

ABSTRACT

COMPARISON OF RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR- $\kappa\beta$ LIGAND (RANKL) AND OSTEOPROTEGERIN (OPG) EXPRESSION POST IMPLANTATION COMBINATION OF DEMINERALIZED FREEZE DRIED BOVINE BONE XENOGRAFT – BOVINE HYDROXYAPATITE (DFDBBX-BHA) AND FREEZE DRIED BOVINE BONE XENOGRAFT (FDBBX)

(In vivo Laboratory Experimental Study on New Zealand White Rabbit)

Background: Research in bone graft materials as bone substitution that potentially replace autogenous bone graft is nowadays investigated intensively. Freeze Dried Bone Xenograft (FDBBX), Demineralized Freeze Dried Bone Xenograft (DFDBBX) in a mixture with Bovine Hydroxyapatite (BHA) were compared by grafting those materials in mandible bone defect of New Zealand White Rabbit. Variables of RANKL, OPG expression, and the amount of osteoclast were measured as the parameters of resorption of those bone graft materials in regeneration process.

Objective: To determine the amount of osteoclast, RANKL and OPG expression after the graft materials of FDBBX, DFDBBX-BHA were grafted.

Method: Ten millimeter round defect was made in the mandible angle of New Zealand White Rabbit and divided in three groups. The control group, FDBBX group, and DFDBBX and BHA mixture group. The observation time were: 2 weeks, 4 weeks and 8 weeks. The amount of osteoclast cells was observed using Hematoxylin Eosin (HE), and expression of RANKL and OPG were observed using Immunohistochemistry (IHC).

Results: The amount of osteoclast cells in group of DFDBBX and BHA mixture was found lower with significant difference ($p = 0.009$) in 8 weeks observation compared to FDBBX group. The expression of RANKL in those groups in mixture was found lower with significant difference ($p = 0.001$), but not significant difference compared to FDBBX group. Comparing to control group, group of mixture of DFDBBX and BHA found that the OPG showed higher value ($p = 0.005$), but no significant difference compared with in FDBBX groups.

Conclusion: FDBBX and mixture of DFDBBX and BHA showed a difference level in the amount of osteoclast means that graft material in a mixture of DFDBBX and BHA resorbed more slowly comparing to FDBBX. The slower of bone graft degradation as presented in DFDBBX and BHA combination can be related to its capacity in host bone stimulation.

Keywords: Bovine Xenograft, RANK, RANKL, OPG

DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan	
Sampul Dalam	i
Prasyarat Gelar	ii
Pernyataan Orisinalitas	iii
Persetujuan Usulan Penelitian Tesis	iv
Persetujuan Tesis	v
Penetapan Panitia Penguji	vi
Kata Pengantar	vii
Persetujuan Publikasi Tugas Akhir	ix
Abstrak	x
Abstract	xi
Daftar Isi	xii
Daftar Tabel	xviii
Daftar Gambar	xx
Daftar Lampiran	xxii
Daftar Singkatan	xxiii

BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.4.1 Teoritis	8
1.4.2 Praktis	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Struktur dan Komposisi Tulang	9
2.2 Komponen Sel-sel Tulang	11
2.2.1 <i>Osteoprogenitor Cell</i>	11
2.2.2 Osteoblas	11
2.2.3 Osteosit	13
2.2.4 Osteoklas	14
2.3 Defek Tulang Maksilofasial	15
2.4 <i>Critical Size Defect</i>	15
2.5 <i>Bone Graft</i>	17
2.6 <i>Xenograf</i>	18
2.6.1 <i>Bovine Hydroxyapatite</i>	19
2.6.2 <i>Freeze Dried Bovine Bone Xenograf</i>	20

2.6.3 <i>Demineralized Freeze-Dried Bovine Bone Xenograft</i>	21
2.7 Angiogenesis dalam Penyembuhan Tulang	23
2.8 <i>Growth Factor</i> dalam Proses Penyembuhan Tulang	25
2.9 Respon Biologis Pasca Implantasi <i>Bone Graft</i>	27
2.10 <i>Remodeling</i> Penyembuhan Tulang	30
2.11 <i>Bone Marker</i> Resorpsi Tulang	34
2.11.1 <i>Receptor Activator Of Nuclear Factor-$\kappa$$\beta$ Ligand</i> (RANKL)	35
2.11.2 <i>Osteoprotegerin</i> (OPG)	36
2.12 Pensinyalan Ikatan RANKL, OPG dan RANK	37
2.13 Pemeriksaan Osteoklas	39
2.14 Pemeriksaan Ekspresi RANKL dan OPG	39
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	41
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	41
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	42
3.3 Hipotesis Penelitian	44
BAB 4 METODE PENELITIAN	45
4.1 Rancangan Penelitian	45
4.2 Unit Eksperimen	46
4.2.1 Kriteria Inklusi	46
4.2.2 Kriteria Eksklusi	46
4.3 Randomisasi	46
4.4 Variabel Penelitian	47

4.4.1 Variabel Bebas (<i>Independent Variable</i>)	47
4.4.2 Variabel Tergantung (<i>Dependent Variable</i>)	47
4.4.3 Variabel Kendali	47
4.4.4 Definisi Operasional	48
4.5 Materi dan Bahan Penelitian	50
4.5.1 Materi Penelitian	50
4.5.2 Bahan dan Alat Penelitian	50
4.6 Jadwal dan Lokasi Penelitian	51
4.6.1 Jadwal Penelitian	51
4.6.2 Tempat Penelitian	51
4.7 Kerangka Operasional	51
4.7.1 Uji Laik Etik Penelitian	51
4.7.2 Penanaman FDBBX dan DFDBBX-BHA pada Hewan Coba	52
4.7.2.1 Pembuatan <i>Critical Size Defect</i> pada Mandibula Kelinci	52
4.7.2.2 Implantasi FDBBX dan Kombinasi DFDBBX-BHA pada Defek Mandibula Kelinci	53
4.7.2.3 Pengorbanan Hewan Coba dan Pengambilan Spesimen Jaringan Penelitian	55
4.7.3 Dekalsifikasi Spesimen Jaringan Penelitian	56
4.7.4 Pemrosesan Spesimen Penelitian	56
4.7.5 Pengamatan Sel Osteoklas	57
4.7.6 Pengamatan Ekspresi RANKL	57

4.7.7 Pengamatan Ekspresi OPG	57
4.8 Analisa Statistik	58
4.9 Skema Prosedur Penelitian	60
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	61
5.1 Analisis Histologi Osteoklas Minggu ke-2, ke-4 dan ke-8.....	61
5.1.1 Pengamatan Jumlah Sel Osteoklas Minggu ke-2	61
5.1.2 Pengamatan Jumlah Sel Osteoklas Minggu ke-4	62
5.1.3 Pengamatan Jumlah Sel Osteoklas Minggu ke-8	62
5.2 Analisis Immunohistokimia Ekspresi RANKL dan OPG	
Minggu ke-2, ke-4 dan ke-8	63
5.2.1 Pengamatan Ekspresi RANKL Minggu ke-2	63
5.2.2 Pengamatan Ekspresi RANKL Minggu ke-4	64
5.2.3 Pengamatan Ekspresi RANKL Minggu ke-8	65
5.2.4 Pengamatan Ekspresi OPG Minggu ke-2	65
5.2.5 Pengamatan Ekspresi OPG Minggu ke-4	66
5.2.6 Pengamatan Ekspresi OPG Minggu ke-8	67
5.3 Analisis Statistika Osteoklas, Ekspresi RANKL, Ekspresi OPG	
Minggu ke-2, ke-4 dan ke-8	67
5.3.1 Analisis Osteoklas.....	67
5.3.2 Analisis Ekspresi RANKL	71
5.3.3 Analisis Ekspresi OPG	75
5.3.4 Perbandingan Ekspresi OPG dan RANKL	79

BAB 6 PEMBAHASAN	80
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	99
7.1 Kesimpulan	99
7.2 Saran	100
DAFTAR PUSTAKA	101
LAMPIRAN	116

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Statistika Deskriptif Osteoklas	68
Tabel 5.2 Distribusi Data dan Uji Beda antara Kelompok Kontrol, Kelompok FDBBX, Kelompok DFDBBX-BHA terhadap Osteoklas	69
Tabel 5.3 Hasil uji <i>Post Hoc</i> (<i>Mann-Whitney</i>) antara Kelompok Kontrol, Kelompok FDBBX, Kelompok DFDBBX-BHA terhadap Jumlah Osteoklas	70
Tabel 5.4 Statistika Deskriptif Ekspresi RANKL	71
Tabel 5.5 Distribusi Data dan Uji Beda antara Kelompok Kontrol, Kelompok FDBBX, Kelompok DFDBBX-BHA terhadap Ekspresi RANKL	73
Tabel 5.6 Hasil uji <i>Post Hoc</i> (<i>Tukey HSD</i>) antara Kelompok Kontrol, Kelompok FDBBX, Kelompok DFDBBX-BHA terhadap Ekspresi RANKL	74
Tabel 5.7 Statistika Deskriptif Ekspresi OPG	75
Tabel 5.8 Distribusi Data dan Uji Beda antara Kelompok Kontrol, Kelompok FDBBX, Kelompok DFDBBX-BHA terhadap Ekspresi OPG	77

Tabel 5.9 Hasil uji <i>Post Hoc</i> (<i>Tukey HSD</i>) antara Kelompok Kontrol, Kelompok FDBBX, Kelompok DFDBBX-BHA terhadap Ekspresi OPG	78
Tabel 5.10 Deskriptif Perbandingan Jumlah Ekspresi OPG dan RANKL	79

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Bovine Hydroxyapatite</i>	19
Gambar 2.2 <i>Demineralized freeze-dried bovine bone xenograft (DFDBBX)</i> ...	22
Gambar 2.3 Jalur Pensinyalan RANKL, OPG dan RANK	37
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian	45
Gambar 4.2 Skema Pembuatan Defek Mandibula dan Aplikasi Graft Pada Defek Tulang Mandibula Kelinci	53
Gambar 4.3 Pembuatan <i>Critical Size Defect</i> Pada Angulus Mandibula Kelinci dan Aplikasi Partikel Bone Graft	54
Gambar 4.4 Pengambilan Sampel Penelitian Reseksi Tulang Mandibula Kelinci	55
Gambar 4.5 Skema Prosedur Penelitian	60
Gambar 5.1 Gambar Mikroskopis Osteoklas Pengamatan Minggu Ke-2	61
Gambar 5.2 Gambar Mikroskopis Osteoklas Pengamatan Minggu Ke-4	62
Gambar 5.3 Gambar Mikroskopis Osteoklas Pengamatan Minggu Ke-8	63

Gambar 5.4 Gambar Mikroskopis Ekspresi RANKL	
Pengamatan Minggu Ke-2	64
Gambar 5.5 Gambar Mikroskopis Ekspresi RANKL	
Pengamatan Minggu Ke-4	64
Gambar 5.6 Gambar Mikroskopis Ekspresi RANKL	
Pengamatan Minggu Ke-8	65
Gambar 5.7 Gambar Mikroskopis Ekspresi OPG	
Pengamatan Minggu Ke-2	66
Gambar 5.8 Gambar Mikroskopis Ekspresi OPG	
Pengamatan Minggu Ke-4	66
Gambar 5.9 Gambar Mikroskopis Ekspresi OPG	
Pengamatan Minggu Ke-8	67
Gambar 5.10 Diagram Jumlah Osteoklas pada Kelompok Kontrol, FDBBX dan DFDBBX kombinasi BHA pada Pengamatan Minggu Ke-2,Ke-4 dan Ke-8	68
Gambar 5.11 Diagram Ekspresi RANKL pada Kelompok Kontrol, FDBBX dan DFDBBX kombinasi BHA pada Pengamatan Minggu Ke-2,Ke-4 dan Ke-8	71
Gambar 5.12 Diagram Ekspresi OPG pada Kelompok Kontrol, FDBBX dan DFDBBX kombinasi BHA pada Pengamatan Minggu Ke-2,Ke-4 dan Ke-8	75

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Lembar Kelaikan Etik Penelitian	116
Lampiran 2. Kegiatan Penelitian	117
Lampiran 3. Pengambilan Sampel	117
Lampiran 4. Pemrosesan Sampel Jaringan	118
Lampiran 5. Peralatan dan <i>Software</i> Pengamatan Mikroskopis	118
Lampiran 6. Analisis Statistik Hasil Penelitian	119

DAFTAR SINGKATAN

BHA	: <i>Bovine Hydroxyapatite</i>
BMP	: <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMPR	: <i>Bone Morphogenetic Proteins Receptor</i>
CFU-F	: <i>Fibroblast Colony Forming Unit</i>
CFU-GM	: <i>Granulocyt-Macrophage Colony-Forming Unit</i>
DFDBBX	: <i>Demineralized Freeze Dried Bovine Bone Xenograft</i>
DFDBBX-BHA-2	: Kelompok DFDBBX kombinasi BHA minggu ke-2
DFDBBX-BHA-4	: Kelompok DFDBBX kombinasi BHA minggu ke-4
DFDBBX-BHA-8	: Kelompok DFDBBX kombinasi BHA minggu ke-8
ECM	: Matriks Ekstraseluler
FDBBX	: <i>Freeze Dried Bovine Bone Xenograft</i>
FDBBX	: <i>Freeze Dried Bovine Bone Xenograft</i>
FDBBX-2	: Kelompok FDBBX minggu ke-2
FDBBX-4	: Kelompok FDBBX minggu ke-4
FDBBX-8	: Kelompok FDBBX minggu ke-8
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factors</i>
GLA-protein	: <i>Gamma Carboxyglutamic protein</i>
HA	: <i>Hidroksiapatit</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
IGF	: <i>Insulin Like Growth Factors</i>
IHC	: <i>Immunohistochemistry</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
ITD	: <i>Institute of Tropical Disease</i>
K-2	: Kelompok kontrol minggu ke-2
K-4	: Kelompok kontrol minggu ke-4
K-8	: Kelompok kontrol minggu ke-8

MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
M-SCF	: <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
OB	: <i>Osteoblas</i>
OC	: <i>Osteoklas</i>
OCIF	: <i>Osteoclast Inhibiting Factor</i>
OCP	: <i>Osteoclast Precursor</i>
ODF	: <i>Osteoclast Differentiation Factor</i>
OPG	: <i>Osteoprotegerin</i>
OPGL	: <i>Osteoprotegerin Ligand</i>
OPs	: <i>Osteogenic Proteins</i>
OS	: <i>Osteosit</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factors</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin</i>
PMN	: <i>Polymorphonuclear Neutrophilic Leukocyte</i>
PTH	: <i>Hormon Paratiroid</i>
RANK	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa\beta$</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor $\kappa\beta$ Ligand</i>
TGF- α	: <i>Transforming Growth Factor α</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRANCE	: <i>TNF Related Activation-Induced Cytokine</i>
TRAP	: <i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>