

Resorpsi tulang alveolar akan terjadi setelah pencabutan gigi dan memengaruhi keberhasilan rehabilitasi, terutama untuk pemasangan implan. Penelitian mengenai kebaruan material preservasi soket akan membantu dalam memahami bagaimana mencegah atau meminimalkan resorpsi tulang. Monograf ini bisa menjadi referensi bagi dokter gigi, spesialis periodonti, dan ahli bedah mulut dalam memilih dan menerapkan material preservasi soket yang tepat sesuai dengan kondisi pasien. Dengan adanya monograf ini, mahasiswa, peneliti, dan praktisi dapat memperoleh pemahaman mendalam tentang berbagai material yang tersedia, mekanisme kerjanya, serta efektivitasnya berdasarkan bukti ilmiah terbaru.

Buku monograf ini tidak hanya menyajikan teori, tetapi juga didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan. Hal ini memberikan keunggulan dalam hal validitas ilmiah dan relevansi klinis, sehingga lebih terpercaya dibandingkan buku yang hanya bersumber dari literatur tanpa penelitian langsung. Hasil riset yang disajikan dalam buku ini memperkaya khazanah ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang material kedokteran gigi, dengan data dan temuan baru yang mungkin belum dibahas dalam monograf lain. Dibandingkan buku umum yang membahas kedokteran gigi secara luas, buku ini lebih spesifik dan mendalam tentang preservasi soket tulang alveolar, sehingga lebih bermanfaat bagi profesional yang ingin memahami topik ini secara detail.

Sasaran utama pengguna buku monograf ini adalah dokter gigi dan dokter gigi spesialis yang melakukan perawatan gigi dan mulut yang membutuhkan kualitas tulang alveolar yang baik. Dokter gigi dengan spesialisasi periodonti, bedah mulut, dan prostodonsia dapat memahami teknik dan material terbaik dalam mencegah resorpsi tulang pasca-ekstraksi, serta mengoptimalkan hasil bedah dengan mempertahankan volume tulang alveolar agar persiapan pemasangan implan gigi dapat dilakukan dengan tulang yang berkualitas baik. Peneliti yang ingin mengembangkan material baru untuk preservasi soket tulang dan memahami efektivitas hidroksiapatit dengan amnion membran. Akademisi yang ingin mengintegrasikan hasil riset ini dalam kajian ilmiah dan pembelajaran. Perusahaan farmasi dan produsen biomaterial yang tertarik untuk mengembangkan atau meningkatkan produk preservasi tulang alveolar.



nasmedia

Penerbit Anggota IKAPI
PT Nas Media Indonesia
Sidorejo, Prambanan, Klaten 55584
Babua Raya No. 3 Makasar 90233
+62811 42 2017
@nasmedia.id nasmedia.id

REFERENSI



POTENSI BIOKOMPOSIT ALAMI KOMBINASI MEMBRAN AMNION SAPI
DENGAN HIDROKSIAPTIT SEBAGAI MATERIAL PENGGANTI TULANG ALVEOLAR

Octarina, dkk

POTENSI BIOKOMPOSIT ALAMI KOMBINASI MEMBRAN AMNION SAPI DENGAN HIDROKSIAPTIT SEBAGAI MATERIAL PENGGANTI TULANG ALVEOLAR

Octarina, dkk



**POTENSI BIOKOMPOSIT ALAMI
KOMBINASI MEMBRAN AMNION
SAPI DENGAN HIDROKSIAPTIT
SEBAGAI MATERIAL PENGANTI
TULANG ALVEOLAR**



Sanksi Pelanggaran Hak Cipta

**UNDANG-UNDANG REPUBLIK INDONESIA
NOMOR 28 TAHUN 2014 TENTANG HAK CIPTA**

Ketentuan Pidana

Pasal 113

- 1) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
- 2) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- 3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- 4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).



POTENSI BIOKOMPOSIT ALAMI KOMBINASI MEMBRAN AMNION SAPI DENGAN HIDROKSIAPTIT SEBAGAI MATERIAL PENGANTI TULANG ALVEOLAR

Octarina, dkk

Diterbitkan Oleh
PT. Nas Media Indonesia
Tahun 2025

POTENSI BIOKOMPOSIT ALAMI KOMBINASI MEMBRAN AMNION SAPI DENGAN HIDROKSIAPTIT SEBAGAI MATERIAL PENGANTI TULANG ALVEOLAR

Octarina

Elly Munadziroh

Meircurius Dwi Condro Surboyo

Florencia Livia Kurniawan

Copyright © Octarina, dkk 2025

All rights reserved

Layout : Muh Taufik
Desain Cover : Muh Taufik
Image Cover : freepik.com

Cetakan Pertama, Maret 2025

xxii + 179 hlm; 14.5 x 20.5 cm

ISBN 978-634-205-315-7

Diterbitkan oleh Penerbit Nasmedia

PT. Nas Media Indonesia

Anggota IKAPI

No. 018/SSL/2018

Sidorejo, Prambanan, Klaten 55584

Batua Raya No. 3, Makassar 90233

Telp. 0811 42 2017

0811 49 2022

0813 4111 6363

redaksi@nasmedia.id

www.nasmedia.id

Instagram: @nasmedia.id

Fanspage: nasmedia.id

Youtube: nasmedia entertainment





Persembahan
Untuk putra tercinta,
Ignatius Rilly Fusena

Penulisan monograf ini merupakan hasil dari proses penelitian selama
masa studi,
yang dijalani di tengah kehamilanmu—masa penuh perjuangan,
kebahagiaan, dan harapan.
Semoga kelak engkau tahu bahwa sejak awal, engkau telah menjadi
sumber kekuatan dan inspirasi.

Dengan cinta yang tak terhingga,
Mama & Papa

PRAKATA

Resorpsi tulang alveolar akan terjadi setelah pencabutan gigi dan memengaruhi keberhasilan rehabilitasi, terutama untuk pemasangan implan. Penelitian mengenai kebaruan material preservasi soket akan membantu dalam memahami bagaimana mencegah atau meminimalkan resorpsi tulang. Monograf ini bisa menjadi referensi bagi dokter gigi, spesialis periodonti, dan ahli bedah mulut dalam memilih dan menerapkan material preservasi soket yang tepat sesuai dengan kondisi pasien. Dengan adanya monograf ini, mahasiswa, peneliti, dan praktisi dapat memperoleh pemahaman mendalam tentang berbagai material yang tersedia, mekanisme kerjanya, serta efektivitasnya berdasarkan bukti ilmiah terbaru.

Buku monograf ini tidak hanya menyajikan teori, tetapi juga didasarkan pada penelitian yang telah dilakukan. Hal ini memberikan keunggulan dalam hal validitas ilmiah dan relevansi klinis, sehingga lebih terpercaya dibandingkan buku yang hanya bersumber dari literatur tanpa penelitian langsung. Hasil riset yang disajikan dalam buku ini memperkaya khazanah ilmu pengetahuan, khususnya dalam bidang material kedokteran gigi, dengan data dan temuan baru yang mungkin belum dibahas dalam monograf lain. Dibandingkan buku umum yang membahas kedokteran gigi secara luas, buku ini lebih spesifik dan mendalam tentang preservasi soket tulang alveolar, sehingga lebih bermanfaat bagi profesional yang ingin memahami topik ini secara detail.

Penelitian ini berfokus pada pembuatan material biokomposit amnion membran dan hidroksiapatit, karakterisasi material, uji *in vitro* dan *in vivo* dari biokomposit hidroksiapatit dengan amnion membran. Analisis struktur mikro dan makro biokomposit hidroksiapatit dengan amnion membran menggunakan Scanning Electron Microscopy (SEM) dan X-ray

Diffraction (XRD). Evaluasi sifat mekanik dan bioaktivitas material untuk memastikan kesesuaiannya sebagai material preservasi soket. Studi biokompatibilitas dan bioresorpsi material setelah diaplikasikan pada model hewan atau manusia.

Penelitian ini juga dapat dikembangkan ke dalam program pengabdian masyarakat, workshop, atau seminar tentang penggunaan material biokomposit hidroksiapatit dengan amnion membran dalam preservasi soket. Penyuluhan di klinik dan puskesmas tentang pilihan material terbaik untuk mempertahankan tulang setelah pencabutan gigi. Kerja sama dengan perusahaan farmasi atau bioteknologi untuk pengembangan dan produksi material biokomposit hidroksiapatit dengan amnion membran agar dapat digunakan secara luas. Penelitian lanjutan untuk meningkatkan efisiensi dan keamanan material sebelum komersialisasi.

Sasaran utama pengguna buku monograf ini adalah dokter gigi dan dokter gigi spesialis yang melakukan perawatan gigi dan mulut yang membutuhkan kualitas tulang alveolar yang baik. Dokter gigi dengan spesialisasi periodonti, bedah mulut, dan prostodonsia dapat memahami teknik dan material terbaik dalam mencegah resorpsi tulang pasca-ekstraksi, serta mengoptimalkan hasil bedah dengan mempertahankan volume tulang alveolar agar persiapan pemasangan implan gigi dapat dilakukan dengan tulang yang berkualitas baik. Peneliti yang ingin mengembangkan material baru untuk preservasi soket tulang dan memahami efektivitas hidroksiapatit dengan amnion membran. Akademisi yang ingin mengintegrasikan hasil riset ini dalam kajian ilmiah dan pembelajaran. Perusahaan farmasi dan produsen biomaterial yang tertarik untuk mengembangkan atau meningkatkan produk preservasi tulang alveolar.

Prasayarat pengguna monograf ini adalah Mahasiswa Kedokteran Gigi, Dokter Gigi Umum, dan Dokter Gigi Spesialis yang memiliki

pemahaman dasar tentang anatomi dan fisiologi tulang alveolar, serta proses penyembuhan pasca-ekstraksi gigi. Pengguna buku ini juga menguasai konsep dasar pencabutan gigi, resorpsi tulang, dan strategi preservasi tulang alveolar. Selain itu, pengguna monograf ini secara khusus ditujukan kepada peneliti yang memiliki minat dalam pengembangan dan penelitian biomaterial.

Bab ini diawali dengan latar belakang masalah mengapa diperlukannya preservasi soket setelah pencabutan dan material yang berpotensi sebagai preservasi soket. Salah satu kombinasi material yang berpotensi sebagai preservasi soket adalah biokomposit yang berasal dari kombinasi membran amnion dan hidroksiapatit. Material tersebut kemudian dikarakterisasi untuk menganalisis sifatnya, dilanjutkan dengan uji sitotoksitas dan uji *in vivo* pada hewan coba untuk melihat potensi osteogenesisnya.

Buku monograf ini diharapkan dapat menjadi referensi utama dalam memahami dan mengaplikasikan material preservasi tulang alveolar, khususnya biokomposit hidroksiapatit dengan membran amnion. Monograf ini dapat menjadi sumber utama bagi mahasiswa yang ingin meneliti penggunaan biomaterial dalam regenerasi tulang alveolar. Dapat digunakan sebagai referensi dalam penyusunan skripsi, tesis, atau disertasi di bidang kedokteran gigi dan dapat menjadi dasar dalam pengembangan riset dan inovasi biomaterial.

Untuk mendukung pemahaman pembaca terhadap monograf ini, berikut beberapa sumber tambahan yang dapat digunakan antara lain: Jurnal-Jurnal Penelitian dan Buku Ajar Kedokteran Gigi yang membahas biomaterial dalam regenerasi tulang alveolar, seperti penelitian tentang hidroksiapatit dan membran amnion.

Puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga karya buku monograf ini dapat diselesaikan dengan baik. Penulis mengucapkan terima kasih terutama

kepada bank jaringan RSUD Dr. Soetomo-Surabaya yang telah membantu penulis menemukan ide-ide penelitian dan terus berkarya sampai hari ini. Terima kasih kepada, promotor, teman-teman sejawat, serta laboratorium yang telah mendukung penulis untuk bisa melaksanakan penelitian dengan baik. Penulis pun mengucapkan terima kasih untuk dukungan dari keluarga terkasih, ibu, suami, dan anakku yang telah menemani dan mendukung sampai hari ini.

Jakarta, 14 Februari 2025

Dr. drg. Octarina, M.Si

SEKAPUR SIRIH

Dengan mengucapkan puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa, kami menyambut dengan penuh apresiasi terbitnya buku Monograf yang berjudul ***Potensi Biokomposit Alami Kombinasi Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiaptit Sebagai Material Pengganti Tulang Alveolar*** yang disusun oleh Tim Penulis antara lain Dr. drg. Octarina, M.Si; Prof. Dr. drg. Elly Munadzirroh, M.Kes; Drg. Meircurius Dwi Chondro Surboyo, M.Kes Sp.P.M; dan Drg. Florencia Livia Kurniawan, M.K.G. Buku Monograf ini hadir sebagai kontribusi penting dalam bidang Material kedokteran Gigi dan diharapkan dapat menjadi sumber referensi yang bermanfaat bagi para akademisi, mahasiswa, serta praktisi di bidang terkait.

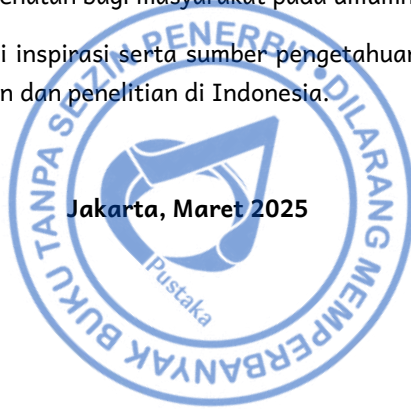
Dalam era perkembangan ilmu pengetahuan yang semakin pesat, kebutuhan akan literatur yang komprehensif dan berbasis penelitian yang mutakhir menjadi semakin penting. Buku ini tidak hanya menyajikan teori dan konsep mendasar, tetapi juga mengulas berbagai metode penelitian dan hasil yang diharapkan dapat menjadi acuan perkembangan biomaterial kedokteran gigi saat ini.

Sebagai bagian dari komunitas akademik di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti, kami sangat mendukung agar para dosen menerbitkan karya ilmiah yang dapat meningkatkan kualitas pembelajaran serta memperkaya wawasan keilmuan. Kami berharap buku monograf ini dapat menjadi salah satu rujukan yang berharga, baik dalam kegiatan pembelajaran maupun dalam penelitian lebih lanjut.

Ucapan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada seluruh pihak yang telah berkontribusi dalam penyusunan buku ini.

Semoga karya ini dapat memberikan manfaat yang luas dan berkelanjutan bagi dunia pendidikan dan kesehatan bagi masyarakat pada umumnya.

Semoga buku ini menjadi inspirasi serta sumber pengetahuan yang berharga bagi insan pendidikan dan penelitian di Indonesia.



Jakarta, Maret 2025

drg. Wiwiek Poedjiastoeti, M.Kes., Sp.BMM., PhD

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi

Universitas Trisakti

DAFTAR ISI

PRAKATA	vi
SEKAPUR SIRIH	x
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR	xvii

BAB I

MATERIAL PEMBENTUK TULANG ALVEOLAR	1
A. Preservasi Tulang Alveolar	1
B. Struktur dan Potensi Hidroksiapatit dalam Pembentukan Tulang	4
C. Struktur, Komposisi, dan Potensi Membran Amnion.....	7

BAB II

KOMBINASI HIDROKSIAPATIT DAN MEMBRAN AMNION	10
A. Biokomposit	10
B. Variasi pembuatan Biokomposit	12
C. Metode Pembuatan Biokomposit	14

BAB III

HASIL UJI KARAKTERISASI MATERIAL.....	21
A. Fourier Transform Infrared (FTIR)	21
B. Scanning Electrone Microscopy (SEM).....	34
C. Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)	49
D. Hasil Pengujian Persentase Porositas	58
E. Hasil Pengujian Persentase <i>Swelling</i>	64

BAB IV

HASIL UJI IN VITRO LABORATORIUM	84
A. Uji Sitotoksisitas dengan Metode MTT Assay	84
B. Kultur Sel	86
C. Sel Fibroblas BHK-21	87
D. Hasil Penelitian.....	88

BAB V

HASIL UJI IN VIVO	93
A. Kolagen.....	93
B. Osteoblas	103
C. Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2)	112
D. Osteocalcin.....	120
E. RUNX2	129
RINGKASAN	137
DAFTAR PUSTAKA.....	143
DAFTAR SINGKATAN	173
TENTANG PENULIS.....	176

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1.1. Puncak Penyerapan Gugus Fungsi Amida I, II, III, A, B, OH^- , PO_4^{3-} Dan CO_3^{2-} Pada Membran Amnion Sapi, Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiapatit 30:70, 35:65, 40:60	29
Tabel 3.1.2. Referensi Puncak Penyerapan Gugus Fungsi Amida I, II, III, A, B, OH^- , PO_4^{3-} , Dan CO_3^{2-}	31
Tabel 3.2.1. Hasil Perhitungan Jumlah Dan Diameter Porus Pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x	46
Tabel 3.2.2. Hasil Perhitungan Jumlah Dan Diameter Porus Pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x BAM-HA 30:70	47
Tabel 3.2.3. Hasil Perhitungan Jumlah Dan Diameter Porus Pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x BAM-HA 35:65	47
Tabel 3.2.4. Hasil Perhitungan Jumlah Dan Diameter Porus Pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x BAM-HA 40:60	47
Tabel 3.2.5. Hasil Perhitungan Jumlah Dan Diameter Porus Pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x Bio-Oss Collagen	47
Tabel 3.3.1. Perbandingan Elemen Hasil <i>Mapping</i> EDS Yang Terkandung Pada Masing-Masing Spesimen	56
Tabel 3.4.1 Hasil Pengujian Persentase Porositas BAM	59
Tabel 3.4.2. Hasil Pengujian Persentase Porositas BAM-HA 30:70	59
Tabel 3.4.3. Hasil Pengujian Persentase Porositas BAM-HA 35:65	60
Tabel 3.4.4. Hasil Pengujian Persentase Porositas BAM-HA 40:60	60
Tabel 3.4.5. Hasil Pengujian Persentase Porositas <i>Bio-Oss Collagen</i>	61
Tabel 3.4.6. Hasil Pengujian Persentase Porositas	63
Tabel 3.4.7. Analisa Statistik Persentase Porositas ANOVA Satu Jalan <i>Post Hoc Games Howel</i>	64

Tabel 3.5.1. Hasil Uji Swelling BAM	66
Tabel 3.5.2. Hasil Uji Swelling BAM 30:70.....	66
Tabel 3.5.3. Hasil Uji Swelling BAM 35:65.....	66
Tabel 3.5.4. Hasil Uji Swelling BAM 40:60.....	66
Tabel 3.5.5. Hasil Uji Swelling Bio-Oss <i>Collagen</i>	67
Tabel 3.5.6. Hasil Pengujian Persentase <i>Swelling</i>	67
Tabel 3.5.7. Analisa Statistika Persentase <i>Swelling</i> ANOVA Satu Jalan <i>Post Hoc Games Howel</i>	68
Tabel 3.5.8. Nilai Rerata Uji Biodegradasi Pada Biokomposit Membran Amnion Sapi-Hidroksiapatit	80
Tabel 3.5.9. Hasil Analisa Statistika <i>One Way ANOVA Welch</i> Pada Uji Biodegradasi Biokomposit Membran Amnion Sapi- Hidroksiapatit Perbandingan Rasio 30:70, 35:65, Dan 40:60 (w/w).....	82
Tabel 3.5.10. Hasil Uji Statistika <i>Post-Hoc Tukey HSD</i> Persentase Biodegradasi Pada Biokomposit Membran Amnion Sapi- Hidroksiapatit Perbandingan Rasio 30:70, 35:65, Dan 40:60 (w/w).....	83
Tabel 4.1.1. Jumlah Replikasi, Rerata, Standar Deviasi Dan Persentase Sel Fibroblas BHK-21 Yang Hidup	89
Tabel 5.1.1. Hasil Rerata Dan Standar Deviasi Analisa Ketebalan Kolagen	98
Tabel 5.1.2. Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Analisis Ketebalan Kolagen	100
Tabel 5.2.1. Hasil Rerata Dan Standar Deviasi Analisa Proliferasi Sel Osteoblas.....	107
Tabel 5.2.2. Analisis Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Sel Osteoblas	109
Tabel 5.3.1. Hasil Rerata Dan Standar Deviasi Analisa Ekspresi BMP-2.....	116

Tabel 5.3.2. Analisis Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Ekspresi BMP-2.....	117
Tabel 5.4.1. Hasil Rerata Dan Standar Deviasi Analisa Ekspresi <i>Osteocalcin</i>	124
Tabel 5.4.2. Analisis Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Ekspresi <i>Osteocalcin</i>	125
Tabel 5.5.1. Hasil Rerata Dan Standar Deviasi Analisa Ekspresi RUNX2	132
Tabel 5.5.2. Analisis Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Ekspresi RUNX2.....	133

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1.1. Tahapan Penyembuhan Soket Pencabutan.....	3
Gambar 2.1.1. Proses Pembuatan Hidroksiapatit Yang Berasal Dari Bovine.....	17
Gambar 2.1.2. Proses Pembuatan Biokomposit Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiapatit.....	18
Gambar 3.1.1. Grafik Hasil Analisa FTIR Membran Amnion Sapi.....	23
Gambar 3.1.2. Grafik Hasil Analisa FTIR Dari Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiapatit 30:70	24
Gambar 3.1.3. Grafik Hasil Analisa FTIR Dari Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiapatit 35:65	25
Gambar 3.1.4. Grafik Hasil Analisa FTIR Dari Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiapatit 40:60	26
Gambar 3.1.5. Hasil Analisa FTIR Dari Bio-Oss <i>Collagen</i>	27
Gambar 3.2.1. Mikrograf SEM BAM; (A) Perbesaran 50x, (B) Perbesaran 100x, Dan (C) Perbesaran 500x.....	35
Gambar 3.2.2. Figure SEM Images; (A) BHA At 10000x Magnification And (B) BHA At 20000x Magnification.....	38
Gambar 3.2.3. Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 30:70; (A) Perbesaran 50x, (B) Perbesaran 100x, Dan (C) Perbesaran 500x	39
Gambar 3.2.4. Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 35:65; (A) Perbesaran 50x, (B) Perbesaran 100x, Dan (C) Perbesaran 500x	41
Gambar 3.2.5. Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 40:60; (A) Perbesaran 50x, (B) Perbesaran 100x, Dan (C) Perbesaran 500x	43

Gambar 3.2.6. Mikrograf SEM Bio-Oss <i>Collagen</i> ; (A) Perbesaran 50x, (B) Perbesaran 100x, Dan (C) Perbesaran 500x.....	46
Gambar 3.3.1. Gambaran EDS Membran Amnion Sapi; (A) Mapping (B) Persentase Elemen	50
Gambar 3.3.2. Gambaran EDS Hidroksiapatit; (A) Mapping (B) Persentase Elemen	51
Gambar 3.3.3. Gambaran EDS Kombinasi Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiapatit 30:70; (A) Mapping (B) Persentase Elemen	52
Gambar 3.3.4. Gambaran EDS Kombinasi Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiapatit 35:65; (A) Mapping (B) Persentase Elemen	53
Gambar 3.3.5. Gambaran EDS Kombinasi Membran Amnion Sapi Dengan Hidroksiapatit 40:60; (A) Mapping (B) Persentase Elemen	54
Gambar 3.3.6. Gambaran EDS Biooss <i>Collagen</i> ; (A) Mapping (B) Persentase Elemen.....	55
Gambar 3.5.1. Grafik Hasil Analisa XRD Dari Modifikasi BAM	71
Gambar 3.5.2. Grafik Hasil Analisa XRD Dari BAM-HA 30:70	72
Gambar 3.5.3. Grafik Hasil Analisa XRD Dari BAM-HA 35:65	73
Gambar 3.5.4. Grafik Hasil Analisa XRD Dari BAM-HA 40:60	74
Gambar 3.5.5. Grafik Hasil Analisa XRD Dari Bio-Oss <i>Collagen</i>	75
Gambar 3.5.6. Grafik Hasil Analisa XRD Modifikasi BAM, Bio-Oss, BAM-HA 30:70, 35:65, Dan 40:60	76
Gambar 3.5.7. Grafik Rerata Nilai Rasio Biodegradasi Pada Biokomposit Membran Amnion Sapi-Hidroksiapatit Perbandingan 30:70, 35:65, Dan 40:60 (w/w).....	81

Gambar 5.1.1. Gambaran Histologi Ketebalan Kolagen Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-14. Pewarnaan Masson Trichome, Perbesaran 40x. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Serat Kolagen	96
Gambar 5.1.2. Gambaran Histologi Ketebalan Kolagen Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-28. Pewarnaan Masson Trichome, Perbesaran 40x. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Serat Kolagen	97
Gambar 5.1.3. Perbandingan Rerata Ketebalan Kolagen Antar Kelompok	99
Gambar 5.2.1. Gambaran Histologi Sel Osteoblas Pada Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-14. Pewarnaan He, Perbesaran 40x. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Sel Osteoblas (OB)	105
Gambar 5.2.2. Gambaran Histologi Sel Osteoblas Pada Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-28. Pewarnaan He, Perbesaran 40x. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Sel Osteoblas (OB)	106
Gambar 5.2.3. Perbandingan Rerata Sel Osteoblas Antar Kelompok....	108

Gambar 5.3.1. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi BMP-2 Pada Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-14. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Ekspresi BMP-2	114
Gambar 5.3.2. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi BMP-2 Pada Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-28. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Ekspresi BMP-2	115
Gambar 5.3.3. Perbandingan Rerata Ekspresi BMP-2 Antar Kelompok	118
Gambar 5.4.1. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi Osteocalcin Pada Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-14. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Ekspresi Osteocalcin	122
Gambar 5.4.2. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi <i>Osteocalcin</i> Pada Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-28. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Ekspresi <i>Osteocalcin</i>	123
Gambar 5.4.3. Perbandingan Rerata Ekspresi RUNX2 Antar Kelompok	126

Gambar 5.5.1	Gambaran Imunohistokimia Ekspresi RUNX2 Pada Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-14. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Ekspresi RUNX2	130
Gambar 5.5.2.	Gambaran Imunohistokimia Ekspresi RUNX2 Pada Soket Tulang Alveolar Tikus SD Pada Hari Ke-28, (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss <i>Collagen</i> , Dan (F) BAM. Tanda Panah Menunjukkan Ekspresi RUNX2	131
Gambar 5.5.3.	Perbandingan Rerata Ekspresi RUNX2 Antar Kelompok	134



BAB I

MATERIAL PEMBENTUK TULANG ALVEOLAR



A. Preservasi Tulang Alveolar

Tulang alveolar merupakan bagian penting dari tulang rahang yang terletak pada rahang atas dan rahang bawah. Tulang alveolar memiliki peranan penting sebagai soket untuk menunjang gigi serta jaringan periodontal. Struktur tulang alveolar ini terdiri dari tulang kortikal, tulang trabekular, septum interdental, serat sharpeys, lamina dura, dan crest alveolar (Ramalingam *et al.*, 2019).

Jaringan tulang adalah jaringan ikat dengan aktivitas metabolisme yang tinggi, memiliki struktur yang heterogen dan dinamis serta kekuatan mekanik yang tinggi. Enamel, dentin, sementum, dan tulang merupakan jaringan tulang yang ada didalam tubuh manusia. Tulang dapat dikatakan suatu material komposit yang terdiri dari komponen organik dan inorganik (Neel *et al.*, 2016).

Beberapa peneliti yang memiliki pendapat bahwa tulang alveolar memiliki komposisi perbandingan matriks organik dan matriks inorganik yaitu sebesar 30:70 ataupun 35:65. Beberapa peneliti menyatakan bahwa tulang alveolar memiliki komposisi yang hampir sama seperti sementum. Matriks inorganik terdiri dari mineral hidroksiapatit sebesar (65% berat), matriks organik (23% berat), dan air (10% berat) (Shahmoradi *et al.*,

2014); (Oosterlaken *et al.*, 2021). Menurut Kołodziejska *et al.*, (2020), matriks organik (kira-kira 20-30% berat) dan fraksi mineral (mewakili 60-70% massa tulang dan terutama terdiri dari apatit nanokristalin) pada komponen jaringan tulang juga terkandung air.

Salah satu tindakan umum dalam bidang kedokteran gigi adalah pencabutan gigi. Penyembuhan luka secara normal akibat tindakan pencabutan gigi menghasilkan resorpsi tulang alveolar dan pengerutan jaringan gusi yang signifikan (Steiner, 2008). Resorpsi tulang alveolar akan menyebabkan kehilangan tebal dan tinggi ridge tulang alveolar. Kehilangan tebal dan tinggi tulang alveolar akan memunculkan berbagai masalah pada restorasi gigi tiruan, antara lain masalah estetik, muncul celah pada gigi tiruan lepasan, cekat maupun restorasi *implan* di kemudian hari (Willenbacher *et al.*, 2016; Natto *et al.*, 2017). Resorpsi tulang pasca ekstraksi cenderung lebih terlihat pada korteks labial daripada korteks lingual atau palatal. Resorpsi ini akan mengubah bentuk tulang alveolar dan mengurangi panjang lengkung gigi secara keseluruhan (Cheng *et al.*, 2019).

Enam bulan pertama setelah pencabutan, tulang alveolar akan mengalami resorpsi sebanyak 11-22% dari tinggi tulang dan 29-63 % dari ketebalan tulang (Natto *et al.*, 2017). Tulang alveolar bagian bukal akan lebih rentan mengalami resorpsi dibandingkan lingual. Hal ini disebabkan oleh banyaknya jumlah lamina dura pada bagian bukal. Resorpsi tulang alveolar menyebabkan masalah estetik. Rerata resorpsi tulang alveolar bervariasi setiap individu. Soket tulang alveolar mandibula lebih cepat mengalami resorpsi daripada maksila. Pada penyembuhan normal, 40-60% tulang alveolar akan hilang dalam waktu 2 sampai 3 tahun setelah pencabutan (Nisar *et al.*, 2020).

Setelah pencabutan, bekuan darah akan terbentuk. Bekuan darah akan digantikan dengan pembentukan jaringan granulasi pada hari ke-4 sampai ke-5. Jaringan granulasi akan mengalami mineralisasi membentuk

anyaman tulang pada hari ke-5 sampai ke-16. Proses osteogenesis akan dimulai pada minggu ke-3 sampai ke-6. *Remodeling* tulang lamellar terjadi pada minggu ke-5 sampai minggu ke-10. Pada saat *remodeling*, tulang alveolar akan mengalami perubahan bentuk dengan adanya resorpsi yang terjadi selama berbulan-bulan. Resorpsi terbesar yang mengakibatkan perubahan bentuk tulang alveolar terjadi selama tiga bulan pertama. Proses penyembuhan soket pencabutan dapat terlihat pada Gambar 1.1 (Kalsi *et al.*, 2019).



Gambar 1.1.1. Tahapan penyembuhan soket pencabutan

Preservasi soket dibutuhkan untuk mempertahankan kondisi jaringan tulang yang mengalami resorpsi akibat pencabutan. Preservasi soket ini dapat dilakukan dengan penambahan material pengganti tulang yang

berasal dari *autograft* (berasal dari pasien yang sama), *allograft* (berasal dari spesies yang sama), *xenograft* (berasal dari spesies yang berbeda), dan material *alloplastic* (berasal dari material sintetik). Material *autograft* berasal dari *autologous bone* (AB) dan *bone marrow grafts*; material *allografts* antara lain *demineralized freeze-dried bone allograft* (DFDBA), *mineralized freeze-dried bone allograft* (FDBA); material *xenografts* antara lain *deproteinized bovine bone mineral* (DBBM), *absorbable collagen sponges*, atau *corticocancellous porcine bone*; material *alloplast* antara lain *bioactive glass particles* dan *calcium phosphates*; material bioaktif *recombinant human bone morphogenetic protein-2* (rhBMP-2) dan *platelet-rich fibrin* (PRF) (Kalsi et al., 2019; Willenbacher et al., 2016; Nisar et al., 2020).

Biomaterial yang digunakan sebagai preservasi soket diharapkan dapat mengintegrasikan tiga karakteristik penting tulang alami yaitu osteokonduktif, osteoinduktif, dan osteogenesis. Biomaterial ini juga memiliki sifat mekanik yang baik, berpori, biodegradabel, tidak toksik, biokompatibel, (Dhand et al., 2016; Hendrijantini et al., 2020; O'Brien, 2011) dan dapat berperan sebagai matrix pembentukan tulang baru di area yang mengalami resorpsi (Rohanizadeh et al., 2008). Menurut Singh & Madhan (2017), biomaterial dengan kandungan faktor pertumbuhan memiliki sifat osteoinduktif. Sifat ini akan menstimulasi proses penyembuhan jaringan lunak serta jaringan keras.

B. Struktur dan Potensi Hidroksiapatit dalam Pembentukan Tulang

Hidroksiapatit (HA) merupakan salah satu bahan biokeramik dan komponen utama pembentuk tulang maupun enamel gigi (Ardhiyanto, 2012). HA merupakan mineral anorganik yang menunjukkan struktur kisi apatit yang khas yaitu $(A_{10}(BO_4)_6X_2)$. A, B, dan X diwakili oleh Ca^{2+} , PO_4^{3-} , dan OH^- secara berurutan. HA murni mengandung 39,68% berat kalsium

dan 18% berat fosfor sehingga meningkatkan rasio mol Ca: P 1,67. Stabilitas termal senyawa ini sangat penting karena memengaruhi sifat mekanik, biokompatibilitas, kelarutan, dan morfologi HA (Ratnayake *et al.*, 2017). HA dengan rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ telah banyak digunakan dalam rekayasa jaringan tulang karena biokompatibilitas yang baik, mudah terurai, osteokonduktivitas baik dan tidak toksik (Chen *et al.*, 2017).

Jaringan tulang merupakan material komposit biomineral yang tersusun dari 70% bagian anorganik dan 30% komponen organik. Komposisi utama jaringan tulang terdiri dari garam kalsium yaitu hidroksiapatit sebagai komponen anorganik dan kolagen sebagai komponen organik (Kaczmarek & Sionkowska, 2018). Tulang alveolar adalah bagian dari maksila dan mandibula yang berperan untuk mendukung dan membentuk soket gigi. Komposisi tulang alveolar hampir sama seperti sementum. Tulang alveolar mengandung mineral hidroksiapatit sebesar 65% dengan tambahan matriks organik kolagen 35% (Oosterlaken *et al.*, 2021). Hidroksiapatit (HA), selain komponen anorganik utama dari tulang, juga merupakan penyusun mineral utama gigi. Material ini dapat membentuk ikatan kimiawi langsung dengan jaringan sekitarnya dan menunjukkan sifat osteokonduktif dan biokompatibilitas yang sangat baik, serta sifat non-toksik, non-inflamasi, dan nonimunogenik (Brasinika *et al.*, 2016).

Saat ini HA digunakan sebagai *bone graft* setelah pencabutan gigi sebelum dilakukan pemasangan *implan* untuk menjaga kualitas dan kuantitas tulang alveolar (Gholami *et al.*, 2012). *Bone graft* dapat digunakan sebagai *scaffold* yang berperan dan menjaga maturasi bekuan darah saat koagulasi pada fase awal penyembuhan luka. Selain itu, *bone graft* dapat meningkatkan produksi matriks ekstraseluler dan maturasi. *Bone graft* yang ideal akan memengaruhi seluruh proses penyembuhan setelah dilakukan ekstraksi. *Bone graft* secara progresif diserap kembali dan digantikan oleh tulang yang vital dan matang (Gomes *et al.*, 2019).

Hidroksiapatit dapat disintesis dari komponen anorganik atau dari sumber daya alam, seperti tulang mamalia dan laut, tumbuhan, serta sumber biogenik (Zhao *et al.*, 2021). Tulang sapi secara morfologis dan struktural mirip ke tulang manusia. Tulang cancellous sapi memiliki arsitektur berpori yang membantu pertumbuhan jaringan tulang. Material ini memiliki ukuran pori yang cukup (ukuran pori minimum 100 μm) dan struktur pori yang saling berhubungan penting untuk osteogenesis. Selain itu, *bovine hydroxyapatite* (BHA) memiliki komposisi kimiawi yang mirip dengan tulang manusia dengan komposisi karbonat (CO_3^{2-}), natrium (Na^+), magnesium (Mg^{2+}), besi (Fe^{2+}), fluorida (F^-), silikat, dan klorida (Cl) yang memengaruhi berbagai reaksi biomekanik yang terkait dengan metabolisme tulang (Ratnayake *et al.*, 2017).

Hidroksiapatit dapat diekstrak dari tulang paha sapi dengan menggunakan beberapa metode, yaitu metode hidrotermal, presipitasi, *sub-critical water*, dan hidrolisis dengan basa. Proses ekstraksi bertujuan untuk menghilangkan zat-zat organik di dalam tulang seperti protein dan lemak (Delina *et al.*, 2018).

Penelitian yang dilakukan Arifin *et al.*, (2020) dengan menggunakan *bovine* HA sebagai *bone graft* pada pasien yang mengalami trauma pada tulang menunjukkan 80,36% mengalami penyembuhan yang sangat baik. Hal ini dapat disebabkan karena *bovine* HA memiliki kesamaan kimianya dengan tulang; biokompatibilitasnya yang sangat baik dengan merangsang osteokonduksi; dan dapat diintegrasikan ke dalam tulang tanpa memicu reaksi kekebalan. HA juga dapat menyediakan ion kalsium dan ion basa bagi osteoblas sehingga mesenkim ekstraseluler termineralisasi dan mensekresi ATPase. Ini juga dapat mendorong sel untuk menunjukkan fenotipe osteoblas dan membentuk jaringan tulang (Arifin *et al.*, 2020).

C. Struktur, Komposisi, dan Potensi Membran Amnion

Membran amnion terletak pada bagian terdalam plasenta yang mengelilingi embrio dengan ketebalan 0,02 sampai 0,5 mm. Membran ini merupakan lapisan tipis, tangguh, transparan, avaskular komposit (Tang *et al.*, 2017). Membran amnion terdiri dari tiga lapisan utama yaitu lapisan epitel tunggal, membran basal yang tebal, dan mesenkim avaskular dengan kandungan utama kolagen (Chopra & Thomas, 2013). Lapisan terdalam paling dekat dengan janin disebut epitel amnion epitelium ketuban terdiri dari satu lapisan sel yang tersusun seragam pada membran basal. Membran basal adalah salah satu selaput paling tebal yang ditemukan di semua jaringan manusia. Kolagen tipe IV terutama terdeteksi di membran basal AM yang tebal. Berdasarkan imunodeteksi, kolagen tipe I, III, VI, XV, serta kolagen V dan IV dapat diidentifikasi pada lapisan kompak dan spons secara berurutan (Gunasekaran *et al.*, 2020).

Membran amnion bukan hanya membran avaskular sederhana akan tetapi memiliki multifungsi metabolisme seperti pengangkutan air, bahan terlarut, produksi faktor bioaktif, termasuk peptida vasoaktif, faktor pertumbuhan, dan sitokin (Mamede *et al.*, 2012). Menurut penelitian Koizumi *et al.* (2000) ekspresi mRNA dengan RT-PCR pada membran amnion menunjukkan kandungan EGF, TGF- α , KGF, HGF, bFGF, TGF- β 1, - β 2, - β 3, KGFR dan HGFR. Penelitian dengan ELISA menunjukkan kandungan membran amnion antara lain EGF, TGF- α , KGF, HGF, bFGF, TGF- β 1, - β 2. Kandungan membran amnion tersebut yang dapat menyebabkan membran amnion memiliki potensi yang baik untuk penyembuhan dan regenerasi luka (Niknejad *et al.*, 2008). SLPI adalah inhibitor *human leukocyte elastase* yang ada pada membran amnion. Protein ini memiliki fungsi imunologis terhadap antiinflamasi dan antimikrobal (Zhang *et al.*, 2001).

Membran amnion telah digunakan sebagai biomaterial pada aplikasi biomedis. Aplikasi tersebut antara lain meliputi dermatologi dalam bedah

plastik, transplantasi kulit dan sebagai pembalut biologis untuk luka bakar kulit, luka, ulkus kaki kronis, penyembuhan mata (Sripriya & Kumar, 2016; Kang *et al.*, 2013). Kandungan kolagen pada membran amnion memiliki peran penting untuk membentuk struktur yang memberikan dukungan dan ketahanan pada saat penyembuhan luka. Kolagen tipe I merupakan komponen yang paling melimpah, yang merupakan komponen utama pada saat aponeurosis, pembentukan tendon, dan menstimulasi pembentukan jaringan parut yang matang. Kolagen tipe III dikenal sebagai serat retikuler, berfungsi untuk mendukung struktur jaringan. Selain itu, kolagen tipe III juga meningkat jumlahnya selama fase awal penyembuhan luka (Wardhana *et al.*, 2020).

Membran basal amnion sangat mirip dengan membran basal yang ada di bagian tubuh lainnya seperti konjungtiva atau gingiva (Chopra & Thomas, 2013). Faktor pertumbuhan yang ada pada membran amnion akan menyediakan lingkungan penyembuhan alami, mempercepat penyembuhan, dan meniru *stem cell* untuk pertumbuhan *in vivo*. Faktor pertumbuhan ini akan merangsang peningkatan kelebihan deposit matriks ekstraseluler pada fase pematangan penyembuhan luka. Fibronektin dan kolagen tipe III merupakan matriks awal yang terbentuk. Sedangkan, glikosaminoglikan dan proteoglikan akan terbentuk pada matriks selanjutnya. Matriks terakhir yang terbentuk pada fase pematangan adalah kolagen tipe I, sebagian besar menggantikan jumlah kolagen tipe III yang terbentuk selama pembentukan matriks awal (Wardhana *et al.*, 2020). Menurut Chopra & Thomas (2013), membran amnion memiliki kemampuan untuk mempercepat penyembuhan luka. Mekanisme regenerasi tersebut disebabkan peran membran amnion antara lain; meningkatkan imunomodulatif dan kekebalan; anti mikroba (efek spektrum luas terhadap bakteri, jamur, protozoa dan virus), mengurangi nyeri; mengurangi jaringan parut dan anti inflamasi; aktivitas reparatif jaringan dengan peningkatan remodeling tulang, osteogenesis dan kondrogenesis;

meningkatkan fibrogenesis dan angiogenesis; meningkatkan deposisi matriks ekstraseluler; sumber utama sel induk mesenkim.

Salah satu sumber membran amnion berasal dari sapi. Beberapa keuntungan *Bovine Amniotic Membrane* (BAM) adalah kemudahan legalitas, etik, dan tidak terpengaruh dengan kepercayaan ritual seperti pada membran amnion manusia (Putra *et al.*, 2020, Octarina *et al.* 2021). BAM dapat diproduksi dalam jumlah besar pada peternakan dengan pemberian pangan yang baik, sehingga menghasilkan selaput membran amnion dengan elastisitas dan ketebalan yang baik. BAM memiliki faktor pertumbuhan seperti membran amnion manusia. Faktor pertumbuhan ini akan mempercepat proses reepitelisasi sehingga penyembuhan luka akan lebih cepat (Kim *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2020).

Berdasarkan penelitian Siswanto *et al.* (2013) BAM memiliki persamaan dengan membran amnion manusia. Membran amnion terbukti, bersifat non toksik, memiliki berat molekul 70 kDa, dan mampu mempercepat pembentukan kolagen pada saat proses penyembuhan luka. Hal senada juga dilakukan oleh (Ballesteros *et al.*, 2020) yang membuat BAM dengan protokol yang berbeda. Hasilnya menunjukkan bahwa BAM memiliki potensi sebagai *scaffold* untuk regenerasi jaringan epitel.

Penelitian Indrawati *et al.* (2019) menunjukkan ekspresi BMP-2 setelah dilakukan pemberian spons membran amnion pada soket tulang alveolar setelah pencabutan. Hasilnya menunjukkan BAM mampu menginduksi BMP-2 selama proses osteogenesis, sehingga dapat disimpulkan material ini memiliki sifat osteoinduktif. Menurut Dewey *et al.* (2020), membran amnion juga menunjukkan kandungan faktor pertumbuhan yang berperan pada diferensiasi osteogenik dan perbaikan kerusakan pada tulang. Membran amnion baik untuk penyembuhan jaringan lunak, kombinasi atau mineralisasi dengan material lain akan mengoptimalkan terjadinya regenerasi tulang (Dewey *et al.*, 2020)

BAB II

KOMBINASI HIDROKSIAPATIT DAN MEMBRAN AMNION



A. Biokomposit

Amnion membran sapi adalah biomaterial alami yang mengandung kolagen, protein, dan faktor pertumbuhan. Kolagen merupakan bagian dari matriks ekstraseluler dan berfungsi sebagai basis yang sangat baik untuk mengganti jaringan tulang yang rusak. (Chen *et al.*, 2017). Penyembuhan luka dan regenerasi jaringan tulang akan ditingkatkan oleh faktor pertumbuhan yang terkandung pada membran amnion (Walsh *et al.*, 2019).

Hidroksiapatit merupakan salah satu kandungan dari material pembentuk tulang. Sifat bioaktif dan biokompatibel hidroksiapatit memungkinkannya membentuk ikatan kimia dengan jaringan tanpa menjadi beracun atau osteokonduktif. Ini adalah bahan yang tepat untuk membuat pengganti tulang (Kaczmarek & Sionkowska, 2018). Hidroksiapatit yang berasal dari sapi dapat digunakan sebagai material pengganti tulang dan dapat berperan sebagai preservasi soket. Kombinasi amnion membran sapi dan hidroksiapatit akan menjadi lebih efektif apabila dikombinasikan, dengan adanya faktor pertumbuhan pada membran amnion akan menstimulus komponen yang kemudian akan menstimulus pembentukan tulang yang ada pada hidroksiapatit (Gholami *et al.*, 2012).

Biokomposit adalah bahan yang terdiri dari dua atau lebih bahan penyusun yang berbeda yang dikombinasikan untuk menghasilkan bahan baru yang memiliki sifat yang lebih baik (Rudin & Phillips, 2013). Biokomposit dapat berupa gabungan dari dua atau lebih biomaterial (Octarina, *et al* 2021). Unsur yang berfungsi sebagai pengisi dan matriks yang mengikat serat. Biokomposit umumnya minimal terdiri dari dua unsur (Anjarsari *et al.*, 2016). Yang *et al.*, (2020) menyatakan bahwa kombinasi biokomposit akan memaksimalkan sifat material yang digunakan untuk aplikasi biomedis. Chen *et al.* (2017) menyatakan bahwa material komposit yang dibuat dengan menggabungkan unsur kolagen dan hidroksiaptit dengan beberapa teknik dapat menjadi pilihan yang baik untuk mengoptimalkan regenerasi tulang karena mereka memiliki struktur dan komposisi yang mirip dengan tulang alami. Proses osteogenesis pada defek tulang alveolar akan ditingkatkan dengan menggabungkan membran amnion dan material pembentuk tulang.(Jiawen *et al.*, 2014).

Kombinasi *scaffold* membran amnion dengan material anorganik dapat membantu perbaikan tulang kraniomaksilofasial, terutama dalam perjalanan defek yang menunjukkan komplikasi inflamasi yang signifikan (Dewey *et al.*, 2020). Penggabungan hidroksiapatit ke dalam *scaffold* kolagen yang berperan sebagai matriks menghasilkan konstruksi yang memiliki sifat osteokonduktif. Kombinasi ini memiliki sifat mekanis yang ideal untuk membantu pertumbuhan jaringan tulang dan keduanya biokompatibel yang dapat terurai secara hayati (Walsh *et al.*, 2019). Riset *in vivo* menunjukkan bahwa kombinasi hidroksiapatit dan kolagen yang ditanamkan ke substansi tulang akan diserap oleh sel osteoklas melalui fagositosis yang menyebabkan pembentukan tulang baru oleh osteoblas di daerah sekitarnya. Diferensiasi osteoklastik dan aktivasi osteoblas juga didorong oleh kombinasi asam hialuronat dan kolagen (Hiratsuka *et al.*, 2020).

B. Variasi pembuatan Biokomposit

Penggabungan biokomposit organik dan anorganik untuk menghasilkan material yang sangat mirip dengan komposisi kimia, mikro dan makro-struktur, dan porositas jaringan tulang. Untuk mencapai hal ini, berbagai metode dan variasi kombinasi telah digunakan. Biokomposit yang menyerupai struktur tulang memiliki peran penting dalam proses penyembuhan jaringan tulang (Kołodziejska *et al.*, 2020). Studi yang dilakukan oleh Yuliati *et al.* (2019) mengkombinasikan karbonat apatit, kitosan, serta gelatin dengan rasio 50:50, 60:40, 70:30, dan 80:20. Pembuatan kombinasi karbonat apatit, kitosan, dan gelatin dicampur sampai membentuk gel. Gel dibekukan selama dua puluh empat jam pada suhu -40 derajat Celcius, dan kemudian dilakukan pengeringan beku selama empat puluh delapan jam. Rasio kombinasi 70:30 memiliki porositas yang paling besar untuk pertumbuhan sel osteoblas dan kekuatan kompresi yang paling besar. Studi yang dilakukan oleh Brasinika *et al.* (2016) menunjukkan hasil yang serupa yaitu menggabungkan hidroksiapatit dan kolagen-arginin dengan perbandingan 80:20, 70:30, dan 60:40. Studi ini menemukan bahwa rasio kombinasi 70:30 adalah yang terbaik untuk regenerasi jaringan tulang.

Studi literatur dari penelitian lain menggunakan kalsium karbonat dan kitosan-gelatin rasio 60:40 dan 70:30, kemudian diuji biodegradasi dan kekuatan kompresi. Studi tersebut menunjukkan bahwa rasio 60:40 menunjukkan biodegradasi yang lebih rendah dan kekuatan tekan yang lebih tinggi daripada rasio 70:30 (Fadhlallah *et al.*, 2018). Persentase perbandingan komposisi tulang alveolar terdiri dari 75% organik dan 35% anorganik, menurut beberapa penelitian (Uppoor *et al.*, 2014), (Shahmoradi *et al.*, 2014), dan (Oosterlaken *et al.*, 2021). Studi yang dilakukan oleh Walsh *et al.* (2019) membuat *scaffold* dengan perbandingan rasio 1:2 antara kolagen dengan hidroksiapatit. Kolagen dengan berat 1,8 gram ditambahkan dengan 3,6 gram hidroksiapatit dicampur sampai membentuk suspensi bubur yang kemudian dilakukan pengeringan beku.

Penelitian ini menemukan bahwa *scaffold* yang terbentuk dapat berfungsi sebagai tempat penyimpanan untuk komponen pertumbuhan yang berkontribusi pada regenerasi tulang.

Ada dua metode yang digunakan untuk membuat biokomposit kolagen dan hidroksiapatit. Metode pertama merupakan metode bubur-suspensi, partikel nanohidroksiapatit ditambahkan pada suspensi kolagen dan kemudian diliofilisasi. Metode yang kedua merupakan metode perendaman, kolagen yang telah terliliofilisasi dibentuk menjadi *scaffold* berpori yang direndam dalam suspensi hidroksiapatit dan kemudian diliofilisasi. Dua metode ini, menghasilkan *scaffold* komposit dengan struktur dengan pori yang sangat banyak dan berikatan. Pengulangan dan melakukan variasi kombinasi yang berbeda lebih mudah dilakukan dengan metode suspensi (Cunniffe *et al.*, 2010). Studi yang dilakukan oleh Yunoki *et al.* (2007) menggunakan rasio 80:20 antara nanokomposit hidroksiapatit dan kolagen. Nanokomposit hidroksiapatit dan kolagen tipe I dicampur pada pH 8–9 dan suhu sekitar 40°C. Setelah liofilisasi awal, nanokomposit hidroksiapatit dan kolagen dimasukkan ke dalam air suling atau larutan buffer fosfat (pH 7,4), kemudian dibekukan kembali dan divakum pada suhu 140°C. Larutan buffer fosfat akan menghasilkan ikatan silang serat kolagen dan komposit berpori sehingga sifat mekanik yang sangat baik diperoleh.

Landasan pembuatan kombinasi membran amnion dengan penambahan mineral garam kalsium pada penelitian ini. Membran amnion secara mekanis dipisahkan dari plasenta pada tahap awal proses. Membran amnion dibersihkan menggunakan larutan buffer fosfat tanpa kandungan kalsium dan magnesium digunakan untuk membilas darah pada membran. Amnion dipisahkan dengan spatula untuk menghilangkan sisa darah. Membran amnion kemudian dipotong menjadi potongan yang lebih kecil, dideselularisasi, dibilas dengan larutan fosfat untuk menghilangkan kotoran, dan disimpan dalam larutan fosfat pada suhu 4° C selama 24 hingga 48 jam sehingga akan terbentuk membran amnion yang sudah

diliofilisasi. Setelah itu, membran amnion ditumbuk menjadi bubuk, kolagen dan garam kalsium ditambahkan untuk mineralisasi. Setelah menghasilkan suspensi bubur yang homogen, liofilisasi kembali dilakukan (Dewey *et al.*, 2020). Studi yang serupa dengan ini dilakukan oleh Sabouri *et al.* (2020) yang memanfaatkan mineralisasi membran amnion dengan Ca^{2+} dan PO_4^{3-} . Tujuan dari penelitian ini adalah menggabungkan biomaterial untuk membentuk biokomposit yang berfungsi sebagai rekayasa jaringan pada penyembuhan tulang.

Metode pengeringan beku sering kali disebut dengan liofilisasi adalah proses pengeringan jaringan atau biomaterial dengan cara sublimasi. Pada proses sublimasi akan terjadi di mana air berpindah langsung dari keadaan padat (es) ke keadaan uap tanpa melalui keadaan cair (Nireesha *et al.*, 2013). Metode pengeringan beku akan membuat biomaterial lebih stabil dan kering sehingga lebih awet dan dapat disimpan dalam waktu yang lama. Selain itu, proses pengeringan beku pada membran ketuban sapi tidak akan mengubah komponen biokimia dan struktur utama materi (Kim *et al.*, 2009).

C. Metode Pembuatan Biokomposit

Pembuatan Biokomposit pada penelitian ini diawali dengan permohonan laik etik dan telah mendapatkan persetujuan laik etik dengan nomor 360/HRECC.FODM/VII/2021. Membran amnion dan bubuk hidroksiapatit berasal dari sapi. Persiapan amnion membran dilakukan di Instalasi Pusat Biomaterial Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo. Membran amnion segar berasal dari sapi betina lokal dari peternakan di Malang, Jawa Timur. Amnion segar ini dibersihkan dari bekuan darah dan dicuci dengan larutan salin 0,05% sebanyak empat kali selama 10 menit. Setelah itu, amnion membran dicuci kembali dengan akuades sampai larutan saline bersih. Membran amnion yang sudah bersih dimasukkan ke dalam

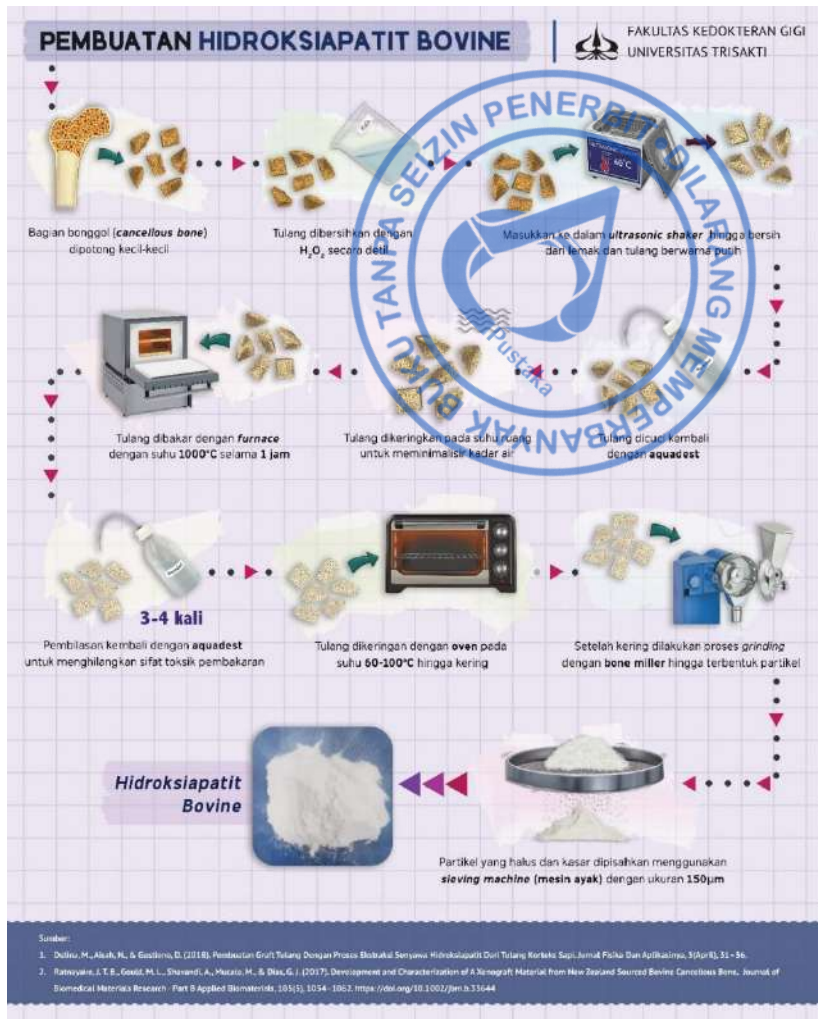
pendinginan dengan suhu -80°C selama 1x24 jam. Kemudian dilakukan pendinginan kering beku selama 1x24 jam dengan suhu -100°C .

Hidroksiapatit berasal dari tulang sapi di Rumah Pemotongan Hewan Surabaya, Jawa Timur. Bagian tulang kanselus kecil-kecil sesuai. Pencucian tulang dilakukan dengan detail menggunakan hidrogen peroksida (H_2O_2). Potongan tulang kemudian dimasukkan ke dalam pengocok ultrasonik dengan suhu 60°C supaya lemak yang ada pada tulang bersih. Proses ini dilakukan berulang sehingga tulang benar-benar bersih dari lemak dan berwarna putih. Tulang kemudian kembali dicuci kembali dengan akuades untuk menghilangkan hidrogen peroksida. Tulang yang sudah bersih dikeringkan pada suhu kamar untuk mengurangi kadar air. Pembakaran tulang dilakukan dengan oven pada suhu 1000°C selama 1 jam. Untuk menghilangkan sifat toksik setelah proses pembakaran, dilakukan pencucian dengan akuades kembali sebanyak 3 sampai 4 kali. Tulang dikeringkan kembali dengan oven pada suhu 60°C sampai 100°C sampai kering. Proses grinding dilakukan, setelah tulang benar-benar kering dengan penghancur tulang sampai terbentuk partikel. Partikel yang halus dan kasar dipisahkan dengan mesin ayak sampai didapatkan ukuran partikel $150\ \mu\text{m}$ (Gambar 2.1.1).

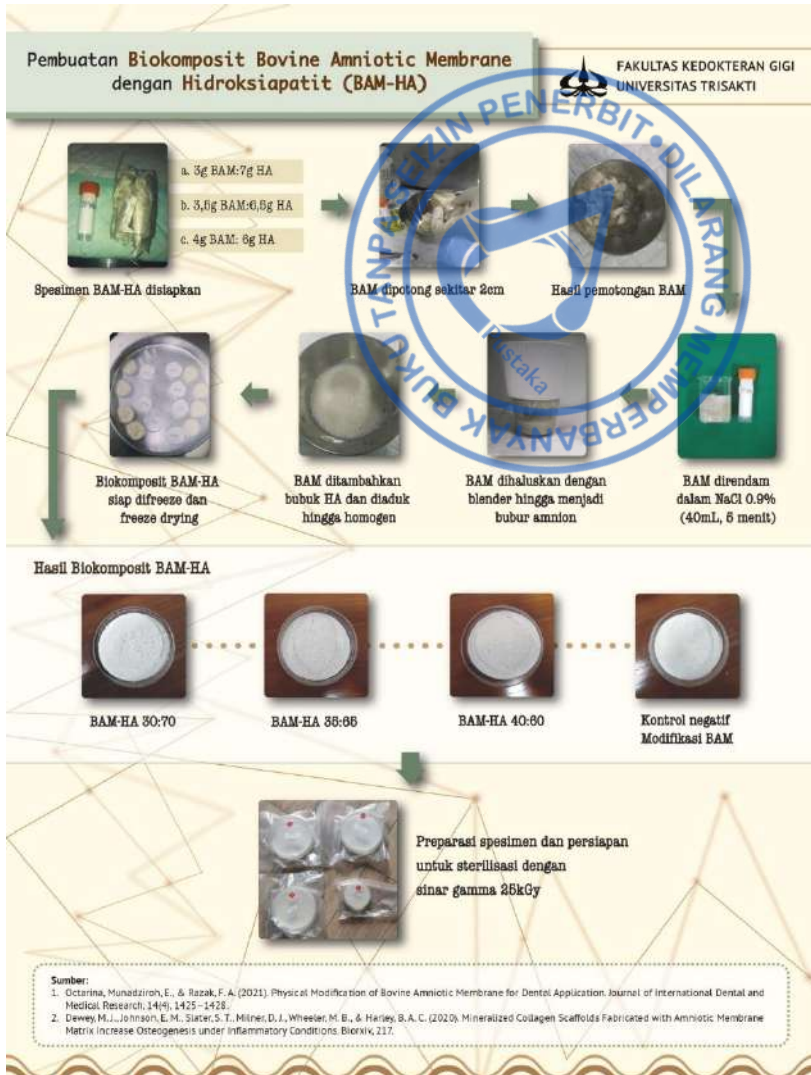
Membran amnion sapi dalam bentuk kering dan bubuk hidroksiapatit telah dipersiapkan. Membran amnion kering dan hidroksiapatit dipersiapkan untuk masing-masing sampel sebanyak 3 gr amnion membran sapi dan 7 gr hidroksiapatit (30:70), 3,5 gr amnion membran sapi dan 6,5 hidroksiapatit (35:65), serta 4 gr amnion membran sapi dan 6 gr hidroksiapatit (40:60). Amnion membran kering dipotong-potong sekitar 2 cm kemudian ditambahkan dengan natrium klorida 0,9% sebanyak 40 mL. Amnion membran sapi kering yang sudah dipotong-potong direndam selama 5 menit sampai membran menyerap cairan. Setelah amnion menyerap natrium klorida dihaluskan dengan blender selama 10 menit sampai menghasilkan bubur amnion. Bubur amnion kemudian ditambahkan bubuk hidroksiapatit yang telah dipersiapkan sebelumnya.

Kemudian diaduk sampai homogen, dan dimasukkan ke dalam cawan petri dengan ukuran diameter 10 cm. Setelah itu, dimasukkan ke dalam pendingin (Thermo, USA) dengan suhu -80°C selama 1x24 jam dan dilakukan pendinginan kering beku (Thermo (VirTis, USA) selama 1x24 jam dengan suhu -100°C . Sterilisasi dengan sinar gamma sebesar 25kGy (Gambar 2.1.2).

Pembuatan biokomposit membran amnion sapi dengan hidroksiapatit menghasilkan rasio 30:70, 35:65, dan 40:60 dalam bentuk spons. Setelah pembuatan biokomposit membran amnion sapi dengan hidroksiapatit, dilakukan uji tahap pertama untuk menganalisis karakterisasi material. Pada pengujian ini dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif yaitu membran amnion sapi dan kontrol positif berupa produk komersil yaitu Bio-Oss *Collagen*. Sebelum dilakukan uji karakterisasi sampel dipersiapkan bentuk dan ukurannya untuk analisa gugus fungsi, struktur permukaan, elemen material, persentase porositas, dan kemampuan *swelling*.



Gambar 2.1.1. Proses pembuatan hidroksiapatit yang berasal dari bovine (Filio, et al 2022).



Gambar 2.1.2. Proses pembuatan biokomposit membran amnion sapi dengan hidroksiapatit (Octarina, et al, 2024).

Pembuatan biokomposit BAM-HA diawali dengan mempersiapkan BAM dalam bentuk lembaran dan bubuk HA. Persiapan dalam bentuk kering dilakukan agar material ini dapat disetarakan rasio dalam hitungan berat. BAM dalam bentuk lembaran kering dipotong-potong dan direndam dalam larutan salin untuk memudahkan penghancuran dan penggabungan dengan bubuk HA (Dewey *et al.*, 2020).

Pembuatan biokomposit BAM-HA dengan prinsip dan prosedur teknis sol dan gel. Metode sol-gel merupakan satu metode sintesis yang menerapkan dua tahapan fasa penting yaitu sol dan gel. Prosedur tahapan pembuatan adalah pembuatan fasa sol, gelasi sol, dan penghilangan fasa cair (Liza *et al.*, 2018; Ramesh *et al.*, 2017). NaCl digunakan dalam penelitian ini sebagai pelarut organik untuk memudahkan dalam penghalusan BAM dengan blender. Saat prosedur ini terjadi tahapan terjadinya gelasi sol yang ditandai dengan adanya bubur amnion yang lengket seperti *jelly*. Penambahan hidroksiapatit dilakukan pada saat fase gelasi sol ini membentuk ikatan antara BAM dengan HA. Pembuatan biokomposit ini BAM berperan sebagai matriks dan hidroksiapatit juga berperan sebagai *filler* (Montalbano *et al.*, 2020). Penghilangan fasa cair pada biomaterial atau *jelly* digunakan metode pengeringan *freeze drying super critical* (aerogel). Metode pengeringan ini akan menyublimasi kandungan air tanpa menghilangkan komponen atau mengubah struktur pada biomaterial. Proses ini akan menimbulkan struktur pori pada biomaterial (Catauro & Cipriotti, 2021).

Pembuatan material ini diharapkan menjadi biokomposit pengganti tulang (Kołodziejska *et al.*, 2020). Penelitian ini dilakukan pembuatan biokomposit BAM-HA dengan perbandingan 30:70, 35:65, dan 40:60 agar mendekati dari struktur tulang. Tulang atau dentin memiliki perbandingan komponen organik dan anorganik 30:70 (Neel *et al.*, 2016). Komposisi tulang alveolar mendekati sementum memiliki komposisi komponen organik dan anorganik sebesar 35:65 (Oosterlaken *et al.*, 2021). Beberapa literatur mengatakan bahwa perbandingan komposisi material organik dan

anorganik pada tulang sebesar 40:60. Oleh karena itu perbandingan BAM-HA untuk 40:60 dengan lebih banyak matriks organik sebanyak 40% dibuat sebagai perbandingan meningkatkan penyerapan *scaffold* untuk penyembuhan luka (Dey, 2020).

Pembuatan biokomposit ini akan memodifikasi sifat material, *filler* hidroksiapatit akan memberikan kekuatan dan matriks dari BAM yang mengandung kolagen selain sebagai pengikat juga akan membentuk atau menginisiasi penyembuhan luka (Montalbano *et al.*, 2020). Selain itu, material ini juga diharapkan dapat berperan sebagai *scaffold* untuk pembentukan tulang baru dan atau sebagai karier obat-obatan (Holzapfel *et al.*, 2013).

BAB III

HASIL UJI KARAKTERISASI MATERIAL



Karakterisasi material adalah serangkaian metode yang digunakan untuk mempelajari dan memahami sifat-sifat fisik, kimia, dan mekanik dari suatu material. Proses ini penting untuk mengetahui bagaimana material tersebut akan berperilaku dalam kondisi tertentu, serta untuk memastikan kualitas dan konsistensinya. Sifat fisis maupun kimiawi suatu material dapat dipengaruhi dari ukuran dan komponen dari material tersebut (Abdullah & Khairurrijal, 2009; Khalid *et al.* 2014). Gugus fungsi, morfologi permukaan, struktur porositas, persentase porositas dan kemampuan *swelling* adalah karakteristik dari suatu material yang penting diketahui untuk material yang digunakan sebagai aplikasi biomedis untuk regenerasi tulang.

A. Fourier Transform Infrared (FTIR)

Salah satu metode analisis material adalah *Fourier Transform Infrared* (FTIR). Metode analisis ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi molekul yang kompleks, gugus fungsi, senyawa organik, atau senyawa anorganik. Jenis analisis ini dapat digunakan untuk mengarakterisasi sampel dalam bentuk cairan, larutan, pasta, bubuk, film, serat, dan gas. Selain itu, dapat digunakan untuk mengevaluasi material

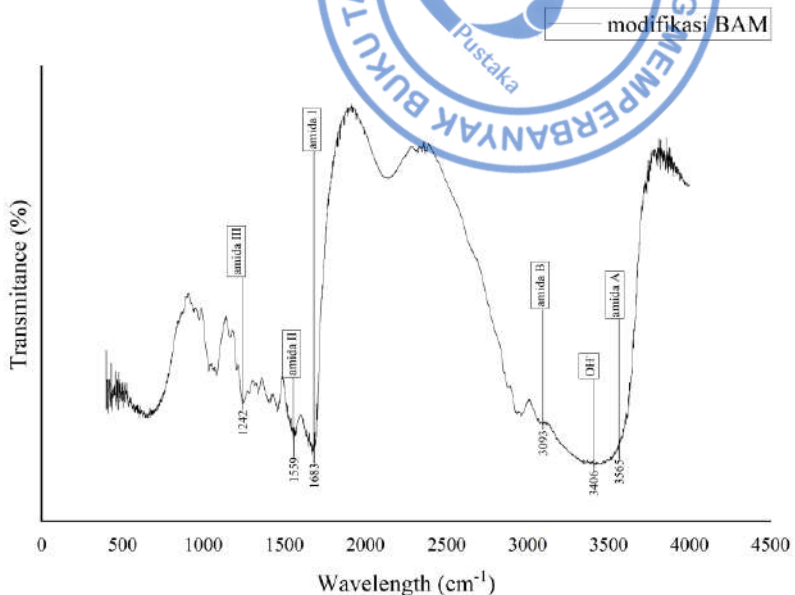
pada permukaan substrat. Prosedur analisis FTIR melibatkan paparan sampel radiasi inframerah (IR). Radiasi inframerah memengaruhi getaran atom molekul dalam sampel yang menyebabkan penyerapan atau transmisi energi tertentu. Oleh karena itu, FTIR berguna untuk mengidentifikasi getaran molekul khusus dalam sampel. (Nandiyanto *et al.*, 2019). Analisa FTIR adalah teknik analisis yang sensitif, cepat, dan nondestruktif yang memerlukan penggunaan reagen kimia dan pelarut dalam jumlah kecil. (Maryam *et al.*, 2019). Metode ini akan menganalisis spektra yang dihasilkan sesuai dengan puncak-puncak yang dibentuk oleh suatu gugus fungsi (Zhong *et al.*, 2018).

Preparasi sampel pada penelitian ini dilakukan sebelum pengujian dengan alat Uji FTIR. Sampel diberikan kalium bromida (Sigma Aldrich, Jerman) dengan perbandingan 1:4. Setelah sampel tercampur dengan kalium bromide, ditumbuk menggunakan mortal dan pastel sampai menjadi satu kesatuan dan homogen. Setelah homogen dimasukkan wadah dengan ukuran diameter 4 mm untuk pengujian. Analisa gugus fungsi sampel menggunakan IR Prestige-21 (Shimadzu, Jepang). Metode pengujian menggunakan *Diffuse Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (DRS-FTIR) pada rentang pengukuran $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, resolusi 2.0 cm^{-1} , scan sebanyak 20 dan hasil pengukuran persentase transmittance (Octarina *et al.*, 2022).

Standar operasional pengujian dengan alat FTIR. Alat instrumen FTIR dinyalakan dengan menekan tombol *on/off*. Software FTIR yang tersedia pada komputer dibuka. Pemilihan opsi “*measure*” kemudian pilih “*measurement*” lalu “*initialize*” ditunggu hingga muncul tiga ikon status berwarna hijau pada sebelah kanan layar. Perangkat FTIR siap untuk digunakan. Perangkat tambahan DRS-8000A digunakan untuk sampel padat. Jika telah terpasang, maka akan muncul satu *square* ikon hijau bertuliskan DRS-8000 bersamaan dengan tiga *square* ikon lainnya. Sampel yang telah dipersiapkan dimasukkan ke dalam lubang silinder yang terdapat pada bagian tengah wadah berbentuk mur. Lalu tempatkan

wadah tersebut ditempatkan pada alat DRS, posisikan agar sinar IR tepat mengenai bagian tengah wadah. Pengukuran dilakukan *background* pada rentang 400-4000 cm^{-1} , resolusi 2.0 cm^{-1} , jumlah scan sebanyak 20 dan hasil pengukuran persentase transmittance.

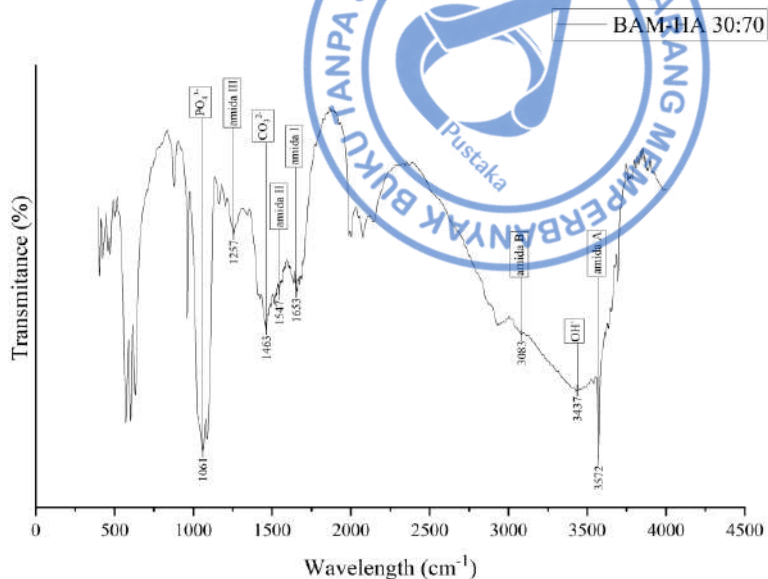
Hasil Pengujian *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR)



Gambar 3.1.1. Grafik hasil analisa FTIR membran amnion sapi

Gambar 3.1.1 adalah grafik hasil analisa FTIR BAM. Pada grafik tersebut terdapat puncak penyerapan amida I pada 1683 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida II pada panjang gelombang 1559 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida III pada panjang gelombang 1242 cm^{-1} . Puncak

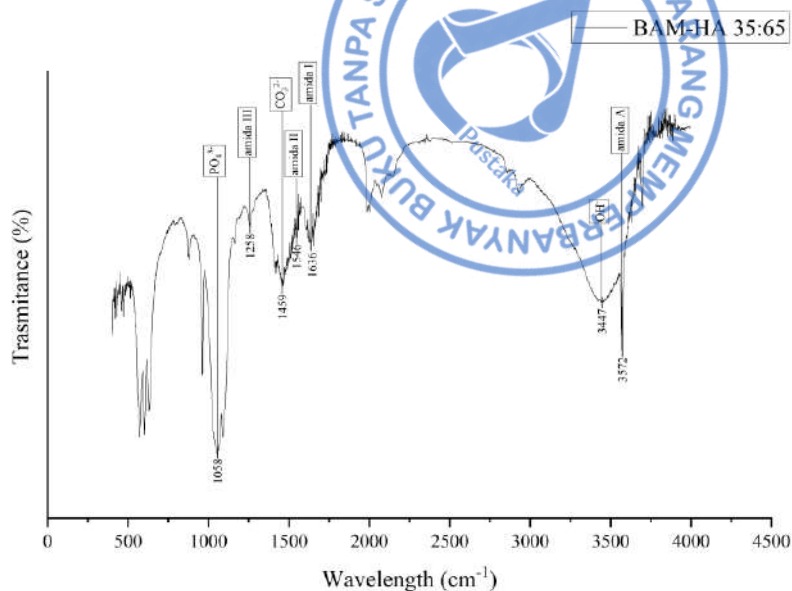
penyerapan amida A pada panjang gelombang 3565 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida B pada panjang gelombang 2936 cm^{-1} . Puncak penyerapan OH- pada panjang gelombang 3406 cm^{-1} .



Gambar 3.1.2. Grafik hasil Analisa FTIR dari membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 30:70

Gambar 3.1.2 adalah grafik hasil analisa membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 30:70. Pada grafik tersebut terdapat puncak penyerapan amida I pada 1653 cm^{-1} . Terdapat puncak penyerapan amida II pada panjang gelombang 1547 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida III pada panjang gelombang 1257 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida A pada panjang gelombang 3572 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida B pada panjang

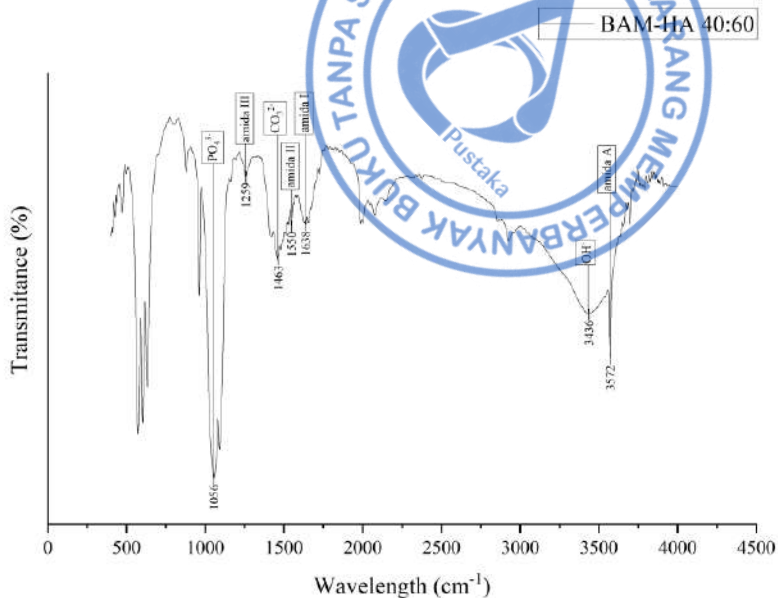
gelombang 2929 cm^{-1} . Puncak penyerapan PO_4^{3-} pada panjang gelombang 1061 cm^{-1} . Puncak penyerapan CO_3^{2-} pada panjang gelombang 1463 cm^{-1} . Puncak penyerapan OH^- pada panjang gelombang 3437 cm^{-1} .



Gambar 3.1.3. Grafik hasil Analisa FTIR dari membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 35:65

Gambar 3.1.3 adalah grafik hasil analisa membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 35:65. Pada grafik tersebut terdapat puncak penyerapan amida I pada 1636 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida II pada panjang gelombang 1546 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida III pada panjang gelombang 1258 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida A pada panjang gelombang 3572 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida B pada panjang

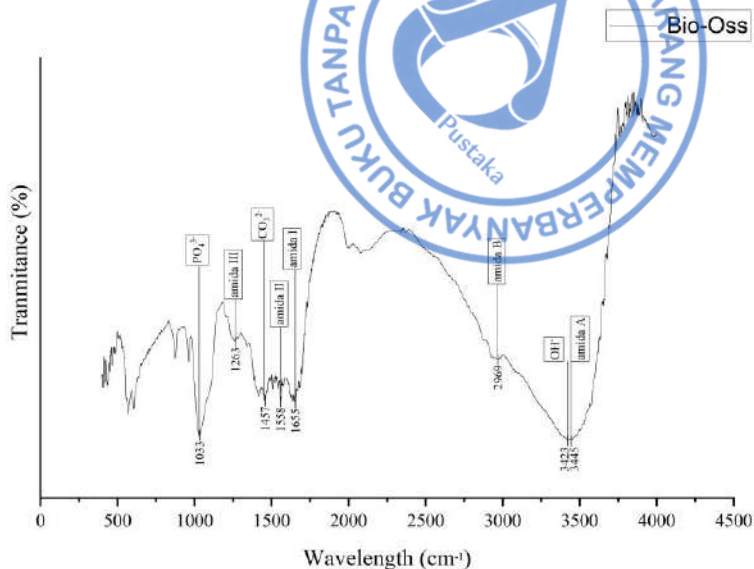
gelombang 2929 cm^{-1} . Puncak penyerapan PO_4^{3-} pada panjang gelombang 1058 cm^{-1} . Puncak penyerapan CO_3^{2-} pada panjang gelombang 1459 cm^{-1} . Puncak penyerapan OH^- pada panjang gelombang 3447 cm^{-1} .



Gambar 3.1.4. Grafik hasil analisa FTIR dari membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 40:60

Gambar 3.1.4 adalah grafik hasil analisa membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 40:60. Pada grafik tersebut terdapat puncak penyerapan amida I pada 1638 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida II pada panjang gelombang 1550 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida III pada panjang gelombang 1259 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida A pada panjang gelombang 3436 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida B pada panjang

gelombang 2927 cm^{-1} . Puncak penyerapan PO_4^{3-} pada panjang gelombang 1056 cm^{-1} . Puncak penyerapan CO_3^{2-} pada panjang gelombang 1463 cm^{-1} . Puncak penyerapan OH^- pada panjang gelombang 3436 cm^{-1} .

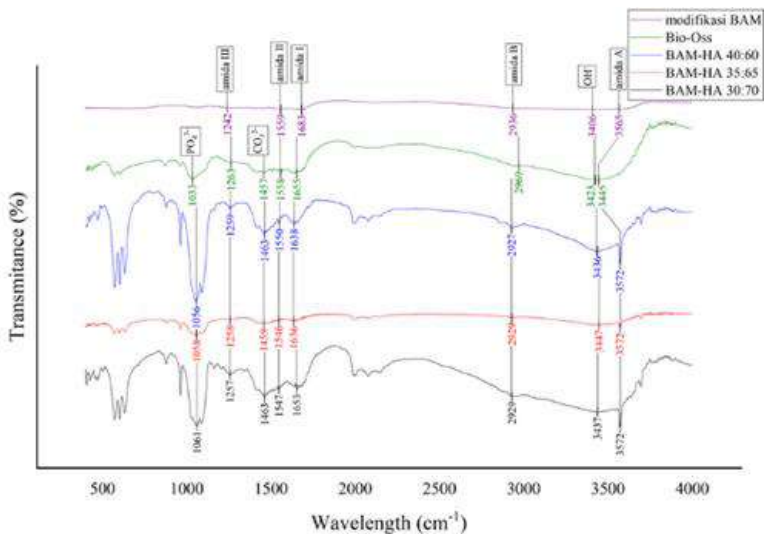


Gambar 3.1.5. Hasil analisa FTIR dari Bio-Oss Collagen

Gambar 3.1.5 adalah hasil analisa FTIR dari Bio-Oss Collagen. Pada grafik tersebut terdapat puncak penyerapan amida I pada 1655 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida II pada panjang gelombang 1558 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida III pada panjang gelombang 1263 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida A pada panjang gelombang 3445 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida B pada panjang gelombang 2969 cm^{-1} . Puncak penyerapan PO_4^{3-} pada panjang gelombang 1033 cm^{-1} . Puncak penyerapan

CO_3^{2-} pada panjang gelombang 1489 cm^{-1} . Puncak penyerapan OH^- pada panjang gelombang 3423 cm^{-1} .

Tabel 3.1.1 merupakan ringkasan dari hasil analisa FTIR berdasarkan referensi peregang gugus fungsi $\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$, $\text{N}-\text{H}$ dan $\text{O}-\text{H}$ dan $\text{P}-\text{O}-\text{P}$, serta pembengkokkan gugus fungsi $\text{N}-\text{H}$. Penelitian ini menunjukkan membran amnion sapi tidak mengalami denaturasi atau perubahan saat dimodifikasi dan dikombinasi dengan bubuk hidroksiapatit. Membran amnion sapi dengan hidroksiapatit teridentifikasi dapat terikat dengan baik. Biokomposit membran amnion sapi dengan hidroksiapatit memiliki gugus fungsi yang sama dengan kontrol negatif dan kontrol positif yaitu gugus fungsi amida I, II, III, A, B, dan OH^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} .



Gambar 3.1.6.

Tabel 3.1.1. Puncak penyerapan gugus fungsi amida I, II, III, A, B, OH⁻, PO₄³⁻ dan CO₃²⁻ pada membran amnion sapi, membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 30:70, 35:65, 40:60

Puncak penyerapan (cm-1)							
Gugus Fungsi	BAM	membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 30:70	membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 35:65	membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 40:60	Bio-Oss Collagen	Referensi	Mode gugus fungsi
Amida I	1683	1653	1636	1638	1655	1600-1700	Peregangan C=O
Amida II	1559	1547	1546	1550	1558	1480-1575	Pembengkokan N-H Peregangan C-N
Amida III	1242	1257	1258	1259	1263	1200-1300	Pembengkokan N-H Peregangan C-N
Amida A	3565	3572	3572	3572	3445	3300-3600	Peregangan N-H
Amida B	2936	2929	2929	2927	2926	2900-3100	Peregangan N-H
OH ⁻	3406	3437	3447	3436	3423	3300-3500	Peregangan O-H
PO ₄ ³⁻	-	1061	1058	1056	1033	1480-1575	Peregangan asimetris P-O-P
CO ₃ ²⁻	-	1463	1452	1463	1489	1380-1580	Peregangan osimetris C-O

Hasil analisa FTIR kelima sampel penelitian ini yaitu BAM, BAM-HA 30:70, 35:65, 40:60, dan Bio-Oss memiliki gugus fungsi amida I, II, III, A, B, dan OH⁻ (Gambar 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5, 3.1.6). Amida adalah suatu jenis senyawa kimia yang mempunyai gugus fungsional RnE(O)xNR'2 (R dan R' mengacu kepada H atau gugus organik). Gugus fungsi amida I, II, III, A, B, dan OH⁻ ditandai dengan ikatan O-H, N-H, C-H dan N-H yang merupakan indikasi adanya kolagen (De Campos Vidal & Mello, 2011; Riaz *et al.*, 2018).

Hasil analisa FTIR BAM-HA 30:70, 35:65, 40:60, dan Bio-Oss menunjukkan adanya gugus fungsi PO₄³⁻ dan CO₃²⁻ (Gambar 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5, 3.1.6). Gugus fungsi PO₄³⁻ dan CO₃²⁻ merupakan parameter dari HA. Menurut Xie (2016) gugus fungsi O-P-O, C-O, dan Ca-O diindikasikan sebagai hidroksiapatit. Sampel BAM tidak menunjukkan adanya gugus fungsi PO₄³⁻ dan CO₃²⁻ (Gambar 3.1.1). Hal ini sesuai pada penelitian karena sampel BAM merupakan sampel kontrol negatif dan tidak dilakukan penambahan dengan HA pada saat pembuatan sampel (Ślósarczyk *et al.*, 2005; Chandrasekar *et al.*, 2013). Referensi puncak penyerapan dari gugus fungsi amida I, II, III, A, B, OH⁻ PO₄³⁻, dan CO₃²⁻ terlihat pada Tabel 3.1.2.

Tabel 3.1.2. Referensi puncak penyerapan gugus fungsi amida I, II, III, A, B, OH⁻ PO₄³⁻, dan CO₃²⁻

Gugus Fungsi	Senyawa	Gelombang IR
Peregangan C=O	Amida I	1600-1700 cm ⁻¹
Pembengkokan N-H Peregangan C-N	Amida II	1480-1575 cm ⁻¹
Pembengkokan N-H Peregangan C-N	Amida III	1200-1300 cm ⁻¹
Peregangan N-H	Amida A	3300-3600 cm ⁻¹
Peregangan N-H	Amida B	2900-3100 cm ⁻¹
Peregangan O-H	OH ⁻ (air)	3300-3500 cm ⁻¹
Peregangan asimetris P-O-P	PO ₄ ³⁻	1480-1575 cm ⁻¹
Peregangan asimetris C-O	CO ₃ ²⁻	1380-1580 cm ⁻¹

Penyerapan pada panjang gelombang 1600-1700 cm⁻¹ yang sesuai dengan gelombang penyerapan protein amida I yang terutama dikaitkan dengan mode peregangan C=O (Kong & Yu, 2007). Penyerapan pada panjang gelombang 1480-1575 cm⁻¹ yang sesuai dengan gelombang penyerapan protein amida II yang terutama dikaitkan dengan mode pembengkokan N-H dan peregangan C-N (Riaz *et al.*, 2018; Sabouri *et al.*, 2020). Penyerapan pada panjang gelombang 1200-1300 cm⁻¹ yang sesuai dengan gelombang penyerapan protein amida III yang terutama dikaitkan dengan mode pembengkokan N-H dan peregangan C-N (Riaz *et al.*, 2018; Ji *et al.*, 2020). Penyerapan pada panjang gelombang 3300-3600 cm⁻¹ yang sesuai dengan gelombang penyerapan protein amida A yang terutama dikaitkan dengan mode peregangan N-H (Riaz *et al.*, 2018), (Ji *et al.*, 2020). Penyerapan pada panjang gelombang 2900-3100 cm⁻¹ yang sesuai dengan gelombang penyerapan protein amida B yang terutama dikaitkan dengan mode peregangan N-H (Sabouri *et al.*, 2020). Penyerapan pada panjang gelombang 3300-3500 cm⁻¹ yang sesuai dengan gelombang penyerapan gugus fungsi air yaitu OH⁻ yang terutama dikaitkan dengan

mode peregangan N-H (Riaz *et al.*, 2018), (Sabouri *et al.*, 2020). Penyerapan pada panjang gelombang 1480-1575 cm^{-1} yang sesuai dengan gelombang penyerapan gugus fungsi HA yaitu PO_4^{3-} yang terutama dikaitkan dengan mode peregangan asimetris P-O-P (Chandrasekar *et al.*, 2013; Sabouri *et al.*, 2020; Ślósarczyk *et al.*, 2005). Penyerapan pada panjang gelombang 1380-1580 cm^{-1} yang sesuai dengan gelombang penyerapan gugus fungsi HA yaitu CO_3^{2-} yang terutama dikaitkan dengan mode Peregangan asimetris C-O (Chandrasekar *et al.*, 2013; Sabouri *et al.*, 2020; Ślósarczyk *et al.*, 2005). Referensi gambaran gugus fungsi ini dapat terkumpul pada tabel 3.1.2.

Spektrum pada FTIR dapat mengindikasikan variasi *upregulation* atau *downregulation* dari protein. Kolagen tipe 1 memiliki spektra FTIR pada amida I 1585-1720 cm^{-1} dan amida II pada 1500-1586 cm^{-1} (Riaz *et al.*, 2018). Spektrum FTIR yang ditampilkan pada penelitian ini menunjukkan bahwa BAM, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM-HA (30:70, 35:65, 40:60) menunjukkan adanya kolagen tipe I. Adanya kolagen tipe I krusial dalam penyembuhan luka. Protein ini terbentuk dan digunakan untuk memperbaiki jaringan. Pita spektrum amida I ditandai dengan peregangan C=O dan mengindikasikan adanya kolagen (Kong & Yu, 2007). Apabila spektrum ini menurun, menunjukkan adanya denaturasi dari struktur kolagen. Amida I digunakan untuk mengevaluasi struktur sekunder yang lain dari elemen seperti *alpha helix*, *beta sheets* yang berubah menjadi *unordered coil* dan *random coil*.

Spektrum protein ditandai dengan vibrasi peregangan dan pembengkokan gugus fungsi amida. Pada penelitian ini ketiga sampel Biokomposit BAM-HA dan kontrol negatif yaitu BAM tidak memperlihatkan adanya pergeseran puncak gugus fungsi amida I dan II. Hal ini menunjukkan kolagen yang terdapat pada biokomposit BAM-HA tidak mengalami denaturasi selama proses pembuatan (Sabouri *et al.*, 2020; Sripriya & Kumar, 2016). Biokomposit BAM-HA juga memiliki semua gugus fungsi PO_4^{3-} dan CO_3^{2-} dari kontrol positif yaitu Bio-Oss *Collagen*. Puncak

penyerapan CO_3^{2-} pada $1460\text{--}1530\text{ cm}^{-1}$ menunjukkan bahwa material ini adalah HA alami (Gheisari *et al.*, 2015).

Adanya gugus fungsi amida dan hidroksiapatit pada kombinasi BAM-HA menunjukkan bahwa penggabungan BAM dengan HA telah berhasil. Hal ini dikonfirmasi oleh hasil FTIR, yang menunjukkan HA terikat dan menyatu pada BAM. Hasil FTIR juga menunjukkan tidak ada perubahan gugus fungsi dan mode dari puncak serapan amida pada BAM setelah HA ditambahkan pada sampel biokomposit BAM-HA. Hal ini sesuai dengan penelitian Chen *et al.* (2017) yang menganalisis *scaffold* kolagen dengan HA, menunjukkan gugus fungsi yang sama antara *scaffold* kolagen dan *scaffold* kombinasi kolagen-HA (Chen *et al.*, 2017).

Kolagen memiliki struktur *tripel helix* dari *alfa helix* dari rantai polipeptida, yang membentuk dasar dari *backbone*. Pada penelitian ini, spektrum amida pada BAM 1683 cm^{-1} dan Bio-Oss *Collagen* memiliki spektrum yang lebih rendah yaitu 1655 cm^{-1} . Penurunan spektrum ini mengindikasikan peregangan dari *backbone* yang menyebabkan perubahan *conformational* dari struktur *tripel heliks* Bio-Oss *Collagen*. BAM-HA 30:70 menunjukkan gambaran spektrum yang sama dengan Bio-Oss *Collagen* dengan spektrum 1653 cm^{-1} . Apabila dibandingkan antara Bio-Oss *Collagen* dan BAM-HA 30:70, pergeseran spektrum yang lebih besar terlihat pada BAM-HA 35:65 yaitu sebesar 1636 cm^{-1} dan BAM-HA 40:60 sebesar 1638 cm^{-1} . Hal ini mengindikasikan tingginya derajat *conformational change* pada kolagen *tripel helix* yang membentuk *beta sheets* pada BAM-HA 35:65 dan 40:60. *Beta sheets* adalah protein sekunder dari spektrum yang berada pada spektrum 1633 cm^{-1} (Boskey & Villarreal-Ramirez, 2017). Hasil ini menunjukkan bahwa dengan meningkatnya kandungan BAM pada biokomposit, struktur *triple helix* dari kolagen akan digantikan oleh protein *beta sheet*, yaitu lebih sedikit *triple helix* dan lebih banyak *beta sheets*. Perubahan *conformational* dari inti protein akan menghasilkan pembentukan *beta sheets*, yang memengaruhi

turns/coil dari struktur protein. Hal ini menyebabkan pembentukan pematangan kolagen selama proses penyembuhan.

Kandungan kolagen pada BAM-HA diperlukan untuk memulai proses regenerasi tulang. Kolagen dapat memulai aktivitas dan respons sel (Riaz *et al.*, 2018). Kolagen juga memiliki peranan yang dapat membantu hemostasis dan pelekatan sel (Dimitriou *et al.*, 2012). Kandungan HA pada biokomposit BAM-HA akan meningkatkan kemampuan biomaterial tersebut dalam penyembuhan tulang alveolar. HA memiliki sifat bioaktif dan biokompatibilitas yang baik. HA juga diperlukan untuk membantu proses regenerasi tulang dan mengisi kekosongan soket sebagai material yang menggantikan tulang (Edward *et al.*, 2020; Kattimani *et al.*, 2016). Gabungan kedua biomaterial yang biasa disebut biokomposit memiliki kesinergisan sehingga dapat menstimulasi osteoinduksi, osteokonduksi, dan osteointegrasi yang merupakan proses osteoregenerasi (Albrektsson & Johansson, 2001; Ghilini *et al.*, 2021).

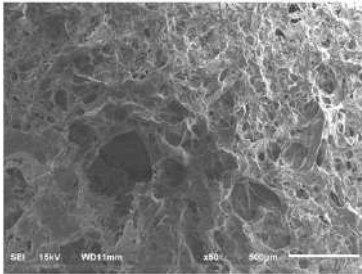
B. Scanning Electrone Microscopy (SEM)

Scanning Electron Microscope (SEM) adalah jenis mikroskop elektron yang mencitrakan permukaan sampel oleh pemindaian dengan pancaran sinar elektron. Elektron yang berinteraksi dengan atom yang membentuk sampel menghasilkan sinyal yang berisi informasi tentang sampel dari permukaan topografi, morfologi, dan komposisi suatu material. SEM dapat mendeteksi dan menganalisis fraktur pada permukaan, memberikan informasi mikrostruktur, melihat kontaminasi permukaan, analisa kimia kualitatif, dan identifikasi struktur kristalin (Choudhary *et al.*, 2017).

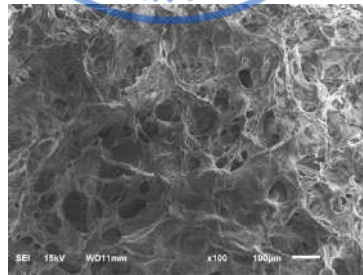
Biomaterial sampel bersifat non konduktor terhadap termal dan listrik sehingga sangat rentan mengalami kerusakan akibat radiasi dari pancaran sinar elektron SEM. Preparasi sampel untuk pengujian SEM pada bahan biomaterial adalah hal yang penting untuk dapat menganalisis.

Sampel biomaterial harus melewati proses fiksasi, pengeringan, dan *coating* dengan logam seperti emas, platinum atau palladium untuk menjadikan permukaan sampel konduktif untuk analisa SEM (Kashi *et al.*, 2014).

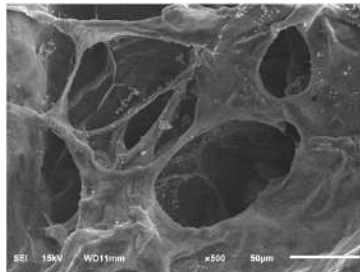
Uji SEM dilakukan untuk mengetahui topografi, morfologi bentuk pori, ukuran, dan jumlah pori yang ada pada sampel (Octarina *et al.*, 2024). Pada penelitian ini kelima sampel yaitu BAM, Biokomposit BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, dan Bio-Oss *Collagen* dilakukan uji analisa menggunakan SEM.



(a)



(b)



(c)

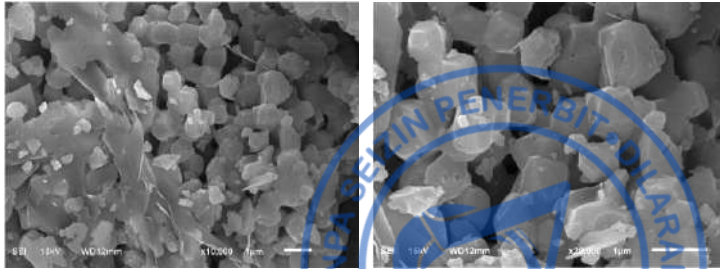
Gambar 3.2.1. Mikrograf SEM BAM; (a) perbesaran 50x, (b) perbesaran 100x, dan (c) perbesaran 500x

Tabel 3.2.1. Hasil Perhitungan Jumlah dan Diameter Porus pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x BAM

	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	41.314	101.094	62.952	181.667	-2.726	41.215
2	100.884	96.309	65.703	180.000	12.171	102.280
3	29.785	81.032	65.800	138.000	36.870	29.406
4	24.981	76.128	66.000	94.000	45.000	24.952
5	18.255	54.314	48.333	60.136	26.565	17.534
6	158.532	91.944	47.634	186.244	30.005	160.730
7	70.138	95.527	61.162	127.444	22.989	70.275
8	243.082	100.076	69.032	202.730	47.573	246.996
9	189.277	149.122	78.284	246.823	118.657	192.130
10	196.964	139.435	78.156	245.000	125.407	199.635
11	112.414	122.134	68.442	219.000	57.680	113.670
12	79.746	139.699	90.502	241.727	48.945	80.592
13	132.590	98.078	57.132	249.881	-43.229	134.527
14	82.629	147.446	76.633	233.272	6.789	82.919
15	162.375	139.794	53.238	252.905	-86.594	164.966
16	101.845	70.955	49.977	107.250	34.902	102.786
17	78.786	83.046	55.804	133.037	29.745	79.027
18	23.059	70.322	53.327	115.000	142.125	22.352
19	35.550	77.253	54.802	166.889	153.435	35.069
20	43.236	88.653	56.636	162.818	149.931	43.040
21	57.648	72.290	48.792	100.000	47.726	58.287
22	102.806	68.283	56.208	129.000	42.709	104.049
23	25.942	66.521	48.911	104.408	38.660	25.105
24	109.531	61.009	43.612	82.976	-7.125	110.637
25	116.257	67.813	47.231	93.556	47.021	117.902
26	81.668	62.032	52.278	84.056	47.911	81.892
27	171.022	70.328	52.215	109.555	-18.435	173.582

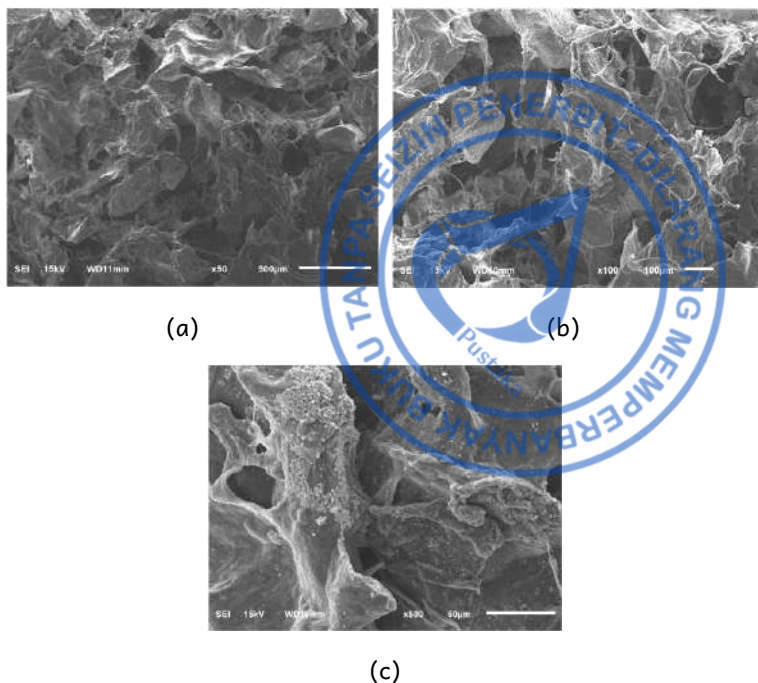
28	106.649	58.024	46.892	95.000	42.064	108.267
29	32.667	57.804	51.096	82.389	-37.569	32.153
30	47.079	66.718	51.750	80.312	29.745	47.416
31	152.767	64.864	48.629	119.000	128.320	154.922
32	38.432	66.547	57.128	78.395	120.466	38.665
33	65.334	66.254	47.609	99.978	26.565	65.754
34	70.138	72.843	60.917	89.562	-75.579	70.846
35	39.393	63.581	50.000	79.000	36.870	39.208
36	14.412	62.313	54.204	65.551	-33.690	14.137
37	64.374	100.714	56.102	200.000	46.219	65.167
38	41.314	104.008	57.762	188.333	2.726	41.215
39	204.650	91.643	60.453	178.358	3.778	208.256
40	62.452	113.326	62.957	191.000	28.179	62.272
	Rerata					89.096

Gambar 3.2.1 adalah mikrograf SEM BAM dengan perbesaran 50x (Gambar 3.2.1a), perbesaran 100x (Gambar 3.2.1b), dan perbesaran 500x (Gambar 3.2.1c). Pada mikrograf SEM ini terlihat porus-porus kecil yang tidak beraturan dan merata di permukaan sampel. Pengamatan pada mikrograf SEM 100x (Gambar 3.2.1b) ditemukan jumlah pori-pori sebanyak 40 buah. Perhitungan ukuran porus dengan *software Image-J* menunjukkan ukuran rerata 89,096 μm , dengan ukuran porus terbesar 208,256 μm dan ukuran porus terkecil 14,137 μm (Tabel 3.2.1).



Gambar 3.2.2. Figure SEM images; (a) BHA at 10000x magnification and (b) BHA at 20000x magnification

Gambar 3.2.2 merupakan gambar SEM BHA pada pembesaran (A) 10.000x dan (B) 20.000x. Pada penelitian ini, perangkat lunak Image J digunakan pada gambar SEM dengan pembesaran 20.000x untuk mengukur ukuran kristal HA. Gambar tersebut menunjukkan struktur kristal heksagonal tidak beraturan dengan ukuran rata-rata $1,97 \mu\text{m}$, dengan ukuran terkecil $0,144 \mu\text{m}$ dan ukuran terbesar $4,494 \mu\text{m}$.



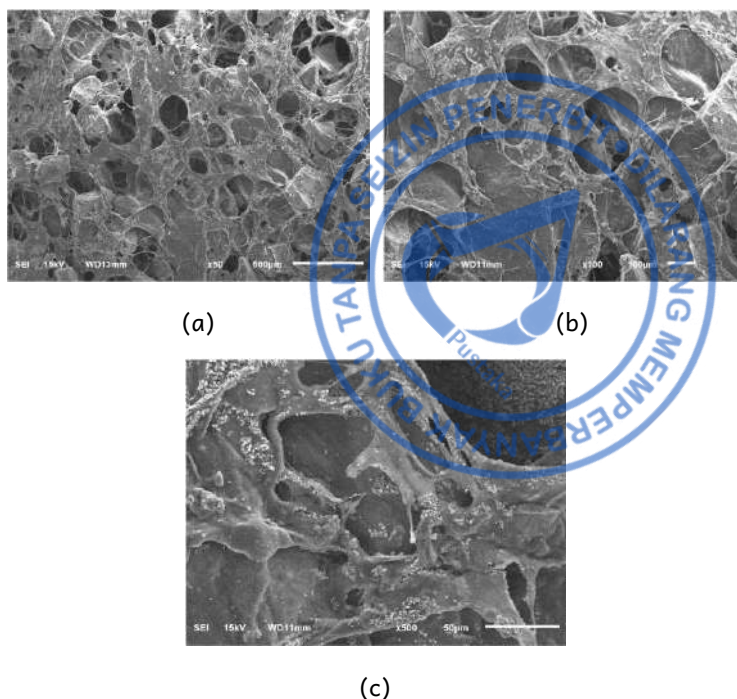
Gambar 3.2.3. Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 30:70; (a) perbesaran 50x, (b) perbesaran 100x, dan (c) perbesaran 500x

Tabel 3.2.2. Hasil Perhitungan Jumlah dan Diameter Porus pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x BAM-HA 30:70

	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	143.126	86.289	66.048	216.403	23.471	153.409
2	128.557	93.944	72.764	185.000	53.746	137.762
3	389.955	80.743	59.269	134.084	-88.486	420.445
4	64.278	81.709	61.130	146.000	32.829	68.306
5	183.408	89.668	62.298	175.148	-84.075	197.317
6	64.278	76.194	48.169	193.565	-132.797	68.130

7	248.543	74.581	56.385	213.162	-98.746	267.884
8	238.258	83.514	57.721	166.344	18.958	256.463
9	190.264	80.757	56.799	134.179	-27.493	204.551
10	41.138	71.775	61.220	90.000	27.646	43.893
11	70.278	81.157	64.420	154.654	41.987	74.730
12	225.403	94.388	63.557	253.317	-82.117	242.996
13	35.996	80.568	61.249	165.752	43.025	37.990
14	47.137	70.442	59.407	87.000	2.121	50.026
15	66.850	79.985	64.442	108.000	73.443	71.470
	Rerata					153.025

Gambar 3.2.3 adalah mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 30:70 dengan perbesaran 50x (Gambar 3.2.3a), perbesaran 100x (Gambar 3.2.3b), dan perbesaran 500x (Gambar 3.2.3c). Pada mikrograf SEM ini menunjukkan permukaan sampel tampak padat dan terlihat porus-porus besar yang tidak beraturan. Pengamatan pada mikrograf SEM perbesaran 100x (Gambar 3.2.2b) menunjukkan jumlah porus sebanyak 15 buah. Porus-porus tersebut memiliki ukuran rerata 153,025 μm , porus terbesar berukuran 420,445 μm , dan porus terkecil berukuran 37,990 μm menggunakan *software Image-J* (tabel 3.2.2). Partikel HA tampak menyatu dengan BAM mengisi celah-celah di antara porus-porus. Hal ini menunjukkan antara BAM-HA bisa membentuk ikatan satu sama lain.



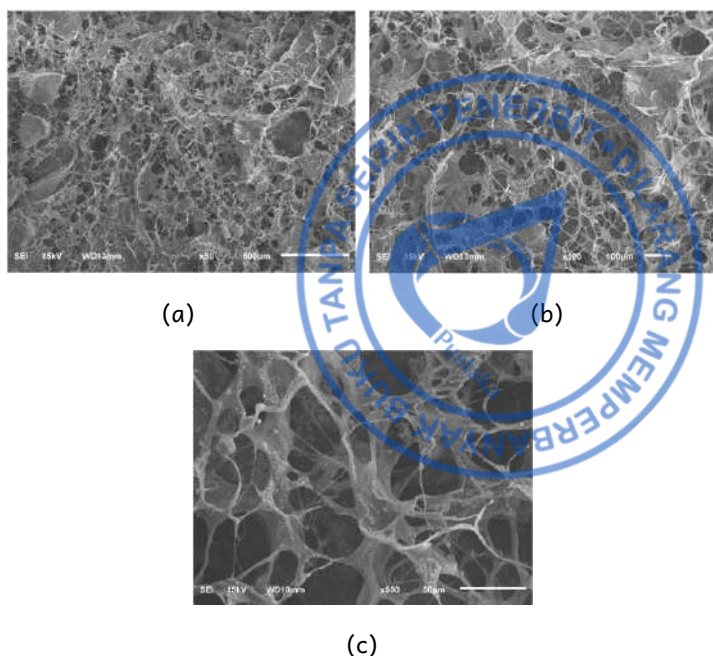
Gambar 3.2.4. Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 35:65; (a) perbesaran 50x, (b) perbesaran 100x, dan (c) perbesaran 500x

Tabel 3.2.3. Hasil Perhitungan Jumlah dan Diameter Porus pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x BAM-HA 35:65

	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	109.531	72.239	48.187	147.000	32.005	110.967
2	132.590	71.945	36.135	245.983	42.049	134.642
3	158.532	142.826	60.368	253.161	19.983	160.622
4	171.022	110.639	50.258	221.949	36.741	173.693
5	261.337	144.679	74.940	254.917	-61.356	265.821
6	43.236	73.783	39.215	159.548	71.565	43.395

7	293.044	88.407	33.076	191.461	47.397	298.298
8	310.338	109.092	52.025	255.000	-46.005	316.106
9	208.493	87.844	29.317	187.000	-58.219	212.168
10	164.297	96.127	37.000	211.709	28.072	166.635
11	104.727	103.485	58.890	212.000	25.145	106.116
12	72.060	63.734	27.838	162.162	-1.548	72.562
13	58.609	108.594	65.872	211.494	-55.784	59.268
14	70.138	77.193	48.250	141.574	-50.599	71.036
15	118.178	120.770	41.305	252.400	-39.685	119.729
16	195.042	116.562	56.458	232.000	25.805	198.156
17	159.493	77.309	32.273	161.985	-69.362	161.302
18	62.452	53.979	34.406	174.406	5.356	63.008
19	288.240	116.123	50.580	250.605	-115.364	292.889
20	85.511	73.373	0.000	129.341	-120.069	86.080
	Rerata					155.625

Gambar 3.2.4 adalah mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 35:65 dengan perbesaran 50x (Gambar 3.2.4a), perbesaran 100x (Gambar 3.2.4b), dan perbesaran 500x (Gambar 3.2.4c). Pada mikrograf SEM terlihat porus-porus yang tidak beraturan pada permukaan sampel. Pengukuran porus pada SEM dengan perbesaran 100x (Gambar 3.2.3b) menunjukkan jumlah porus sebanyak 20 buah. Porus-porus ini memiliki ukuran rerata 155,625 μm , porus terbesar berukuran 316,106 μm , dan porus terkecil berukuran 43,395 μm menggunakan *software Image-J* (tabel 3.2.3). Partikel HA tampak menyatu dengan BAM mengisi celah-celah di antara porus-porus. Hal ini menunjukkan antara BAM-HA bisa membentuk ikatan satu sama lain.



Gambar 3.2.5. Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 40:60; (a) perbesaran 50x, (b) perbesaran 100x, dan (c) perbesaran 500x

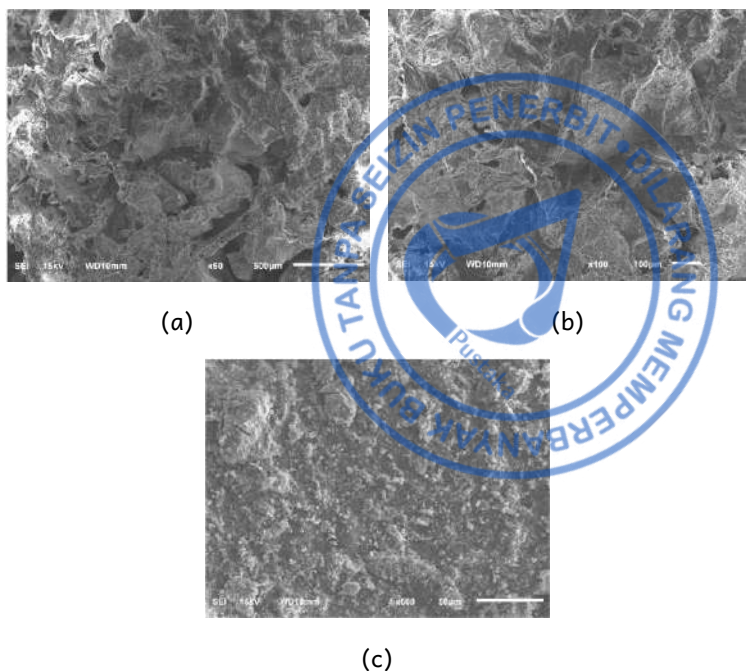
Tabel 3.2.4. Hasil Perhitungan Jumlah dan Diameter Porus pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x BAM-HA 40:60

	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	27.127	77.937	61.000	96.000	4.764	25.087
2	26.042	85.273	67.773	118.565	15.255	23.754
3	118.273	115.028	71.619	232.128	18.435	111.997
4	98.741	113.173	82.199	173.062	16.821	93.588
5	39.062	84.825	71.151	215.000	-73.610	36.917
6	22.786	96.830	74.760	141.420	23.962	20.518
7	111.762	114.389	75.850	251.657	-79.796	105.841

8	47.743	97.159	60.910	190.104	37.405	44.585
9	34.722	76.649	64.631	165.000	39.806	32.543
10	35.807	81.928	69.312	97.250	60.255	33.593
11	135.634	85.158	65.330	158.000	-67.166	128.847
12	71.615	92.640	74.526	180.921	56.310	67.604
13	53.168	80.935	65.250	162.750	-48.366	50.173
14	94.401	98.256	58.860	203.023	5.315	89.970
15	130.208	90.642	63.888	176.000	26.996	123.919
16	205.078	89.300	56.647	161.553	-11.669	195.711
17	292.969	110.857	64.754	189.326	-81.870	279.896
18	26.042	121.712	102.749	161.000	52.125	23.754
19	56.424	94.351	61.647	126.048	-120.579	53.237
20	53.168	87.981	68.000	162.000	65.556	50.346
21	31.467	111.227	74.281	187.000	140.711	29.610
22	71.615	98.582	70.307	161.444	123.690	67.604
23	86.806	120.715	84.274	192.241	42.955	82.548
24	43.403	88.466	78.223	132.000	124.509	40.451
25	44.488	95.431	65.735	185.380	26.565	41.926
26	49.913	99.851	60.652	164.308	-57.724	46.817
27	62.934	104.751	80.000	230.000	114.775	59.658
28	53.168	91.625	70.778	129.312	146.976	49.695
29	57.509	86.267	59.669	176.000	133.452	54.526
30	47.743	80.126	66.781	91.623	169.216	44.537
31	87.891	97.787	63.851	200.500	71.114	83.671
32	97.656	80.495	63.404	168.000	49.538	93.100
33	56.424	78.787	62.584	114.689	64.440	53.115
34	159.505	98.155	62.643	206.044	46.668	151.798
35	159.505	99.302	63.335	189.030	-74.055	151.669
36	52.083	93.971	72.358	122.653	30.964	48.591
37	49.913	99.397	73.497	152.691	45.000	47.140
38	52.083	123.914	79.033	202.349	59.036	48.591

39	86.806	97.965	70.344	147.000	62.784	81.994
40	30.382	121.082	75.123	209.778	48.013	28.028
	Rerata					72.424

Gambar 3.2.5 adalah mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 40:60 dengan perbesaran 50x (Gambar 3.2.5a), perbesaran 100x (Gambar 3.2.5b), dan perbesaran 500x (Gambar 3.2.5c). Pada mikrograf SEM terlihat porus-porus yang tidak beraturan dan hampir merata pada permukaan sampel. Pengamatan pada perbesaran 100x (Gambar 3.2.5b), sampel memiliki jumlah porus sebanyak 40 buah. Porus-porus ini memiliki ukuran rerata 72,424 μm , porus terbesar berukuran 279,896 μm dan porus terkecil berukuran 20,518 μm menggunakan *software Image-J*. Partikel HA tampak menyatu dengan BAM mengisi celah-celah di antara porus-porus. Hal ini menunjukkan antara BAM-HA bisa membentuk ikatan satu sama lain.



Gambar 3.2.6. Mikrograf SEM Bio-Oss *Collagen*; (a) perbesaran 50x, (b) perbesaran 100x, dan (c) perbesaran 500x

Tabel 3.2.5. Hasil Perhitungan Jumlah dan Diameter Porus pada Mikrograf SEM Perbesaran 100x Bio-Oss *Collagen*

	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	37.224	87.906	63.931	152.126	68.499	72.384
2	86.943	96.205	75.097	126.937	54.782	169.867
3	118.961	96.388	66.933	251.000	-10.620	232.555
4	83.559	99.134	73.000	165.705	-47.534	163.227
5	141.868	84.493	65.100	143.000	15.772	277.806
6	24.209	87.335	71.000	105.000	34.380	46.983

7	24.469	71.271	67.165	86.939	7.431	47.336
8	125.208	98.174	73.000	198.000	-36.870	244.898
9	34.881	87.373	67.015	135.896	-41.348	67.963
10	20.825	99.333	66.210	221.824	-75.256	40.096
	Rerata					136.312

Gambar 3.2.6 adalah mikrograf SEM Biokomposit Bio-Oss Collagen dengan perbesaran 50x (Gambar 3.2.5a), perbesaran 100x (Gambar 3.2.5b), dan perbesaran 500x (Gambar 3.2.5c). Pada mikrograf SEM terlihat permukaan sampel terlihat padat dan jarang adanya porus. Pengamatan pada perbesaran SEM 100x (Gambar 3.2.5b) menunjukkan jumlah porus sebanyak 10 buah. Porus yang ada memiliki ukuran rerata 136,312 μm , porus terbesar berukuran 277,806 μm , dan porus terkecil berukuran 40,096 μm menggunakan *software Image-J* Tabel 3.2.5.

Pada penelitian ini BAM-HA bisa membentuk ikatan satu sama lain. Semakin banyak jumlah rasio BAM, maka sampel akan lebih banyak memiliki porus-porus. BAM memiliki jumlah porositas terbanyak dengan ukuran terkecil, sedangkan semakin banyak kandungan HA pada pembuatan biokomposit BAM-HA akan menyebabkan porositas semakin besar dan jumlah porus semakin sedikit. Hal yang sama ditemukan pada gambaran mikrograf SEM Bio-Oss *Collagen* dengan ukuran porus yang besar dan jumlah porus yang sedikit.

Analisa *Scanning Electron Microscope* (SEM) adalah analisis yang digunakan untuk mempelajari struktur mikro berpori dan morfologi *scaffold* menggunakan mikroskop elektron (López Angulo & do Amaral Sobral, 2016). SEM akan menghasilkan gambaran permukaan sampel dengan memindai permukaan menggunakan pancaran elektron. Elektron berinteraksi dengan atom yang ada pada sampel untuk menghasilkan sinyal yang berisi informasi tentang sampel dari topografi permukaan, morfologi, dan komposisi bahan (Choudhary *et al.* 2017).

Analisa SEM pada penelitian ini (Gambar 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4, 3.5.2) terlihat adanya porus-porus berukuran mikro pada permukaan sampel. Pembentukan porus-porus ini dapat disebabkan dengan adanya proses *freeze drying* saat pembuatan sampel. Proses *freeze drying* akan menghilangkan cairan yang ada di sampel dengan cara sublimasi sehingga tidak menghilangkan komponen-komponen utamanya dan menghasilkan struktur mikroporus pada sampel (Shukla, 2011).

Penelitian ini menunjukkan sampel dengan kandungan rasio BAM yang semakin besar, yaitu pada BAM (kontrol negatif) dan BAM-HA rasio 40:60 akan memiliki pori-pori yang lebih banyak dengan ukuran yang lebih kecil. Pembentukan pori-pori ini dapat disebabkan karena BAM memiliki kandungan kolagen. Kolagen merupakan zat organik yang mengandung banyak cairan. Oleh karena itu, pada saat proses *freeze drying* akan meninggalkan mikroporus yang terbanyak. Hal ini sesuai dengan penelitian bahwa kolagen yang dilakukan *freeze drying* akan membuat struktur mikro berkisar 20-40 μm (Schoof *et al.*, 2001).

Ukuran porus yang irregular dan jumlah porus yang berkurang ditunjukkan dengan mikrofotografi SEM pada biokomposit BAM-HA 30:70 dan Bio-Oss *Collagen*. Kandungan HA yang semakin banyak akan membuat jumlah porus semakin sedikit dan bentuk porus semakin irregular. Hal ini akan menjadikan material tersebut menjadi lebih padat dan *brittle* (Kim *et al.*, 2005).

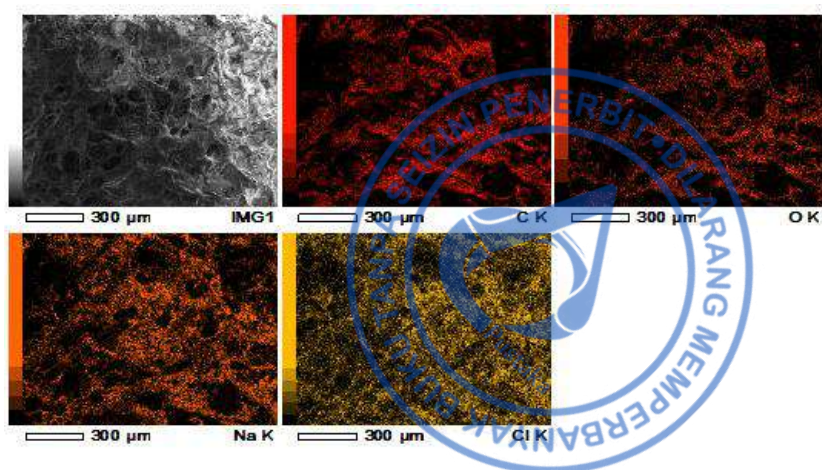
Ukuran pori merupakan faktor yang sangat penting untuk pertumbuhan sel dan difusi nutrisi, sehingga akan memfasilitasi pelekatan sel serta vaskularisasi. Pori-pori adalah parameter mendasar untuk pengangkutan oksigen dan nutrisi dari Matriks ekstraseluler ke bagian dalam *scaffold*. Ukuran pori diamati berada di kisaran 100–300 μm , ukuran pori ini ideal pada aplikasi rekayasa jaringan (Tohamy *et al.*, 2018).

Porositas *scaffold*, ukuran pori, dan struktur pori keseluruhan memiliki efek penting pada pembentukan jaringan dan infiltrasi ke dalam

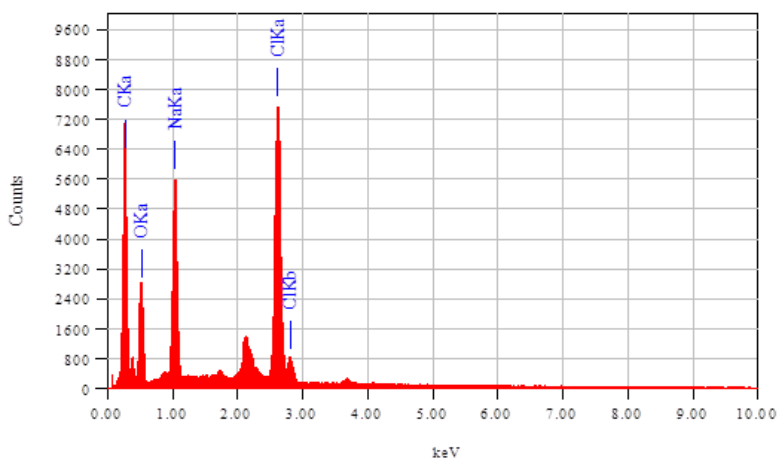
konstruksi biomaterial. Pori-pori interkoneksi memfasilitasi transportasi sel ke bahan perancah, sementara itu luas permukaan internal yang meningkat akan menyediakan tempat yang lebih luas untuk perlekatan dan penyebaran sel. Pada penelitian ini ukuran porus sampel yang sesuai untuk terjadinya osteokonduksi adalah BAM-HA 35:65 dengan ukuran porus 316,106 μm , BAM-HA 40:60 dengan ukuran porus 279,896 μm , dan Bio-Oss *Collagen* 277,806 μm . Sedangkan untuk terjadinya regenerasi jaringan lunak, ukuran porus yang dimiliki BAM-HA 30:70 sebesar 37,990 μm , BAM-HA 35:65 sebesar 43,395 μm , BAM-HA 40:60 sebesar 20,518 μm , dan Bio-Oss *Collagen* sebesar 40,096 μm . Efek ukuran pori pada regenerasi jaringan memiliki ukuran pori optimum 200–350 μm untuk osteokonduksi dan 20–125 μm untuk regenerasi jaringan. Interkonektivitas pori juga penting untuk memastikan bahwa semua sel berada dalam jarak 200 μm dari suplai darah untuk menyediakan transfer massa oksigen dan nutrisi (López Angulo & do Amaral Sobral, 2016).

C. Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS)

Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS, EDX, EDXS or XEDS), sering kali disebut *energy dispersive X-ray analysis* (EDXA) atau *energy dispersive X-ray microanalysis* (EDXMA). EDS adalah teknik analisa yang digunakan untuk menganalisis komposisi unsur, elemen, atau karakteristik kimia dari suatu material. Metode analisa ini terjadi karena adanya interaksi antara X-ray dan sampel. Setiap elemen memiliki struktur atomik yang unik, terlihat dari letak puncak spektrum tersebut (Masrukan *et al.*, 1999). Spektrum analisa mikro EDX berisi informasi semi-kualitatif dan semi-kuantitatif. EDX merupakan alat penting untuk mendeteksi nanopartikel dan karakterisasi mineral yang terakumulasi dalam jaringan (Scimeca *et al.*, 2018).

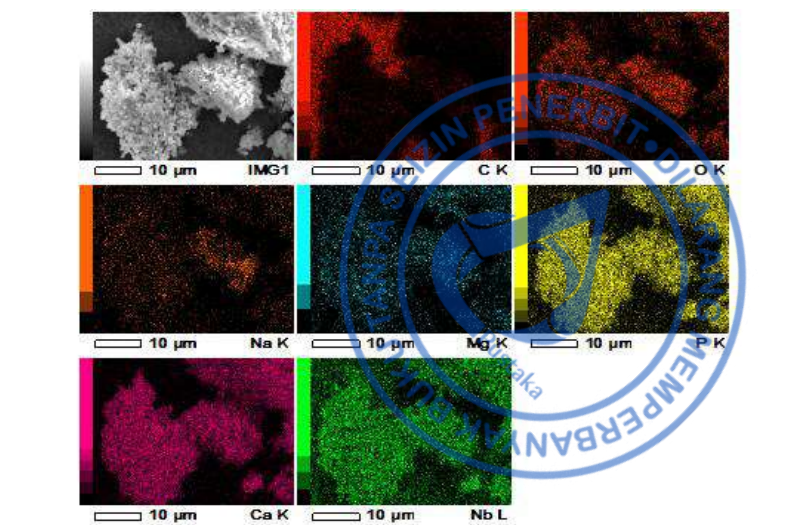


(a)

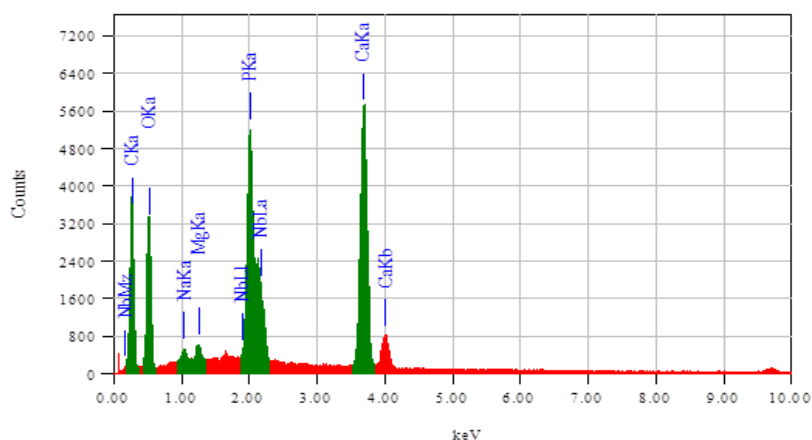


(b)

Gambar 3.3.1. Gambaran EDS Membran amnion sapi; (a) Mapping (b) Persentase Elemen

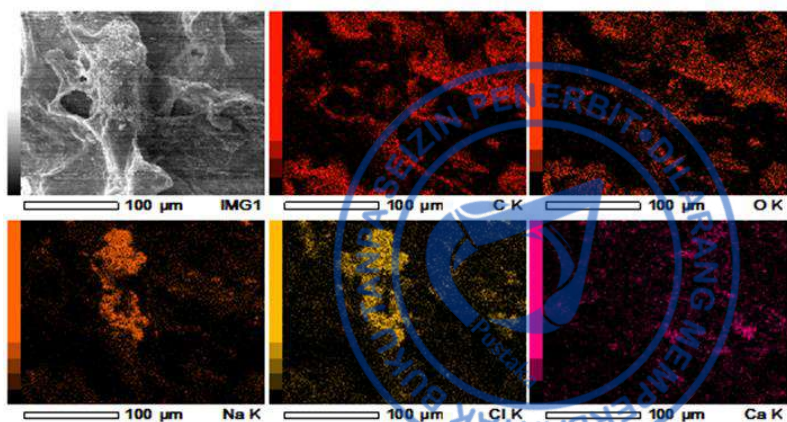


(a)

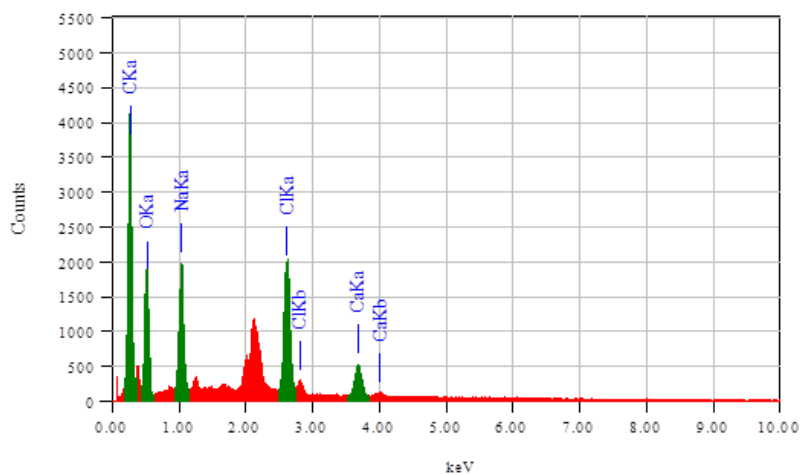


(b)

Gambar 3.3.2. Gambaran EDS Hidroksiapatit; (a) Mapping (b) Persentase Elemen

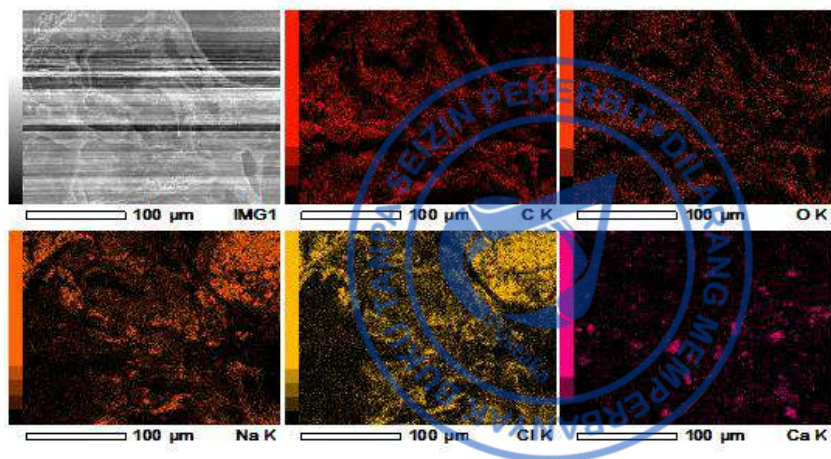


(a)

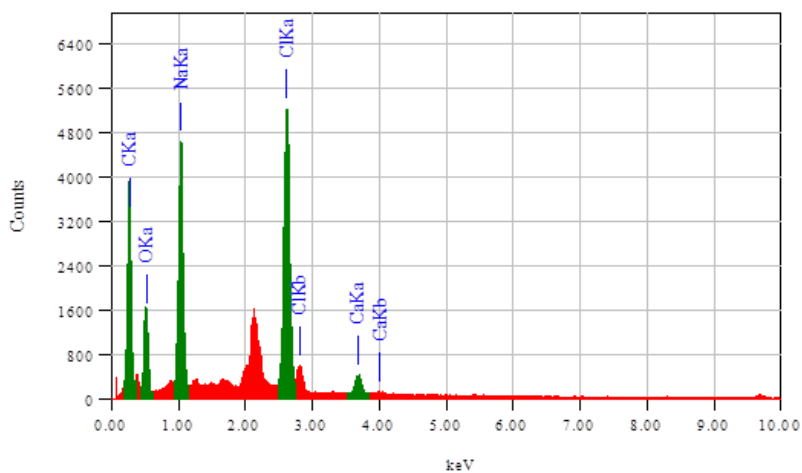


(b)

Gambar 3.3.3. Gambaran EDS Kombinasi membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 30:70; (a) Mapping (b) Persentase Elemen

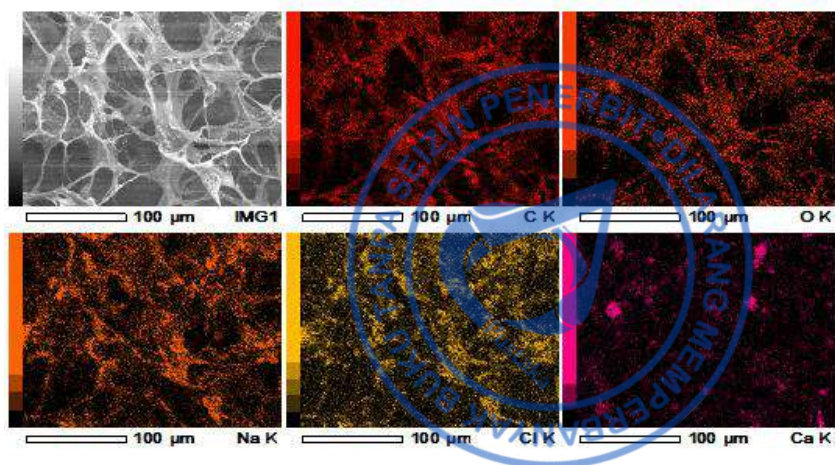


(a)

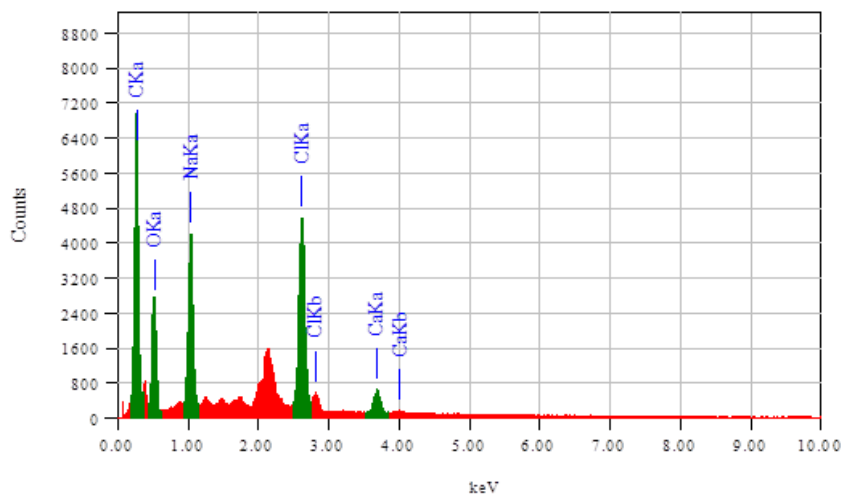


(b)

Gambar 3.3.4. Gambaran EDS Kombinasi membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 35:65; (a) Mapping (b) Persentase Elemen

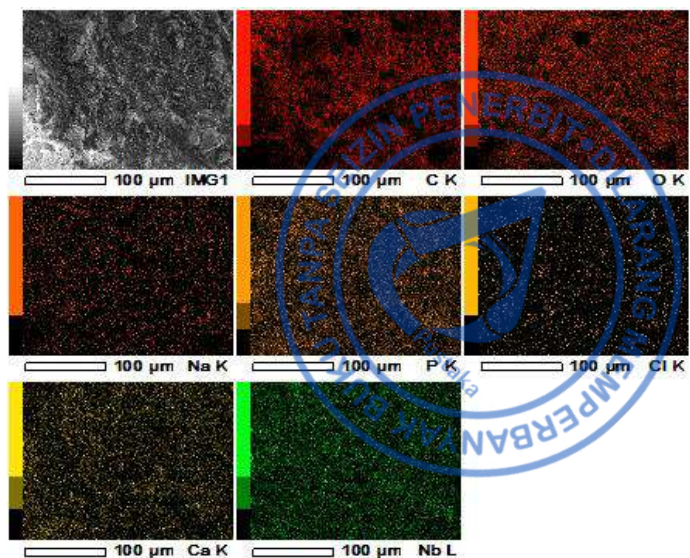


(a)

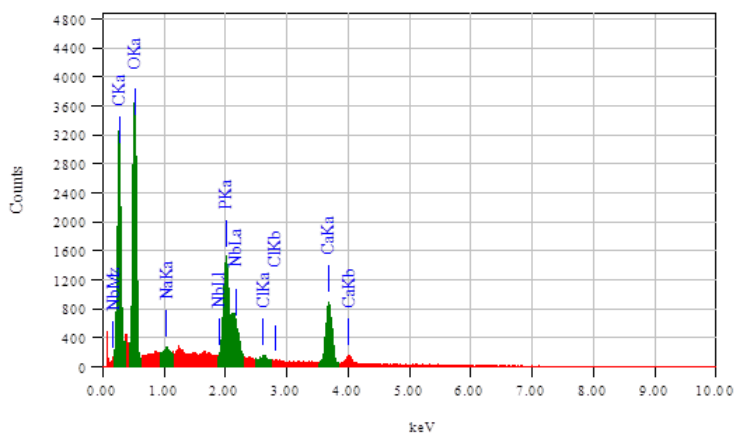


(b)

Gambar 3.3.5. Gambaran EDS Kombinasi membran amnion sapi dengan hidroksiapatit 40:60; (a) Mapping (b) Persentase Elemen



(a)



(b)

Gambar 3.3.6. Gambaran EDS BiOOss *Collagen*; (a) Mapping (b) Persentase Elemen

Hasil analisis komponen kelima sampel yang telah dilakukan pemeriksaan pemetaan unsur dengan EDS. Gambar 3.3.1 (a,b) BAM menunjukkan adanya komponen (74,70% C, 16.99% O, 3.83% Na, 4.48% Cl). Pada gambar 3.3.2, HA menunjukkan adanya unsur C (50,71%), O (34,59%), Na (0,35%), Mg (0,35%), P (4,29%), Ca (8,97%), dan Nb (0,74%). Gambar 3.3.3 (a,b) adalah grafik biokomposit BAM-HA 30:70 dengan unsur-unsur yang terkandung antara lain 60,95% C, 30,11% O, 2,25% Na, 1,92% Cl, 0,90% Mg, 0,66% P, 0,00% Si, 2,63% Ca, 0,57% Nb. Gambar 3.3.4 (a,b) adalah grafik biokomposit BAM-HA 35:65 yang memiliki unsur-unsur sebagai berikut 69,24% C, 23,24% O, 2,21% Na, 2,42% Cl, 0,40% Mg, 0,51% P, 0,06% Si, 1,58% Ca, 0,34% Nb. Gambar 3.3.5 (a,b) adalah grafik biokomposit BAM-HA 40: 60 dengan unsur-unsur yang dimilikinya sebagai berikut 69,92% C, 23,15% O, 2,34% Na, 2,30% Cl, 0,35% Mg, 0,09% P, 0,02% Si, 1,28% Ca, 0,55% Nb. Pada Gambar 3.3.6(a,b) menunjukkan elemen-elemen yang terkandung pada Bio-Oss *Collagen* antara lain (53.10% C, 42.39 % O, 0.19% Na, 1.87%P, 0.12% Cl, 2.01% Ca, 0.33% Nb).

Tabel 3.3.1. Perbandingan elemen hasil *mapping* EDS yang terkandung pada masing-masing spesimen

Elemen	Sampel				
	BAM	BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	BAM-HA 40:60	Bio-Oss Collagen
C	74,70%	60,95%	69,24%	69,92%	53.10%
O	16.99%	30,11%	23,24%	23,15%	42.39 %
Na	3.83%	2,25%	2,21%	2,34%	0.19%
Cl	4.48%	1,92%	2,42%	2,30%	0.12%
Mg	-	0,90%	0,40%	0,35%	-
P	-	0,66%	0,51%	0,09%	1.87%

Si	-	0,00%	0,06%	0,02%	-
Ca	-	2,63%	1,58%	1,28%	2.01%
Nb	-	0,57%	0,34%	0,55%	0.33%

Komponen BAM ditandai dengan adanya unsur karbon, sedangkan komponen HA ditandai dengan unsur kalsium, magnesium, dan fosfor. Uji EDS menunjukkan adanya komponen karbon, kalsium, fosfor, dan magnesium pada biokomposit BAM-HA. Semakin tinggi kandungan BAM akan semakin tinggi unsur karbon. Semakin tinggi kandungan HA, akan semakin tinggi unsur-unsur kalsium fosfor dan magnesium (tabel 3.3.1).

Mikroanalisis *Energy Dispersive X-ray* (EDS) adalah sebuah teknik untuk menganalisis unsur menggunakan mikroskop elektron berdasarkan karakteristik *X-Ray* yang akan menunjukkan unsur-unsur yang ada pada sampel (Scimeca *et al.*, 2018). Penelitian ini menggunakan analisa EDS untuk menganalisa elemen-elemen penting pada sampel biokomposit BAM-HA yang dapat berperan untuk menyusun struktur tulang.

Pembuatan material biokomposit BAM-HA dengan berbagai rasio ini ditunjukkan untuk menstimulasi pembentukan jaringan tulang baru. Untuk membentuk tulang baru, maka biokomposit BAM-HA diharapkan memiliki unsur-unsur seperti jaringan tulang. Jaringan tulang terdiri dari unsur-unsur 99% kalsium, 88% fosfor, 50% magnesium, dan 35% sodium (Kołodziejska *et al.*, 2020).

Hasil penelitian ini menunjukkan pada sampel BAM, Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60, dan Bio-Oss *Collagen* terdapat unsur-unsur karbon, oksigen, natrium, dan klorida. Unsur karbon dari tertinggi sampai terendah dimiliki secara berurutan oleh BAM, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, serta BAM-HA 30:70 dan Bio-Oss *Collagen*. Unsur-unsur karbon menunjukkan bahwa adanya kandungan kolagen pada material

tersebut. Semakin tinggi persentase unsur karbon ini makin tinggi kandungan kolagen (Antoniatic *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2014).

Analisis pemetaan EDS pada sampel Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60, dan Bio-Oss *Collagen* menunjukkan adanya unsur-unsur kalsium, fosfor, natrium, karbon, magnesium, dan oksigen. Unsur-unsur ini mengindikasikan adanya HA dalam sampel-sampel tersebut (Niakan *et al.*, 2015; Im *et al.*, 2017). Kalsium dan fosfat adalah unsur yang paling penting untuk membentuk tulang. Penelitian ini juga menunjukkan bahwa semakin tinggi atau semakin banyak kandungan HA pada rasio biokomposit maka unsur kalsium dan fosfor akan semakin banyak. Hal ini sesuai dengan gambaran pemetaan EDS bahwa Biokomposit BAM-HA 30:70 memiliki unsur kalsium dan fosfor lebih tinggi dibanding rasio lainnya (Sharma *et al.*, 2017). Bio-Oss *Collagen* memiliki unsur tertinggi dari kalsium, karena Bio-Oss *Collagen* terdiri dari 90% material pembentuk tulang. Kalsium adalah ion yang sangat penting untuk tubuh manusia. Ion-ion ini terbukti dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi dari sel osteoblas (Gheisari *et al.*, 2015).

D. Hasil Pengujian Persentase Porositas

Pertumbuhan sel dalam proses rekayasa jaringan membutuhkan *scaffold* dengan struktur berpori yang memiliki porositas untuk mendukung regenerasi tulang. Semakin besar persentase porositas *scaffold* akan menghasilkan proliferasi dan diferensiasi sel tulang lebih cepat. Persentase porositas yang ideal untuk regenerasi tulang adalah 80-90%. (Tohamy *et al.*, 2018; Milla *et al.*, 2018; Utomo *et al.*, 2019). Uji porositas pada *scaffold* dilakukan dengan menggunakan metode *liquid displacement*, cairan yang digunakan adalah etanol. Uji ini dilakukan untuk mengetahui persentase pori yang terkandung di dalam *scaffold* (Milla *et al.*, 2018). Porositas dinyatakan dengan perbandingan massa sampel

kering dengan massa sampel basah, persentase porositas dihitung menggunakan rumus berikut :

$$\text{Persentase Porositas (\%)} = \frac{(W1 - W0)}{(\rho \times V0)} \times 100\%.$$

W0, merupakan berat sampel awal, W1 merupakan berat akhir sampel setelah perendaman, V0 merupakan volume sampel, dan ρ merupakan massa jenis etanol.

Tabel 3.4.1 Hasil pengujian persentase porositas BAM

	Sampel	p (cm)	l (cm)	t (cm)	W0 (g)	W1 (g)	ρ (g/cm3)	% Porosit y
BAM	A1	0,856	0,54	0,344	0,012	0,143	0,789	104,41
	A2	0,764	0,51	0,316	0,009	0,104	0,789	97,79
	A3	0,88	0,556	0,354	0,012	0,147	0,789	98,78
	A4	0,758	0,624	0,354	0,011	0,145	0,789	101,43
	A5	0,81	0,54	0,32	0,005	0,125	0,789	108,66
	A6	0,754	0,539	0,352	0,009	0,128	0,789	105,43
	A7	0,79	0,622	0,312	0,007	0,128	0,789	100,03
	A8	0,761	0,482	0,353	0,008	0,119	0,789	108,65
	A9	0,85	0,622	0,33	0,011	0,155	0,789	104,61
	A10	0,756	0,62	0,312	0,009	0,127	0,789	102,26

Tabel 3.4.2. Hasil pengujian persentase porositas BAM-HA 30:70

	Sampel	p (cm)	l (cm)	t (cm)	W0 (g)	W1 (g)	ρ (g/cm3)	% Porosity
BAM-HA 30:70	B1	0,647	0,583	0,39	0,028	0,118	0,789	77,54
	B2	0,726	0,597	0,432	0,034	0,15	0,789	78,52
	B3	0,742	0,532	0,416	0,032	0,137	0,789	81,04
	B4	0,716	0,443	0,444	0,031	0,113	0,789	73,79

	B5	0,72	0,488	0,472	0,033	0,127	0,789	71,83
	B6	0,74	0,522	0,486	0,038	0,139	0,789	68,18
	B7	0,818	0,536	0,428	0,041	0,144	0,789	69,56
	B8	0,744	0,542	0,444	0,032	0,143	0,789	78,57
	B9	0,664	0,568	0,404	0,029	0,127	0,789	81,51
	B10	0,678	0,48	0,432	0,037	0,135	0,789	88,34

Tabel 3.4.3. Hasil pengujian persentase porositas BAM-HA 35:65

	Sampel	p (cm)	l (cm)	t (cm)	W0 (g)	W1 (g)	ρ (g/cm ³)	% Porosity
BAM-HA 35:65	C1	0,694	0,534	0,278	0,017	0,088	0,789	87,34
	C2	0,662	0,525	0,254	0,017	0,084	0,789	96,19
	C3	0,676	0,5	0,302	0,015	0,085	0,789	86,91
	C4	0,706	0,47	0,252	0,016	0,082	0,789	100,03
	C5	0,62	0,476	0,24	0,013	0,065	0,789	93,05
	C6	0,734	0,534	0,288	0,022	0,101	0,789	88,69
	C7	0,798	0,478	0,338	0,022	0,104	0,789	80,61
	C8	0,818	0,478	0,278	0,018	0,087	0,789	80,45
	C9	0,982	0,421	0,29	0,02	0,096	0,789	80,34
	C10	0,786	0,412	0,238	0,012	0,072	0,789	98,66

Tabel 3.4.4. Hasil pengujian persentase porositas BAM-HA 40:60

	Sampel	p (cm)	l (cm)	t (cm)	W0 (g)	W1 (g)	ρ (g/cm ³)	% Porosity
BAM-HA 40:60	D1	0,725	0,6	0,283	0,026	0,125	0,789	101,92
	D2	0,742	0,55	0,244	0,02	0,105	0,789	108,18
	D3	0,79	0,62	0,238	0,024	0,125	0,789	109,81
	D4	0,89	0,624	0,304	0,028	0,159	0,789	98,34
	D5	0,786	0,61	0,248	0,023	0,111	0,789	93,79
	D6	0,812	0,624	0,246	0,025	0,137	0,789	113,88

	Sampel	p (cm)	l (cm)	t (cm)	W0 (g)	W1 (g)	ρ (g/cm ³)	% Porosity
	D7	0,942	0,608	0,274	0,027	0,139	0,789	90,45
	D8	0,914	0,56	0,296	0,026	0,135	0,789	91,18
	D9	0,928	0,558	0,22	0,022	0,127	0,789	116,81
	D10	0,962	0,602	0,243	0,031	0,151	0,789	108,07

Tabel 3.4.5. Hasil pengujian persentase porositas *Bio-Oss Collagen*

	Sampel	p (cm)	l (cm)	t (cm)	W0 (g)	W1 (g)	ρ (g/cm ³)	% Porosity
Bio-Oss	E1	0,803	0,53	0,55	0,159	0,284	0,789	67,68
	E2	0,802	0,52	0,54	0,158	0,283	0,788	67,67
	E3	0,804	0,54	0,56	0,160	0,285	0,790	67,69
	E4	0,804	0,54	0,56	0,160	0,285	0,790	67,69
	E5	0,802	0,52	0,54	0,158	0,283	0,788	67,67
	E6	0,803	0,53	0,55	0,159	0,284	0,789	67,68
	E7	0,803	0,53	0,55	0,159	0,284	0,789	67,68
	E8	0,802	0,52	0,54	0,158	0,283	0,788	67,67
	E9	0,804	0,54	0,56	0,160	0,285	0,790	67,69
	E10	0,803	0,53	0,55	0,159	0,284	0,789	67,68

Porositas merupakan indikasi persentase void atau ruang kosong dari struktur berpori yang akan memengaruhi pertumbuhan sel. Persentase porositas berhubungan dengan jumlah pori yang dimiliki oleh suatu biomaterial. Persentase porositas adalah karakteristik penting yang wajib dimiliki suatu biomaterial untuk rekayasa jaringan. Analisa ini berhubungan dengan kemampuan suatu material untuk sebagai *scaffold* yang berperan dalam regenerasi jaringan baik jaringan lunak maupun jaringan keras (Lutzweiler *et al.*, 2020).

Rerata persentase porositas yang dimiliki BAM-HA 30:70 (76,89% $\pm$ 6,15%). Persentase porositas 70%, tidak dapat mendukung pertumbuhan

dan pelekatan sel di tahap awal sehingga proliferasi sel menjadi terhambat. Proliferasi sel yang terhambat menyebabkan penyembuhan jaringan menjadi terhambat (Danilevicius *et al.*, 2015).

Rerata persentase porositas dimiliki tertinggi oleh sampel BAM (105,93 % $\pm$ 3,81 %), dan biokomposit BAM-HA 40:60 (103,25% $\pm$ 9,50%). Analisa statistik menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok ($p < 0.05$). Persentase porositas yang lebih tinggi akan meningkatkan penyerapan nutrisi dan permeabilitas hidrolik, akan tetapi kekakuannya semakin rendah yang akan menyebabkan hilangnya sifat mekanik dan menjadi mudah terdegradasi (Zhang *et al.*, 2013). Biomaterial dengan persentase porositas besar menyebabkan luas permukaan menjadi lebih kecil sehingga sel yang menempel menjadi lebih sedikit dan akan menghambat proliferasi sel (Torres-Sanchez *et al.*, 2017).

Persentase porositas yang memenuhi kriteria untuk penyembuhan tulang adalah berkisar 80-90%. Rerata persentase porositas sesuai dengan kriteria tersebut pada penelitian ini dimiliki oleh biokomposit BAM-HA adalah dengan rasio 35:65 sebesar (89,23% $\pm$ 7,51%). Persentase porositas ini akan menyebabkan biomaterial memiliki luas permukaan yang lebih besar, yang lebih menguntungkan untuk pelekatan sel awal (Milla *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021).

Uji persentase porositas dilakukan pada kelima sampel BAM, BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, dan Bio-Oss Collagen (Tabel 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5). Uji ini untuk dilakukan untuk mengetahui persentase porositas yang ada pada sampel. Pengujian ini menggunakan metode *liquid displacement*. Nilai rerata dan standart deviasi hasil uji persentase porositas dapat terlihat pada Tabel 3.4.6.

Tabel 3.4.6. Hasil pengujian persentase porositas

No	Kelompok	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Normalitas	Homogenitas	Sig Anova
1	BAM	105,93 $\pm$ 3,81	0,608*	0,000**	0,000***
2	BAM-HA 30:70	76,89 $\pm$ 6,15	0,812*		
3	BAM-HA 35:65	89,23 $\pm$ 7,51	0,242*		
4	BAM-HA 40:60	103,25 $\pm$ 9,50	0,444*		
5	Bio-Oss Collagen	67,68 $\pm$ 1,64	0,389*		

Ket : * $p > 0,05$ = data normal

** $p < 0,05$ = varian data tidak homogen

*** $p < 0,05$ = ada perbedaan bermakna

Penelitian ini menunjukkan rerata persentase porositas kelompok BAM (105,93 $\pm$ 3,81), BAM-HA 30:70 (76,89 $\pm$ 6,15), BAM-HA 35:65 (89,23 $\pm$ 7,51), BAM-HA 40:60 (103,25 $\pm$ 9,50), dan Bio-Oss *Collagen* (67,68 $\pm$ 1,64). Persentase porositas tertinggi dimiliki kelompok BAM dan biokomposit BAM-HA 40:60. Sedangkan, persentase porositas terendah dimiliki Bio-Oss *Collagen* dan biokomposit BAM-HA 30:70.

Uji statistika diawali dengan uji normalitas yang menunjukkan keseluruhan data normal. Setelah itu dilakukan uji homogenitas yang menunjukkan varian data tidak homogen dan menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok (sig ANOVA $p < 0,05$) (Tabel 3.4.6).

Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan ANOVA satu jalan *post hoc games howel* ditemukan tidak adanya perbedaan bermakna antara kelompok BAM dan BAM-HA 40:60. Sedangkan, antara kelompok BAM dengan BAM-HA 30:70 dan BAM-HA ditemukan perbedaan bermakna. Antar kelompok BAM-HA dengan ketiga rasio yang berbeda ditemukan perbedaan bermakna (Tabel 3.4.7).

Tabel 3.4.7. Analisa statistik persentase porositas ANOVA satu jalan *post hoc Games Howel*

Kelompok	BAM	BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	BAM-HA 40:60	Bio-Oss Colagen
BAM		0.000*	0.001*	1.000	0.000*
BAM-HA 30:70			0.004*	0.000*	0.021*
BAM-HA 35:65				0.009*	0.000*
BAM-HA 40:60					0.000*
Bio-Oss Colagen					

Ket : * $p < 0.05$ ada perbedaan bermakna

E. Hasil Pengujian Persentase *Swelling*

Salah satu ciri khas yang harus dimiliki biomaterial untuk regenerasi tulang adalah kemampuannya dalam menyerap cairan atau eksudat luka. Uji *swelling* merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui kapasitas bahan dalam menyerap cairan hingga terjadi kesetimbangan. Derajat pembengkakan hanya memengaruhi ikatan antarmolekul dan tidak

menyebabkan putusannya ikatan kimia dalam rantai polimer. Uji *swelling* dapat diukur dengan menimbang berat kering sampel awal dan berat basah sampel akhir, kemudian dinyatakan dalam persen (%) (López Angulo & do Amaral Sobral, 2016).

Biomaterial dalam bentuk *biomaterial* yang baik adalah yang dapat menjaga lingkungan luka tetap lembab dan mengabsorb eksudat dengan menyimpan cairan luka di dalam *biomaterial* untuk mencegah terjadinya maserasi. Maserasi adalah mekanisme pelunakan jaringan oleh kondisi basah yang berkepanjangan sehingga sel akan melemah dan epidermis menjadi mudah terkikis (Pramesti, 2014; Zhong, 2018). Kemampuan retensi air dari *biomaterial* terlihat dari kemampuan untuk menyerap cairan tubuh, mengubah nutrisi sel dan metabolit, serta menjaga lingkungan yang lembab untuk meningkatkan penyembuhan luka (Pei, 2015). Kemampuan *swelling* suatu biomaterial memegang peranan penting dalam proses penyembuhan jaringan, yakni transfer nutrisi dan cairan tubuh akan maksimal jika suatu biomaterial memiliki kemampuan *swelling* yang baik (Maji *et al.*, 2016).

Pengukuran kapasitas penyerapan air dengan cara melakukan penimbangan awal dan akhir setelah diberikan cairan. Bobot awal ditimbang sebelum (W_0) direndam ke dalam air deionisasi pada suhu kamar selama 1 jam. Setelah 1 jam dikeluarkan dari perendaman air, air yang berlebih pada permukaan material dihilangkan dengan hati-hati menggunakan kertas saring. Penimbangan dilakukan kembali dan dihasilkan Bobot (W_1). Rasio penyerapan air (ϵ_2) dihitung sebagai berikut:

$$\epsilon_2 = \frac{(W_1 - W_0)}{W_0} \times 100\% \text{ (Long *et al.*, 2017).}$$

Uji *Swelling* dilakukan untuk mengetahui kemampuan material untuk menyerap cairan. Pada penelitian ini kelima sampel yaitu BAM, Biokomposit BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen* dilakukan uji analisa kemampuan *swelling*.

Tabel 3.5.1. Hasil uji swelling BAM

SAMPEL	1	2	3	4	5	6	7	9	9	10
BERAT AWAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
BERAT AKHIR	1246,4	1192,1	1352	1232	1269,9	1213,4	1225,5	1078,8	1134,9	1325
PERHITUNGAN	1146,4	1092,1	1252	1132	1169,9	1113,4	1125,5	978,8	1034,9	1225
	1146,4	1092,1	1252	1132	1169,9	1113,4	1125,5	978,8	1034,9	1225

Tabel 3.5.2. Hasil uji swelling BAM 30:70

SAMPEL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BERAT AWAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
BERAT AKHIR	419,5	411,2	420,7	425,4	435,8	421,5	411,2	434,6	413,8	411,6
PERHITUNGAN	319,5	311,2	320,7	325,4	335,8	321,5	311,2	334,6	313,8	311,6
	319,5	311,2	320,7	325,4	335,8	321,5	311,2	334,6	313,8	311,6

Tabel 3.5.3. Hasil uji swelling BAM 35:65

SAMPEL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BERAT AWAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
BERAT AKHIR	601,5	607,6	623	605,7	622,2	639,5	620,9	603,3	576,2	646,8
PERHITUNGAN	501,5	507,6	523	505,7	522,2	539,5	520,9	503,3	476,2	546,8
	501,5	507,6	523	505,7	522,2	539,5	520,9	503,3	476,2	546,8

Tabel 3.5.4. Hasil uji swelling BAM 40:60

SAMPEL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BERAT AWAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
BERAT AKHIR	745,4	759,1	713,3	673,9	696,8	684,4	711,5	688	670,7	744,6
PERHITUNGAN	645,4	659,1	613,3	573,9	596,8	584,4	611,5	588	570,7	644,6
	645,4	659,1	613,3	573,9	596,8	584,4	611,5	588	570,7	644,6

Tabel 3.5.5. Hasil uji swelling Bio-Oss *Collagen*

SAMPEL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BERAT AWAL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
BERAT AKHIR	237,3	237,2	237,1	237,3	237,2	237,3	237,1	237,3	237,2	237,1
PERHITUNGAN	137,3	137,2	137,1	137,3	137,2	137,3	137,1	137,3	137,2	137,1
	137,3	137,2	137,1	137,3	137,2	137,3	137,1	137,3	137,2	137,1

Hasil keseluruhan sampel pengujian swelling dapat dilihat pada tabel (3.5.1, 3.5.2, 3.5.3, 3.5.4, 3.5.5) Nilai rerata pengujian dapat terlihat pada Tabel 3.4.1, yang menunjukkan persentase *swelling* kelompok BAM ($1127 \pm 81,18$), BAM-HA 30:70 ($320,53 \pm 9,16$), BAM-HA 35:65 ($514,67 \pm 20,35$), BAM-HA 40:60 ($608,77 \pm 31,66$), dan Bio-Oss *Collagen* ($137,3 \pm 1,30$). Setelah sampel diuji kemudian dianalisa secara statistika.

Tabel 3.5.6. Hasil pengujian persentase *swelling*

No	Kelompok	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Normalitas	Homogenitas	Sig Anova
1	BAM	1127,00 $\pm$ 81,18	0,918*	0,000**	0,000***
2	BAM-HA 30:70	320,53 $\pm$ 9,16	0,124*		
3	BAM-HA 35:65	514,67 $\pm$ 20,35	0,776*		
4	BAM-HA 40:60	608,77 $\pm$ 31,66	0,320*		
5	Bio-Oss Collagen	137,30 $\pm$ 1,30	0,537*		

Ket : * $p > 0,05$ = data normal

** $p < 0,05$ = varian data tidak homogen

*** $p < 0,05$ = ada perbedaan bermakna

Uji statistika diawali dengan uji normalitas yang menunjukkan keseluruhan data normal ($p > 0,05$). Setelah itu dilakukan uji homogenitas yang menunjukkan varian data tidak homogen ($p < 0,05$) dan menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok (sig ANOVA $p < 0,05$) (Tabel 3.5.6). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan ANOVA satu jalan *post hoc games howel*. Tabel 3.5.7 menunjukkan adanya perbedaan bermakna di setiap kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Penelitian ini menunjukkan semakin banyak kandungan BAM semakin tinggi persentase *swelling* dari material tersebut.

Tabel 3.5.7. Analisa statistika persentase *swelling* ANOVA satu jalan *post hoc games howel*

Kelompok	BAM	BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	BAM-HA 40:60	Bio-Oss Collagen
BAM		0.000*	0.000*	0.000*	0.000*
BAM-HA 30:70			0.000*	0.000*	0.000*
BAM-HA 35:65				0.000*	0.000*
BAM-HA 40:60					0.000*
Bio-Oss Collagen					

Ket : * $p < 0.05$ ada perbedaan bermakna

Kemampuan *swelling* merupakan salah satu sifat penting dari suatu biomaterial yang memiliki peranan untuk regenerasi jaringan tulang. Sifat ini berhubungan dengan ukuran pori dan volume biomaterial. Kemampuan *swelling* biomaterial memiliki peran dalam absorpsi cairan tubuh, transfer nutrisi serta metabolit (Peter *et al.*, 2010).

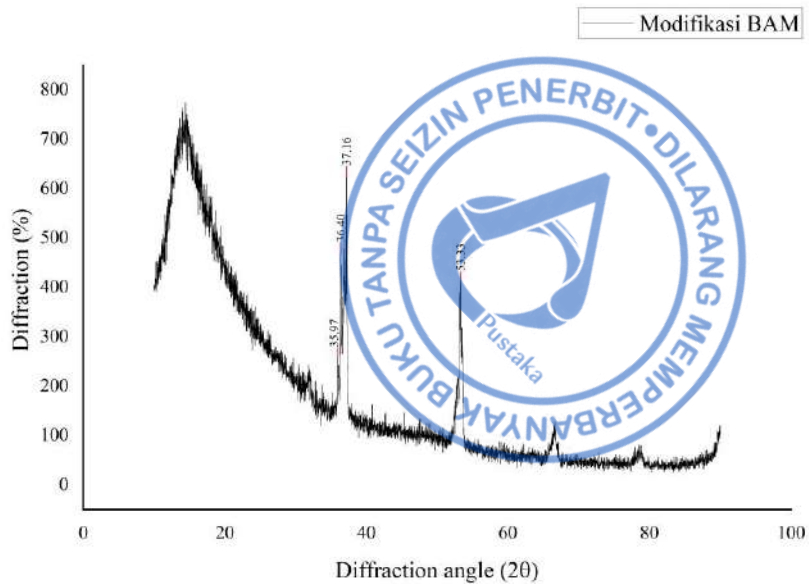
Kelima sampel pada penelitian ini antara lain BAM, BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, dan Bio-Oss *Collagen* dilakukan perendaman pada larutan PBS selama 1x24 jam. Hasil uji *swelling* didapatkan rerata rasio *swelling* BAM (1127%), BAM-HA 30:70 (320,53%), BAM-HA 35:65 (514,67%), BAM-HA 40:60 (608,77%), dan Bio-Oss *Collagen* (137,3%). Penelitian ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna di setiap kelompok ($p < 0,05$). Hal ini dapat disebabkan semakin besar jumlah BAM makin besar kemampuan *swelling* dari material tersebut (O'Brien *et al.*, 2005). Senada dengan penelitian Lim *et al.* (2020), semakin tingginya berat molekul yang dimiliki material tersebut akan semakin tinggi kemampuan *swelling* yang dimilikinya. Hal ini disebabkan karena BAM mengandung polimer berupa kolagen (Gunasekaran *et al.*, 2020). Kolagen memiliki berat molekul yang lebih tinggi dibandingkan hidroksiapatit. Penelitian Haaparanta *et al.* (2014) menunjukkan bahwa kolagen merupakan salah satu polimer memiliki kemampuan penyerapan air yang tinggi. Jumlah kolagen yang tinggi akan meningkatkan sifat penyerapan air dari biomaterial. Sedangkan, penambahan hidroksiapatit dalam biokomposit akan menurunkan kemampuan *swelling*, karena hidroksiapatit akan membentuk ikatan silang antara rantai polimer yang menyebabkan menurunnya hidrofilik polimer (Lee & Yun, 2014)

Menurut penelitian Iviglia *et al.* (2016), biomaterial yang digunakan untuk regenerasi tulang sebaiknya memiliki kemampuan *swelling* minimal 300%. Semakin tinggi kemampuan *swelling*, maka semakin mudah material tersebut menyerap nutrisi dan sebagai perlekatan sel diawal penyembuhan. Berdasarkan studi tersebut didapatkan bahwa seluruh rasio biokomposit BAM-HA dengan 30:70, 35:65, dan 40:60 memiliki

kemampuan *swelling* sesuai yang dibutuhkan dalam regenerasi jaringan tulang.

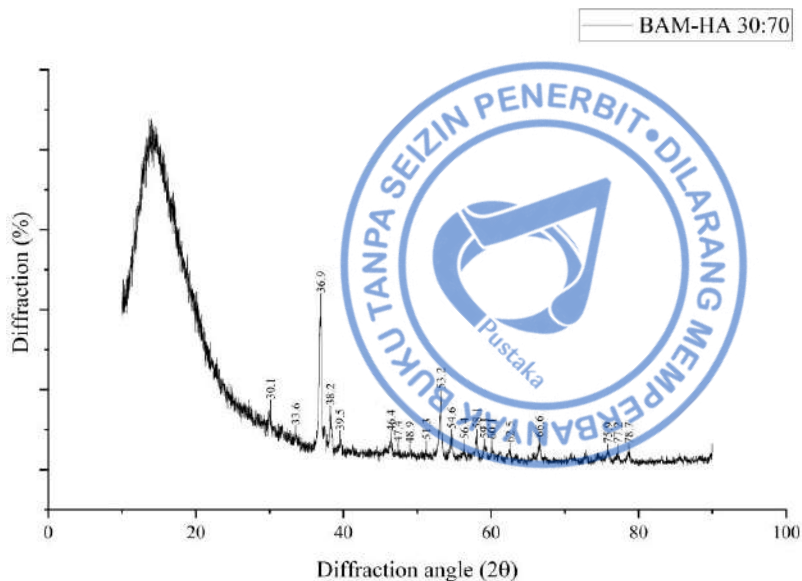
Hasil XRD

XRD merupakan teknik untuk mempelajari struktur kristal suatu bahan dengan menggunakan pancaran sinar-X. Sinar X-ray dihasilkan oleh *chatode ray tube* yang akan di filter untuk menghasilkan radiasi monokromatik, kemudian dikonsentrasikan dan diarahkan pada sampel. Interaksi sinar x dengan sampel kristalin membentuk interferensi yang memenuhi hukum Bragg menghasilkan interferensi konstruktif yang akan di deteksi dan diproses. Konversi puncak difraksi ke *d-spacing* ini dapat mengidentifikasi suatu benda dengan membandingkan *d-spacing* yang unik dari suatu senyawa dengan pola referensi.²⁷ XRD juga dapat digunakan untuk mengidentifikasi struktur, ukuran kristal, unsur, parameter kisi, dan derajat kristalisasi melalui puncak difraksi yang muncul.⁶³ Maka dari itu, XRD merupakan teknik yang dapat menganalisa fase kristalin dari berbagai macam material seperti HA.²⁷ Derajat kristalinitas dari HA akan memengaruhi degradasinya dalam tubuh pasien serta penyerapan material lain. HA dengan derajat kristalinitas yang tinggi ($X_c=30-70\%$) lebih sulit diserap oleh tubuh. HA dengan derajat kristalinitas tinggi digunakan saat absorpsi dari bahan ini tidak diinginkan.⁶⁴ HA dengan derajat kristalinitas rendah ($X_c=0-30\%$) yang menyerupai tulang manusia lebih mudah diserap oleh tubuh dibandingkan dengan HA dengan kristalinitas yang tinggi. Maka dari itu, untuk kebutuhan preservasi soket dibutuhkan HA dengan derajat kristalinitas rendah.^{64,65}



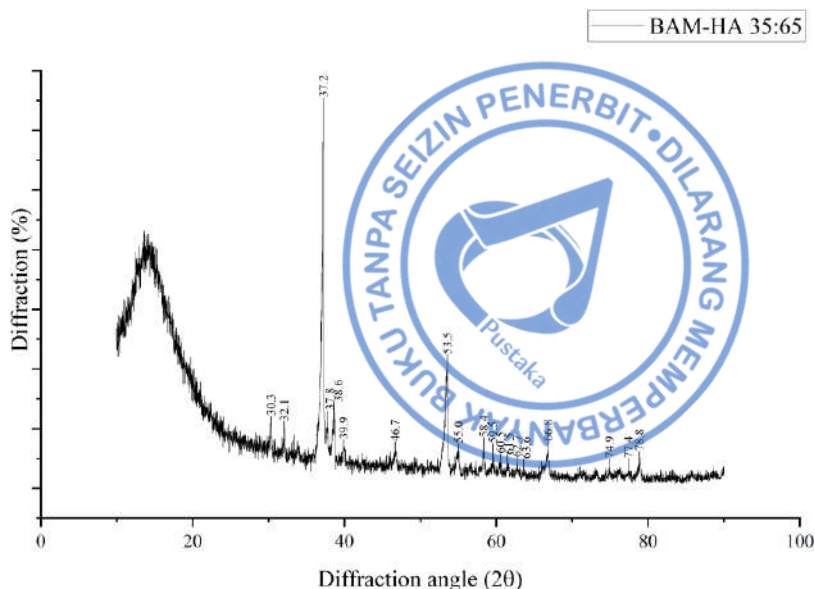
Gambar 3.5.1. Grafik hasil analisa XRD dari modifikasi BAM

Pada hasil analisa XRD modifikasi BAM terlihat pada Gambar 3.5.1 hasil grafik XRD ini terdapat puncak tajam namun tidak menunjukkan adanya kristal HA.



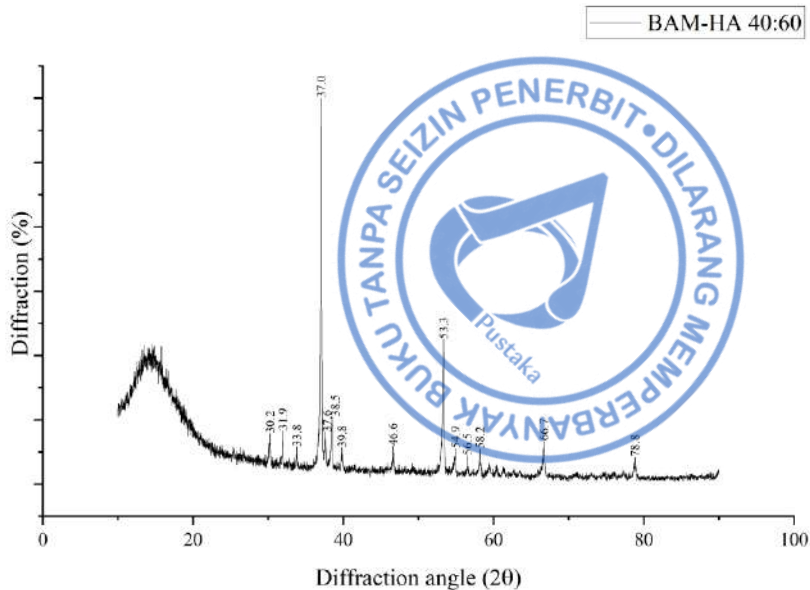
Gambar 3.5.2. Grafik hasil analisa XRD dari BAM-HA 30:70

Gambar 3.5.2 menunjukkan hasil analisa XRD BAM-HA 30:70. Pada hasil analisa ini terlihat puncak tajam pada $30,1^\circ$; $33,6^\circ$; $36,9^\circ$; $38,2^\circ$; $39,5^\circ$; $46,4^\circ$; $53,2^\circ$; $54,6^\circ$; $56,4^\circ$; dan $58,1^\circ$; $59,1^\circ$; $60,1^\circ$; $62,5^\circ$; $66,6^\circ$; $75,9^\circ$; $77,2^\circ$; dan $78,7^\circ$ 2θ yang menunjukkan adanya kristal HA. Puncak difraksi tertinggi HA ditemukan pada $36,9^\circ$ 2θ . Hasil analisis XRD BAM-HA 30:70 menunjukkan kecocokan dengan pola referensi HA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$). Pada perhitungan *Scherrer*, sampel ini memiliki ukuran kristal HA sebesar 1040 nm. Derajat kristalinitas HA pada sampel ini adalah 19% yang merupakan kristal HA dengan derajat kristalinitas rendah.



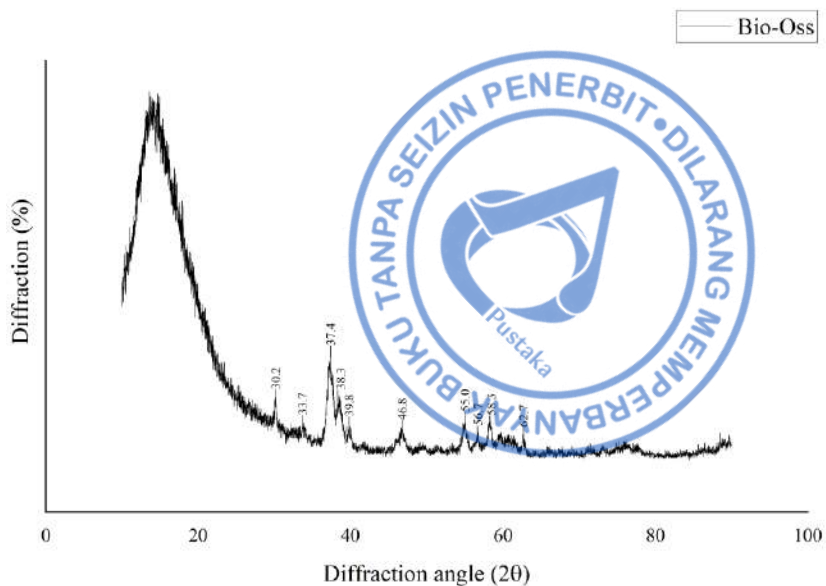
Gambar 3.5.3. Grafik hasil analisa XRD dari BAM-HA 35:65

Pada hasil analisa BAM-HA 35:65 Gambar 3.5.3, terlihat puncak tajam pada $30,3^\circ$; $32,1^\circ$; $37,2^\circ$; $37,8^\circ$; $38,6^\circ$; $39,9^\circ$; $46,7^\circ$; $53,5^\circ$; 55° ; $58,4^\circ$; dan $59,5^\circ$; $60,5^\circ$; $61,5^\circ$; $62,7^\circ$; $63,6^\circ$; $66,8^\circ$; $74,9^\circ$; $77,4^\circ$; dan $78,8^\circ$ 2θ yang menunjukkan adanya kristal HA. Puncak difraksi HA tertinggi pada $37,2^\circ$ 2θ . Hasil analisis XRD BAM-HA 35:65 menunjukkan kecocokan dengan pola referensi HA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$). Pada perhitungan *Scherrer*, ukuran kristal HA sebesar 868 nm. Derajat kristalinitas HA adalah 28% yang merupakan kristal HA dengan derajat kristalinitas rendah.



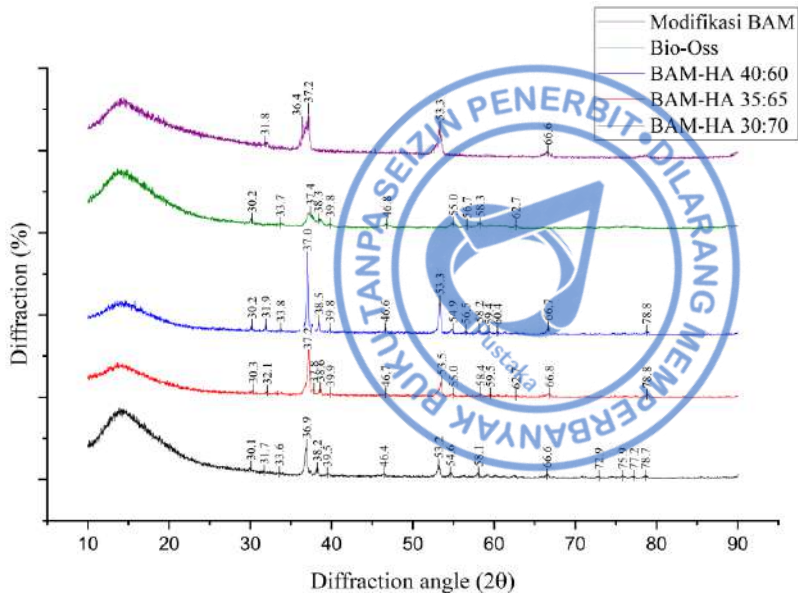
Gambar 3.5.4. Grafik hasil analisa XRD dari BAM-HA 40:60

Gambar 3.5.4 merupakan grafik hasil analisa XRD BAM-HA 40:60. Pada grafik ini menunjukkan puncak tajam pada 30,2°; 31,9°; 33,8°; 37 °; 37,6°; 38,5°; 39,8°; 46,6°; 53,3°; 54,9°; 56,5°; dan 58,1°; 66,7°; 78,8° 2θ yang menunjukkan adanya kristal HA. Puncak difraksi tertinggi HA pada 37° 2θ. Hasil analisis XRD menunjukkan kecocokan dengan pola referensi HA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$). Pada perhitungan *Scherrer*, ukuran kristal HA sebesar 867 nm. Derajat kristalinitas HA pada sampel ini adalah 34% yang merupakan kristal HA dengan derajat kristalinitas sedang.



Gambar 3.5.5. Grafik hasil analisa XRD dari Bio-Oss *Collagen*

Pada hasil analisa XRD Bio-Oss *Collagen* Gambar 3.5.5, terdapat puncak tajam pada 30,2°; 33,7°; 37,4°; 38,3°; 39,8°; 46,8°; 55°; 56,7°; 58,3°; dan 62,7° 2θ yang menunjukkan adanya kristal HA. Puncak difraksi tertinggi HA pada 37,4° 2θ. Hasil analisis XRD menunjukkan kecocokan dengan pola referensi HA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$). Perhitungan *Scherrer*, ukuran kristal HA adalah 19.5 nm. Derajat kristalinitas HA adalah 20% yang merupakan kristal HA dengan derajat kristalinitas rendah.



Gambar 3.5.6. Grafik hasil analisa XRD modifikasi BAM, Bio-Oss, BAM-HA 30:70, 35:65, dan 40:60

Gambar 3.5.6 adalah grafik XRD hasil analisa Bio-Oss, modifikasi BAM, BAM-HA 30:70, 35:65, dan 40:60. Sampel biokomposit BAM-HA dan Bio-Oss *Collagen* memiliki puncak yang menandakan adanya kristal HA. Keempat sampel memiliki kristal HA dengan rumus kimia $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Sampel modifikasi BAM tidak menunjukkan puncak yang menandakan adanya HA.

Kristal yang dihasilkan oleh Bio-Oss merupakan kristal HA dengan ukuran nano, sedangkan kristal HA pada biokomposit BAM-HA memiliki ukuran mikro HA. Kristal HA Bio-Oss *Collagen* memiliki derajat kristalinitas yang rendah. Kristal HA Biokomposit BAM-HA 30:70 dan 35:65 memiliki

derajat kristalinitas yang rendah. Kristal HA Biokomposit BAM-HA 40:60 memiliki derajat kristalinitas yang sedang.

Pada hasil XRD BAM-HA 30:70, 35:65, 40:60, dan Bio-Oss *Collagen* ditemukan puncak difraksi yang tajam dari sinar-x yang menunjukkan adanya kristal HA. Keempat sampel menunjukkan kristal HA dengan rumus kimia $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ yang sesuai dengan referensi dari *The International Centre for Diffraction Data (ICDD®) Powder Diffraction File™ (PDF®)* (No. 01-073-0294) dengan puncak difraksi HA terlihat pada 12,6°; 19,8°; 21,8°; 25,3°; 26,5°; 29,5°; 30,1°; 32,8°; 33,7°; 37°; 37,5°; 38,4°; 39,8°; 41,5°; 44,6°; 45,8°; 46,5°; 47,3°; 49,1°; 49,6°; 51,4°; 52°; 53,2°; 53,3°; 54,8°; 56,4°; 57°; 58,1°; 59,3°; 60,3°; 61,3°; 62,6°; 64,1°; 65,9°; 66,5°; 67,4°; 68,4°; 68,7°; 68,8°; 69,7°; 70,8°; 71,4°; 72,8°; 73,1°; 74,6°; 75,2°; 75,9°; 76,1°; 77,1°; 78,9°; 80,1°; 81,6°; 82,2°; 82,4°; 83,1°; 83,6°; 84,5°; 85,2°; 85,5°; 85,7°; 86,3°; 86,7°; 87,2°; 88,2°; 88,6°; dan 89,8° 2 θ .⁸¹

Pada penelitian ini, derajat kristalinisasi sebesar 19% pada BAM-HA 30:70, sebesar 28% pada BAM-HA 35:65, sebesar 34% pada BAM-HA 40:60, dan sebesar 20% pada Bio-Oss. Hal ini menunjukkan makin besar jumlah BAM atau kolagen, akan meningkatkan derajat kristalinitasnya. Sesuai dengan penelitian (Mendes *et al.*, 2012) yang menemukan bahwa meningkatnya kandungan kolagen akan menambah derajat kristalinitas dari HA. Hal ini terjadi karena adanya interaksi HA dengan senyawa pada BAM yang berperan sebagai agen nukleasi.^{82,83}

Ukuran kristal pada biomaterial ini memengaruhi potensinya sebagai material preservasi soket. BAM-HA 30:70 memiliki ukuran kristal terbesar di antara keempat sampel dengan besar 1040 nm. BAM-HA 35:65 memiliki ukuran kristal HA sebesar 868 nm. BAM-HA 40:60 memiliki ukuran kristal HA sebesar 867 nm. Bio-Oss memiliki ukuran kristal HA terkecil yaitu 19.5 nm. Ukuran kristal HA memengaruhi koneksi, migrasi, adhesi, proliferasi, diferensiasi, dan biodegradasi dari biomaterial.⁸⁴ Menurut penelitian (Cai *et al.*, 2007) HA dengan ukuran 20 nm sangat baik untuk mendukung

pertumbuhan sel punca mesenkimal. Namun, HA dengan ukuran yang kecil mudah terserap oleh tubuh sehingga tidak dapat menggantikan ruang kosong pada soket.^{84,85}

Ukuran kristal pada sampel (867-1040 nm) merupakan kristal HA dengan ukuran mikro. Kristal dengan ukuran mikro dapat membantu diferensiasi sel punca dan sintesis matriks. Hal ini sesuai dengan penelitian (Matsiko *et al.*, 2015) bahwa sampel berukuran mikro dapat menstimulasi proliferasi sel, ekspresi gen kondrogenik, dan produksi matriks⁸⁶. HA dengan ukuran mikro dapat meningkatkan kemampuan osteogenik dan sementogenik karena dapat membantu perlekatan, penyebaran, dan proliferasi sel.⁸⁷ Ukuran kristal yang tidak terlalu kecil ($< 2-3 \mu\text{m}$) dan derajat kristalinitas yang rendah dari kristal HA adalah material yang terbaik untuk penyembuhan tulang supaya HA tidak teresorpsi dengan cepat.^{64,65,84,85}

Uji Biodegradasi Biokomposit Membran Amnion Sapi-Hidroksiapatit

Biodegradasi dalam aplikasi biomedis diartikan sebagai kerusakan bertahap pada material yang dimediasi oleh aktivitas biologis yang spesifik (Winiati & Septiani, 2013, p. 30). Suatu uji degradasi diperlukan untuk mengetahui kemampuan degradasi biomaterial saat berinteraksi dengan lingkungan. Kemampuan degradasi pada suatu biomaterial berperan dalam pembentukan jaringan baru karena memiliki sifat yang dapat memengaruhi viabilitas dan proliferasi sel. Biomaterial yang telah diimplementasikan didalam tubuh harus mampu untuk mempertahankan sifat mekanik dan integritas struktural yang cukup sehingga adaptasi sel berjalan dengan baik dan dapat menyimpan matriks ekstraseluler yang dimiliki (Eliaz, 2012, p. 173-175). Biomaterial yang memiliki sifat biodegradabel diharapkan mampu menciptakan ruang bagi jaringan tulang baru untuk dapat tumbuh (Bose *et al.*, 2012, p. 1).

Uji biodegradasi merupakan parameter untuk melihat waktu yang dibutuhkan oleh biomaterial terdegradasi sesuai pembentukan jaringan

baru. Pengujian ini berfungsi untuk mengetahui lamanya sampel dapat terurai dalam tubuh, sehingga sel kemudian dapat menghasilkan matriks ekstraseluler (O'Brien, 2011, p. 89). Perbedaan kemampuan laju degradasi dapat tergantung pada variasi perbandingan dan komponen pada suatu biomaterial yang digunakan (Abbott & Kaplan, 2016, p. 140-146). Biomaterial harus memiliki biodegradasi yang rendah untuk tulang beregenerasi. Penelitian Wattanutchariya & Changkowchai (2014, p. 3) mengenai kitosan-gelatin:hidroksiapatit, menunjukkan hasil biodegradasi sebesar 25,6% setelah direndam selama 7 hari dan akan terdegradasi sebesar 50-60% setelah perendaman 21 hari.

Kecepatan laju degradasi dipengaruhi oleh ukuran porositas suatu biomaterial. Semakin besar ukuran porositas, maka akan mempercepat kemampuan degradasi. Hal ini dikarenakan ukuran porositas yang semakin besar dapat memengaruhi sifat hidrofilik suatu biomaterial dimana akses cairan dengan mudah berdifusi ke dalam biomaterial sehingga dapat mempercepat penurunan massa pada biomaterial (Wang & Yeung, 2017, p. 224; Wang *et al.*, 2009, p. 1079).

Tingkat degradasi biomaterial dipengaruhi oleh ikatan kimia, komposisi polimer, sifat, dan kondisi lingkungan (Kartikasari *et al.*, 2016, p. 625). Pengujian degradasi dilakukan dengan cara perendaman sampel pada larutan *Simulated Body Fluid* (SBF) selama rentang waktu yang ditentukan. Larutan SBF merupakan larutan buatan yang memiliki komposisi dan konsentrik ionik yang hampir mirip dengan plasma darah manusia yang disimpan pada kondisi ringan pH 7,4 dan suhu $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Biomaterial yang telah dilakukan perendaman kemudian dikeringkan menggunakan metode *freeze-drying*. Metode ini bersifat mudah dan sederhana untuk menguji kestabilan dan lama waktu biomaterial mengalami biodegradasi dengan meniru kondisi lingkungan tubuh (Saad *et al.*, 2017, p. 268 & Saad *et al.*, 2019, p. 797). Uji biodegradasi dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Wattanutchariya & Changkowchai, 2014, p. 2) :

$$\text{Biodegradasi (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_f} \times 100$$

Keterangan :

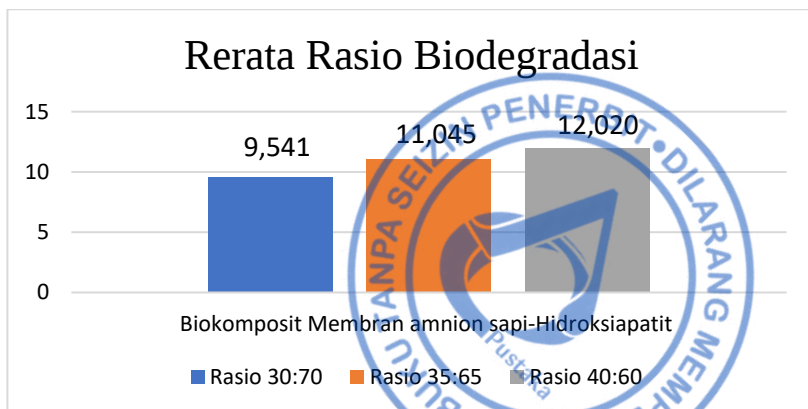
W_i = berat awal sebelum dilakukan perendaman

W_f = berat akhir setelah dilakukan perendaman

Perhitungan berat awal dan berat akhir dilakukan untuk masing-masing sampel. Durasi penelitian ditentukan selama 7 hari. Perhitungan data berat awal dan berat akhir sampel yang telah didapat, kemudian digunakan untuk melakukan perhitungan biodegradasi biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit berbagai rasio melalui rumus. Hasil nilai rerata dan simpang baku tingkat biodegradasi biokomposit berbagai rasio dapat dilihat di Tabel 3.5.8 dan Gambar 3.5.7.

Tabel 3.5.8. Nilai rerata uji biodegradasi pada biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit

Biokomposit	Perbandingan	Rasio Biodegradasi (%)	
		Rerata	Simpang Baku
Membran amnion sapi-hidroksiapatit	30:70	9.541	1.428
	35:65	11.045	1.415
	40:60	12.020	0.483



Gambar 3.5.7. Grafik rerata nilai rasio biodegradasi pada biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit perbandingan 30:70, 35:65, dan 40:60 (w/w)

Berdasarkan Tabel 3.5.8 dan Gambar 3.5.7 diatas, dapat diketahui bahwa nilai rerata tingkat biodegradasi biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit mengalami peningkatan yaitu dari perbandingan rasio 30:70, 35:65, dan 40:60 (w/w). Biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit perbandingan rasio 40:60 didapatkan nilai rerata tingkat biodegradasi paling tinggi yaitu sebesar $12.020 \pm 0.483\%$; diikuti $11.045 \pm 1.415\%$ pada perbandingan rasio 35:65, dan $9.541 \pm 1.428\%$ perbandingan rasio 30:70 (w/w). Pada biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit dengan rasio perbandingan hidroksiapatit yang semakin besar ditunjukkan laju biodegradasi yang semakin rendah.

Hasil nilai data uji biodegradasi dianalisis menggunakan uji *Shapiro-Wilk* yang merupakan uji untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak apabila sampel kurang dari 20. Berdasarkan uji *Shapiro-Wilk*, didapatkan nilai hasil uji terhadap masing-masing variabel adalah lebih besar dari ($p > 0.05$). Nilai $p > 0.05$ menunjukkan bahwa data semua

rasio tersebut terdistribusi normal. Dari hasil pengujian normalitas data, maka analisis statistik dapat dilanjutkan pada pengujian statistik parametrik *one way ANOVA*. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan tingkat biodegradasi pada setiap rasio.

Pada awal pengujian *one way ANOVA*, dilakukan pengujian homogenitas data dengan menggunakan *Levene test*. Hasil *Levene test* menunjukkan nilai signifikan $p = 0,042$ ($p < 0,05$). Berdasarkan data yang diperoleh, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa “terdapat kelompok yang mempunyai varian berbeda”. Karena varian data berbeda, dilanjutkan pengujian *ANOVA* menggunakan *one way ANOVA welch*. Statistik *analysis of variance*, *one way ANOVA* merupakan salah satu uji statistik parametrik untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok data secara keseluruhan. Tabel hasil *one way ANOVA welch* dapat dilihat pada Tabel 3.5.9.

Tabel 3.5.9. Hasil analisa statistika *one way ANOVA welch* pada uji biodegradasi biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit perbandingan rasio 30:70, 35:65, dan 40:60 (w/w)

Robust Tests of Equality of Means				
Uji Biodegradasi				
	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	14,048	2	14,307	,000

Hasil uji *one way ANOVA welch* menunjukkan nilai signifikansi $p = 0,000$ yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok dengan nilai *p-value* kurang dari ($p < 0,05$). Oleh karena itu, dilanjutkan pengujian analisis *Post-Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui antar kelompok mana yang mempunyai perbedaan signifikan/bermakna.

Hasil pengujian *Post-Hoc Tukey HSD* telah dirangkum dan ditampilkan dalam tabel 3.5.10.

Tabel 3.5.10. Hasil uji statistika *Post-hoc Tukey HSD* persentase biodegradasi pada biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit perbandingan rasio 30:70, 35:65, dan 40:60 (w/w)

Perbandingan	30:70	35:65	40:60
30:70		0.024*	0.000*
35:65			0.180
40:60			

* Menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$)

Hasil uji *Post-Hoc Tukey HSD* yang telah dilakukan menunjukkan bahwa terjadi perbedaan yang bermakna rerata tingkat *swelling* antara kelompok biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit rasio 30:70 dengan rasio 35:65 (w/w) ($p = 0.000$) dan biokomposit membran amnion sapi-hidroksiapatit rasio 30:70 dengan rasio 40:60 (w/w) ($p = 0.000$).

BAB IV

HASIL UJI IN VITRO LABORATORIUM

A. Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT Assay

Uji sitotoksitas merupakan bagian dari evaluasi bahan kedokteran gigi yang diperlukan dalam prosedur screening standar. Uji sitotoksitas digunakan untuk mengetahui potensi toksik yang dapat dihasilkan dari suatu bahan secara langsung terhadap kultur sel. Data yang diperoleh dapat digunakan untuk mendapatkan informasi mengenai derajat bahaya suatu bahan jika dipaparkan pada manusia, sehingga dosis penggunaan dapat ditentukan dengan tepat agar aman untuk diaplikasikan (Rasni, 2017; BPOM RI, 2014).

Uji sitotoksitas dapat dilakukan dengan menggunakan hewan coba secara *in vivo* maupun kultur sel secara *in vitro*. Pengujian dengan metode *in vivo* dilakukan dengan menggunakan hewan coba untuk mengetahui metabolisme dari suatu senyawa dalam tubuh. Hewan coba yang digunakan pada metode ini harus berjenis mamalia, karena hasilnya akan diterapkan pada manusia (Retnomurti, 2008). Metode *in vitro* menggunakan kultur sel lebih sering digunakan untuk uji sitotoksitas karena prosesnya cepat, biaya murah, dan tidak memerlukan penggunaan hewan. Prinsip dasar menumbuhkan sel secara *in vitro* adalah dengan merancang sistem kultur agar menyerupai keadaan *in vivo*. Caranya dengan memindahkan sel yang akan diteliti dari jaringan asal ke wadah kultur dengan memberi nutrisi yang cukup pada temperatur 37°C, dan pH lingkungan yang terjaga. Kekurangan dari metode ini yaitu secara teknis

masih belum cukup memadai untuk menggantikan tes pada hewan (Aslanturk, 2018; Jayanti, 2013).

Terdapat berbagai metode untuk menilai sitotoksitas dari suatu bahan antara lain MTT assay, agar *overlay*, filter molekul, pembebasan isotop kromium, dan pewarnaan eksklusi dengan *trypan blue* (Rasni, 2017; Hodgson et al., 2004). Pada penelitian ini, metode yang digunakan untuk menilai sitotoksitas terhadap sel fibroblas BHK-21 adalah dengan metode *Methyl Tiazolydiphenyl Tetrazolium Bromide* (MTT) assay (Kalangit et al., 2023, Berliana et al, 2023).

MTT assay merupakan metode kolorimetrik yang sensitif, kuantitatif, dan terpercaya untuk mengukur viabilitas, proliferasi, dan aktivitas sel. Dasar uji enzimatis MTT adalah dengan mengukur kemampuan sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel (Wati et al., 2016). Dalam pengujian ini, garam MTT direduksi menjadi endapan formazan ungu oleh sel hidup, sedangkan sel yang mati tidak dapat mereduksi garam MTT menjadi endapan formazan. Jumlah sel yang hidup kemudian dapat diukur sebagai konsentrasi hasil dari produk MTT yang diukur dengan spektrofotometer. Untuk mengukur intensitas warna, digunakan pembaca microplate 96-well dengan ELISA reader. Jumlah formazan yang dihasilkan diukur setelah dilarutkan. Semakin pekat warna yang dihasilkan, semakin tinggi nilai absorbansinya, sehingga jumlah sel yang hidup semakin banyak (Fitriani et al., 2019; Siregar & Hadijono, 2000). Persentase sel yang hidup dihitung dengan menggunakan rumus seperti di bawah ini (Murali & Thanikaivelan, 2016).

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{OD \text{ perlakuan} - OD \text{ media}}{OD \text{ kontrol sel} - OD \text{ media}} \times 100\%$$

Keterangan:

- % sel hidup : Persentase jumlah sel yang hidup setelah perlakuan
 OD perlakuan : Nilai densitas optikal formazan pada setiap sampel setelah perlakuan
 OD media : Nilai densitas optikal formazan pada kontrol media
 OD kontrol sel : Nilai densitas optikal formazan pada kontrol sel

Kelebihan dari MTT *assay* yaitu mudah digunakan, aman, valid, relatif cepat, memiliki reproduktifitas tinggi, dan banyak digunakan untuk menentukan viabilitas sel dan uji sitotoksitas (Aslanturk, 2018).

B. Kultur Sel

Kultur sel merupakan suatu metode pemindahan sel dari hewan atau tumbuhan yang di tempatkan pada lingkungan buatan yang sesuai (Puspitasari et al., 2016). Dalam mengatur lingkungan hidup sel, perlu diperhatikan hal-hal yang dapat mendukung pertumbuhan sel, seperti lingkungan yang steril, suplai nutrisi yang cukup untuk tumbuh, temperatur stabil, dan pH yang terjaga (Jayanti, 2013). Kultur sel dapat berupa kultur sel primer maupun kultur sel sekunder (*cell line*).

Kultur sel primer merupakan kultur yang sel, jaringan, dan organnya diperoleh langsung dari organisme asalnya dengan pemotongan jaringan normal, kemudian di kultur sebagai sel dengan disintegrasi mekanis atau kimia maupun bantuan enzim (Verma et al., 2020). Kultur sel primer ini sulit diperoleh dan hanya dapat dipertahankan dalam periode waktu tertentu. Kultur sel primer memiliki sifat yang lebih sensitif dibandingkan

dengan *cell lines*, sehingga pada uji *in vitro* lebih ideal menggunakan kultur sel primer (Loprinzi et al., 2014).

Sedangkan kultur *cell line* adalah keturunan sel yang diperoleh dari kultur sel primer dan telah dipisahkan secara enzimatis ataupun secara mekanis (Rasni, 2017; Jayanti, 2013). Kelebihan menggunakan kultur *cell lines* secara *in vitro* yaitu pasase dapat dilakukan dari 50 hingga 70 kali, pertumbuhan sel cepat, integritas sel tetap terjaga, sel dapat memperbanyak diri dalam suspensi, dan telah digunakan dalam penelitian virologi, imunologi, serta toksikologi (Meizarini, 2005). Kekurangan dari metode *in vitro* dengan kultur sel adalah sel akan mudah mati jika terkontaminasi dengan mikroorganisme, sehingga setiap tahapan yang dilakukan harus selalu dalam kondisi aseptik (Jayanti, 2013).

C. Sel Fibroblas BHK-21

Fibroblas merupakan sel yang berperan penting pada lamina propria di mukosa mulut (Nanci, 2013). Sel fibroblas merupakan sel utama pada jaringan periodontal yang berfungsi untuk sintesis kolagen dan matriks, berperan dalam degradasi kolagen yang menghasilkan perubahan konstan pada serabut utama (*remodelling*), dan memelihara jaringan periodontium yang sehat (Wulandari et al., 2008). Sel fibroblas merupakan salah satu tipe sel yang digunakan dalam uji sitotoksitas dengan kultur sel. Jenis sel fibroblas yang digunakan dalam kultur sel pada penelitian ini adalah sel fibroblas BHK-21 (Freshney, 2011, Octarina et al, 2024) .

Sel fibroblas BHK-21 berasal dari sel fibroblas ginjal bayi hamster. Penggunaan sel fibroblas BHK-21 dikarenakan fibroblas merupakan sel yang menjadi komponen utama dari pulpa, ligamen periodontal, dan gingiva (Restiani et al., 2017; Yuliati, 2005). Sel fibroblas BHK-21 lebih banyak digunakan untuk menguji sitotoksitas dari bahan dan obat-obatan di bidang kedokteran gigi. Sel fibroblas BHK-21 merupakan kultur

yang berasal dari jaringan embrionik sehingga mudah tumbuh dan mudah dilakukan subkultur ulang (Wulandari, 2006). Selain itu, sel fibroblas BHK-21 memiliki karakterisasi yang stabil, sensitif, tidak mengalami mutasi, serta tidak bersifat tumor *genic* (Freshney, 2010).

D. Hasil Penelitian

Penelitian uji sitotoksitas membran bovine amnion hidroksiapatit terhadap sel fibroblas BHK-21 menggunakan metode MTT *assay* dengan pembacaan melalui ELISA *reader* pada panjang gelombang 620 nm. Hasil pembacaan uji MTT dengan menggunakan ELISA *reader* pada penelitian ini adalah berupa *optical density* yang merupakan tingkat absorbansi melalui perubahan warna yang dihasilkan oleh aktivitas mitokondria dan kristal formazan menjadi berwarna ungu. Jika warna yang dihasilkan semakin pekat, maka semakin tinggi nilai absorbansinya.

Nilai *optical density* menggambarkan jumlah sel fibroblas yang hidup. Semakin besar nilai *optical density*, menunjukkan semakin besar jumlah sel fibroblas yang hidup. Perhitungan jumlah sel fibroblas yang hidup menggunakan rumus persentase sel hidup. Berdasarkan hasil pengamatan dan pembacaan nilai absorbansi, uji sitotoksitas membran bovine amnion hidroksiapatit terhadap sel fibroblas BHK-21 menggunakan ELISA *reader* yang terbagi atas kelompok perlakuan dengan pemaparan BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, dan BAM-HA 60:40 didapatkan hasil pada Tabel 4.1.1.

Tabel 4.1.1. Jumlah replikasi, rerata, standar deviasi dan persentase sel fibroblas BHK-21 yang hidup

	N	Rerata OD	Standar Deviasi	% Sel Hidup
Kontrol Media	6	0,0670	0,008763	0%
Kontrol Sel	6	0,5080	0,059221	100%
BAM-HA 30:70	6	0,4998	0,048267	98,14%
BAM-HA 35:65	6	0,4866	0,050685	95,14%
BAM-HA 40:60	6	0,4943	0,054098	96,89%

Pada Tabel 4.1.1 dapat dilihat bahwa dengan replikasi sebanyak 6 kali menunjukkan persentase sel fibroblas BHK-21 yang hidup setelah diberi perlakuan pada kelompok kontrol media adalah 0%, pada kelompok kontrol sel adalah 100%, pada kelompok pemberian BAM-HA 30:70 adalah 98,14%, pada kelompok pemberian BAM-HA 35:65 adalah 95,14%, dan pada kelompok pemberian BAM-HA 40:60 adalah 96,89%.

Berdasarkan hasil pengamatan dan perhitungan jumlah sel fibroblas BHK- 21 setelah terpapar BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, dan BAM-HA 40:60, pada kelompok sampel dengan pemberian BAM-HA 30:70 didapatkan adanya kecenderungan peningkatan rata-rata jumlah sel fibroblas BHK-21 dibandingkan dengan pemberian BAM-HA 35:65 dan BAM-HA 40:60.

Bovine Amniotic Membrane (BAM) telah banyak digunakan dalam bidang kedokteran gigi sebagai *wound dressing* pada penyembuhan luka gingiva maupun jaringan periodontal lainnya karena memiliki efek anti-inflamasi, anti-scarring, serta merangsang regenerasi jaringan. Namun, BAM mudah terdegradasi dengan cepat dan kekuatan mekaniknya rendah, sehingga pada pengaplikasiannya BAM cukup susah dan memakan waktu lama, serta BAM sangat tipis sehingga mudah terurai di lokasi jahitan.

Oleh karena itu, diperlukan mineral garam kalsium yang terdapat dalam hidroksiapatit (HA) yang mampu memperbaiki struktur tulang. HA merupakan biomaterial yang berasal dari komponen anorganik utama jaringan tulang dan gigi. HA dapat berasal dari tulang sapi (*bovine hydroxyapatite*) dan telah banyak digunakan untuk pencangkokan tulang, perbaikan, pengisian atau penggantian jaringan tulang dan gigi karena biokompatibilitasnya yang sangat baik dengan jaringan keras. Kombinasi BAM dan HA bertujuan untuk menghasilkan biomaterial baru yang diharapkan dapat memberikan dampak yang baik untuk mempercepat penyembuhan luka serta meregenerasi tulang. Berdasarkan penelitian sebelumnya mengenai variasi kombinasi, pada penelitian ini variasi perbandingan BAM-HA yang digunakan yaitu dengan rasio 30:70, 35:65, dan 40:60. Penggabungan BAM dan HA dapat dilakukan dengan menggunakan metode *freeze-drying*. Metode ini dapat membentuk struktur berpori sehingga dalam manipulasi biomaterial akan memberikan kemudahan serta stabilitas (Nireesha et al., 2013).

Membran bovine amnion hidroksiapatit sebagai bahan biomaterial harus bersifat biokompatibel, yaitu kemampuan suatu bahan untuk memberikan respons biologis yang baik jika diaplikasikan ke tubuh, sehingga dapat diterima oleh jaringan dan tidak bersifat toksik. Oleh karena itu, uji sitotoksitas diperlukan untuk memenuhi persyaratan ini. Dalam penelitian ini, dilakukan uji sitotoksitas membran bovine amnion hidroksiapatit dengan variasi kombinasi BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65 dan BAM-HA 40:60 terhadap sel fibroblas BHK-21.

Parameter yang umum digunakan untuk menentukan sitotoksitas suatu bahan adalah Cytotoxic Dilution 50% (CD50). Cytotoxic Dilution 50% (CD50) merupakan standar suatu bahan dapat dikatakan tidak toksik apabila persentase sel hidup setelah diberi perlakuan lebih dari 50% (Telli 1999, p. 6). Hasil penelitian antar kelompok sampel terhadap sel fibroblas BHK-21 dengan menggunakan metode MTT *assay* menunjukkan rata-rata persentase dari sel fibroblas yang hidup setelah pemberian BAM-HA 30:70

adalah 98,14%, setelah pemberian BAM-HA 35:65 adalah 95,14%, dan setelah pemberian BAM-HA 40:60 adalah 96,89%. Persentase ini berada di atas dari parameter CD50, sehingga dapat disimpulkan bahwa BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, dan BAM-HA 40:60 tidak bersifat toksik. Hal ini ditunjukkan dengan hasil sel yang terwarnai menjadi berwarna ungu setelah dilakukan uji sitotoksitas. Jika suatu bahan yang dipaparkan bersifat tidak toksik, maka dehidrogenase akan aktif sehingga kristal formazan dapat terproduksi (Ariani, Yulianti & Adiarto 2009, p. 16). Sel fibroblas yang hidup mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan ungu, sedangkan sel yang mati tidak dapat mereduksi garam MTT menjadi kristal formazan. Selanjutnya, absorbansi larutan berwarna ini diukur menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 620 nm (Devienne & Raddi, 2002, p. 166; Siregar & Hadijono, 2000). Peningkatan jumlah sel hidup menghasilkan peningkatan jumlah formazan yang terbentuk serta peningkatan absorbansi, sehingga transformasi warna berhubungan langsung dengan jumlah sel hidup. Semakin pekat warna ungu dari kelompok sampel setelah dilakukan uji sitotoksitas, menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup, sehingga dapat dikatakan suatu bahan yang dipaparkan tidak bersifat toksik.

Kultur sel fibroblas BHK-21 yang diberi paparan BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, dan BAM-HA 40:60 menunjukkan persentase sel fibroblas yang hidup tinggi. Hal ini dapat terjadi karena membran bovine amnion hidroksiapatit mengandung *growth factor* seperti FGF. FGF akan berikatan dengan reseptor FGFRs yang berada dipermukaan sel target dan mengaktifkan kaskade biokimia dengan memulai aktivasi dari PI3-kinase yang selanjutnya mengaktifkan jalur Rac1. Rac1 kemudian meregulasi aktivasi dari jalur JNK sehingga memengaruhi transkripsi inti sel, sehingga menyebabkan terjadinya peningkatan proliferasi dan migrasi dari sel fibroblas (Yun et al., 2010). Berdasarkan kandungan FGF dalam membran bovine amnion hidroksiapatit yang dapat menstimulasi proliferasi

fibroblas, menunjukkan bahwa membran bovine amnion hidroksiapatit tidak bersifat toksik.

Pada penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa penggunaan *sponge amnion* yang terbuat dari campuran membran amnion dan gelatin juga tidak bersifat toksik sehingga aman untuk digunakan (Munadzirroh, Yuliati & Ragilia 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Mondal *et al.* (2012, p. 683-691) menunjukkan hidroksiapatit tidak menunjukkan efek toksik pada kultur sel. Membran bovine amnion hidroksiapatit terbuat dari campuran BAM dan HA yang kedua bahan tersebut tidak memiliki sifat toksik. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh penulis, terbukti bahwa membran bovine amnion hidroksiapatit tidak bersifat toksik terhadap sel fibroblas BHK-21 sehingga aman untuk digunakan sebagai bahan alternatif untuk mempercepat penyembuhan luka serta meregenerasi tulang pasca pencabutan gigi.

BAB V

HASIL UJI IN VIVO

Penelitian tahap kedua ini adalah penelitian *in vivo*, dengan aplikasi biokomposit BAM-HA dengan varian 30:70, 35:65 dan 40:60 pada hewan coba tikus Sprague Dawley (SD). Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari komisi etik IPB dengan no 232-2022 IPB. Aplikasi biokomposit BAM-HA dengan berbagai varian dimasukkan pada soket tulang alveolar tikus SD setelah pencabutan gigi insisivus bawah kanan dibandingkan dengan kelompok kontrol yaitu kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM dan kelompok Bio-Oss Collagen. Pada hari ke 14 dan ke 28 tikus dikorbankan untuk diambil jaringan tulang alveolar dan dianalisis mekanisme osteogenesis dengan melihat ketebalan kolagen, proliferasi osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan Osteocalcin pada preparat histologi dan imunohistokimia.

A. Kolagen

Tulang alami adalah kumpulan kompleks nanofibril kolagen tipe I dan kristal HA yang diendapkan pada permukaannya. Dua jenis sel berperan penting dalam pembentukan tulang: osteoblas (pembentuk tulang) dan osteoklas (resorpsi tulang). Selama proses osifikasi, osteoblas mengeluarkan kolagen tipe I, di samping banyak protein non-kolagen seperti *Osteocalcin*, sialoprotein tulang, dan osteopontin. Kolagen berfungsi sebagai *template*, menginisiasi, dan menyebarkan mineralisasi independen dari vesikel matriks pada saat pembentukan jaringan tulang (Ferreira *et al.*, 2012).

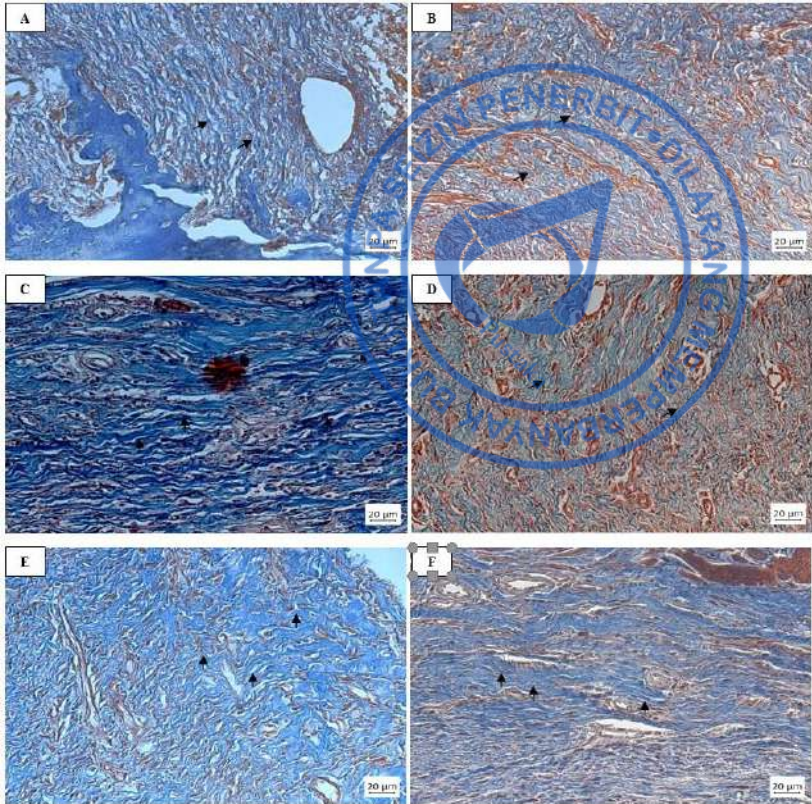
Kolagen merupakan zat protein berbentuk serabut yang merupakan bagian utama jaringan ikat yang diperlukan pada keadaan-keadaan penyembuhan luka, pembentukan jaringan parut, serta pembentukan matriks tulang. Kolagen adalah komponen kunci pada fase penyembuhan luka. Pada awalnya terdapat kolagen tipe III yang lebih dominan yang kemudian akan diganti oleh kolagen tipe I. Setelah 20 hari, jaringan granulasi digantikan oleh kolagen, dan tulang mulai terbentuk di dasar dan pinggiran soket ekstraksi (Steiner *et al.*, 2008).

Kolagen yang diamati secara mikroskopis berbentuk tebal, berliku-liku, tidak elastis yang terdiri dari protein kolagen (*white fibers*). Pada pewarnaan dengan pengecatan HE (*Hematoxylin Eosin*) didapatkan warna merah muda. Pengamatan dilakukan dengan foto soket pasca ekstraksi dilanjutkan dengan penghitungan jumlah kolagen. Area yang dinilai kepadatannya pada pemeriksaan ini adalah daerah *Healing Centre* (HC) yaitu pada daerah sekeliling tepi soket. Data pada sampel ini merupakan data semi kuantitatif serat kolagen dinyatakan dalam persen yang ditentukan dengan cara membagi luas area (μm^2) sabut kolagen yang teramati dengan luas total area pengukuran (Salim *et al.*, 2015).

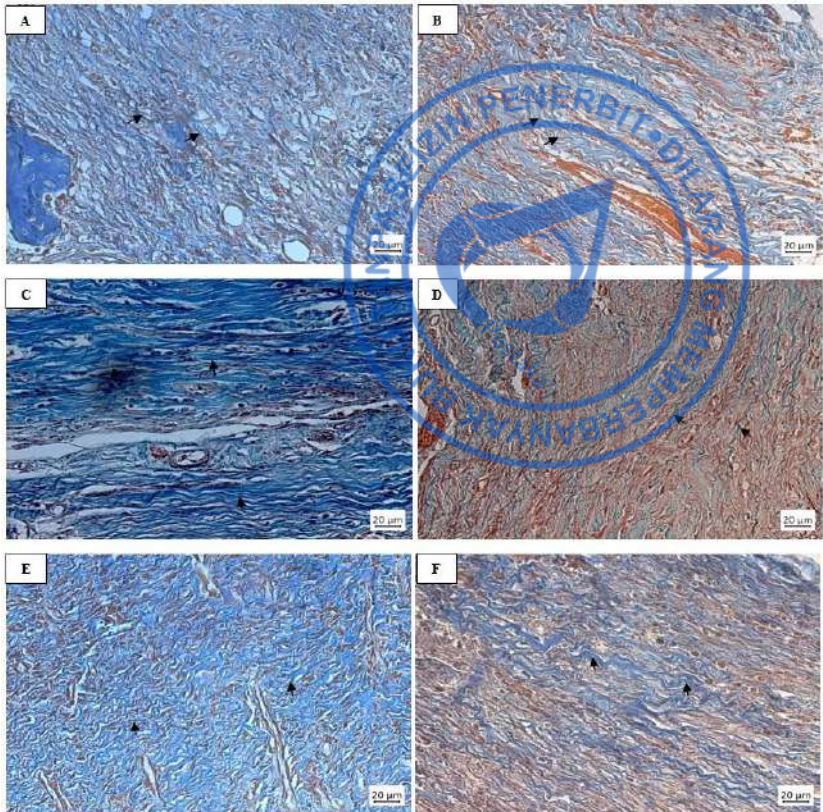
Penelitian ini dilakukan pengujian untuk melihat ketebalan kolagen dengan aplikasi material biokomposit BAM-HA. Pembentukan kolagen menunjukkan adanya pembentukan atau penyembuhan pada jaringan lunak.

Gambar 5.1.1 dan 5.1.2 merupakan gambaran histologi kolagen hari ke-14 dan 28 pada kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM. Pada gambaran histologi menunjukkan peningkatan ketebalan kolagen dengan aplikasi material BAM-HA dengan berbagai rasio (tanda panah hitam). Pada gambaran histologi 5.1.2 pada hari ke-28, gambaran ketebalan kolagen mulai berkurang jumlahnya pada setiap kelompok.

Perhitungan nilai rata-rata dan standar deviasi ketebalan kolagen pada hari ke-14 (Tabel 5.1.1) secara berurutan pada kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM menunjukkan angka sebesar $(1,83 \pm 0,57)$, $(2,33 \pm 0,12)$, $(3,00 \pm 0,20)$, $(2,60 \pm 0,34)$, $(3,43 \pm 0,40)$, dan $(3,13 \pm 0,23)$. Pada hari ke-28, perhitungan nilai rata-rata dan standar deviasi kolagen pada kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan menunjukkan angka sebesar $(1,73 \pm 0,12)$, $(2,13 \pm 0,23)$, $(2,53 \pm 0,30)$, $(2,40 \pm 0,20)$, $(2,73 \pm 0,23)$, dan $(2,60 \pm 0,20)$. Hasil rerata dari ketebalan kolagen pada penelitian ini dapat dipersentasekan dengan gambaran diagram batang (Gambar 5.1.3).



Gambar 5.1.1. Gambaran Histologi Ketebalan Kolagen soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-14. Pewarnaan Masson Trichome, perbesaran 40x. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss *Collagen*, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan serat kolagen



Gambar 5.1.2. Gambaran Histologi Ketebalan Kolagen soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-28. Pewarnaan Masson Trichome, perbesaran 40x. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss *Collagen*, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan serat kolagen

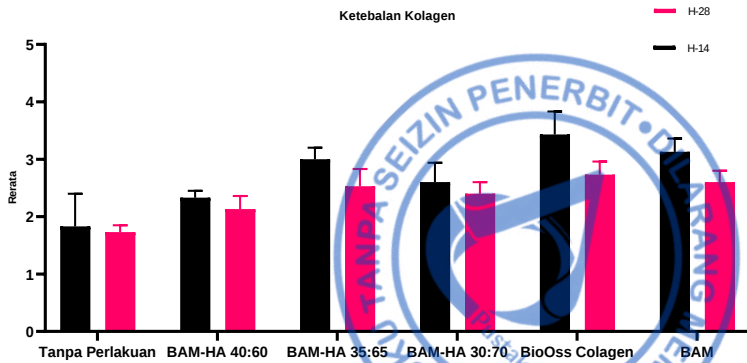
Tabel 5.1.1. Hasil rerata dan standar deviasi analisa ketebalan kolagen

No.	Kelompok	X ± SD		N		H	Sig ANOVA	Efek	
		Hari ke- 14	Hari ke- 28				Material	Waktu	M*W
1.	Kontrol Negatif	1,83 ± 0,57	1,73 ± 0,12	0,189*	0,446**	0,000°	0,000°	0,001°	0,091
2.	BAM-HA 40:60	2,33 ± 0,12	2,13 ± 0,23						
3.	BAM-HA 35:65	3,00 ± 0,20	2,53 ± 0,30						
4.	BAM-HA 30:70	2,60 ± 0,34	2,40 ± 0,20						
5.	Bio-Oss Collagen	3,43 ± 0,40	2,73 ± 0,23						
6.	BAM	3,13 ± 0,23	2,60 ± 0,20						

Ket : * $p > 0,05$ = data normal

 ** $p > 0,05$ = varian data homogen

 ° $p < 0,05$ = ada perbedaan bermakna



Gambar 5.1.3. Perbandingan rerata ketebalan kolagen antar kelompok

Uji statistika diawali dengan uji normalitas yang menunjukkan keseluruhan data normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas dilakukan setelah semua data normal, penelitian ini menunjukkan varian data tidak homogen ($p < 0,05$) dan adanya perbedaan bermakna antar kelompok (sig ANOVA $p < 0,05$). Uji di antara subjek menunjukkan adanya efek antara material yang berbeda dan antara waktu aplikasi yang berbeda ($p < 0,05$), akan tetapi tidak ada hubungan antara material dengan waktu aplikasi ($p > 0,05$) (Tabel 5.1.1). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan ANOVA dua jalan jalan *post hoc* Tukey. Tabel 5.1.2 menunjukkan perbedaan bermakna antar kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Penelitian ini menunjukkan aplikasi material BAM-HA pada soket tulang alveolar dapat meningkatkan ketebalan kolagen.

Tabel 5.1.2. Statistik *Two Way ANOVA Post Hoc Tukey* analisis ketebalan kolagen

Kelompok	Kontrol Negatif	BAM-HA 40:60	BAM-HA 35:65	BAM-HA 30:70	Bio-Oss Collagen	BAM
Kontrol Negatif	-	*0,035	*0,000	*0,020	*0,000	*0,000
BAM-HA 40:60	-	-	*0,009	0,409	*0,000	0,001
BAM-HA 35:65	-	-	-	0,409	0,235	0,977
BAM-HA 30:70	-	-	-	-	*0,004	0,122
Bio-Oss Collagen	-	-	-	-	-	0,626
BAM	-	-	-	-	-	-

Ket : $p < 0.05$ = ada perbedaan bermakna

Kolagen berperan penting dalam proses penyembuhan luka, kolagen adalah protein utama yang menyusun komponen matriks ekstraseluler sehingga dapat memperbaiki kerusakan dan memulihkan struktur dan fungsi anatomi jaringan (Mardiyantoro *et al.*, 2020). Peningkatan pembentukan kolagen dimulai dari hari ke-3 dan berlanjut hingga minggu ke-2 setelah adanya cedera (Oki *et al.*, 2022). Salah satu parameter penyembuhan tulang adalah pembentukan serat kolagen. Matriks tulang terdiri dari serat kolagen yang berkisar 90% dan protein non-kolagen. (Tandelilin *et al.*, 2006).

Penelitian ini dapat terlihat ketebalan kolagen yang padat pada hari ke-14. Nilai rata-rata dan standar deviasi ketebalan kolagen kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:75, BAM-HA 30:70, Bio-Oss Collagen, dan BAM secara berurutan sebesar $(1,83 \pm 0,57)$, $(2,33 \pm 0,12)$, $(3,00 \pm 0,20)$, $(2,60 \pm 0,34)$, $(3,43 \pm 0,40)$, dan $(3,13 \pm 0,23)$. (Wibowo *et al.*, 2023) Serat kolagen mulai muncul pada hari ke-3, karena merupakan

fase awal terjadi migrasi dan proliferasi fibroblas. Pembentukan serat kolagen mengalami puncaknya dari hari ke-7 sampai ke-14 (Oki *et al.*, 2022). Penelitian ini senada dengan Tandelilin *et al.* (2006) mengatakan bahwa serat kolagen tampak lebih padat pada hari ke-14 setelah pencabutan gigi.

Pembentukan kolagen terlihat menurun di hari ke-28 dengan nilai rerata dan standar deviasi pada kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:75, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan sebesar ($1,73 \pm 0,12$), ($2,13 \pm 0,23$), ($2,53 \pm 0,30$), ($2,40 \pm 0,20$), ($2,73 \pm 0,23$), dan ($2,60 \pm 0,20$) (Octarina *et al.*, 2024). Hal ini senada dengan penelitian (Rosanto *et al.*, 2019) yang mengatakan bahwa terjadi penurunan tingkat ketebalan kolagen terjadi setelah hari ke-14 dan seiring berjalannya waktu kepadatan akan terus menurun. Ketebalan kolagen pada hari ke-14 mulai mengalami penurunan, hal ini dapat disebabkan karena pada waktu tersebut kolagen mulai tergantikan menjadi matriks tulang (Ismardianita *et al.*, 2019).

Proses biologis pada penyembuhan luka setelah pencabutan gigi terjadi melalui beberapa fase yang meliputi hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodeling*. Setelah perdarahan pada luka soket berhenti, selanjutnya akan digantikan oleh jaringan granulasi. Jaringan granulasi secara bertahap akan digantikan dengan matriks jaringan ikat sementara dengan serat kolagen dan fase proliferasi yang dari proses penyembuhan luka dimulai (Araujo *et al.*, 2015). BAM mengandung Kolagen tipe I, III, IV, V, VI dan XV (Gunasekaran *et al.*, 2020). Kolagen adalah protein utama yang ada pada Matriks tulang. Kolagen tipe 1 adalah jenis protein kolagen yang paling melimpah yang digunakan secara luas sebagai komponen preservasi tulang untuk menginduksi regenerasi jaringan pada tulang yang rusak. (Huang *et al.*, 2013)

Kelompok dengan aplikasi material BAM-HA (40:60, 35:65, 30:70), dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan terlihat adanya

perbedaan bermakna ketebalan kolagen secara statistik ($p < 0,05$). Gambaran histologi dari kelompok aplikasi BAM-HA memiliki ketebalan kolagen yang lebih padat. Hal ini dapat disebabkan, BAM memiliki preteomik *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) (Munadzirroh, *et al.*, 2022). SLPI akan menstimulasi faktor pertumbuhan, seperti EGF, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), dan *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Sabouri *et al.*, 2020). EGF adalah pengatur utama motilitas sel epitel sehingga memengaruhi laju re-epitelisasi, membantu kontraksi luka dengan merangsang proliferasi dan migrasi fibroblas dan menginduksi pematangan kulit dengan mengikat EGFR dalam sel di lokasi luka (Vaidyanathan, 2021). TGF- β akan menstimulasi aktivitas fibroblas dan merangsang sekresi *Fibroblast Growth Factor* (FGF). FGF akan berikatan pada reseptor tirosin reseptor kinase yang mendorong autofosforilasi pada reseptor dan fosforilasi posterior pada serin, treonin, dan residu tirosin pada protein target spesifik seperti Raf-1, MAPK/Erk kinase (MEK) dan *extracellular signal-regulated kinase-1* (ERK) (R. De Araújo *et al.*, 2019) sekresi FGF akan menyebabkan migrasi fibroblas meningkat. Peningkatan migasi sel fibroblas merangsang pembentukan kolagen pada luka pencabutan. Kolagen akan membentuk struktur pada jaringan, peningkatan ketebalan kolagen akan menstimulus percepatan penyembuhan luka pencabutan (Faadhila *et al.*, 2021) (Matsumine *et al.*, 2019).

Kelompok dengan aplikasi Bio-Oss *Collagen* memiliki ketebalan kolagen yang lebih tinggi dan berbeda bermakna secara statistik ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok aplikasi BAM-HA (60:40, 35:65, dan 30:70). Kandungan HA yang lebih tinggi pada Bio-Oss *Collagen* akan menstimulasi fibroblas dan osteoblas lebih cepat. Fibroblas yang terstimulasi lebih cepat akan menstimulasi kolagen lebih cepat. Hal ini yang menyebabkan pembentukan kolagen lebih tinggi pada kelompok Bio-Oss *Collagen* (Ardhiyanto, 2012).

B. Osteoblas

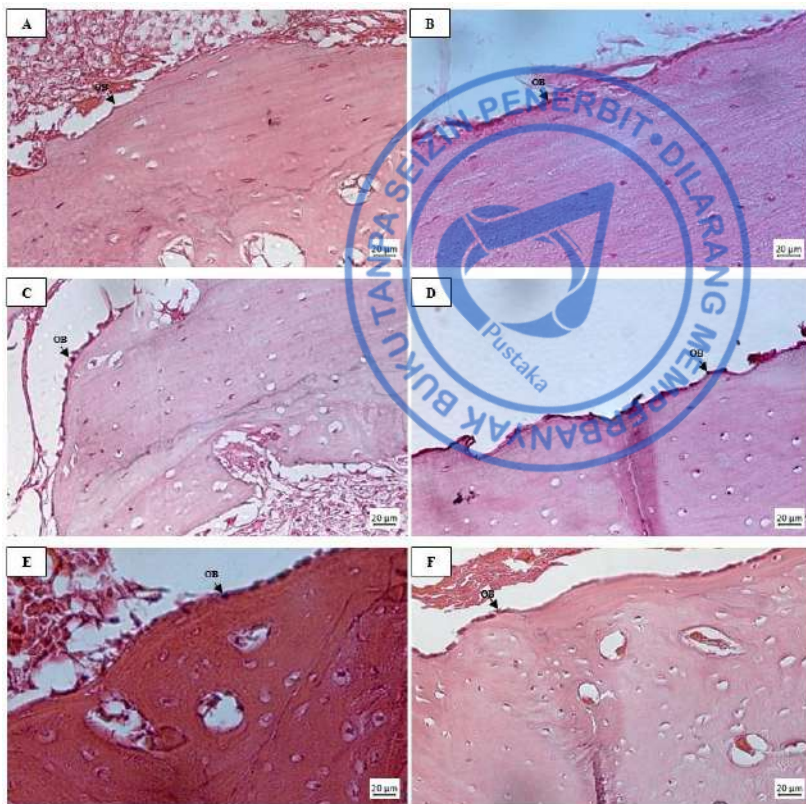
Jaringan tulang terdiri dari sel (osteoblas dan osteosit) yang tertanam dalam matriks ekstraselular. Matriks ekstraseluler tersusun dari 2 komponen utama, fibrin kolagen tipe I dan nanokristal HA yang terdistribusi sepanjang fibrin kolagen (Stuckensen *et al.*, 2019). Pada proses *remodeling* tulang alveolaris, sel osteoblas akan beragregasi dengan zat interseluler tulang yang mengandung kolagen untuk membentuk serat kolagen baru dan membentuk osteoid (Sularsih & Soeprijanto, 2012).

Osteoblas memiliki peran utama dalam pembentukan tulang dengan multipel sintesa protein matriks tulang (Tanaka *et al.*, 2005). Osteoblas adalah sel kuboid terletak di sepanjang permukaan tulang. Sel ini hanya terdiri dari 4-6% dari semua sel tulang dan berfungsi untuk membentuk, *remodeling*, dan penyembuhan tulang. Osteoblas berasal dari sel induk mesenkim (MSC). MSC berperan pada pembentukan osteopogenitor dengan ekspresi gen spesifik, termasuk sintesis BMP dan jalur *signaling* Wnt. RUNX2 adalah gen utama pada diferensiasi osteoblas. Gen ini menunjukkan gen yang berkaitan dengan pembentukan osteoblas antara ColIA1, ALP, BSP, BGLAP dan OC (Florescio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões, *et al.*, 2015). Osteoblas berperan terhadap produksi kolagen dan protein nonkolagen termasuk *Osteocalcin*, bone sialoprotein, osteopontin, dan osteonectin. Osteoblas juga menghasilkan sitokin antara lain *insulin-like growth factor* I, II, TGF β , BMPs. Faktor pertumbuhan ini tersimpan pada matriks tulang yang terkalsifikasi dan memegang peranan penting pada diferensiasi dan fungsi osteoblas (Nakamura, 2007).

Pembentukan osteoblas didahului oleh pra-osteoblas yang selanjutnya mengalami proses pematangan yang juga membedakan osteosit. Osteosit adalah sel tulang yang ditemukan di kanalikuli yang membentuk matriks tulang. Pembentukan tulang dikaitkan dengan peningkatan ekspresi Osteoprotegerin (OPG) atau penurunan ekspresi

aktivator *Nuclear Factor Kappa B Ligand Receptor* (RANKL). Resorpsi tulang patologis juga diketahui melibatkan peningkatan ekspresi rasio RANKL dan penurunan ekspresi OPG. Selama respons inflamasi, sitokin proinflamasi, seperti Interleukin IL-1b, IL-6, IL-11 dan IL-17, serta osteoklastogenesis *Tumor Nuclear Factor* (TNF- α), dapat diinduksi dengan meningkatkan ekspresi RANKL, sekaligus mengurangi produksi OPG dalam sel osteoblas (Rahmawati *et al.*, 2017). Interaksi HA mengaktifkan jalur pensinyalan ERK. Jalur pensinyalan ERK dapat menstimulasi gen yang berhubungan dengan osteoblas seperti Col I, *Osteocalcin*, dan diferensiasi osteogenik MSC. HA terlibat tidak hanya dalam ekspresi gen yang berhubungan dengan osteoblas tetapi juga dalam banyak jalur pensinyalan yang berhubungan dengan Ca^{2+} dan peningkatan regulasi protein ECM (Bal *et al.*, 2020).

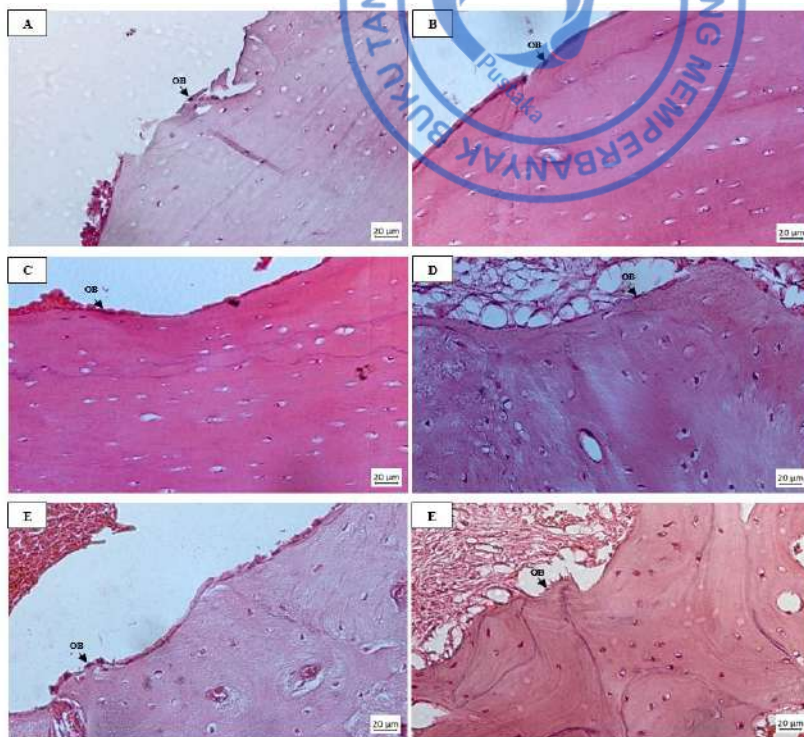
Penelitian ini menganalisis proliferasi sel osteoblas sebagai indikator penyembuhan soket tulang alveolar. Gambaran proliferasi sel osteoblas dilihat secara histologi pada preparat soket tulang alveolar setelah diaplikasikan material. Penelitian ini menunjukkan gambaran histologi proliferasi sel osteoblas pada soket tulang alveolar tikus SD hari ke-14 (Gambar 5.2.1) dan hari ke-28 (Gambar 5.2.2), kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM. Sel osteoblas ditandai dengan sel berbentuk kuboid berinti tunggal yang terletak di sepanjang soket tulang alveolar.



Gambar 5.2.1. Gambaran Histologi Sel Osteoblas pada soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-14. Pewarnaan HE, perbesaran 40x. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss *Collagen*, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan sel osteoblas (OB)

Hari ke-14 menunjukkan adanya peningkatan jumlah sel osteoblas dengan aplikasi material BAM-HA dengan berbagai rasio (tanda panah hitam). (Gambar 5.2.1 A-F) Perhitungan nilai rata-rata dan standar

deviasi jumlah sel osteoblas (Tabel 5.2.1) secara berurutan pada kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM menunjukkan angka sebesar $(8,23 \pm 0,26)$, $(13,43 \pm 0,26)$, $(15,83 \pm 2,26)$, $(14,80 \pm 0,30)$, $(20,20 \pm 4,20)$, dan $(17,53 \pm 0,30)$ (Wibowo et al, 2023).



Gambar 5.2.2. Gambaran Histologi Sel Osteoblas pada soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-28. Pewarnaan HE, perbesaran 40x. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss *Collagen*, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan sel osteoblas (OB)

Gambaran histologi proliferasi sel osteoblas hari ke-28 kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM terlihat pada Gambar 5.2.2 A-F. Pada gambaran histologi ini terlihat jumlah sel osteoblas mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan hari ke-14. Pada Tabel 5.2.1 menunjukkan perhitungan nilai rata-rata dan standar deviasi sel osteoblas pada kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan menunjukkan angka sebesar $(6,73 \pm 0,30)$, $(8,17 \pm 0,38)$, $(8,67 \pm 2,88)$, $(8,27 \pm 0,30)$, $(9,87 \pm 1,66)$, dan $(8,93 \pm 2,36)$. Nilai rerata sel osteoblas antar kelompok dapat dipresentasikan dengan diagram batang Gambar 5.5.3. Hasil statistik dengan *two way ANOVA post hoc Tukey* juga ditemukan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok kontrol negatif dengan semua kelompok perlakuan pada Tabel 5.2.1 (Octarina *et al*, 2024).

Tabel 5.2.1. Hasil rerata dan standar deviasi analisa proliferasi sel Osteoblas

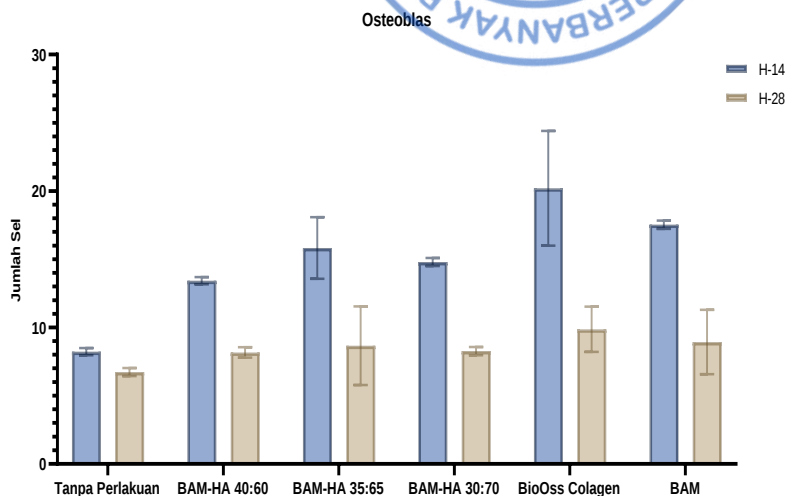
No	Kelompok	X $\pm$ SD		N	H	Sig ANOVA	Interaksi Antar Bahan		
		Hari ke-14	Hari ke-28				Material	Waktu	M*W
1.	Kontrol Negatif	8,23 $\pm$ 0,26	6,73 $\pm$ 0,30	0,060*	0,483**	0,000*	0,000*	0,000*	0,004
2.	BAM-HA 40:60	13,43 $\pm$ 0,26	8,17 $\pm$ 0,38						
3.	BAM-HA 35:65	15,83 $\pm$ 2,26	8,67 $\pm$ 2,88						
4.	BAM-HA 30:70	14,80 $\pm$ 0,30	8,27 $\pm$ 0,30						

5.	Bio-Oss Collagen	20,20 ± 4,20	9,87 ± 1,66					
6.	BAM	17,53 ± 0,30	8,93 ± 2,36					

Ket : * $p > 0,05$ = data normal

** $p > 0,05$ = varian data homogen

° $p < 0,05$ = ada perbedaan bermakna



Gambar 5.2.3. Perbandingan rerata sel osteoblas antar kelompok

Uji normalitas yang menunjukkan keseluruhan data normal ($p>0,05$). Setelah uji normalitas, dilakukan uji homogenitas yang menunjukkan varian data tidak homogen ($p<0,05$) dan diteruskan dengan uji signifikansi anova. Uji signifikansi anova menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok ($p<0,05$). Uji di antara subjek menunjukkan adanya efek antara material yang berbeda dan antara waktu aplikasi yang berbeda ($p<0,05$), akan tetapi tidak ada hubungan antara material dengan waktu aplikasi ($p>0,05$) (Tabel 5.2.1). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan anova dua jalan jalan *post hoc Tukey*. Tabel 5.2.2, menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan ($p<0,05$). Penelitian ini terlihat aplikasi material BAM-HA pada soket tulang alveolar dapat meningkatkan proliferasi osteoblas.

Tabel 5.2.2. Analisis statistik *Two Way ANOVA Post Hoc Tukey* sel osteoblas

Kelompok	Kontrol Negatif	BAM-HA 40:60	BAM-HA 35:65	BAM-HA 30:70	Bio-Oss Collagen	BAM
Kontrol Negatif	-	*0,029	*0,000	*0,005	*0,000	*0,000
BAM-HA 40:60	-	-	0,529	0,975	*0,003	0,180
BAM-HA 35:65	-	-	-	0,917	0,155	0,977
BAM-HA 30:70	-	-	-	-	*0,019	0,539
Bio-Oss Collagen	-	-	-	-	-	0,478
BAM	-	-	-	-	-	-

Ket : $p<0,05$ = ada perbedaan bermakna

Osteoblas adalah sel yang penting dalam penyembuhan tulang. Sel osteoblas akan meningkatkan pertumbuhan tulang pada area defek dengan mensintesis matriks tulang yang selanjutnya akan mengalami remineralisasi (Khotib *et al.*, 2021). Akhir fase inflamasi, pelepasan faktor-faktor pertumbuhan oleh makrofag menyebabkan aktifnya sel osteoblas dan fase proliferasi dari proses penyembuhan luka dimulai (Araujo *et al.*, 2015), (Gomes *et al.*, 2019). Sel osteoblas ini muncul pada saat fase proliferasi dan berlanjut hingga fase *remodeling* tulang (Gomes *et al.*, 2019), (Mizoguchi & Ono, 2021).

Penelitian hari ke-14 menunjukkan, nilai rata-rata dan standar deviasi sel osteoblas pada kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:75, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan sebesar $(8,23 \pm 0,26)$, $(13,43 \pm 0,26)$, $(15,83 \pm 2,26)$, $(14,80 \pm 0,30)$, $(20,20 \pm 4,20)$, dan $(17,53 \pm 0,30)$. Hasil penelitian ini menunjukkan pada hari ke-14 proses penyembuhan tulang didominasi dengan aktivitas sel osteoblas (Vieira *et al.*, 2015). Penelitian ini sejalan dengan penelitian (Olaitan *et al.*, 2019) mengatakan bahwa penyembuhan tulang alveolar pada hari ke-14 setelah pencabutan gigi menunjukkan adanya aktivitas proliferasi sel osteoblas yang merupakan indikator dari pembentukan tulang baru. Pada hari ke-28, rata-rata dan standar deviasi sel osteoblas terlihat menurun pada seluruh kelompok. Nilai rerata dan standar deviasi kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:75, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan sebesar $(6,73 \pm 0,30)$, $(8,17 \pm 0,38)$, $(8,67 \pm 2,88)$, $(8,27 \pm 0,30)$, $(9,87 \pm 1,66)$, dan $(8,93 \pm 2,36)$. Hasil ini selaras dengan penelitian Hanafiah *et al.* (2022) yang menyatakan bahwa sel osteoblas mengalami penurunan dari hari ke-14 sampai hari ke-28. Penurunan jumlah proliferasi sel osteoblas ini disebabkan karena sel osteoblas berubah menjadi sel osteoblas matang yaitu osteosit (Olaitan *et al.*, 2019).

Kelompok BAM-HA (40:60, 35:65, 30:70) secara statistik menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$) jumlah sel osteoblas hari ke-14 dan ke-28 yang lebih tinggi dibandingkan dengan pada kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan). Kandungan dalam BAM-HA memiliki potensi untuk meningkatkan proses penyembuhan luka setelah pencabutan gigi pada soket tulang alveolar yang ditandai dengan aktivitas osteoblas. BAM mengandung faktor pertumbuhan yang memiliki peran penting dalam proses penyembuhan luka yang mampu merangsang pertumbuhan regenerasi tulang alveolar setelah pencabutan gigi (Faadhila *et al.*, 2021). Kandungan HA mirip dengan komposisi tulang dan gigi dan mampu merangsang pertumbuhan tulang (Naini *et al.*, 2022).

Kandungan SLPI pada BAM akan berikatan pada makrofag sehingga memengaruhi faktor pertumbuhan FGF yang juga dapat mempercepat migrasi fibroblas (Munadzirroh, *et al.*, 2022). Terjadinya migrasi fibroblas dapat mendorong angiogenesis, yaitu terbentuknya pembuluh darah baru (Gomes *et al.*, 2019). Pembentukan pembuluh darah baru merupakan tanda memasuki fase proliferasi yang memungkinkan sel punca mesenkim berdiferensiasi menjadi osteoblas untuk menghasilkan tulang (Shrivats *et al.*, 2013). Pada fase proliferasi, progenitor sel osteoblas menunjukkan aktivitas *Alkaline Phosphatase* (ALP) dan dianggap sebagai pre osteoblas. Transisi pre osteoblas menjadi osteoblas ditandai dengan peningkatan ekspresi *Osterix* (Osx) dan sekresi protein matriks tulang. Selain itu, sel osteoblas mengalami perubahan morfologi menjadi besar dan berbentuk kuboid (Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simoes, *et al.*, 2015).

Kristal HA dapat berperan sebagai ligan yang mengaktifkan reseptor pensinyalan dan meningkatkan ekspresi faktor transkripsi osteogenik yang menunjukkan diferensiasi osteogenik. Stimulasi osteoblas oleh HA dapat melalui jalur pensinyalan *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK). (Khotib *et al.*, 2021). Fibronektin yang terkandung pada BAM dapat berinteraksi dengan HA dan mengaktifkan jalur ERK (Xu *et al.*, 2020). Jalur pensinyalan ERK dapat distimulasi juga dengan adanya interaksi HA

dengan *fibroblast growth factor receptor* (FGFr). FGFr akan mengikat ligan berperan untuk mengaktivasi *mitogen activated protein kinases* (MAPKs). (Ha *et al.*, 2017). Peningkatan jumlah sel osteoblas terjadi dengan adanya interaksi BAM-HA melalui jalur persinyalan ERK menandakan stimulus penyembuhan tulang alveolar menjadi lebih cepat.

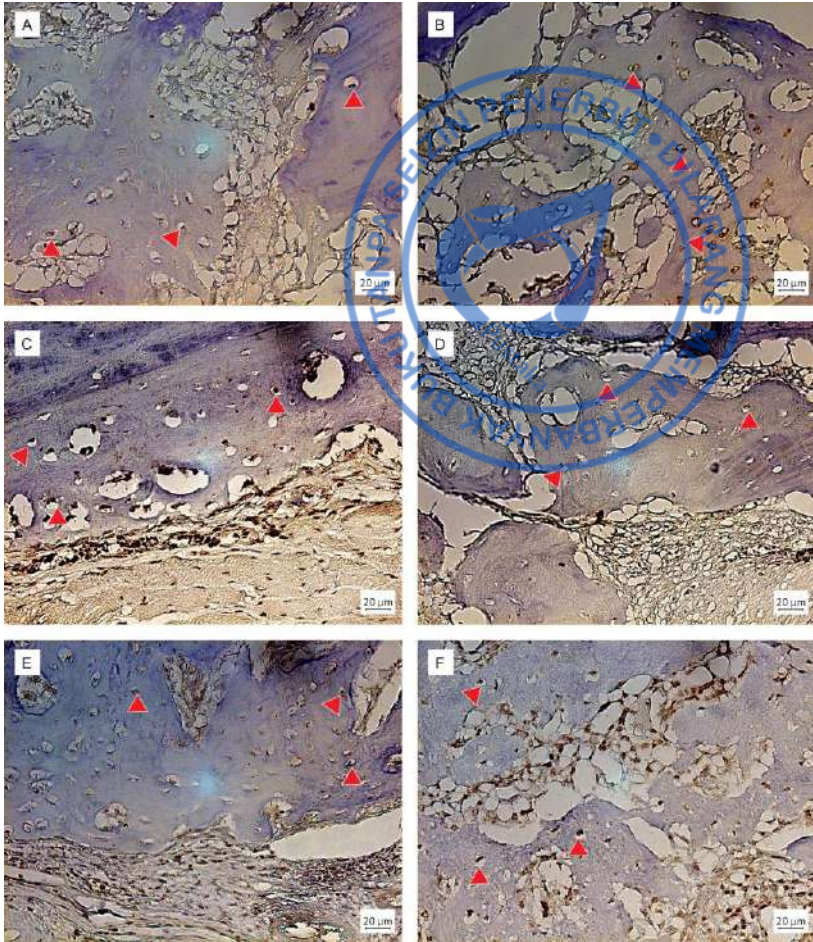
Kelompok Bio-Oss *Collagen* menunjukkan nilai rerata proliferasi sel osteoblas yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok BAM-HA (40:60, 35:65, 30:70) secara bermakna ($p < 0.05$). Hal tersebut dapat terjadi dikarenakan Bio-Oss *Collagen* memiliki kandungan yang terdiri dari 90% *Deproteinized Bovine Bone Mineral* (DBBM). DBBM ini mengandung unsur kalsium dan fosfat yang tinggi dibandingkan biokomposit BAM-HA (Tabel 5.2.2). Kalsium dan fosfat merupakan unsur pembentuk tulang alveolar, semakin tinggi unsur ini akan semakin meningkatkan proliferasi sel osteoblas (Gheisari *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Fan *et al.* (2021) mengatakan bahwa Bio-Oss *Collagen* menunjukkan kemampuan yang baik untuk mempertahankan volume tulang alveolar dan membantu pembentukan tulang baru yang ditandai dengan proliferasi osteoblas. Soket tulang alveolar yang tidak diberikan bahan HA dan DBBM mengalami reduksi tulang tiga kali lebih besar. Material ini mampu membantu proses penyembuhan tulang alveolar setelah pencabutan gigi dengan mengurangi terjadinya resorpsi tulang alveolar (Araújo & Lindhe, 2009).

C. Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2)

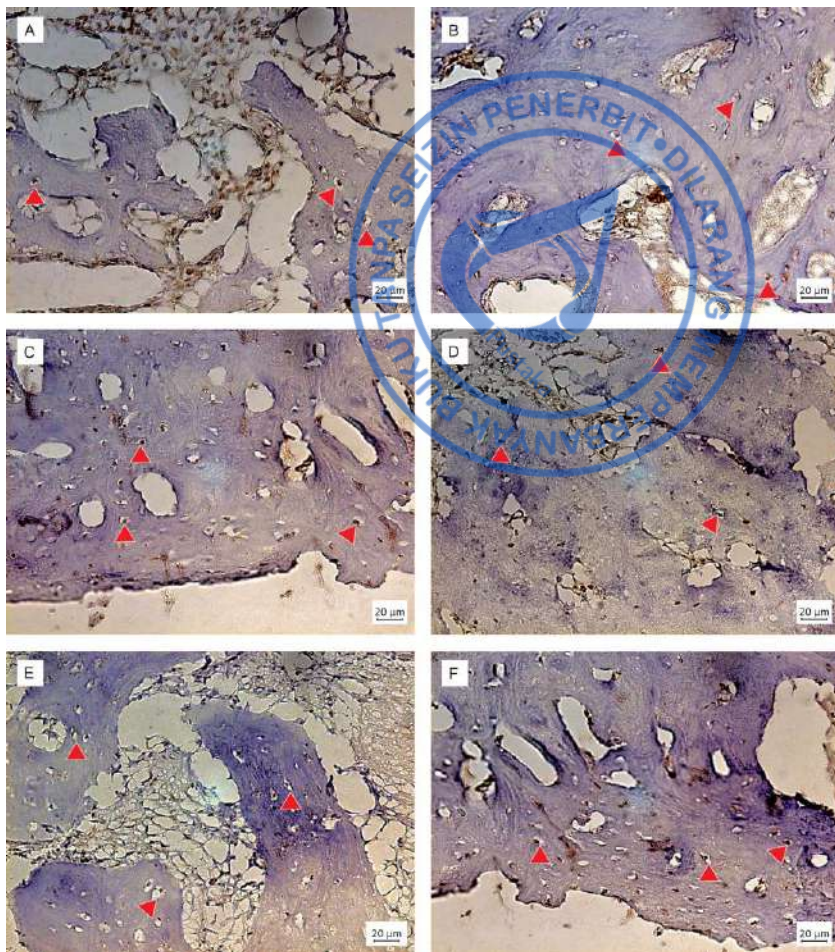
Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2) adalah kelompok faktor pertumbuhan yang berperan sebagai *marker* dalam pembentukan tulang dan kartilago. BMP-2 ini akan muncul pada saat penyembuhan dan regenerasi dari tulang (Stuckensen *et al.*, 2019). BMP-2 merekrut sel punca untuk penyembuhan tulang, menstimulasi angiogenesis, dan menyebabkan diferensiasi sel punca menjadi osteoblas (Sularsih & Wahjuningsih, 2015). Protein ini adalah sitokin yang merupakan keluarga

besar (TGF- β). BMP-2 menunjukkan sifat osteogenik ini dengan mengaktifkan pensinyalan Smad1/5/8 dan mengatur transkripsi gen osteogenik, termasuk *distal-less homeobox 5* (Dlx5). Dlx5 merupakan mediator ekspresi *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) yang diinduksi BMP-2 (Jang *et al.*, 2012). BMP-2 memiliki sifat osteoinduktif dan meningkatkan Diferensiasi osteoblas dengan menurunkan ekspresi MyoD dan menstimulasi ekspresi RUNX2 (Nakamura, 2007).

Ekspresi BMP-2 dianalisis menggunakan analisa imunohistokimia. BMP-2 merupakan indikator dari penyembuhan tulang. Pewarnaan dengan antigen-antibodi BMP-2 dapat terlihat pewarnaan kecoklatan pada sitoplasma dan nukleus sel osteoblas, hipertrofi kondrosit.



Gambar 5.3.1. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi BMP-2 pada soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-14. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss *Collagen*, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan ekspresi BMP-2



Gambar 5.3.2. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi BMP-2 pada soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-28. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss *Collagen*, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan ekspresi BMP-2

Tabel 5.3.1. Hasil rerata dan standar deviasi analisa ekspresi BMP-2

No.	Kelompok	X ± SD		N	H	Sig. ANOVA	Interaksi		
		Hari ke-14	Hari ke-28				Material	Waktu	M*W
1.	Kontrol Negatif	5,93 ± 0,70	6,60 ± 1,11	0.066*	0,227**	0,000°	0,000°	0,004°	0,666
2.	BAM-HA 40:60	9,00 ± 1,40	9,13 ± 0,70						
3.	BAM-HA 35:65	10,66 ± 1,80	12,60 ± 2,42						
4.	BAM-HA 30:70	10,06 ± 0,30	12,00 ± 0,52						
5.	Bio-Oss Collagen	11,00 ± 0,20	13,80 ± 1,24						
6.	BAM	9,46 ± 0,50	11,73 ± 3,60						

Ket : * $p > 0,05$ = data normal

** $p > 0,05$ = varian data homogen

° $p < 0,05$ = ada perbedaan bermakna

Tabel 5.3.2. Analisis statistik *Two Way ANOVA Post Hoc Tukey* ekspresi BMP-2

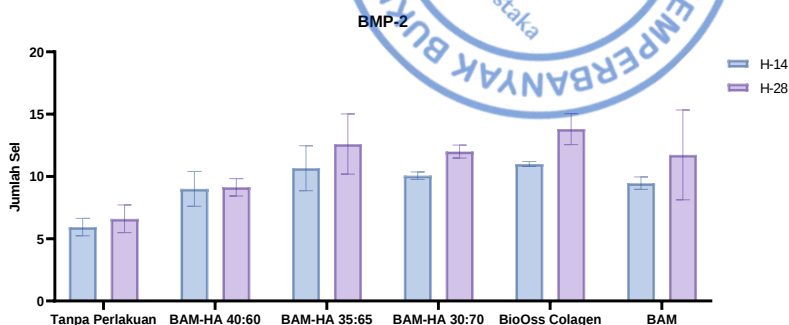
	Tanpa Perlakuan	Bio Oss Collagen	BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	BAM-HA 40:60	BAM
Tanpa Perlakuan	-	0.000*	0.000*	0.000*	0.044*	0.001*
Bio Oss Collagen	-	-	0.646	0.952	0.011*	0.360
BAM-HA 30:70	-	-	-	0.983	0.270	0.996
BAM-HA 35:65	-	-	-	-	0.078	0.851
BAM-HA 40:60	-	-	-	-	-	0.531
BAM	-	-	-	-	-	-

Ket : $p < 0.05$ = ada perbedaan bermakna

Gambar 5.3.1 (A-F) merupakan gambaran imunohistokimia ekspresi BMP-2 pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM di hari ke-14. Ekspresi BMP-2 ditandai sebagai sel kondroblas yang tersebar pada tulang alveolar (tanda panah). Gambaran ekspresi BMP-2 terlihat lebih tinggi pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan. Perhitungan nilai rata-rata dan standar deviasi (Tabel 5.3.2) ekspresi BMP-2 secara berurutan pada kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen* dan BAM memiliki nilai sebesar $(5,93 \pm 0,70)$, $(9,00 \pm 1,40)$, $(10,66 \pm 1,80)$, $(10,66 \pm 1,80)$, $(11,00 \pm 0,22)$, dan $(9,46 \pm 0,50)$ (Ariesta *et al*, 2023)

Hari ke-28 terlihat gambaran imunohistokimia ekspresi BMP-2 pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM pada Gambar (5.3.2 A-F).

Kelompok dengan perlakuan menunjukkan gambaran sel kondroblas yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tanpa perlakuan. Tabel 5.3.2 menunjukkan nilai rerata dan standar deviasi dari kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss Collagen, dan BAM secara berurutan yaitu $(6,60 \pm 1,11)$, $(9,13 \pm 0,70)$, $(12,60 \pm 2,42)$, $(12,00 \pm 0,52)$, $(13,80 \pm 1,24)$ dan $(11,73 \pm 3,60)$. Gambaran rerata antar kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.3.3.



Gambar 5.3.3. Perbandingan rerata ekspresi BMP-2 antar kelompok

Uji statistika diawali dengan uji normalitas yang menunjukkan keseluruhan data normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas dilakukan setelah semua data normal, penelitian ini menunjukkan varian data tidak homogen ($p < 0,05$) dan adanya perbedaan bermakna antar kelompok (sig anova $p < 0,05$). Uji di antara subjek menunjukkan adanya efek antara material yang berbeda dan antara waktu aplikasi yang berbeda ($p < 0,05$), akan tetapi tidak ada hubungan antara material dengan waktu aplikasi ($p > 0,05$) (Tabel 5.3.1). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan anova dua jalan *post hoc* Tukey. Pada Tabel 5.3.2, menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok

perlakuan ($p < 0.05$). Penelitian ini terlihat aplikasi material BAM-HA pada soket tulang alveolar dapat meningkatkan ekspresi BMP-2.

BMP-2 merupakan salah satu protein yang dapat menginduksi pembentukan tulang dan kartilago. BMP-2 dapat berperan dalam berbagai proses biologis sel osteoblas, antara lain proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis (Ma *et al.*, 2010).

Gambaran IHK pada hari ke-14 jumlah ekspresi BMP-2 pada kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:75, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan memiliki nilai rata-rata dan standar deviasi sebesar ($5,93 \pm 0,70$), ($9,00 \pm 1,40$), ($10,66 \pm 1,80$), ($10,66 \pm 1,80$), ($11,00 \pm 0,22$), dan ($9,46 \pm 0,50$). Pada hari ke-28, terlihat adanya peningkatan jumlah ekspresi pada kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:75, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan memiliki nilai rata-rata dan standar deviasi sebesar ($6,60 \pm 1,11$), ($9,13 \pm 0,70$), ($12,60 \pm 2,42$), ($12,00 \pm 0,52$), ($13,80 \pm 1,24$), dan ($11,73 \pm 3,60$). Peningkatan ekspresi BMP-2 pada penelitian ini terlihat berbeda bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Ekspresi BMP-2 akan mencapai puncaknya pada hari ke-14 sampai hari ke-28 pasca ekstraksi gigi. Pada hari ke-14, BMP-2 mulai membantu sel progenitor untuk berubah menjadi osteoblas. Pada hari ke-28, sel progenitor akan menjadi sel osteoblas yang sudah lebih padat dari sebelumnya dan mulai menjadi sel dewasa. Oleh karena itu, ekspresi BMP-2 pada hari ke-28 lebih tinggi dibandingkan pada hari-14 (Jovanovic *et al.*, 2003).

Analisa statistik menunjukkan kelompok BAM-HA (40:60, 35:65, 30:70) memiliki ekspresi BMP-2 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan ($p < 0,05$). Hal ini disebabkan karena BAM memiliki faktor pertumbuhan TGF β yang dapat menginduksi BMP-2. Jalur BMP atau TGF- β diperlukan untuk osteogenesis secara *in vitro* dan *in vivo*. BMP-2 adalah aktivator kuat pembentukan tulang. BMP-2 adalah protein

pleiotropik yang dapat memengaruhi satu atau lebih jalur pensinyalan yang terlibat dalam regenerasi tulang (Filová *et al.*, 2020). Saat BMP-2 berikatan dengan BMPR yang terletak di *lipid rafts*, *caveolae*, dan *clathrin coated pits* (CCPs), akan mengaktifkan BMPRII fosforilasi BMPRIa. Hal ini menyebabkan aktivasi jalur pensinyalan Smad atau jalur non-Smad. Jalur pensinyalan non-Smad, *Extracellular Signal-Related Kinase* (ERK), *Phosphatidylinositol 3-Kinase* (PI3K), dan *transforming growth factor- β -activated kinase 1/binding protein 1* (TAB1/TAK1) akan diaktifkan. Semua jalur ini akan menyebabkan peningkatan diferensiasi *mesenchymal stem cells* (MSCs) dan osteoprogenitor menjadi osteoblas (Halloran *et al.*, 2020). Jalur pensinyalan ERK akan meningkatkan ekspresi gen BMP-2, BMP-4, dan BMP-7 yang sangat penting dalam diferensiasi osteoblas selama osteogenesis. Ekspresi BMP-2 yang tinggi menunjukkan adanya inisiasi penyembuhan soket tulang alveolar yang lebih cepat (Gomes *et al.*, 2019).

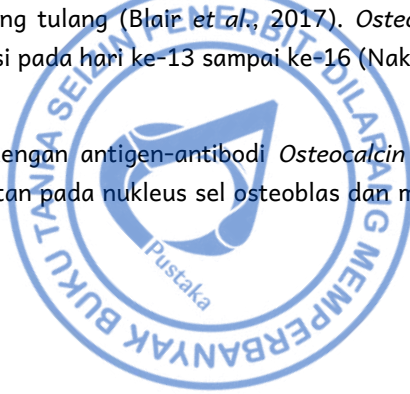
Penelitian pada kelompok perlakuan Bio-Oss *Collagen* ini menunjukkan rerata ekspresi BMP-2 yang tertinggi diantara kelompok-kelompok lain baik pada hari-14 maupun sampai hari-28 ($p < 0,05$). Hal ini kemungkinan disebabkan kandungan HA yang tinggi pada Bio-Oss *Collagen* apabila dibandingkan BAM-HA (40:60, 35:65 dan 30:70). Ion kalsium dan fosfat yang lebih tinggi pada kandungan HA akan meningkatkan proliferasi sel osteoblas. Peningkatan proliferasi sel osteoblas akan merangsang peningkatan ekspresi BMP-2 untuk pembentukan tulang baru (Khotib *et al.*, 2021).

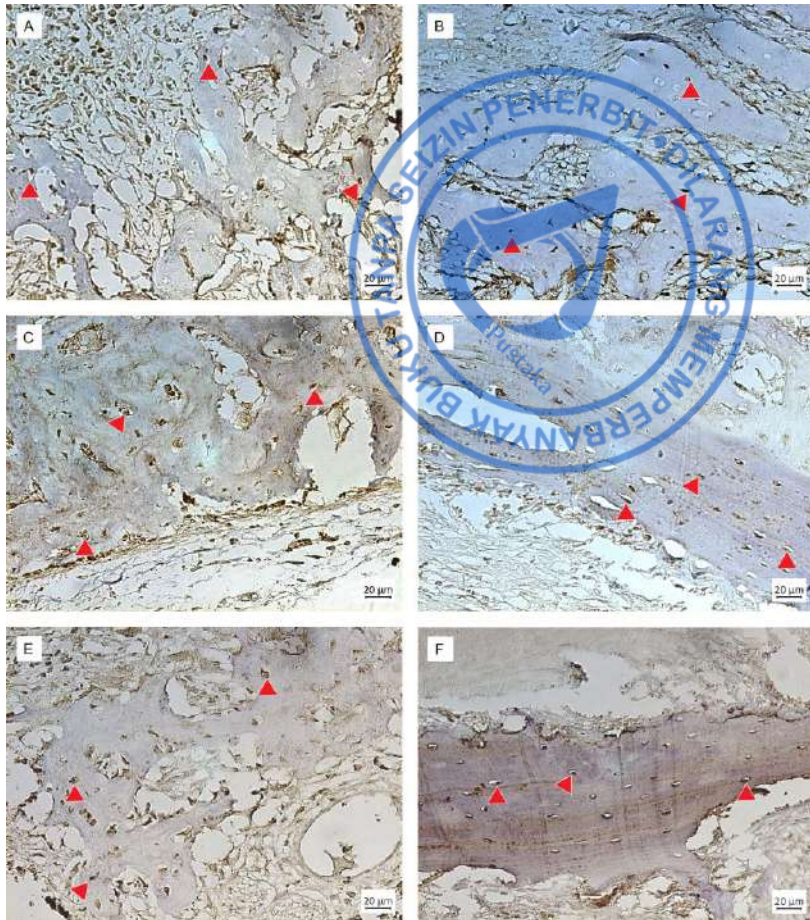
D. Osteocalcin

Osteocalcin adalah protein spesifik pada tulang yang disintesa oleh osteoblas. Protein ini adalah marker yang baik pada maturasi osteogenik. Saat penyembuhan tulang, deposit *Osteocalcin* pertama kali terdeteksi pada tahap diferensiasi di hari ke-13. Protein ini memiliki peran penting

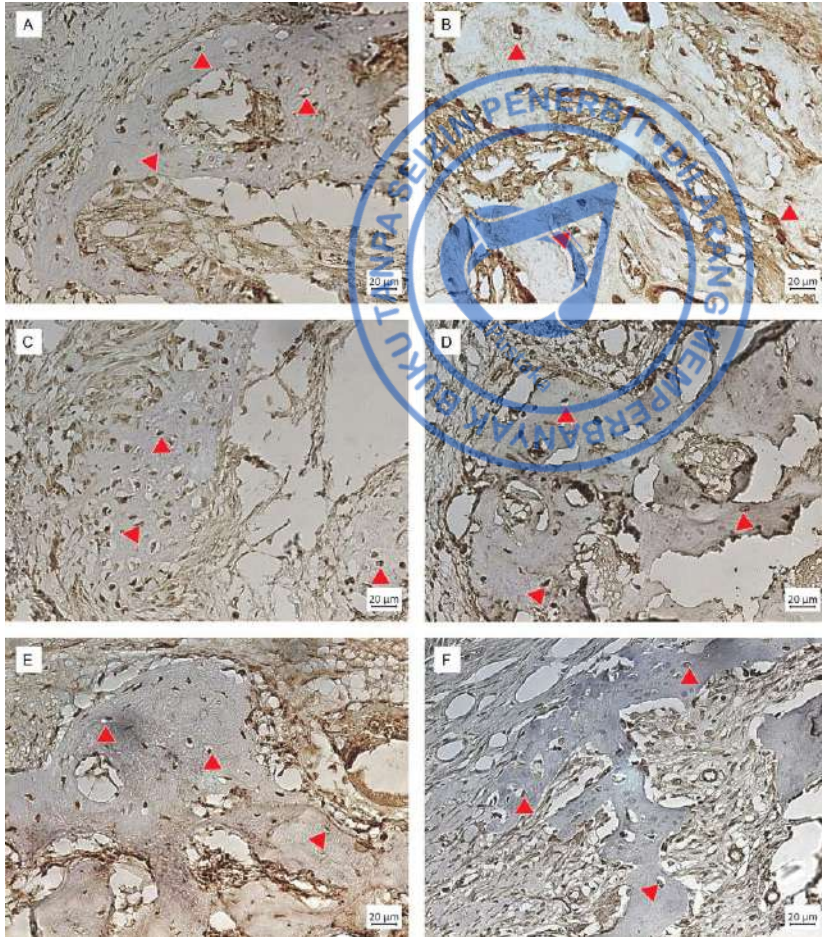
dalam menghubungkan matriks organik dan mineral, juga berperan sebagai indikator aktivitas dari osteoblas dan sebagai molekul pengirim sinyal dalam proses remodeling tulang (Blair *et al.*, 2017). *Osteocalcin* pada saat kalsifikasi terdeteksi pada hari ke-13 sampai ke-16 (Nakamura *et al.*, 2009).

Pewarnaan histokimia dengan antigen-antibodi *Osteocalcin* dapat terlihat warna merah kecoklatan pada nukleus sel osteoblas dan matriks tulang.





Gambar 5.4.1. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi Osteocalcin pada soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-14. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss Collagen, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan ekspresi Osteocalcin



Gambar 5.4.2. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi *Osteocalcin* pada soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-28. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss *Collagen*, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan ekspresi *Osteocalcin*

Tabel 5.4.1. Hasil rerata dan standar deviasi analisa ekspresi
Osteocalcin

No.	Kelompok	X ± SD		N	H	Sig ANOVA	Interaksi		
		Hari ke-14	Hari ke-28				Material	Waktu	M*W
1.	Kontrol Negatif	6,26 ± 0,46	7,80 ± 0,80	0,461*	0,913**	0,000°	0,000°	0,000°	0,997
2.	BAM-HA 40:60	8,53 ± 0,64	9,80 ± 0,52						
3.	BAM-HA 35:65	9,93 ± 0,80	11,26 ± 1,17						
4.	BAM-HA 30:70	9,06 ± 0,70	10,46 ± 1,52						
5.	Bio-Oss Collagen	10,66 ± 0,80	12,26 ± 1,79						
6.	BAM	9,53 ± 0,11	11,33 ± 0,70						

Ket : * $p > 0,05$ = data normal

** $p > 0,05$ = varian data homogen

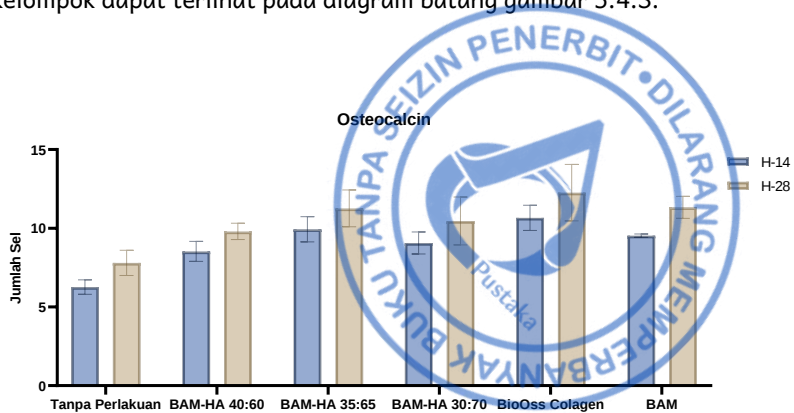
° $p < 0,05$ = ada perbedaan bermakna

Tabel 5.4.2. Analisis Statistik *Two Way ANOVA Post Hoc Tukey* Ekspresi *Osteocalcin*

	Tanpa Perlakuan	Bio Oss Collagen	BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	BAM-HA 40:60	BAM
Tanpa Perlakuan	-	0.000*	0.001*	0.000*	0.008*	0.000*
Bio Oss Collagen	-	-	0.048*	0.616	0.004*	0.432
BAM-HA 30:70	-	-	-	0.653	0.878	0.824
BAM-HA 35:65	-	-	-	-	0.131	1.000
BAM-HA 40:60	-	-	-	-	-	0.227
BAM	-	-	-	-	-	-

Gambar 5.4.1 dan 5.4.2 merupakan gambaran ekspresi *Osteocalcin* pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM di hari ke-14 dan 28. Ekspresi *Osteocalcin* ditandai dengan adanya sel osteosit pada permukaan tulang alveolar. Gambaran ekspresi *Osteocalcin* terendah terdapat kelompok tanpa perlakuan (Gambar 5.4.1A) apabila dibandingkan dengan kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM (Gambar 5.4.1 B-F). Jumlah ekspresi *Osteocalcin* dari kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan memiliki rerata ($6,26 \pm 0,46$), ($8,53 \pm 0,64$), ($9,93 \pm 0,80$), ($9,06 \pm 0,70$), ($10,66 \pm 0,80$) dan ($9,53 \pm 0,11$) (Tabel 5.4.2). Ekspresi *Osteocalcin* terlihat meningkat pada hari ke-28. (Gambar 5.4.2 A-F) Rerata dan standar deviasi ekspresi *Osteocalcin* pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan adalah ($7,80 \pm 0,80$), ($9,80 \pm 0,52$), ($11,26 \pm 1,17$), ($10,46 \pm$

1,52), (12,26 ± 1,79), dan (11,33 ± 0,70). Perbandingan rerata antar kelompok dapat terlihat pada diagram batang gambar 5.4.3.



Gambar 5.4.3. Perbandingan rerata ekspresi RUNX2 antar kelompok

Uji normalitas yang menunjukkan keseluruhan data normal ($p > 0,05$). Setelah uji normalitas, dilakukan uji homogenitas yang menunjukkan varian data tidak homogen ($p < 0,05$) dan diteruskan dengan uji signifikansi anova. Uji signifikansi anova menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok ($p < 0,05$). Uji di antara subjek menunjukkan adanya efek antara material yang berbeda dan antara waktu aplikasi yang berbeda ($p < 0,05$), akan tetapi tidak ada hubungan antara material dengan waktu aplikasi ($p > 0,05$) (Tabel 5.4.1). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan anova dua jalan jalan *post hoc* Tukey. Pada Tabel 5.4.2 menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Penelitian ini terlihat aplikasi material BAM-HA pada soket tulang alveolar dapat meningkatkan ekspresi *Osteocalcin*.

Osteocalcin merupakan hasil sekresi dari osteoblas matang yaitu osteosit (Komori, 2022). *Osteocalcin* disekresikan oleh osteoblas dan

berperan dalam regulasi metabolisme tubuh dan pro-osteoblastik atau pembentukan tulang (Renno *et al.*, 2012).

Gambaran IHK pada hari ke-14 jumlah ekspresi *Osteocalcin* menunjukkan peningkatan dengan adanya aplikasi material biokomposit BAM HA dengan berbagai rasio apabila dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan. Nilai rerata dan standar deviasi pada kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:75, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan memiliki nilai rata-rata dan standar deviasi sebesar ($6,26 \pm 0,46$), ($8,53 \pm 0,64$), ($9,93 \pm 0,80$), ($9,06 \pm 0,70$), ($10,66 \pm 0,80$), dan ($9,53 \pm 0,11$). Ekspresi *Osteocalcin* pada hari ke-28 terlihat adanya peningkatan pada keseluruhan kelompok. Nilai rerata dan standar deviasi kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:75, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM memiliki rerata secara berurutan yaitu ($7,80 \pm 0,80$), ($9,80 \pm 0,52$), ($11,26 \pm 1,17$), ($10,46 \pm 1,52$), ($12,26 \pm 1,79$), dan ($11,33 \pm 0,70$) (Tabel 5.15). Peningkatan *Osteocalcin* dari hari ke-14 sampai hari ke-28 terlihat adanya perbedaan bermakna secara statistik ($p < 0,05$). Hal ini disebabkan karena *Osteocalcin* diekspresikan dalam tahap akhir diferensiasi dari osteoblas dewasa dan merupakan mayoritas protein non-kolagen dari matriks tulang (Hirata *et al.*, 2005).

Kelompok dengan aplikasi material BAM-HA (40:60, 35:65 dan 30:70) memiliki nilai *Osteocalcin* yang lebih tinggi dibandingkan tanpa perlakuan dan berbeda bermakna secara statistika ($p < 0,05$). Hal ini dapat disebabkan faktor pertumbuhan BMP-2 akan mengaktifkan transkripsi RUNX2 melalui jalur ERK. RUNX2 sebagai “gen induk” osteogenesis akan mengatur ekspresi protein non-kolagen seperti *Osteocalcin*. *Osteocalcin* muncul ditahap akhir diferensiasi osteoblas dengan mengikat Ca dengan matriks tulang dan menginduksi mineralisasi (Beck, 2003). Peningkatan kalsium akan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi osteoblas yang menyebabkan ekspresi *Osteocalcin* meningkat (Gong *et al.*, 2017). Peningkatan *Osteocalcin* dengan aplikasi BAM-HA (40:60, 35:65, 30:70)

akan meningkatkan terjadinya remineralisasi yang menandai pembentukan tulang baru menjadi lebih cepat.

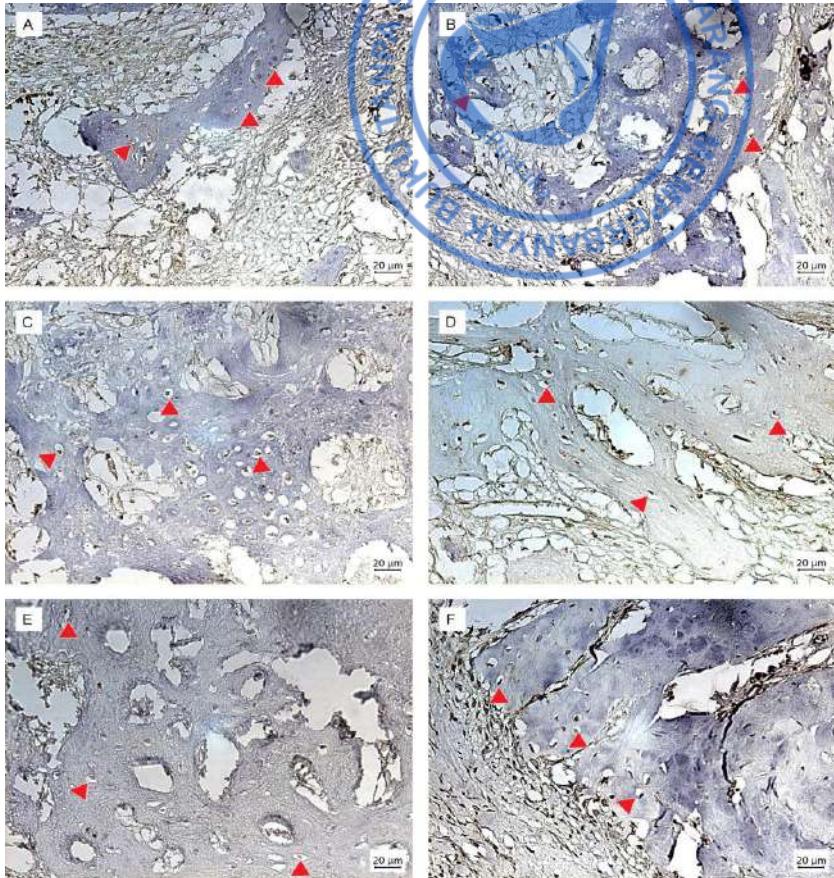
Kelompok Bio-Oss *Collagen* pada penelitian ini menunjukkan nilai rerata ekspresi *Osteocalcin* yang lebih tinggi secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok BAM-HA (40:60, 35:65, 30:70). Hal ini dapat disebabkan kandungan HA yang lebih tinggi pada Bio-Oss *Collagen* dibandingkan biokomposit BAM-HA aplikasi Bio-Oss *Collagen* yang memiliki efek osteogenik lokal yang signifikan. HA menyediakan ion kalsium yang cukup untuk memfasilitasi mineralisasi. Tingginya ion kalsium akan meningkatkan ekspresi dari *osteocalcin*, sehingga dapat meningkatkan efek pembentukan tulang baru (Wong & Rabie, 2010).

E. RUNX2

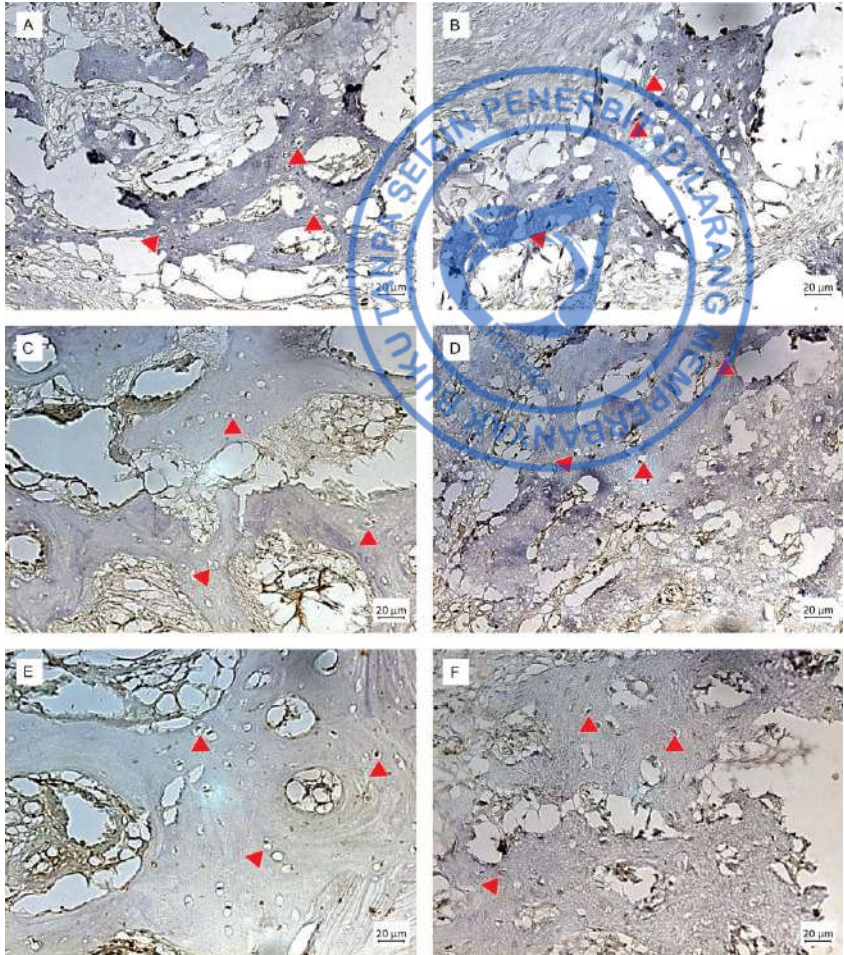
RUNX2 merupakan faktor transkripsi yang berperan terhadap hipertrofi kondrosit, pembentukan tulang endokondral, dan invasi pembuluh darah ke kartilago. RUNX2 juga mengatur diferensiasi pluripotent sel mesenkim menjadi osteoblas. Ekspresi RUNX2 dalam sel ikat menunjukkan terjadinya diferensiasi osteoblas atau transkripsi gen untuk pembentukan kolagen tipe 1 (Pereira *et al.*, 2017). RUNX2 mengatur ekspresi dari beberapa gen osteblastik, termasuk kolagen tipe I, osteopontin, *osteocalcin*, dan sialoprotein tulang dengan mengikat *osteoblas-specific cis-acting element 2* (OSE2; ACCACA) (Jang *et al.*, 2012). RUNX2 adalah anggota keluarga *domain runt* dari faktor transkripsi dan penting dalam diferensiasi dan proliferasi sel punca mesenkim dalam transisinya ke sel osteoprogenitor. RUNX2 juga dikenal sebagai faktor pengikat inti 1 (CBF α 1), (PEBP2 α A), dan AML3. Sel osteoprogenitor, preosteoblas, osteoblas, dan osteosit mengekspresikan RUNX2. Ekspresi RUNX2 terdeteksi pada membran nukleus di beberapa sel monositik di koagulum, di nukleus beberapa osteoblas atau preosteoblas pada tulang alveolar, dan di sitoplasma sel vaskular di ligamen periodontal (Sato & Takaoka, 2015).

Secara biologi molekuler, RUNX2 mengatur proses diferensiasi osteoblas pada tahapan yang berbeda. Regulasi oleh RUNX2 berlangsung dengan baik pada tahap awal diferensiasi, RUNX2 akan menghambat proses pada tahap selanjutnya (Gambar 2.20). Keseluruhan proses dari MSC yang tidak berdiferensiasi menjadi osteoblas terjadi dalam fase yang berbeda dan masing-masing fase ini dikarakterisasi oleh pola tertentu dari ekspresi gen penanda osteoblas. RUNX2 mengontrol ekspresi gen penanda osteoblas dengan mengikat ke OSE2, tempat pengikatan RUNX2, ditemukan di regio promotor dari semua gen penanda osteoblas utama. (Bruderer *et al.*, 2014).

RUNX2 merupakan indikator dari penyembuhan tulang. Pada preparat imunohistokimia dapat terlihat berwarna merah kecoklatan pada sel osteoblas dan osteosit.



Gambar 5.5.1 Gambaran Imunohistokimia Ekspresi RUNX2 pada soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-14. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss Collagen, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan ekspresi *RUNX2*



Gambar 5.5.2. Gambaran Imunohistokimia Ekspresi RUNX2 pada soket tulang alveolar tikus SD pada hari ke-28. (A) Tanpa Perlakuan, (B) BAM-HA 40:60, (C) BAM-HA 35:65, (D) BAM-HA 30:70, (E) Bio-Oss Collagen, dan (F) BAM. Tanda panah menunjukkan ekspresi RUNX2

Tabel 5.5.1. Hasil rerata dan standar deviasi analisa ekspresi RUNX2

No.	Kelompok	X ± SD		N	H	Sig ANOVA	Interaksi		
		Hari ke-14	Hari ke- 28				Material	Waktu	M*W
1.	Kontrol Negatif	7,73 ± 0,30	6,60 ± 0,20	0,167*	0,901**	0,000°	0,000°	0,000°	0,184
2.	BAM-HA 40:60	8,93 ± 0,23	8,82 ± 0,60						
3.	BAM-HA 35:65	10,06 ± 0,23	8,93 ± 0,75						
4.	BAM-HA 30:70	9,06 ± 0,64	8,66 ± 0,30						
5.	Bio-Oss Collagen	12,26 ± 1,44	9,86 ± 0,98						
6.	BAM	10,40 ± 0,40	9,26 ± 0,30						

Ket : * $p > 0,05$ = data normal

** $p > 0,05$ = varian data homogen

° $p < 0,05$ = ada perbedaan bermakna

Tabel 5.5.2. Analisis statistik *two way ANOVA post hoc tukey* ekspresi RUNX2

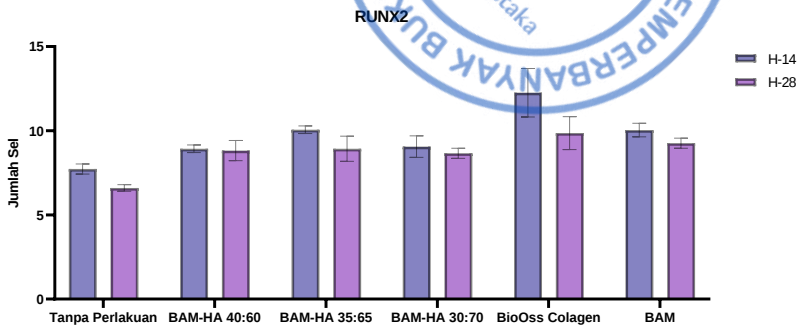
	Tanpa Perlakuan	Bio Oss Collagen	BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	BAM-HA 40:60	BAM
Tanpa Perlakuan	-	0.000*	0.002*	0.000*	0.011*	0.000*
Bio Oss Collagen	-	-	0.000*	0.004*	0.000*	0.031*
BAM-HA 30:70	-	-	-	0.545	0.964	0.137
BAM-HA 35:65	-	-	-	-	0.164	0,944
BAM-HA 40:60	-	-	-	-	-	0.025*
BAM	-	-	-	-	-	-

Ket : $p < 0.05$ = ada perbedaan bermakna

Gambar 5.5.1 merupakan gambaran ekspresi RUNX2 pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM pada hari ke-14. Ekspresi RUNX2 ditandai dengan adanya sel osteosit pada permukaan tulang alveolar. Gambaran ekspresi RUNX2 terendah terdapat kelompok tanpa perlakuan (Gambar 5.5.1A), apabila dibandingkan dengan kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM (Gambar 5.5.1 B-F). Jumlah ekspresi RUNX2 dari kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen* dan BAM secara berurutan memiliki rerata ($7,73 \pm 0,30$), ($8,93 \pm 0,23$), ($10,06 \pm 0,23$), ($9,06 \pm 0,64$), ($12,26 \pm 1,44$) dan ($10,40 \pm 0,40$) (Tabel 5.5.2).

Gambar 5.5.2 (A-F) merupakan ekspresi RUNX2 pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM pada hari ke-28. Pada hari ke-28,

gambaran ekspresi RUNX2 menurun apabila dibandingkan pada hari ke-14. Rerata dan standar deviasi ekspresi RUNX2 pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan adalah ($6,60 \pm 0,20$), ($8,82 \pm 0,60$), ($8,93 \pm 0,75$), ($8,66 \pm 0,30$), ($9,86 \pm 0,98$), dan ($9,26 \pm 0,30$) (Tabel 5.5.2). Persentase antar kelompok hari ke-14 dan hari ke-28 dapat terlihat dari gambaran diagram batang (Gambar 5.5.3).



Gambar 5.5.3. Perbandingan rerata ekspresi RUNX2 antar kelompok

Uji normalitas yang menunjukkan keseluruhan data normal ($p > 0,05$). Setelah uji normalitas, dilakukan uji homogenitas yang menunjukkan varian data tidak homogen ($p < 0,05$) dan diteruskan dengan uji signifikansi anova. Uji signifikansi anova menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok ($p < 0,05$). Uji di antara subjek menunjukkan adanya efek antara material yang berbeda dan antara waktu aplikasi yang berbeda ($p < 0,05$), akan tetapi tidak ada hubungan antara material dengan waktu aplikasi ($p > 0,05$) (Tabel 5.5.1). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan anova dua jalan *post hoc* Tukey. Pada Tabel 5.5.2, menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok tanpa

perlakuan dengan kelompok perlakuan ($p < 0.05$). Penelitian ini terlihat aplikasi material BAM-HA pada soket tulang alveolar dapat meningkatkan ekspresi RUNX-2.

RUNX2 adalah faktor transkripsi fundamental untuk perkembangan tulang (Komori, 2022). RUNX2 penting untuk diferensiasi osteoblas dan osteogenesis (Renno *et al.*, 2012) yang mul teridentifikasi pada saat pembentukan preosteoblas (Maruyama *et al.*, 2007).

Jumlah ekspresi RUNX2 pada hari ke-14 dari kelompok tanpa perlakuan, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan memiliki rerata ($7,73 \pm 0,30$), ($8,93 \pm 0,23$), ($10,06 \pm 0,23$), ($9,06 \pm 0,64$), ($12,26 \pm 1,44$) dan ($10,40 \pm 0,40$). Penelitian ini menunjukkan, pada hari ke-28 terjadi penurunan nilai rerata ekspresi RUNX2 pada kelompok tanpa perlakuan, kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM secara berurutan adalah ($6,60 \pm 0,20$), ($8,82 \pm 0,60$), ($8,93 \pm 0,75$), ($8,66 \pm 0,30$), ($9,86 \pm 0,98$) dan ($9,26 \pm 0,30$) (Tabel 5.5.1).

Penelitian ini aplikasi BAM-HA (40:60, 35:65 dan 30:70) dibandingkan tanpa perlakuan menunjukkan adanya peningkatan ekspresi RUNX2 yang berbeda bermakna ($p < 0.05$). Hal ini dapat dikarenakan BAM yang mengandung faktor pertumbuhan menyebabkan diferensiasi osteoblas menjadi lebih cepat. TGF- β pada BAM akan meningkatkan ekspresi BMP-2 yang berakibat meningkatnya osteoprogenitor (Wang *et al.*, 2019; Bruderer *et al.*, 2014). TGF- β akan mengaktifkan SMAD3 dan menginduksi RUNX2 melalui jalur ERK yang berfungsi mengubah Osteoprogenitor menjadi pre-osteoblas. Selain itu, ekspresi FGF pada BAM melalui reseptor Fgfr1 dapat meningkatkan ekspresi RUNX2 (Bruderer *et al.*, 2014).

RUNX2 penting dalam diferensiasi sel punca mesenkim menjadi sel osteoprogenitor selama osteogenesis awal tetapi tidak selama tahap pematangan tulang. RUNX2 berfungsi terutama dalam diferensiasi sel

punca mesenkim untuk menjadi sel osteoprogenitor fibroblastik segera setelah pencabutan gigi (Sato & Takaoka, 2015). Ekspresi RUNX2 dapat diidentifikasi secara terbatas pada sel-sel yang terletak di pinggir kondensasi mesenkim yang berdiferensiasi menjadi sel osteoblas. Sel-sel kondrosit yang terletak di pusat, secara bertahap kehilangan ekspresi RUNX2 (Bruderer *et al.*, 2014). Penurunan ekspresi RUNX2 yang terlihat pada semua kelompok perlakuan di hari ke-28 penelitian ini, hal ini kemungkinan disebabkan terbentuknya *tumor necrosis factor ligand superfamily member 11* (TNFSF11) atau *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) yang dapat menyebabkan resorpsi tulang (Komori, 2022). Pada saat diferensiasi, osteoblas yang belum matang akan menjadi matang dengan adanya stimulasi dengan RUNX2 dan menghasilkan *Osteocalcin*. *Osteocalcin* akan bekerja secara berlawanan dengan RUNX2 (Bruderer *et al.*, 2014). Ketika RUNX2 mensintesis *Osteocalcin*, ekspresi RUNX2 akan menurun (Halloran *et al.*, 2020). Ekspresi RUNX2 yang berlebihan akan menyebabkan ekspresi FGF4 dan FGF8 dalam epitel terganggu sehingga pembentukan *ectodermal ridge* (AER) apikal terganggu. (Kawane *et al.*, 2018). Aplikasi BAM-HA akan meningkatkan ekspresi BMP-2 dan RUNX2 pada hari ke-14, sehingga akan terjadi peningkatan proliferasi kondroblas dan osteoblas.

Aplikasi Bio-Oss *Collagen* meningkatkan ekspresi RUNX2 apabila dibandingkan dengan BAM-HA (60:40, 35:65, 40:60) secara bermakna ($p < 0,05$) (Octarina, *et al.*, 2024). Tingginya unsur kalsium dan fosfat pada Bio-Oss *Collagen* akan menstimulasi osteoblas lebih cepat untuk berdeferensiasi. RUNX2 adalah faktor transkripsi yang mengekspresikan sel osteoblas. Semakin cepat osteoblas berdiferensiasi, semakin cepat menstimulasi RUNX2 yang menyebabkan ekspresi RUNX2 akan meningkat (Khotib *et al.*, 2021).

RINGKASAN

Material preservasi soket tulang alveolar dibutuhkan untuk mempertahankan keadekuatan tulang alveolar terhadap resorpsi yang terjadi setelah dilakukan pencabutan gigi. Pembuatan biokomposit *bovine amniotic membrane* dengan hidroksiapatit (BAM-HA) diharapkan berpotensi sebagai material preservasi soket tulang alveolar. Biokomposit BAM-HA ini dibuat dengan tujuan menggabungkan dua sifat material yang berbeda untuk saling melengkapi dan memiliki sifat sinergisme untuk meningkatkan penyembuhan dan pembentukan tulang alveolar pasca pencabutan gigi.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni yang dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah pembuatan biokomposit BAM-HA, kemudian dilakukan uji karakterisasi dengan *Fourier Transform Infrared* (FTIR), *Scanning Electron Microscopy* (SEM), *Energy-dispersive X-ray spectroscopy* (EDS), persentase porositas, dan persentase *swelling*. Penelitian tahap kedua adalah aplikasi pada soket tulang alveolar hewan coba tikus *Sprague Dawley* (SD) untuk melihat mekanisme osteogenesis dengan melihat gambaran preparat histologi dan imunohistokimia dari ketebalan kolagen, sel osteoblas, ekspresi BMP-2, *Osteocalcin*, dan RUNX2.

Metode penelitian tahap pertama adalah pembuatan dan karakterisasi biokomposit BAM-HA. BAM kering dan bubuk HA dipersiapkan masing-masing sebanyak 3:7 gr (30:70), 3,5:6,5 gr (35:65), dan 4:6 gr (40:60). BAM direndam dalam larutan saline kemudian di blender sampai membentuk bubur amnion kemudian ditambahkan bubuk HA. Setelah BAM tercampur rata dengan HA dimasukkan ke dalam wadah kemudian dilakukan *freeze* dengan suhu -80°C dan *freeze drying* dengan suhu -100°C . Biokomposit BAM-HA yang dibuat berbentuk spons kemudian

di sterilisasi dengan sinar gamma 25 kGy. Sampel biokomposit kemudian di preparasi dan dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif. Kelima kelompok tersebut antara lain BAM-HA 30:70, 40:60, dan 35:65, Bio-Oss *Collagen*, dan BAM. Karakterisasi biokomposit BAM-HA dengan berbagai rasio dipersiapkan untuk analisa menggunakan FTIR, SEM, EDX, persentase porositas, dan persentase *swelling*.

Hasil penelitian pada tahap I, grafik FTIR BAM-HA 30:70, 40:60, dan 35:65 penyerapan gelombang infra-merah ketiga sampel menyerupai kontrol positif (Bio-Oss *Collagen*) dan kontrol negatif (BAM). Biokomposit BAM-HA memiliki gugus fungsi yang sama dengan kontrol negatif dan kontrol positif yaitu gugus fungsi amida I, II, III, A, B, dan OH-, PO_4^{3-} , dan CO_3^{2-} . Mikrograf SEM dari keseluruhan sampel tampak terlihat adanya porus-porus pada permukaan sampel. Partikel HA tampak menyatu dengan BAM mengisi celah-celah di antara porus-porus. Pada sampel BAM dan BAM-HA rasio 40:60 terlihat gambaran yang hampir mirip, terlihat porus-porus kecil yang tidak beraturan dan merata di permukaan sampel. Pada BAM memiliki ukuran rerata porus 89.096 μm dan pada BAM-HA 40:60 memiliki ukuran rerata porus 72.424 μm . Semakin tinggi kandungan HA menunjukkan gambaran permukaan sampel yang semakin padat, porus semakin besar, akan tetapi jumlah porus semakin berkurang. BAM-HA 35:65 ukuran rerata porus 155.625 μm , BAM-HA 30:70 ukuran rerata porus 153.025 μm , dan Bio-Oss *Collagen* ukuran rerata porus 136.312 μm . Pada Uji EDS, berbagai rasio BAM-HA, dan Bio-Oss *Collagen* menunjukkan adanya unsur-unsur kalsium, fosfor, magnesium, karbon, oksigen, natrium. Semakin tinggi jumlah HA akan meningkatkan unsur-unsur kalsium, fosfor, dan magnesium. Semakin tinggi jumlah BAM, akan meningkatkan jumlah unsur karbon dan oksigen. Persentase porositas tertinggi dimiliki kelompok BAM dan biokomposit BAM-HA 40:60. Sedangkan, persentase porositas terendah dimiliki Bio-Oss *Collagen* dan biokomposit BAM-HA 30:70. Penelitian ini menunjukkan semakin jumlah

porus dan tingginya kandungan BAM persentase *swelling* akan semakin meningkat.

Biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dibuat melalui metode sol gel yang meliputi fasa sol, gelasi sol, dan penghilangan fasa cair. Hasil analisa FTIR menunjukkan adanya gugus amida dan hidroksiapatit pada biokomposit BAM-HA, adanya gugus fungsi ini menunjukkan terjadi ikatan di antara kedua material. Analisa SEM struktur berpori yang bervariasi pada permukaan sampel. Metode *freeze drying* menyebabkan porus pada permukaan sampel. Rasio HA yang semakin tinggi pada setiap sampel menyebabkan porus menjadi lebih besar dan berat. Uji persentase porositas menunjukkan material ini dapat berperan sebagai pertumbuhan sel osteoblas. Uji *swelling* menunjukkan kemampuan dan potensi sebagai *scaffold* untuk regenerasi jaringan keras. Biokomposit BAM-HA rasio 35:65 memiliki potensi yang paling optimal sebagai material preservasi soket.

Tahap penelitian kedua dilakukan uji *in vivo*, aplikasi biokomposit BAM-HA pada hewan coba tikus *Sprague Dawley* (SD). Sebanyak 36 ekor tikus jantan dengan berat 250-300 gr dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan. Kelompok tersebut antara lain; tanpa perlakuan, BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, BAM, dan Bio-Oss *Collagen*. Setelah adaptasi selama 2 minggu, dilakukan pencabutan pada gigi insisivus pertama bawah kanan. Setelah pencabutan pada kelompok yang diberi perlakuan, sampel biokomposit BAM-HA dengan ukuran 3x10 mm dimasukkan sepanjang soket tulang alveolar gigi tikus dan dijahit dengan benang catgut 0,5 mm. Hari ke-14 dan ke-28 pasca pencabutan tikus di euthanasia, dilakukan pemotongan rahang bawah dan pengambilan bagian tulang alveolar. Tulang alveolar kemudian di fiksasi, dekalsifikasi, pembuatan blok parafin, dan pemotongan blok parafin dengan ketebalan 5 μ m untuk pembuatan preparat histologi dan imunohistokimia. Pewarnaan preparat histologi untuk menganalisis ketebalan kolagen menggunakan *Masson Trichome* dan proliferasi osteoblas dengan

Hematoxylin Eosin. Pewarnaan preparat imunohistokimia menggunakan antigen-antibodi BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2 (Affinity Biosciences, Inc. USA).

Hasil penelitian tahap II analisa histologi adalah analisa ketebalan kolagen dan proliferasi osteoblas. Ketebalan kolagen terlihat meningkat pada hari ke-14 dengan aplikasi biokomposit BAM-HA dan menurun pada hari ke-28. Penurunan ini dapat disebabkan kolagen mulai tergantikan dengan matriks tulang. Proliferasi sel osteoblas pada hari ke-14 terlihat adanya peningkatan pada kelompok aplikasi BAM-HA apabila dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan. Jumlah sel osteoblas terlihat menurun pada hari ke-28, hal ini disebabkan sel osteoblas menjadi sel osteoblas yang matang yaitu osteosit. Analisa imunohistokimia pada penelitian ini adalah ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*. Ekspresi BMP-2 mengalami peningkatan pada hari ke-14 dan ke-28 pada kelompok aplikasi biokomposit BAM-HA. Ekspresi RUNX-2 terlihat meningkat pada hari ke-14 dan terlihat menurun pada hari ke-28. Ekspresi *Osteocalcin* terjadi peningkatan dari hari ke-14 dan hari ke-28.

BAM memiliki faktor pertumbuhan, EGF, VEGF, FGF, TGF- β , dan PDGF. TGF- β menstimulasi aktivitas fibroblas dan sekresi FGF. FGF berikatan pada reseptor tirosin kinase, mendorong autofosforilasi pada reseptor dan fosforilasi posterior pada serin, treonin, dan residu tirosin pada protein target spesifik seperti Raf-1, MAPK/Erk kinase MEK, dan ERK. Sekresi FGF akan menyebabkan migrasi fibroblas meningkat dan merangsang pembentukan kolagen pada luka pencabutan. Kolagen akan membentuk struktur pada jaringan dan menstimulus percepatan penyembuhan luka pencabutan. Migrasi fibroblas mendorong angiogenesis, tanda memasuki fase proliferasi yang memungkinkan sel punca mesenkim berdiferensiasi menjadi osteoblas untuk menghasilkan tulang. Pada fase proliferasi, progenitor sel osteoblas menunjukkan *Aktivitas Alkaline Phosphatase* (ALP) dan dianggap sebagai pre-osteoblas. Kristal HA dapat berperan sebagai ligan yang mengaktifkan reseptor

pensinyalan dan meningkatkan ekspresi faktor transkripsi osteogenik. Stimulasi osteoblas oleh HA melalui jalur pensinyalan ERK. Fibronectin yang terkandung pada BAM berinteraksi dengan HA dan mengaktifkan jalur ERK. Jalur pensinyalan ERK juga dapat distimulasi dengan adanya interaksi HA dengan FGFr. FGFr akan mengikat ligan berperan untuk mengaktifkan MAPKs. Peningkatan jumlah sel osteoblas terjadi dengan adanya interaksi BAM-HA melalui jalur pensinyalan ERK menandakan stimulus penyembuhan tulang alveolar menjadi lebih cepat.

Ekspresi BMP-2 terlihat lebih tinggi pada kelompok dengan aplikasi BAM-HA. Faktor pertumbuhan $TGF\beta$ menginduksi BMP-2. BMP-2 berikatan dengan BMPR yang akan mengaktifkan BMPRII. Hal ini menyebabkan aktivasi jalur pensinyalan ERK. Aktivasi jalur akan menyebabkan peningkatan diferensiasi MSCs dan osteoprogenitor menjadi osteoblas. Jalur pensinyalan ERK akan meningkatkan ekspresi gen BMP-2 yang sangat penting dalam diferensiasi osteoblas selama osteogenesis. Ekspresi BMP-2 yang tinggi menunjukkan adanya inisiasi penyembuhan soket tulang alveolar yang lebih cepat. BMP-2 akan mengaktifkan transkripsi RUNX2 melalui jalur ERK. Penurunan ekspresi RUNX2 ke-28 disebabkan terbentuknya TNFSF11 atau RANKL yang dapat menyebabkan resorpsi tulang. RUNX2 Sebagai “gen induk” osteogenesis akan mengatur ekspresi protein non-kolagen seperti *Osteocalcin*. Ketika RUNX2 mensintesis *Osteocalcin*, ekspresi RUNX2 akan menurun. *Osteocalcin* muncul ditahap akhir diferensiasi osteoblas dengan mengikat kalsium dengan matriks tulang dan menginduksi mineralisasi. Peningkatan kalsium akan meningkatkan proliferasi dan diferensiasi osteoblas yang menyebabkan ekspresi *osteocalcin* meningkat.

Penelitian ini membuat Biokomposit antara BAM dengan HA dengan berbagai perbandingan rasio 30:70, 35:65, dan 40:60. Analisa karakteristik FTIR gugus fungsi dari kolagen yaitu amida I, II, III, A, B. Gugus fungsi PO_4^{3-} , dan CO_3^{2-} yang merupakan parameter dari HA. Karakteristik SEM pada keseluruhan sampel menunjukkan adanya porus-

porus pada permukaan sampel. Ukuran porus yang paling optimal untuk regenerasi jaringan tulang adalah pada BAM-HA 35:65 dan 40:60. Analisa EDS menunjukkan adanya unsur-unsur kalsium, fosfor, magnesium, dan natrium. Persentase porositas terbaik dimiliki pada biokomposit BAM-HA dengan rasio 35:65. Kandungan BAM akan meningkatkan kemampuan *swelling*. Aplikasi BAM-HA pada soket tulang alveolar dapat meningkatkan ketebalan kolagen pada hari ke-14 dan menurun di hari ke-28 yang menandai mulai terjadinya pembentukan tulang baru. Pertumbuhan sel osteoblas terlihat pada hari ke-14 dan menjadi osteoblas matang pada hari ke-28. Ekspresi BMP-2 dan *Osteocalcin* terlihat meningkat pada hari ke-14 dan 28, sedangkan ekspresi RUNX2 pada hari ke-28 terjadi penurunan. Ekspresi BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2 pada penelitian ini merupakan penanda terjadinya peningkatan mekanisme regenerasi tulang alveolar. Hal ini menunjukkan aplikasi BAM-HA pada soket tulang alveolar setelah pencabutan dapat berpotensi sebagai material preservasi soket tulang alveolar.

Hasil penelitian ini menunjukkan biokomposit BAM-HA 35:65 memiliki karakteristik sebagai *scaffold* regenerasi tulang alveolar dan memiliki mekanisme osteogenesis yang ditandai dengan adanya peningkatan kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2, dan *Osteocalcin*, sehingga material ini memiliki potensi sebagai material preservasi soket tulang alveolar. Aplikasi biokomposit BAM-HA 35:65 pada soket tulang alveolar setelah pencabutan dapat meningkatkan regenerasi tulang alveolar, sehingga diharapkan rehabilitasi fungsi dan estetik dari restorasi pada pasien implan akan menjadi lebih baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott, R. D., & Kaplan, D. L. (2016). Engineering Biomaterials for Enhanced Tissue Regeneration. *Current Stem Cell Reports*, 2(2), 140–146.
- Abdullah, M., & Khairurrijal, K. (2009). Review: Karakterisasi Nanomaterial. *J. Nano Saintek*, 2(1), 1–9.
- Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, 10, S96–S101.
- Anjarsari, Dahlan, K., Suptijah, P., & Kemala, T. (2016). Sintesis dan Karakterisasi Biokomposit BCP/Kolagen Sebagai Material Perancah Tulang. *Jphpi*, 19(3), 356–361.
- Antoniac, I. V., Antoniac, A., Vasile, E., Tecu, C., Fosca, M., Yankova, V. G., & Rau, J. V. (2021). In vitro characterization of novel nanostructured collagen-hydroxyapatite composite scaffolds doped with magnesium with improved biodegradation rate for hard tissue regeneration. *Bioactive Materials*, 6(10), 3383–3395.
- Araújo, M. G., & Lindhe, J. (2009). Ridge preservation with the use of Bio-Oss® collagen: A 6-month study in the dog. *Clinical Oral Implants Research*, 20(5), 433–440.
- Araujo, M. G., Silva, C. O., Monica, M., & Sukekava, F. (2015). Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontology 2000*, 68, 122–134.
- Ardhiyanto, H. B. (2012). Peran hidroksiapatit sebagai material. *Stomatognathic Jurnal Kedokteran Gigi*, 9(1), 13–15.

- Ariani, MD, Yuliati, A & Adiarto, T 2009, 'Toxicity testing of chitosan from tiger prawn shell waste on cell culture', *Dent J. (Maj. Ked. Gigi)*, vol. 42, no. 1, pp. 16, 99-100.
- Ariesta G.A., Octarina, Munadzirah E., Handharyani E. (2023). Pengaruh aplikasi bovine amniotic membrane pada soket tulang alveolar terhadap ekspresi BMP-2: studi eksperimental. *Jurnal Kedokteran Gigi (JKG) Universitas Padjajaran*. 25(7), 141-146.
- Arifin, A., Mahyudin, F., & Edward, M. (2020). The Clinical and Radiological Outcome of Bovine Hydroxyapatite (Bio Hydrox) As Bone Graft. (*JOINTS*) *Journal Orthopaedi and Traumatology Surabaya*, 9(1), 9.
- Aslanturk, OS, 2018, 'In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages', *Genotoxicity – A Predictable Risk To Our Actual World*, pp. 1-4.
- Bal, Z., Kaito, T., Korkusuz, F., & Yoshikawa, H. (2020). Bone regeneration with hydroxyapatite-based biomaterials. *Emergent Materials*, 3(4), 521-544.
- Ballesteros, A. C. V., Puello, H. R. S., Lopez-Garcia, J. A., Bernal-Ballen, A., Mosquera, D. L. N., Forero, D. M. M., Charry, J. S. S., & Bejarano, Y. A. N. (2020). Bovine decellularized amniotic membrane: Extracellular matrix as scaffold for mammalian skin. *Polymers*, 12(3).
- Beck, G. R. (2003). Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(2), 234-243.
- Berliana S., Octarina. (2024). Aggregatibacter actinomycetemcomitans dan Porphyromonas gingivalis: Bakteri Destruksi Tulang Alveolar. *Jurnal Kedokteran Gigi terpadu (JKGT)*. 6 (1), 28-30.

- Blair, H. C., Larrouture, Q. C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., Tuan, R. S., Robinson, L. J., Schlesinger, P. H., & Nelson, D. J. (2017). Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 23(3), 268-280.
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, 30(10), 546-554.
- Boskey, A. L., & Villarreal-Ramirez, E. (2017). Intrinsically Disordered Proteins and Biomineralization. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139-148.
- Brasinika, D., Tsigkou, O., Tsetsekou, A., & Missirlis, Y. F. (2016). Bioinspired synthesis of hydroxyapatite nanocrystals in the presence of collagen and L-arginine: Candidates for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 104(3), 458-469.
- Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Role and regulation of runx2 in osteogenesis. *European Cells and Materials*, 28, 269-286.
- Budhy, T. I., Sumaryono, B., & Suardita, K. (2017). BMP-2 Expression of Post Tooth Extraction that Catfish Oil Application. *The Veterinary Medicine International Conference 2017 Volume*, 69-76.
- Badan Pengawasan Obat dan Makanan RI. (2014). Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Non klinik Secara In Vivo. Jakarta: Badan Pengawasan Obat dan Makanan RI. Hal. 3-4, 9, 11-12, 28-32.

- Catauro, M., & Cipriotti, S. V. (2021). Characterization of hybrid materials prepared by sol-gel method for biomedical implementations. A critical review. *Materials*, 14(7).
- Chandrasekar, A., Sagadevan, S., & Dakshnamoorthy, A. (2013). Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite (n-HAP) using the wet chemical technique. *International Journal of Physical Sciences*, 8(32), 1639–1645.
- Chen, L., Wu, Z., Zhou, Y., Li, L., Wang, Y., Wang, Z., Chen, Y., & Zhang, P. (2017). Biomimetic porous collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(37), 1–8.
- Cheng, A., Berridge, J. P., McGary, R. T., Erley, K. J., & Johnson, T. M. (2019). The Extraction Socket Management Continuum: A Hierarchical Approach to Dental Implant Site Development. *Clinical Advances in Periodontics*, 9(2), 91–104.
- Chopra, A., & Thomas, B. S. (2013). Amniotic Membrane: A Novel Material for Regeneration and Repair. *Journal of Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering*, 18(1), 1–8.
- Choudhary, O. P., Husbandry, A., & Choudhary, P. (2017). Scanning Electron Microscope : Advantages and Disadvantages in Imaging Scanning Electron Microscope : Advantages and Disadvantages in Imaging Components. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, May.
- Cunniffe, G. M., Dickson, G. R., Partap, S., Stanton, K. T., & O'Brien, F. J. (2010). Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 21(8), 2293–2298.

- Danilevicius, P., Georgiadi, L., Pateman, C. J., Claeysens, F., Chatzinikolaidou, M., & Farsari, M. (2015). The effect of porosity on cell ingrowth into accurately defined, laser-made, polylactide-based 3D scaffolds. *Applied Surface Science*, 336, 2–10.
- De Araújo, R., Lôbo, M., Trindade, K., Silva, D. F., & Pereira, N. (2019). Fibroblast Growth Factors: A Controlling Mechanism of Skin Aging. *Skin Pharmacology and Physiology*, 32(5), 275–282.
- De Campos Vidal, B., & Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42(3), 283–289.
- Delina, M., Aisah, N., & Gustiono, D. (2018). Pembuatan Graft Tulang Dengan Proses Ekstraksi Senyawa Hidroksiapatit Dari Tulang Korteks Sapi. *Jurnal Fisika Dan Aplikasinya*, 3(April), 31–36.
- Dewey, M. J., Johnson, E. M., Slater, S. T., Milner, D. J., Wheeler, M. B., & Harley, B. A. C. (2020). Mineralized collagen scaffolds fabricated with amniotic membrane matrix increase osteogenesis under inflammatory conditions. *Biorxiv*, 217.
- Dey, P. (2020). Bone mineralisation. In B. Č. and H. F. M. David G. Churchill, Maja Dutour Sikirić (Ed.), *Contemporary Topics about Phosphorus in Biology and Materials* (1st ed.). IntechOpen.
- Dhand, C., Ong, S. T., Dwivedi, N., Diaz, S. M., Venugopal, J. R., Navaneethan, B., Fazil, M. H. U. T., Liu, S., Seitz, V., Wintermantel, E., Beuerman, R. W., Ramakrishna, S., Verma, N. K., & Lakshminarayanan, R. (2016). Bio-inspired in situ crosslinking and mineralization of electrospun collagen scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 104, 323–338.

- Dimitriou, R., Mataliotakis, G. I., Calori, G. M., & Giannoudis, P. V. (2012). The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: Current experimental and clinical evidence. *BMC Medicine*, 10(81), 1–24.
- Edward, M., Dominica, H., Mahyudin, F., & Rantam, F. A. (2020). Differences of Bone Regeneration Using Bovine Hydroxyapatite and Bovine Hydroxyapatite With Freeze-Dried Platelet Rich Plasma Allograft in Bone Defect of Femoral White Rabbit. (*JOINTS*) *Journal Orthopaedi and Traumatology Surabaya*, 9(2), 34.
- Faadhila, T., Valentina, M., Munadzirah, E., Nirwana, I., Soekartono, H., & Surboyo, M. (2021). Bovine sponge amnion stimulates socket healing: A histological analysis. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 12(1), 99–103.
- Fadhlallah, P. M. El, Yuliati, A., Soesilawati, P., & Pitaloka, P. (2018). Biodegradation and Compressive Strength Test of Scaffold with Different Ratio as Bone Tissue Engineering Biomaterial. *Journal of International Dental and Medical Research*, 11(3), 1636–1639.
- Fan, Q., Zeng, H., Fan, W., Wu, T., Sun, J., Yan, Q., & Shi, B. (2021). Ridge preservation of a novel extraction socket applying Bio-Oss® collagen: An experimental study in dogs. *Journal of Dental Sciences*, 16(3), 831–839.
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., & Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8(9), 3191–3200.
- Filio P, Octarina, Komariah. Characterization of Fabricated Bovine Hydroxyapatite Crystal as Socket Preservation Material: An SEM-EDX and X-ray Diffraction Study. *World J Dent*. 2022;13(S-2):S175–S181.

- Filová, E., Tonar, Z., Lukášová, V., Buzgo, M., Litvinec, A., Rampichová, M., Beznoska, J., Plencner, M., Staffa, A., Daňková, J., Soural, M., Chvojka, J., Malečková, A., Králíčková, M., & Amler, E. (2020). Hydrogel containing anti-cd44-labeled microparticles, guide bone tissue formation in osteochondral defects in rabbits. *Nanomaterials*, 10(8), 1–27.
- Fitriani, F., Soetojo, A., & Subiwahjudi, A. (2019). Sitotoksitas Ekstrak Kulit Kakao (*Theobroma cacao*) terhadap Kultur Sel Fibroblas BHK-21. *Conservative Dentistry Journal*, 9(1), 54–65.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Hindiawi Publishing Corporation*, 7(6), 17–24.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells Rinaldo. *BioMed Research International*, 1–17.
- Freshney, R. I. 2011. *Animal cell Culture, A practical approach* 6th edition. IRL. Press: Washington DC.
- Freshney, RI 2010, *Culture of animal cells a manual of basic technique and specialized applications*, 6th edn, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 365–75, 402.
- Gheisari, H., Karamian, E., & Abdellahi, M. (2015). A novel hydroxyapatite-Hardystonite nanocomposite ceramic. *Ceramics International*, 41(4), 5967–5975.

- Ghilini, F., Fagali, N., Pissinis, D. E., Benítez, G., & Schilardi, P. L. (2021). Multifunctional Titanium Surfaces for Orthopedic Implants: Antimicrobial Activity and Enhanced Osseointegration. *ACS Applied Bio Materials*, 4(8), 6451–6461.
- Gholami, G. A., Najafi, B., Mashhadiabbas, F., Goetz, W., & Najafi, S. (2012). Clinical, histologic and histomorphometric evaluation of socket preservation using a synthetic nanocrystalline hydroxyapatite in comparison with a bovine xenograft: A randomized clinical trial. *Clinical Oral Implants Research*, 23(10), 1198–1204.
- Gomes, P. D. S., Daugela, P., Poskevicius, L., Mariano, L., & Helena, M. (2019). Molecular and Cellular Aspects of Socket Healing in the Absence and Presence of Graft Materials and Autologous Platelet Concentrates : a Focused Review. *Journal of Oral & Maxillofacial Reserch*, 10(3), 1–18.
- Gunasekaran, D., Thada, R., Felciya, G., Jeyakumar, S., Panneerselvam, N., Shanmugam, G., & Tiruchirapalli, U. (2020). International Journal of Biological Macromolecules Physicochemical characterization and self-assembly of human amniotic membrane and umbilical cord collagen : A comparative study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2920–2933.
- Ha, S. W., Park, J., Habib, M. M., & Beck, G. R. (2017). Nano-Hydroxyapatite Stimulation of Gene Expression Requires Fgf Receptor, Phosphate Transporter, and Erk1/2 Signaling. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(45), 39185–39196.

- Haaparanta, A. M., Järvinen, E., Cengiz, I. F., Ellä, V., Kokkonen, H. T., Kiviranta, I., & Kellomäki, M. (2014). Preparation and characterization of collagen/PLA, chitosan/PLA, and collagen/chitosan/PLA hybrid scaffolds for cartilage tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(4), 1129–1136.
- Halloran, D., Durbano, H. W., & Nohe, A. (2020). Developmental review bone morphogenetic protein-2 in development and bone homeostasis. *Journal of Developmental Biology*, 8(3).
- Hanafiah, O. A., Hanafiah, D. S., Dohude, G. A., Satria, D., Livita, L., Moudy, N. S., & Rahma, R. (2022). Effects of 3% binahong (Anredera cordifolia) leaf extract gel on alveolar bone healing in post-extraction tooth socket wound in Wistar rats (*Rattus norvegicus*). *F1000Research*, 10, 1–23.
- Hendrijantini, N., Sitalaksmi, R. M., Ari, M. D. A., Hidayat, T. J., Putri, P. A. N., & Sukandar, D. (2020). The expression of TNF-alpha, IL-1 beta, and IL-10 in the diabetes mellitus condition induced by the combination of spirulina and chitosan. *Bali Medical Journal*, 9(1), 22–26.
- Hirata, M., Yamaza, T., Mei, Y. F., & Akamine, A. (2005). Expression of osteocalcin and Jun D in the early period during reactionary dentin formation after tooth preparation in rat molars. *Cell and Tissue Research*, 319(3), 455–465.
- Hiratsuka, T., Uezono, M., Takakuda, K., Kikuchi, M., Oshima, S., Sato, T., Suzuki, S., & Moriyama, K. (2020). Enhanced bone formation onto the bone surface using a hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 108(2), 391–398.

- Holzapfel, B. M., Reichert, J. C., Schantz, J. T., Gbureck, U., Rackwitz, L., Nöth, U., Jakob, F., Rudert, M., Groll, J., & Hutmacher, D. W. (2013). How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(4), 581–603.
- Hodgson, E. A textbook of modern toxicology. 3rd ed. USA: John Wiley and Sons, Inc;2004:353
- Huang, W., Yang, S., Shao, J., & Li, Y. P. (2013). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Frontiers in Bioscience*, 12(8), 3068–3092.
- Im, J. H., Choi, C. H., Mun, F., Lee, J. H., Kim, H., Jung, W. K., Jang, C. H., & Kim, G. H. (2017). A polycaprolactone/fish collagen/alginate biocomposite supplemented with phlorotannin for hard tissue regeneration. *RSC Advances*, 7(4), 2009–2018.
- Indrawati, D. W., Munadzirah, E., Indah, T., Sulisetyawati, B., Mahardhika, P., & Fadhlallah, E. (2019). Sponge amnion potential in post tooth extraction wound healing by interleukin - 6 and bone morphogenetic protein - 2 expression analysis : An animal study. *Dental Research Journal*, 16, 283–288.
- Ismardianita, E., Elianora, D., Rosalina, W., Nofrike, L., & Khairani, V. Y. (2019). The effectiveness methanol extract clausena excavate on number of fibroblast and density of collagen fibers after tooth extraction. *Journal of Dentomaxillofacial Science*, 4(3), 170–175.
- Iviglia, G., Cassinelli, C., Torre, E., Baino, F., Morra, M., & Vitale-Brovarone, C. (2016). Novel bioceramic-reinforced hydrogel for alveolar bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 44, 97–109.

- Jang, W. G., Kim, E. J., Kim, D. K., Ryoo, H. M., Lee, K. B., Kim, S. H., Choi, H. S., & Koh, J. T. (2012). BMP2 protein regulates osteocalcin expression via Runx2-mediated Atf6 gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 287(2), 905–915.
- Jayanti, T. (2013). Uji Toksisitas Ekstrak Buah Delima Merah (*Punica granatum*) Pada Kultur Sel Fibroblas BHK-21 (Penelitian Eksperimental Laboratoris) (Doctoral dissertation, Universitas Airlangga).
- Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., Jia, X., Tang, J., & Cao, Y. (2020). DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components. *ACS Omega*, 5(15), 8572–8578.
- Jiawen, S., Janjun, Z., Dai, J., Dedong, Y., Hongbo, Y., Jun, S., Xudong, W., Shen, S., & Lihe, G. (2014). Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells and Its Application in Alveolar Defect Restoration. *Stem Cells Translation Medicine*, 3, 1526–1534.
- Jovanovic, S. A., Hunt, D. R., Bernard, G. W., Spiekermann, H., Nishimura, R., Wozney, J. M., & Wikesjö, U. M. E. (2003). Long-term functional loading of dental implants in rhBMP-2 induced bone: A histologic study in the canine ridge augmentation model. *Clinical Oral Implants Research*, 14(6), 793–803.
- Kaczmarek, B., & Sionkowska, A. (2018). Chitosan/collagen blends with inorganic and organic additive—A review. *Advances in Polymer Technology*, 37(6), 2367–2376.
- Kalangit R.B., Octarina. (2024). Metode uji sitotoksisitas biomaterial dengan bentuk scaffold padatan dan berpori spons. *Jurnal Kedokteran Gigi terpadu (JKGT)*. 6(1), 53-56.

- Kalsi, A. S., Kalsi, J. S., & Bassi, S. (2019). Alveolar ridge preservation: why, when and how. *British Dental Journal*, 227(4), 264–274.
- Kang, M., Choi, S., & Cho Lee, A. R. (2013). Effect of freeze dried bovine amniotic membrane extract on full thickness wound healing. *Archives of Pharmacal Research*, 36(4), 472–478.
- Kartikasari, N., Yuliati, A., & Kriswandini, I. L. (2016). Compressive strength and porosity tests on bovine hydroxyapatite-gelatin-chitosan scaffolds. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 49(3), 153.
- Kashi, A. M., Tahermanesh, K., Chaichian, S., Joghataei, M. T., Moradi, F., Tavangar, S. M., Najafabadi, A. S. M., Lotfibakhshaiesh, N., Beyranvand, S. P., Anvari-Yazdi, A. F., & Abed, S. M. (2014). How to Prepare Biological Samples and Live. *Galen Medical Journal*, 3(2), 63–80.
- Kattimani, V. S., Kondaka, S., & Lingamaneni, K. P. (2016). Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 7, BTRI.S36138.
- Kawane, T., Qin, X., Jiang, Q., Miyazaki, T., Komori, H., Yoshida, C. A., Matsuura-Kawata, V. K. dos S., Sakane, C., Matsuo, Y., Nagai, K., Maeno, T., Date, Y., Nishimura, R., & Komori, T. (2018). Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Scientific Reports*, 8(1), 1–17.
- Khalid, P., Suman, V. B., Shameema, S., Vinodini, N. A., Shela, R. P., & Chattergee, P. K. (2014). Analytical methods for nanomaterial characterization. *International Journal of Nano Dimension Analytical Methods for Nanomaterial Characterization*, 5(4), 309–320.

- Khotib, J., Gani, M. A., Budiati, A. S., Lestari, M. L. A. D., Rahadiansyah, E., & Ardianto, C. (2021). Signaling pathway and transcriptional regulation in osteoblasts during bone healing: Direct involvement of hydroxyapatite as a biomaterial. *Pharmaceuticals*, 14(7).
- Kim, H. W., Knowles, J. C., & Kim, H. E. (2005). Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 72(2), 136-145.
- Kim, J. Y., Choi, Y. M., Jeong, S. W., & Williams, D. L. (2009). Effect of bovine freeze-dried amniotic membrane (Amnisite-BA™) on uncomplicated canine corneal erosion. *Veterinary Ophthalmology*, 12(1), 36-42.
- Koizumi, N., Inatomi, T., Sotozono, C., Fullwood, N. J., Quantock, A. J., & Kinoshita, S. (2000). Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Current Eye Research*, 20(3), 173-177.
- Kołodziejaska, B., Kafalak, A., & Kolmas, J. (2020). Biologically Inspired Collagen / Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration — A Review. *Materials*, 13(1748), 1-17.
- Komori, T. (2022). Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10).
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549-559.

- Lee, J., & Yun, H. S. (2014). Hydroxyapatite-containing gelatin/chitosan microspheres for controlled release of lysozyme and enhanced cytocompatibility. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(9), 1255–1263.
- Li, Y., Sun, S., Gao, P., Zhang, M., Fan, C., Lu, Q., Li, C., Chen, C., Lin, B., & Jiang, Y. (2021). A tough chitosan-alginate porous hydrogel prepared by simple foaming method. *Journal of Solid State Chemistry*, 294, 121797.
- Liza, Y. M., Yasin, R. C., Maidani, S. S., & Zainul, R. (2018). *Sol Gel: Principle and Technique (a Review)*.
- Long, H., Ma, K., Xiao, Z., & Ren, X. (2017). Preparation and characteristics of gelatin sponges crosslinked by microbial transglutaminase. *PeerJ*, 1–18.
- López Angulo, D. E., & do Amaral Sobral, P. J. (2016). Characterization of gelatin/chitosan scaffold blended with aloe vera and snail mucus for biomedical purpose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 645–653.
- Loprinzi, C., Bensinger, W., & Peterson, D, 2014, Understanding and Managing Chemotherapy Side Effects, *Cancer Care*, pp.4–7.
- Lutzweiler, G., Halili, A. N., & Vrana, N. E. (2020). The overview of porous, bioactive scaffolds as instructive biomaterials for tissue regeneration and their clinical translation. *Pharmaceutics*, 12(7), 1–29.
- Ma, Y., Ma, L., Guo, Q., & Zhang, S. (2010). Expression of bone morphogenetic protein-2 and its receptors in epithelial ovarian cancer and their influence on the prognosis of ovarian cancer patients. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1), 1–6.

- Maji, K., Dasgupta, S., Pramanik, K., & Bissoyi, A. (2016). Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Biomaterials*, 2016(December 2015), 1-14.
- Mamede, A. C., Carvalho, M. J., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Maia, C. J., & Botelho, M. F. (2012). Amniotic membrane: From structure and functions to clinical applications. *Cell and Tissue Research*, 349(2), 447-458.
- Mardiyantoro, F., Prasetyaningrum, N., & Rahmastuti, H. T. (2020). Histopathological characteristics of dental socket healing on collagen density following use of pangas catfish (*Pangasius djambal*) gelatin. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 5(3), 120.
- Maruyama, Z., Yoshida, C. A., 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. *Developmental Dynamics*, 236(7), 1876-1890.
- Maryam, S., Effendi, N., & Kasmah, K. (2019). Produksi dan Karakterisasi Gelatin dari Limbah Tulang Ayam dengan Menggunakan Spektrofotometer Ftir (Fourier Transform Infra Red). *Majalah Farmaseutik*, 15(2), 96.
- Masrukan, Wagiyu, & Aditoiyanto. (1999). Pemeriksaan Mikrostruktur dan Analisis Unsur AIMgSil Menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM)-EDS. *Prosiding Seminar Nasional Hamburan Neutron Dan Sinar X*, 2, 79-82.

- Matsumine, H., Fujimaki, H., Takagi, M., Mori, S., Iwata, T., Shimizu, M., & Takeuchi, M. (2019). Full-thickness skin reconstruction with basic fibroblast growth factor-impregnated collagen-gelatin sponge. *Regenerative Therapy*, 11, 81-87.
- Md Saad, A. P., Abdul Rahim, R. A., Harun, M. N., Basri, H., Abdullah, J., Abdul Kadir, M. R., & Syahrom, A. (2017). The influence of flow rates on the dynamic degradation behaviour of porous magnesium under a simulated environment of human cancellous bone. *Materials and Design*, 122, 268-279.
- Md Saad, A. P., Prakoso, A. T., Sulong, M. A., Basri, H., Wahjuningrum, D. A., & Syahrom, A. (2019). Impacts of dynamic degradation on the morphological and mechanical characterisation of porous magnesium scaffold. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 18(3), 797-811.
- Meizarini A, Munadzirroh E, Rachmadi P. Sitotoksisitas bahan restorasi cyanoacrylate dengan variasi perbandingan powder dan liquid menggunakan MTT Assay. *Jurnal Penelitian Medika Eksakta*.2005, Vol 6 No.1:16-25
- Munadzirroh, E., Yuliati, A., & Ragilia, A. N. (2018). Cytotoxicity test of sponge amnion on BHK-21 fibroblast cell. *Journal of International Dental and Medical Research*, 11(3), 819-822.
- Milla, L. El, Indrani, D. J., & Irawan, B. (2018). Sintesis Dan Uji Porositas Scaffold Hidroksiapatit/Alginat. *ODONTO: Dental Journal*, 5(1), 49. <https://doi.org/10.30659/odj.5.1.49-53>
- Mizoguchi, T., & Ono, N. (2021). The diverse origin of bone-forming osteoblasts. *HHS Public Access*, 36(8), 1432-1447.

- Montalbano, G., Molino, G., Fiorilli, S., & Vitale-Brovarone, C. (2020). Synthesis and incorporation of rod-like nano-hydroxyapatite into type I collagen matrix: A hybrid formulation for 3D printing of bone scaffolds. *Journal of the European Ceramic Society*, 40(11), 3689–3697.
- Munadziroh, E., Askandar, M. G., Yuliati, A., Surboyo, M. D. C., & Wan Harun, W. H. A. (2022). The effect of secretory leukocyte protease inhibitor amnion membrane on incisional wound healing. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 12(3), 358–362.
- Munadziroh, E., Putri, G. A., Ristiana, V., Agustantina, T. H., Nirwana, I., Razak, F. A., & Surboyo, M. D. C. (2022). The Role of Recombinant Secretory Leukocyte Protease Inhibitor to CD163, FGF-2, IL-1 and IL-6 Expression in Skin Wound Healing. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 15(May), 903–910.
- Naini, A., Clarissa Astiasari, & Muhammad Nurul Amin. (2022). Socket Preservation with Hydroxyapatite Gypsum Puger Scaffold and Aloe vera on Fibroblast and Type 1 Collagen Cells. *Denta*, 16(1), 33–41.
- Nakamura, A., Dohi, Y., Akahane, M., Ohgushi, H., Nakajima, H., Funaoka, H., & Takakura, Y. (2009). Osteocalcin secretion as an early marker of osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 15(2), 169–180.
- Nakamura, H. (2007). Morphology of Bone Cells Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells. *Journal of Hard Tissue Biology*, 16(1), 15–22.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., & Ragadhita, R. (2019). How to read and interpret ftir spectroscopy of organic material. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 4(1), 97–118.

- Natto, Z. S., Parashis, A., Steffensen, B., Ganguly, R., Finkelman, M. D., & Jeong, Y. N. (2017). Efficacy of collagen matrix seal and collagen sponge on ridge preservation in combination with bone allograft: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(6), 649-659.
- Neel, E. A. A., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., Coathup, M., Young, A. M., Bozec, L., & Mudera, V. (2016). Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4743-4763.
- Niakan, A., Ramesh, S., Tan, C. Y., Purbolaksono, J., Chandran, H., & Teng, W. D. (2015). Effect of annealing treatment on the characteristics of bovine bone. *Journal of Ceramic Processing Research*, 16(2), 223-226.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., Seifalian, M., & Sciences, I. (2008). Properties Of The Amniontic Membrane For Potential Use In Tissue Engineering. *European Cells and Materials*, 88-99.
- Nireesha, G., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjana Babu, M., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/Freeze Drying -An Review. *Ijntps*, 3(4), 87-98.
- Nisar, N., Nilesh, K., Parkar, M. I., & Punde, P. (2020). Extraction socket preservation using a collagen plug combined with platelet-rich plasma (PRP): A comparative clinico-radiographic study. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 14(2), 139-145.
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88-95.

- Octarina, Berliana S., Kalangit R.B. (2024). Antibacterial and cytotoxic effects of fresh bovine amniotic membrane with hydroxyapatite (BAM-HA): a laboratory experiment. *Padjajaran Journal Of Dentistry*. 36(1), 92-102.
- Octarina, Munadziroh E. (2021). Potential of Bovine Amniotic Membrane and Hydroxyapatite as Biocomposite Materials for Enhanced Bone Formation. *Mal J Med Health Sci* 17(SUPP6): 124-126.
- Octarina, Munadziroh E., Razak F.A., Abbas B., Soekartono H., Agustantina T.A, Surboyo M.D.C. (2022). Characterization of Bovine Sponge Amnion (BSA) by a Novel Process for Dental Treatment. *JIDMR*. 15 (2), 479-484.
- Octarina, Munadziroh E. (2024). Characterization of Fresh Bovine Amnion Membrane Combined with Hydroxyapatite as Candidate Scaffold for Alveolar Bone Tissue Engineering. *Journal of Dentistry Indonesia*. 31(3), 208-214.
- Octarina, Munadziroh E. Razak F.A. (2021). Physical Modification of Bovine Amniotic Membrane for Dental Application. *JIDMR*. 14(4), 1425-1428.
- Octarina, Munadziroh E, Razak FA, Surboyo MDC. (2022). Characterisation of Bovine Amniotic Membrane with Hydroxyapatite Bio-Composite. *Coatings*. 12(1403),1-12.
- Octarina O, Munadziroh E, Razak FA, Handharyani E, Surboyo MDC. (2024) .The Role of Bovine Amniotic Membrane and Hydroxyapatite for the Ridge Preservation. *International Journal of Biomaterials*. 2024 1-12.
- Oki, A. S., Cantika, Z., & Zahra, A. (2022). *Differences in Collagen Density of Post-Tooth Extraction Socket after Aerobic and Anaerobic Physical Exercise in Wistar Rats (Rattus Novergicus)*. April, 1-8.

- Olaitan, O. H., Komolafe, O. A., Owotade, F. J., & Saka, O. S. (2019). Histologic Assessment of Extraction Sockets Following Tooth Extraction: Suitability of a Rabbit Model. *Nigerian Journal of Dental Research*, 4(1), 1-4.
- Oosterlaken, B. M., Vena, M. P., & de With, G. (2021). In Vitro Mineralization of Collagen. *Advanced Materials*, 2004418(33), 1-27.
- Pei, Y., Ye, D., Zhao, Q., Wang, X., Zhang, C., Huang, W., Zhang, N., Liu, S., & Zhang, L. (2015). Effectively promoting wound healing with cellulose/gelatin sponges constructed directly from a cellulose solution. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(August), 7518-7528.
- Pereira, R. dos S., Menezes, J. D., Bonardi, J. P., Griza, G. L., Okamoto, R., & Hochuli-Vieira, E. (2017). Histomorphometric and immunohistochemical assessment of RUNX2 and VEGF of Biogran™ and autogenous bone graft in human maxillary sinus bone augmentation: A prospective and randomized study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 19(5), 867-875.
- Peter, M., Binulal, N. S., Nair, S. V., Selvamurugan, N., Tamura, H., & Jayakumar, R. (2010). Novel biodegradable chitosan-gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*, 158(2), 353-361.
- Pramesti AR, Hikmawati D, A. N. (2014). Absorbent Dressing Sponge Berbasis Alginat-Kitosan Kurkumin Untuk Luka derajat Eksudat Sedang-Besar. *Jurnal Fisika Dan Terapannya*, 2(3), 89-111.
- Puspitasari, I. M. (2016). Teknik Pembuatan Kultur Sel Primer, Immortal Cell Line dan Stem Cell. *Farmaka*, 14(2), 195-206.

- Putra, N. H. D., Matulatan, F., Wibowo, M. D., & Danardono, E. (2020). Effects of dried bovine amniotic membrane as prosthetics of abdominal fascial defect closure observed by the expression of platelet-derived growth factor in *Rattus norvegicus* wistar strain. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(6), 987–991.
- Rahmawati, D., Retno Indrawati, R., Roestamadji, R. I., Setiawatie, E. M., Yuliati, A., & Bramantoro, T. (2017). Osteogenic ability of combined hematopoietic stem cell, hydroxyapatite graft and platelet rich fibrin on rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, 6(4), 88–95.
- Ramalingam, S., Sundar, C., Jansen, J. A., & Alghamdi, H. (2019). Alveolar bone science: Structural characteristics and pathological changes. In *Dental Implants and Bone Grafts: Materials and Biological Issues*. Elsevier Ltd.
- Ramesh, S., Kim, H. S., Lee, Y. J., Hong, G. W., & Kim, J. H. (2017). Nanostructured Silica/Gold-Cellulose-Bonded Amino-POSS Hybrid Composite via Sol-Gel Process and Its Properties. *Nanoscale Research Letters*, 12.
- Rasni, H. (2017). Uji Sitotoksitas Metronidazol Berbasis Hidrogel Kitosan terhadap Viabilitas Sel Fibroblas 3T3 Secara in vitro.
- Ratnayake, J. T. B., Gould, M. L., Shavandi, A., Mucalo, M., & Dias, G. J. (2017). Development and characterization of a xenograft material from New Zealand sourced bovine cancellous bone. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 105(5), 1054–1062.
- Ratnayake, J. T. B., Mucalo, M., & Dias, G. J. (2017). Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 105(5), 1285–1299.

- Renno, A. C. M., Fávaro-Pípi, E., Fernandes, K., Tim, C., & Ribeiro, D. A. (2012). Ultrasound therapy modulates osteocalcin expression during bone repair in rats. *Ultrasonics*, 52(1), 111–116.
- Retnomurti, H.R. (2008). Pengujian Toksisitas Akut Ekstrak Buah Merah (Pandanus conoideus Lam.) Secara In Vivo. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor. Hal. 30–31.
- Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S. Z., Rahim, A., Rizvi, S. A. A., & Rehman, I. U. (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53(9), 703–746. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>
- Rohanizadeh, R., Swain, M. V, & Mason, R. S. (2008). Gelatin sponges (Gelfoam ®) as a scaffold for osteoblasts. *J Urnal Material Science*, 1173–1182.
- Rosanto, Y. B., Handajani, J., & Susilowati, H. (2019). Efek Pemberian Gel Getah Batang Tanaman Pisang Secara Topikal Terhadap Kepadatan Serabut Kolagen Pada Proses Penyembuhan Luka Pasca Ekstraksi Gigi Marmut (Effect of Topical Application of Banana Stem Sap Gel on the Density of Collagen Fiber in the Wound H. *Dentika Dental Journal*, 17(1), 34–39.
- Rudin, A., & Phillips, C. (2013). Biopolymers. In *The Elements of Polymer Science & Engineering* (pp. 521–535). Elsevier.
- Sabouri, L., Farzin, A., Kabiri, A., Milan, P. B., Farahbakhsh, M., Mehdizadehkashi, A., Kajbafzadeh, A., Samadikuchaksaraei, A., Yousefbeyk, F., Azami, M., & Moghtadaei, M. (2020). Mineralized Human Amniotic Membrane as a Biomimetic Scaffold for Hard Tissue Engineering Applications. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6(11), 6285–6298.

- Salim, S., Rostiny, & Kuntjoro, M. (2015). Efek Kombinasi Spirulina Kitosan Untuk Preservasi Soket Terhadap Osteoblas, Osteoklas dan Kepadatan Kolagen. *Dentika Journal*, 18(3), 225–231.
- Sato, H., & Takaoka, Y. (2015). RUNX2 expression during early healing of tooth-extraction wounds in rats. *Journal of Oral Science*, 57(4), 319–325.
- Schoof, H., Apel, J., Heschel, I., & Rau, G. (2001). Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges. *Journal of Biomedical Materials Research*, 58(4), 352–357.
- Scimeca, M., Bischetti, S., Lamsira, H. K., Bonfiglio, R., & Bonanno, E. (2018). Energy Dispersive X-ray (EDX) microanalysis : A powerful tool in biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*, 62, 1–10.
- Shahmoradi, M., Bertassoni, L. E., Elfallah, H. M., & Swain, M. (2014). *Fundamental Structure and Properties of Enamel, Dentin and Cementum* (Issue February).
- Sharma, A., Brand, D., Fairbank, J., Ye, H., Lavy, C., & Czernuszka, J. (2017). A self-organising biomimetic collagen/nano-hydroxyapatite-glycosaminoglycan scaffold for spinal fusion. *Journal of Materials Science*, 52(21), 12574–12592.
- Shrivats, A. R., Alvarez, P., Schutte, L., & Hollinger, J. O. (2013). Bone Regeneration. In *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition* (Fourth Edi, pp. 1201–1202). Elsevier.

- Shukla. (2011). Freeze Drying Process: A Review Soham Shukla*
Department of Pharmaceutical Technology, B. S. Patel Pharmacy
College, Saffrony Institute of Technology, Near Saffrony Holiday
Resort, Ahmedabad-Mehsana Highway, At & Post Linch-384435,
Mahesana, Gujarat, Ind. *International Journal of Pharmaceutical
Sciences and Research*, 2(12), 3061–3068. [https://ijpsr.com/bft-
article/freeze-drying-process-a-review/?view=fulltext](https://ijpsr.com/bft-article/freeze-drying-process-a-review/?view=fulltext)
- Singh, M., & Madhan, G. (2017). Comparison of Ability of Platelet-rich
Fibrin vs CollaPlug in maintaining the Buccal Bone Height of
Sockets following Extractions in 20 Patients. *Journal of Health
Sciences & Research*, 8(1), 1–6. [https://doi.org/10.5005/jp-
journals-10042-1040](https://doi.org/10.5005/jp-journals-10042-1040)
- Siregar, F., & Hadijono, B. S. (2000). Uji Sitoktoksisitas Dengan Esei MTT.
Journal of Dentistry Indonesia, 7(1), 28–32.
- Siswanto, R., Rizkawati, D. M., Ifada, A. A., Putra, A. P., Rachmayani, F.,
& Widiyanti, P. (2013). Bovine Freeze Dried Amniotic Membrane (
FD-AM) Covered Sterile Gauze for Wound Dressing. *Asian
Academic Society International Confrence*, 68–71.
- Ślósarczyk, A., Paszkiewicz, Z., & Paluszkiewicz, C. (2005). FTIR and XRD
evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by
wet methods. *Journal of Molecular Structure*, 744–747(SPEC.
ISS.), 657–661.
- Sripriya, R., & Kumar, R. (2016). Denudation of human amniotic membrane
by a novel process and its characterisations for biomedical
applications. *Progress in Biomaterials*, 5(3–4), 161–172.
- Steiner, G. G., Francis, W., Burrell, R., Kallet, M. P., Steiner, D. M., &
Macias, R. (2008). The healing socket and socket regeneration.
*Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg,
N.J. : 1995)*, 29(2), 1–18.

- Stuckensen, K., Lamo-Espinosa, J. M. E. M.-L., Ripalda-Cemboráin, P., López-Martínez, T., Iglesias, E., Abizanda, G., Andreu, I., Flandes-Iparraguirre, M., Pons-Villanueva, J., Elizalde, R., Nickel, J., Ewald, A., Gbureck, U., Prósper, F., Groll, J., & Granero-Moltó, F. (2019). Anisotropic Cryostructured Collagen Scaffolds for Efficient Delivery of RhBMP-2 and Enhanced Bone Regeneration. *Materials*, 12, 1-15.
- Sularsih, & Soeprijanto. (2012). Perbandingan jumlah sel osteoblas pada penyembuhan luka antara penggunaan kitosan gel 1% dan 2%. *Jurnal Material Kedokteran Gigi*, 1(2), 145-152. jurnal.pgdi.or.id/index.php/jmkg/article/view/181/164
- Sularsih, & Wahjuningsih, E. (2015). Bone Morphogenetic Protein - 2 of Rattus Norvegicus Using Chitosan Gel with Different Molecular Weight on Wound Healing of Dental Extraction. *Dental Journal*, 48(2).
- Tanaka, Y., Nakayamada, S., & Okada, Y. (2005). Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Current Drug Targets: Inflammation and Allergy*, 4(3), 325-328.
- Tandelilin, R. T., M. Sofro, A. S., Santoso, A. S., Soesatyo, M. H., & Asmara, W. (2006). The density of collagen fiber in alveolus mandibular bone of rabbit after augmentation with powder demineralized bone matrix post incisivus extraction. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 39(2), 43.
- Tang, K., Wu, J., Xiong, Z., Ji, Y., & Sun, T. (2017). Human acellular amniotic membrane: A potential osteoinductive biomaterial for bone regeneration. *Journal Of Biomaterial Application*, 32(6), 754-764.

- Telli, C, Serper, A, Dogan, L, Guc, D 1999, 'Evaluation of the cytotoxicity of calcium phosphate root canal sealers by MTT assay', *Journal of Endodontics*, 25(12), p. 6
- Tohamy, K. M., Mabrouk, M., Soliman, I. E., Beherei, H. H., & Aboelnasr, M. A. (2018). Novel alginate/hydroxyethyl cellulose/hydroxyapatite composite scaffold for bone regeneration: In vitro cell viability and proliferation of human mesenchymal stem cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112(January), 448-460.
- Torres-Sanchez, C., Al Mushref, F. R. A., Norrito, M., Yendall, K., Liu, Y., & Conway, P. P. (2017). The effect of pore size and porosity on mechanical properties and biological response of porous titanium scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 77, 219-228.
- Uchide, N., Ohyama, K., Bessho, T., Takeichi, M., & Toyoda, H. (2012). Possible Roles of Proinflammatory and Chemoattractive Cytokines Produced by Human Fetal Membrane Cells in the Pathology of Adverse Pregnancy Outcomes Associated with Influenza Virus Infection. *Mediators of Inflammation*, July.
- Uppoor, A., Nayak, D. G., & P, M. C. (2014). *Textbook of Periodontology and Oral Implantology* (M. C. P. Ashita Uppoor, Dilip G Nayak (ed.)). Elsevier Health Science.
- Utomo, D. N., Mahyudin, F., Wardhana, T. H., Purwati, P., Brahmana, F., & Gusti, A. W. R. (2019). Physicobiochemical characteristics and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (hbm-mscs) in biodegradable porous sponge bovine cartilage scaffold. *International Journal of Biomaterials*, 2019.
- Vaidyanathan, L. (2021). Growth factors in wound healing ↓ a review. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 14(3), 1469-1480.

- Vieira, A. E., Repeke, C. E., De Barros Ferreira, S., Colavite, P. M., Biguetti, C. C., Oliveira, R. C., Assis, G. F., Taga, R., Trombone, A. P. F., & Garlet, G. P. (2015). Intramembranous bone healing process subsequent to tooth extraction in mice: Micro-computed tomography, histomorphometric and molecular characterization. *PLoS ONE*, 10(5), 1–22.
- Walsh, D. P., Raftery, R. M., Chen, G., Heise, A., O'Brien, F. J., & Cryan, S. A. (2019). Rapid healing of a critical-sized bone defect using a collagen-hydroxyapatite scaffold to facilitate low dose, combinatorial growth factor delivery. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(10), 1843–1853.
- Wang, J., Wang, M., Chen, F., Wei, Y., Chen, X., Zhou, Y., Yang, X., Zhu, X., Tu, C., & Zhang, X. (2019). Nano-hydroxyapatite coating promotes porous calcium phosphate ceramic-induced osteogenesis via BMP/SMAD signaling pathway. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 7987–8000.
- Wang, W., & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, 2(4), 224–247.
- Wang, Xiaoliang, Wang, X., Tan, Y., Zhang, B., Gu, Z., & Li, X. (2009). Synthesis and evaluation of collagen-chitosan- hydroxyapatite nanocomposites for bone grafting. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 89(4), 1079–1087.
- Wang, Xuechuan, Hao, X., Ren, L., Qiang, T., & Zhang, S. (2014). Study of the Preparation, Characterization, and Sizing Performance of Modified Collagen Surface Sizing Agent. *BioResources*, 9(1), 1255–1266.

- Wardhana, A. J. P., Matulatan, F., Wibowo, M. D., & Danardono, E. (2020). Effect of bovine dried amniotic membranes as prosthesis of abdominal fascial defect closure reviewed from the level of density collagen type I and III in *Rattus norvegicus* wistar strain. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(5), 574-577.
- Wattanutchariya, W., & Changkewchai, W. (2014). Characterization of porous scaffold from chitosan-gelatin/hydroxyapatite for bone grafting. *Lecture Notes in Engineering and Computer Science*, II(January), 1-4.
- Wibowo A.R., Octarina, Munadzirah E., Handharyani E. (2023). The effect of application of bovine amniotic membrane on osteoblasts, osteocytes, and collagen in the post-extraction alveolar bone socket of Sprague Dawley rats. *Padjadjaran Journal of Dentistry (PJD)*. 35(2), 163-169.
- Willenbacher, M., Al-Nawas, B., Berres, M., Kämmerer, P. W., & Schiegnitz, E. (2016). The Effects of Alveolar Ridge Preservation: A Meta-Analysis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 18(6), 1248-1268.
- Winiati, W., Septiani, W., & Tekstil, B. B. (2013). *Aktifitas Biodegradasi in Vitro Dan in Vivo Serat Plastisasi in Vitro and in Vivo Biodegradation Activities of Chitosan Fiber After Receiving Dehydration and Plasticizer*. 28(1), 29-37.
- Wong, R. W. ., & Rabie, A. B. . (2010). Effect of Bio-Oss® Collagen and Collagen Matrix on Bone Formation. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 4(1), 71-76.

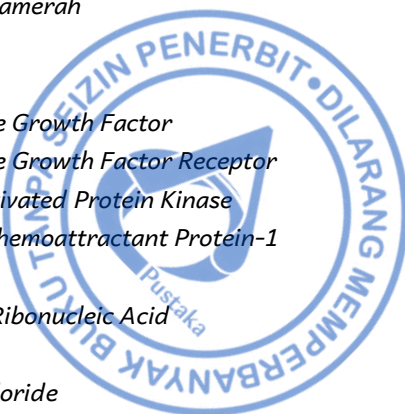
- Xu, D., Wan, Y., Li, Z., Wang, C., Zou, Q., Du, C., & Wang, Y. (2020). Tailorable hierarchical structures of biomimetic hydroxyapatite micro/nano particles promoting endocytosis and osteogenic differentiation of stem cells. *Biomaterials Science*, 8(12), 3286–3300.
- Yang, Y., Zhang, Y., Yan, Y., Ji, Q., Dai, Y., Jin, S., & Liu, Y. (2020). A Sponge-Like Double-Layer Wound Dressing with Chitosan and Decellularized Bovine Amniotic Membrane for Promoting Diabetic Wound Healing. *Polymers*, 12(535), 1–13.
- Yuliati, A., Merlindika, Y., Munadzirah, E., Aditya Ari, M. D., Mahardhika El Fadhlallah, P., Rianti, D., Dwi Ariani, M., & Kartikasari, N. (2019). Mechanical strength and porosity of carbonate apatite-chitosan-gelatine scaffold in various ratio as a biomaterial candidate in tissue engineering. *Key Engineering Materials*, 829, 173–181.
- Yunoki, S., Ikoma, T., & Monkawa, A. (2007). *Three-dimensional porous hydroxyapatite / collagen composite with rubber-like elasticity*. 18(4), 393–409.
- Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, et al. Fibroblast growth factors: Biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng*. 2010;1(1):1–18.
- Zhang, Qing, Shimoya, K., Moriyama, A., Yamanaka, K., Nakajima, A., Nobunaga, T., Koyama, M., Azuma, C., & Murata, Y. (2001). Production of secretory leukocyte protease inhibitor by human amniotic membranes and regulation of its concentration in amniotic fluid. *Molecular Human Reproduction*, 7(6), 573–579.

- Zhang, Qingchun, Jiang, Y., Zhang, Y., Ye, Z., Tan, W., & Lang, M. (2013). Effect of porosity on long-term degradation of poly (ϵ -caprolactone) scaffolds and their cellular response. *Polymer Degradation and Stability*, 98(1), 209–218.
- Zhao, R., Yang, R., Cooper, P. R., Khurshid, Z., & Ratnayake, J. (2021). *Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments*. 26(3007), 1–27.
- Zhong, Q., Hu, Z., Zhang, D., & Li, S. (2018). Fabrication and Characterization of Marine Polysaccharides Hemostatic Dressing. *ICAMMT*, 423.

DAFTAR SINGKATAN



AB	: <i>Autologous Bone</i>
ATP	: <i>Adenosine TriPhosphatase</i>
BAM	: <i>Bovine Amniotic Membrane</i>
bFGF	: <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP-2	: <i>Bone Morphogenetic Protein-2</i>
BMPR	: <i>Bone Morphogenetic Protein Receptor</i>
βTCP	: <i>beta Tricalcium Phosphate</i>
Ca	: <i>Calcium</i>
Cat-K	: <i>Cathepsin K</i>
Cbfa1	: <i>Core binding factor α1</i>
CEJ	: <i>Cemento-enamel junction</i>
CXCR-4	: <i>Chemokine Receptor Type 4</i>
DBBM	: <i>Deproteinized Bovine Bone Mineral</i>
DFDBA	: <i>Demineralized Freeze-Dried bone Alograft</i>
EDX	: <i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ERK	: <i>Extracellular Signal-Regulated kinase</i>
F	: <i>Fluorine</i>
FAK	: <i>Focal Adhesion Kinase</i>
Fe	: <i>Ferrum</i>
FDDBA	: <i>Freeze-Dried Bone Allograft</i>
FGF2	: <i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FGFR	: <i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FTIR	: <i>Fourier Transform Infrared</i>
HA	: <i>Hydroxyapatite</i>
HE	: <i>Hematoksin-Eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HGFR	: <i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>



IL	: <i>Interleukin</i>
IR	: <i>Radiasi Inframerah</i>
kDa	: <i>Kilodalton</i>
kGy	: <i>Kilogray</i>
KGF	: <i>Keratinocyte Growth Factor</i>
KGFR	: <i>Keratinocyte Growth Factor Receptor</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
Mg	: <i>Magnesium</i>
mRNA	: <i>messenger Ribonucleic Acid</i>
Na	: <i>Natrium</i>
NaCl	: <i>Natrium Chloride</i>
NFκβ	: <i>Nuclear Factor of Kappa Beta</i>
OB	: <i>Osteoblast</i>
Oc	: <i>Osteoclast</i>
OCN	: <i>Osteocalcin</i>
Ot	: <i>Osteosit</i>
OPG	: <i>Osteoprotegrin</i>
P	: <i>Phosphate</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDAF	: <i>Platelet Derived Angiogenesis Factor</i>
PDGF	: <i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PiT	: <i>Phosphate Transporter</i>
RANK	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>
Ras	: <i>Rat Sarcoma</i>
rhBMP-2	: <i>recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2</i>
RT-PCR	: <i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
RUNX2	: <i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>
SD	: <i>Sprague Dawley</i>
SEM	: <i>Scanning Electron Microscope</i>
SLPI	: <i>Secretory leukocyte protease inhibitor</i>

SP-A	: <i>Surfactant Protein A</i>
TNF α	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TGF α	: <i>Transforming Growth Factor α</i>
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
TLR	: <i>Toll Like Receptor</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
XRD	: <i>X-ray Diffraction</i>



Tentang Penulis



Dr. drg. Octarina M.Si dilahirkan di Jakarta, 17 Oktober 1983. Memulai pendidikan dokter gigi pada tahun 2000 di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti dan selesai pada 2006. Setelah itu, melanjutkan studi ke jenjang Magister Ilmu Kedokteran Gigi dengan kekhususan Ilmu Material Kedokteran Gigi pada tahun 2010 di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dan lulus

pada tahun 2012. Pada tahun 2020-2023, Berkesempatan kembali untuk menempuh pendidikan lanjutan Doktoral Ilmu Kedokteran Gigi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Mengawali karier ditahun (2006 - 2007) sebagai Dokter Gigi Tidak Tetap di Kecamatan Atambua, Provinsi Kupang, Nusa Tenggara Timur. Sejak tahun 2008 sampai saat ini menjadi Dosen Pengajar Bahan Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti. Pada tahun (2017-2020) menjadi Kepala Bagian, Bahan Kedokteran Gigi dan Kepala Lab DMT Core (2019-2021), Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Saat ini, Ketua Ilmu Material Kedokteran Gigi (IPAMAGI) cabang Jakarta periode (2020-2025). Sejak tahun 2024 sampai sekarang menjabat sebagai Kepala Pusat Unggulan Lembaga penelitian dan pengembangan Masyarakat Universitas Trisakti dan aktif menekuni berbagai penelitian yang berhubungan dengan pengembangan material dan biomaterial kedokteran gigi. Penulis juga mitra bebestari dan reviewer dari beberapa jurnal nasional.



Prof. Dr. drg. Elly Munadziroh, M.S. merupakan guru besar di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga (UNAIR). Lahir di Malang, 9 Agustus 1961. Meraih gelar sarjana di bidang Kedokteran Gigi dari Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga tahun 1985, melanjutkan studi pascasarjana di Universitas Sumatera Utara dan meraih gelar Magister Sains (M.S.) pada tahun 1997, serta memperoleh gelar Doktor Ilmu Kedokteran Gigi dari Universitas Airlangga pada tahun 2008. Pada tahun 2019, mendapatkan gelar Guru Besar dalam bidang Ilmu Dental Material di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Karier akademik dimulai pada tahun 1987 sebagai staf pengajar di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, dengan berbagai posisi strategis yang pernah diemban di tingkat universitas maupun luar universitas, seperti Direktur Direktorat Pengembangan Karier, Inkubasi Kewirausahaan, dan Alumni (DPKKA) Universitas Airlangga, Sekretaris Jenderal *Indonesia Career Center Network* (ICCN), *Board of Advisor* AIESEC, Komisi II BPF FKG UNAIR, Penasehat Persatuan Dokter Gigi Indonesia (PDGI) Cabang Surabaya, dan Ketua Departemen Organisasi Ikatan Peminat Ilmu Material dan Alat Kedokteran Gigi Indonesia. Berbagai penghargaan dan piagam tanda jasa telah diterima, antara lain Satya Lencana Karya Satya XX dari Pemerintah Republik Indonesia pada tahun 2016, *Runner-up* FKG Award dari FKG UNAIR pada tahun 2016, masuk dalam daftar Seratus Peneliti Terbaik versi Kementerian Pemberdayaan Perempuan pada tahun 2010, Dosen Berprestasi Universitas Airlangga tahun 2008 peringkat II di bidang penelitian, dan Wisudawan Terbaik Pascasarjana (S3) Universitas Airlangga pada tahun 2008.



drg. Meircurius Dwi Condro Surboyo, M.Kes., Sp.PM merupakan dokter gigi spesialis penyakit mulut dan staf pengajar di Departemen Ilmu Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Menyelesaikan Pendidikan Dokter Gigi pada tahun 2014 di Universitas Airlangga, Pendidikan Magister Ilmu Kesehatan Gigi pada tahun 2017 dan Spesialis Penyakit Mulut pada

tahun 2021 di Universitas Airlangga. Riset utama terkait pengembangan bahan alam untuk regenerasi jaringan keras dan jaringan lunak rongga mulut. Penelitian mengenai asap cair tempurung kelapa dan sekam padi untuk terapi sariawan dan periodontitis telah dijalani sejak tahun 2015 selama menempuh pendidikan Magister. Hasil penelitian tersebut telah dipublikasi pada beberapa jurnal internasional bereputasi dan telah mendapatkan dua paten.



drg. Florencia Livia Kurniawan, M.K.G dilahirkan di Jakarta pada 29 Oktober 1988. Penulis memulai Pendidikan Dokter Gigi pada tahun 2006 di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti dan menyelesaikan studi pada tahun 2012. Setelah itu, penulis melanjutkan studi ke jenjang Magister Ilmu Kedokteran Gigi pada tahun 2019 di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti dan lulus pada

tahun 2022. Pada tahun 2008-2011 berkarier sebagai Asisten Dosen bagian Bahan Kedokteran Gigi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti. Pada tahun 2012 mengawali karier sebagai Dokter Gigi di Klinik Medika Bina Sejahtera dan Klinik Gigi Plaza de Lumina, Jakarta Barat. Sejak tahun 2019 sampai saat ini menjadi Dosen Pengajar Departemen Bahan Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Trisakti. Penulis aktif menekuni berbagai penelitian yang berhubungan dengan pengembangan bahan biomaterial kedokteran gigi serta reviewer jurnal nasional.