kebanyakan studi mengenai sel T, NFAT berimplikasi pada regulasi dari multiple sitokin dan molekul regulator lainnya, termasuk interleukin-2 (IL-2), IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, GM-CSF, interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor nekrosis faktor (TNF)- $\alpha$ , CD40 ligand (CD154) dan CD95 ligand (FasL); beberapa studi lanjutan belum menunjukkan adanya keterlibatan protein NFAT pada respon imun dari limfosit B, *NK cells*, makrofag, *mast cell* dan eosinofil, dibandingkan dengan yang lain. Famili NFAT terdiri atas paling tidak empat *calcium-regulated members*, NFATc1 (NFATc, NFAT2), NFATc2 (NFATp, NFAT1), NFATc3 (NFAT4, NFATx), dan NFATc4 (NFAT3), masing-masing menunjukkan gambaran ekspresi jaringan yang khas dan memainkan peran yang berbeda-beda pada transkripsi gen. Meskipun berbeda, bagaimanapun juga, NFATs menunjukkan adanya mekanisme aktivasi yang hampir sama, dimana aktifasinya dimediasi oleh reseptor sel T, reseptor sel B, dan/atau molekul tambahan seperti CD40 yang mengaktifasi cyclosporinsensitive, calcium-regulated phosphatase calcineurin, yang mendesforilasi sitoplasmik NFATs dan memungkinkan mereka translokasi menuju nukleus dan dengan demikian membantu dalam transkripsi gen (Peng et al., 2001).

Tabel 2.2 *NFAT Family* (Kiani, et al., 2000)

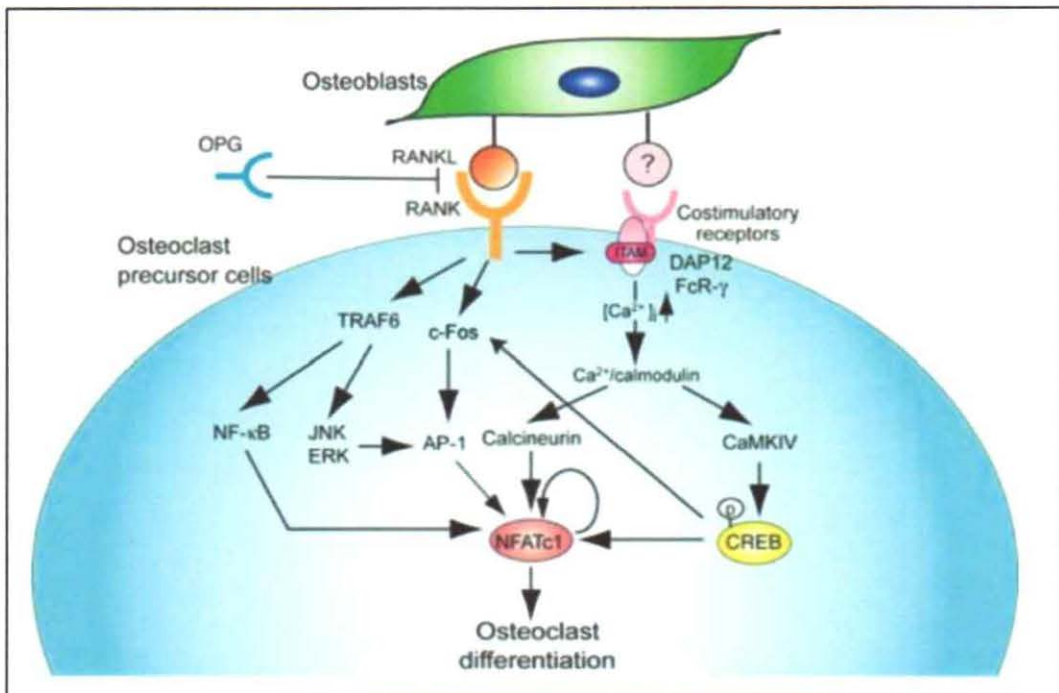
| NFAT Protein    | Keberadaan dalam Sel Imun? | Gambaran Lainnya                                                                                            | Fenotip pada Tikus                                                                                   |
|-----------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NFAT1 (p, c2)   | Ya                         | 80%-90% dari total NFAT pada <i>resting immune cells</i>                                                    | Meningkatkan produksi IL-4, <i>Th2 bias</i> (menunda penutupan transkripsi IL-4)                     |
| NFAT2 (c, c1)   | Ya                         | Satu isoform diinduksi selama aktivasi                                                                      | <i>Embryonic lethality</i> ( <i>heart valve defect</i> )<br>Limfosit menghasilkan lebih sedikit IL-4 |
| NFAT3 (c4)      | Tidak                      | Terlibat dalam kardiak hipertropi                                                                           | Layak dan subur<br>Gambaran fenotip lebih detail belum dilaporkan                                    |
| NFAT4 (x, c3)   | Ya                         | Terekspresi tinggi pada <i>thymocytes</i>                                                                   | Defek pada bagian positif <i>thymocytes</i>                                                          |
| NFAT5 (Ton EBP) | Ya                         | Nuklear, bukan sitoplasmik<br>Bukan <i>calcineurin-regulated</i><br>Tidak berhubungan dengan <i>Fos/Jun</i> | <i>Knockouts</i> belum ada<br>NFAT5 tidak dimplikasi pada regulasi gen target NFAT konvensional      |

NFAT merupakan lima faktor transkripsi (NFATc1 hingga c4 dan NFAT5) yang terlibat dalam perkembangan vertebrata dan pada pertumbuhan dan diferensiasi berbagai tipe sel (Mammucari et al., 2005; Heit et al., 2006; Smerdel-Ramoya et al., 2010). Pada sel yang tidak terstimulasi, NFATc1 hingga c4 difosforilasi sangat tinggi dan tertinggal dalam sitoplasma. Aktivasi *phosphatase calcineurin dephosphorylates specific residue residues* pada SRR dan SPXX mengulang bentuk dari regulator utama NFAT. Hal ini mengakibatkan translokasi NFAT pada nukleus dan aktivasi transkripsi gen target NFAT (Okamura et al., 2000).

2.2.2 NFATc1 dan Perkembangan Tulang

Homeostasis sistem tulang dijaga dengan proses remodeling tulang, yang tergantung pada keseimbangan antara pembentukan tulang oleh osteoblas dan

resorpsi tulang oleh osteoklas (Karsenty et al, 2002). NFATc1 merupakan faktor transkripsi krusial bagi diferensiasi osteoklas dan inhibitor calcineurin yang mencegah osteoclastogenesis in vitro dengan menekan induksi NFATc1 yang distimulasi oleh sitokin untuk osteoclastogenesis, reseptor activator NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) (Takayagi et al., 2002).



Gambar 2.4. Skema kaskade signaling pada diferensiasi osteoklas. Osteoclastogenesis didukung oleh osteoblast atau *bone marrow stromal cell*, yang menyediakan RANKL, M-CSF, dan sedikit ligand karakteristik untuk *costimulatory receptors*. RANKL berikatan dengan RANK hasil dari perekrutan TRAF6, yang mengaktifkan NF- $\kappa$ B dan MAPKs. Induksi NFATc1, faktor transkripsi kunci osteoclastogenesis, tergantung pada faktor transkripsi AO-1 (termasuk c-Fos) dan NF- $\kappa$ B. *Costimulatory signal* untuk RANK: imunoreseptor berkaitan dengan ITAM-harboring adaptors menstimulasi  $Ca^{2+}$  signaling. NFATc1 dipindahkan ke nukleus setelah defosforilasi oleh calcineurin yang diaktifkan oleh kalsium ( $Ca^{2+}$ ) signaling.  $Ca^{2+}$ /calmodulin kinase IV merupakan kinase utama yang mengaktifkan *cAMP response element-binding protein* (CREB), yang juga penting untuk diferensiasi osteoklas. Induksi c-Fos sebagian dimediasi oleh CREB. Di nukleus, NFATc1 bekerja bersama dengan faktor transkripsi lain, seperti AP-1, PU.1, MITF, dan CREB, untuk menginduksi berbagai gen osteoklas spesifik (Takayanagi., 2007).

## 2.3 Run-related Transcription Factor 2 (RUNX2)

### 2.3.1 Struktur dan Peran RUNX2

*Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) merupakan *multifunctional transcription factor* yang mengatur diferensiasi kondrosit dan osteoblas dan ekspresi banyak protein gen matriks ekstraseluler selama pembentukan tulang (Komori., 2010). Kerangka vertebrata terdiri atas kartilago dan tulang. Tulang dibentuk melalui osifikasi baik intramembran dan endochondral. Osteoblas secara langsung membentuk tulang intramembran, dimana kondrosit pertama-tama membentuk rangka kartilago yang kemudian digantikan dengan tulang oleh osteoblast dan osteoklas melalui proses osifikasi endokondral. Pada diferensiasi kondrosit, setelah kondensasi mesenkim, *pluripotent mesenchymal cells* berdiferensiasi menjadi kondrosit yang *immature*, yang memproduksi kolagen tipe II dan proteoglikan. Kondrosit *immature* kemudian berdiferensiasi menjadi kondrosit hipertropik, yang mengekspresikan *Col10a1*, dan akhirnya menjadi kondrosit hipertropik terminal, yang mengekspresikan *Spp1* (*secreted phosphoprotein 1/osteopontin*), *Ibsp* (*integrin-binding sialoprotein/bone sialoprotein II*), dan *MMP13* (*matrix metalloproteinase 13*) (Marks and Odgren., 2002). Pada diferensiasi osteoblast, RUNX2, SP7 dan canonical Wnt signaling memiliki peran penting dalam proses *pluripotent mesenchymal cells* menuju *osteoblastic lineage* (Komori., 2006). Setelah berada pada *osteoblastic lineage*, osteoblast mengekspresi gen matriks protein tulang pada berbagai level sel (Komori., 2010).

### 2.3.2 Ekspresi RUNX2 Selama Perkembangan Tulang

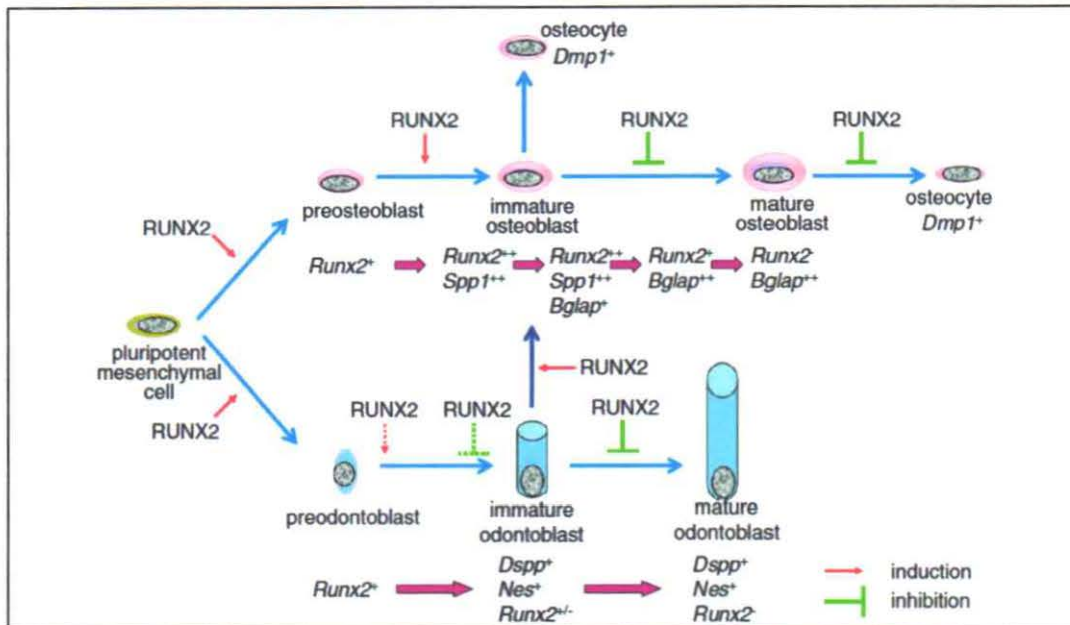
RUNX2 diekspresi oleh dua isoform yang memiliki *N-termini* berbeda (RUNX2 tipe I dimulai dengan urutan MRIPV dan RUNX2 tipe II dimulai dengan urutan MASNS) dan keduanya diekspresikan oleh promotor yang berbeda. Baik mRNA RUNX2 tipe I dan tipe II diekspresikan oleh kondrosit dan osteoblas, meskipun mRNA RUNX2 tipe II utamanya diekspresikan oleh osteoblas (Enomoto *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002). Kedua isoform memiliki kemiripan fungsi tetapi berbeda dalam ketergantungannya dengan CFBF, yang merupakan *essential co-transcription factor* RUNX2 (Kundu *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002; Kanatani *et al.*, 2006).

Selama perkembangan kerangka, baik tipe I dan tipe II mRNA RUNX2 diekspresi lemah dalam proliferasi kondrosit, ekspresinya diregulasi sebagai diferensiasi kondrosit, dan baik mRNA RUNX2 tipe I dan tipe II diekspresi tinggi dalam kondrosit dengan tahapan maturasi dari kondrosit prehipertropik hingga hipertropik (Enomoto *et al.*, 2000; Stricker S *et al.*, 2002). Selama perkembangan diferensiasi osteoblast, ekspresi mRNA RUNX2 dan protein RUNX2 berubah secara dinamis, dan ekspresi SPP1 dan BGLAP dapat digunakan sebagai tanda proses dinamis ini. Selama perkembangan tulang intramembran, RUNX2 secara kuat terdeteksi dalam preosteoblast, *osteoblast immature*, dan awal *mature osteoblast*. Pada tikus liar yang berumur 1 minggu, preosteoblast dalam periosteum mandibula mengekspresikan adanya RUNX2 tetapi tidak dengan SPP1 dan BGLAP yang terdapat didalam mandibula, baik *SPP1-positif immature osteoblast* dan BGLAP-positif *early mature osteoblast* mengekspresikan RUNX2. Selama

perkembangan tulang endokondral, RUNX2 yang pertama kali dapat dideteksi pada sel mesenkim pada region perichondrial: di femur pada umur 1 minggu, preosteoblas pada region perichondrial dikelilingi proliferasi dan prehipertropik kondrosit yang mengekspresikan RUNX2 tetapi bukan SPP1 atau BGLAP; *osteoblast immature* dikelilingi lapisan hipertropik kondrosit yang mengekspresikan RUNX2 dan SPP1 tetapi tidak BGLAP; BGLAP-positif *early mature osteoblas*, yang mengekspresikan RUNX2, muncul pada tulang metafiseal kortikal. Selama perkembangan tulang yang panjang, osteoblas pada metafisis kurang matang dibandingkan pada diafisis; pada femur saat umur 4 minggu, *SPP1-positif immature osteoblast* mengekspresi RUNX2 dengan tinggi dan *BGLAP-positif mature osteoblast* mengekspresikan RUNX2 dengan rendah pada metafisis, dimana RUNX2 dan SPP1 tidak dapat terdeteksi dengan imunohistokimia pada kebanyakan *BGLAP-positif late mature osteoblast* pada diafisis meskipun mRNA RUNX2 dan SPP1 dapat terdeteksi dengan hibridasi insitu. Jadi, RUNX2 diekspresi dalam preosteoblas, dimana tidak mengekspresikan SPP1 dan BGLAP, yang terekspresi dengan tinggi pada *SPP1-positif immature osteoblast*, dan kemudian diekspresikan pada *BGLAP-positif early mature osteoblast*, tapi ekspresi RUNX2 akhirnya regulasinya turun di *BGLAP-positif late mature osteoblast* (Maruyama *et al.*, 2007).

### 2.3.3 Diferensiasi Osteoblas dan Pematangan Tulang

Pada tikus transgenik over-ekspresi RUNX2 dikontrol oleh 2.3-kb *Colla1 promoter*, tulang kortikal memiliki struktur *woven-bone like structure*, massa tulang



Gambar 2.5. Regulasi diferensiasi osteoblast dan odontoblast oleh RUNX2. RUNX2 mengarahkan *pluripotent mesenchymal cells* menuju *osteoblast lineage*, meningkatkan jumlah osteoblast immature, tetapi menghambat maturasi osteoblast. Preosteoblast mengekspresikan RUNX2. Osteoblast immature mengekspresikan RUNX2 dan SPP1 dan, kemudian, BGLAP. Osteoblast mature mengekspresikan BGLAP, tetapi regulasi ekspresi RUNX2 turun. Osteosit mengekspresikan DMP1. Transisi osteoblast immature menjadi osteosit muncul pada tahap awal perkembangan tulang. Prekursor umum osteoblast dan odontoblast dibatasi untuk *neural-crest-derived mesenchymal cells*, namun proses basal diferensiasi osteoblast adalah sama dengan di *neural-crest-derived* dan *non-neural-crest-derived pluripotent mesenchymal cells*. Diferensiasi preodontoblast dari *neural-crest-derived pluripotent mesenchymal cells*. RUNX2 penting untuk diferensiasi *pluripotent mesenchymal cells* menjadi preodontoblast. RUNX2 juga memungkinkan untuk menginduksi diferensiasi preodontoblast menjadi odontoblast immature pada tahap awal namun bersifat sebagai penghalang pada tahap akhir. Preodontoblast mengekspresikan RUNX2, odontoblast immature mengekspresikan DSPP dan NES tetapi sedikit RUNX2, dan osteoblast mature mengekspresikan DSPP dan NES tetapi tidak RUNX2. Ekspresi RUNX2 regulasinya turun selama diferensiasi odontoblast, dan RUNX2 menghambat diferensiasi terminal odontoblast. Over-ekspresi RUNX2 menginduksi transdiferensiasi odontoblast menjadi osteoblast (SPP1 mensekresi phosphoprotein 1/osteopontin, BGLAP bone gamma-carboxyglutamate [gla] protein/osteocalcin, DSPP *dentin sialophosphoprotein*, NES *nestin*, DMP1 *dentin matrix protein 1*) (Komori., 2010).

kortikal tetapi bukan massa tulang trabekular yang banyak tereduksi, dan reduksi pada massa tulang kortikal disebabkan oleh akselerasi resorpsi yang dikarenakan oleh peningkatan perekrutan dan aktifitas osteoklas (Liu *et al.*, 2001; Geoffroy *et al.*, 2002; Kanatani *et al.*, 2006). Hal ini dikarenakan komposisi *immature* dari tulang kortikal, yang terdiri atas abundant SPP1 dengan *small cell attachment motif* (Arg-Gly-Asp [RGD]); RGD terbentuk oleh integrasi dan mendorong perlekatan

osteoklas menuju matriks ekstraseluler (Komori., 2010). Ekspresi IBSP, yang juga memiliki motif RGD, meningkat di RUNX2 tikus transgenik dibawah kontrol 2.3-kb *Colla1 promoter* (Liu *et al.*, 2001; Geoffroy *et al.*, 2002) dan mungkin juga berkontribusi akselerasi resorpsi tulang kortikal (Komori., 2010).

Secara kontras, volume tulang trabecular meningkat tanpa deselerasi osteoclastogenesis pada RUNX2 tikus transgenik dewasa di bawah kontrol 2.3-kb *Colla1 promoter* (Maruyama *et al.*, 2007). Perluasan mineralisasi pada tulang trabekular tinggi pada dn-RUNX2 tikus transgenik dibandingkan tikus liar. Selanjutnya, meskipun serat kolagen dideposit dengan longgar pada orientasi bebas pada tulang trabekular tikus liar, serat kolagen dibentuk secara padat dan teratur pada tulang trabekular dn-RUNX2 tikus transgenik. Jadi, RUNX2 mengarahkan *multipoten mesenchymal cells* menuju *osteoblast lineage* dan mencetuskan ekspresi matriks protein gen tulang mayor, yang menyebabkan peningkatan pada *osteoblast immature*, yang membentuk tulang *immature*. Bagaimanapun, regulasi ekspresi RUNX2 harus turun untuk fenotip osteoblast yang telah *mature* seutuhnya, yang membentuk tulang *mature*, yang akan diperoleh (Gambar 2.5 dan 2.6) (Komori., 2010).

## **BAB 3**

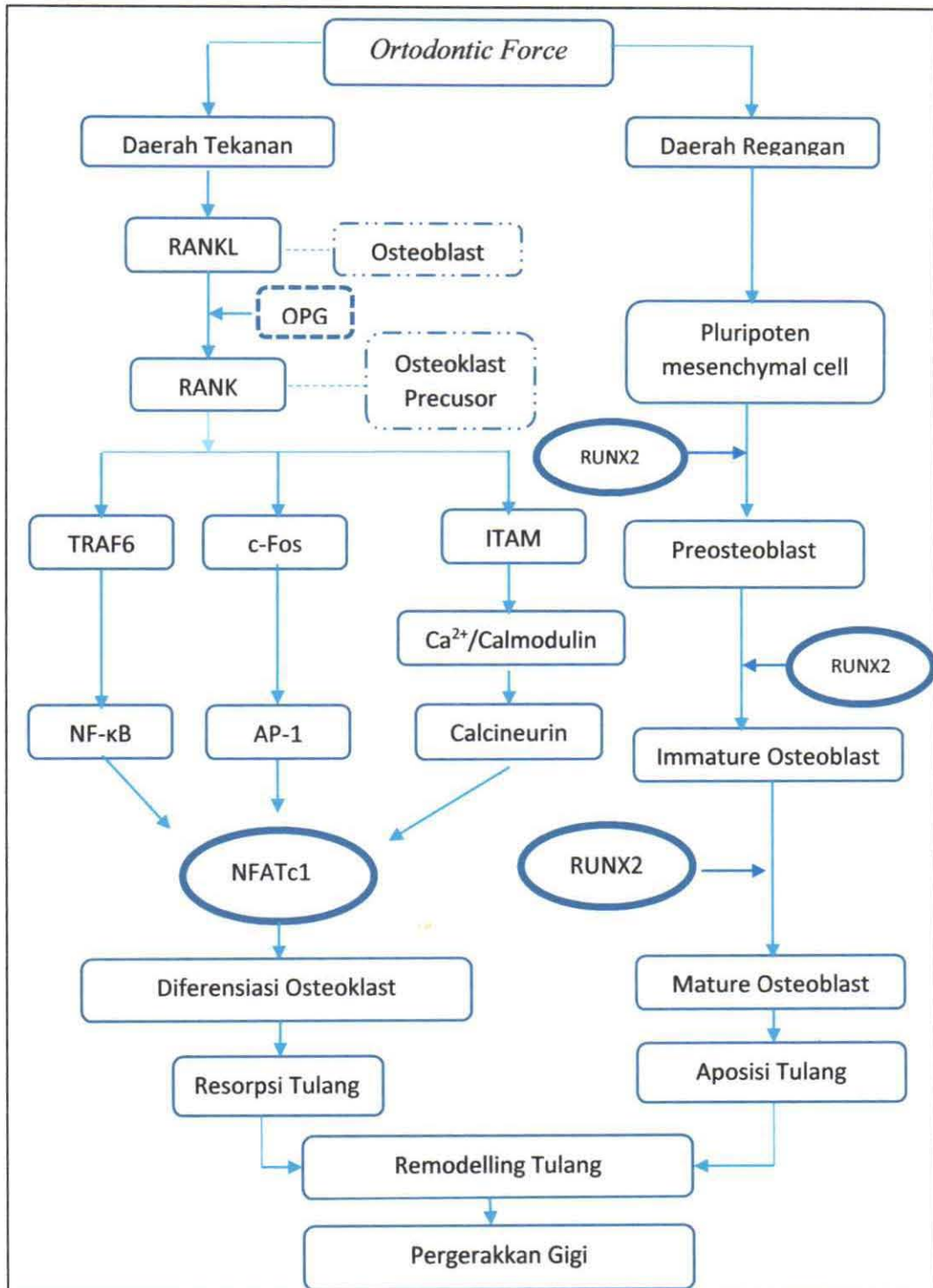
# **KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN**



### BAB 3

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual



### 3.2 Penjelasan Kerangka Konseptual

Tekanan ortodonti diartikan sebagai pemberian gaya pada gigi dengan tujuan untuk menggerakkan gigi. Pergerakan gigi ortodonti adalah hasil remodeling jaringan periodontal dan jaringan tulang karena adanya kekuatan mekanis. Kekuatan mekanis yang diberikan akan menghasilkan daerah “tekanan” dan regangan” pada jaringan gigi.

Kekuatan mekanis dari peranti ortodonti akan menghasilkan tekanan. Tekanan ini menginduksi regangan yang merubah vaskularisasi dan aliran darah, yang menghasilkan sintesis lokal dan menyebabkan pengeluaran berbagai molekul kunci, seperti neurotransmitter, sitokin, *growth factor*, *colony-stimulating factor*, dan metabolit asam arachidonat. Molekul ini dapat merangsang respon sel oleh berbagai tipe sel didalam dan disekitar gigi, menyediakan lingkungan mikro yang sesuai untuk aposisi dan resorpsi jaringan.

Osteoclastogenesis didukung oleh osteoblas atau *bone marrow stromal cell*, yang menyediakan RANKL, M-CSF, dan sedikit ligand karakteristik untuk *costimulatory receptors*. RANKL berikatan dengan RANK hasil dari perekrutan TRAF6, yang mengaktifkan NF- $\kappa$ B dan MAPKs. Induksi NFATc1, faktor transkripsi kunci osteoclastogenesis, tergantung pada faktor transkripsi AO-1 (termasuk c-Fos) dan NF- $\kappa$ B. *Costimulatory signal* untuk RANK: imunoreseptor berkaitan dengan ITAM-harboring adaptors menstimulasi Ca<sup>2+</sup> signaling. NFATc1 dipindahkan ke nukleus setelah defosforilasi oleh calcineurin yang diaktifkan oleh kalsium (Ca<sup>2+</sup>) signaling. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase IV merupakan kinase utama yang mengaktifkan *cAMP response element-binding protein* (CREB), yang juga penting

untuk diferensiasi osteoklas. Induksi c-Fos sebagian dimediasi oleh CREB. Di nukleus, NFATc1 bekerja bersama dengan faktor transkripsi lain, seperti AP-1, PU.1, MITF, dan CREB, untuk menginduksi berbagai gen osteoklas spesifik (Takayanagi., 2007).

RUNX2 mengarahkan *pluripotent mesenchymal cells* menuju *osteoblast lineage*, meningkatkan jumlah *osteoblast immature*, tetapi menghambat maturasi osteoblas. Preosteoblas mengekspresikan RUNX2. *Osteoblast immature* mengekspresikan RUNX2 dan SPP1 dan, kemudian, BGLAP. *Osteoblast mature* mengekspresikan BGLAP, tetapi regulasi ekspresi RUNX2 turun. Osteosit mengekspresikan DMP1. Transisi *osteoblast immature* menjadi osteosit muncul pada tahap awal perkembangan tulang. Prekursor umum osteoblas dan odontoblas dibatasi untuk *neural-crest-derived mesenchymal cells*, namun proses basal diferensiasi osteoblas adalah sama dengan di *neural-crest-derived* dan *non-neural-crest-derived pluripotent mesenchymal cells*. Diferensiasi preodontoblas dari *neural-crest-derived pluripotent mesenchymal cells*. RUNX2 penting untuk diferensiasi *pluripotent mesenchymal cells* menjadi preodontoblas. RUNX2 juga memungkinkan untuk menginduksi diferensiasi preodontoblas menjadi *odontoblast immature* pada tahap awal namun bersifat sebagai penghalang pada tahap akhir. Preodontoblas mengekspresikan RUNX2, *odontoblast immature* mengekspresikan DSPP dan NES tetapi sedikit RUNX2, dan *osteoblast mature* mengekspresikan DSPP dan NES tetapi tidak RUNX2. Ekspresi RUNX2 regulasinya turun selama diferensiasi odontoblas, dan RUNX2 menghambat diferensiasi terminal odontoblas. Over-ekspresi RUNX2 menginduksi transdiferensiasi odontoblas menjadi

osteoblas (SPP1 mensekresi phosphoprotein 1/osteopontin, BGLAP bone gamma-carboxyglutamate [gla] protein/osteocalcin, DSPP *dentin sialophosphoprotein*, NES *nestin*, DMP1 *dentin matrix protein 1*) (Komori., 2010).

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Ada perbedaan ekspresi NFATc1 dan RUNX2 pada pergerakan ortodonti gigi tikus yang diberikan tekanan 10 gr/mm<sup>2</sup>, 5 gr/mm<sup>2</sup> – 10 gr/mm<sup>2</sup> dan 10 gr/mm<sup>2</sup> - 20 gr/mm<sup>2</sup>.

## **BAB 4**

# **METODE PENELITIAN**



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *the post test control group design*.

#### 4.2 Sampel Penelitian

Besar jumlah sampel minimal ditentukan dengan rumus Daniel (2005):

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

Keterangan:

$n$  = Besar sample minimal

$Z$  = Nilai  $Z$  pada tingkat kesalahan tertentu ( $\alpha$ ); jika  $\alpha = 0.05$ , maka  $Z = 1.96$  (2-tailed) dan  $Z = 1.64$  (1-tailed)

$\sigma$  = Standart Deviasi (SD)

$d$  = Kesalahan yang masih bisa ditoleransi

$\alpha$  = Derajat signifikansi (0.05)

$P$  = Keterpercayaan penelitian (80%)

$$\begin{aligned}
 n &= \frac{(1.96)^2 \sigma^2}{d^2} \\
 &= (1.96)^2 \\
 &= 3.84 = 4
 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka sampel yang digunakan pada penelitian ini tiap kelompok berjumlah empat ekor tikus. Pada penelitian ini menggunakan 7 kelompok sehingga jumlah total sampel yang digunakan adalah 28 ekor tikus.

#### 4.3 Kriteria Sampel

1. Jenis galur Wistar
2. Jenis kelamin jantan
3. Usia 16-20 minggu
4. Berat badan 200-250 gram
5. Kondisi sehat dan tidak ada kelainan sistemik yang bisa dilihat dengan bulu yang halus dan mobilitas yang normal.

#### 4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas : Durasi pemberian gaya ortodonti

Variabel tergantung : Kadar *NFATc1* dan *RUNX2*

Variabel terkendali : Kekuatan *Niti closed coil spring*, waktu perlakuan, jenis kelamin, pemeliharaan tikus, metode pemeriksaan, cara pengambilan jaringan.

#### 4.5 Definisi Operasional

1. Kadar *NFATc1* adalah banyaknya *NFATc1* yang terdapat pada gigi tikus yang telah diberikan gaya ortodonti dan diuji dengan menggunakan metode *Imunohistokimia*
2. Kadar *RUNX2* adalah banyaknya *RUNX2* yang terdapat pada gigi tikus yang telah diberikan gaya ortodonti dan diuji dengan menggunakan metode *Imunohistokimia*
3. Kekuatan *Niti closed coil spring* adalah kekuatan ortodonti yang diberikan pada gigi tikus yang diukur dengan menggunakan *tension gauge* untuk menghasilkan kekuatan masing-masing sebesar 5 gr/mm<sup>2</sup>, 10 gr/mm<sup>2</sup> dan 20 gr/mm<sup>2</sup> selama 14 hari dan 28 hari.

#### 4.6 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Biokimia Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.7 Waktu Penelitian

Waktu penelitian akan dimulai pada bulan November 2016 hingga Juni 2017.

## 4.8 Bahan dan Alat Penelitian

### 4.8.1 Bahan Penelitian

- a. *Glass ionomer cement*
- b. EDTA,
- c. HE,
- d. Etanol,
- e. Paraffin,
- f. Alkohol,
- g. Xilol,
- h. PBS,
- i. Formalin.

### 4.8.2 Alat Penelitian

- a. *Niti closed coil spring*,
- b. *Stainless steel ligature wire*,
- c. Kandang tikus,
- d. *Disposable spuit*,
- e. Timbangan,
- f. *Scalpel*,
- g. Gunting,
- h. Tabung reaksi,
- i. Pipet,
- j. Botol squirt,

- k. Mikroskop,
- l. Kamera,
- m. Slide,
- n. *Bur silindris*,
- o. *Low speed*,

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Persiapan Sampel

Tikus galur wistar berusia 16-20 minggu dengan berat 200-250 gr dikelompokkan menjadi 7 kelompok: 1 kelompok kontrol dan 6 kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

Perlakuan pada tiap kelompok dapat dilihat pada tabel berikut ini:

Tabel 4.1 Perlakuan pada tiap kelompok

| KELOMPOK | PERLAKUAN                                        | LAMA PERLAKUAN |         | KETERANGAN                  |
|----------|--------------------------------------------------|----------------|---------|-----------------------------|
|          |                                                  | 14 HARI        | 28 HARI |                             |
| Kontrol  | Tanpa perlakuan                                  | -              | -       | Dikorbankan pada hari ke-0  |
| A        | 10 gr/mm <sup>2</sup>                            | 5 ekor         |         | Dikorbankan pada hari ke-14 |
|          | 10 gr/mm <sup>2</sup>                            |                | 5 ekor  | Dikorbankan pada hari ke-28 |
| B        | 5 gr/mm <sup>2</sup>                             | 5 ekor         |         | Dikorbankan pada hari ke-14 |
|          | 5 gr/mm <sup>2</sup> – 10 gr/mm <sup>2</sup> *   |                | 5 ekor  | Dikorbankan pada hari ke-28 |
| C        | 10 gr/mm <sup>2</sup>                            | 5 ekor         |         | Dikorbankan pada hari ke-14 |
|          | 10 gr/mm <sup>2</sup> – 20 gr/mm <sup>2</sup> ** |                | 5 ekor  | Dikorbankan pada hari ke-28 |

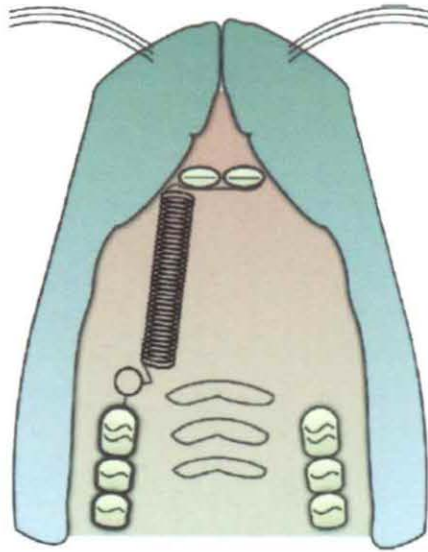
Keterangan:

\*Gaya yang diberikan pada tikus sebesar 5 gr/mm<sup>2</sup> selama 14 hari. Pada hari ke 15 dilakukan penambahan gaya sebesar 10 gr/mm<sup>2</sup>.

\*\* Gaya yang diberikan pada tikus sebesar 10 gr/mm<sup>2</sup> selama 14 hari. Pada hari ke 15 dilakukan penambahan gaya sebesar 20 gr/mm<sup>2</sup>.

#### 4.9.2 Pemasangan *Niti closed coil spring*

1. Tikus dianastesi dengan larutan yang terdiri atas campuran *ketamine* (100 mg/ml, *xylazin* (20 mg/ml) dan *acepromazin* (10 mg/ml) secara intermuskular (Sella dkk, 2012)
2. Sebelum dipasang, kekuatan *Niti closed coil spring* diukur menggunakan *tension gauge* untuk menghasilkan kekuatan sebesar 5 gr/mm<sup>2</sup>, 10 gr/mm<sup>2</sup> dan 20 gr/mm<sup>2</sup>. (Pavlin, 2000)
3. *Niti closed coil spring* diletakkan diantara gigi insisif sentral rahang atas dan molar pertama kiri rahang atas untuk menggerakkan molar ke arah mesial. Piranti ini di fiksasi dengan menggunakan 0.007" *stainlees steel ligature wire* yang dipasang mengelilingi gigi insisif sentral rahang atas melalui sebuah lubang yang dibuat dengan menggunakan bur silindris pada sisi distoservikal tepat di atas gingival papilla. Bagian posterior dari piranti juga dilakukan ligasi dengan 0.007" *stainlees steel ligature wire* yang dipasang mengelilingi gigi molar pertama. Untuk meningkatkan retensi, setelah dilakukan ligase juga diaplikasikan *glass ionomer cement* (Sella, 2012)



Gambar 4.1 Pemasangan *Niti closed coil spring* pada tikus

#### 4.9.3 Ekstraksi Jaringan

Setelah 14 hari dan 28 hari pasca aktivasi *Niti closed coil spring* dilakukan euthanasia pada sampel penelitian dan pembedahan pada maksila hingga daerah molar pertama.

#### 4.9.4 Pemeriksaan Histologi

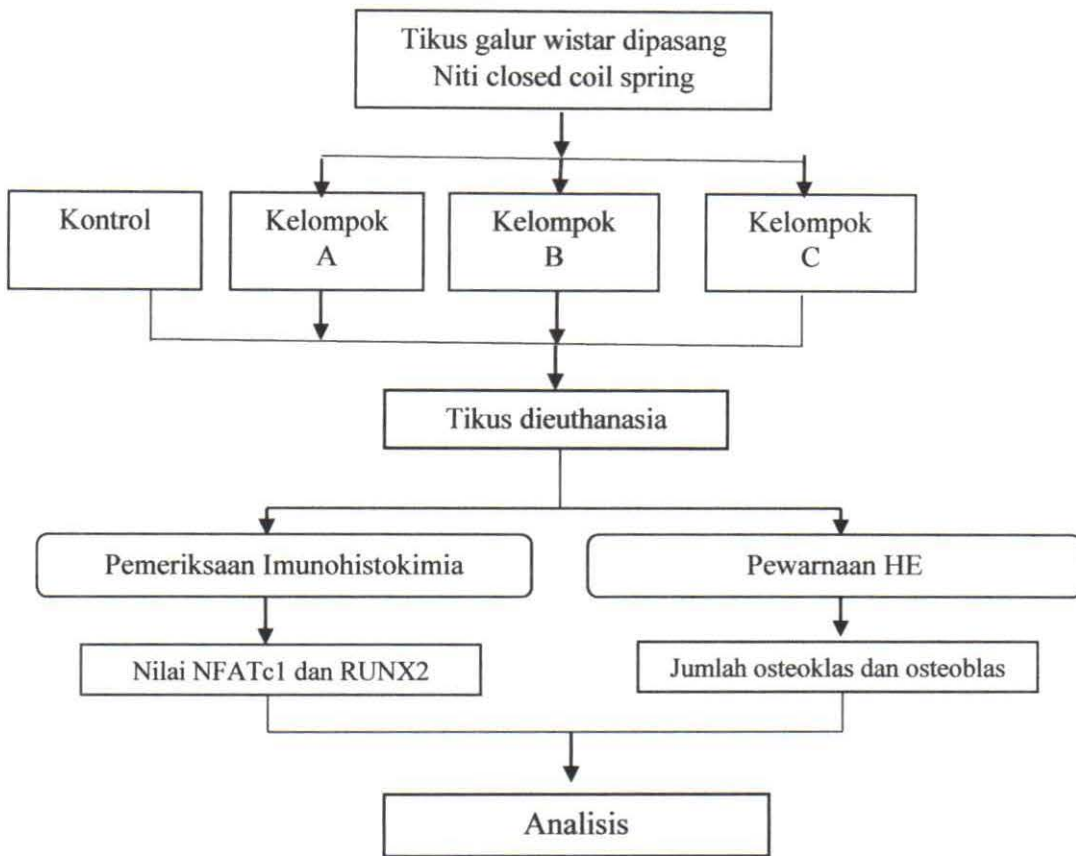
1. Hewan coba dieutanasia menggunakan anastesi eter dan dilakukan pemotongan gigi molar tikus secara vertikal.
2. Dekalsifikasi jaringan menggunakan EDTA 14% selama 21-90 hari.
3. Jaringan dicuci dengan PBS 3-5x untuk membersihkan kontaminan.
4. Sampel difiksasi menggunakan formalin 10% selama 24 jam.
5. Dehidrasi: menggunakan alkohol bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 96% dan absolut) masing-masing 60 menit.

6. *Clearing*: 2 kali masing-masing selama 60 menit pada suhu 48°C.
7. *Embedding* paraffin: paraffin keras pada cetakan selama satu hari.
8. Setelah itu dilakukan pemotongan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 5 mikron dengan rotary microtome.
9. *Mounting*: pada gelas objek dengan gelatin 5%.
10. Deparafinisasi: paraffin blok direndam dalam xilol 2 kali masing-masing selama 5.
11. Rehidrasi: menggunakan alkohol berseri (absolut, 96%, 80%, 70%, 50% dan 30%) masing-masing 5 menit. Kemudian dibilas dalam H<sub>2</sub>O selama 5 menit.

#### 4.10 Analisis Statistik Penelitian

Hasil perhitungan kadar NFAT1 dan RUNX2 ditabulasi menurut kelompok sample masing-masing, kemudian diuji statistik dengan menggunakan *Uji Kolmogorof Smirnof* untuk menguji apakah data terdistribusi normal. Kemudian untuk mengetahui perbedaan kadar NFATc1 atau RUNX2 pada hari ke-14 dan hari ke-28 pada tiap kelompok dan dengan kelompok gaya yang lain, dilakukan uji dengan menggunakan uji *analysis of variance (ANOVA)* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey HSD*.

#### 4.11 Skema Cara Kerja Penelitian



## **BAB 5**

# **HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

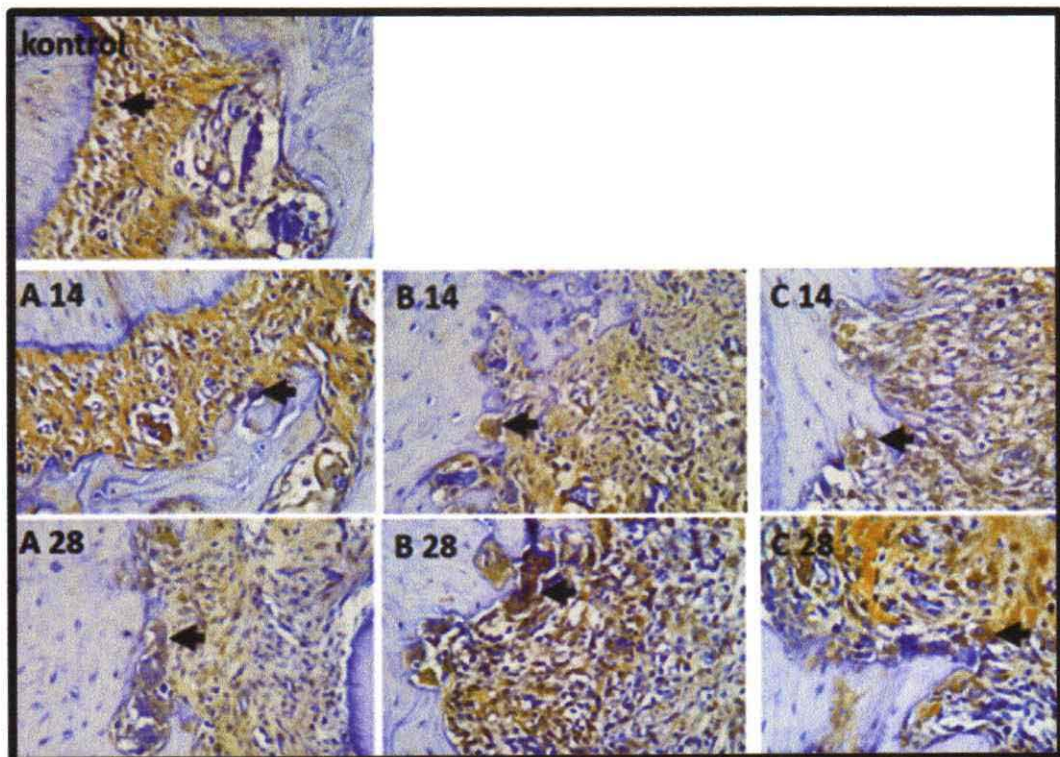


## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini bertujuan untuk melihat ekspresi NFATc1 dan RUNX2 pada tahap pergerakan gigi ortodonti tikus. Ekspresi NFATc1 dan RUNX2 juga dihubungkan dengan jumlah osteoklas dan osteoblas pada sisi tekanan dan regangan. Nilai NFATc1 dan RUNX2 didapatkan melalui pewarnaan imunohistokimia. Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah uji *ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Turkey HSD* untuk melihat hubungan antar kelompok.

#### 5.1 Hasil Perhitungan Nilai NFATc1



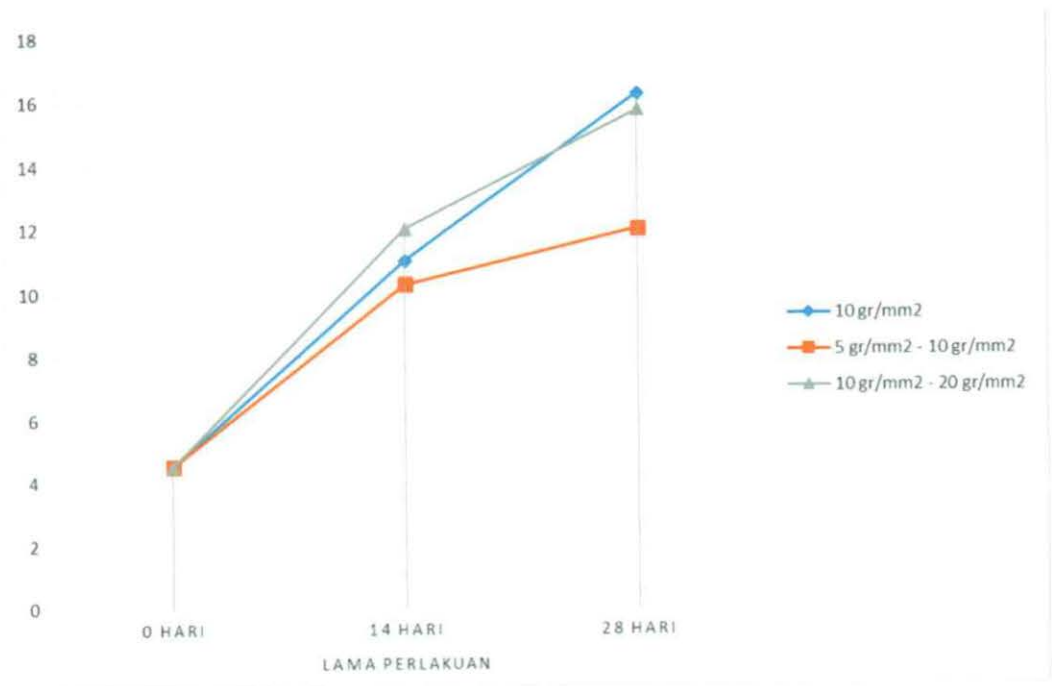
Gambar 5.1. Hasil pewarnaan imunohistokimia NFATc1 pada sisi tekanan (ditunjukkan dengan tanda panah)

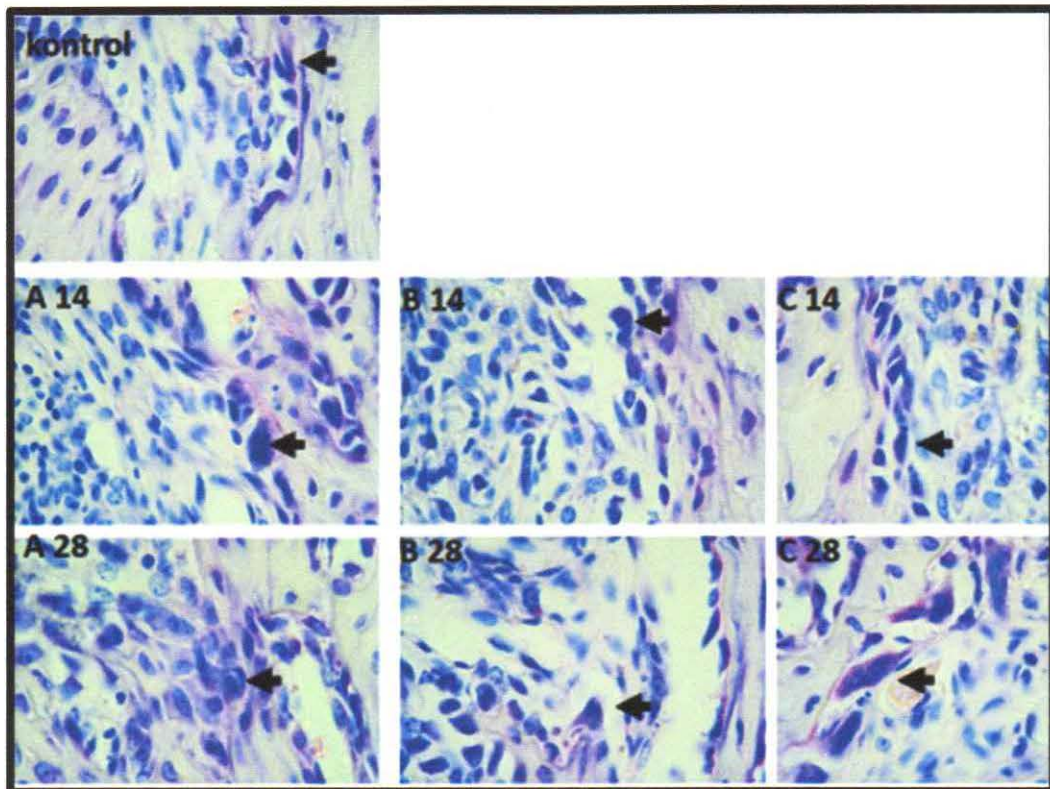
Tabel 5.1 Perhitungan nilai NFATc1 pada daerah tekanan

| Kelompok                         | N  | Mean ± SD    |
|----------------------------------|----|--------------|
| Kontrol (K)                      | 4  | 4.5 ± 1.73   |
| 10 gr/mm2 14 hari (P1)           | 4  | 11 ± 1.83    |
| 10 gr/mm2 28 hari (P2)           | 4  | 16.25 ± 1.71 |
| 5 gr/mm2 14 hari (P3)            | 4  | 10.25 ± 1.26 |
| 5 gr/mm2-10 gr/mm2 28 hari (P4)  | 4  | 12 ± 2.16    |
| 10 gr/mm2 14 hari (P5)           | 4  | 12 ± 1.63    |
| 10 gr/mm2-20 gr/mm2 28 hari (P6) | 4  | 15.75 ± 3.30 |
| TOTAL                            | 28 | 11.68 ± 4.10 |

Tabel 5.1 di atas menunjukkan bahwa nilai rata-rata NFATc1 pada sisi tekanan yang tertinggi terdapat pada kelompok P2 yakni pada kelompok tikus yang diberikan kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup> dilihat pada hari ke-28. Sedangkan nilai rata-rata NFATc1 pada sisi tekanan yang terendah terdapat pada kelompok kontrol dan P3 yakni kelompok tikus yang diberikan kekuatan 5 mg/mm<sup>2</sup> dilihat pada hari ke-14.

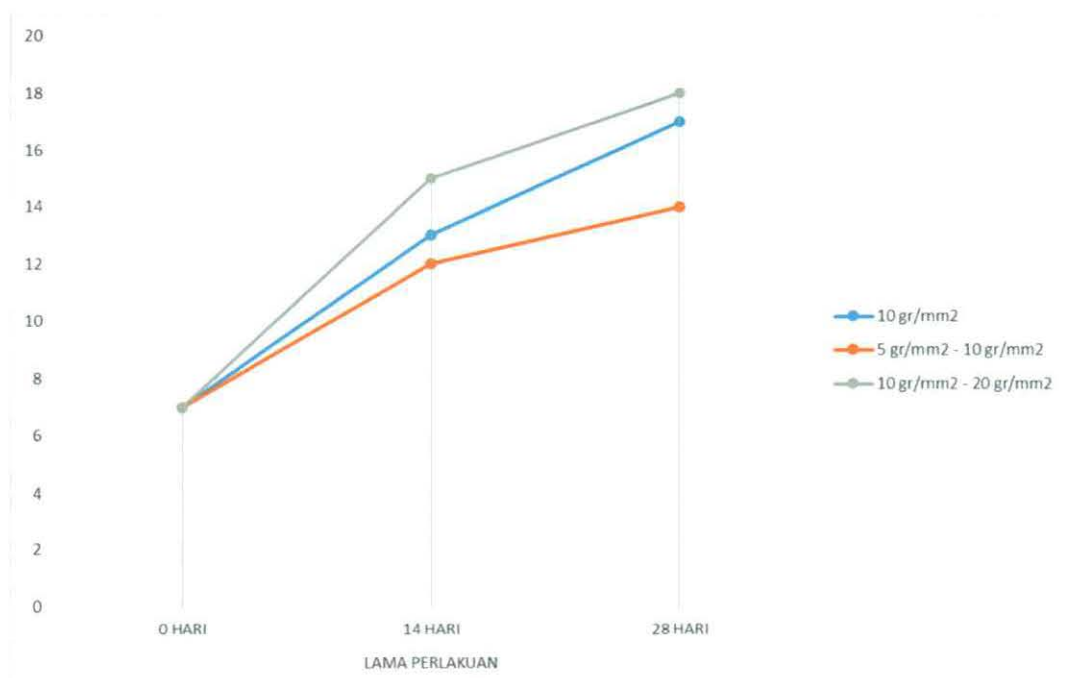
Grafik 5.1 Nilai rata-rata NFATc1 pada daerah tekanan





Gambar 5.2. Hasil pewarnaan hematosillin eosin (HE) osteoklas pada sisi tekanan (ditunjukkan dengan tanda panah)

Grafik 5.2 Nilai rata-rata osteoklas pada daerah tekanan



Grafik 5.1 dan 5.2 di atas menunjukkan bahwa jumlah rata-rata osteoklas dan nilai rata-rata NFATc1 pada sisi tekanan berbanding lurus yang berarti bahwa bila nilai NFATc1 menunjukkan nilai yang rendah, maka jumlah osteoklas juga rendah. Begitupula bila nilai NFATc1 tinggi maka jumlah osteoklas juga tinggi.

Tabel 5.2 Hasil uji *Tukey HSD* NFATc1 pada daerah tekanan

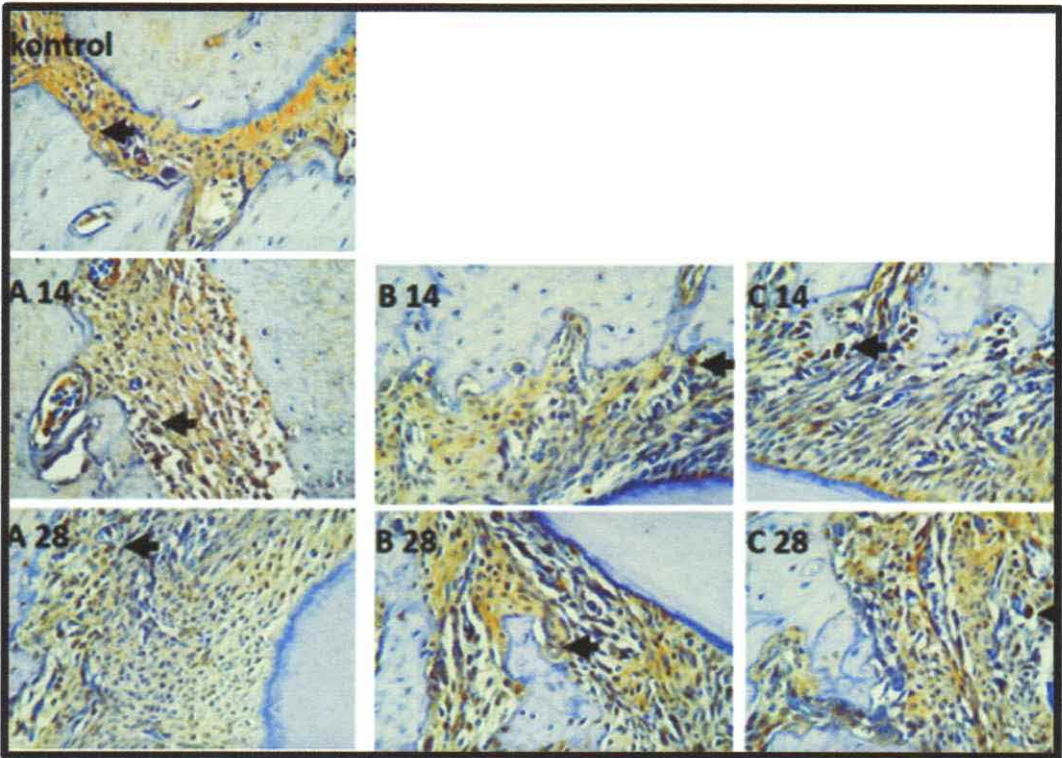
| KELOMPOK | KELOMPOK PEMBANDING | Sig.  | KETERANGAN       |
|----------|---------------------|-------|------------------|
| K        | P1                  | .003  | Signifikan       |
|          | P2                  | .000  | Signifikan       |
|          | P3                  | .010  | Signifikan       |
|          | P4                  | .001  | Signifikan       |
|          | P5                  | .001  | Signifikan       |
|          | P6                  | .000  | Signifikan       |
| P1       | P2                  | .022  | Signifikan       |
|          | P3                  | .998  | Tidak signifikan |
|          | P4                  | .992  | Tidak signifikan |
|          | P5                  | .992  | Tidak signifikan |
|          | P6                  | .046  | Signifikan       |
| P2       | P3                  | .007  | Signifikan       |
|          | P4                  | .092  | Tidak signifikan |
|          | P5                  | .092  | Tidak signifikan |
|          | P6                  | 1.000 | Tidak signifikan |
| P3       | P4                  | .881  | Tidak signifikan |
|          | P5                  | .881  | Tidak signifikan |
|          | P6                  | .015  | Signifikan       |
| P4       | P5                  | 1.000 | Tidak signifikan |
|          | P6                  | .175  | Tidak signifikan |
| P5       | P6                  | .175  | Tidak signifikan |

\*K (kontrol); P1 (10 gr/mm<sup>2</sup> 14 hari); P2 (10 gr/mm<sup>2</sup> 28 hari); P3 (5 gr/mm<sup>2</sup> 14 hari); P4 (5 gr/mm<sup>2</sup>-10 gr/mm<sup>2</sup> 28 hari); P5 (10 gr/mm<sup>2</sup> 14 hari); P6 (10 gr/mm<sup>2</sup>-20 gr/mm<sup>2</sup> 28 hari)

Uji Tukey HSD digunakan untuk membandingkan hasil antar kelompok. Dari hasil pada tabel 5.2 di atas menunjukkan bahwa terdapat beberapa kelompok yang berbeda secara signifikan ( $p<0.05$ ) namun terdapat beberapa kelompok yang tidak berbeda secara signifikan ( $p>0.05$ ). Perbandingan antar kelompok yang berbeda secara signifikan antara lain kelompok K dengan P1, P2, P3, P4, P5, dan P6; kelompok P1 dengan K, P2 dan P6; kelompok P2 dengan K, P1 dan P3;

Kelompok P3 dengan K, P2, dan P6; kelompok P4 dengan K; dan kelompok P5 dengan K.

5.2 Hasil Perhitungan Nilai RUNX2



Gambar 5.3. Hasil pewarnaan imunohistokimia RUNX2 pada sisi regangan (ditunjukkan dengan tanda panah)

Tabel 5.3 Perhitungan nilai RUNX2 pada daerah regangan

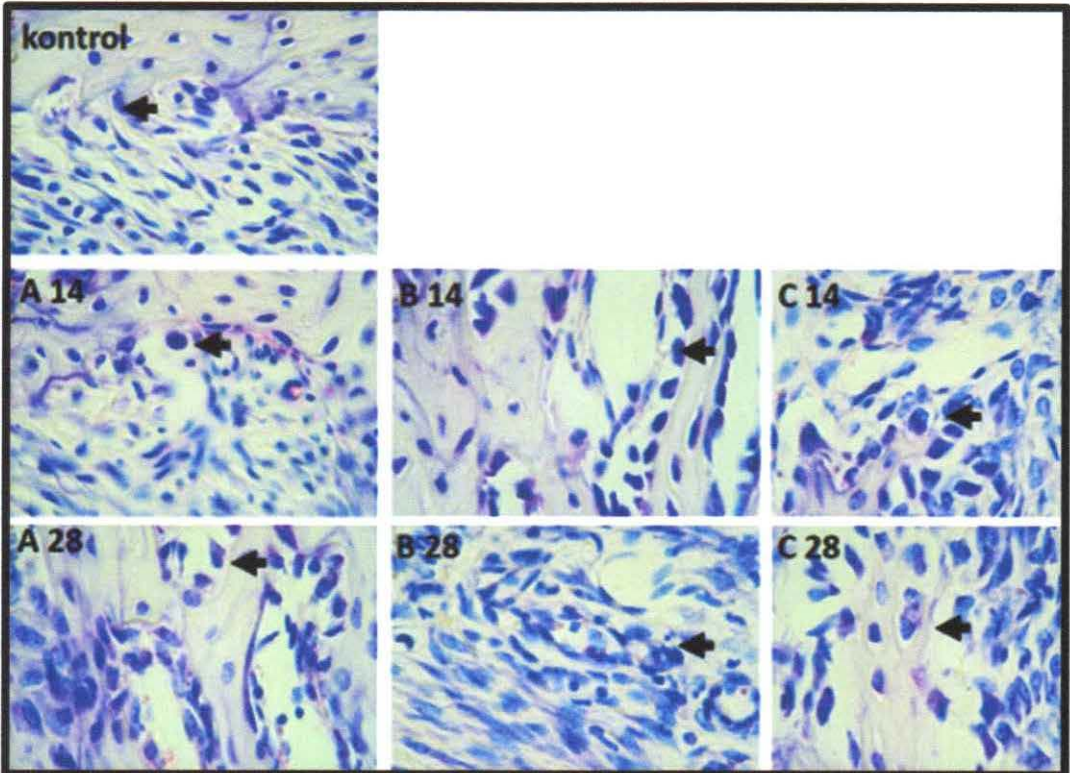
| Kelompok                         | N  | Mean ± SD    |
|----------------------------------|----|--------------|
| Kontrol (K)                      | 4  | 3.75 ± 2.06  |
| 10 gr/mm2 14 hari (P1)           | 4  | 8.75 ± 1.71  |
| 10 gr/mm2 28 hari (P2)           | 4  | 13 ± 2.16    |
| 5 gr/mm2 14 hari (P3)            | 4  | 6.5 ± 1.73   |
| 5 gr/mm2-10 gr/mm2 28 hari (P4)  | 4  | 12.5 ± 2.08  |
| 10 gr/mm2 14 hari (P5)           | 4  | 8.5 ± 1.73   |
| 10 gr/mm2-20 gr/mm2 28 hari (P6) | 4  | 14.5 ± 0.577 |
| TOTAL                            | 28 | 9.64 ± 3.97  |

Pada tabel 5.3 menunjukkan nilai rata-rata RUNX2 pada sisi regangan yang tertinggi adalah pada kelompok P6 yakni pada kelompok tikus yang dilakukan peningkatan kekuatan dari 10 gr/mm<sup>2</sup> menjadi 20 gr/mm<sup>2</sup> yang dilihat pada hari ke-28. Sedangkan nilai rata-rata RUNX2 yang terendah adalah pada kelompok kontrol dan P3 yakni pada kelompok tikus yang diberikan kekuatan 5 gr/mm<sup>2</sup> pada hari ke-14.

Grafik 5.3 Nilai rata-rata RUNX2 pada daerah regangan

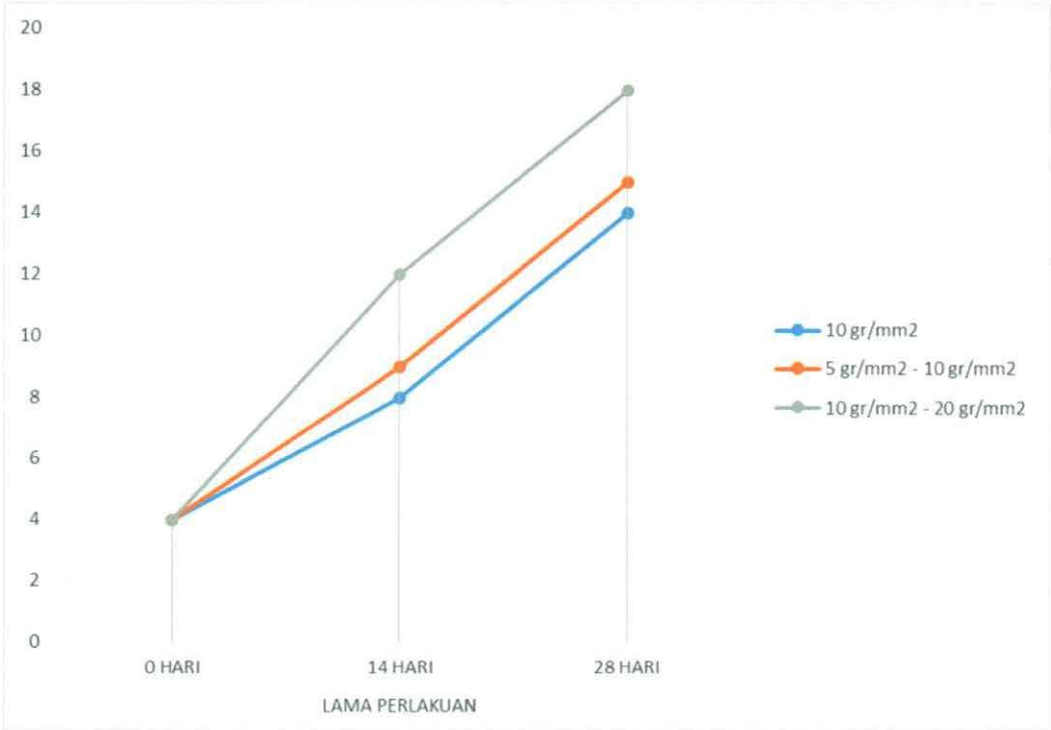


Grafik 5.3 dan 5.4 menunjukkan bahwa jumlah rata-rata osteoblas dan nilai rata-rata RUNX2 pada sisi regangan berbanding lurus yang berarti bahwa bila nilai RUNX2 menunjukkan nilai yang rendah, maka jumlah osteoblas juga rendah. Begitupula bila nilai RUNX2 tinggi maka jumlah osteoblas juga tinggi.



Gambar 5.4. Hasil pewarnaan hematosillin eosin (HE) osteoblas pada sisi regangan (ditunjukkan dengan tanda panah)

Grafik 5.4 Nilai rata-rata osteoblas pada daerah regangan



Tabel 5.4 Hasil uji *Tukey HSD RUNX2* pada daerah regangan

| KELOMPOK | KELOMPOK PEMBANDING | Sig.  | KETERANGAN       |
|----------|---------------------|-------|------------------|
| K        | P1                  | .011  | Signifikan       |
|          | P2                  | .000  | Signifikan       |
|          | P3                  | .352  | Tidak Signifikan |
|          | P4                  | .000  | Signifikan       |
|          | P5                  | .017  | Signifikan       |
|          | P6                  | .000  | Signifikan       |
| P1       | P2                  | .040  | Signifikan       |
|          | P3                  | .578  | Tidak signifikan |
|          | P4                  | .090  | Tidak signifikan |
|          | P5                  | 1.000 | Tidak signifikan |
|          | P6                  | .003  | Signifikan       |
| P2       | P3                  | .001  | Signifikan       |
|          | P4                  | 1.000 | Tidak signifikan |
|          | P5                  | .027  | Signifikan       |
|          | P6                  | .893  | Tidak signifikan |
| P3       | P4                  | .002  | Signifikan       |
|          | P5                  | .697  | Tidak signifikan |
|          | P6                  | .000  | Signifikan       |
| P4       | P5                  | .061  | Tidak signifikan |
|          | P6                  | .697  | Tidak signifikan |
| P5       | P6                  | .002  | Signifikan       |

\*K (kontrol); P1 (10 gr/mm2 14 hari); P2 (10 gr/mm2 28 hari); P3 (5 gr/mm2 14 hari); P4 (5 gr/mm2-10 gr/mm2 28 hari); P5 (10 gr/mm2 14 hari); P6 (10 gr/mm2-20 gr/mm2 28 hari)

Hasil pada tabel 5.4 menunjukkan bahwa terdapat beberapa kelompok yang berbeda secara signifikan ( $p<0.05$ ) namun terdapat beberapa kelompok yang tidak berbeda secara signifikan ( $p>0.05$ ). Perbandingan antar kelompok yang berbeda secara signifikan antara lain kelompok K dengan P1, P2, P4, P5, dan P6; kelompok P1 dengan K, P2 dan P6; kelompok P2 dengan K, P1, P3 dan P5; Kelompok P3 dengan P2, P4 dan P6; kelompok P4 dengan K; dan kelompok P5 dengan K dan P6.

# **BAB 6**

# **PEMBAHASAN**



## **BAB 6**

### **PEMBAHASAN**

Kekuatan mekanis yang diberikan pada gigi ditransmisikan ke tulang alveolar sekitarnya melalui ligament periodontal (PDL). Sehingga pemberian kekuatan ini akan mengaktifkan proses remodeling tulang, resorpsi dan/atau aposisi yang memfasilitasi pergerakan gigi di dalam tulang alveolar. Dilihat dari sisi biomekanik, terlihat jelas bahwa tekanan dan/atau regangan pada periodontal, terutama PDL memainkan peran penting dalam pergerakan gigi (Driel et al., 2000).

Ligamen periodontal (PDL) berfungsi sebagai pengikat antara gigi dengan tulang alveolar dan juga berfungsi sebagai bantalan antara tulang alveolar dan sementum terhadap tekanan oklusal. PDL merupakan bagian yang selalu terkena dampak langsung dari tekanan mekanik pada lingkungan rongga mulut. Telah diketahui bahwa tekanan mekanik menimbulkan respon biokimia pada sel PDL. Fase awal pergerakan gigi ortodontik menyebabkan respon inflamasi akut, karakteristiknya adalah munculnya vasodilatasi periodontal dan migrasi leukosit keluar dari kapiler ligament periodontal. Mediator inflamasi akan mencetuskan proses biologi yang berhubungan dengan resorpsi dan aposisi tulang alveolar. Sitokin disekresi oleh leukosit berinteraksi baik secara langsung dengan sel tulang ataupun secara tidak langsung melalui sel lain, seperti monosit, limfosit, dan fibroblast. Keluarnya beberapa sel pada sisi inflamasi mengubah proses remodeling tulang normal, menghasilkan resorpsi tulang dan/atau aposisi tulang patologik. Proses ini akan menghasilkan proses pergerakan gigi (Dudic et al, 2006).

Berdasarkan analisis data pada tabel 5.1 terlihat bahwa nilai NFATc1 seluruh kelompok terlihat mengalami perubahan yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Nilai NFATc1 yang tinggi menunjukkan terjadinya osteoklastogenesis pada daerah tekanan. Hal ini diungkapkan oleh Takayagi et al (2002) yang mengemukakan bahwa NFATc1 merupakan faktor transkripsi krusial bagi diferensiasi osteoklast. Dalam prosesnya NFATc1 diinduksi oleh RANKL, dan induksi ini bergantung pada jalur TRAF6-NF- $\kappa$ B dan c-Fos. Aktivasi NFAT dimediasi oleh fosfatase spesifik, calcineurin, dimana diaktifkan oleh calcium-calmodulin signaling. NFATc1 meregulasi sejumlah gen osteoklast spesifik pada hubungannya dengan faktor transkripsi lain, seperti AP-1, PU.1 dan MITF. Osteoklast mature menjadi multinuclear giant cells melalui fusi mononuklear osteoklast (Nakashima et al, 2012).

Peningkatan tertinggi terjadi pada kelompok dengan pemberian kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup> (kelompok P1 dan P2). Kelompok ini menghasilkan pergerakan gigi yang baik karena kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup> merupakan kekuatan optimum untuk menggerakkan gigi pada tikus. Hasil ini sesuai dengan yang diungkapkan oleh Schwarz. Schwarz mengemukakan konsep klasik dari gaya yang optimal. Dia mendefinisikan gaya terus menerus yang optimal sebagai "Gaya yang menyebabkan perubahan tekanan jaringan yang mendekati tekanan pembuluh darah kapiler, sehingga mencegah ligamen periodontal terkompresi." Menurut Schwarz, kekuatan di bawah tingkat optimal tidak menyebabkan reaksi dalam ligamen periodontal. Kekuatan yang melebihi tingkat optimal akan menyebabkan nekrosis jaringan dan mencegah resorpsi tulang frontal. Sehingga gerakan gigi menjadi tertunda sampai

*undermining resorption* menghilangkan jaringan nekrotik penghambat (Ren et.al, 2003).

Sedangkan pada kelompok dengan pemberian kekuatan secara bertahap menunjukkan pembentukan osteoklast yang rendah pada kelompok yang diberikan kekuatan 5 gr/mm<sup>2</sup> menjadi 10 gr/mm<sup>2</sup> (P3-P4). Hal ini dikarenakan kekuatan 5 gr/mm<sup>2</sup> merupakan kekuatan rendah dan belum cukup mampu untuk mengaktifkan pembentukan osteoklast yang adekuat untuk pergerakan gigi. Pembentukan osteoklast mulai banyak terbentuk saat kekuatan dinaikkan menjadi 10 gr/mm<sup>2</sup>. Berbeda dengan kelompok P3-P4, kelompok dengan peningkatan kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup> menjadi 20 gr/mm<sup>2</sup> menunjukkan pembentukan osteoklast yang baik mulai dari pemberian kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup>, namun pembentukan osteoklast pada peningkatan kekuatan 20 gr/mm<sup>2</sup> lebih rendah dibandingkan dengan kelompok 10 gr/mm<sup>2</sup> (P2). Hal ini dikarenakan pada pemberian kekuatan besar terjadi proses hyalinisasi.

Hyalinisasi pada jaringan periodontal akan menghambat pergerakan gigi. Hyalinisasi tidak hanya menghambat pembentukan osteoklast pada sisi tekanan untuk resorpsi frontal, tetapi juga menginduksi terjadinya *undermining resorption* (Von Bohl et al, 2004; Thilander et al, 2005). Namun, pada penelitian ini terlihat bahwa nilai NFATc1 pada perlakuan yang diberikan kekuatan 20 gr/mm<sup>2</sup> (*heavy force*) menunjukkan nilai NFATc1 yang tinggi, hal ini menunjukkan bahwa proses pembentukan osteoklas masih berjalan dengan baik meskipun dengan pemberian kekuatan yang besar. Hal ini dikarenakan sebelum dilakukan pemberian kekuatan yang besar gigi diberikan kekuatan yang ringan terlebih dahulu. Pemberian

kekuatan ringan pada tahap awal dan kemudian ditingkatkan menjadi kekuatan yang lebih besar dapat mencegah efek negatif dari pemberian kekuatan besar. Hal ini sesuai dengan hasil dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Tomizuka et al (2007) yang menunjukkan bahwa pemberian kekuatan ringan pada tahap awal dan secara bertahap ditingkatkan kekuatannya menginduksi pembentukan osteoklast yang lebih banyak dengan sedikit hyalinisasi dan dengan demikian pergerakan gigi menjadi efektif.

Pada tabel hasil 5.4 tentang nilai rata-rata RUNX2 pada daerah regangan didapatkan hasil bahwa seluruh kelompok menunjukkan nilai yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan nilai RUNX2 ini menunjukkan adanya peningkatan proses diferensiasi osteoblast. Osteoblast merupakan sel yang bertanggung jawab pada pembentukan tulang. Osteoblast didiferensiasi dari sel mesenkim. *Mesenchymal stem cells* berdiferensiasi menjadi osteoblast immature, yang mengekspresikan *bone matrix protein genes*, melalui kerja dari RUNX2, osteorix dan  $\beta$ -catenin. Osteoblast immature, yang diekspresikan tinggi pada osteopontin, berdiferensiasi menjadi osteoblast mature, yang diekspresikan tinggi pada osteocalcin, dan akhirnya osteoblast mature berikatan dengan matriks tulang menjadi osteosit (Nakhasima et al, 2003).

Hasil pada bab 5.4 juga menunjukkan bahwa kelompok dengan peningkatan kekuatan menghasilkan pembentukan osteoblast yang tinggi. Pembentukan osteoklast yang tinggi sisi tekanan dan diseimbangkan dengan pembentukan osteoblast yang tinggi pula pada sisi regangan akan menghasilkan pergerakan gigi yang baik.

# **BAB 7**

## **KESIMPULAN DAN SARAN**

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

- Ekspresi NFATc1 dan RUNX2 terendah terlihat pada pemberian kekuatan ortodonti 5 gr/mm<sup>2</sup> (*light force*) pada hari ke-14. Hal ini menunjukkan bahwa pada pemberian kekuatan 5 gr/mm<sup>2</sup> belum dapat menghasilkan pembentukan osteoklas dan osteoblas yang cukup untuk pergerakan gigi. Osteoklas dan osteoblas mulai terbentuk pada pemberian kekuatan 10 gr/mm<sup>2</sup> (*optimum force*).
- Ekspresi NFATc1 dan RUNX2 tertinggi terlihat pada pemberian kekuatan ortodonti 20 gr/mm<sup>2</sup> (*heavy force*) pada hari ke-28. Hal ini menunjukkan bahwa pada pemberian kekuatan 20 gr/mm<sup>2</sup> (*heavy force*) menghasilkan pembentukan osteoklas dan osteoblas yang tinggi dan menghambat terjadinya hyalinisasi.

#### 7.2 Saran

- Penelitian lebih lanjut mengenai peran NFATc1 dan RUNX2 terhadap pergerakan gigi ortodonti dapat dilakukan lebih lanjut berdasarkan pada berbagai tingkatan waktu dan kekuatan.
- Penelitian lebih lanjut mengenai pemberian kekuatan ortodonti secara bertahap dapat dilakukan pada waktu yang lebih lama.

# DAFTAR PUSTAKA



## DAFTAR PUSTAKA

Ariffin S.H.Z., Yamamoto Z., Abidin I.Z.Z., Wahab R.M.A., Ariffin Z.Z. 2011. Cellular and Molecular Changes in Orthodontics Tooth Movement. *The Scientific World Journal*. Vol.11. Pp: 1788-1803.

Banerjee C., Javed A., Choi JY., Green J., Rosen V., Wijnen AJ van, Steil JL., Lian JB., Stein GS. 2001. Differential Regulation of The Two Principal Runx2/Cbfa1 N-terminal Isoforms in Response to Bone Morphogenetic Protein-2 During Development of The Osteoblast Phenotype. *Endocrinology* 142:4026-4039

Capelli J, Fidel R, Figueredo CM, Teles RP. 2010. Change in The Gingival Fluid Volume During Maxillary Canine Retraction. *Dental Press J. Orthod*. Vol.15.no.2

Choi KY., Lee SW., Park MH., Bae YC., Shin HI., Nam S., Kim YJ., Kim HJ., Ryoo HM. 2002 Spatio-temporal Expression Patterns of Runx2 Isoforms in Early Skeletogenesis. *Exp Mol Med* 34:426-433

Crotti T.N., Sharma S.M., Fleming J.D., Flannery M.R., Ostrowski M.C., Goldring S.R., et al. 2008. PU.1 dan NFATc1 Mediate Osteoclastic Induction of The Mouse Beta3 Integrin Promoter. *J Cell Physiol* 2008;82:475-88.

Crotti T.N., Sharma S.M., Fleming J.D., Flannery M.R., Ostrowski M.C., Goldring S.R., et al. 2008. PU.1 and NFATc1 Mediate Osteoclastic Induction of The Mouse Beta3 Integrin Promoter. *J Cell Physiol* 2008; 215:636-44.

Daskalogiannakis J. 2000. Glossary of Orthodontic Terms. Berlin: Quintessence.

Dolce C., Malone J.S., Wheeler T.T. 2002. Current Concept in The Biology of Orthodontic Tooth Movement. *Seminars in Orthodontics*, Vol 8, No 1 (March), 2002: pp 6-12.

Driel W. D., E J van Leeuwen, J W Von den Hoff, J C Maltha, A M Kuijpers-Jagtman. 2000. Time-dependent Mechanical Behaviour of The Periodontal Ligament. *Proc Instn Mech Engrs Vol 214 Part H*.

Dudic A., Kiliaridis S., Mombelli A., Giannopoulou C. 2006. Composition Changes in Gingival Crevicular Fluid During Orthodontic Tooth Movement: Comparisons Between Tension and Compression Sides. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 416-422

Enomoto H., Enomoto-Iwamoto M., Iwamoto M., Nomura S., Himeno M., Kitamura Y., Khisimoto T., Komori T. 2000. Cbfa1 is a Positive Regulatory Factor in Chondrocyte Maturation. *J Biol Chem* 275:8695-8702.

Henneman S., Von den Hoff J.W., Maltha J.C. 2008. Mechanobiology of Tooth Movement. *European Journal of Orthodontics* 30 (2008) 299-306.

Geoffroy V., Kneissel M., Fournier B., Boyde A., Matthias P. 2002. High Bone Resorption in Adult Aging Transgenic Mice Overexpressing Cbfa1/Runx2 in Cells of The Osteoblastic Lineage. *Mol Cell Biol* 22:6222-6233

Heit JJ., Apelqvist AA., Gu X., Winslow MM., Neilson JR., Crabtree GR., Kim SK. 2006. Calcineurin/NFAT Signalling Regulates Pancreatic Beta-cell Growth and Function. *Nature* 443:345-349.

Kanatani N., Fujita T., Fukuyama R., Liu W., Yoshida CA., Moriishi T., Yamana K., Miyazaki T., Toyosawa S., Komori T. 2006. Cbfb $\beta$  Regulates Runx2 Function Isoform-dependently in Postnatal Bone Development. *Dev Biol* 296:48-61

Karsenty, G., Wagner E.F. 2002. Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development. *Dev Cell* 2, 389-406.

Kiani, Alexander., Anjana Rao., Jose Aramburu. 2000. Manipulating Immune Responses with Immunosuppressive Agents that Target NFAT. *Immunity*, Vol. 12, 359-372, April, 2000, Copyright.2000 by Cell Press.

Kim K., Kim J.H., Lee J., Jin H., Lee S., Fisher D.E., Kook H., Kim K.K., Choi Y., Kim N. 2005. Nuclear Factor of Activated T Cells c1 Induces Osteoclast-associated Receptor Gene Expression during Tumor Necrosis Factor-related Activation-induced Cytokine-mediated Osteoclastogenesis. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 42, pp. 35209–35216, October 21, 2005.

Kim Y., Sato K., Asagiri M., Morita I., Soma K., Takayanagi H. 2005. Contribution of Nuclear Factor of Activated T Cells c1 to the Transcriptional Control of Immunoreceptor Osteoclast-associated Receptor but Not Triggering Receptor Expressed by Myeloid Cells-2 during Osteoclastogenesis. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 38, pp. 32905–32913, September 23, 2005.

Kim J.H., Kim n. 2014. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. *J Bone Metab* 2014;21:233-241.

Komori T. 2005. Regulation of Skeletal Development by The Runx Family of Transcription Factors. *J Cell Biochem* 95:445-453

Komori, Toshihisa. 2006. Regulation of Osteoblast Differentiation by Transcription Factors. *Journal of Cellular Biochemistry* 99:1233-1239 (2006).

Komori T. 2010. Regulation of Bone Development and Extracellular Matrix Protein Genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* (2010) 339:189-195

Krishnan V., Davidovitch Z. 2006. Cellular, Molecular, and Tissue Level Reactions to Orthodontic Force. *Am J Ortho Dentofacial Orthop* 2006; 129: 1-32.

Krishnan V., Davidovitch Z. 2006. Cellular, Molecular and Tissue-level Reactions to Orthodontic Force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006 ; 129-469

Kundu M., Javed A., Jeon JP., Horner A., Shum L., Eckhaus M., Muenke M., Lian JB., Yang Y., Nuckolls GH., Stein GS., Liu PP. 2002. Cbfb Interacts With Runx2 and has a Critical Role in Bone Development. *Nat Genet* 32:547-552.

Liu W., Toyosawa S., Furuichi T., Kanatani N., Yoshida C., Liu Y., Himeno M., Narai S., Yamaguchi A., Komori T. 2001. Overexpression of Cbfa1 in Osteoblast Inhibits Osteoblast Maturation and Causes Osteopenia With Multiple Fractures. *J Cell Biol* 155:157-166.

Lopez-Rodriguez C. et al. 2001. Bridging the NFAT and NF- $\kappa$ B families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* 15, 47-58

Mammucari C., Tommasi di Vignano A., Sharov AA., Neilson J., Havrda MC., Roop DR., Botchkarev VA., Crabtree GR., Dotto GP. 2005. Integration of Notch 1 and Calcineurin/NFAT Signaling Pathways in Keratinocyte Growth and Differentiation Control. *Dev Cell* 8:665-676

Marks S.C. Jr., Odgren P.R. 2002. Structure and Development of the Skeleton. In: Bilezikian J.P., Raisz L.G., Rodan G.A (eds). *Principles of Bone Biology*. Academic Press, pp 3-15.

Maruyama Z., Yoshida CA., Furuichi T., Amizuka N., Ito M., Fukuyama R., Miyazaki T., Kitaura H., Nakamura K., Fujita T., Kanatani N., Moriishi T., Yamana K., Liu W., Kawaguchi H., Nakamura K., Komori T. 2007. Runx2 Determines Bone Maturity and Turnover Rate in Postnatal Bone Development and is Involved in Bone Loss in Estrogen Deficiency. *Dev Dyn* 236:1876-1890

Matsumoto M., Kogawa M., Wada S., Takayanagi H., Tsujimoto M., Katayama S., Hisatake K., Nogi Y. 2004. Essential Role of p38 Mitogen-activated Protein Kinase in Cathepsin K Gene Expression during Osteoclastogenesis through Association of NFATc1 and PU.1. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 279, No. 44, Issue of October 29, pp. 45969–45979, 2004.

Meikle MC. 2006. The Tissue, Cellular and Molecular Regulation of Orthodontic Tooth Movement:100 Years After Carl Sandstedt. *European J Orthod* 2006; 28:221-40

Miller J., Horner A., Stacy T., Lowrey C., Lian JB., Stein G., Nuckolls GH., Speck NA. 2002. The Core-binding Factor  $\beta$  Subunit is Required for Bone Formation and Hematopoietic Maturation. *Nat Genet* 32:645-649

Miyazaki T., Kanatani N., Rokutanda S., Yoshida C., Toyosawa S., Nakamura R., Takada S., Komori T. 2008. Inhibition of Terminal Differentiation of Odontoblast and Their Transdifferentiation Into Osteoblast in Runx2 Transgenic Mice. *Arch Histol Cytol* 71:131-146.

Nakashima, Kazuhisa, Benoit de C. 2003. Transcriptional Mechanisms in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *TRENDS in Genetics* Vol.19 No.8 August 2003.

Nakashima, Tomoki, Hiroshi T. 2012. New Regulation Mechanisms of Osteoclast Differentiation. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 1240 (2012) E13-E18

Negishi-Koga, T., Hiroshi T. 2009.  $\text{Ca}^{2+}$ -NFATc1 Signaling is an Essential Axis of Osteoclast Differentiation. *Immunological Review* 231/2009.

Okamura, Heidi., Jose A., Carmen G., Joao PBV., Anuradha R., Mamta T., Xiaolong Z., Jun Q., Patrick GH., Anjana R. 2000. Concerted Dephosphorylation of the Transcription Factor NFAT1 Induces a Conformational Switch that Regulates Transcriptional Activity. *Molecular Cell*, Vol.6, 539-550, September, 2000, Copyright.2000 by Cell Press.

Ren, Yijin, Jaap C. M., Anne M. K. 2003. Optimum Force Magnitude for Orthodontic Tooth Movement: A Systematic Literature Review. *Angle Orthodontist*, Vol 73, No 1, 2003

Peng, Stanford L., Andrea JG., Ann MR., Laurie HG. 2001. NFATc1 and NFATc2 Together Control Both T and B Cell Activation and Differentiation. *Immunity*, Vol.14, 13-20, January, 2001 by Cell Press.

Rahardjo P. 2009. *Ortodonti dasar*. Surabaya. Pusat penerbitan dan Percetakan Unair.

Singh G. 2004. *Textbook of Orthodontics*. Jaypee Brothers Medical Publisher (P) Ltd. Edisi Ke-1. Pp: 198-204

Smerdel-Ramoya, Anna., Stefaano Zanotti., Ernesto Canalis. 2010. Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Transactivates Nuclear Factor of Activated T-Cells (NFAT) in Cells of the Osteoblastic Lineage. *Journal of Cellular Biochemistry* 110:477-483.

Takahashi, Ichiro., Kazuyuki O., Makoto N., Hidetoshi M., Yasuyuki S., Hideo M. 2006. Expression of Genes for Gelatinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Periodontal Tissue During Orthodontic Tooth Movement. *J Mol Hist* (2006) 37:333-342.

Takayanagi, Hiroshi. 2007. The Role of NFAT in Osteoclast Formation. *Ann.N. Y. Acad. Sci.* 1116: 227-237 (2007).

Takayanagi, H. Osteoimmunology: Shared Mechanisms and Crosstalk Between The Immune and Bone Systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292-304.

Takayanagi H., Kim S., Koga T., Nishina H., Issiki M., Yoshida H., Saiura A., Isobe M., Yokochi T., Inoue J., Wagner E., Mak T., Kodama T., Taniguchi T. 2002.

Induction and Activation of The Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Developmental Cell*, Vol. 3, 889–901, December, 2002.

Tomizuka R., Hiroyasu K., Yoshinaka S., Akihiro S., Kaoru I., Hideo M. 2006. Effect of Gradually Increasing Factor Generated by Permanent Rare Earth Magnets for Orthodontic Tooth Movement. *Angle Orthodontist*, Vol 76, No 6, 2006

Tomizuka R., Yoshinaka S., Hiroyasu K., Akihiro S., Sachiko U., Masayoshi K., Hideo M., Kaoru I. 2007. Histological Evaluation of The Effects of Initially Light and Gradually Increasing Force on Orthodontic Tooth Movement. *Angle Orthodontist*, Vol 77, No 3, 2007.

Thilander B., Rygh P., Reitan K. 2005. Tissue Reactions in Orthodontics. In: Graber TM., Vanarsdall RL Jr., Vig KWL., eds. *Orthodontics. Current Principles & Techniques*. 4<sup>th</sup> ed. St Louis, Mo: Elsevier Inc; 2005:145-219

Toms S.R., Lemons J.E., Bartolucci A.A., Eberhardt A.W. 2002. Nonlinear Stress-Strain Behaviour of Periodontal Ligament Under Orthodontic Loading. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* Vol 122, Number 2.

Von Bohl M., Maltha J., Von den H., Kujipers-Jagtman AM. 2004. Changes in The Periodontal Ligament After Experimental Tooth Movement Using High and Low Continuous Forces in Beagle Dog. *Angle Orthod.* 2004;74:16-25

Williams, J.K., PK Cook., KG Isaacson., AR Thom. 2000. *Alat-alat Ortodonti Cekat: Prinsip dan Praktek*. Jakarta: EGC.

Wise G.E., King G.J. 2008. Mechanisms of Tooth Eruption and Orthodontics Tooth Movement. *J Dent Res* 87:414-434.

Yamashiro T., Aberg T., Levanon D., Groner Y., Thesleff I. 2002. Expression of Runx1, -2, and -3 During Tooth, Palate, and Craniofacial Bone Development. *Mech Dev* 119S:S107-S110.

Yoshida CA., Furuichi T., Fujita T., Fukuyama R., Kanatani N., Kobayashi S., Satake M., Takada K., Komori T. 2002. Core-binding factor  $\beta$  Interacts with Runx2 and is Required for Skeletal Development. *Nat Genet* 32:633-638

# LAMPIRAN



Lampiran 1

Hasil Perhitungan NFATc1 dan RUNX2 Pada Daerah Tekanan dan Regangan

| kelompok |        |   | RUNX2 tarikan | NFATC1 tekanan |
|----------|--------|---|---------------|----------------|
| A        | 0 hari | 1 | 2             | 5              |
|          |        | 2 | 6             | 2              |
|          |        | 3 | 5             | 6              |
|          |        | 4 | 2             | 5              |
| B        | 14     | 1 | 7             | 10             |
|          |        | 2 | 9             | 13             |
|          |        | 3 | 8             | 9              |
|          |        | 4 | 11            | 12             |
|          | 28     | 1 | 15            | 18             |
|          |        | 2 | 14            | 17             |
|          |        | 3 | 13            | 16             |
|          |        | 4 | 10            | 14             |
| B        | 14     | 1 | 6             | 10             |
|          |        | 2 | 5             | 12             |
|          |        | 3 | 9             | 10             |
|          |        | 4 | 6             | 9              |
|          | 28     | 1 | 13            | 13             |
|          |        | 2 | 15            | 14             |
|          |        | 3 | 12            | 12             |
|          |        | 4 | 10            | 9              |
| B        | 14     | 1 | 6             | 12             |
|          |        | 2 | 10            | 14             |
|          |        | 3 | 9             | 12             |
|          |        | 4 | 9             | 10             |
|          | 28     | 1 | 14            | 19             |
|          |        | 2 | 15            | 12             |
|          |        | 3 | 14            | 18             |
|          |        | 4 | 15            | 14             |

Lampiran 2

Hasil Analisis Statistik NFATc1

Descriptives

| NFATc1               |    |       |                |            |                                  |             |         |         |
|----------------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|                      | N  | Mean  | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|                      |    |       |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| kontrol              | 4  | 4.50  | 1.732          | .866       | 1.74                             | 7.26        | 2       | 6       |
| 10gr/mm2 14 hari     | 4  | 11.00 | 1.826          | .913       | 8.09                             | 13.91       | 9       | 13      |
| 10gr/mm2 28 hari     | 4  | 16.25 | 1.708          | .854       | 13.53                            | 18.97       | 14      | 18      |
| 5 gr/mm2 14 hari     | 4  | 10.25 | 1.258          | .629       | 8.25                             | 12.25       | 9       | 12      |
| 5-10 gr/mm2 28 hari  | 4  | 12.00 | 2.160          | 1.080      | 8.56                             | 15.44       | 9       | 14      |
| 10 gr/mm2 14 hari    | 4  | 12.00 | 1.633          | .816       | 9.40                             | 14.60       | 10      | 14      |
| 10-20 gr/mm2 28 hari | 4  | 15.75 | 3.304          | 1.652      | 10.49                            | 21.01       | 12      | 19      |
| Total                | 28 | 11.68 | 4.101          | .775       | 10.09                            | 13.27       | 2       | 19      |

Test of Homogeneity of Variances

| NFATc1           |     |     |      |
|------------------|-----|-----|------|
| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
| 1.662            | 6   | 21  | .180 |

ANOVA

| NFATc1         |                |    |             |        |      |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
| Between Groups | 366.857        | 6  | 61.143      | 14.716 | .000 |
| Within Groups  | 87.250         | 21 | 4.155       |        |      |
| Total          | 454.107        | 27 |             |        |      |

Multiple Comparisons

Dependent Variable: NFATc1

Tukey HSD

| (I) KELOMPOK     | (J) KELOMPOK            | Mean<br>Difference<br>(I-J) | Std.<br>Error | Sig.  | 95% Confidence<br>Interval |                |
|------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------|-------|----------------------------|----------------|
|                  |                         |                             |               |       | Lower<br>Bound             | Upper<br>Bound |
| kontrol          | 10gr/mm2 14 hari        | -6.500*                     | 1.441         | .003  | -11.19                     | -1.81          |
|                  | 10gr/mm2 28 hari        | -11.750*                    | 1.441         | .000  | -16.44                     | -7.06          |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari        | -5.750*                     | 1.441         | .010  | -10.44                     | -1.06          |
|                  | 5-10 gr/mm2 28<br>hari  | -7.500*                     | 1.441         | .001  | -12.19                     | -2.81          |
|                  | 10 gr/mm2 14<br>hari    | -7.500*                     | 1.441         | .001  | -12.19                     | -2.81          |
|                  | 10-20 gr/mm2 28<br>hari | -11.250*                    | 1.441         | .000  | -15.94                     | -6.56          |
|                  | kontrol                 | 6.500*                      | 1.441         | .003  | 1.81                       | 11.19          |
| 10gr/mm2 14 hari | 10gr/mm2 28 hari        | -5.250*                     | 1.441         | .022  | -9.94                      | -.56           |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari        | .750                        | 1.441         | .998  | -3.94                      | 5.44           |
|                  | 5-10 gr/mm2 28<br>hari  | -1.000                      | 1.441         | .992  | -5.69                      | 3.69           |
|                  | 10 gr/mm2 14<br>hari    | -1.000                      | 1.441         | .992  | -5.69                      | 3.69           |
|                  | 10-20 gr/mm2 28<br>hari | -4.750*                     | 1.441         | .046  | -9.44                      | -.06           |
|                  | kontrol                 | 11.750*                     | 1.441         | .000  | 7.06                       | 16.44          |
|                  | 10gr/mm2 14 hari        | 5.250*                      | 1.441         | .022  | .56                        | 9.94           |
| 10gr/mm2 28 hari | 5 gr/mm2 14 hari        | 6.000*                      | 1.441         | .007  | 1.31                       | 10.69          |
|                  | 5-10 gr/mm2 28<br>hari  | 4.250                       | 1.441         | .092  | -.44                       | 8.94           |
|                  | 10 gr/mm2 14<br>hari    | 4.250                       | 1.441         | .092  | -.44                       | 8.94           |
|                  | 10-20 gr/mm2 28<br>hari | .500                        | 1.441         | 1.000 | -4.19                      | 5.19           |
|                  | kontrol                 | 5.750*                      | 1.441         | .010  | 1.06                       | 10.44          |
|                  | 10gr/mm2 14 hari        | -.750                       | 1.441         | .998  | -5.44                      | 3.94           |
|                  | 10gr/mm2 28 hari        | -6.000*                     | 1.441         | .007  | -10.69                     | -1.31          |
| 5 gr/mm2 14 hari | 5-10 gr/mm2 28<br>hari  | -1.750                      | 1.441         | .881  | -6.44                      | 2.94           |

|                     |                      |         |       |       |        |       |
|---------------------|----------------------|---------|-------|-------|--------|-------|
| 5-10 gr/mm2 28 hari | 10 gr/mm2 14 hari    | -1.750  | 1.441 | .881  | -6.44  | 2.94  |
|                     | 10-20 gr/mm2 28 hari | -5.500* | 1.441 | .015  | -10.19 | -.81  |
|                     | kontrol              | 7.500*  | 1.441 | .001  | 2.81   | 12.19 |
|                     | 10gr/mm2 14 hari     | 1.000   | 1.441 | .992  | -3.69  | 5.69  |
|                     | 10gr/mm2 28 hari     | -4.250  | 1.441 | .092  | -8.94  | .44   |
|                     | 5 gr/mm2 14 hari     | 1.750   | 1.441 | .881  | -2.94  | 6.44  |
|                     | 10 gr/mm2 14 hari    | .000    | 1.441 | 1.000 | -4.69  | 4.69  |
|                     | 10-20 gr/mm2 28 hari | -3.750  | 1.441 | .175  | -8.44  | .94   |
|                     | kontrol              | 7.500*  | 1.441 | .001  | 2.81   | 12.19 |
|                     | 10gr/mm2 14 hari     | 1.000   | 1.441 | .992  | -3.69  | 5.69  |
| 10 gr/mm2 14 hari   | 10gr/mm2 28 hari     | -4.250  | 1.441 | .092  | -8.94  | .44   |
|                     | 5 gr/mm2 14 hari     | 1.750   | 1.441 | .881  | -2.94  | 6.44  |
|                     | 5-10 gr/mm2 28 hari  | .000    | 1.441 | 1.000 | -4.69  | 4.69  |
|                     | 10-20 gr/mm2 28 hari | -3.750  | 1.441 | .175  | -8.44  | .94   |
|                     | kontrol              | 11.250* | 1.441 | .000  | 6.56   | 15.94 |
|                     | 10gr/mm2 14 hari     | 4.750*  | 1.441 | .046  | .06    | 9.44  |
|                     | 10gr/mm2 28 hari     | -.500   | 1.441 | 1.000 | -5.19  | 4.19  |
|                     | 5 gr/mm2 14 hari     | 5.500*  | 1.441 | .015  | .81    | 10.19 |
|                     | 5-10 gr/mm2 28 hari  | 3.750   | 1.441 | .175  | -.94   | 8.44  |
|                     | 10 gr/mm2 14 hari    | 3.750   | 1.441 | .175  | -.94   | 8.44  |

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

NFATc1

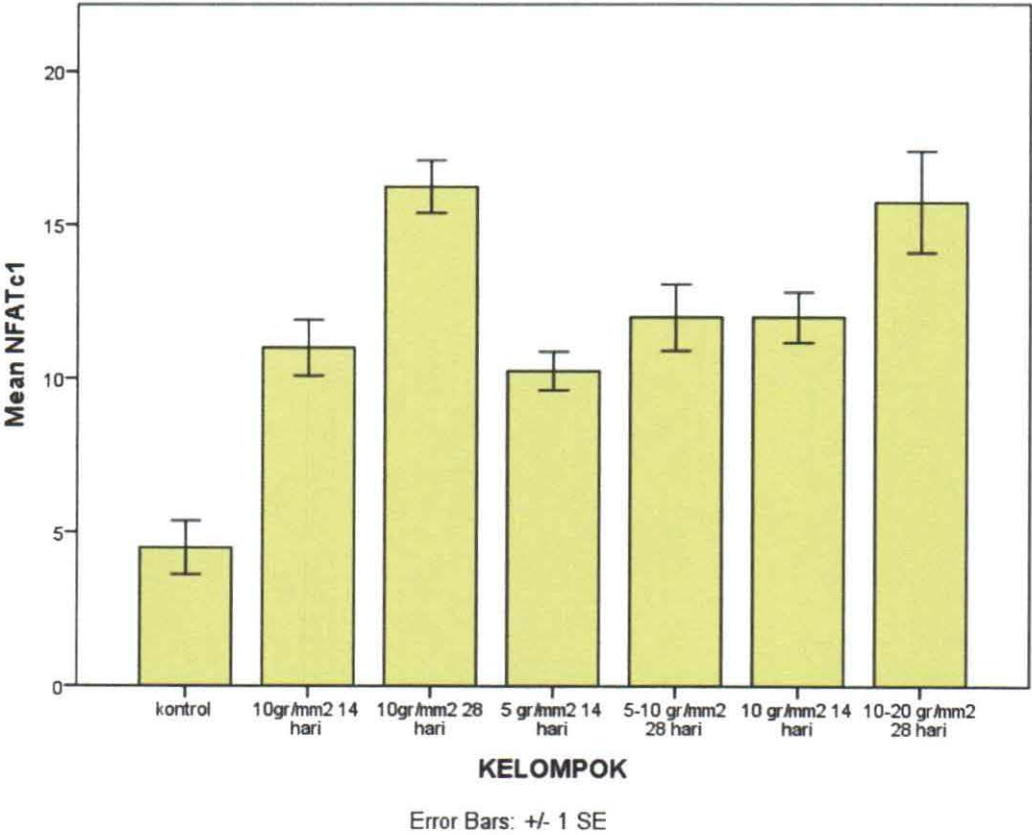
Tukey HSD<sup>a</sup>

| KELOMPOK            | N | Subset for alpha = 0.05 |       |       |
|---------------------|---|-------------------------|-------|-------|
|                     |   | 1                       | 2     | 3     |
| kontrol             | 4 | 4.50                    |       |       |
| 5 gr/mm2 14 hari    | 4 |                         | 10.25 |       |
| 10gr/mm2 14 hari    | 4 |                         | 11.00 |       |
| 5-10 gr/mm2 28 hari | 4 |                         | 12.00 | 12.00 |

|                      |   |       |       |       |
|----------------------|---|-------|-------|-------|
| 10 gr/mm2 14 hari    | 4 |       | 12.00 | 12.00 |
| 10-20 gr/mm2 28 hari | 4 |       |       | 15.75 |
| 10gr/mm2 28 hari     | 4 |       |       | 16.25 |
| Sig.                 |   | 1.000 | .881  | .092  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Lampiran 3

Hasil Analisis Statistik RUNX2

Descriptives

runx2

|                      | N  | Mean  | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|----------------------|----|-------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|                      |    |       |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| kontrol              | 4  | 3.75  | 2.062          | 1.031      | .47                              | 7.03        | 2       | 6       |
| 10gr/mm2 14 hari     | 4  | 8.75  | 1.708          | .854       | 6.03                             | 11.47       | 7       | 11      |
| 10gr/mm2 28 hari     | 4  | 13.00 | 2.160          | 1.080      | 9.56                             | 16.44       | 10      | 15      |
| 5 gr/mm2 14 hari     | 4  | 6.50  | 1.732          | .866       | 3.74                             | 9.26        | 5       | 9       |
| 5-10 gr/mm2 28 hari  | 4  | 12.50 | 2.082          | 1.041      | 9.19                             | 15.81       | 10      | 15      |
| 10 gr/mm2 14 hari    | 4  | 8.50  | 1.732          | .866       | 5.74                             | 11.26       | 6       | 10      |
| 10-20 gr/mm2 28 hari | 4  | 14.50 | .577           | .289       | 13.58                            | 15.42       | 14      | 15      |
| Total                | 28 | 9.64  | 3.974          | .751       | 8.10                             | 11.18       | 2       | 15      |

Test of Homogeneity of Variances

runx2

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| .743             | 6   | 21  | .621 |

ANOVA

runx2

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 358.929        | 6  | 59.821      | 18.611 | .000 |
| Within Groups  | 67.500         | 21 | 3.214       |        |      |
| Total          | 426.429        | 27 |             |        |      |

Multiple Comparisons

Dependent Variable: runx2

Tukey HSD

| (I) KELOMPOK     | (J) KELOMPOK         | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 95% Confidence Interval |             |
|------------------|----------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|                  |                      |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| kontrol          | 10gr/mm2 14 hari     | -5.000*               | 1.268      | .011  | -9.12                   | -.88        |
|                  | 10gr/mm2 28 hari     | -9.250*               | 1.268      | .000  | -13.37                  | -5.13       |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari     | -2.750                | 1.268      | .352  | -6.87                   | 1.37        |
|                  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -8.750*               | 1.268      | .000  | -12.87                  | -4.63       |
|                  | 10 gr/mm2 14 hari    | -4.750*               | 1.268      | .017  | -8.87                   | -.63        |
|                  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -10.750*              | 1.268      | .000  | -14.87                  | -6.63       |
|                  | kontrol              | 5.000*                | 1.268      | .011  | .88                     | 9.12        |
|                  | 10gr/mm2 28 hari     | -4.250*               | 1.268      | .040  | -8.37                   | -.13        |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari     | 2.250                 | 1.268      | .578  | -1.87                   | 6.37        |
|                  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -3.750                | 1.268      | .090  | -7.87                   | .37         |
| 10gr/mm2 14 hari | 10 gr/mm2 14 hari    | .250                  | 1.268      | 1.000 | -3.87                   | 4.37        |
|                  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -5.750*               | 1.268      | .003  | -9.87                   | -1.63       |
|                  | kontrol              | 9.250*                | 1.268      | .000  | 5.13                    | 13.37       |
|                  | 10gr/mm2 14 hari     | 4.250*                | 1.268      | .040  | .13                     | 8.37        |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari     | 6.500*                | 1.268      | .001  | 2.38                    | 10.62       |
|                  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | .500                  | 1.268      | 1.000 | -3.62                   | 4.62        |
|                  | 10gr/mm2 28 hari     | 4.500*                | 1.268      | .027  | .38                     | 8.62        |
|                  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -1.500                | 1.268      | .893  | -5.62                   | 2.62        |
|                  | kontrol              | 2.750                 | 1.268      | .352  | -1.37                   | 6.87        |
|                  | 10gr/mm2 14 hari     | -2.250                | 1.268      | .578  | -6.37                   | 1.87        |
| 5 gr/mm2 14 hari | 10gr/mm2 28 hari     | -6.500*               | 1.268      | .001  | -10.62                  | -2.38       |
|                  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -6.000*               | 1.268      | .002  | -10.12                  | -1.88       |

|                     |                      |         |       |       |        |       |
|---------------------|----------------------|---------|-------|-------|--------|-------|
| 5-10 gr/mm2 28 hari | 10 gr/mm2 14 hari    | -2.000  | 1.268 | .697  | -6.12  | 2.12  |
|                     | 10-20 gr/mm2 28 hari | -8.000* | 1.268 | .000  | -12.12 | -3.88 |
|                     | kontrol              | 8.750*  | 1.268 | .000  | 4.63   | 12.87 |
|                     | 10gr/mm2 14 hari     | 3.750   | 1.268 | .090  | -.37   | 7.87  |
|                     | 10gr/mm2 28 hari     | -.500   | 1.268 | 1.000 | -4.62  | 3.62  |
|                     | 5 gr/mm2 14 hari     | 6.000*  | 1.268 | .002  | 1.88   | 10.12 |
|                     | 10 gr/mm2 14 hari    | 4.000   | 1.268 | .061  | -.12   | 8.12  |
|                     | 10-20 gr/mm2 28 hari | -2.000  | 1.268 | .697  | -6.12  | 2.12  |
|                     | kontrol              | 4.750*  | 1.268 | .017  | .63    | 8.87  |
|                     | 10gr/mm2 14 hari     | -.250   | 1.268 | 1.000 | -4.37  | 3.87  |
| 10 gr/mm2 14 hari   | 10gr/mm2 28 hari     | -4.500* | 1.268 | .027  | -8.62  | -.38  |
|                     | 5 gr/mm2 14 hari     | 2.000   | 1.268 | .697  | -2.12  | 6.12  |
|                     | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -4.000  | 1.268 | .061  | -8.12  | .12   |
|                     | 10-20 gr/mm2 28 hari | -6.000* | 1.268 | .002  | -10.12 | -1.88 |
|                     | kontrol              | 10.750* | 1.268 | .000  | 6.63   | 14.87 |
|                     | 10gr/mm2 14 hari     | 5.750*  | 1.268 | .003  | 1.63   | 9.87  |
|                     | 10gr/mm2 28 hari     | 1.500   | 1.268 | .893  | -2.62  | 5.62  |
|                     | 5 gr/mm2 14 hari     | 8.000*  | 1.268 | .000  | 3.88   | 12.12 |
|                     | 5-10 gr/mm2 28 hari  | 2.000   | 1.268 | .697  | -2.12  | 6.12  |
|                     | 10 gr/mm2 14 hari    | 6.000*  | 1.268 | .002  | 1.88   | 10.12 |

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

runx2

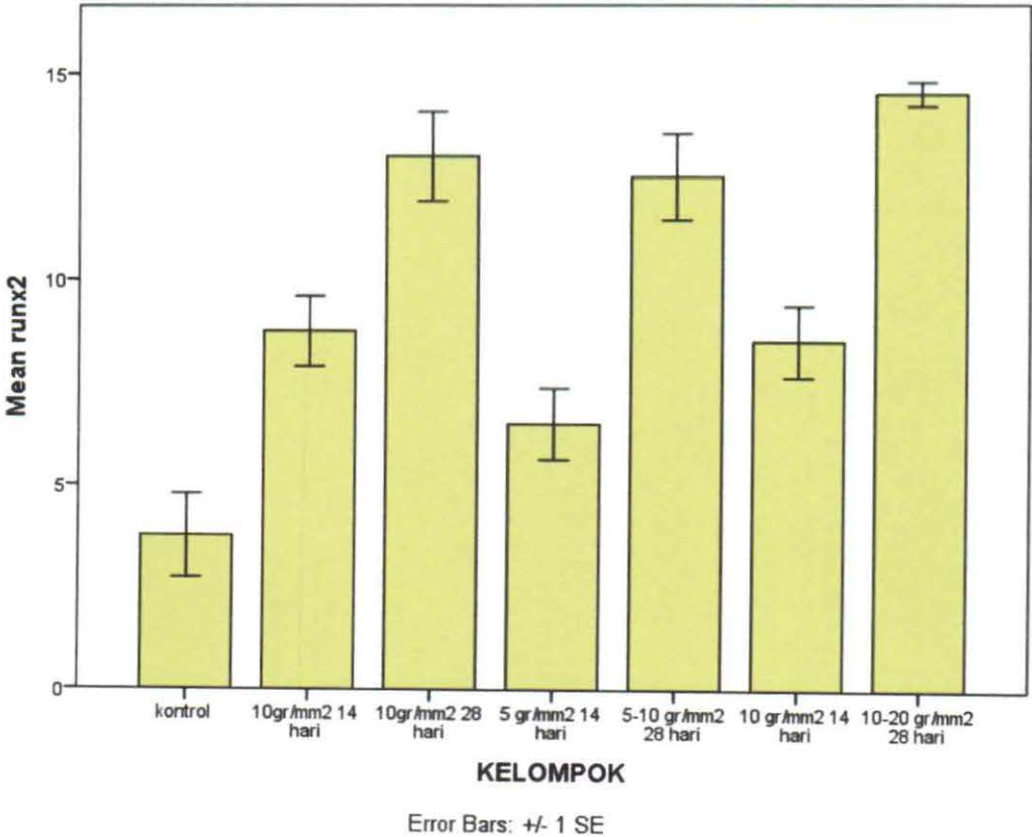
Tukey HSD<sup>a</sup>

| KELOMPOK          | N | Subset for alpha = 0.05 |      |      |   |
|-------------------|---|-------------------------|------|------|---|
|                   |   | 1                       | 2    | 3    | 4 |
| kontrol           | 4 | 3.75                    |      |      |   |
| 5 gr/mm2 14 hari  | 4 | 6.50                    | 6.50 |      |   |
| 10 gr/mm2 14 hari | 4 |                         | 8.50 | 8.50 |   |
| 10gr/mm2 14 hari  | 4 |                         | 8.75 | 8.75 |   |

|                      |   |      |      |       |       |
|----------------------|---|------|------|-------|-------|
| 5-10 gr/mm2 28 hari  | 4 |      |      | 12.50 | 12.50 |
| 10gr/mm2 28 hari     | 4 |      |      |       | 13.00 |
| 10-20 gr/mm2 28 hari | 4 |      |      |       | 14.50 |
| Sig.                 |   | .352 | .578 | .061  | .697  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Lampiran 4

Hasil Analisis Statistik Perhitungan Osteoklast

ANOVA

osteoclast

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | 306.429        | 6  | 51.071      | 9.908 | .000 |
| Within Groups  | 108.250        | 21 | 5.155       |       |      |
| Total          | 414.679        | 27 |             |       |      |

Multiple Comparisons

Dependent Variable: osteoclast

Tukey HSD

| (I) KELOMPOK     | (J) KELOMPOK         | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 95% Confidence Interval |             |
|------------------|----------------------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|                  |                      |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| kontrol          | 10gr/mm2 14 hari     | -6.250*               | 1.605      | .012  | -11.47                  | -1.03       |
|                  | 10gr/mm2 28 hari     | -10.250*              | 1.605      | .000  | -15.47                  | -5.03       |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari     | -5.750*               | 1.605      | .025  | -10.97                  | -.53        |
|                  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -7.000*               | 1.605      | .004  | -12.22                  | -1.78       |
|                  | 10 gr/mm2 14 hari    | -8.000*               | 1.605      | .001  | -13.22                  | -2.78       |
|                  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -10.750*              | 1.605      | .000  | -15.97                  | -5.53       |
|                  | kontrol              | 6.250*                | 1.605      | .012  | 1.03                    | 11.47       |
|                  | 10gr/mm2 28 hari     | -4.000                | 1.605      | .212  | -9.22                   | 1.22        |
| 10gr/mm2 14 hari | 5 gr/mm2 14 hari     | .500                  | 1.605      | 1.000 | -4.72                   | 5.72        |
|                  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -.750                 | 1.605      | .999  | -5.97                   | 4.47        |
|                  | 10 gr/mm2 14 hari    | -1.750                | 1.605      | .924  | -6.97                   | 3.47        |
|                  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -4.500                | 1.605      | .122  | -9.72                   | .72         |
| 10gr/mm2 28 hari | kontrol              | 10.250*               | 1.605      | .000  | 5.03                    | 15.47       |
|                  | 10gr/mm2 14 hari     | 4.000                 | 1.605      | .212  | -1.22                   | 9.22        |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari     | 4.500                 | 1.605      | .122  | -.72                    | 9.72        |

|  |                      |         |       |       |        |       |
|--|----------------------|---------|-------|-------|--------|-------|
|  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | 3.250   | 1.605 | .429  | -1.97  | 8.47  |
|  | 10 gr/mm2 14 hari    | 2.250   | 1.605 | .795  | -2.97  | 7.47  |
|  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -.500   | 1.605 | 1.000 | -5.72  | 4.72  |
|  | kontrol              | 5.750*  | 1.605 | .025  | .53    | 10.97 |
|  | 10gr/mm2 14 hari     | -.500   | 1.605 | 1.000 | -5.72  | 4.72  |
|  | 10gr/mm2 28 hari     | -4.500  | 1.605 | .122  | -9.72  | .72   |
|  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -1.250  | 1.605 | .985  | -6.47  | 3.97  |
|  | 5 gr/mm2 14 hari     |         |       |       |        |       |
|  | 10 gr/mm2 14 hari    | -2.250  | 1.605 | .795  | -7.47  | 2.97  |
|  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -5.000  | 1.605 | .066  | -10.22 | .22   |
|  | kontrol              | 7.000*  | 1.605 | .004  | 1.78   | 12.22 |
|  | 10gr/mm2 14 hari     | .750    | 1.605 | .999  | -4.47  | 5.97  |
|  | 10gr/mm2 28 hari     | -3.250  | 1.605 | .429  | -8.47  | 1.97  |
|  | 5-10 gr/mm2 28 hari  |         |       |       |        |       |
|  | 5 gr/mm2 14 hari     | 1.250   | 1.605 | .985  | -3.97  | 6.47  |
|  | 10 gr/mm2 14 hari    | -1.000  | 1.605 | .995  | -6.22  | 4.22  |
|  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -3.750  | 1.605 | .274  | -8.97  | 1.47  |
|  | kontrol              | 8.000*  | 1.605 | .001  | 2.78   | 13.22 |
|  | 10gr/mm2 14 hari     | 1.750   | 1.605 | .924  | -3.47  | 6.97  |
|  | 10gr/mm2 28 hari     | -2.250  | 1.605 | .795  | -7.47  | 2.97  |
|  | 10 gr/mm2 14 hari    |         |       |       |        |       |
|  | 5 gr/mm2 14 hari     | 2.250   | 1.605 | .795  | -2.97  | 7.47  |
|  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | 1.000   | 1.605 | .995  | -4.22  | 6.22  |
|  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -2.750  | 1.605 | .615  | -7.97  | 2.47  |
|  | kontrol              | 10.750* | 1.605 | .000  | 5.53   | 15.97 |
|  | 10gr/mm2 14 hari     | 4.500   | 1.605 | .122  | -.72   | 9.72  |
|  | 10-20 gr/mm2 28 hari | .500    | 1.605 | 1.000 | -4.72  | 5.72  |
|  | 5 gr/mm2 14 hari     | 5.000   | 1.605 | .066  | -.22   | 10.22 |
|  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | 3.750   | 1.605 | .274  | -1.47  | 8.97  |

|                   |       |       |      |       |      |
|-------------------|-------|-------|------|-------|------|
| 10 gr/mm2 14 hari | 2.750 | 1.605 | .615 | -2.47 | 7.97 |
|-------------------|-------|-------|------|-------|------|

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

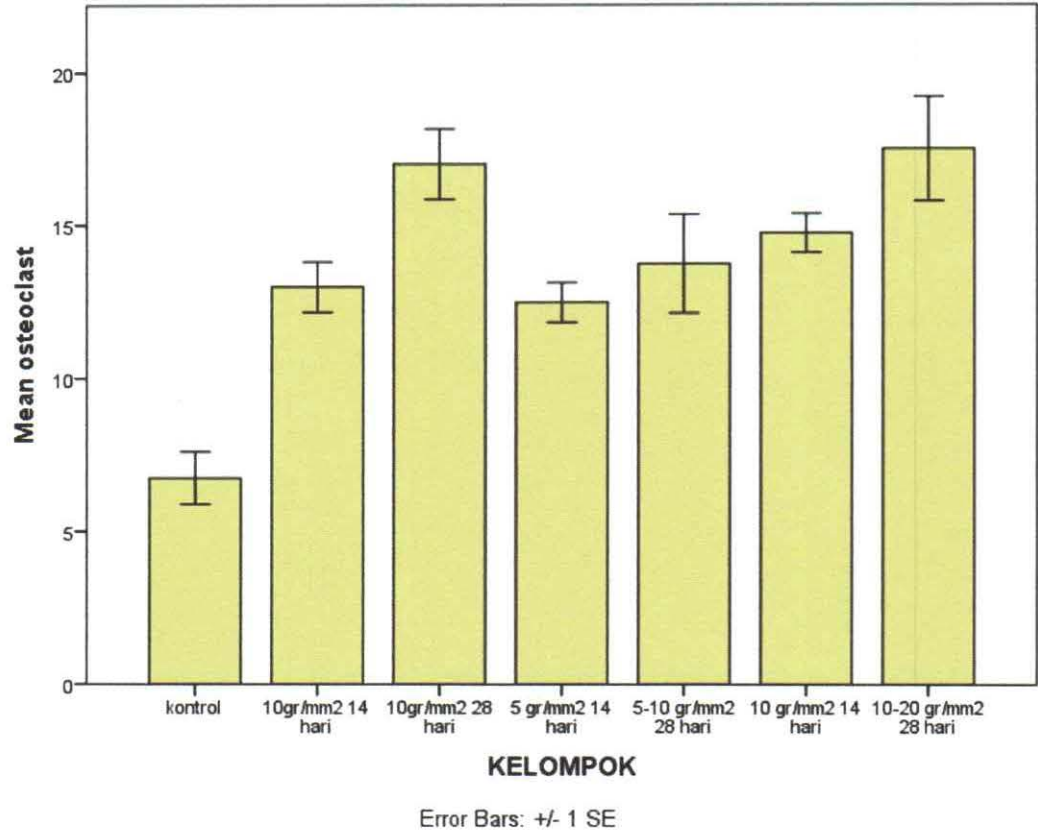
osteoclast

Tukey HSD<sup>a</sup>

| KELOMPOK             | N | Subset for alpha = 0.05 |       |
|----------------------|---|-------------------------|-------|
|                      |   | 1                       | 2     |
| kontrol              | 4 | 6.75                    |       |
| 5 gr/mm2 14 hari     | 4 |                         | 12.50 |
| 10gr/mm2 14 hari     | 4 |                         | 13.00 |
| 5-10 gr/mm2 28 hari  | 4 |                         | 13.75 |
| 10 gr/mm2 14 hari    | 4 |                         | 14.75 |
| 10gr/mm2 28 hari     | 4 |                         | 17.00 |
| 10-20 gr/mm2 28 hari | 4 |                         | 17.50 |
| Sig.                 |   | 1.000                   | .066  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Lampiran 5

Hasil Analisis Statistik Perhitungan Osteoblast

ANOVA

osteoblast

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| Between Groups | 496.429        | 6  | 82.738      | 16.548 | .000 |
| Within Groups  | 105.000        | 21 | 5.000       |        |      |
| Total          | 601.429        | 27 |             |        |      |

Multiple Comparisons

Dependent Variable: osteoblast

Tukey HSD

| (I) KELOMPOK     | (J) KELOMPOK         | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval |             |
|------------------|----------------------|-----------------------|------------|------|-------------------------|-------------|
|                  |                      |                       |            |      | Lower Bound             | Upper Bound |
| kontrol          | 10gr/mm2 14 hari     | -4.000                | 1.581      | .199 | -9.14                   | 1.14        |
|                  | 10gr/mm2 28 hari     | -10.500*              | 1.581      | .000 | -15.64                  | -5.36       |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari     | -5.750*               | 1.581      | .022 | -10.89                  | -.61        |
|                  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -10.750*              | 1.581      | .000 | -15.89                  | -5.61       |
|                  | 10 gr/mm2 14 hari    | -7.500*               | 1.581      | .002 | -12.64                  | -2.36       |
|                  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -13.250*              | 1.581      | .000 | -18.39                  | -8.11       |
|                  | kontrol              | 4.000                 | 1.581      | .199 | -1.14                   | 9.14        |
|                  | 10gr/mm2 28 hari     | -6.500*               | 1.581      | .008 | -11.64                  | -1.36       |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari     | -1.750                | 1.581      | .919 | -6.89                   | 3.39        |
|                  | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -6.750*               | 1.581      | .005 | -11.89                  | -1.61       |
|                  | 10gr/mm2 14 hari     | -3.500                | 1.581      | .330 | -8.64                   | 1.64        |
|                  | 10-20 gr/mm2 28 hari | -9.250*               | 1.581      | .000 | -14.39                  | -4.11       |
| 10gr/mm2 28 hari | kontrol              | 10.500*               | 1.581      | .000 | 5.36                    | 15.64       |
|                  | 10gr/mm2 14 hari     | 6.500*                | 1.581      | .008 | 1.36                    | 11.64       |
|                  | 5 gr/mm2 14 hari     | 4.750                 | 1.581      | .082 | -.39                    | 9.89        |

|                      |                      |         |       |       |        |       |
|----------------------|----------------------|---------|-------|-------|--------|-------|
| 5 gr/mm2 14 hari     | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -2.250  | 1.581 | 1.000 | -5.39  | 4.89  |
|                      | 10 gr/mm2 14 hari    | 3.000   | 1.581 | .503  | -2.14  | 8.14  |
|                      | 10-20 gr/mm2 28 hari | -2.750  | 1.581 | .599  | -7.89  | 2.39  |
|                      | kontrol              | 5.750*  | 1.581 | .022  | .61    | 10.89 |
|                      | 10gr/mm2 14 hari     | 1.750   | 1.581 | .919  | -3.39  | 6.89  |
|                      | 10gr/mm2 28 hari     | -4.750  | 1.581 | .082  | -9.89  | .39   |
|                      | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -5.000  | 1.581 | .060  | -10.14 | .14   |
|                      | 10 gr/mm2 14 hari    | -1.750  | 1.581 | .919  | -6.89  | 3.39  |
|                      | 10-20 gr/mm2 28 hari | -7.500* | 1.581 | .002  | -12.64 | -2.36 |
|                      | kontrol              | 10.750* | 1.581 | .000  | 5.61   | 15.89 |
|                      | 10gr/mm2 14 hari     | 6.750*  | 1.581 | .005  | 1.61   | 11.89 |
|                      | 10gr/mm2 28 hari     | .250    | 1.581 | 1.000 | -4.89  | 5.39  |
|                      | 5-10 gr/mm2 28 hari  | 5.000   | 1.581 | .060  | -.14   | 10.14 |
|                      | 10 gr/mm2 14 hari    | 3.250   | 1.581 | .412  | -1.89  | 8.39  |
|                      | 10-20 gr/mm2 28 hari | -2.500  | 1.581 | .695  | -7.64  | 2.64  |
|                      | kontrol              | 7.500*  | 1.581 | .002  | 2.36   | 12.64 |
| 10 gr/mm2 14 hari    | 10gr/mm2 14 hari     | 3.500   | 1.581 | .330  | -1.64  | 8.64  |
|                      | 10gr/mm2 28 hari     | -3.000  | 1.581 | .503  | -8.14  | 2.14  |
|                      | 5 gr/mm2 14 hari     | 1.750   | 1.581 | .919  | -3.39  | 6.89  |
|                      | 5-10 gr/mm2 28 hari  | -3.250  | 1.581 | .412  | -8.39  | 1.89  |
|                      | 10-20 gr/mm2 28 hari | -5.750* | 1.581 | .022  | -10.89 | -.61  |
|                      | kontrol              | 13.250* | 1.581 | .000  | 8.11   | 18.39 |
|                      | 10gr/mm2 14 hari     | 9.250*  | 1.581 | .000  | 4.11   | 14.39 |
|                      | 10gr/mm2 28 hari     | 2.750   | 1.581 | .599  | -2.39  | 7.89  |
| 10-20 gr/mm2 28 hari | 5 gr/mm2 14 hari     | 7.500*  | 1.581 | .002  | 2.36   | 12.64 |
|                      | 5-10 gr/mm2 28 hari  | 2.500   | 1.581 | .695  | -2.64  | 7.64  |
|                      | 10 gr/mm2 14 hari    | 5.750*  | 1.581 | .022  | .61    | 10.89 |

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

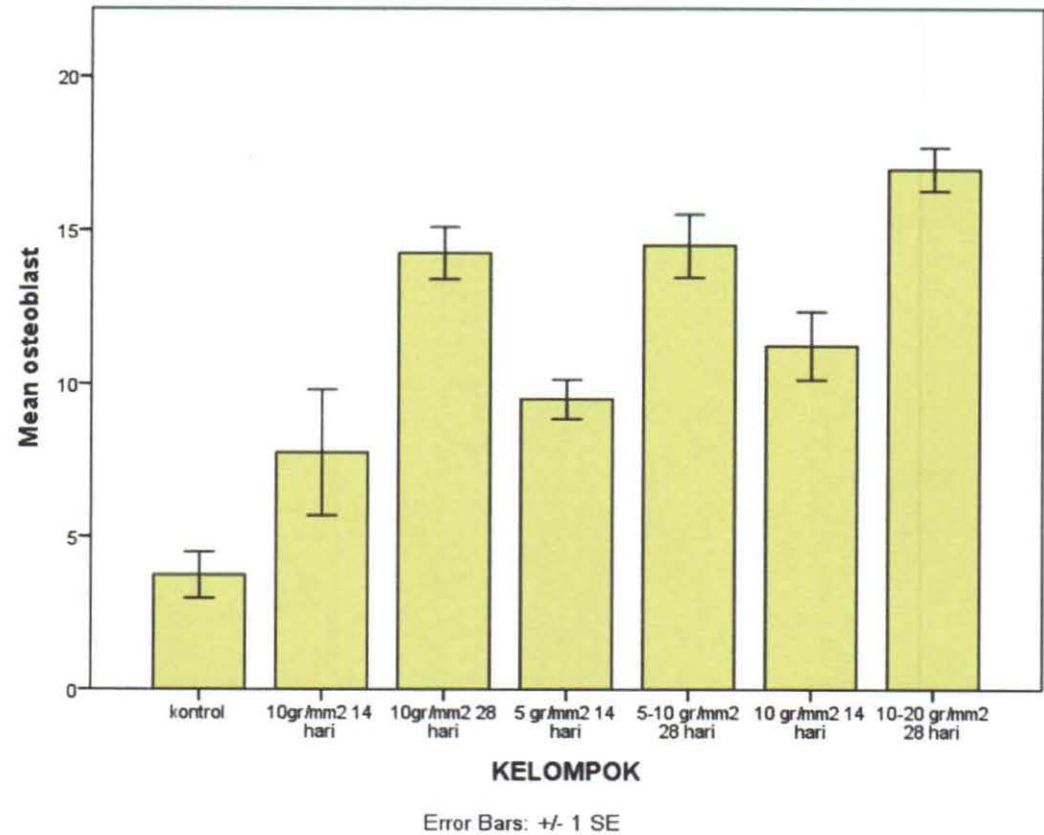
osteoblast

Tukey HSD<sup>a</sup>

| KELOMPOK             | N | Subset for alpha = 0.05 |       |       |       |
|----------------------|---|-------------------------|-------|-------|-------|
|                      |   | 1                       | 2     | 3     | 4     |
| kontrol              | 4 | 3.75                    |       |       |       |
| 10gr/mm2 14 hari     | 4 | 7.75                    | 7.75  |       |       |
| 5 gr/mm2 14 hari     | 4 |                         | 9.50  | 9.50  |       |
| 10 gr/mm2 14 hari    | 4 |                         | 11.25 | 11.25 |       |
| 10gr/mm2 28 hari     | 4 |                         |       | 14.25 | 14.25 |
| 5-10 gr/mm2 28 hari  | 4 |                         |       | 14.50 | 14.50 |
| 10-20 gr/mm2 28 hari | 4 |                         |       |       | 17.00 |
| Sig.                 |   | .199                    | .330  | .060  | .599  |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.



Lampiran 6

Hasil Analisis Statistik Korelasi NFATc1, RUNX2, Osetoklast dan Osteoblast

|                   |                                    | Correlations |        |            |            |
|-------------------|------------------------------------|--------------|--------|------------|------------|
| Control Variables |                                    | runx2        | NFATc1 | osteoclast | osteoblast |
| KELOMPOK          | Correlation                        | 1.000        | .702   | .661       | .777       |
|                   | runx2 Significance (2-tailed)      | .            | .000   | .000       | .000       |
|                   | df                                 | 0            | 25     | 25         | 25         |
|                   | Correlation                        | .702         | 1.000  | .938       | .628       |
|                   | NFATc1 Significance (2-tailed)     | .000         | .      | .000       | .000       |
|                   | df                                 | 25           | 0      | 25         | 25         |
|                   | Correlation                        | .661         | .938   | 1.000      | .657       |
|                   | osteoclast Significance (2-tailed) | .000         | .000   | .          | .000       |
|                   | df                                 | 25           | 25     | 0          | 25         |
|                   | Correlation                        | .777         | .628   | .657       | 1.000      |
|                   | osteoblast Significance (2-tailed) | .000         | .000   | .000       | .          |
|                   | df                                 | 25           | 25     | 25         | 0          |

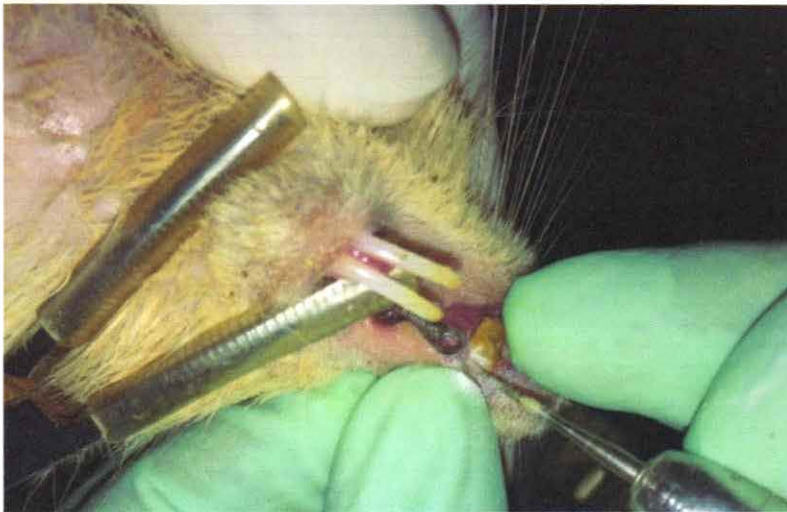




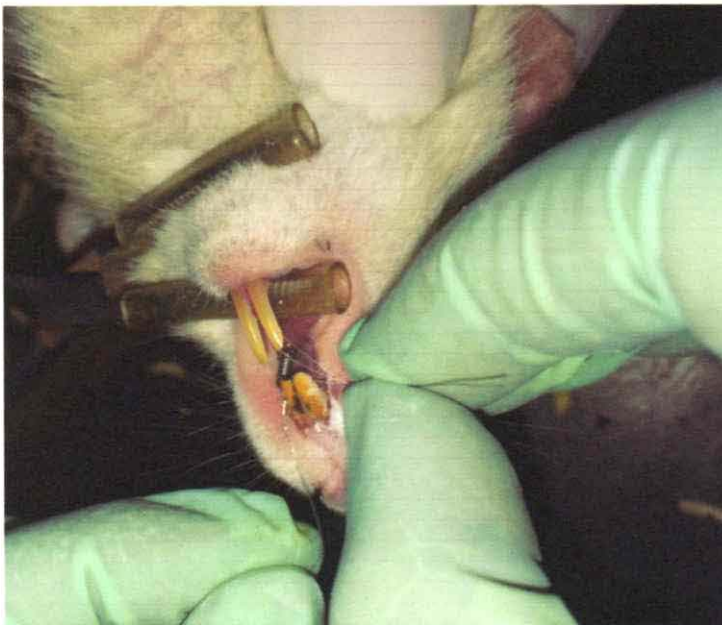
Tahap Persiapan Anastesi Hewan Coba



Anastesi Hewan Coba



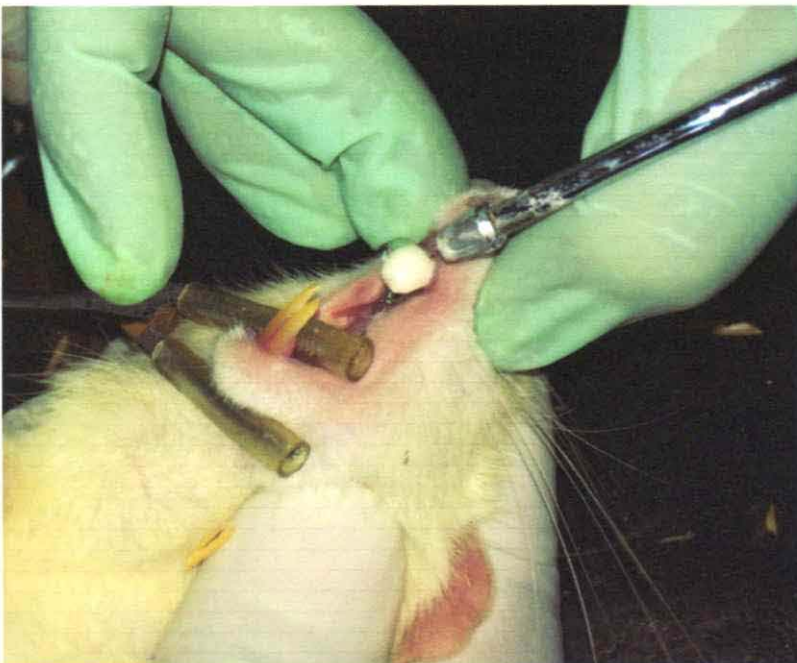
Preparasi Gigi Tikus untuk Persiapan Pemasangan *Niti Closed Coil Spring*



Retensi *Closed Coil Spring* dengan *Ligature Wire*



Bahan Retensi dengan *Glass Ionomer Cement*



Tahap Retensi *NiTi Closed Coil Spring* dengan GIC



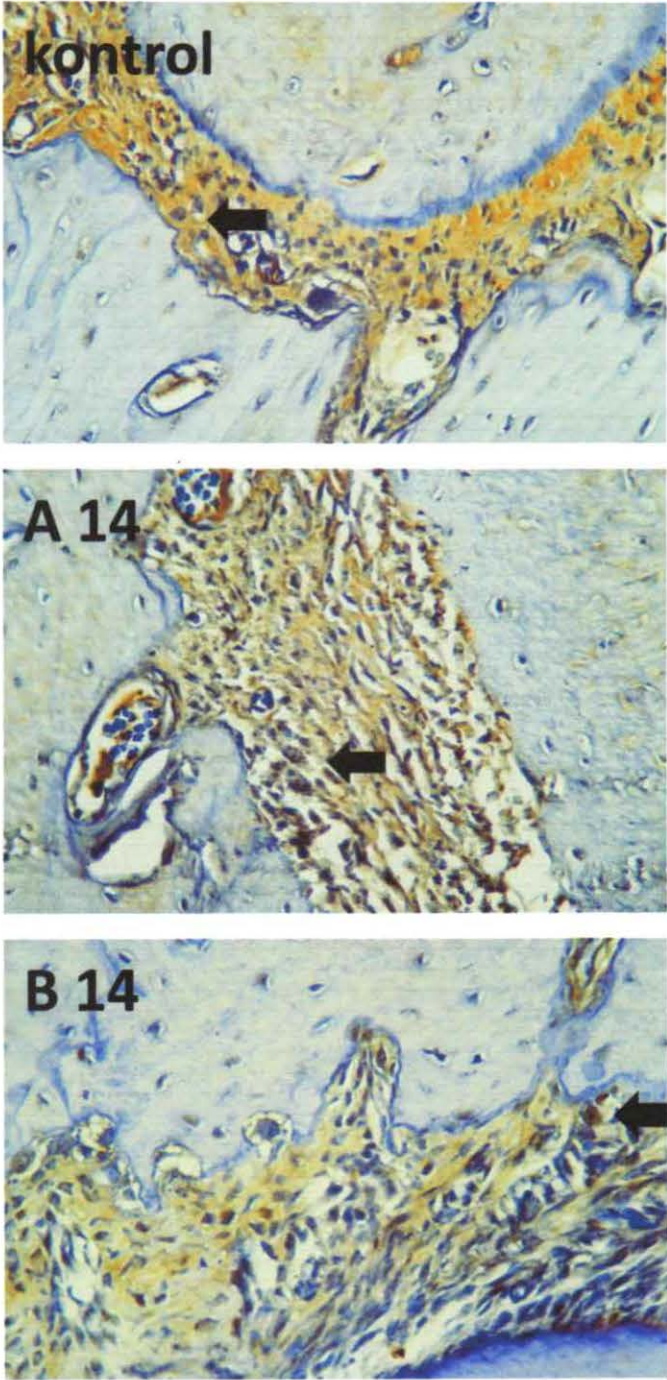
Hasil Pemasangan *Niti Closed Coil Spring*

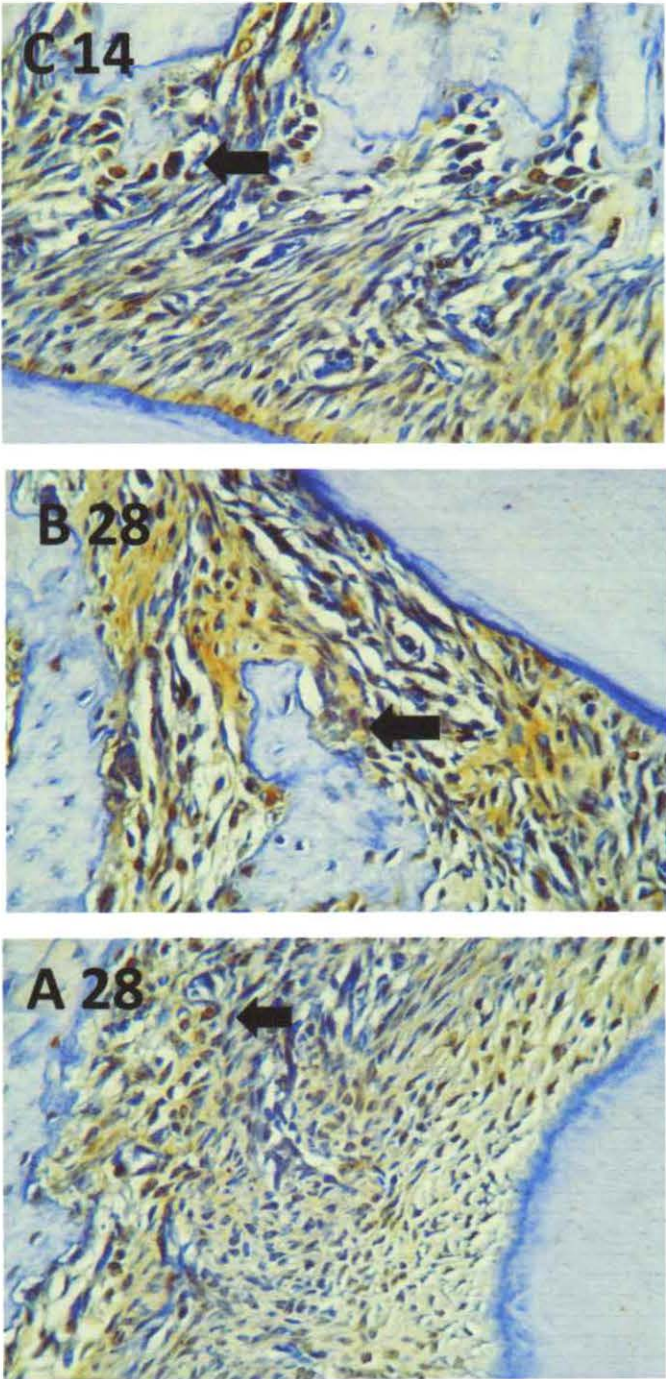


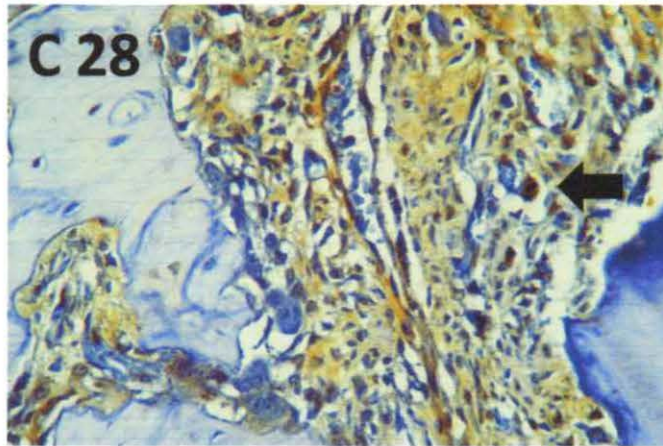
Perendaman Jaringan Didalam Formalin

Lampiran 8

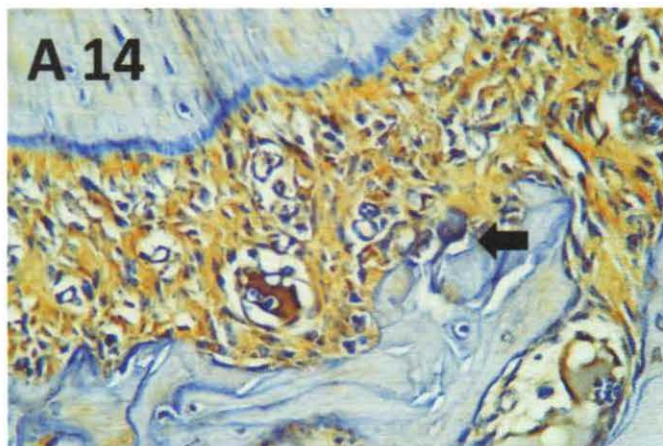
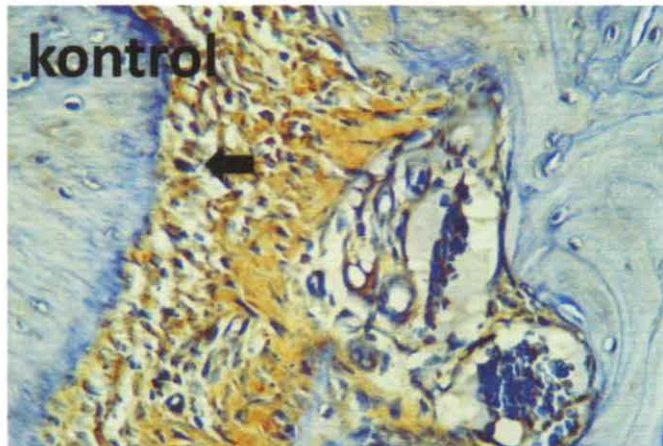
Gambar Hasil Pewarnaan Imunohistokimia RUNX2

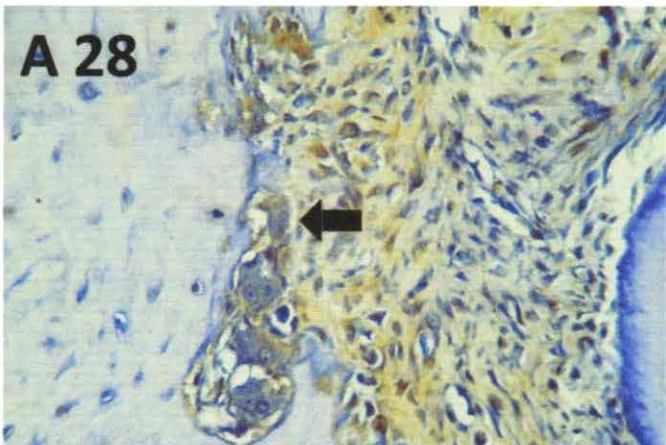
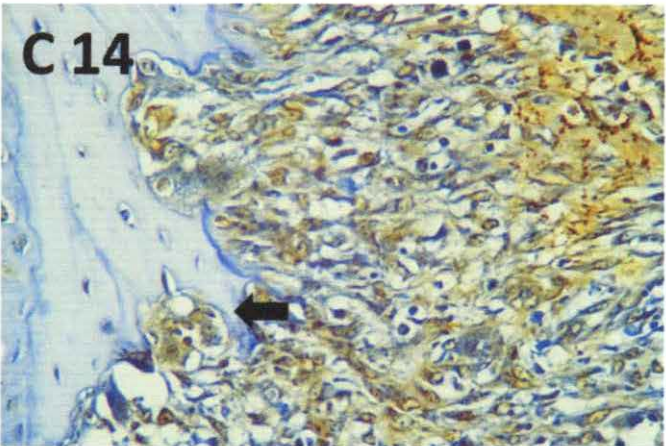
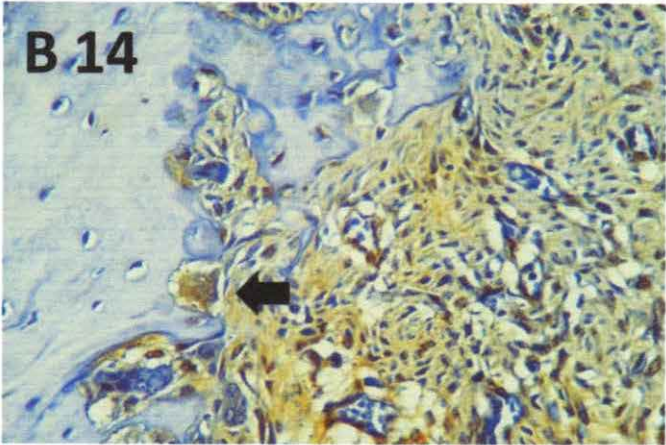


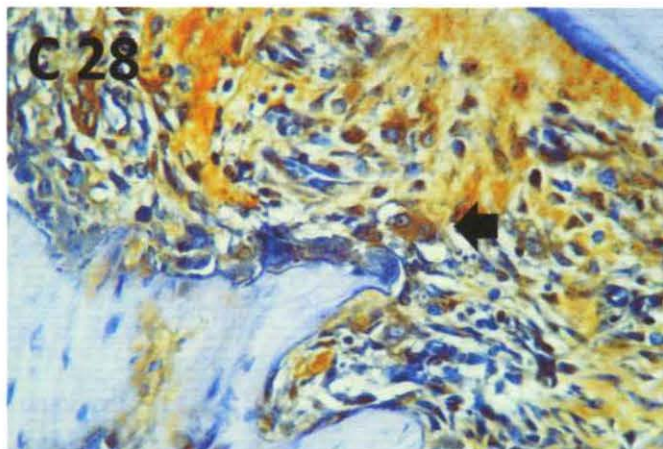
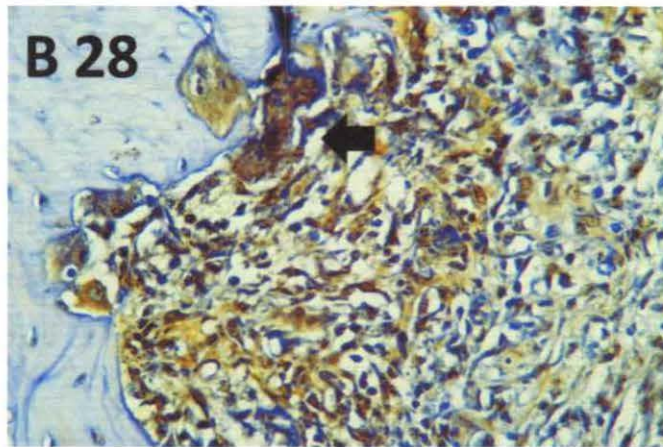




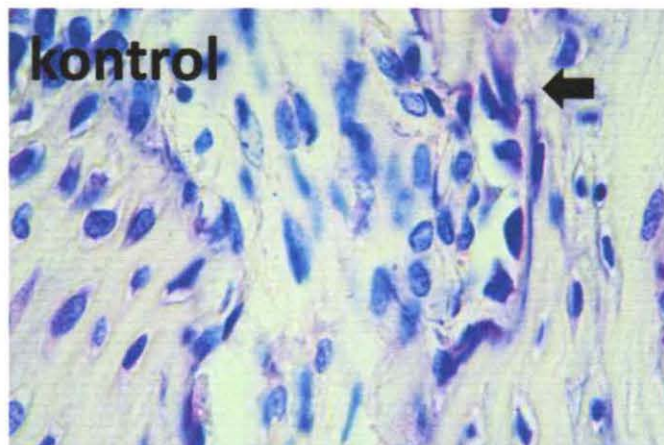
**Gambar Hasil Pewarnaan Imunohistokimia NFATc1**

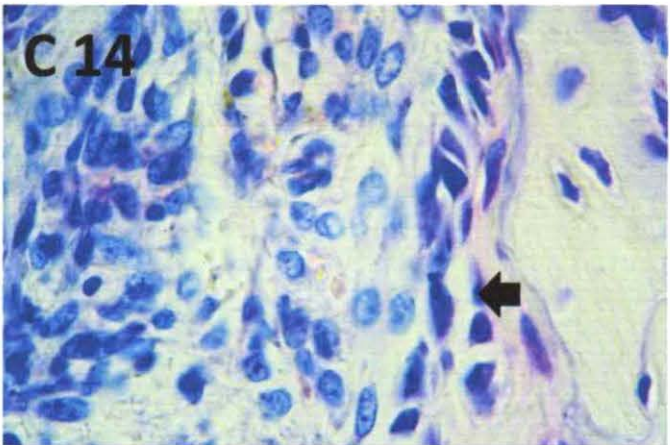
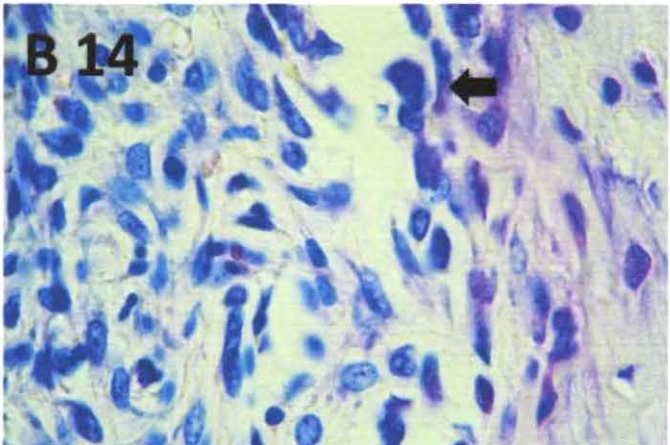
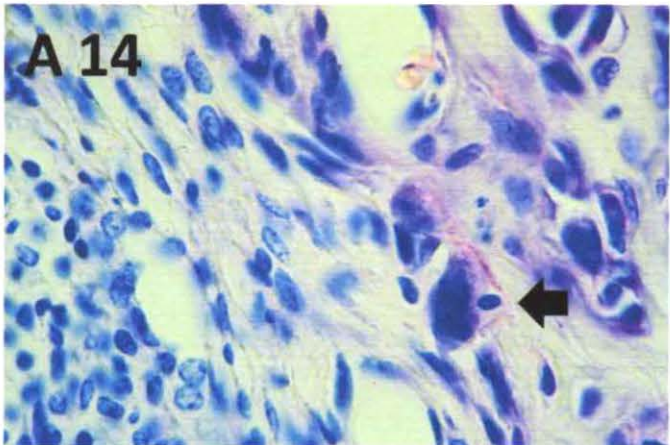


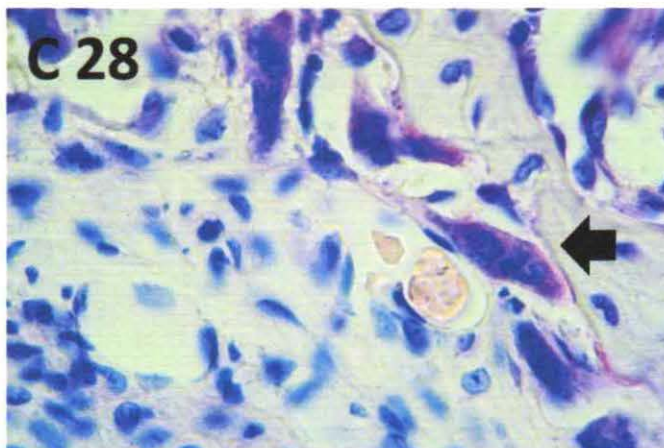
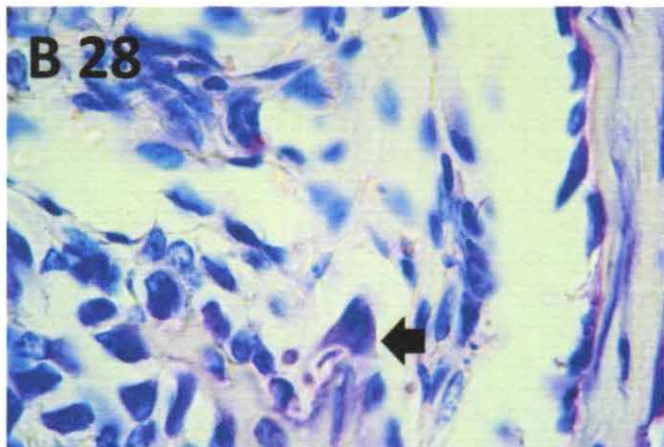
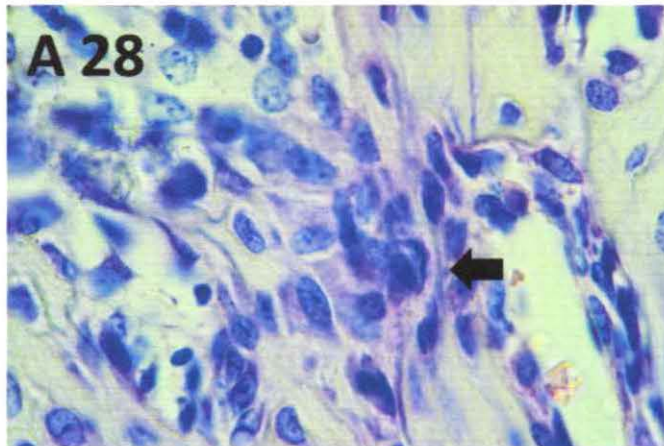




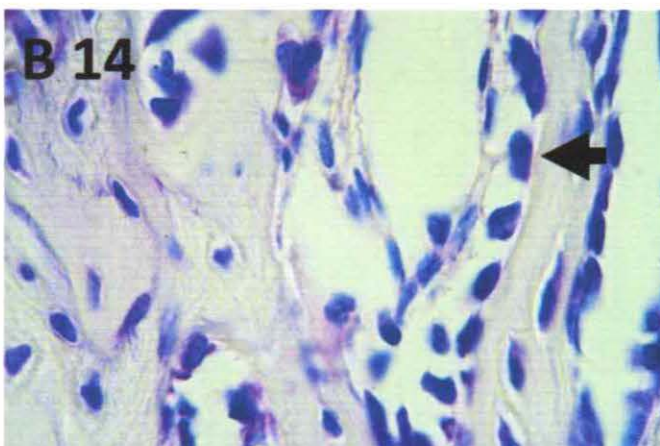
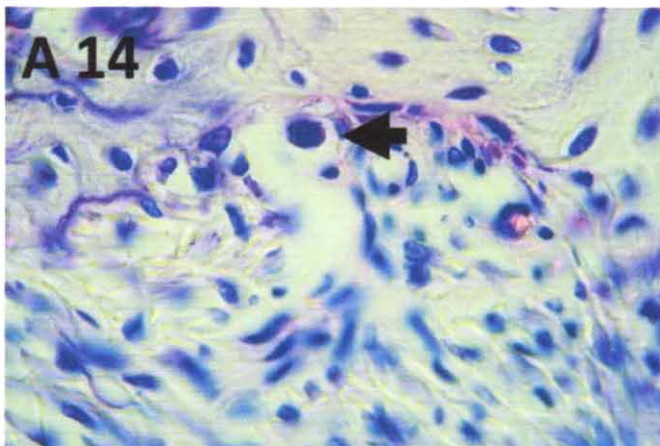
**Gambar Hasil Pewarnaan HE Osteoklast**

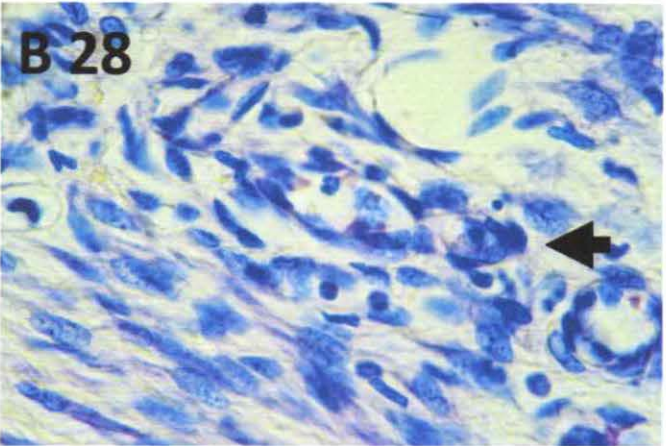
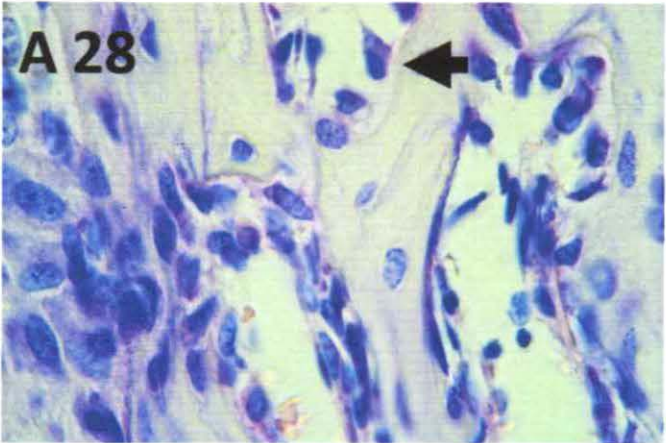
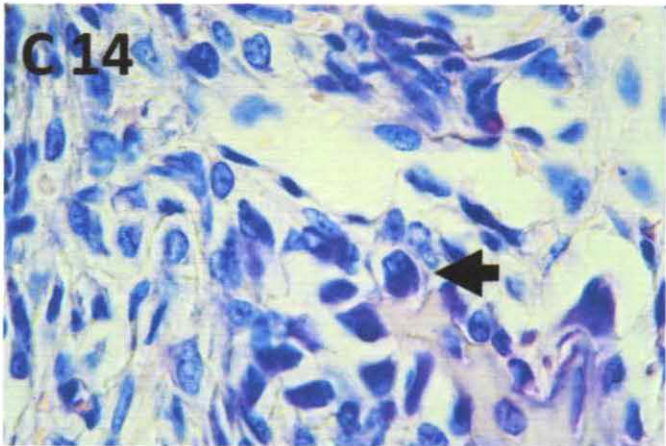


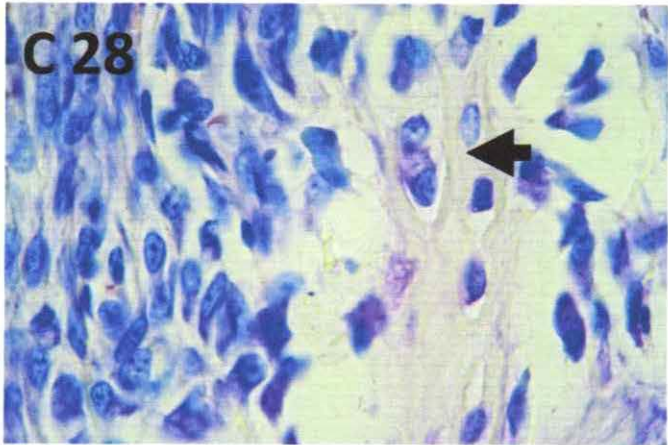




**Gambar Hasil Pewarnaan HE Osteoblast**









**UNIVERSITAS AIRLANGGA FACULTY OF DENTAL MEDICINE  
HEALTH RESEARCH ETHICAL CLEARANCE COMMISSION**

**ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE**

Number : 066/HRECC.FODM/VI/2017

Universitas Airlangga Faculty Of Dental Medicine Health Research Ethical Clearance Commission has studied the proposed research design carefully, and therefore, shall herewith certify that the research entitled :

**"EKSPRESI NFATc1 DAN RUNX2 PADA PERGERAKAN GIGI  
ORTODONTI TIKUS"**

Principal Researcher : NDHUK RATIH MUSTIHO HATI, drg  
Unit/Institution/Place of Research : - Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya  
- Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya  
- Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

**CERTIFIED TO BE ETHICALLY CLEARED**



Surabaya, June 20<sup>th</sup>, 2017  
Chairman,  
Prof. Dr. drg. MS. Sp.Perio(K)  
Official No.195009081978021001