

**MEKANISME REGENERASI BIOKOMPOSIT
BOVINE AMNIOTIC MEMBRANE HIDROKSIAPATIT
TERHADAP PRESERVASI SOKET TULANG
ALVEOLAR
(Kajian Pada Model Hewan Coba *Sprague Dawley*)**

DISERTASI



Oleh:

**OCTARINA
NIM: 022010173001**

**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2023**

**MEKANISME REGENERASI BIOKOMPOSIT
BOVINE AMNIOTIC MEMBRANE HIDROKSIAPATIT
TERHADAP PRESERVASI SOKET TULANG
ALVEOLAR
(Kajian Pada Model Hewan Coba *Sprague Dawley*)**

DISERTASI



Oleh:

**OCTARINA
NIM: 022010173001**

**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2023**

PRASYARAT GELAR

**MEKANISME REGENERASI BOKOMPOSIT *BOVINE AMNIOTIC*
MEMBRANE HIDROSIAPATIT TERHADAP PRESERVASI SOKET
TULANG ALVEOLAR
(Kajian Pada Model Hewan Coba *Sprague Dawley*)**

DISERTASI

**Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya**

Oleh :

**OCTARINA
NIM : 022010173001**

LEMBAR PENGESAHAN

**MEKANISME REGENERASI BIOKOMPOSIT
BOVINE AMNIOTIC MEMBRANE HIDROKSIAPATIT
TERHADAP PRESERVASI SOKET TULANG
ALVEOLAR
(Kajian Pada Model Hewan Coba *Sprague Dawley*)**

DISERTASI

**Merupakan Ujian Komprehensif Sebagai Salah Satu Syarat
Untuk Menetapkan Mahasiswa Sebagai Calon Doktor
di Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya**

Oleh :

OCTARINA

NIM : 022010173001

Menyetujui

Promotor



Prof. Dr. Elly Munadziroh, drg., MS.

NIP. 196108091987012001

Ko-Promotor



Prof. Dr. Fathilah Abdul Razak

No. Paspor A53047350

**Koordinator Program Studi
Doktor Ilmu Kedokteran Gigi**



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

NIP. 195601071981031003

PENETAPAN PANITIA PENGUJI DISERTASI TERTUTUP

Disertasi Tertutup ini telah diuji pada tanggal 31 Mei 2023

Ketua : Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes.

Anggota :

- 1. Prof. Dr. Elly Munadziroh, drg., MS (Promotor)**
- 2. Prof. Dr. Fathilah Abdul Razak (Ko-Promotor)**
- 3. Dr. Pratiwi Soesilawati, drg., M.Kes.**
- 4. Dr. Taufan Bramantoro, drg., M. Kes.**
- 5. Rosalina Tjandrawinata, drg., M.Si, Ph.D**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini saya :

Nama : Octarina
NIM : 022010173001
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran Gigi
Judul Tesis : MEKANISME REGENERASI BIODKOMPOSIT
BOVINE AMNIOTIC MEMBRANE HIDROKSIAPATIT TERHADAP
PRESERVASI SOKET TULANG ALVEOLAR (KAJIAN PADA MODEL
HEWAN COBA SPRAGUE DAWLEY)

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli dan benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas namakan saya, serta bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiatism) dari hasil karya orang lain. Disertasi belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik baik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh. Karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya, 10 Mei 2023

Yang membuat pernyataan



Octarina

NIM. 022010173001

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji Syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat dan anugerah-Nya saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi. Penulisan disertasi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Saya menyadari tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak tidaklah mudah bagi saya untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini. Disertasi ini merupakan buah dari kerja keras, bimbingan, arahan, kesempatan, bantuan dan kerja sama dari berbagai pihak. Oleh karena itu, perkenankan saya pada kesempatan ini dengan penuh kerendahan hati menyampaikan ucapan terima kasih sedalam-dalamnya kepada berbagai pihak yang telah membantu selama proses pendidikan, penelitian, dan penulisan disertasi ini. Ucapan terima kasih dan hormat, saya sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. Agung Sosiawan drg.,SH.,MH., M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, yang telah mengizinkan saya untuk mengikuti Program Pendidikan Doktoral.
2. Prof. Dr. drg. Tri Erri Astoeti, Mkes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti; drg. Wiwiek Poedjiastoeti, M.Kes., Sp.BM.,Ph.D selaku Wakil Dekan I; drg. Rosalina Tjandrawinata, M.Si., Ph.D selaku Wakil dekan II, drg. Abdul Gani Soulissa, M.P.H. selaku Wakil Dekan III, Dr.drg. Wita Anggraini, M.Biomed, PAK.,Sp.Perio selaku Wakil Dekan IV, yang telah memberikan kesempatan dan mendukung saya untuk melanjutkan Pendidikan Program Doktoral.

3. Prof. Dr. Elly Munadziroh, drg. M.Kes, selaku promotor saya yang selalu membimbing, memotivasi, mendukung, memberikan kesempatan dan arahan yang luar biasa selama penelitian dan penyusunan disertasi ini.
4. Prof. Dr. Fathilah Abdul Razak, selaku ko-promotor yang selalu dengan tenang dan sabar mengoreksi naskah penelitian disertasi saya.
5. Prof Dr. Anita Yulianti, drg. MKes; Dr. Pratiwi Soesilawati, drg. MKes; Dr. Taufan Bramantoro, drg. MKes; drg. Rosalina Tjandrawinata, M.Si PhD selaku para penguji yang telah memberikan masukan dan arahan dalam disertasi ini sehingga saya lebih memantapkan diri untuk menjalani penelitian dan penulisan disertasi.
6. Prof. Dr. Sri Kunarti, drg., MS., Sp.KG(K) selaku Kepala Pusat Studi Program S3 periode tahun 2017-2020 yang telah menerima saya menjadi mahasiswa Program Doktorat di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
7. Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp. Ort selaku Kepala Pusat Studi Program S3 yang telah memberi masukan untuk penulisan disertasi dan memberi arahan serta kemudahan untuk menyelesaikan Pendidikan Program Doktorat di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
8. Drg. Dini Setyowati M.PH, P.HD selaku sekretaris program studi S3 yang selalu sabar dengan pertanyaan mahasiswa
9. Prof. Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg. M.Kes selaku PJMK mata kuliah Seminar Hasil Penelitian (SHP) yang memberikan saran untuk hasil penelitian.
10. Mbak Erna Rachmawati, Amd selaku administrasi program Pendidikan S3 yang selalu siap dengan jawaban kapan saja dan bersedia membantu dengan baik dan ramah untuk proses administrasi Pendidikan S3.

11. Pak Lesmono dan Mbak Yulfa sebagai laboran dan operator teknis di Bank Jaringan RSUD DR. Soetomo Surabaya yang telah banyak membantu, berjasa dan berkonsultasi selama proses pembuatan material.
12. RSHP FKH IPB, drh. Arni Diana Fitri M.Si. dan drh Supriyono, M.Si. PhD, Prof. Drh. Ekowati Handharyani, M.S, Ph.D, APVet, Pak Yuri dan Pak Andri yang telah banyak memberikan masukan selama penelitian hewan coba, pembuatan preparat di IPB.
13. Laboratorium-laboratorium FTIR PAIR-BATAN, SEM FMIPA ITB, FARFIS UI Depok yang telah membantu saya untuk menyelesaikan penelitian awal dan karakterisasi material.
14. drg. Meircurius Dwi Condro Surboyo, Sp.PM, M.Kes selaku teman untuk berkonsultasi dan bekerja sama dalam proses kelulusan saya.
15. Dr. Johan Arief Budiman, drg. Sp. Ort sebagai guru dan teman yang telah memberikan banyak ilmu, memberikan semangat, memberikan bimbingan kepada saya untuk publikasi di jurnal Internasional. Terima kasih dok untuk segala ilmunya.
16. Dr. Komariah, S. Biomed sebagai kakak tempat berkonsultasi, tempat merencanakan penelitian sehingga dapat menyelesaikan penelitian dengan baik.
17. Drg. Sheila Soesanto, MKes yang semangat dan pandai. Terima kasih untuk perhatiannya.
18. Drg. Niko Falatehan Sp. Prost teman bercerita di kala masalah besar melanda. Terima kasih telah menjadi pendengar yang baik.
19. Kepada staf bagian BKG Universitas Trisakti Dr. Rosalina Tjandrawinata, drg. Deviyanti pratiwi, MKes, drg. Eddy PhD, drg. Florencia Livia MKG, drg Dewi

- liliany Margaretta MKes, yang telah memberikan pelajaran hidup yang luar biasa kepada saya sehingga saya semakin kuat dan tangguh untuk menggapai impian saya.
20. Kepada suamiku yang tercinta FX. Willy Ari Pamungkas terima kasih atas kesetiaannya, kesabarannya, kepercayaannya, ketangguhannya, selama mendampingi dan menemani dalam suka dan duka, dalam untung dan malang, dalam sehat dan sakit. *“You are the best and you are my hope”*
21. Kepada Ibuku Ny. Nani Widjaja dan Alm. Ayahku Tn. Andy Ernanto Widjaja terima kasih telah memberikan kesempatan luar biasa dalam hidup saya, sehingga saya mampu menyelesaikan Pendidikan ini dengan baik dan tepat waktu.
22. Kepada anakku tersayang Ignatius Rilly Fusena yang telah membawa mukzizat ke dunia ini. Terima kasih ya Nak telah setiap hari menemani Mama Fu untuk penelitian dan menyelesaikan penulisan disertasi. Kamu adalah anugerah terindah dan luar biasa untuk kami. *I Love you so much Nak.*
23. Kepada keluarga besar Soedijono, mbak MM. Rini Rosalanti, Felix Wuyohandono, Rosita Dewi yang telah memberikan kebahagiaan dalam hidup saya, tempat berbagi.
24. Drg. Risma Apriandi, Drg. Anastasia Elsa Prahasti Sp. KG(K), drg. Elline Sp. KG (K) selaku teman seperjuangan yang memberikan semangat dan motivasi dikala sudah merasa sangat lelah dan putus asa. *Yes we passed it guys..* Terima kasih untuk perjuangannya.
25. Rekan-rekan mahasiswa S1 yang saya sayangi, Pascal Filio, M Riza Hafiz, Arlita, Laidy Aretha Ongkuruna, Artheda Regita Wibowo, Geneva Adelya

Ariesta. Terima kasih telah membantu dan memberikan semangat untuk menyelesaikan penelitian sehingga dapat berjalan lancar dan baik.

26. Suster pengasuh yang telah membantu merawat Dek Fu, sehingga saya bisa menyelesaikan Pendidikan lanjutan ini. Terima kasih atas segala jasa-jasanya.

27. Akhir kata dengan penuh kerendahan hati saya hendak menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya atas bantuannya dari berbagai pihak yang mungkin terlewat dalam penulisan ini. Saya menyadari ketidaksempurnaan saya dan saya ingin terus belajar, bertumbuh dan berkembang sampai akhir waktu.

Surabaya, 14 Februari 2023

Penulis

ABSTRACT**REGENERATION MECHANISM OF BOVINE AMNIOTIC MEMBRANE
HYDROXYAPATITE BIOCOMPOSITE ON ALVEOLAR BONE SOCKET
PRESERVATION***(Studies on Experimental Animal Models of Sprague Dawley)***ABSTRACT**

Background: Socket preservation is necessary to prevent alveolar bone resorption after tooth extraction. Fabrication of bovine amniotic membrane biocomposite with hydroxyapatite (BAM-HA) is expected to be a material for alveolar bone socket preservation. **Objectives:** Fabrication of BAM-HA biocomposites and analyze material characteristics and mechanism of osteogenesis. **Methods:** BAM-HA was fabricated with ratios of 30:70, 35:65 and 40:60, then characterized by FTIR, SEM, EDS, porosity percentage and swelling percentage. After characterization, the material was applied to the alveolar bone socket of the Sprague Dawley after extraction to analyze osteogenesis mechanism. On the 14th and 28th day, the rats were euthanized to analyze the thickness of collagen, osteoblasts, expression of BMP-2, RUNX2 and Osteocalcin. **Result:** After fabricating BAM-HA in various ratios, FTIR test showed the presence of amide I,II,III,A,OH-, PO_4^{3-} , and CO_3^{2-} functional groups. SEM analysis shows, the ideal size for the alveolar bone regeneration scaffold is owned by BAM-HA 35:65 of 155.625 μm . EDS analysis shows the presence of elements Ca, Mg, P. The ideal porosity percentage test is BAM-HA 35:65 with an average of 89.23%. Histological and immunohistochemical analysis showed that the thickness of collagen, osteoblast cells, expression of BMP-2, Osteocalcin and RUNX2 showed an increase with the application of BAM-HA ($p < 0.05$) on the 14th and 28th days. **Conclusions:** The BAM-HA 35:65 biocomposite has the characteristics and mechanisms of osteogenesis which are characterized by increased of collagen, osteoblast, expression of BMP-2, RUNX2 and Osteocalcin, therefore this material has potential as an alveolar bone socket preservation material.

Keywords: Alveolar Bone Socket Preservation, Biocomposites, BAM-HA, Characterization, Osteogenesis

ABSTRAK

MEKANISME REGENERASI BIOKOMPOSIT BOVINE AMNIOTIC MEMBRANE HIDROKSIAPATIT TERHADAP PRESERVASI SOKET TULANG ALVEOLAR (Kajian Pada Model Hewan Coba *Sprague Dawley*)

ABSTRAK

Latar belakang: Preservasi soket diperlukan untuk mencegah terjadinya resorpsi tulang alveolar setelah dilakukan pencabutan gigi. Pembuatan biokomposit *bovine amniotic membrane* dengan hidroksiapatit (BAM-HA) diharapkan menjadi material preservasi soket tulang alveolar. **Tujuan:** Membuat biokomposit BAM-HA, menganalisis karakteristik material dan mekanisme osteogenesis. **Metode:** BAM-HA dibuat dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 kemudian material dikarakterisasi dengan FTIR, SEM, EDS, persentase porositas dan persentase *swelling*. Setelah karakterisasi, material diaplikasikan pada soket tulang alveolar hewan coba tikus *Sprague Dawley* setelah dilakukan pencabutan untuk menganalisis sifat osteogenesis. Pada hari ke-14 dan ke 28 tikus di euthanasia untuk menganalisis ketebalan kolagen, sel osteoblas, ekspresi BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2. **Hasil:** Setelah pembuatan BAM-HA berbagai rasio, uji FTIR menunjukkan adanya gugus fungsi amida I, II, III, A, OH-, PO_4^{3-} , dan CO_3^{2-} . Analisa SEM menunjukkan struktur berpori yang bervariasi, ukuran yang memenuhi kriteria untuk *scaffold* regenerasi tulang alveolar dimiliki oleh BAM-HA 35:65 sebesar 155.625 μ m. Analisa EDS menunjukkan adanya unsur-unsur Ca, Mg, P yang memiliki peranan penting dalam pembentukan tulang. Material paling berpotensi sebagai media pertumbuhan sel pada uji persentase porositas adalah BAM-HA 35:65 dengan rerata 89,23%. Analisa histologi dan imunohistokimia menunjukkan ketebalan kolagen, jumlah sel osteoblas, ekspresi BPM-2, *Osteocalcin* dan *RUNX2* menunjukkan adanya peningkatan dengan aplikasi BAM-HA ($p < 0.05$) pada hari ke-14 dan ke 28. Gambaran histologi dan imunohistokimia ini menunjukkan adanya peningkatan mekanisme osteogenesis. **Kesimpulan:** 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.

Kata kunci: Preservasi Soket Tulang alveolar, Biokomposit, BAM-HA, Karakterisasi, Osteogenesis

SUMMARY**REGENERATION MECHANISM OF BOVINE AMNIOTIC MEMBRANE
HYDROXYAPATITE BIOCOSMPOSITE ON ALVEOLAR BONE SOCKET
PRESERVATION***(Studies on Sprague Dawley Animal Models)***Octarina**

Alveolar bone socket preservation materials are needed to maintain the adequacy of alveolar bone against resorption that occurs after tooth extraction. The fabrication of biocomposite bovine amniotic membrane with hydroxyapatite (BAM-HA) is expected to have potential as an alveolar bone socket preservation material. This BAM-HA biocomposite was made with the aim of combining two different material properties to complement each other and have synergistic properties to improve healing and alveolar bone formation after tooth extraction.

This research is a true experimental research conducted in two stages. The first stage was the manufacture of the BAM-HA biocomposite, then characterization tests were carried out with Fourier Transform Infrared (FTIR), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), porosity percentage and swelling percentage. The second stage of research was the application of alveolar bone sockets to Sprague Dawley (SD) rats to examine the mechanism of osteogenesis by analyzing the histological and immunohistochemical descriptions of the thickness of collagen, osteoblast cells, BMP-2, Osteocalcin and RUNX2 expression.

The first stage of the research method was the preparation and characterization of the BAM-HA biocomposite. Dry BAM and HA powder were prepared in the amount of 3:7 gr (30:70), 3.5:6.5 gr (35:65), and 4:6 gr (40:60) respectively. BAM is soaked in saline solution then blended until it forms amnion slurry then HA powder is added. After BAM is thoroughly mixed with HA, it is put into a container and then freeze at -80°C and freeze dry at -100°C. The BAM-HA biocomposite which was made in the form of a sponge was then sterilized with 25 kGy gamma rays. The biocomposite samples were then prepared and compared with negative controls and positive controls. The five groups include BAM-HA 30:70, 40:60, and 35:65, Bio-Oss Collagen, and BAM. Characterization of BAM-HA biocomposite with various ratios prepared for analysis using FTIR, SEM, EDX, porosity percentage, and swelling percentage.

The results of the research in phase I, the FTIR graphs of infra-red waves absorption for the three samples BAM-HA 30:70, 40:60, and 35:65, resemble the positive control (Bio-Oss Collagen) and negative control (BAM). The BAM-HA biocomposite has the same functional groups as the negative and positive controls,

namely amide I, II, III, A, B, and OH-, PO_4^{3-} , and CO_3^{2-} functional groups. SEM micrographs of the entire sample show that there are pores on the surface of the sample. HA particles appear to unite with BAM to fill in the gaps between the pores. In the BAM and BAM-HA samples the ratio of 40:60 shows an almost similar appearance, small irregular and evenly distributed pores are seen on the surface of the sample. BAM has an average porous size of 89,096 μm and BAM-HA 40:60 has an average porous size of 72,424 μm . The higher of HA content, the denser the sample surface, the larger pores, but the smaller the number of pores. BAM-HA 35:65 average porous size was 155,625 μm , BAM-HA 30:70 average porous size was 153,025 μm , Bio-Oss Collagen average porous size was 136,312 μm . In the EDS Test, various ratios of BAM-HA and Bio-Oss Collagen indicated the presence of the elements calcium, phosphorus, magnesium, carbon, oxygen, and sodium. The higher the number of HA will increase the elements of calcium, phosphorus, and magnesium. The higher the number of BAM will increase the amount of carbon and oxygen elements. The highest percentage of porosity belongs to the BAM group and the BAM-HA 40:60 biocomposite. Meanwhile, the lowest porosity percentage is owned by Bio-Oss Collagen and BAM-HA 30:70 biocomposite. This study shows that the higher the number of pores and the higher the BAM content, the percentage of swelling will increase.

BAM-HA biocomposites with ratios of 30:70, 35:65, and 40:60 were prepared using the sol-gel method, which includes the sol phase, sol gelation, and removal of the liquid phase. The results of the FTIR analysis showed the presence of amide and hydroxyapatite groups in the BAM-HA biocomposite, the presence of these functional groups indicated that there was a bond between the two materials. SEM analysis of varying porous structures on the surface of the sample. The freeze-drying method causes pores on the sample surface. The higher HA ratio in each sample causes the porous to become larger and heavier. The porosity percentage test shows that this material can act as an osteoblast cell growth. The swelling test shows the ability and potential as a scaffold for hard tissue regeneration. Biocomposite BAM-HA ratio of 35:65 has the most optimal potential as a socket preservation material.

In the second research phase, an *in vivo* test was carried out, the application of the BAM-HA biocomposite in experimental animals, Sprague Dawley rats (SD). A total of 36 male rats weighing 250-300 g were divided into 6 treatment groups. These groups include: no treatment, BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60, BAM and Bio-Oss Collagen. After adaptation for 2 weeks, the right lower first incisor was extracted. After extraction in the treated group, a 3x10 mm BAM-HA biocomposite sample was inserted along the alveolar bone socket of the rat's teeth and sutured with 0.5 mm catgut thread. On the 14th and 28th days after extraction of the rats in euthanasia, the lower jaw was cut and the alveolar bone was removed. The alveolar bone was then fixed, decalcified, paraffin blocks were made, and paraffin blocks were cut with a thickness of 5 μm for histology and immunohistochemistry preparations. Staining of histological preparations to analyze collagen thickness using Masson Trichome and osteoblast proliferation

with Hematoxylin Eosin. Immunohistochemistry staining using BMP-2 antigen-antibody, Osteocalcin and RUNX2 (Affinity Biosciences, Inc. USA).

The results of the second stage of histological analysis were analysis of collagen thickness and osteoblast proliferation. Collagen thickness was seen to increase on day 14 with the application of BAM-HA biocomposite and decreased on day 28. This decrease can be caused by collagen being replaced with bone matrix. Osteoblast cell proliferation on day 14 showed an increase in the BAM-HA application group when compared to the non-treated group. The number of osteoblast cells decreased on day 28, this was due to osteoblast cells becoming mature osteoblast cells, namely osteocytes. Immunohistochemical analysis in this study was the expression of BMP-2, RUNX2 and Osteocalcin. BMP-2 expression increased on the 14th and 28th day in the BAM-HA biocomposite application group. RUNX-2 expression increased on day 14 and decreased on day 28. Osteocalcin expression increased from day 14 and day 28.

BAM has growth factors, EGF, VEGF, FGF, TGF- β , and PDGF. TGF- β stimulates fibroblast activity and FGF secretion. FGF binds to receptor tyrosine kinases, promoting autophosphorylation at the receptors and posterior phosphorylation of serine, threonine, and tyrosine residues on specific target proteins such as Raf-1, MAPK/Erk kinase MEK and ERK. FGF secretion will cause increased migration of fibroblasts, stimulate the formation of collagen in the extraction wound. Collagen will form a structure in the tissue and stimulate the accelerated healing of the extraction wound. Migration of fibroblasts drives angiogenesis, a marker of entering the proliferative phase that allows mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts to produce bone. In the proliferative phase, osteoblast progenitor cells show alkaline phosphatase (ALP) activity and are considered pre-osteoblasts. HA crystals can act as a ligand that activates signaling receptors and enhances the expression of osteogenic transcription factors. Stimulation of osteoblasts by HA through the ERK signaling pathway. Fibronectin contained in BAM interacts with HA and activates the ERK pathway. The ERK signaling pathway can also be stimulated by the interaction of HA with FGFR. FGFR will bind to the ligand to activate MAPKs. The increase in the number of osteoblast cells occurs due to the interaction of BAM-HA through the ERK signaling pathway, indicating that the stimulus for alveolar bone healing is faster.

BMP-2 expression was seen to be higher in the BAM-HA application group. TGF β growth factor induces BMP-2. BMP-2 binds to BMPR, activating BMPRII. This leads to activation of the ERK signaling pathway. Pathway activation will lead to increased differentiation of MSCs and osteoprogenitors into osteoblasts. The ERK signaling pathway increases BMP-2 gene expression, which is critical in osteoblast differentiation during osteogenesis. High BMP-2 expression indicates a more rapid initiation of alveolar bone socket healing. BMP-2 will activate RUNX2 transcription through the ERK pathway. The decreased expression of the 28th RUNX2 is due to the formation of TNFSF11 or RANKL which can cause bone resorption. RUNX2 As the "master gene" of osteogenesis will regulate the

expression of non-collagen proteins such as Osteocalcin. When RUNX2 synthesizes Osteocalcin, RUNX2 expression will decrease. Osteocalcin appears in the late stages of osteoblast differentiation by binding calcium to the bone matrix and inducing mineralization. Increased calcium will increase the proliferation and differentiation of osteoblasts which causes increased osteocalcin expression.

This study made biocomposites between BAM and HA with various ratios of 30:70, 35:65, and 40:60. FTIR characteristic analysis of the functional groups of collagen, namely amides I, II, III, A, and B. The functional groups PO_4^{3-} , and CO_3^{2-} are the parameters of HA. The SEM characteristics of the entire sample indicated the presence of pores on the surface of the sample. The most optimal porous sizes for bone tissue regeneration are BAM-HA 35:65 and 40:60. EDS analysis, showed the elements of calcium, phosphorus, magnesium, and sodium. The best porosity percentage is owned by the BAM-HA biocomposite with a ratio of 35:65. The BAM content will increase the swelling ability. The application of BAM-HA to the alveolar bone socket increased collagen thickness on day 14 and decreased on day 28 which marked the start of new bone formation. Growth of osteoblast cells was seen on the 14th day and became mature osteoblasts on the 28th day. BMP-2 and Osteocalcin expression increased on days 14 and 28, while RUNX2 expression decreased on days 28. The expression of BMP-2, Osteocalcin, and RUNX2 in this study are markers of an increased mechanism of alveolar bone regeneration. This shows that the application of BAM-HA in the alveolar bone socket after extraction can potentially be used as an alveolar bone socket preservation material.

The results of this study indicate that the BAM-HA 35:65 biocomposite has characteristics as a scaffold for alveolar bone regeneration and has an osteogenesis mechanism that is characterized by increased collagen, osteoblasts, expression of BMP-2, RUNX2, and Osteocalcin so that this material has potential as a bone socket preservation material. alveolar. The application of BAM-HA 35:65 biocomposite in the alveolar bone socket after extraction can increase alveolar bone regeneration, so it is hoped that the rehabilitation of function and aesthetics of restorations in implant patients will be better.

RINGKASAN

**MEKANISME REGENERASI BIOKOMPOSIT BOVINE AMNIOTIC
MEMBRANE HIDROKSIAPATIT TERHADAP PRESERVASI SOKET
TULANG ALVEOLAR
(Kajian Pada Model Hewan Coba Sprague Dawley)**

Octarina

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 untuk 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⁻, PO₄³⁻, dan CO₃²⁻. 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 , 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 μm 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 di 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, 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. Fibronektin 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 β menginduksi BMP-2. BMP-2 berikatan dengan BMPR, 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, 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, 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 di 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 ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM.....	ii
LEMBAR PRASYARAT GELAR DOKTOR	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI DISERTASI TERTUTUP	v
PERNYATAAN ORISINALITAS	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
<i>ABSTRACT</i>	xii
ABSTRAK	xiii
<i>SUMMARY</i>	xiv
RINGKASAN	xviii
DAFTAR ISI.....	xxii
DAFTAR GAMBAR	xxvii
DAFTAR TABEL.....	xxx
DAFTAR LAMPIRAN	xxxii
DAFTAR SINGKATAN	xxxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat	7
1.4.1 Bagi Ilmu Pengetahuan dan Teknologi	7
1.4.2 Bagi Kesejahteraan Umat Manusia	8

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Perservasi Soket	9
2.2 Dental Implan.....	11
2.3 Komposisi Tulang Alveolar	13
2.4 Membran Amnion.....	14
2.4.1 Struktur dan Komposisi Membran Amnion	14
2.4.2 Potensi membrane amnion.....	16
2.4.3 <i>Bovine Amniotic Membrane</i> (BAM)	18
2.5 Hidroksiapatit (HA)	19
2.5.1 Struktur Hidroksiapatit (HA)	19
2.5.2 Potensi Hidroksiapatit Dalam Pembentukan Tulang.....	20
2.5.3 <i>Bovine hydroxyapatite</i>	21
2.6 Kombinasi <i>Bovine Amniotic Membrane</i> dan Hidroksiapatit	22
2.6.1 Biokomposit	22
2.6.2 Variasi Kombinasi dan Metode Penggabungan Biokomposit.....	23
2.6.3 Metode Pembuatan Biomaterial	27
2.7 Karakterisasi Material.....	27
2.7.1 <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR)	28
2.7.2 Scanning Electron Microscope (SEM).....	31
2.7.3 <i>Energy Dispersive X-ray Spectroscopy</i> (EDX)	33
2.7.4 Swelling.....	35
2.7.5 Persentase Porositas.....	36
2.8 Sprague Dawley	37
2.9 Proses Diferensiasi Osteogenik.....	39
2.9.1 <i>Signaling Pathway Bovine amniotic membrane</i>	43
2.9.2 <i>Signaling Pathway</i> HA	45
2.10 Marker Osteogenesis.....	46
2.10.1 Kolagen	46
2.10.2 Osteoblas	47
2.10.3 Bone morphogenic protein 2 (BMP-2).....	49
2.10.4 <i>Osteocalcin</i>	50
2.10.5 RUNX2.....	51
2.11 Histopatologi Anatomi (HPA)	53
2.12 Imunohistokimia	54
 BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPORESIS PENELITIAN.....	 55
3.1 Kerangka Konseptual.....	55
3.2 Hipotesis	57
 BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	 59
4.1 Jenis Penelitian.....	59
4.2 Rancangan Penelitian.....	59

4.2.1 Penelitian tahap I	59
4.2.2 Tahap II.....	61
4.3 Populasi.....	63
4.4 Sampel Penelitian.....	64
4.4.1 Sampel	64
4.4.2 Besar Sampel	64
4.5 Variabel Penelitian.....	65
4.6 Definisi Operasional Variabel.....	66
4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian	68
4.7.1 Lokasi Penelitian	68
4.7.2 Waktu Penelitian.....	68
4.8 Bahan dan Alat.....	69
4.8.1 Bahan dan Alat untuk Pembuatan HA.....	69
4.8.2 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Biokomposit BAM-HA.....	69
4.8.3 Bahan dan Alat untuk Analisa Gugus Fungsi BAM-HA	69
4.8.4 Bahan dan Alat untuk Analisa Struktur Porus BAM-HA.....	69
4.8.5 Bahan dan Alat untuk Analisa Elemen BAM-HA.....	70
4.8.6 Bahan dan Alat untuk Analisa Persentase Porositas BAM-HA	70
4.8.7 Bahan dan Alat untuk Analisa Kemampuan <i>Swelling</i> BAM-HA.....	70
4.8.8 Bahan dan Alat Untuk Ekstraksi Gigi Tikus <i>Sprague Dawley</i>	70
4.8.9 Bahan dan Alat untuk Perlakuan Pada Hewan Coba.....	71
4.8.10 Bahan dan Alat untuk Analisa Histopatologi Tikus <i>Sprague Dawley</i> ...71	
4.8.11 Bahan dan Alat untuk Analisa Imunohistokimia Tikus SD	71
4.9 Cara Kerja	72
4.9.1 Uji Laik Etik Pada Komisi Etik.....	72
4.9.2 Persiapan <i>Bovine Amnion Membrane</i> (BAM)	72
4.9.3 Pembuatan Hidroksiaptit	72
4.9.4 Pembuatan Biokomposit BAM-HA.....	73
4.9.5 Gugus Fungsi pada BAM-HA	74
4.9.6 Struktur-Morfologi dan Elemen pada BAM-HA.....	75
4.9.7 Kemampuan <i>swelling</i> pada BAM-HA.....	76
4.9.8 Persentase Porositas pada BAM-HA.....	77
4.9.9 Persiapan Hewan Coba.....	78
4.9.10 Aplikasi Hewan Coba.....	78
4.9.11 Prosedur Persiapan Fiksasi Jaringan.....	81
4.9.12 Pembuatan Blok Parafin	82
4.9.13 Pemotongan Blok Parafin.....	83
4.9.14 Pembuatan Preparat Histologi Pewarnaan Hematoxylin Eosin.....	83
4.9.15 Pembuatan Preparat Histologi Pewarnaan Masson Trichome.....	84
4.9.16 Pembuatan Preparat Imunohistokimia BMP-2, <i>Osteocalcin</i> dan RUNX2.....	85
4.9.17 Pemeriksaan Preparat Histologi.....	87

4.9.18 Pemeriksaan Preparat Imunohistokimia	88
4.10 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	89
4.11 Pengolahan dan Analisis Data.....	89
4.12 Alur Kerja Penelitian	90
4.12.1 Pembuatan Biokomposit BAM-HA.....	90
4.12.2 Karakterisasi Biokomposit BAM-HA	91
4.12.3 Aplikasi Pada hewan Coba	92
BAB 5 HASIL PENELITIAN	93
5.1 Hasil Penelitian Tahap Pertama	94
5.1.1 Hasil Pengujian <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FTIR)	94
5.1.2 Hasil Pengujian <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM)	100
5.1.3 Hasil Pengujian <i>Energy Dispersive X-ray</i> (EDS).....	105
5.1.4 Hasil Pengujian Persentase Porositas	107
5.1.5 Hasil Pengujian Persentase <i>Swelling</i>	109
5.2 Hasil Penelitian Tahap Kedua.....	111
5.2.1 Hasil Analisa Ketebalan Kolagen	111
5.2.2 Hasil Analisa Proliferasi Sel Osteoblas	115
5.2.3 Hasil Analisa Ekspresi BMP-2	120
5.2.4 Hasil Analisa Ekspresi RUNX2	125
5.2.5 Hasil Ekspresi <i>Osteocalcin</i>	130
BAB 6 PEMBAHASAN	135
6.1 Hasil Penelitian Tahap Pertama	137
6.1.1 Analisa <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FTIR)	137
6.1.2 Analisa <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM).....	142
6.1.3 Analisa <i>Energy Dispersive X-ray</i> (EDS).....	144
6.1.4 Analisa Persentase Porositas	145
6.1.5 Analisa Persentase <i>Swelling</i>	146
6.2 Hasil Penelitian Tahap Kedua.....	148
6.2.1 Analisa Ketebalan Kolagen	148
6.2.2 Analisa Proliferasi Sel Osteoblas	150
6.2.3 Analisa Ekspresi BMP-2	154
6.2.4 Analisa Ekspresi RUNX2.....	156
6.2.5 Analisa Ekspresi <i>Osteocalcin</i>	158
6.3 Temuan Baru.....	160
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	161
7.1 Kesimpulan	161
7.2 Saran	162

DAFTAR PUSTAKA	163
LAMPIRAN	181

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tahapan penyembuhan soket pencabutan	10
Gambar 2.2 Anatomi dan komponen tulang alveolar	13
Gambar 2.3 Diagram membran amnion. Amnion dan korion disatukan oleh lapisan spons. Amnion terbentuk dari sel epitel ketuban berlapis tunggal dan lapisan kompak dan fibroblas. Korion terbentuk dari sel trofoblas berlapis-lapis dan lapisan retikuler	15
Gambar 2.4 Mekanisme membran amnion sebagai penyembuh dan regenerasi luka	16
Gambar 2.5 Gambaran kisi kristal hidroksiapatit (A) Tampilan prospektif dari sel unit kristal HA. (B) Tipe ion kalsium yang ditemukan dalam kisi HA	19
Gambar 2.6 Isolasi membran amnion dari plasenta dan pembuatan bahan biokomposit	26
Gambar 2.7 Grafik FTIR hidroksiapatit bovine (A) subcritical water extraction dan (B) sintering pada suhu 650°C	29
Gambar 2.8 FTIR kolagen scaffold	30
Gambar 2.9 FTIR gelatin tulang ayam	31
Gambar 2.10 Mikrograf SEM pada permukaan <i>biomaterial</i> gelatin (a) Pembuatan <i>biomaterial</i> dengan teknik <i>freeze drying</i> memiliki ukuran pori 278 μm (b) Pembuatan <i>biomaterial</i> dengan cairan nitrogen dengan memiliki ukuran pori 182 μm	32
Gambar 2.11 Mikrograf SEM hidroksiapatit <i>bovine</i>	33
Gambar 2.12 <i>Energy dispersive X-ray spectra of anisotropic dan isotropic scaffolds</i>	34
Gambar 2.13 Grafik EDX HA <i>bovine</i>	35
Gambar 2.14 Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) galur (a) Wistar, (b) <i>Sprague-Dawley</i> dan (c) Long Evans.	39
Gambar 2.15 Ilustrasi osteon primer pada penyembuhan soket pencabutan. Fiber kolagen tampak berserat dengan pewarnaan toluidine biru, perbesaran x100	42
Gambar 2.16 Jalur persinyalan hidroksiapatit terhadap penyembuhan tulang	45
Gambar 2.17 Pembentukan kolagen Plug 1 bulan setelah pencabutan	47
Gambar 2.18 Tanda Panah menunjukkan Ekspresi Imunohistokimia BMP-2	50
Gambar 2.19 Gambaran tulang alveolar tikus (a) Observasi pada permukaan tulang menggunakan pewarnaan HE menunjukkan <i>bony trabecula</i> (B), osteoblas (Ob) dan <i>giant multinucleated osteoclasts</i> (Oc); osteosit (Ot) disekeliling Matriks tulang. (b) Imunohistologi untuk deteksi <i>Osteocalcin</i> dengan hematoxylin. Catatan : <i>Osteocalcin-positive</i>	

osteoblas (tanda panah) pada permukaan <i>bony trabecula</i> (B). BV: blood vessel.....	51
Gambar 2.20 Diferensiasi osteoblas dan kondrosit oleh RUNX2	52
Gambar 2.21 Imunohistokimia RUNX2 (tanda panah) dengan pewarnaan Harris's hematoxylin, perbesaran 325. A, <i>pristine bone</i> ; B, <i>intermediate</i> dan C, <i>apical</i>	53
Gambar 5.1 Hasil pembuatan biokomposit (a) BAM-HA 30:70, (b) BAM-HA 35:65, (c) BAM-HA 40 :60, (d) Kontrol negatif BAM	93
Gambar 5.2 Grafik hasil analisa FTIR BAM.....	94
Gambar 5.3 Grafik hasil analisa FTIR dari BAM-HA 30:70	95
Gambar 5.4 Grafik hasil Analisa FTIR dari BAM-HA 35:65	96
Gambar 5.5 Grafik hasil analisa FTIR dari BAM-HA 40:60	97
Gambar 5.6 Hasil analisa FTIR dari Bio-Oss Collagen	98
Gambar 5.7 Mikrograf SEM BAM, a. Perbesaran 50x, b. Perbesaran 100x, dan c. Perbesaran 500x.....	100
Gambar 5.8 Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 30:70 a. Perbesaran 50x b. Perbesaran 100x dan c. Perbesaran 500x.....	101
Gambar 5.9 Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 35:65 a. Perbesaran 50x b. Perbesaran 100x dan c. Perbesaran 500x.....	102
Gambar 5.10 Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 40:60 a. Perbesaran 50x b. Perbesaran 100x dan c. Perbesaran 500x.....	103
Gambar 5.11 Mikrograf SEM Bio-Oss Collagen a. Perbesaran 50x b. Perbesaran 100x dan c. Perbesaran 500x	104
Gambar 5.12 Gambaran Grafik dan Pemetaan EDS (a,b) BAM, (c,d) BAM-HA 30 :70, (e,f) BAM-HA 35:65, (g,h) BAM-HA 40:60, (i,j) Bio-Oss Collagen.....	106
Gambar 5.13 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	112
Gambar 5.14 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	113
Gambar 5.15 Perbandingan rerata ketebalan kolagen antar kelompok	114
Gambar 5.16 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)	116

- Gambar 5.17 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)117
- Gambar 5.18 Perbandingan rerata sel osteoblas antar kelompok118
- Gambar 5.19 Gambaran Imunohistokimia Ekspresi BMP2 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-2120
- Gambar 5.20 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-2121
- Gambar 5.21 Perbandingan rerata ekspresi BMP-2 antar kelompok123
- Gambar 5.22 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 RUNX2125
- Gambar 5.23 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 RUNX2126
- Gambar 5.24 Perbandingan rerata ekspresi RUNX2 antar kelompok128
- Gambar 5.25 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*130
- Gambar 5.26 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*131
- Gambar 5.27 Perbandingan rerata ekspresi RUNX2 antar kelompok133

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Taksonomi Sprague Dawley	38
Tabel 5.1	Puncak penyerapan gugus fungsi amida I, II, III, A, B, OH ⁻ , PO ₄ ³⁻ dan CO ₃ ²⁻ pada BAM, BAM-HA 30:70, 35:65, 40:60	99
Tabel 5.2	Perbandingan elemen hasil <i>mapping</i> EDS yang terkandung pada masing-masing spesimen	107
Tabel 5.3	Hasil pengujian persentase porositas	108
Tabel 5.4	Analisa statistik persentase porositas ANOVA satu jalan post hoc Games Howel.....	109
Tabel 5.5	Hasil pengujian persentase <i>swelling</i>	110
Tabel 5.6	Analisa statistika persentase <i>swelling</i> ANOVA satu jalan post hoc games howel	110
Tabel 5.7	Hasil rerata dan standar deviasi analisa ketebalan kolagen	114
Tabel 5.8	Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> analisis ketebalan kolagen	115
Tabel 5.9	Hasil rerata dan standar deviasi analisa proliferasi sel osteoblas ...	118
Tabel 5.10	Analisis Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Sel Osteoblas	119
Tabel 5.11	Hasil Rerata dan Standar Deviasi Analisa Ekspresi BMP-2.....	122
Tabel 5.12	Analisis Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Ekspresi BMP-2	122
Tabel 5.13	Hasil Rerata dan Standar Deviasi Analisa Ekspresi <i>RUNX2</i>	127
Tabel 5.14	Analisis Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Ekspresi <i>RUNX2</i>	127
Tabel 5.15	Hasil Rerata dan Standar Deviasi Analisa Ekspresi <i>Osteocalcin</i> ...	132
Tabel 5.16	Analisis Statistik <i>Two Way ANOVA Post Hoc Tukey</i> Ekspresi <i>Osteocalcin</i>	132
Tabel 6.1	Referensi puncak penyerapan gugus fungsi amida I, II, III, A, B, OH ⁻ , PO ₄ ³⁻ , dan CO ₃ ²⁻	138

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Keaslian penelitian	181
Lampiran 2	Laik etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.....	185
Lampiran 3	Laik etik LPPM IPB	186
Lampiran 4	Hasil perhitungan Jumlah dan Diameter Porus pada Mikrograf SEM perbesaran 100x	187
Lampiran 5	Hasil pengujian persentase porositas	191
Lampiran 6	Hasil pengujian <i>swelling</i>	193
Lampiran 7	Pembuatan Biokomposit BAM-HA.....	194
Lampiran 8	Persiapan Spesimen untuk Pengujian	195
Lampiran 9	Aplikasi Material Pada Hewan Coba dan Pembuatan Preparat	196
Lampiran 10	Hasil uji Analisa statistika	199

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>
β TCP	: <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>
FDBA	: <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>Hematoksilin-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>
TNFα	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>

TGF α : *Transforming Growth Factor α*
TGF β : *Transforming Growth Factor β*
TLR : *Toll Like Receptor*
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Masalah kesehatan gigi dan mulut dialami 57,6% warga Indonesia, dengan tindakan pencabutan menempati urutan kedua (Riskesdas, 2018). Setelah 3 bulan pencabutan, akan terjadi resorpsi tulang alveolar berkisar 40–60% baik vertikal maupun horizontal (Nisar *et al.*, 2020). Resorpsi ketebalan tulang alveolar sekitar 3,87 mm dan resorpsi tinggi tulang alveolar berkisar 1,67 sampai 2,03 mm (Willenbacher *et al.*, 2016), resorpsi terjadi lebih cepat pada mandibula terutama di bagian bukal (Fickl *et al.*, 2008).

Saat ini restorasi implan gigi digunakan sebagai alternatif pada pasien dengan kehilangan sebagian atau seluruh gigi (Atieh *et al.*, 2018). Menurut Monje *et al.*, (2013) keberhasilan implan gigi ditentukan oleh kualitas dan kuantitas tulang alveolar. Keberhasilan implan dipengaruhi pula oleh resorpsi tulang alveolar yang terjadi setelah pencabutan gigi (Zhang *et al.*, 2013). Salah satu syarat keberhasilan implan adalah resorpsi tulang alveolar terjadi maksimal kurang dari 1 mm yang terjadi dalam kurun waktu 1 tahun (Annibali *et al.*, 2012). Oleh karena itu, preservasi soket dilakukan untuk mengurangi atau menghentikan terjadinya resorpsi tulang alveolar (Kalsi *et al.*, 2019). Persevasi soket dilakukan untuk mencegah resorpsi tulang alveolar dengan memberikan biomaterial aktif pada soket pencabutan (Willenbacher *et al.*, 2016).

Bio-Oss Collagen adalah salah satu biomaterial yang digunakan sebagai preservasi soket tulang alveolar. Material ini mengandung kombinasi kolagen yang berasal dari babi dan hidroksiapatit yang berasal dari tulang sapi (Araújo & Lindhe, 2009). Kandungan yang ada pada material ini, menyebabkan material ini sulit mendapatkan legalitas kehalalannya di Indonesia (Majelis Ulama Indonesia, 2021).

Salah satu biomaterial yang memiliki potensi osteoinduktif untuk penyembuhan tulang adalah membran amnion (Tang *et al.*, 2017). *Bovine Amniotic Membrane* (BAM) memiliki kandungan kolagen dan faktor pertumbuhan (Singh & Madhan, 2017). Biomaterial ini memiliki persamaan dengan membran amnion manusia (Siswanto *et al.*, 2013). Kandungan faktor pertumbuhan yang ada pada membran amnion ini antara lain EGF, TGF- α , KGF, HGF, bFGF, TGF- β , KGFR dan HGFR (Koizumi *et al.*, 2000). Selain faktor pertumbuhan, matriks ekstraselular pada membran amnion terdiri dari kolagen tipe I, III, IV V, VI, XV, laminin, nidogen, fibronektin dan proteoglikan (Niknejad *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2017). Kolagen yang terkandung pada membran amnion akan berpotensi sebagai material biomedis pada rekayasa jaringan (Gunasekaran *et al.*, 2020). Menurut Tang (2017), membran amnion menunjukkan adanya ekspresi CXCR-4, MCP-1, *Osteocalcin* dan CatK sehingga memiliki kemampuan osteoinduktif pada saat pembentukan tulang (Tang *et al.*, 2017).

Limitasi membran amnion adalah mudah mengalami biodegradasi, sehingga sulit untuk mempertahankan integritas struktural yang diperlukan untuk regenerasi tulang (Dimitriou *et al.*, 2012). Mudahnya terjadi biodegradasi karena kandungan kolagen pada membran amnion mudah terserap (Castro-ceseña & Camachovillegas, 2016). Hal ini menyebabkan penyembuhan tulang hanya terjadi di bagian

marginal (Fickl *et al.*, 2008). Menurut penelitian Starecki *et al.*, (2014) kombinasi membran amnion dan material pembentuk tulang yang bersifat osteokonduktif akan meningkatkan regenerasi tulang. Untuk mengatasi limitasi tersebut, membran amnion dikombinasikan dengan mineral garam kalsium (Ca^{2+}) untuk memperbaiki struktur dan meningkatkan sifat osteogenesis (Dewey *et al.*, 2020; Sabouri *et al.*, 2020).

Salah satu biomaterial yang mengandung garam kalsium fosfat yang stabil adalah Hidroksiapatit (HA) dengan rumus kimia ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). HA berperan dalam pembentukan tulang atau substitusi tulang pada saat ekstraksi dan dapat digunakan sebagai preservasi soket (Machtei *et al.*, 2019). Hidroksiapatit *bovine* 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 memiliki kemampuan osteokonduktif dan terbukti mampu merangsang diferensiasi osteoblas pada pembentukan tulang (Mozartha, 2015).

Penggabungan material BAM dan HA menjadi suatu material biokomposit yang diharapkan memiliki kemampuan yang sinergis untuk meregenerasi jaringan tulang. Faktor pertumbuhan yang terkandung dalam BAM, TGF β dan FGF2 menstimulasi fibroblas untuk membentuk kolagen tipe I dan III yang berperan dalam penyembuhan luka (Primadina *et al.*, 2019). Kolagen yang terbentuk akan berikatan dengan ion kalsium dari hidroksiapatit untuk proses osteogenesis (Brasinika *et al.*, 2016). Hidroksiapatit dengan kandungan kalsium fosfat, akan menstimulasi ekspresi gen osteoblas (Bal *et al.*, 2020). Pada penelitian ini dilakukan

pembuatan biokomposit BAM-HA untuk melihat mekanisme regenerasi tulang yang diharapkan dapat mempertahankan dimensi tulang alveolar.

Tulang terdiri dari 20-30% matriks organik, 60-70% fraksi anorganik dan 10% air dari massa tulang keseluruhan (Kołodziejska *et al.*, 2020). Menurut Shahmoradi *et al.* (2014), tulang alveolar memiliki komposisi yang hampir sama seperti sementum. Komposisi tersebut terdiri dari mineral hidroksiapatit sebesar 65 % dengan tambahan matriks organik kolagen 35 % (Oosterlaken *et al.*, 2021). Berdasarkan rasio tersebut maka dalam penelitian ini dilakukan pembuatan biokomposit dengan varian 30:70, 35:65 dan 40:60. Suatu novel biokomposit memerlukan uji karakteristik untuk mengetahui sifat material sebelum dilakukan uji *in vivo*.

Uji karakterisasi material merupakan uji tahap awal untuk mengetahui sifat-sifat material tersebut dan potensinya untuk menjadi *scaffold*. Karakterisasi material memberikan informasi tentang sifat-sifat fisis maupun kimiawi material yang dapat dipengaruhi oleh ukuran dan komponen material (Abdullah & Khairurrijal, 2009). Tahap awal pada penelitian ini akan melakukan karakterisasi pada gugus fungsi, struktur material, elemen material, persentase porositas, kemampuan *swelling*. Gugus fungsi dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa organik dari komponen material (Nandiyanto *et al.*, 2019). Struktur morfologi material berperan penting dalam menganalisis bentuk porus yang akan mempengaruhi pertumbuhan dan pelekatan awal sel (Choudhary *et al.*, 2017). Elemen material berperan untuk mengetahui seberapa besar unsur-unsur pembentuk tulang (Scimeca *et al.*, 2018). Persentase porositas akan mempengaruhi peranan material sebagai *scaffold* untuk rekayasa jaringan tulang (Milla *et al.*,

2018). Kemampuan *swelling* suatu material akan mempengaruhi penyerapan nutrisi yang akan mempercepat proses penyembuhan (Tohamy *et al.*, 2018).

Uji *in vivo* dilakukan setelah uji karakterisasi material, dengan aplikasi biokomposit BAM-HA pada soket tulang alveolar setelah pencabutan tikus *Sprague Dawley*. Mekanisme regenerasi tulang alveolar dianalisis pada preparat histologi dan imunohistokimia pada hari ke-14 untuk menganalisis fase proliferasi (Steiner *et al.*, 2008) dan pada hari ke-28 untuk menganalisis fase remodeling tulang (Kalsi *et al.*, 2019). Uji *in vivo* ini akan menganalisis ketebalan kolagen, proliferasi sel osteoblas, ekspresi BMP2, RUNX-2 dan *Osteocalcin*. Kolagen berperan penting dalam tahap awal proses penyembuhan luka (Ferreira *et al.*, 2012). Sel osteoblas penanda dari penyembuhan tulang alveolar dan akan mengekspresikan protein-protein pembentuk tulang. (Tanaka *et al.*, 2005). BMP-2 merupakan salah satu protein yang dapat menginduksi pembentukan tulang. (Stuckensen *et al.*, 2019). RUNX2 berperan dalam diferensiasi osteoblas dan menstimulasi *Osteocalcin*. *Osteocalcin* berperan pada diferensiasi osteoblas tahap akhir untuk mengikat kalsium pada matriks tulang. (Herniyati, 2016)

Biokomposit BAM-HA diharapkan dapat menjadi alternatif material preservasi soket *alveolar*. Sampai saat ini belum pernah ada penelitian yang mengombinasikan BAM-HA menjadi material biokomposit. Berdasarkan fakta tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk membuat dan menganalisis karakteristik sifat serta mekanisme regenerasi tulang alveolar pada hewan coba dengan variasi perbandingan BAM-HA 30:70, 35:65 dan 40:60.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang ada, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut: Apakah biokomposit BAM-HA dengan varian 30:70, 35:65 dan 40:60 memiliki karakteristik dan mekanisme regenerasi sebagai material preservasi soket tulang alveolar?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk menganalisis karakteristik dan mekanisme regenerasi biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 sebagai material preservasi soket tulang alveolar

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini secara khusus dilakukan untuk :

1. Menganalisis gugus fungsi variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60.
2. Menganalisis struktur material dan bentuk pori variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60.
3. Menganalisis elemen material variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60.
4. Menganalisis persentase porositas variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60.
5. Menganalisis kemampuan *swelling* variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60.

6. Menganalisis ketebalan kolagen variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan varian 30:70, 35:65 dan 40:60 pada hari ke-14 dan 28.
7. Menganalisis proliferasi osteoblas variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 pada hari ke-14 dan 28.
8. Menganalisis ekspresi BMP-2 variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 pada hari ke-14 dan 28.
9. Menganalisis ekspresi RUNX2 variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 pada hari ke-14 dan 28.
10. Menganalisis ekspresi *Osteocalcin* variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 pada hari ke-14 dan 28.

1.4 Manfaat

1.4.1 Bagi Ilmu Pengetahuan dan Teknologi

1. Mendapatkan paten atas invensi biokomposit BAM-HA yang berperan sebagai material preservasi soket untuk mempertahankan dimensi tulang alveolar.
2. Mendapatkan hasil karakteristik sifat biokomposit BAM-HA melalui identifikasi gugus fungsi, morfologi permukaan, elemen material, persentase porositas, kemampuan *swelling* dan hasil uji *in vivo* pada hewan coba *Sprague Dawley* dengan pembentukan kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*, sebagai dasar persiapan untuk uji klinis.
3. Memproduksi material biokomposit BAM-HA dalam skala besar sehingga dapat diaplikasikan dalam bidang kedokteran gigi setelah pencabutan untuk mempertahankan dimensi tulang alveolar.

4. Mendapatkan kerjasama antara dokter gigi preklinik sebagai peneliti dan klinisi untuk mengembangkan material yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar sehingga prospek pemasangan protesa dan implan menjadi lebih baik.

1.4.2 Bagi Kesejahteraan Umat Manusia

Material preservasi soket biokomposit BAM-HA, diharapkan menjadi material yang kompatibel untuk menstimulasi penyembuhan tulang alveolar yang lebih sempurna dan cepat setelah dilakukan pencabutan gigi. Peningkatan proses penyembuhan tulang alveolar akan mengoptimalkan tahapan rehabilitasi, fungsional dan estetik untuk restorasi implan pada pasien.

BAB 2

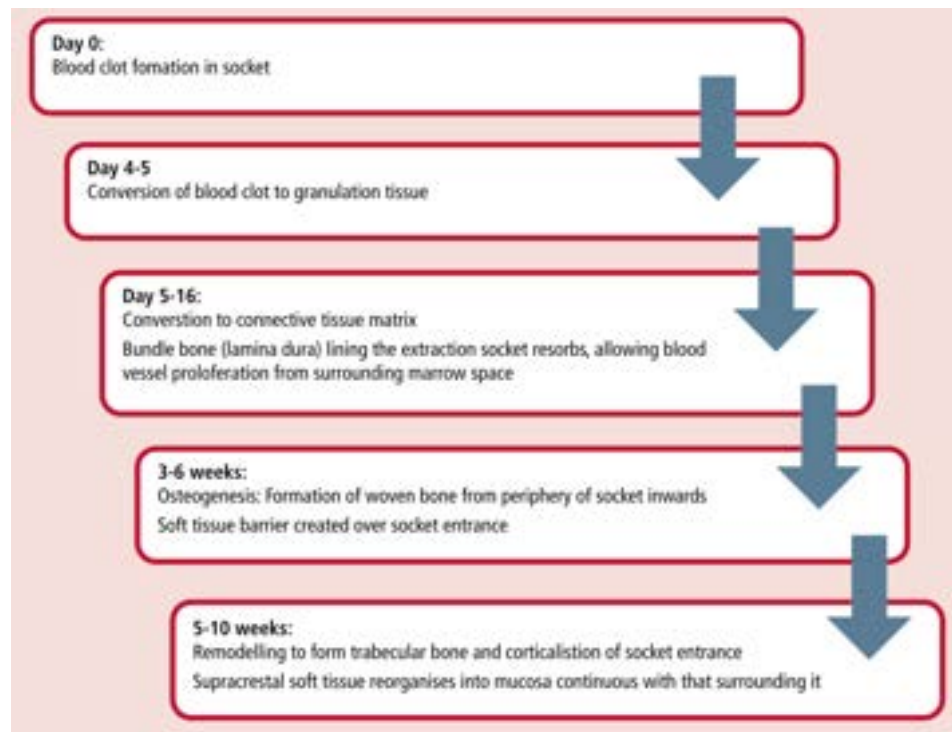
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perservasi Soket

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 (Kalsi *et al.*, 2019).



Gambar 2.1 Tahapan penyembuhan soket pencabutan (Kalsi *et al.*, 2019)

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), 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 materials* antara lain *bioactive glass particles* dan *calcium phosphates*; material bioaktif *recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)* and *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.

2.2 Dental Implan

Teknologi implan gigi semakin berkembang saat ini, kenyamanan dan kestabilan adalah keunggulan implan gigi dibandingkan dengan jenis protesa yang lain. Implan merupakan pilihan perawatan ideal untuk pasien dengan kehilangan satu atau seluruh gigi akibat kerusakan jaringan periodontal, dan trauma, kegagalan

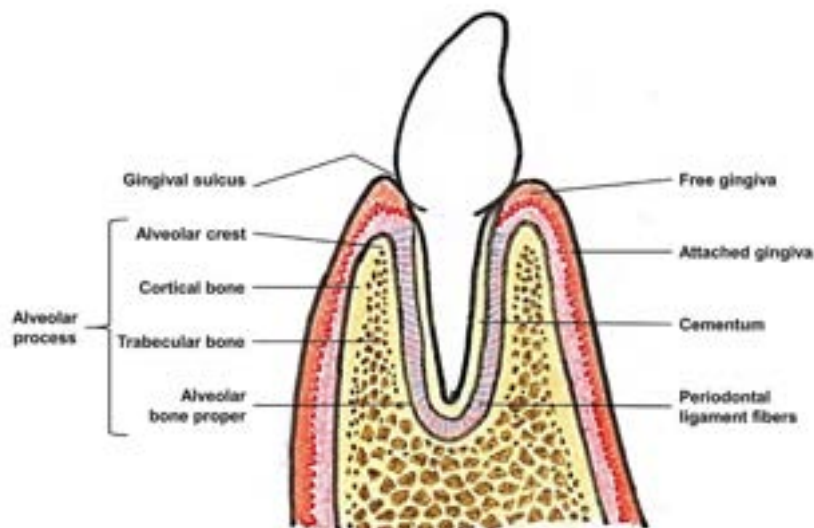
perawatan endodonti (Gbadebo *et al.*, 2014). Implan gigi terlihat menyerupai gigi asli karena desain gigi tiruan cekat ini tidak membutuhkan preparasi gigi tetangga sebagai gigi pendukung (Kurnia *et al.*, 2014).

Keberhasilan implan gigi telah banyak ditunjukkan dalam penelitian, namun, implan yang ditempatkan pada kualitas tulang yang buruk atau penggunaan *immediate* implan menunjukkan tingkat keberhasilan yang lebih rendah. Kestabilan implan dalam rongga mulut adalah syarat wajib untuk keberhasilan suatu implan gigi. Ukuran stabilitas implan adalah dengan terjadinya osseointegrasi dan tidak adanya gerakan implan pada saat pengukuran (Atieh *et al.*, 2018). Stabilitas implan dapat diklasifikasikan sebagai primer atau sekunder. Stabilitas implan primer diukur pada saat penempatan implan, sedangkan stabilitas implan sekunder diukur setelah insersi. Stabilitas primer terjadi dari ikatan mekanis dengan tulang kortikal. Stabilitas sekunder merupakan stabilitas biologis terjadi melalui melalui regenerasi dan remodeling tulang. Stabilitas primer dipengaruhi oleh kualitas dan kuantitas tulang, teknik pembedahan dan geometri implan (panjang, diameter, karakteristik permukaan). Sedangkan stabilitas sekunder dipengaruhi oleh stabilitas primer (Swami *et al.*, 2016).

Salah satu parameter pada keberhasilan implan gigi adalah terjadinya osseointegrasi, dapat berfungsi dengan baik, tanpa gejala dan dengan kehilangan tulang pada daerah marginal yang lebih rendah dari 50%. Kehilangan tulang di bagian marginal harus kurang dari 1 mm dalam tahun pertama implan terpasang dan kurang dari 0,2 mm setiap tahun selanjutnya (Annibali *et al.*, 2012).

2.3 Komposisi Tulang Alveolar

Enamel, dentin, sementum dan tulang adalah natural komposit yang terdiri dari komponen organik dan inorganik (Neel *et al.*, 2016). Tulang alveolar tersusun atas tulang *bundle* terbentuk berlapis-lapis dengan orientasi paralel sepanjang arah koronal apikal gigi. Serat *sharpey* merupakan lapisan tipis lamella tulang dengan struktur miring yang melapisi dinding soket dan bersambung dengan serat ligamen periodontal. Pada pembentukan tulang alveolar, tulang ini berperan dalam mendukung gigi. Tulang alveolar terdiri dari pelat tipis tulang kortikal dengan banyak perforasi (atau pelat cribriform) yang memungkinkan lewatnya pembuluh darah antara ruang sumsum tulang dan ligamen periodontal. Tepi koronal tulang alveolar membentuk puncak alveolar, yang umumnya sejajar dengan *cemento-enamel junction* (CEJ) dan berada pada jarak 1-2 mm ke arah apikal CEJ. Pemeriksaan radiografi menunjukkan tulang kompak yang melapisi tulang alveolar mengandung serat *sharpey*, disebut dengan lamina dura (Gambar 2.2) (Ramalingam *et al.*, 2019).



Gambar 2.2 Anatomi dan komponen tulang 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. Jaringan ini terdiri dari substansi ekstraseluler dan sel tulang: osteoblas, osteoklas, osteosit dan sel osteogenik (Kołodziejska *et al.*, 2020).

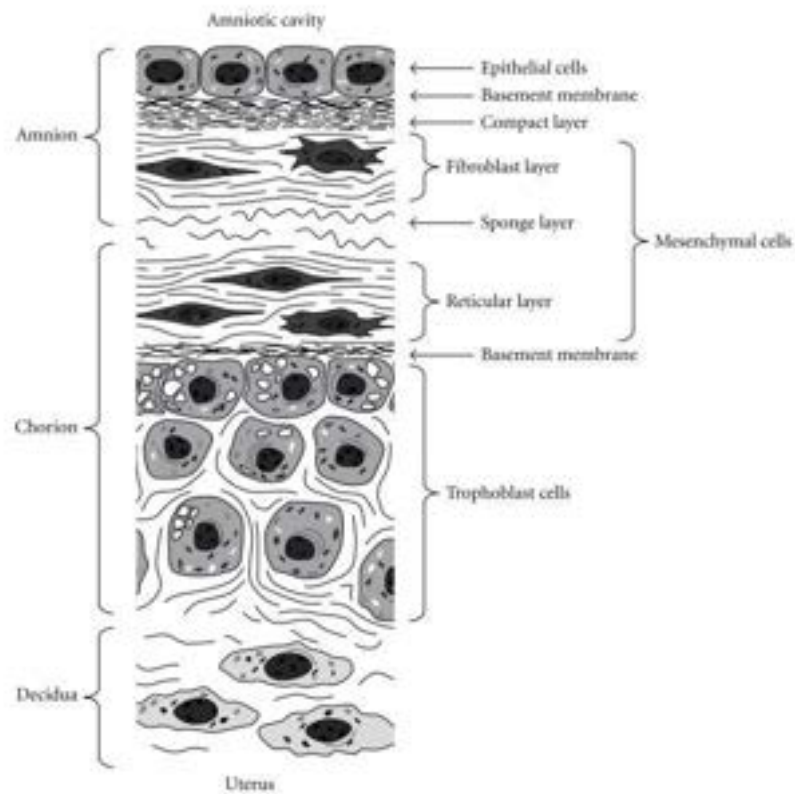
Tulang alveolar memiliki komposisi yang hampir sama seperti sementum. Komposisi utama tulang alveolar terdiri dari mineral hidroksiapatit sebesar (65 % berat) dengan tambahan Matriks organik (23 % berat) dan air (10 % berat) (Shahmoradi *et al.*, 2014). Hal senada diungkapkan oleh (Oosterlaken *et al.*, 2021) bahwa rasio organik dan inorganik sementum berkisar 35:65 % berat. Menurut Kołodziejska *et al.*, (2020), selain 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. Komponen air sekitar 10% dari massa tulang. Air akan memfasilitasi transportasi cairan, berkontribusi pada sifat viskoelastis dan memainkan peran kunci dalam proses mineralisasi.

2.4 Membran Amnion

2.4.1 Struktur dan Komposisi 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: 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 (Gambar 3). 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 dan kolagen V dan IV dapat diidentifikasi pada lapisan kompak dan spons secara berurutan (Gunasekaran *et al.*, 2020).

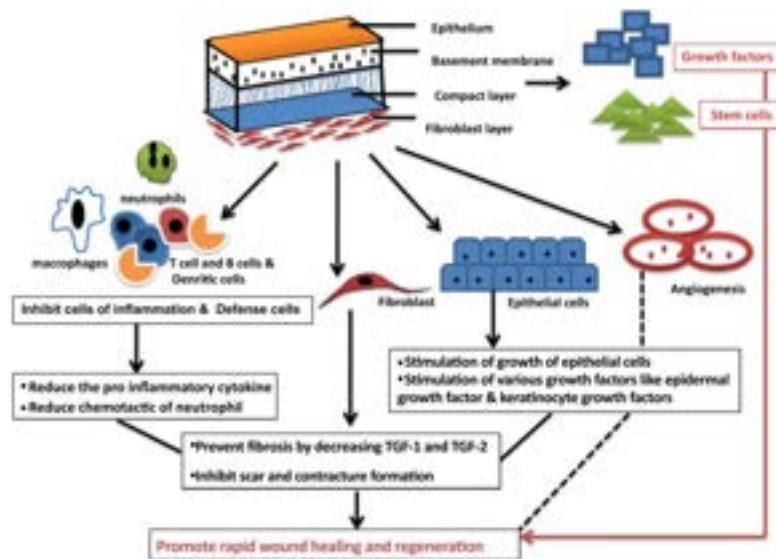


Gambar 2.3 Diagram membran amnion. Amnion dan korion disatukan oleh lapisan spons. Amnion terbentuk dari sel epitel ketuban berlapis tunggal dan lapisan kompak dan fibroblas. Korion terbentuk dari sel trofoblas berlapis-lapis dan lapisan retikuler (Uchide *et al.*, 2012)

Membran amnion bukan hanya membran avaskular sederhana akan tetapi memiliki multifungsi metabolisme seperti pengangkutan air dan bahan terlarut dan 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).

2.4.2 Potensi membran amnion



Gambar 2.4 Mekanisme membran amnion sebagai penyembuh dan regenerasi luka (Chopra & Thomas, 2013)

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. 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 antara lain 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 (Gambar 2.4).

2.4.3 Bovine Amniotic Membrane (BAM)

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). 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, 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.

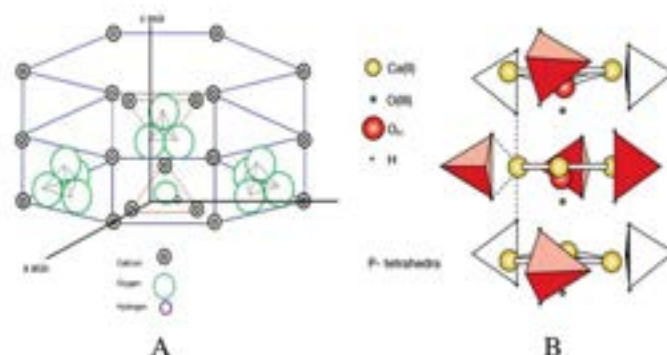
Penelitian Indrawati *et al.* (2019), menunjukkan ekspresi BMP-2 setelah dilakukan pemberian spons membran amnion pada soket tulang alveolar setelah pencabutan. Hasilnya menunjukkan BAM mampu menginduksi BMP-2 selama proses osteogenesis, sehingga dapat disimpulkan material ini memiliki sifat osteoinduktif. 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).

2.5 Hidroksiapatit (HA)

2.5.1 Struktur Hidroksiapatit (HA)

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. Gambar 2.5 menunjukkan pandangan prospektif dari sel satuan kristal HA. 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 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ telah banyak digunakan dalam rekayasa jaringan tulang karena biokompatibilitas yang baik, mudah terurai, osteokonduktivitas baik dan tidak toksik (Chen *et al.*, 2017).



Gambar 2.5 Gambaran kisi kristal hidroksiapatit (A) Tampilan prospektif dari sel unit kristal HA. (B) Tipe ion kalsium yang ditemukan dalam kisi HA (Ratnayake *et al.*, 2017)

2.5.2 Potensi Hidroksiapatit Dalam Pembentukan Tulang

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 peningkatan 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).

2.5.3 *Bovine hydroxyapatite*

Hidroksiapatit dapat disintesis dari komponen anorganik atau dari sumber daya alam, seperti tulang mamalia dan laut, tumbuhan dan 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 yang 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).

2.6 Kombinasi *Bovine Amniotic Membrane* dan Hidroksiapatit

2.6.1 Biokomposit

BAM adalah suatu biomaterial alami yang mempunyai kandungan di antaranya protein, kolagen, faktor pertumbuhan. Kolagen adalah komponen dari matriks ekstraseluler dan memberikan basis yang sangat baik untuk menggantikan jaringan tulang yang rusak (Chen *et al.*, 2017). Faktor pertumbuhan yang terkandung pada membran amnion akan meningkatkan penyembuhan luka dan regenerasi jaringan tulang (Walsh *et al.*, 2019).

Hidroksiapatit memiliki sifat bioaktif yang sangat baik dan sifat biokompatibel. Material ini dapat membentuk ikatan kimia dengan jaringan dan tidak beracun dan osteokonduktif. Ini adalah senyawa yang ideal untuk produksi pengganti tulang (Kaczmarek & Sionkowska, 2018). Hidroksiapatit *bovine* digunakan dalam *bone graft* sebagai material pengganti tulang sebagai preservasi soket. Material ini akan lebih efektif apabila dikombinasikan (Gholami *et al.*, 2012).

Biokomposit adalah material yang terdiri dari dua atau lebih bahan penyusun yang berbeda yang digabungkan untuk menghasilkan material baru dengan sifat yang lebih baik (Rudin & Phillips, 2013). Biokomposit umumnya terdiri dari dua unsur. Unsur yang berfungsi sebagai pengisi (*fillers*) yaitu serat (*fiber*) dan bahan pengikat serat-serat tersebut yang disebut matriks. Biokomposit dapat berupa gabungan di antara dua atau lebih biomaterial (Anjarsari *et al.*, 2016). Menurut Yang *et al.*, (2020), kombinasi biokomposit akan memaksimalkan sifat material yang digunakan untuk aplikasi biomedis. Hal senada juga dilakukan oleh Chen *et*

al., (2017), bahwa material komposit yang diproduksi dengan kombinasi kolagen dan HA dengan beberapa teknik dapat menjadi pilihan untuk mengoptimalkan regenerasi tulang, karena mempunyai komposisi dan struktur seperti tulang alami. Kombinasi membran amnion dengan *beta Tricalcium Phosphate* akan meningkatkan proses osteogenesis pada defek tulang alveolar (Jiawen *et al.*, 2014). *Scaffold* membran amnion dengan kombinasi material anorganik dapat memberikan lingkungan yang bermanfaat untuk membantu perbaikan tulang kraniomaksilofasial, terutama dalam perjalanan defek yang menunjukkan komplikasi inflamasi yang signifikan (Dewey *et al.*, 2020). Penggabungan komponen keramik HA ke dalam perancah kolagen berfungsi untuk membuat konstruksi yang osteokonduktif, memiliki sifat mekanis optimal untuk pembentukan jaringan tulang dan keduanya biokompatibel dan dapat terurai secara hayati (Walsh *et al.*, 2019). Studi *in vivo* menunjukkan bahwa kombinasi HA dan kolagen yang ditanamkan ke substansi tulang akan diserap oleh sel-sel osteoklas melalui fagositosis diikuti oleh pembentukan tulang baru oleh osteoblas di daerah sekitarnya. Kombinasi HA dan kolagen akan mendorong diferensiasi osteoklastik dan mengaktifkan osteoblas (Hiratsuka *et al.*, 2020).

2.6.2 Variasi Kombinasi dan Metode Penggabungan Biokomposit

Metode dan variasi penggabungan biokomposit bertujuan untuk menghasilkan material yang sangat mirip komposisi kimia, mikro dan makro-struktur dan porositas dari jaringan tulang (Kołodziejska *et al.*, 2020). Beberapa metode dan variasi kombinasi telah digunakan untuk menggabungkan material organik dan anorganik sebagai biokomposit yang menyerupai struktur tulang yang berperan dalam penyembuhan jaringan tulang.

Menurut penelitian Yuliati *et al.* (2019) yang melakukan variasi kombinasi pembuatan *scaffold* karbonat apatit : kitosan-gelatin memiliki rasio antara lain 50:50, 60:40, 70:30 dan 80:20. Pembuatan kombinasi karbonat apatit, kitosan dan gelatin dicampur sampai membentuk gel. Gel dibekukan pada suhu -40°C selama 2x24 jam kemudian dilakukan *freeze drying* selama 2x24 jam. Variasi kombinasi dan metode rasio 70:30, memiliki ukuran porositas yang maksimal untuk pertumbuhan sel osteoblas dan memiliki kekuatan kompresi yang tertinggi. Hal yang senada dihasilkan pada penelitian Brasinika *et al.* (2016) yang menggabungkan hidroksiapatit dengan kolagen-arginin dengan variasi kombinasi 80:20, 70:30, 60:40. Penelitian ini menunjukkan variasi kombinasi 70:30 merupakan rasio terbaik untuk regenerasi jaringan tulang.

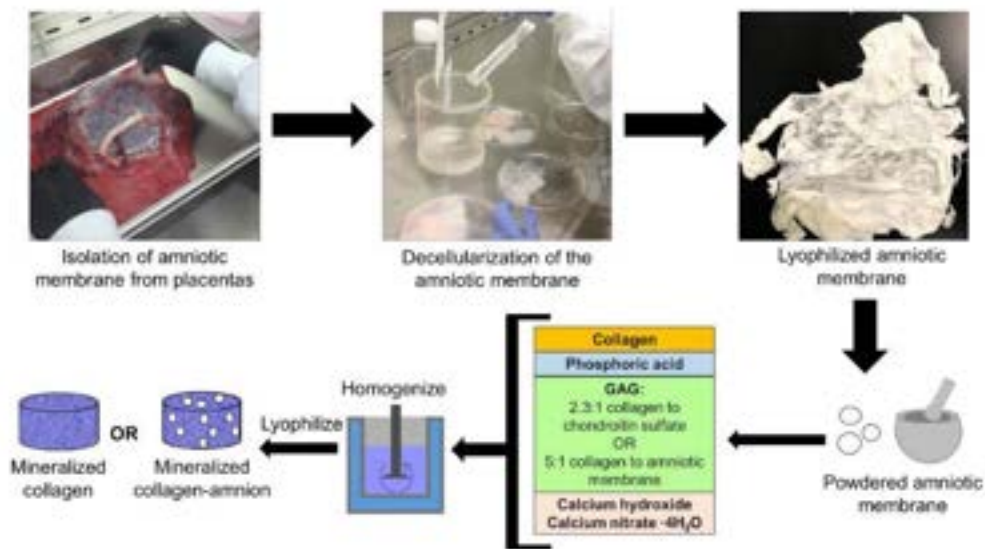
Penelitian lainnya menggabungkan kalsium karbonat dengan kitosan-gelatin untuk melihat biodegradasi dan kekuatan kompresi. Pembuatan biomaterial dilakukan dengan variasi perbandingan kalsium karbonat:kitosan-gelatin sebesar 60:40 dan 70:30. Penelitian tersebut menunjukkan, rasio 40:60 memiliki biodegradasi yang lebih rendah dan kekuatan tekan yang lebih tinggi dibandingkan 30:70 (Fadhlallah *et al.*, 2018). Beberapa literatur menyatakan bahwa komposisi tulang alveolar terdiri dari 35% anorganik dan 75% organik (Uppoor *et al.*, 2014) (Shahmoradi *et al.*, 2014), (Oosterlaken *et al.*, 2021).

Studi yang dilakukan oleh Walsh *et al.* (2019) menggabungkan kolagen dan hidroksiapatit untuk pembuatan *scaffold* dengan perbandingan 1:2. Sebanyak 1,8 gram kolagen ditambahkan 3,6 gram hidroksiapatit dicampur sampai membentuk suspensi bubuk kemudian dilakukan *freeze drying*. Pada penelitian ini *scaffold* yang

terbentuk mampu sebagai wadah untuk faktor pertumbuhan yang berperan pada regenerasi tulang.

Dua metode untuk pembuatan biokomposit HA dan kolagen dilakukan pada penelitian Cunniffe *et al.*, (2010). Pada metode pertama, partikel nanohidroksiapatit ditambahkan pada suspensi kolagen (metode bubuk-suspensi) kemudian diliofilisasi. Pada metode kedua, kolagen yang telah terliliofilisasi berupa *scaffold* berpori direndam dalam suspensi HA kemudian diliofilisasi (metode perendaman). Kedua metode pembuatan biokomposit tersebut, diperoleh *scaffold* komposit dengan struktur yang sangat berpori dan saling berikatan. Metode suspensi merupakan metode yang lebih mudah dilakukan pengulangan dan lebih mudah dilakukan variasi kombinasi.

Penelitian yang dilakukan oleh Yunoki *et al.* (2007) menggunakan perbandingan nanokomposit HA dan kolagen sebesar 80:20. Nanokomposit disintesis dalam kondisi standar (asam fosfat dan Ca(OH)_2 sebagai reagen untuk HA dan kolagen tipe I dicampur pada pH 8–9 dan suhu sekitar 40°C). Nanokomposit HA dan kolagen (setelah liofilisasi awal) dimasukkan dalam air suling atau dalam buffer PBS (PBS standar, pH = 7,4), kemudian dibekukan kembali dan divakum pada suhu 140°C . Adanya PBS akan menghasilkan, ikatan silang serat kolagen dan komposit berpori sehingga sifat mekanik yang sangat baik diperoleh.



Gambar 2.6 Isolasi membran amnion dari plasenta dan pembuatan bahan biokomposit (Dewey *et al.*, 2020)

Gambar 2.6 menunjukkan pembuatan kombinasi membran amnion dengan penambahan mineral garam kalsium. Prosedur awal adalah memisahkan membran amnion secara mekanis dari plasenta. Darah yang ada pada membran dibilas dengan HBSS yang bebas kalsium dan magnesium. Amnion kemudian dikikis dengan spatula untuk menghilangkan sisa darah dan bagian dari lapisan *biomaterial*. Kemudian dipotong menjadi beberapa bagian yang lebih kecil, dilakukan deselularisasi, dibilas dengan PBS untuk menghilangkan kotoran dan disimpan dalam PBS pada suhu 4°C selama 24-48 jam. membran amnion diliofilisasi. Membran amnion ditumbuk sampai menjadi bubuk kemudian ditambahkan kolagen dan garam kalsium untuk mineralisasi. Setelah didapatkan suspense bubuk yang homogen kemudian dilakukan liofilisasi kembali (Dewey *et al.*, 2020). Studi yang senada, dilakukan oleh Sabouri *et al.* (2020) dengan mineralisasi membran amnion dengan Ca^{2+} dan PO_4^{3-} . Studi ini bertujuan untuk menggabungkan biomaterial untuk membentuk biokompisit yang berperan sebagai rekayasa jaringan pada penyembuhan tulang.

Bio-Oss Collagen® adalah kombinasi 90% granula tulang *bovine cancellous* dan 10% kolagen *porcein*. Material ini digunakan sebagai material preservasi soket dalam bentuk blok yang memiliki struktur porusitas. Peran kolagen pada Bio-Oss® adalah sebagai pengikat partikel tulang dan untuk kemudahan pada saat aplikasi (FDA, 2013).

2.6.3 Metode Pembuatan Biomaterial

Struktur porus pada suatu biomaterial akan berperan sebagai media pertukaran gas, absorpsi dari eksudat luka. Porus ini berperan juga sebagai tempat pertumbuhan sel, vaskularisasi dan membawa medikamen sehingga regenerasi tulang akan menjadi lebih cepat (Pei *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2013; Long *et al.*, 2017). Pada pembuatan proses biomaterial ini dapat menggunakan metode *freeze drying* (liofilisasi).

Freeze drying atau yang sering 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).

2.7 Karakterisasi Material

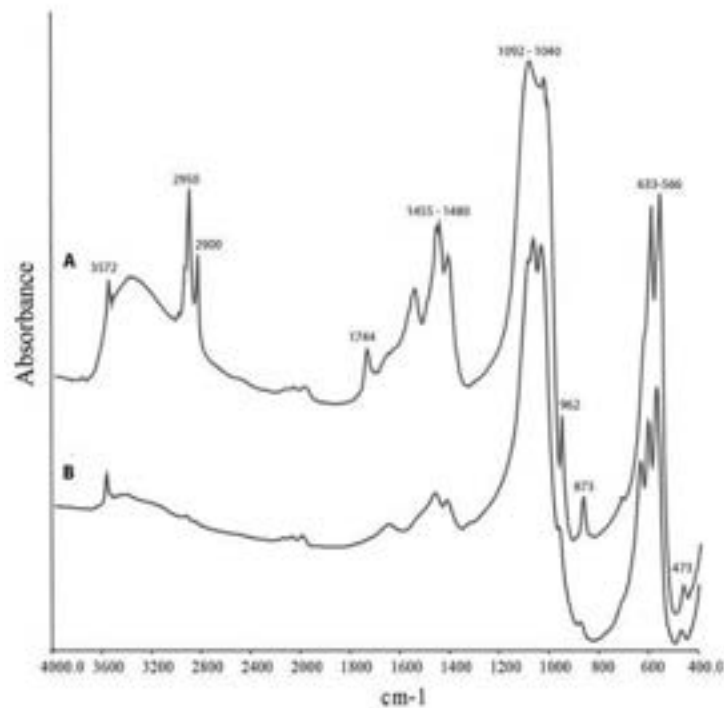
Karakterisasi material memberikan informasi tentang sifat-sifat fisis maupun kimiawi material tersebut. Sifat fisis maupun kimiawi suatu material dapat

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.

2.7.1 *Fourier Transform Infrared (FTIR)*

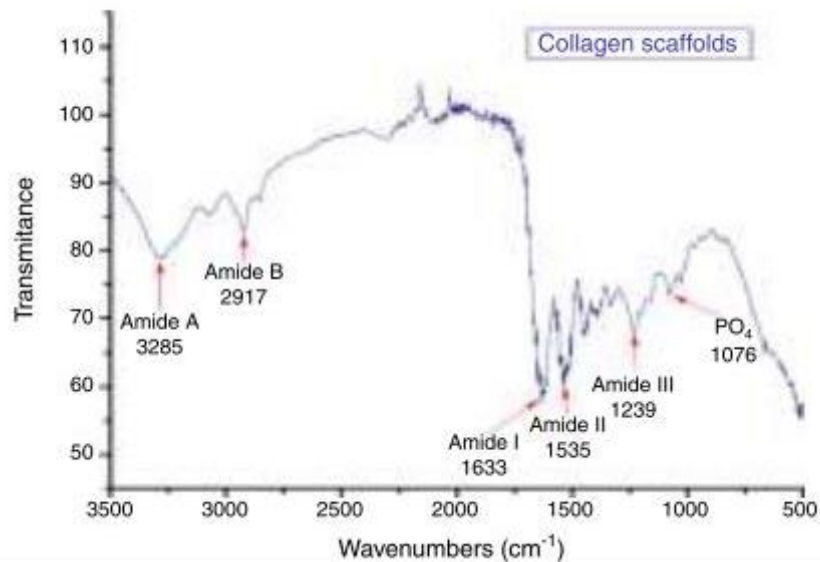
Fourier Transform Infrared (FTIR) adalah salah satu teknik analisa untuk mengidentifikasi gugus fungsi, senyawa organik, senyawa anorganik maupun molekul yang kompleks dari suatu material. Jenis analisa ini dapat digunakan untuk mengkarakterisasi sampel dalam bentuk cairan, larutan, pasta, bubuk, film, serat, dan gas. Analisa ini juga digunakan untuk Menganalisis material pada permukaan substrat. Pada prosedur analisa FTIR, sampel akan diberikan radiasi inframerah (IR). Radiasi IR kemudian berdampak pada getaran atom molekul dalam sampel, menghasilkan penyerapan atau transmisi energi spesifik. Ini membuat FTIR berguna untuk menentukan getaran molekul spesifik yang terkandung dalam sampel (Nandiyanto *et al.*, 2019). Analisa FTIR merupakan teknik analisa yang cepat dan nondestruktif, sensitif dan memerlukan preparasi sampel yang sederhana, serta penggunaan reagen kimia dan pelarut dalam jumlah sedikit (Maryam *et al.*, 2019).

Karakterisasi menggunakan FTIR dapat dilakukan dengan menganalisis spektra yang dihasilkan sesuai dengan puncak-puncak yang dibentuk oleh suatu gugus fungsi, karena senyawa tersebut dapat menyerap radiasi elektromagnetik pada daerah inframerah dengan panjang gelombang antara 0.78–1000 μm (Zhong *et al.*, 2018).



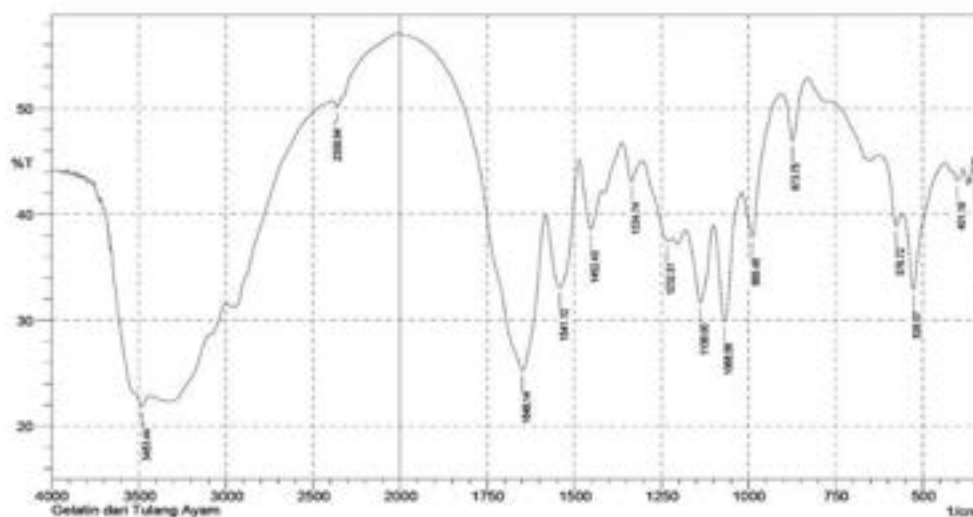
Gambar 2.7 Grafik FTIR hidroksiapatit *bovine* (A) *subcritical water extraction* dan (B) sintering pada suhu 650°C (Ratnayake *et al.*, 2017)

Gambar 2.7 adalah grafik spektrum FTIR untuk bubuk BHA yang diperoleh setelah ekstraksi air subkritis dan sintering pada 650°C. BHA yang diperoleh setelah SCWE dan sintering pada 650°C menunjukkan puncak yang terkait dengan fosfat (PO_4^{3-}), karbonat (CO_3^{2-}), dan hidroksil (OH^-). Spektrum FTIR spektra Gambar 2.7A menunjukkan hasil yang untuk kubus tulang yang diolah dengan air subkritis pada 180°C selama 1 jam meskipun beberapa puncak terkait kolagen dan lemak diamati. Namun, setelah *heat-treatment* tulang sapi pada 650°C selama 6 jam menunjukkan (Gambar 2.7B) kolagen dan sisa lemak terkait pita menghilang menghasilkan struktur HA berkarbonasi murni (Ratnayake *et al.*, 2017).



Gambar 2.8 FTIR kolagen *scaffold* (León-Mancilla, 2016)

Gambar 2.8, merupakan hasil penelitian (León-Mancilla, 2016) pada karakteristik *scaffold* kolagen menggunakan FTIR. Pada penelitian tersebut dapat terlihat gugus fungsi PO₄ (1076 cm⁻¹) yang menunjukkan gugus fungsi hidroksiapatit. Pada panjang gelombang 1650–1665 cm⁻¹ (C=O) merupakan gugus fungsi Amide I; 1530–1550 cm⁻¹ menunjukkan gugus fungsi Amide II $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{CN})$; 3325–3330 cm⁻¹ gugus fungsi Amide A (NH); puncak gelombang pada 2956 cm⁻¹ menunjukkan gugus fungsi CH₃; panjang gelombang 2924 cm⁻¹ gugus fungsi CH₂; panjang gelombang 1239 cm⁻¹ gugus fungsi Amide III $\delta(\text{NH}) + \nu(\text{CN})$; dan panjang gelombang 3080 cm⁻¹ gugus fungsi Amide B (CH₂). Gugus fungsi tersebut berkaitan dengan adanya kolagen.



Gambar 2.9 FTIR gelatin tulang ayam (Maryam *et al.*, 2019)

Struktur gelatin seperti umumnya protein memiliki gugus karboksil, amina, dan hidroksil (Gambar 2.9). Gelatin memunculkan serapan IR khas amida A pada bilangan gelombang $3600\text{--}2300\text{ cm}^{-1}$, amida I pada $1636\text{--}1661\text{ cm}^{-1}$, amida II pada $1560\text{--}1335\text{ cm}^{-1}$, dan amida III pada $1300\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ (Maryam *et al.*, 2019).

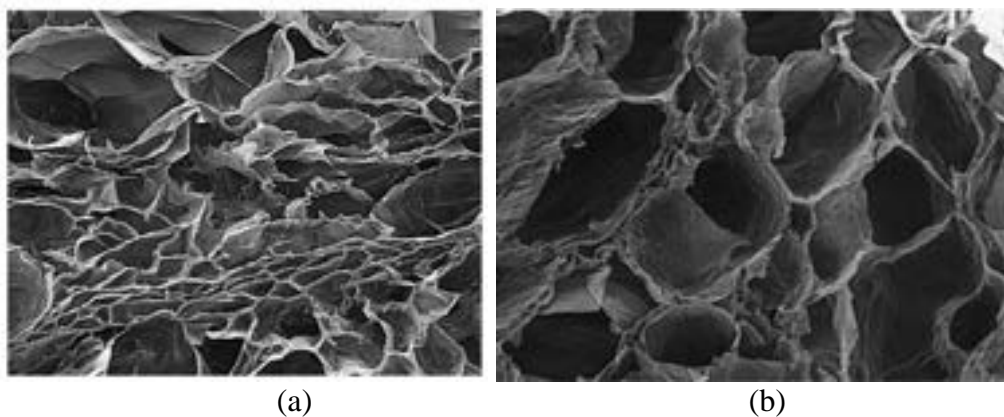
2.7.2 Scanning Electron Microscope (SEM)

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, 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).

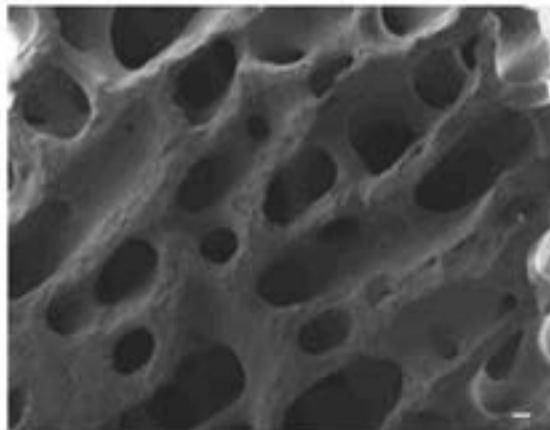
Penelitian yang dilakukan Rohanizadeh *et al.* (2008) menggunakan SEM pada *gelatin sponge* yang dimodifikasi menunjukkan, perbedaan porus bentuk, ukuran, distribusi dan unsur kimia dari mineral yang diendapkan dapat. Hal senada yang didapatkan pada penelitian Kabiri *et al.* (2011) menggunakan metode *freeze drying* yang berbeda pada *sponge gelatin*. *Sponge gelatin* dibuat dengan *freeze drying* pada suhu -25°C memiliki pori-pori besar yang terlihat jelas (Gambar 2.10a). Pengamatan SEM dari spons yang disiapkan dalam nitrogen cair menunjukkan struktur jaringan pori-pori heterogen (Gambar 2.10b). Perbedaan ukuran pori dan struktur bagian dalam *sponge gelatin* mencerminkan perbedaan kecepatan perpindahan panas selama proses pembekuan hidrogel.



(a) (b)
Gambar 2.10 Mikrograf SEM pada permukaan *sponge gelatin* (a) Pembuatan *sponge* dengan teknik *freeze drying* memiliki ukuran pori $278\ \mu\text{m}$ (b) Pembuatan *biomaterial* dengan cairan nitrogen dengan memiliki ukuran pori $182\ \mu\text{m}$ (Kabiri *et al.*, 2011)

Struktur pori pada *biomaterial* merupakan suatu persyaratan yang harus dipenuhi biomaterial yang berperan dalam penyembuhan luka. Pori-pori pada

biomaterial ini berfungsi sebagai sarana pertukaran gas dan penyerapan eksudat luka (Chen, 2013). Pori pada *biomaterial* juga berfungsi sebagai wadah berkembangnya sel dan pertukaran nutrisi dan metabolit (Long *et al.*, 2017). Menurut penelitian Murphy (2010), ukuran rerata porus yang ideal untuk proliferasi dan migrasi sel pada pembentukan jaringan tulang adalah 325 μm . Porus pada *biomaterial* memiliki struktur oval dengan diameter yang paling ideal sebagai *scaffold* berkisar 100 sampai 500 μm (León-Mancilla, 2016).



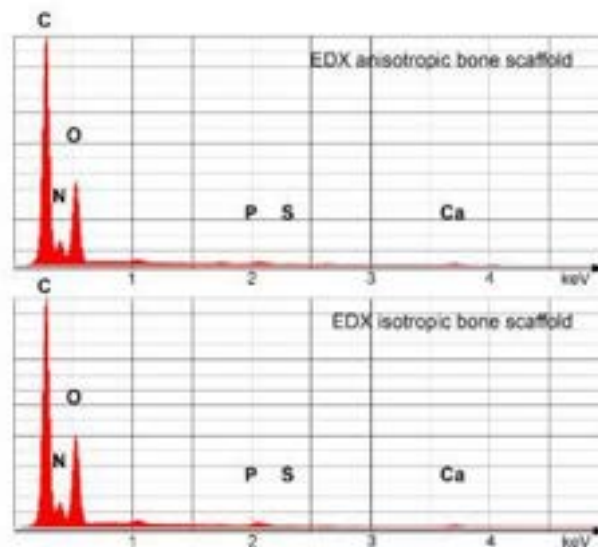
Gambar 2.11 Mikrograf SEM hidroksiapatit *bovine* (Ratnayake *et al.*, 2017)

Gambar 2.11 adalah mikrograf SEM hidroksiapatit *bovine* menunjukkan ukuran pori makro bagian dalam berkisar antara 100 hingga 700 μm (Ratnayake *et al.*, 2017).

2.7.3 Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX)

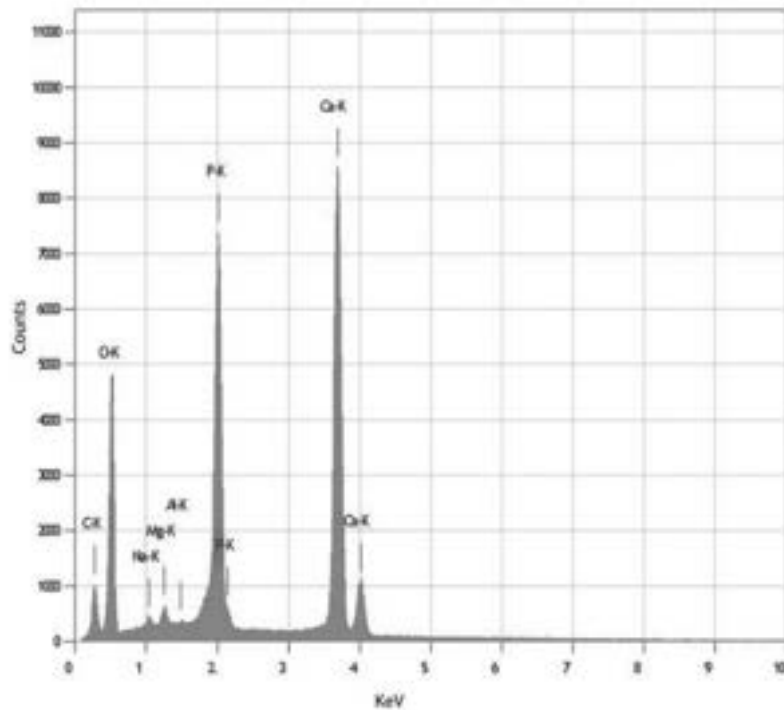
Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS, EDX, EDXS or XEDS), seringkali disebut *energy dispersive X-ray analysis* (EDXA) atau *energy dispersive X-ray microanalysis* (EDXMA). EDS adalah teknik analisa yang digunakan untuk Menganalisis komposisi unsur, elemen atau karakteristik kimia dari suatu material. 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).



Gambar 2.12 Energy Dispersive X-ray spectra of anisotropic dan isotropic scaffolds (Stuckensen *et al.*, 2019)

Penelitian Stuckensen *et al.* (2019) menggunakan EDX untuk Menganalisis komposisi yang ada dalam *scaffold tulang*. Pada *scaffolds* tersebut terdapat kandungan 40,4% karbon, 11,2% nitrogen, 23,6% oksigen, dan didominasi 23,6% kalsium, 0,7% fosfor dan 0,4% sulfur (Gambar 2.12).



Gambar 2.13 Grafik EDX HA *bovine* (Ratnayake *et al.*, 2017)

Hasil EDX (Gambar 2.13) mengungkapkan bahwa fase anorganik BHA terutama terdiri dari kalsium dan fosfor sebagai konstituen utama dengan komposisi minor natrium dan magnesium (Ratnayake *et al.*, 2017).

2.7.4 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 putusya 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, dan untuk 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: $\epsilon_2 = \frac{(W_1 - W_0)}{W_0} \times 100\%$ (Long *et al.*, 2017).

2.7.5 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. Presentase 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.

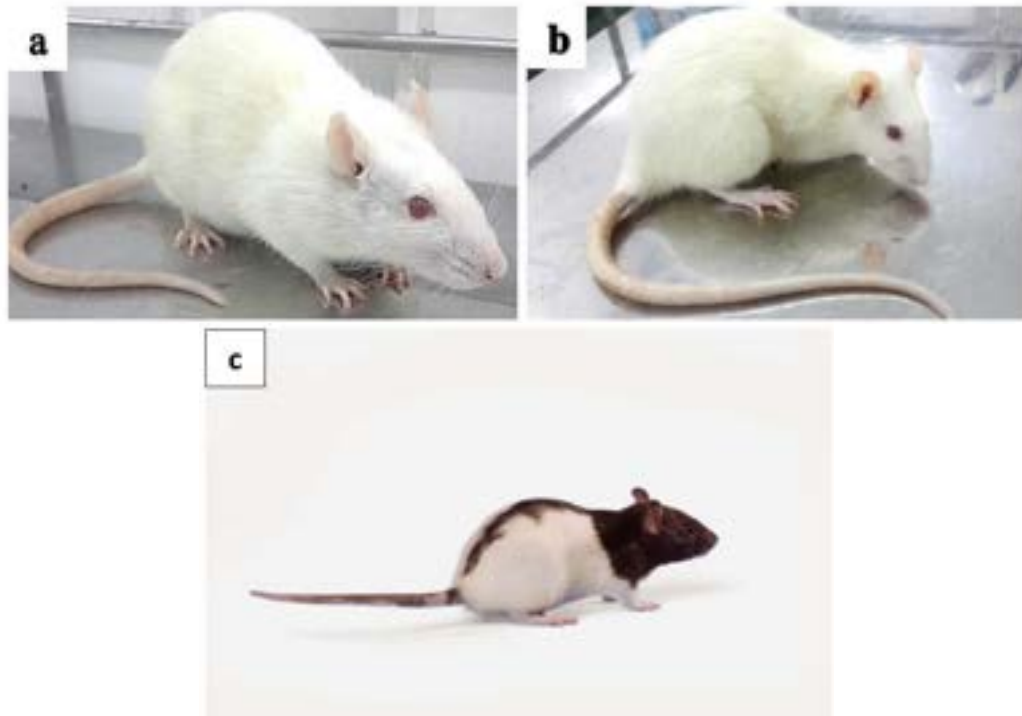
2.8 Sprague Dawley

Tikus putih (*Sprague Dawley*) berasal dari Asia Tengah. Berdasarkan taksonominya (Tabel 2.1), tikus putih termasuk dalam famili *Muridae*, genus *Rattus* dan spesies *R. norvegicus* (Kartika *et al.*, 2013). Tikus putih banyak digunakan sebagai hewan percobaan pada berbagai penelitian (Gambar 2.14). Tikus putih tersertifikasi diharapkan lebih mempermudah para peneliti dalam mendapatkan hewan percobaan yang sesuai dengan kriteria yang dibutuhkan. Kriteria yang dibutuhkan oleh peneliti dalam menentukan tikus putih sebagai hewan percobaan, antara lain: kontrol pakan, kontrol kesehatan, recording perkawinan, jenis (*strain*), umur, bobot badan, jenis kelamin, silsilah genetik. Terdapat tiga galur tikus putih yang memiliki kekhususan untuk digunakan sebagai hewan percobaan antara lain *wistar*, *long evans* dan *Sprague Dawley* (Widiartini *et al.*, 2015).

Tabel 2.1 Taksonomi *Sprague Dawley* (Kartika *et al.*, 2013)

Kingdom	<i>Animal</i>
Filum	<i>Chordata</i>
Kelas	<i>Mamalia</i>
Ordo	<i>Rodentia</i>
Famili	<i>Muridae</i>
Genus	<i>Rattus</i>
Spesies	<i>Sprague Dawley</i>

Semua spesies hewan pengerat (*rodent*) memiliki 2 gigi seri rahang atas dan bawah yang berkembang dengan baik elodont aradikuler (terus tumbuh dan erupsi sepanjang hidup, yang tidak memiliki akar anatomis). Hewan pengerat tidak memiliki gigi taring, dan gigi seri dipisahkan dari gigi premolar oleh ruang panjang tanpa gigi yang disebut diastema. Tikus memiliki gigi premolar atau gigi molar anelodont. Gigi premolar atau molar memiliki akar tunggal atau ganda (dengan periode pertumbuhan terbatas). Gigi ini tidak digunakan selama aktivitas mengunyah normal. Mereka adalah brachyodont (mahkota pendek) dengan banyak katup. Tergantung pada spesiesnya, gigi premolar dan molar memiliki ukuran dan bentuk yang kurang lebih berbeda dalam kuadran yang sama. Tikus dengan spesies *Rattus norvegicus* tidak memiliki gigi taring dan premolar. Tikus ini memiliki formula gigi 2(I 1/1, C 0/0, P 0/0, M 3/3) dengan jumlah total gigi yang ada di dalam rongga mulut sebanyak 16 gigi (Mancinelli & Capello, 2016).



Gambar 2.14 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur (a) Wistar, (b) Sprague-Dawley (Fauziyah, 2016) dan (c) Long Evans (Janvier-Labs, 2021)

2.9 Proses Osteogenesis

Penyembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks melibatkan kegiatan bioseluler dan biokimia berjalan secara berkesinambungan (Handi, 2017). Proses penyembuhan tulang alveolar terjadi melalui tahapan berikut: reaksi inflamasi, migrasi sel, proliferasi sel, Diferensiasi sel dan sintesis unsur-unsur penyusun matriks ekstraseluler, untuk maturasi tulang sebagai periode akhir yang disebut remodeling (Gonzalez *et al.*, 2016; Gadgoli, 2016; Gomes *et al.*, 2019; Kawasumi *et al.*, 2015).

Fase inflamasi dapat dibagi menjadi dua bagian: pembentukan bekuan darah dan migrasi sel inflamasi. Segera setelah pencabutan gigi, perdarahan terjadi dan soket terisi darah. Bekuan darah menyumbat pembuluh yang terputus dan menghentikan pendarahan. Selama 2–3 hari, sel inflamasi bermigrasi ke luka untuk

"membersihkan" sebelum jaringan baru mulai terbentuk. Kombinasi sel inflamasi, vaskular baru, dan fibroblas imatur membentuk jaringan granulasi (Araujo *et al.*, 2015). Jaringan granulasi akan mengganti bekuan darah setelah 7 hari (Steiner *et al.*, 2008). Saat daerah luka steril, jaringan granulasi secara bertahap diganti dengan matriks jaringan ikat yang kaya serat kolagen dan sel, dan fase proliferasi proses penyembuhan luka dimulai (Araujo *et al.*, 2015).

Fase proliferasi juga dapat dibagi menjadi dua bagian, fibroplasia dan pembentukan anyaman tulang. Fase ini ditandai dengan pembentukan jaringan yang intens dan cepat. Fibroplasia melibatkan deposisi cepat dari matriks provisional sementara. Selanjutnya, pembuluh darah dan sel-sel pembentuk tulang akan berpenetrasi ke matriks sementara. Akhirnya, pembentukan anyaman tulang mengelilingi pembuluh darah dan osteon primer (Gambar 2.15). Osteon primer dapat diperkuat oleh tulang berserat paralel. Anyaman tulang dapat diidentifikasi di soket penyembuhan paling cepat 2 minggu setelah pencabutan gigi dan tetap di luka selama beberapa minggu. Anyaman tulang bersifat sementara, tidak memiliki kapasitas menahan beban dan oleh karena itu perlu diganti dengan jenis tulang yang matang (tulang lamular dan sumsum tulang) (Steiner *et al.*, 2008).

Proses penyembuhan yang terjadi setelah 20 hari, jaringan granulasi akan digantikan oleh kolagen, dan tulang mulai terbentuk di dasar dan pinggiran soket ekstraksi. Minggu ke-5, rata-rata dua pertiga dari soket pencabutan telah terisi oleh tulang. Minggu pertama setelah ekstraksi tidak ada pembentukan tulang yang terjadi. Hari ke-8, pembentukan tulang baru terlihat di seluruh tulang alveolar, terutama di bawah dinding tetapi tidak pada permukaan tulang yang melapisi soket ekstraksi. Hari ke-10, pembentukan tulang terlihat pada permukaan dinding soket.

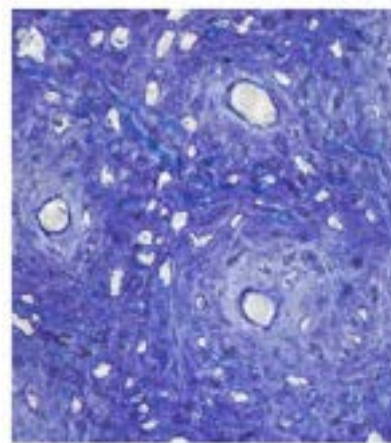
Hari ke-12 pembentukan tulang baru berlanjut di sepanjang dinding soket dan di ruang trabekular yang mengelilingi lokasi ekstraksi. Pewarnaan imunohistokimia digunakan untuk mengidentifikasi pertumbuhan tulang baru (Steiner *et al.*, 2008).

Material preservasi soket tulang alveolar harus memiliki sifat osteogenesis, osteoinduksi dan osteokonduktif. Sifat osteogenesis, diinduksi oleh keberadaan sel punca mesenkim, sel-sel prekursor osteogenik dan osteoblas di dalam graf tulang autologus. Sifat osteoinduktif merupakan proses aktif, tergantung pada keberadaan faktor-faktor pertumbuhan (*growth factors*). Faktor pertumbuhan tersebut antara lain TGF- β , BMP-2, BMP4; dan faktor angiogenesis FGF, VEGF, dan PDGF, IGF1. Sifat osteokonduktif merupakan proses pasif, material osteokonduktif bertindak sebagai *scaffold* untuk perlekatan sel osteoblas dan osteoklas, migrasi, tumbuh, dan membelah (Mahyudin, 2018).

Tulang adalah jaringan aktif yang secara metabolik mengalami *remodeling* secara kontinu oleh dua proses, yaitu pembentukan (formasi) dan penyerapan (resorpsi) tulang. Proses ini bergantung pada aktivitas osteoklas, osteoblas, dan osteosit. Pada kondisi normal, resorpsi dan formasi berkaitan erat satu sama lain, sehingga jumlah tulang yang mengalami resorpsi sama dengan yang dibentuk. (Huldani, 2012). Pembentukan tulang paling cepat terbentuk setelah 2 minggu pencabutan gigi (Steiner *et al.*, 2008). Proses ini akan berlangsung terus dari 3 sampai 6 minggu setelah pencabutan (Kalsi *et al.*, 2019).

Proses biologis pada penyembuhan tulang terjadi atas empat tahap yang berkesinambungan yaitu inflamasi; pembentukan kartilago dan respons periosteal; resorpsi kartilago dan pembentukan tulang primer; pembentukan tulang sekunder dan *remodelling*. Setiap tahapan tersebut yang dipengaruhi oleh molekul

pensinyalan yang dikategorikan menjadi tiga kelompok: (1) sitokin pro-inflamasi, (2) TGF β , (3) faktor angiogenik. Sitokin proinflamasi berperan untuk menginisiasi perbaikan saat terjadinya luka. IL1, IL 6 dan TNF α adalah sitokin proinflamasi yang akan menstimulus sel inflamasi, sintesis matriks ekstraselular dan terjadinya angiogenesis (Alagl & Graves, 2008). Mekanisme penyembuhan defek pada tulang dimulai dengan respon sel osteoprogenitor. Keluarga TGF β terdiri dari BMPs, TGF β dan GDFs (Hashemi *et al.*, 2018). Super famili TGF β akan menstimulir pembentukan kartilago dan tulang yang berperan dalam inisiasi BMP-2. Sinyal ini akan menyebabkan proliferasi dari osteoblas dan apoptosis dari sel osteoklas. Aktivasi BMP-2 akan meningkatkan proses pembentukan tulang (Indrawati *et al.*, 2019). Angiogenesis terbentuk melalui 2 jalur yaitu jalur VEGF dan jalur angiopoetin. Pensinyalan dari VEGF akan menstimulir terbentuknya neoangiogenesis dan endochondral formasi tulang. Pensinyalan angiogenik melalui PDGF akan menstimulasi kolagen yang berperan pada remodeling tulang (Alagl & Graves, 2008).



Gambar 2.15 Ilustrasi osteon primer pada penyembuhan soket pencabutan. Fiber kolagen tampak berserat dengan pewarnaan toluidine biru, perbesaran x100 (Araujo, 2015)

2.9.1 Signaling Pathway Bovine amniotic membrane

Penyembuhan luka akan menstimulasi berbagai sel neutrofil, makrofag, dan *giant cells* ke lokasi luka sebagai perlindungan terhadap mikroorganisme dan untuk mengontrol proses inflamasi. Makrofag dan *giant cells* di lokasi luka menghasilkan sitokin yang menstimulasi fibroblas untuk membentuk fibrosis di lokasi luka. Fibroblas diaktivasi oleh faktor pertumbuhan TGF β yang disekresikan oleh makrofag dan fibroblas di area luka. Membran amnion mengeluarkan VEGF dan HGF yang menjaga keseimbangan antara TGF-1 dan TGF-3 yang mencegah jaringan parut. Membran amnion akan menurunkan sekresi dari sitokin proinflamasi seperti *tumor necrotic factor-alpha* (TNF-alpha) dan *interferon* (IFN) sekaligus meningkatkan produksi sitokin antiinflamasi interleukin IL-10, IL-4, IL-1alpha dan IL-1beta (Chopra & Thomas, 2013).

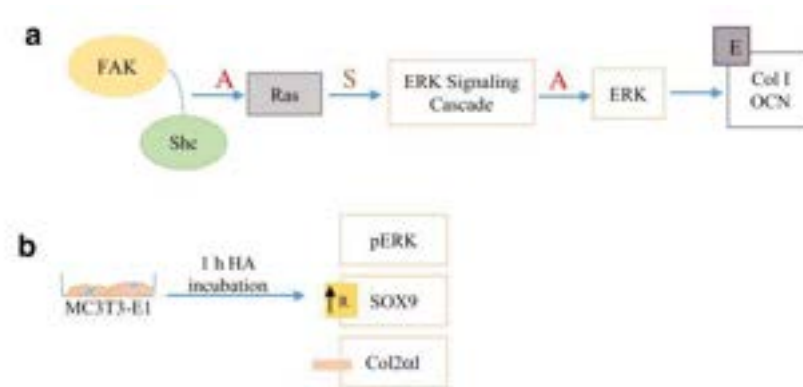
Membran amnion akan menginduksi VEGF baik untuk reseptor VEGF 1 maupun 2. Neovaskularisasi ekstensif yang diamati segera setelah aplikasinya dikaitkan dengan pelepasan faktor angiogenik seperti faktor pertumbuhan turunan insulin (IGF) yang mendorong pembentukan jaringan granulasi dan epitelisasi. Potensi angiogenik ini membantu dalam pengembangan rekayasa jaringan yang berguna dalam revaskularisasi jaringan iskemik, ulkus kronis, perbaikan tulang dan pembentukan tulang rawan (Chopra & Thomas, 2013).

Faktor pertumbuhan yang muncul selama fase pembentukan tulang dan aktivasi osteogenesis antara lain, PDGF, IGF, TGF- β , BMP, VEGF dan FGF. Faktor-faktor pertumbuhan ini tampak pada tahap awal dan menengah penyembuhan tulang dengan beberapa perbedaan ekspresi puncak (Gomes *et al.*, 2019). Faktor pertumbuhan TGF β pada BAM akan menstimulasi BMP yang akan

memengaruhi ekspresi osteogenik melalui induksi jalur MAPK dan Cbfa-1/RUNX2. Sedangkan faktor pertumbuhan FGF2 berperan dalam proses remodeling tulang dengan menstimulasi diferensiasi osteogenik melalui aktivasi Cbfa-1/RUNX2 (Dimitriou *et al.*, 2012). FGF2 dan sel hipoksia menstimulasi VEGF yang berperan untuk neovaskularisasi. Faktor pertumbuhan TGF β dan FGF2 menstimulasi fibroblas untuk membentuk kolagen tipe I dan III yang berperan dalam penyembuhan luka (Primadina *et al.*, 2019).

Bovine Amnion mengandung *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI). SLPI merupakan protein yang dapat menghambat protease, mengontrol aktivitas antibakteri, anti inflamasi dan antivirus, menekan (*matrix metalloproteinase*) MMP yang dapat menimbulkan kerusakan jaringan (Munadziroh *et al.*, 2020). SLPI berikatan dengan reseptor annexin II pada permukaan makrofag yang dapat menurunkan aktivitas NF κ B (Munadziroh, Putri, *et al.*, 2022). Saat terjadi proses penyembuhan luka SLPI akan berikatan dengan makrofag terlokalisasi pada sitoplasma dan nukleus akan berkompetisi dengan NF κ B dalam berikatan dengan DNA melalui degradasi I κ B. Akibatnya, produk NF κ B menurun, dan aktivator reseptor untuk NF κ B (RANK-L) menjadi tidak aktif, sehingga mengganggu maturasi preosteoklas menjadi sel osteoklas. (Fitriani *et al.*, 2018). Ikatan antara SLPI dan makrofag akan memengaruhi produksi sitokin pro-inflamasi IL-6. Ikatan antara SLPI dan makrofag dapat menurunkan ekspresi (toll like receptor) TLR yang akan mengakibatkan penurunan aktivitas NF κ dalam inhibitor sel B, alpha (I κ B α). (Alcorn & Wright, 2004).

2.9.2 Signaling Pathway Hidroksiapatit



Gambar 2.16 Jalur persinyalan hidroksiapatit terhadap penyembuhan tulang (Bal *et al.*, 2020)

Mekanisme jalur persinyalaan HA dapat terlihat pada gambar 2.16. Fosforilasi ERK akan menstimulasi gen yang berhubungan dengan osteoblas antara lain kolagen tipe I, osteokalsin, dan diferensiasi osteogenik MSCs. Reseptor adhesi dari integrin superfamili memediasi interaksi sel tulang dengan material HA melalui aktivasi sitoskeletal dan protein persinyalan intraseluler. *Focal Adhesion Kinase* (FAK) adalah salah satu molekul yang mengaktifkan jalur persinyalan Ras, dengan adanya protein ShC. Aktivasi Ras menstimulasi kaskade persinyalan ERK, dan COL I dan *Osteocalcin* diekspresikan sebagai hasil dari aktivasi ERK (Gambar 2.16a). Analisa microarray dan hasil rtPCR mengungkapkan bahwa HA terlibat tidak hanya dalam ekspresi gen yang berhubungan dengan osteoblas tetapi juga dalam banyak jalur persinyalan yang berhubungan dengan Ca^{2+} dan peningkatan regulasi protein ECM. Hasil yang sangat menarik dari penelitian ini adalah peningkatan kadar SOX9, sedangkan kadar mRNA Col2 α 1 tidak ada perubahan setelah 1 jam inkubasi HA (Gambar 2.16b) (Bal *et al.*, 2020).

Hidroksiapatit dengan kandungan kalsium fosfat, akan menstimulasi ekspresi gen osteoblas, jalur persinyalan dengan Ca^{2+} dan peningkatan regulasi protein ekstraselular matriks (Bal *et al.*, 2020). Ion kalsium akan menyebabkan

pembentukan dan pematangan tulang melalui kalsifikasi dan menstimulasi jalur sintesis osteoblas dengan mengaktifkan ERK1/2. Ion fosfat berperan mengatur diferensiasi dan pertumbuhan osteoblas melalui jalur IGF-1 dan ERK1/2, dan meningkatkan ekspresi BMPs. Selain itu, ion fosfat akan memberi sinyal pada RANK untuk menghambat diferensiasi osteoklas dan resorpsi tulang (Jeong *et al.*, 2019).

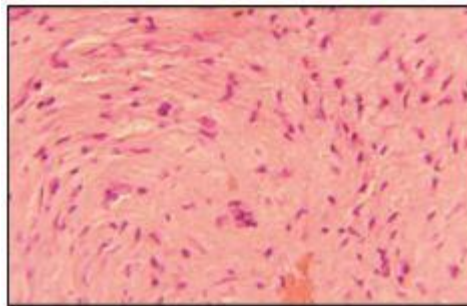
2.10 Marker Osteogenesis

2.10.1 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 (*Hematoksin 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).



Gambar 2.17 Pembentukan kolagen Plug 1 bulan setelah pencabutan (Steiner *et al.*, 2008)

2.10.2 Osteoblas

Jaringan tulang terdiri dari sel (osteoblas dan osteosit) yang tertanam dalam matriks ekstraseluler. 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).

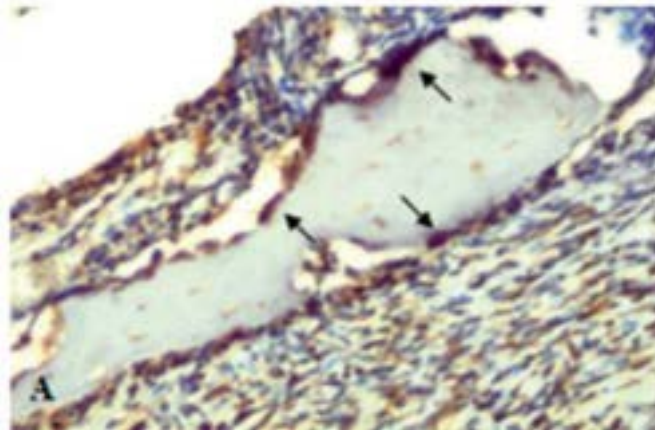
Osteoblas memiliki peran utama dalam pembentukan tulang dengan multipel sintesa protein matriks tulang (Tanaka *et al.*, 2005). Osteoblas adalah sel kuboid terletak di sepanjang permukaan tulang. Sel ini hanya terdiri dari 4-6% dari semua sel tulang dan berfungsi untuk membentuk, remodeling dan penyembuhan tulang. Osteoblas berasal dari sel induk mesenkim (MSC). MSC berperan pada pembentukan osteopogenitor dengan ekspresi gen spesifik, termasuk sintesis BMP dan jalur sinyaling 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 β ligand receptor* (RANKL). Resorpsi tulang patologis juga diketahui melibatkan peningkatan ekspresi rasio RANKL dan penurunan ekspresi OPG. Selama respon inflamasi, sitokin proinflamasi, seperti Interleukin IL-1 β , IL-6, IL-11 dan IL-17 dan 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).

2.10.3 Bone morphogenic protein 2 (BMP-2)

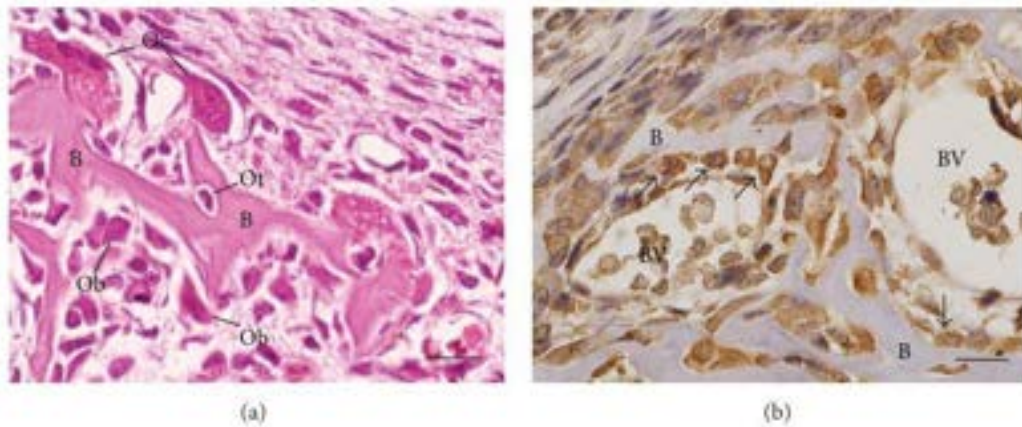
Bone morphogenic protein 2 (BMP-2) adalah kelompok faktor pertumbuhan yang berperan sebagai marker dalam pembentukan tulang dan kartilago. BMP-2 ini akan muncul pada saat penyembuhan dan regenerasi dari tulang (Stuckensen *et al.*, 2019). BMP-2 merekrut sel punca untuk penyembuhan tulang, menstimulasi 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). Gambar 2.18 menunjukkan analisa imunohistokimia pada tulang alveolar tikus paska pencabutan gigi (Budhy *et al.*, 2017).



Gambar 2.18 Tanda Panah menunjukkan Ekspresi Imunohistokimia BMP-2 (Budhy *et al.*, 2017)

2.10.4 *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). Gambar 2.19 menunjukkan pewarnaan imunohistokimia *osteocalcin* yang terbentuk pada tulang alveolar tikus (Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões, *et al.*, 2015).

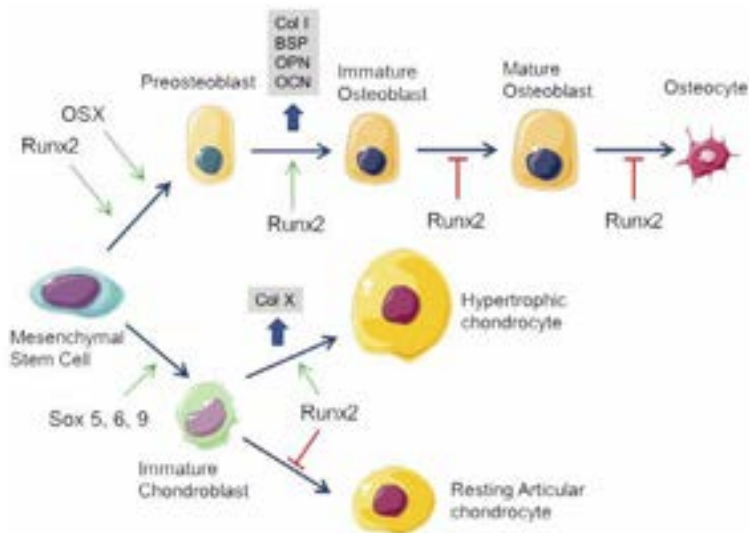


Gambar 2.19 Gambaran tulang alveolar tikus (a) Observasi pada permukaan tulang menggunakan pewarnaan HE menunjukkan *bony trabecula* (B), osteoblas (Ob) dan *giant multinucleated osteoclasts* (Oc); osteosit (Ot) disekeliling Matriks tulang. (b) Imunohistologi untuk deteksi *Osteocalcin* dengan hematoxylin. Catatan : *Osteocalcin-positive* osteoblas (tanda panah) pada permukaan *bony trabecula* (B). BV: blood vessel (Florencio-Silva, Sasso, Sasso-Cerri, Simões, *et al.*, 2015)

2.10.5 RUNX2

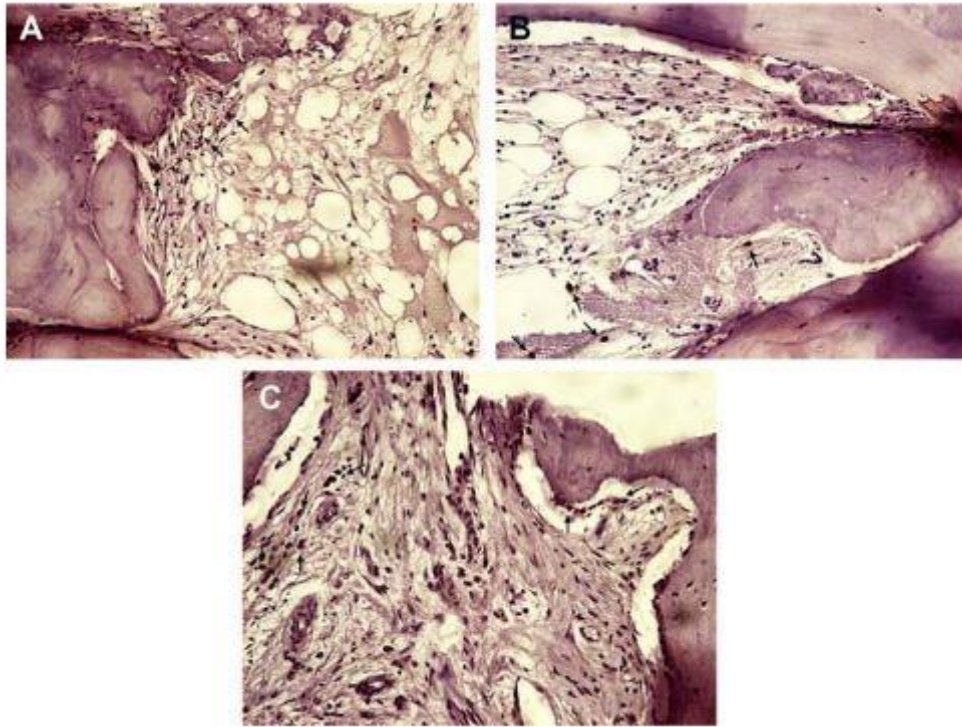
RUNX2 merupakan faktor transkripsi yang berperan terhadap hipertrofi kondrosit, pembentukan tulang endokondral dan invasi pembuluh darah ke kartilago. RUNX2 juga mengatur diferensiasi pluripotent sel mesenkimal menjadi osteoblas. Ekspresi RUNX2 dalam sel ikat menunjukkan terjadinya diferensiasi osteoblas 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 *osteoblast-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) dan (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).



Gambar 2.20 Diferensiasi osteoblas dan kondrosit oleh RUNX2 (Bruderer *et al.*, 2014)

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. Fungsi RUNX2 dalam osteoblas dan diferensiasi kondrosit digambarkan pada Gambar 2.19 (Bruderer *et al.*, 2014).



Gambar 2.21 Imunohistokimia RUNX2 (tanda panah) dengan pewarnaan Harris's hematoxylin, perbesaran 325. A, *pristine bone*; B, *intermediate* dan C, *apical* (Pereira *et al.*, 2017)

2.11 Histopatologi Anatomi (HPA)

Histopatologi adalah cabang biologi yang mempelajari kondisi dan fungsi jaringan dalam hubungannya dengan penyakit. Histopatologi sangat penting dalam kaitan dengan diagnosis penyakit karena salah satu pertimbangan dalam penegakan diagnosis adalah melalui hasil pengamatan terhadap jaringan yang diduga terganggu. Histopatologi dapat dilakukan dengan mengambil sampel jaringan (misalnya seperti dalam penentuan kanker payudara) atau dengan mengamati jaringan setelah kematian terjadi. Dengan membandingkan kondisi jaringan sehat terhadap jaringan sampel dapat diketahui apakah suatu penyakit yang diduga benar-benar menyerang atau tidak. Gambar 2.21 menunjukkan gambaran histologi dengan imunolabeling menggunakan antibodi RUNX2 (Pereira *et al.*, 2017)

2.12 Imunohistokimia

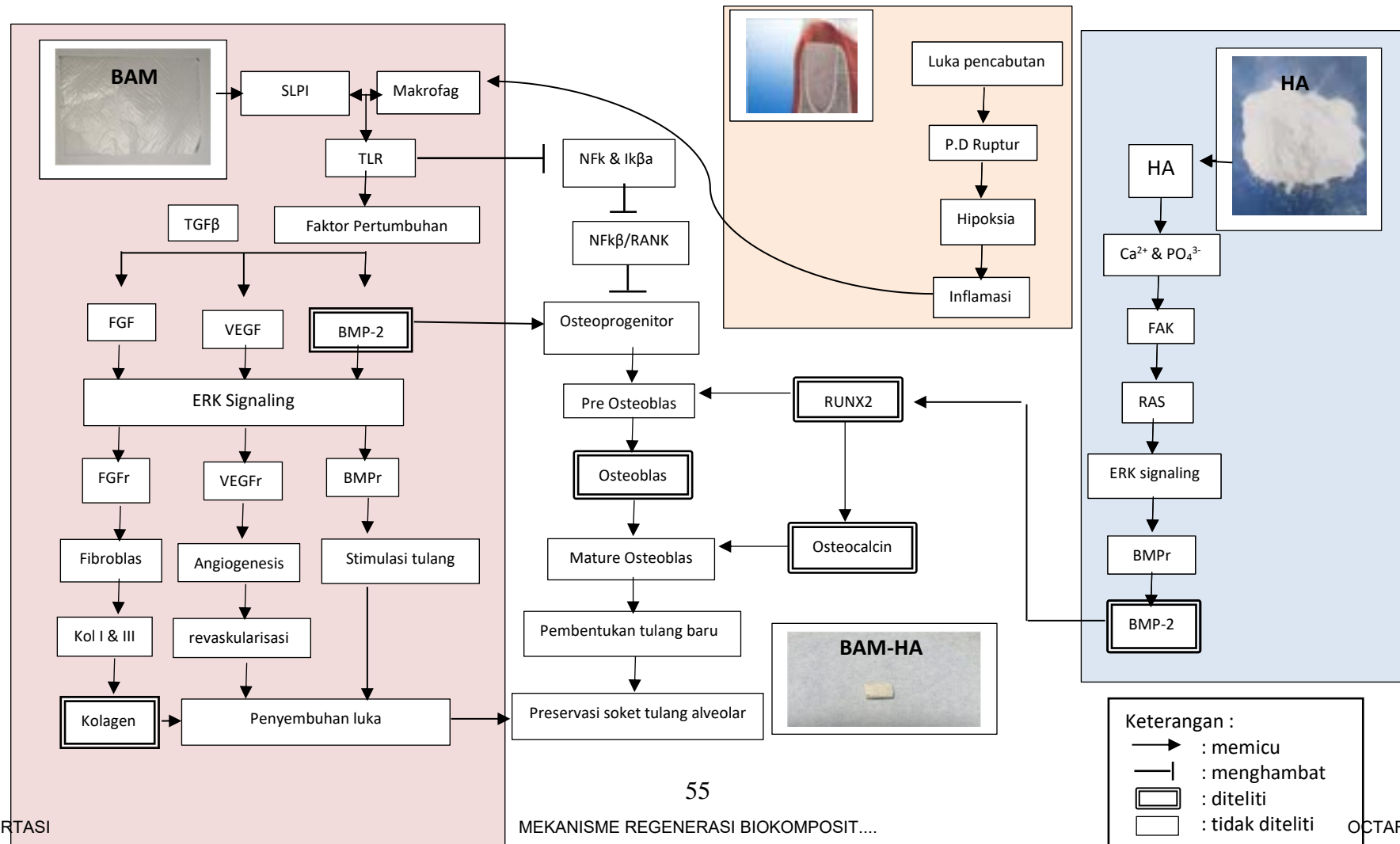
Imunohistokimia merupakan suatu teknik untuk menentukan keberadaan suatu antigen atau protein target dalam jaringan atau sel dengan menggunakan reaksi antigen-antibodi. Pada analisa pemeriksaan imunohistokimia diperlukan beberapa persiapan penting antara lain: preparasi spesimen, prosedur fiksasi, preparasi blok parafin, pengambilan antigen, preparasi antibodi dan reagen, inkubasi, pencucian, dan pewarnaan (Kim *et al.*, 2016).

Interaksi antara antigen dan antibodi merupakan suatu reaksi kimia yang tidak kasat mata, sehingga diperlukan visualisasi adanya ikatan tersebut dengan melabel antibodi yang digunakan dengan enzim atau fluorokrom. Enzim yang digunakan untuk melabel selanjutnya direaksikan dengan substrat kromogen, yaitu substrat yang menghasilkan produk akhir berwarna dan tidak larut, yang dapat diamati dengan mikroskop cahaya. Pengecatan imunohistokimia yang menggunakan fluorokrom untuk melabel antibodi, dapat langsung diamati tanpa harus direaksikan dengan bahan-bahan yang menghasilkan warna di bawah mikroskop *fluorescence*. Setelah antibodi mengikat antigen dalam sampel jaringan, enzim atau pewarna akan diaktifkan karena biasanya antibodi terikat dengan enzim atau pewarna *fluorescence* (Putra *et al.*, 2020).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Penjelasan Kerangka Konseptual :

Proses biologis pada penyembuhan luka setelah pencabutan gigi terjadi melalui beberapa fase yang meliputi, hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan *remodeling*. Saat terjadi pencabutan gigi, maka pembuluh darah akan ruptur, sehingga akan terjadi hipoksia. Sel-sel yang mengalami hipoksia akan menyebabkan inflamasi dan menstimulus makrofag.

BAM memiliki *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) yang akan berikatan dengan makrofag. SLPI yang berikatan dengan makrofag akan menstimulus faktor pertumbuhan TGF β , FGF dan VEGF lewat jalur (*toll like receptor*) TLR. TLR menurunkan NF κ B dan I κ B. NF κ B dan I κ B untuk menurunkan NF κ B. Penurunan NF κ B akan mempengaruhi osteoprogenitor yang akan menurunkan osteoklas dan meningkatkan osteoblas. Faktor pertumbuhan FGF berikatan dengan FGFR untuk menstimulus fibroblas untuk menstimulus kolagen tipe I dan III untuk penyembuhan tulang. Kolagen tipe I dan III akan membentuk kolagen. Kolagen akan membentuk serat yang akan mempercepat penyembuhan luka. VEGF akan berikatan dengan VEGFR untuk proses angiogenesis dan vaskularisasi. Saat vaskularisasi meningkat maka penyembuhan luka akan meningkat lebih cepat. TGF β menstimulus faktor pertumbuhan BMP-2. BMP-2 akan berikatan dengan BMPR melalui jalur ERK untuk menstimulasi osteoprogenitor membentuk pre osteoblas. Selain menstimulasi osteoprogenitor, BMP-2 juga menstimulasi RUNX2. Pada saat fase preosteoblas, akan terlihat ekspresi RUNX2 yang merupakan penanda tahap dimulai fase proliferasi. Fase proliferasi terjadi dari pre osteoblas sampai fase awal mature osteoblas. Saat osteoblas menjadi mature, RUNX2 akan mengekspresikan *Osteocalcin* yang

menandakan terjadinya fase diferensiasi atau memasuki fase remodelling. Saat peningkatan penyembuhan luka dan stimulasi pembentukan tulang meningkat, maka menyebabkan soket tulang alveolar dapat dipertahankan atau terpreservasi.

Hidroksiapatit memiliki ion kalsium dan fosfat yang akan mentimulasi molekul FAK yang akan mengaktifkan jalur persinyalan Ras. Aktivasi jalur persinyalan Ras akan menstimulasi jalur persinyalan ERK. Aktivasi ERK akan menstimulasi BMPr untuk menstimulasi osteoprogenitor membentuk sel osteoblas. Ion kalsium dan fosfat juga akan menstimulasi penurunan osteoklas melalui RANKL. untuk meningkatkan preosteoblas. Pada saat osteoprogenitor membentuk preosteoblas akan menstimulasi ekspresi RUNX2. Saat pre osteoblas membentuk mature osteoblas akan menstimulasi ekspresi *Osteocalcin*. Peningkatan ekspresi *Osteocalcin* menandakan tingginya proses remineralisasi pada tulang alveolar, yang mengindikasikan material biokomposit BAM-HA dapat digunakan sebagai material preservasi soket tulang alveolar.

3.2 Hipotesis

Pada penelitian ini dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut:

1. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dapat membentuk gugus fungsi yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.
2. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 memiliki struktur material dan bentuk pori yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.

3. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 memiliki elemen material yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.
4. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 memiliki persentase porositas yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.
5. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 memiliki kemampuan *swelling* yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.
6. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dapat meningkatkan ketebalan kolagen pada hari ke-14 dan 28 yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.
7. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dapat meningkatkan proliferasi osteoblas pada hari ke-14 dan 28 yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.
8. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dapat meningkatkan ekspresi BMP-2 pada hari ke-14 dan 28 yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.
9. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dapat meningkatkan ekspresi RUNX2 pada hari ke-14 dan 28 yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.
10. Variasi perbandingan biokomposit BAM-HA dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dapat meningkatkan ekspresi *Osteocalcin* pada hari ke-14 dan 28 yang berperan sebagai preservasi soket tulang alveolar.

BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental murni. Pada penelitian eksperimental murni akan dilakukan randomisasi, replikasi dan kelompok kontrol.

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap.

Tahap I adalah pembuatan variasi biokomposit BAM-HA dan analisa karakterisasi sifat material.

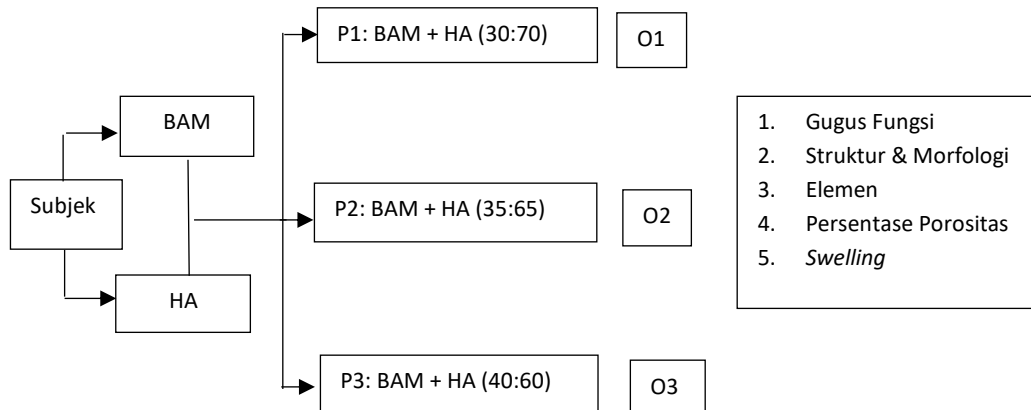
Tahap II adalah analisa osteogenesis varian optimal biokomposit BAM-HA pada hewan coba *Sprague Dawley*.

4.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian pada tahap I adalah analisis deskriptif. Rancangan penelitian pada tahap II menggunakan *Post Test only control Group Design*. Pada desain ini kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dibandingkan dan dipilih secara acak (Setijanto, 2018).

4.2.1 Penelitian tahap I

Penelitian tahap pertama dilakukan pembuatan variasi biokomposit BAM-HA dengan perbandingan 30:70, 35:65 dan 40:60. Setelah mendapatkan hasil pembuatan berbagai variasi biokomposit BAM-HA, kemudian dilakukan analisa karakteristik biokomposit tersebut.



Keterangan :

P1 : Kelompok perlakuan pertama biokomposit BAM-HA perbandingan 30:70

P2 : Kelompok perlakuan kedua biokomposit BAM-HA perbandingan 35:65

P3 : Kelompok perlakuan ketiga biokomposit BAM-HA perbandingan 40:60

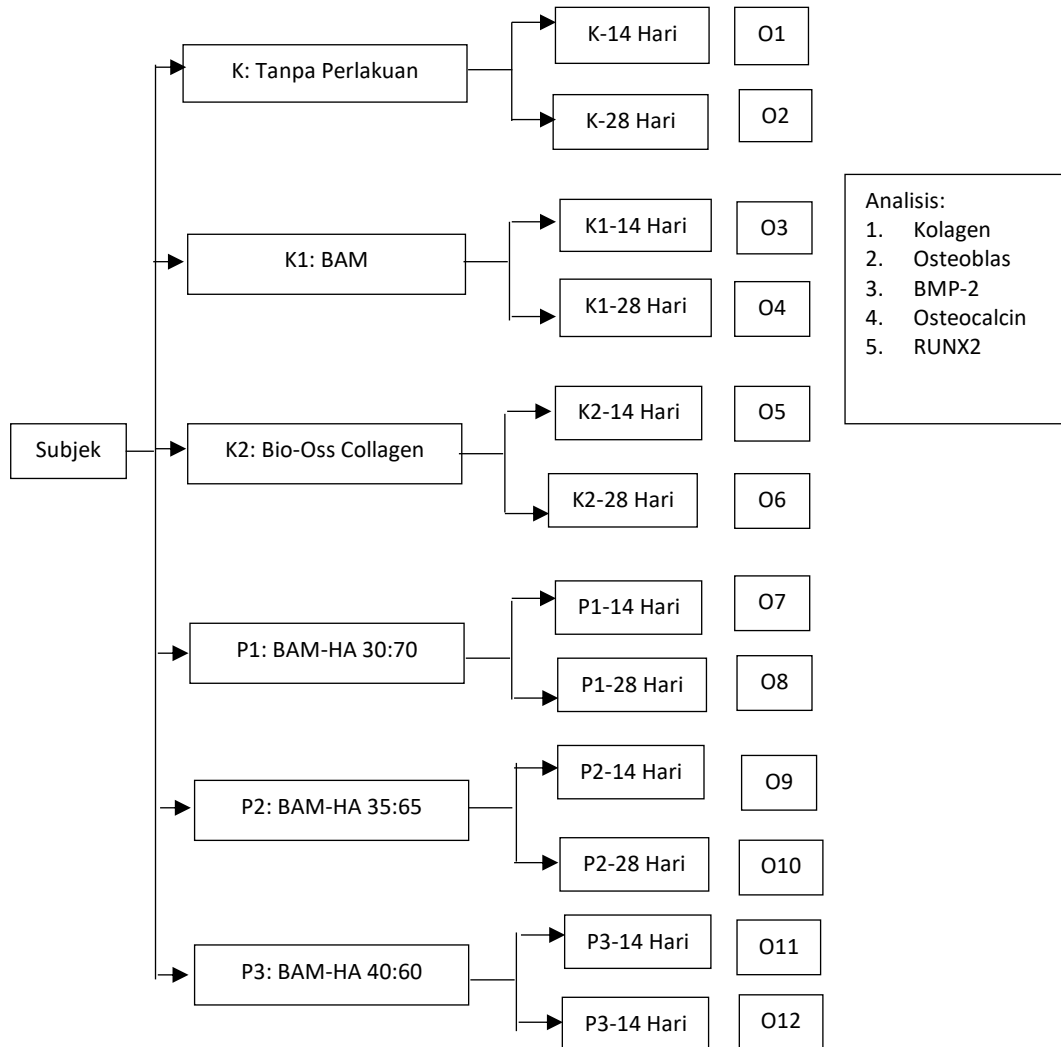
O1 : Observasi kelompok pertama pada gugus fungsi, struktur-morfologi, elemen, persentase porositas dan kemampuan *swelling*.

O2 : Observasi kelompok kedua pada gugus fungsi, struktur-morfologi, elemen, persentase porositas dan kemampuan *swelling*.

O3 : Observasi kelompok ketiga pada gugus fungsi, struktur-morfologi, elemen, persentase porositas dan kemampuan *swelling*.

4.2.2 Tahap II

Tahap kedua penelitian ini, dilakukan untuk menguji biokomposit BAM-HA yang optimal secara *in vivo* pada hewan coba *Sprague Dawley*.



Keterangan :

K : Kelompok kontrol (tanpa perlakuan). Pencabutan pada gigi insisivus rahang bawah *Sprague Dawley* dan dilakukan penjahitan. Analisa histologi dan imunohistokimia pada hari ke-14 dan 28.

K1 : Kelompok kontrol dengan aplikasi BAM. Pencabutan pada gigi insisivus rahang bawah *Sprague Dawley*, diaplikasikan BAM kemudian dilakukan penjahitan. Analisa histologi dan imunohistokimia pada hari ke-14 dan 28

- K2 : Kelompok kontrol positif dengan aplikasi Bio-Oss. Pencabutan pada gigi insisivus rahang bawah *Sprague Dawley*, diaplikasikan Bio Oss kemudian dilakukan penjahitan. Analisa histologi dan imunohistokimia pada hari ke 14 dan 28
- P1 : Kelompok perlakuan dengan aplikasi BAM-HA. Pencabutan pada gigi insisivus rahang bawah *Sprague Dawley*, diaplikasikan biokomposit BAM-HA (30:70) kemudian dilakukan penjahitan. Analisa histologi dan imunohistokimia pada hari ke-14 dan 28
- P2 : Kelompok perlakuan dengan aplikasi BAM-HA. Pencabutan pada gigi insisivus rahang bawah *Sprague Dawley*, diaplikasikan biokomposit BAM-HA (35:65) kemudian dilakukan penjahitan. Analisa histologi dan imunohistokimia pada hari ke-14 dan 28
- P3 : Kelompok perlakuan dengan aplikasi BAM-HA. Pencabutan pada gigi insisivus rahang bawah *Sprague Dawley*, diaplikasikan biokomposit BAM-HA (40:60) kemudian dilakukan penjahitan. Analisa histologi dan imunohistokimia pada hari ke-14 dan 28
- O1 : Observasi pada kelompok kontrol (tanpa perlakuan) hari ke-14 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O2 : Observasi pada kelompok kontrol (tanpa perlakuan) hari ke-28 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O3 : Observasi pada kelompok kontrol BAM hari ke-14 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O4 : Observasi pada kelompok kontrol BAM hari ke-28 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.

- O5 : Observasi pada kelompok kontrol positif (Bio-Oss Collagen) hari ke-14 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O6 : Observasi pada kelompok kontrol positif (Bio-Oss Collagen) hari ke 28 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O7 : Observasi pada kelompok perlakuan 1 BAM-HA (30:70) hari ke-14 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O8 : Observasi pada kelompok perlakuan 1 BAM-HA (30:70) hari ke-28 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O9 : Observasi pada kelompok perlakuan 2 BAM-HA (35:65) hari ke-14 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O10 : Observasi pada kelompok perlakuan 2 BAM-HA (35:65) hari ke 28 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O11 : Observasi pada kelompok perlakuan 3 BAM-HA (40:60) hari ke-14 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.
- O12 : Observasi pada kelompok perlakuan 3 BAM-HA (40:60) hari ke-28 dengan analisa kolagen, osteoblas, ekspresi BMP-2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.

4.3 Populasi

Pada penelitian *in vivo* pada hewan coba menggunakan populasi *Sprague Dawley* jantan berusia 2-3 bulan, dengan berat 250-300 gram. Hewan coba dalam keadaan sehat, kondisi gigi insisivus rahang bawah utuh dan sehat.

4.4 Sampel Penelitian

4.4.1 Sampel

Pada tahap I penelitian ini sampel yang digunakan adalah biokomposit *bovine amniotic membrane* Hidroksiapatit dengan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dari Bank Jaringan Dr. Soetomo Surabaya.

Pada tahap II penelitian ini, sampel yang digunakan adalah tikus *Sprague Dawley*.

4.4.2 Besar Sampel

Pada penelitian ini adalah penelitian laboratorium, di mana sampel dapat terkontrol atau terkendali. Perhitungan besar sampel pada tahap kedua menggunakan rumus *federer*. Besar sampel hewan coba yang digunakan pada penelitian ini diketahui menggunakan rumus *federer* yaitu $(k-1)(r-1) \geq 15$. Di mana k adalah jumlah kelompok hewan coba dan r adalah banyaknya replikasi (besar sampel per kelompok) hewan coba yang digunakan tiap kelompok, maka didapatkan :

$$(k-1)(r-1) \geq 15$$

$$(12-1)(r-1) \geq 15$$

$$11r-11 \geq 15$$

$$11r \geq 15 + 11$$

$$11r \geq 26$$

$$r \geq 2,36 \text{ (minimal 3 ekor tiap kelompok)}$$

4.5 Variabel Penelitian

Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas :

1. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60
2. Waktu penyembuhan 14 hari dan 28 hari

b. Variabel Tergantung :

1. Gugus fungsi pada biokomposit BAM-HA
2. Struktur material pada biokomposit BAM-HA
3. Elemen material pada biokomposit BAM-HA
4. Persentase porositas pada biokomposit BAM-HA
5. Kemampuan *swelling* pada biokomposit BAM-HA
6. Pembentukan kolagen
7. Proliferasi osteoblas
8. Ekspresi BMP-2
9. Ekspresi *Osteocalcin*
10. Ekspresi RUNX2

c. Variabel Terkendali

1. Cara pembuatan Hidroksiapatit
2. Cara pembuatan BAM
3. Cara pembuatan varian biokomposit BAM-HA
4. Ukuran sampel dan cara uji karakterisasi: FTIR, SEM, EDX, Persentase Porositas dan kemampuan *swelling*
5. Hewan coba: *Sprague Dawley* jantan, berumur 3 bulan, memiliki berat badan 250-300 g, dalam keadaan sehat dan aktif.

6. Lingkungan hidup (kandang) hewan coba: suhu ruang, jenis kandang, jumlah hewan coba dalam kandang.
7. Jenis pakan dan air minum yang diberikan pada hewan coba
8. Dosis anestesi, cara pencabutan dan cara penjahitan, alat pencabutan, ukuran biokomposit BAM-HA dan Bio-Oss Collagen sebagai material preservasi soket.

4.6 Definisi Operasional Variabel

- a. Biokomposit BAM-HA adalah *bovine amniotic membrane* dalam bentuk lembaran kering yang dihaluskan kemudian ditambahkan dengan bubuk HA dan dilakukan *freeze drying*.
- b. Gugus fungsi pada biokomposit BAM-HA adalah analisa karakteristik pada biokomposit BAM-HA menggunakan FTIR untuk melihat gugus fungsi dari senyawa amida yang ditunjukkan dengan puncak pada grafik.
- c. Struktur pada biokomposit BAM-HA adalah analisa karakteristik pada biokomposit BAM-HA menggunakan SEM untuk melihat struktur, morfologi dan ukuran porus.
- d. Elemen pada biokomposit BAM-HA adalah analisa karakteristik pada biokomposit BAM-HA menggunakan EDX untuk melihat kandungan dari material.
- e. Persentase porositas pada biokomposit BAM-HA adalah analisa karakteristik biokomposit BAM-HA dengan menghitung persentase porositas menggunakan metode *liquid displacement*.

- f. Kemampuan *swelling* pada biokomposit BAM-HA adalah analisa karakteristik pada biokomposit BAM-HA terhadap kemampuan *swelling* dengan menghitung berat awal dan berat akhir.
- g. Pembentukan kolagen hari ke 14 dan 28 pada biokomposit BAM-HA adalah jumlah ketebalan struktur serat kolagen pada jaringan dengan aplikasi biokomposit BAM-HA yang dilihat secara histologi yang memendarkan warna kemerahan setelah pengecatan dengan *Masson Thricome* (MT).
- h. Proliferasi osteoblas hari ke 14 dan 28 pada biokomposit BAM-HA adalah jumlah sel osteoblas berbentuk kubus atau kolumnar dalam keadaan aktif, dan berbentuk pipih jika dalam keadaan tidak aktif pada jaringan dengan aplikasi biokomposit BAM-HA yang dilihat secara histologi memendarkan warna kemerahan setelah pengecatan dengan *Hematoksilin-Eosin* (HE) .
- i. Ekspresi BMP-2 pada hari ke 14 dan 28 pada biokomposit BAM-HA adalah jumlah sel kondroblas pada jaringan yang diberikan biokomposit BAM-HA yang memendarkan warna kemerahan atau kecoklatan di dalam nucleus atau sitoplasmanya setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi anti-BMP-2.
- j. Ekspresi *Osteocalcin* pada hari ke 14 dan 28 pada biokomposit BAM + HA adalah jumlah sel osteosit pada jaringan yang diberikan biokomposit BAM-HA yang memendarkan warna kecoklatan di dalam sitoplasmanya setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi anti-*Osteocalcin*.
- k. Ekspresi RUNX2 pada hari ke 14 dan 28 pada biokomposit BAM + HA adalah jumlah sel kondrosit pada jaringan yang diberikan biokomposit BAM-HA yang

memendarkan warna kecoklatan di dalam sitoplasmanya setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi anti-RUNX2.

4.7 Lokasi dan Waktu penelitian

4.7.1 Lokasi Penelitian

- a. Bank Jaringan Dr. Soetomo Surabaya untuk pembuatan biokomposit BAM-HA.
- b. Pusat Isotop dan Radiasi (PAIR) Badan Tenaga Nuklir (BATAN) Pasar Jumat Jakarta untuk karakteristik FTIR.
- c. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Institut Teknologi Bandung untuk karakteristik SEM dan Mapping EDS.
- d. Laboratorium Farmasi Universitas Indonesia (UI) untuk karakterisasi *swelling* dan persentase porositas material.
- e. Rumah Sakit Hewan Pendidikan (RSHP) Institut Pertanian Bogor (IPB) untuk aplikasi material pada hewan coba.
- f. Laboratorium Histologi Institut Pertanian Bogor (IPB) untuk pembuatan preparat histologi dan imunohistokimia.
- g. Laboratorium Opadcore, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti untuk analisa preparat.

4.7.2 Waktu penelitian

Penelitian ini akan dijalankan pada bulan Juni 2021 sampai Januari 2023.

4.8 Bahan dan Alat

4.8.1 Bahan dan Alat untuk Pembuatan BAM

Pembuatan BAM membutuhkan bahan sebagai berikut: lembaran BAM segar, NaCl, akuades. Sedangkan alat yang dibutuhkan antara lain: freezer -80°C , freeze-drying -100°C .

4.8.2 Bahan dan Alat untuk Pembuatan HA

Pembuatan HA membutuhkan bahan sebagai berikut: *cancellous bone* sapi, H_2O_2 , akuades. Sedangkan alat yang dibutuhkan antara lain : *ultrasonic shaker*, oven, *bone miller*, *sieving machine*.

4.8.2 Bahan dan Alat untuk Pembuatan Biokomposit BAM-HA

Pembuatan biokomposit BAM-HA membutuhkan bahan berikut: membran amnion kering, hidroksiapatit, air saline (NaCl), akuades. Alat yang dibutuhkan pada penelitian ini antara lain: gelas ukur, blender, timbangan digital, pipet, wadah dengan diameter 10 cm, freezer -80°C , alat freeze-drying, alat sterilisasi.

4.8.3 Bahan dan Alat untuk Analisa Gugus Fungsi BAM-HA

Analisa gugus fungsi pada biokomposit BAM-HA membutuhkan bahan antara lain: biokomposit BAM dan HA sebesar 30:70, 35:65 dan 40:60, berukuran 1x1 cm, kalium bromide. Alat analisa yang digunakan adalah Fourier transform infrared (FTIR) IR Prestige-21 (Shimadzu, Jepang).

4.8.4 Bahan dan Alat untuk Analisa Struktur Porus BAM-HA

Analisa Struktur porus biokomposit BAM-HA membutuhkan dan bahan antara lain: sampel biokomposit BAM dan HA sebesar 30:70, 35:65 dan 40:60,

berukuran 0,5 x 0,5 cm, pelapis emas. Alat analisa yang digunakan adalah *Scanning Electron Microscope* (SEM) (JEOL, JSM 6510-LA, Jepang).

4.8.5 Bahan dan Alat untuk Analisa Elemen BAM-HA

Analisa komponen biokomposit BAM-HA membutuhkan bahan antara lain: biokomposit BAM dan HA sebesar 30:70, 35:65 dan 40:60, berukuran 0,5 x 0,5 cm, Alat analisa yang digunakan adalah EDX (JEOL, JSM 6510-LA, Jepang).

4.8.6 Bahan dan Alat untuk Analisa Persentase Porositas BAM-HA

Analisa persentase porositas BAM-HA membutuhkan bahan antara lain: sampel biokomposit BAM dan HA sebesar 30:70, 35:65 dan 40:60, berukuran 1 x 1 cm, etanol, kertas serap (Whatman). Alat analisa yang digunakan adalah neraca analitik (Fujitsu, Jepang).

4.8.7 Bahan dan Alat untuk Analisa Kemampuan *Swelling* BAM-HA

Analisa daya absorpsi BAM-HA membutuhkan bahan antara lain: biokomposit BAM dan HA sebesar 30:70, 35:65 dan 40:60, berukuran 1x1 cm, larutan PBS, kertas serap (Whatman). Alat analisa yang digunakan adalah neraca analitik (Fujitsu, Jepang).

4.8.8 Bahan dan Alat Untuk Ekstraksi Gigi Tikus *Sprague Dawley*

Bahan yang digunakan pada ekstraksi gigi insisivus rahang bawah kanan tikus SD adalah anestesi ketamin. Alat yang digunakan antara lain: sarung tangan, jarum suntik, tang cabut gigi dan gunting bedah, benang cat-gut, sarung tangan karet, pinset chirurgis, gunting, *needle holder*, dan doek steril.

4.8.9 Bahan dan Alat untuk Perlakuan Pada Hewan Coba

Bahan yang digunakan pada saat perlakuan pada hewan coba: biokomposit BAM-HA, Bio-Oss Collagen®. Alat yang digunakan: gunting pinset, sarung tangan.

4.8.10 Bahan dan Alat untuk Analisa Histopatologi Tikus Sprague Dawley

Analisa histopatologi pada luka bekas pencabutan pada kelompok kontrol dan perlakuan tikus SD membutuhkan bahan yang digunakan untuk pemeriksaan histologi di antaranya yaitu, formalin buffer 10%, alkohol 70%, 80%, 90%, 100%, xylol, kasa steril, kertas label, parafin cair (histoplast), larutan hematoksilin dan eosin, dan albumin. Sedangkan alat yang digunakan meliputi botol kecil untuk tempat jaringan, wadah cetakan, *microtome knife*, *waterbath* (suhu diatur 45-50°C), kaca objek, deck glass dan mikroskop.

4.8.11 Bahan dan Alat untuk Analisa Imunohistokimia Tikus SD

Analisa imunohistokimia pada luka bekas pencabutan pada luka bekas pencabutan pada kelompok kontrol dan perlakuan tikus SD membutuhkan bahan yang digunakan untuk pemeriksaan imunohistokimia di antaranya, formalin buffer 10%, alkohol 70%, 80%, 90%, 100%, xylol, kasa steril, kertas label, parafin cair (histoplast), larutan hematoxylin dan eosin, dan albumin antibodi BMP-2, *Osteocalcin*, *RUNX2*. Sedangkan alat yang digunakan meliputi botol kecil untuk tempat jaringan, wadah cetakan, *microtome knife*, *waterbath* (suhu diatur 45-50°C), kaca objek dan *deck glass*, mikroskop.

4.9 Cara Kerja

4.9.1 Uji Laik Etik Pada Komisi Etik

Sebelum pembuatan material BAM-HA proposal penelitian didaftarkan didaftarkan ke komisi etik di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya untuk memperoleh perizinan laik etik. Penelitian ini telah mendapatkan perijinan laik etik dengan No 360/HRECC.FODM/VII/2021.

Penelitian yang akan dilakukan pada hewan coba, proposal penelitian didaftarkan di Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) institut pertanian bogor (IPB) untuk memperoleh perizinan laik etik. Penelitian pada hewan coba tikus *Sprague Dawley* telah mendapatkan perijinan laik etik dengan No. 232-2022 IPB.

4.9.2 Persiapan *Bovine Amnion Membrane* (BAM)

- a. Persiapan BAM dilakukan di Instalasi Pusat Biomaterial Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo.
- b. BAM segar berasal dari sapi betina lokal dari peternakan di malang, jawa timur.
- c. BAM segar dibersihkan dari bekuan darah dan dicuci dengan larutan salin 0,05% sebanyak empat kali selama 10 menit.
- d. Setelah itu dicuci kembali dengan akuades sampai larutan saline bersih (Tang *et al.*, 2017).
- e. Setelah itu dimasukkan ke dalam *freezer* dengan suhu -80°C selama 1x24 jam.
- f. Kemudian dilakukan *freeze drying* selama 1x24 jam dengan suhu -100°C

4.9.3 Pembuatan Hidroksiaptit

- a. Tulang sapi berasal dari pematangan rumah hewan Surabaya-Jawa Timur.
- b. Bagian *cancellous bone* dipotong kecil-kecil sesuai kebutuhan.

- c. Pencucian dilakukan dengan detail menggunakan H_2O_2 .
- d. Potongan dimasukkan ke dalam *ultrasonic shaker* dengan temperatur $60^\circ C$ supaya lemak mencair. Proses ini dilakukan sampai benar-benar bersih dari lemak dan berwarna putih.
- e. Pencucian dilakukan kembali dengan akuades untuk menghilangkan H_2O_2 sampai bersih.
- f. Tulang kemudian dikeringkan pada suhu kamar untuk meminimalisasi kadar air.
- g. Proses selanjutnya adalah pembakaran dengan *furnace* dengan temperatur $1000^\circ C$ selama 1 jam.
- h. Setelah proses pembakaran, untuk menghilangkan sifat toksik dilakukan pembilasan dengan akuades sebanyak 3 sampai 4 kali.
- i. Kemudian dikeringkan kembali dengan oven pada suhu $60^\circ C$ - $100^\circ C$ sampai kering.
- j. Setelah benar-benar kering dilakukan proses *grinding* dengan *bone miller* sampai terbentuk partikel.
- k. Partikel yang halus dan kasar dipisahkan dengan *sieving machine* (mesin ayak) dengan ukuran $150 \mu m$.

4.9.4 Pembuatan Biokomposit BAM-HA

- a. Pembuatan biokomposit BAM-HA dilakukan di Instalasi Pusat Biomaterial Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo. Biokomposit BAM-HA akan dibuat dalam bentuk *biomaterial* dengan cara sebagai berikut.

- b. Membran amnion kering dan hidroksiapatit dipersiapkan untuk masing-masing sampel sebanyak 3 gr BAM dan 7 gr HA (30:70), 3,5 gr BAM dan 6,5 HA (35:65) dan 4 gr BAM dan 6 gr HA (40:60)
- c. Kemudian BAM dipotong-potong sekitar 2 cm ditambahkan dengan NaCl 0,9% sebanyak 40 mL. BAM yang ada direndam selama 5 menit sampai menyerap cairan.
- d. Setelah itu dihaluskan dengan menggunakan blender kira-kira selama 10 menit sampai menghasilkan bubur amnion.
- e. Bubur amnion kemudian ditambahkan dengan bubuk HA yang telah dipersiapkan sebelumnya.
- f. Kemudian diaduk sampai homogen, dan dimasukkan ke dalam cawan petri dengan ukuran diameter 10 cm.
- g. Setelah itu dimasukkan ke dalam *frezzer* (Thermo, USA) dengan suhu -80°C selama 1x24 jam.
- h. Kemudian dilakukan *freeze drying* (Thermo (VirTis, USA) selama 1x24 jam dengan suhu -100°C .
- i. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan sinar gamma sebesar 25kGy.

4.9.5 Gugus Fungsi pada BAM-HA

a. Persiapan sampel

Sampel BAM-HA ditambahkan kalium bromida (Sigma Aldrich, Jerman) dengan perbandingan 1:4. Campuran ditumbuk menggunakan mortal dan pastel sampai homogen. Setelah homogen dimasukkan pan dengan ukuran diameter 4 mm untuk pengujian pada alat FTIR.

b. Analisa gugus Fungsi dengan FTIR

Analisa gugus fungsi BAM-HA menggunakan IR Prestige-21 (Shimadzu, Jepang). Campuran homogen sampel dan KBr kemudian diukur dengan metode *Diffuse Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (DRS-FTIR) pada rentang pengukuran $400-4000\text{ cm}^{-1}$, resolusi 2.0 cm^{-1} , jumlah scan sebanyak 20 dan hasil pengukuran persentase *transmittance*. Berikut ini adalah standar operasional penelitian:

1. Alat instrumen FT-IR dinyalakan dengan menekan tombol on/off. *Software* FT-IR yang tersedia pada komputer dibuka.
2. Pemilihan opsi “Measure” kemudian pilih “*Measurement*” lalu “*initialize*” ditunggu hingga muncul tiga icon status berwarna hijau pada sebelah kanan layar. Perangkat FT-IR siap untuk digunakan.
3. Perangkat tambahan DRS-8000A digunakan untuk sampel padat. Jika telah terpasang, maka akan muncul satu square icon hijau bertuliskan DRS-8000 bersamaan dengan tiga *square icon* lainnya.
4. 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.
5. Pengukuran dilakukan background pada rentang $400-4000\text{ cm}^{-1}$, resolusi 2.0 cm^{-1} , jumlah *scan* sebanyak 20 dan hasil pengukuran persentase *transmittance*.

4.9.6 Struktur-Morfologi dan Elemen pada BAM-HA

Analisa permukaan, morfologi permukaan, dan komponen menggunakan (JEOL, JSM 6510-LA) *Scanning Electron Microscope* (SEM).

a. Persiapan Sampel

Sampel Biokomposit BAM-HA dipersiapkan dengan ukuran 1 cm x 1 cm. Sampel kemudian dilapisi dengan emas (*fine coater JFC 1600*) sebelum dilakukan pengujian.

b. Pengujian SEM (FMIPA-ITB, 2021).

1. Alat uji SEM dan komputer dinyalakan.
2. Sampel yang sudah dipreparasi kemudian dimasukkan ke dalam chamber.
3. Sampel kemudian di vakum dengan mode *high vacuum* dengan detektor SEI 15 kV.
4. Magnifikasi diatur 50x dan 500x, setelah itu dilakukan pengaturan fokus, stigma X dan stigma Y untuk memperhalus *image*.
5. Kemudian morfologi permukaan porus, ukuran porus dan bentuk porus dianalisis menggunakan software Image-J.

c. Pengujian EDX (FMIPA-ITB, 2021)

1. Sampel yang ada dalam chamber SEM dianalisis dan *mapping* elemen kimia material menggunakan *Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX)*.
2. Pengaturan pembesaran 100 μm dan 300 μm dengan jarak 10 mm.
3. Hasil analisa elemen kimia ditampilkan dalam bentuk grafik dan peta gradasi warna.

4.9.7 Kemampuan *swelling* pada BAM-HA

- a. Sampel Biokomposit BAM-HA dipersiapkan dalam bentuk kubus dengan ukuran 1,5x1,5 cm dengan berat 100 mg

- b. Penimbangan dilakukan dengan neraca analitik (Fujitsu, Japan) pada sampel biokomposit BAM-HA untuk mengetahui berat awal (W_0) sebelum diberikan perlakuan.
- c. Setelah penimbangan awal, sampel biokomposit BAM-HA direndam ke dalam PBS pada suhu kamar selama 24 jam (sampai jenuh).
- d. Setelah perendaman dalam PBS, sampel biokomposit BAM-HA ditimbang kembali dengan neraca analitik (Fujitsu, Japan) untuk mengetahui berat akhir (W_1), Sebelum melakukan penimbangan akhir, air yang berlebih pada permukaan sampel diambil dengan hati-hati menggunakan kertas saring (Whatman).
- e. Rasio penyerapan air (ϵ_2) dihitung sebagai berikut: $\epsilon_2 = \frac{(W_1 - W_0)}{(W_0)} \times 100\%$ (Long *et al.*, 2017).

4.9.8 Persentase Porositas pada BAM-HA

- a. Sampel biokomposit BAM-HA dipersiapkan dengan ukuran 0,2x0,2x0,7 cm dalam bentuk kubus.
- b. Volume awal (V_0) sampel BAM-HA dihitung dan berat awal sampel BAM-HA (W_0) ditimbang neraca analitik (Fujitsu, Jepang).
- c. Sampel kemudian direndam dalam etanol absolut sampai jenuh
- d. Setelah itu sampel sampel ditimbang kembali berat akhir (W_1) dengan neraca analitik (Fujitsu, Jepang).
- e. Persentase porositas dihitung dengan rumus sebagai berikut. Persentase porositas (%) = $\frac{(W_1 - W_0)}{(\rho \times V_0)} \times 100\%$ (Milla *et al.*, 2018).

4.9.9 Persiapan Hewan Coba

- a. Sejumlah 36 ekor tikus, *Sprague Dawley* jantan dilakukan karantina untuk adaptasi di laboratorium selama 7 hari.
- b. Tikus ditempatkan di dalam kandang khusus yang ditutup dengan kawat kasa agar tidak terlepas, berukuran lebar 39 cm, panjang 42 cm dan tinggi 15 cm. Jumlah tikus maksimal 2 ekor setiap kandang.
- c. Tikus diberi makan, minum, ventilasi dan pencahayaan yang memadai. Pemberian pakan dan minum sebanyak 2 kali setiap hari sebanyak 20 gr setiap tikus.
- d. Tikus diberikan obat cacing, obat kutu dan vitamin sebagai suplemen tambahan.
- e. Pada penelitian ini tikus dibagi menjadi 12 kelompok. Masing-masing terdiri dari 3 ekor tikus yang ditentukan secara acak. K1 (kelompok kontrol tanpa Perlakuan), K2 (Kelompok kontrol dengan pemberian BAM), K3 (Kelompok kontrol positif dengan aplikasi Bio-Oss Collagen), P1 (kelompok perlakuan BAM-HA 30:70), P2 (kelompok perlakuan BAM-HA 35:65), P3 (kelompok perlakuan BAM-HA 40:60).

4.9.10 Aplikasi Hewan Coba

- a. Tikus *Sprague Dawley* jantan yang sudah diadaptasi selama 7 hari di laboratorium dipersiapkan untuk diberi perlakuan pencabutan gigi.
- b. Pada saat Tindakan pencabutan tikus dibius dengan gabungan ketamin (0.6 cc) dan xylazine (0,3 cc) kemudian disuntik di bagian intraperitoneal.
- c. Setelah dilakukan pembiusan kemudian tikus kemudian diobservasi setiap 5 menit: detak jantung, pulsus, mukosa, respirasi, pupil. Hal ini dilakukan untuk melihat apakah tikus benar-benar sudah terbius.

- d. Setelah benar-benar terbius total, tikus dilakukan persiapan pencabutan gigi insisivus pertama rahang bawah.
 - e. Pencabutan diawali dengan membuka ligament periodontal dengan sonde lurus. Setelah ligament periodontal terlepas bagian bukal, lingual, mesial dan distal, gigi diungkit dengan excavator hingga keluar semua dan utuh.
 - f. Setelah gigi insisivus bawah kanan keluar dengan utuh, setiap tikus diberi perlakuan sesuai kelompoknya.
- b. Tikus dengan kode K (kontrol/tanpa perlakuan), setelah pencabutan tidak diberikan material apapun dalam soket. Kemudian dilakukan penjahitan pada luka bekas cabut dengan cat gut dengan ukuran 0.4 μ sebanyak 3 jahitan.
 - c. Tikus dengan kode K1 (BAM), setelah pencabutan pada soket diaplikasikan BAM dalam bentuk biomaterial dengan ukuran 3x10 mm dan dilakukan penjahitan pada luka bekas cabut dengan cat gut dengan ukuran 0.4 μ sebanyak 3 jahitan
 - d. Tikus dengan kode K2 (aplikasi Bio-Oss Collagen), setelah pencabutan pada soket diaplikasikan Bio-Oss dalam bentuk spons dengan ukuran 3x10 mm dan dilakukan penjahitan pada luka bekas cabut dengan cat gut dengan ukuran 0.4 μ sebanyak 3 jahitan.
 - e. Tikus dengan kode P1 aplikasi BAM-HA (30:70), setelah pencabutan pada soket diaplikasikan BAM-HA dalam bentuk spons dengan ukuran 3x10 mm dan dilakukan penjahitan pada luka bekas cabut dengan cat gut dengan ukuran 0.4 μ sebanyak 3 jahitan.
 - f. Tikus dengan kode P2 dengan aplikasi BAM-HA (36:65), setelah pencabutan pada soket diaplikasikan BAM-HA dalam bentuk spons dengan ukuran 3x10

- mm dan dilakukan penjahitan pada luka bekas cabut dengan cat gut dengan ukuran 0.4 μ sebanyak 3 jahitan.
- g. Tikus dengan kode P3 dengan aplikasi BAM-HA (40:60), setelah pencabutan pada soket diaplikasikan BAM-HA dalam bentuk spons dengan ukuran 3x10 mm dan dilakukan penjahitan pada luka bekas cabut dengan cat gut dengan ukuran 0.4 μ sebanyak 3 jahitan.
- h. Setelah pencabutan tikus diberikan antibiotik (ampisilin), analgesik (parasetamol) dan antiinflamasi. Untuk mengurangi efek samping dari pencabutan yaitu bengkak, rasa sakit dan inflamasi.
- i. Pada hari ke 14, kelompok K14 (tanpa perlakuan) sebagai kelompok kontrol, kelompok K1 sebagai kelompok kontrol dengan aplikasi BAM, kelompok K2-14 sebagai kelompok kontrol positif dengan aplikasi Bio-Oss Collagen, dan P1-14, P2-14, P3-14 sebagai kelompok perlakuan BAM-HA, diambil masing-masing 3 ekor. Euthanasia tikus SD diawali dengan pembiusan menggunakan ketamine 95 mg/kg dan xylazine 5 mg/kg. Setelah terbius tikus akan dikeluarkan darahnya dari jantung, relokasi leher, pemotongan kepala dan pemotongan rahang. Pemotongan rahang dilakukan pada bagian tulang alveolar mandibula regio anterior secara longitudinal. Tulang rahang mandibula kemudian direndam formalin untuk persiapan fiksasi. Setelah fiksasi akan dilakukan persiapan untuk pembuatan sediaan blok parafin, pemotongan blok parafin dan pembuatan preparat histologi dan imunohistokimia. Setelah pembuatan sediaan preparat histologi dan imunohistokimia, diamati jumlah sel pada 5 area dengan mikroskop ZEISS seri AXIO SCOPE AI yang dilengkapi dengan kamera digital AxioCam dan memakai *software* Zen 3.4 dengan pembesaran 40x.

j. Pada hari ke 28, kelompok K28 (tanpa perlakuan) sebagai kelompok kontrol, K1-28 sebagai kelompok kontrol dengan aplikasi BAM, kelompok K2-28 sebagai kelompok kontrol positif dengan aplikasi Bio-Oss Collagen, dan P1-28, P2-28, P3-28 sebagai kelompok perlakuan BAM-HA diambil masing-masing 3 ekor untuk dilakukan euthanasia. Euthanasia tikus SD diawali dengan pembiusan menggunakan ketamine 95 mg/kg dan xylazine 5 mg/kg. Setelah terbius tikus akan dikeluarkan darahnya dari jantung, relokasi leher, pemotongan kepala dan pemotongan rahang. Pemotongan rahang dilakukan pada bagian tulang alveolar mandibula regio anterior secara longitudinal. Tulang rahang mandibula kemudian direndam formalin untuk persiapan fiksasi. Setelah fiksasi akan dilakukan persiapan untuk pembuatan sediaan blok parafin, pemotongan blok parafin dan pembuatan preparat histologi dan imunohistokimia. Setelah pembuatan sediaan preparat histologi dan imunohistokimia, diamati jumlah sel pada 5 lapang pandang dengan mikroskop ZEISS seri AXIO SCOPE AI yang dilengkapi dengan kamera digital AxioCam dan memakai *software* Zen 3.4 dengan pembesaran 40x.

4.9.11 Prosedur Persiapan Fiksasi Jaringan

a. Persiapan jaringan

Persiapan jaringan yang akan dijadikan preparat. Jaringan dipotong dengan ukuran 5x5 mm untuk memudahkan fiksasi, sehingga cairan fiksasi dapat menyerap sampai ke seluruh jaringan.

b. Fiksasi Jaringan

Fiksasi jaringan menggunakan larutan buffer formalin 10% bertujuan untuk mencegah perubahan jaringan *post mortem* agar tidak membusuk. Perendaman selama 1x24 jam dengan volume larutan 10 kali dari besar spesimen.

c. Dekalsifikasi

Proses ini merupakan penghilangan kalsium secara bertahap dengan menggunakan larutan asam sitrat 20% sampai spesimen melunak selama \pm 3-4 hari, jika telah melunak perendaman dihentikan, kemudian dicuci dengan air mengalir.

4.9.12 Pembuatan Blok Parafin

- a. Dehidrasi, yaitu penarikan air dari jaringan secara bertahap dengan menggunakan alkohol. Dari konsentrasi yang kecil yaitu 70% selama 2 jam, 80% selama 2 jam sebanyak 2 kali, 90% selama 2 jam, kemudian alkohol absolut (etanol) 100% selama 2 jam sebanyak 2 kali.
- b. *Clearing*, yaitu untuk menjernihkan jaringan sehingga tampak transparan dengan cara memasukkan jaringan ke dalam larutan *xylol* I, *xylol* II dan *xylol* III masing-masing selama 40 menit.
- c. Impregnasi, yaitu proses infiltrasi parafin. Proses ini dilakukan dengan cara mencairkan parafin solid pada suhu 60⁰ C dan selanjutnya memasukkan parafin I, paraffin II, paraffin III, paraffin IV masing – masing selama 30 menit.
- d. *Embedding*, yaitu penanaman jaringan dengan parafin solid. Dilakukan dengan cara :
 1. Menyiapkan jaringan yang dikondisikan dalam suhu 60⁰C. bahan *embedding* juga dipanaskan pada suhu 60⁰C.

2. Menyiapkan alat pencetak yang terbuat dari logam. Alat pencetak berbentuk persegi empat, lalu bahan *embedding* dituangkan ke dalam alat pencetak dengan volume yang cukup.
3. Jaringan diambil dengan menggunakan pinset lalu ditanam ke dalam pencetak yang telah diisi oleh parafin dengan posisi yang dikehendaki.
4. Alat pencetak yang telah terisi parafin dan jaringan didinginkan pada alat pendingin. Bila sudah mengeras parafin bisa dilepas dari alat pencetak sehingga terbentuk blok paraffin.

4.9.13 Pemotongan Blok Parafin

Alat yang digunakan untuk memotong blok parafin adalah *rotary microtom*. Blok yang akan dipotong disiapkan pada alat pendingin agar parafin tetap padat dan kompak. Gelas objek disiapkan dan diberi label sesuai dengan nomor spesimen. *Water bath (tissue floatation bath)* disiapkan pada suhu 40°C. Kemudian blok parafin diletakkan pada *head microtom* dan diatur ketebalan yang dikehendaki ($5\mu\text{m}=5\times 10^{-3}$). Sayatan yang diperoleh diletakkan pada *water bath* agar sayatan dapat mengembang dengan baik lalu ditiriskan. Setelah itu, sayatan pada gelas objek ditiriskan dan diberi kode kemudian ditunggu hingga kering. Setelah itu masukan ke dalam inkubator dengan suhu 56°C selama 2 jam.

4.9.14 Pembuatan Preparat Histologi Pewarnaan Hematoxylin Eosin

Pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan hematoxylin eosin dilakukan untuk melihat sel osteoblas. Cara pembuatan preparat histologi adalah sebagai berikut :

- a. Deparafinisasi dilakukan dengan larutan *xylol* (III, II, dan I) masing – masing larutan 2 menit. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat,

- dimulai dari alkohol absolut III, II, I, 95%, 90%, 80% dan 70% pada masing – masing larutan selama 2 menit. Selanjutnya pencucian dilakukan dengan menggunakan *diionizer water* (DW) selama 15 menit.
- b. *Counter stain* menggunakan hematoksilin untuk mewarnai biru pada inti sel dilakukan dengan cara merendam selama 14-16 menit. Setelah itu pencucian dengan air selama 5 menit. Pewarnaan alkali dengan litium karbonat selama 15 sampai 30 detik untuk memberikan warna biru. Cuci dengan air kembali selama 5 menit. Pewarnaan eosin untuk memberikan warna merah dilakukan selama 4 menit, kemudian cuci Kembali dengan air mengalir selama 5 menit.
 - c. Dehidrasi dilakukan dengan larutan alkohol berseri 70%, 80%, 90%, dan 100% serta alkohol absolut I, II, dan III. Pada masing–masing larutan dibiarkan selama 1 menit.
 - d. *Clearing* dilakukan dengan xylol (I, II, dan III).
 - e. Penutupan preparat (*mounting*) dilaksanakan segera dengan aplikasi entelan yang ditutup dengan *cover glass*.
 - f. Pelabelan untuk menandai dan memudahkan analisa pada preparat.
 - g. Preparat siap dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop cahaya.

4.9.15 Pembuatan Preparat Histologi Pewarnaan Masson Trichome

Pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan Masson Trichome dilakukan untuk melihat ketebalan kolagen. Cara pembuatan preparat histologi adalah sebagai berikut :

- a. Deparafinisasi dilakukan dengan larutan xylol (III, II, dan I) masing – masing larutan 2 menit. Kemudian dilakukan rehidrasi dengan alkohol bertingkat, dimulai dari alkohol absolut III, II, I, 95%, 90%, 80% dan 70% pada masing –

- masing larutan selama 2 menit. Selanjutnya pencucian dilakukan dengan menggunakan *Diionizer Water* (DW) selama 15 menit.
- b. Perendaman dengan mordant selama 30-40 menit. Kemudian pencucian dilakukan dengan menggunakan *Diionizer Water* (DW) selama 15 menit.
 - c. Perendaman dengan *Carrazi's hematoxylin* selama 40 menit. Kemudian pencucian dilakukan dengan menggunakan *Diionizer Water* (DW) selama 15 menit.
 - d. Perendaman dengan *orange G* 0,75% selama 1-2 menit.
 - e. Perendaman dengan asam asetat 1% sebanyak 2 kali.
 - f. Perendaman dengan *ponceu xyloidine fuchsin* selama 25 menit.
 - g. Perendaman dengan asam asetat 1% sebanyak 2 kali.
 - h. Perendaman dengan *phosphotungstic acid* 2,5% selama 10 menit.
 - i. Perendaman dengan asam asetat 1% sebanyak 2 kali.
 - j. Perendaman dengan *anilin blue* selama 15 menit.
 - k. Perendaman dengan asam asetat 1% sebanyak 2 kali.
 - l. Perendaman alkohol 95 % selama 3 menit.
 - m. Dehidrasi dilakukan dengan larutan alkohol berseri 70%, 80%, 90%, dan 100% serta alkohol absolut I, II, dan III. Pada masing – masing larutan dibiarkan selama 1 menit.
 - n. Penutupan preparat (*mounting*) dilaksanakan segera dengan *cover glass*.
 - o. Pelabelan untuk menandai dan memudahkan analisa pada preparat.

4.9.16 Pembuatan Preparat Imunohistokimia BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2

Berikut ini adalah protokol imunohistokimia BMP-2 menggunakan antibody BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2 (1:200, Affinity Biosciences, Inc. USA).

- a. Deparafinisasi preparat dilakukan dengan xylol (III, II, dan I) selama 10 menit pada masing-masing larutan.
- b. Rehidrasi dilakukan dengan alkohol bertingkat dimulai dari 100%, 95%, 80%, and 60% selama 5 menit.
- c. Pencucian dengan akuades dilakukan sebanyak 3 kali, masing-masing selama 2 menit.
- d. Pencucian dengan PBS sebanyak 3x, masing-masing selama 5 menit
- e. *Blocking endogenous peroksidase* dengan *Fetal Bovine Serum* selama 30 menit
- f. Inkubasi dengan antibodi primer selama 18-22 jam, diletakkan di dalam refrigerator suhu 40°C (Osteocalcin 200 x, RUNX2 50 x, dan BMP-2 100 x).
- g. Preparat dicuci sebanyak 3x dengan PBS selama masing-masing 5 menit.
- h. Preparat diinkubasi dengan antibodi sekunder selama 30 menit pada suhu ruang 28°C.
- i. Preparat dicuci sebanyak 3x dengan PBS selama masing-masing 5 menit.
- j. Preparat diinkubasi dengan *Horse Radish Peroxide* selama 30 menit pada suhu ruang 28°C.
- k. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3x, masing-masing selama 5 menit.
- l. Preparat diwarnai dengan *chromogen 3,3-diaminobenzidine* selama 3 detik.
- m. Pencucian preparat dengan akuades sebanyak 3x, masing-masing selama 5 menit.
- n. *Counterstain* preparat dilakukan dengan *Mayer's Hematoxilin* selama 3 detik
- o. Preparat dicuci di bawah air mengalir selama 5-10 menit
- p. Perendaman kemudian dilakukan pada alkohol bertingkat 60%, 80%, 90%, and 100% selama masing-masing 5 menit.

- q. Penutupan preparat (*mounting*) dilakukan dengan *entellan* dan *coverglass*.
- r. Pemeriksaan dilakukan dengan mikroskop.

4.9.17 Pemeriksaan Preparat Histologi

Analisa sediaan preparat dilakukan di bawah mikroskop ZEISS seri AXIO SCOPE A.1 yang dilengkapi dengan kamera digital AxioCam dan memakai *software* ZEN 3.4 dengan perbesaran 40x. Setiap sediaan preparat histologi diamati 5 area, kemudian dianalisis menggunakan *software Image J*. Pemeriksaan histologi dilakukan pada kelompok K14, K28, K2-14, K2-28, P1-14, P1-28, P2-14, P2-28, P3-14 dan P3-28 untuk Menganalisis jumlah sel osteoblas, ketebalan kolagen, Berikut ini adalah parameter pada analisa yang akan dilakukan.

- a. Perhitungan ketebalan kolagen dilakukan dengan mengukur ketebalan serat kolagen pada jaringan yang dilihat secara histologi pada area atau jaringan ikat yang memendarkan warna kebiruan setelah pengecatan dengan *Masson Trichrome*. Pembacaan preparat kolagen dilakukan berdasarkan kriteria skor sebagai berikut: 0 (tidak terlihat gambaran serat kolagen); 1 (serat kolagen terlihat sangat tipis/sedikit); 2 (serat kolagen terlihat tipis menyebar); 3 (serat kolagen terlihat tebal menyebar).
- b. Perhitungan sel osteoblas dilakukan dengan menghitung jumlah sel osteoblas pada tepi soket tulang alveolar. Sel osteoblas berbentuk kubus atau kolumnar dalam keadaan aktif, dan berbentuk pipih jika dalam keadaan tidak aktif yang dilihat secara histologi memendarkan warna kemerahan setelah pengecatan dengan *hematoksilin-eosin* (HE).

4.9.18 Pemeriksaan Preparat Imunohistokimia

Analisa sediaan preparat dilakukan di bawah mikroskop ZEISS seri AXIO SCOPE A.1 yang dilengkapi dengan kamera digital AxioCam dan memakai *software* ZEN 3.4 dengan perbesaran 40x. Setiap sediaan preparat imunohistokimia diamati 5 area, kemudian dianalisis menggunakan *software Image J*. Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan pada kelompok K14, K28, K2-14, K2-28, P1-14, P1-28, P2-14, P2-28, P3-14 dan P3-28 untuk Menganalisis jumlah sel ekspresi BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2. Berikut ini adalah parameter dari analisa yang akan dilakukan.

- a. Perhitungan Ekspresi BMP-2 dilakukan dengan menghitung sel kondroblas memendarkan warna kemerahan atau kecoklatan di dalam nukleus atau sitoplasmanya setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi anti-BMP-2.
- b. Perhitungan Ekspresi Osteoclain dilakukan dengan menghitung jumlah sel osteosit yang memendarkan warna kecoklatan di dalam nucleus dan sitoplasmanya setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi anti-*Osteocalcin*.
- c. Perhitungan Ekspresi RUNX2 dilakukan dengan menghitung jumlah sel kondrosit yang memendarkan warna kecoklatan di dalam nukleus dan sitoplasmanya setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi anti-RUNX2.

4.10 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data

Prosedur pengambilan dan pengumpulan data pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode penelitian kuantitatif analitik serta dilakukan uji statistik. Hasil masing-masing kelompok setelah dilakukan pemeriksaan histologi dan imunohistokimia dilakukan pembacaan hasil jumlah sel osteoblas, ketebalan kolagen, ekspresi BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2. Kemudian dilakukan perbandingan antara kelompok K14, K28, K2-14, K2-28, P1-14, P1-28, P2-14, P2-28, P3-14, P3-28 dan dilakukan perhitungan secara statistik.

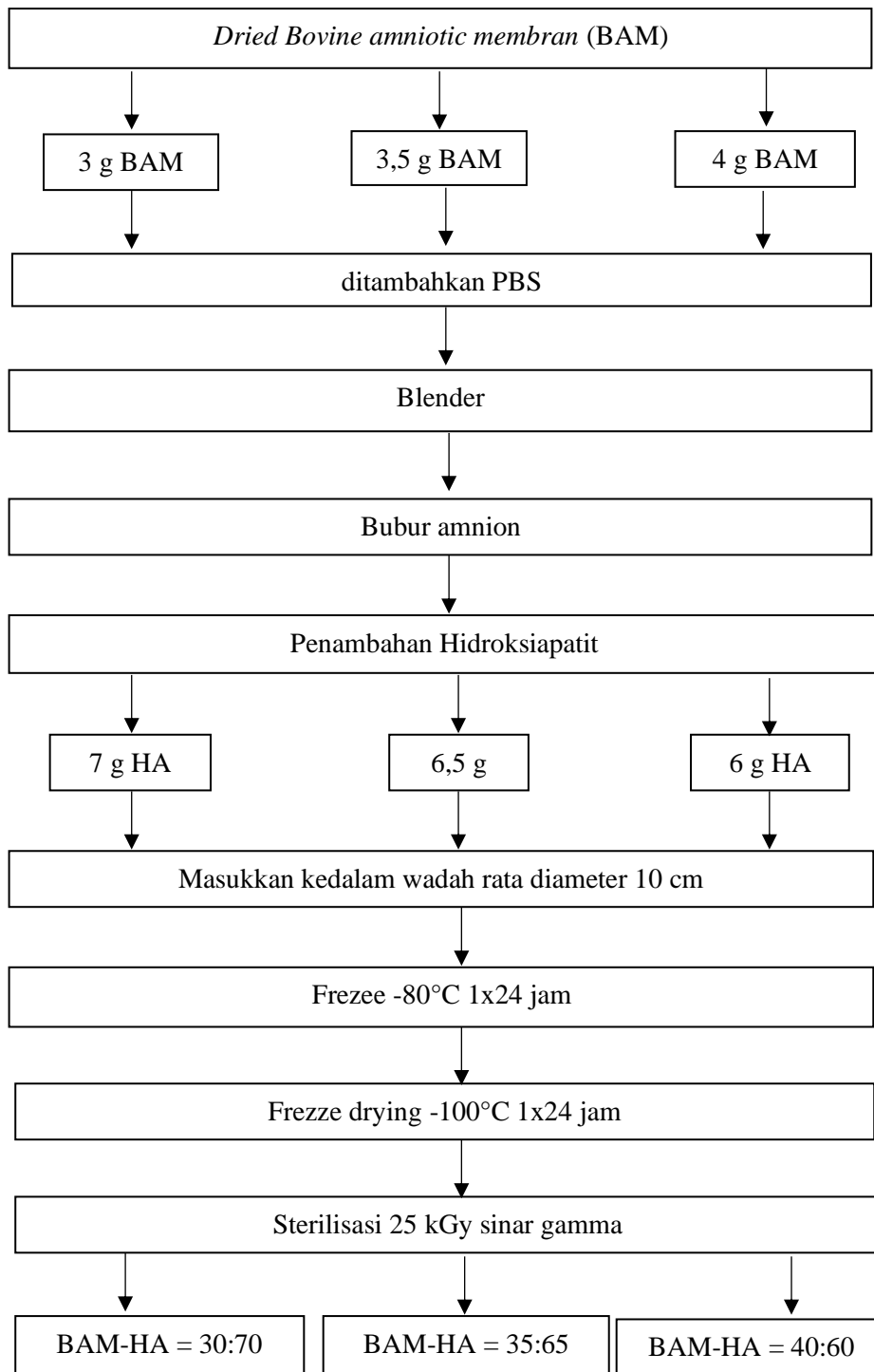
4.11 Pengolahan dan Analisa Data

Data hasil penelitian, diuji normalitas dan homogenitas yang selanjutnya dianalisis statistik dengan ANOVA. Analisa statistik ANOVA satu jalur dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan pada uji persentase porositas dan persentase *swelling*.

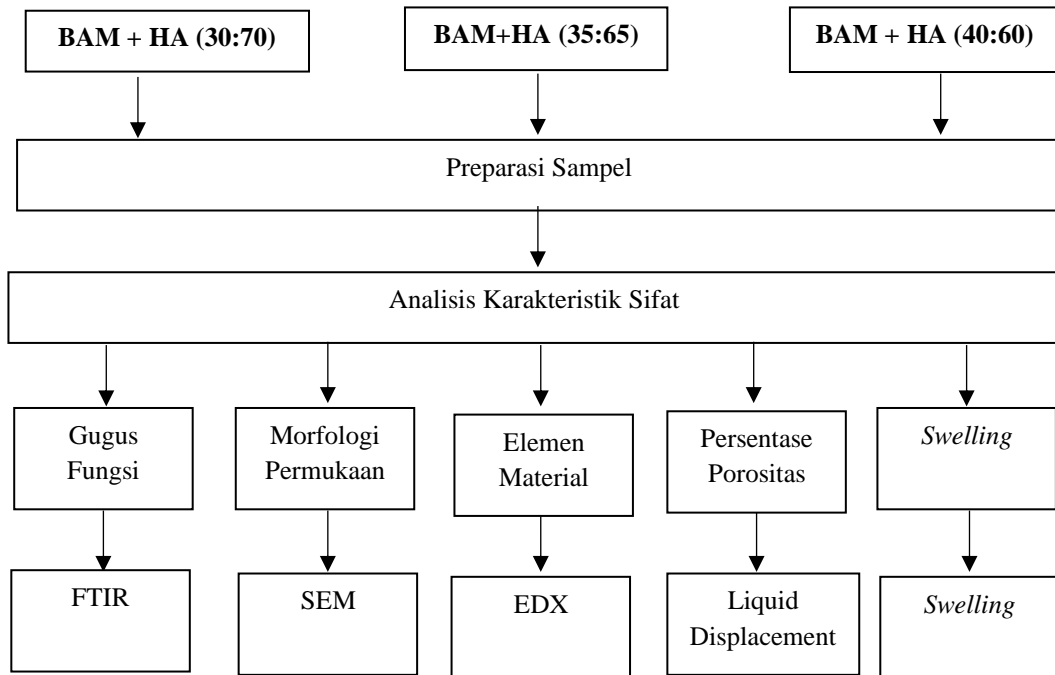
Analisa statistik ANOVA dua jalan dengan *post hoc Tukey* dilakukan untuk melihat perbedaan bermakna pada antar kelompok dengan pada uji osteoblas, kolagen, ekspresi BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2 pada hari ke14, dan hari ke 28. ANOVA dua jalan juga dapat menganalisis interaksi waktu terhadap perbedaan jumlah osteoblas, kolagen, ekspresi BMP-2, *Osteocalcin* dan RUNX2 setelah diaplikasi biokomposit BAM-HA pada luka pasca pencabutan gigi tikus SD. Batas derajat kemaknaan adalah apabila $p < 0,05$ dengan 95 % interval kepercayaan. Analisa data dilakukan dengan program komputer SPSS 23 *for windows*.

4.12 Alur Kerja Penelitian

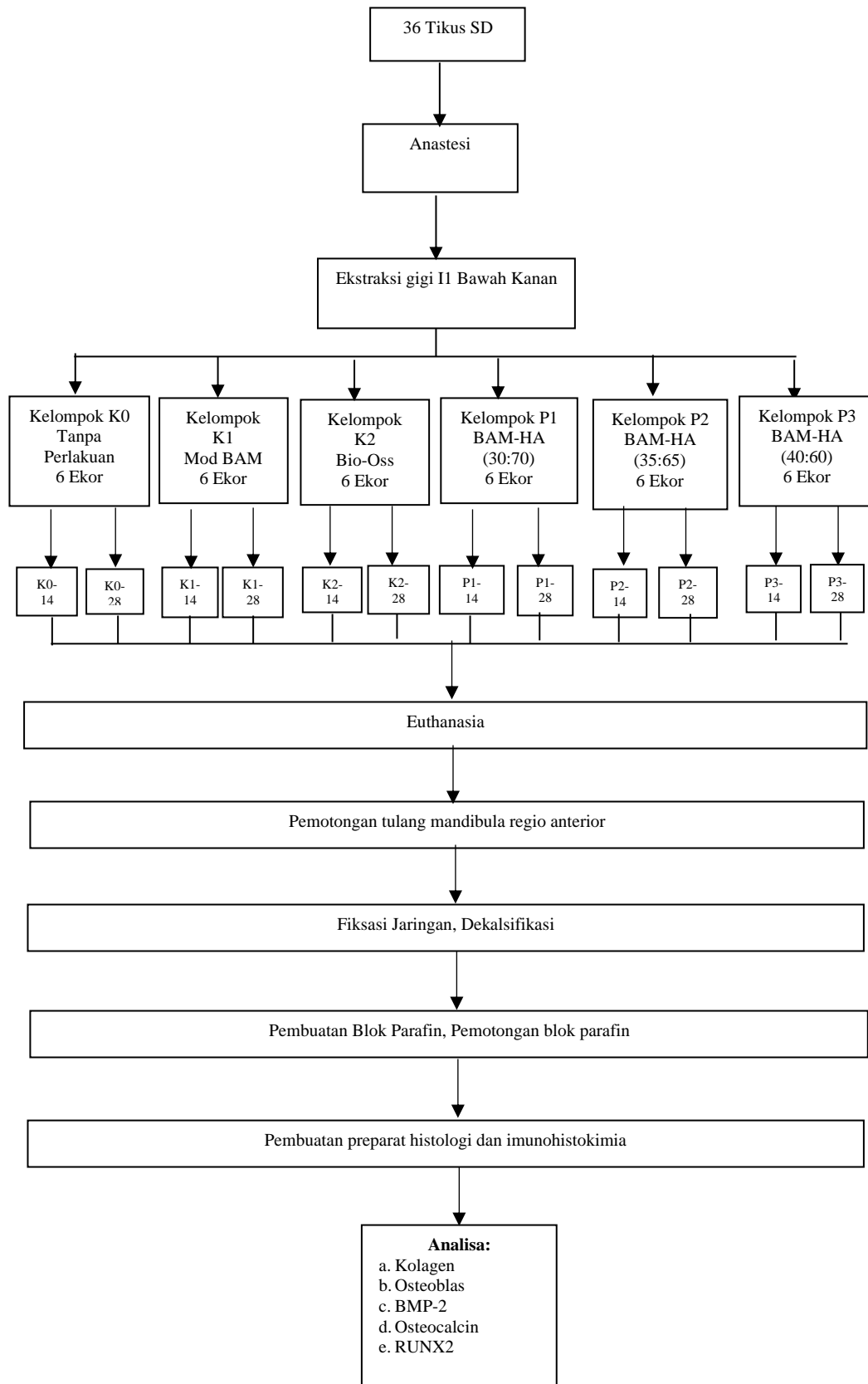
4.12.1 Pembuatan Biokomposit BAM-HA



4.12.2 Karakterisasi Biokomposit BAM-HA



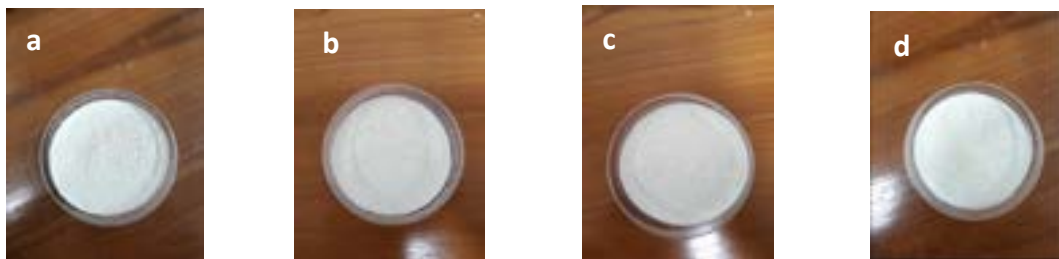
4.12.3 Aplikasi Pada hewan Coba



BAB 5

HASIL PENELITIAN

Pembuatan biokomposit *Bovine Amniotic Membrane* (BAM) dengan hidroksiapatit dilakukan di Bank Jaringan Surabaya Dr. Soetomo telah mendapatkan laik etik dengan no. 360/HRECC.FODM/VII/2021. Pembuatan biokomposit BAM-HA menghasilkan rasio 30:70, 35:65 dan 40:60 dalam bentuk spons (Gambar 5.1). Setelah pembuatan biokomposit BAM-HA, dilakukan uji tahap pertama untuk menganalisis karakterisasi material. Sebelum dilakukan uji karakterisasi sampel dipersiapkan bentuk dan ukurannya untuk analisa gugus fungsi, struktur permukaan, elemen material, persentase porositas dan kemampuan *swelling*.

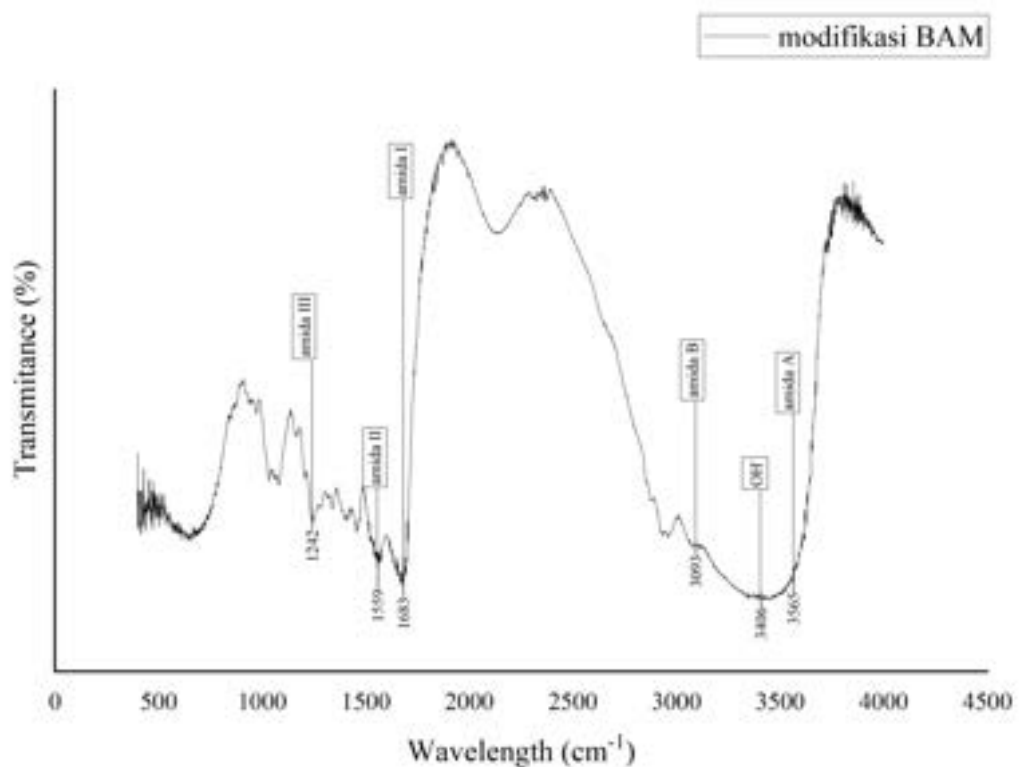


Gambar 5.1 Hasil Pembuatan Biokomposit (a) BAM-HA 30:70, (b) BAM-HA 35:65, (c) BAM-HA 40 :60, (d) Kontrol negatif BAM

5.1 Hasil Penelitian Tahap Pertama

Penelitian tahap pertama ini dilakukan setelah pembuatan biokomposit BAM-HA dalam bentuk spons dan ukuran sampel dipersiapkan sesuai dengan standar pengujian yang berlaku. Sampel yang dianalisa pada penelitian tahap pertama ini antara lain BAM, BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, Bam-HA 40:60, BioOss Collagen.

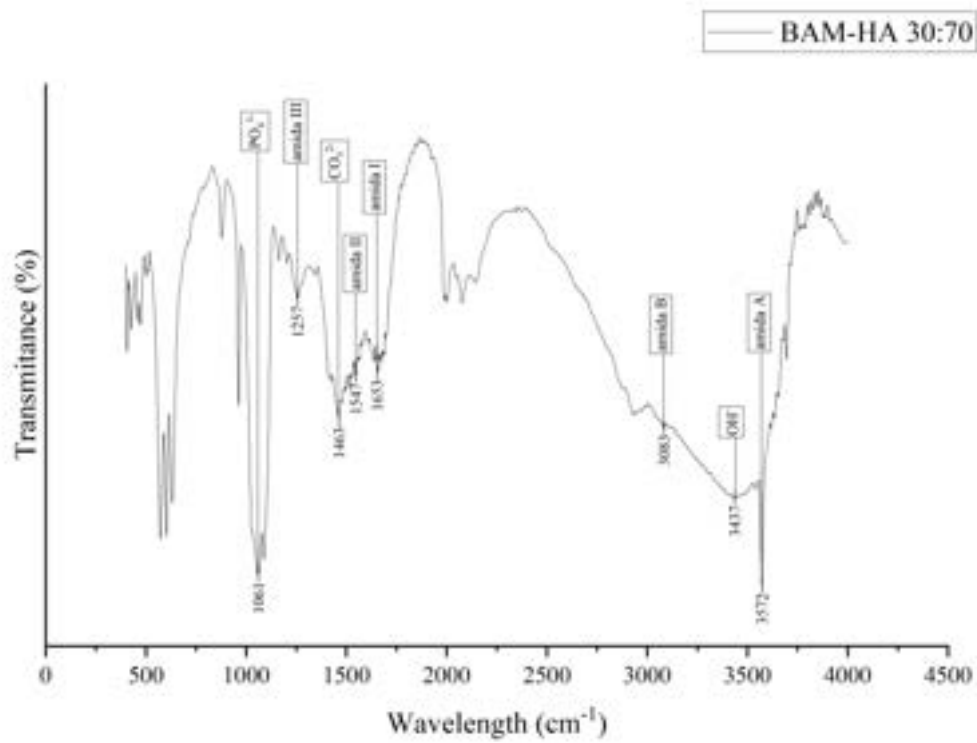
5.1.1 Hasil Pengujian *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR)



Gambar 5.2 Grafik hasil analisa FTIR BAM

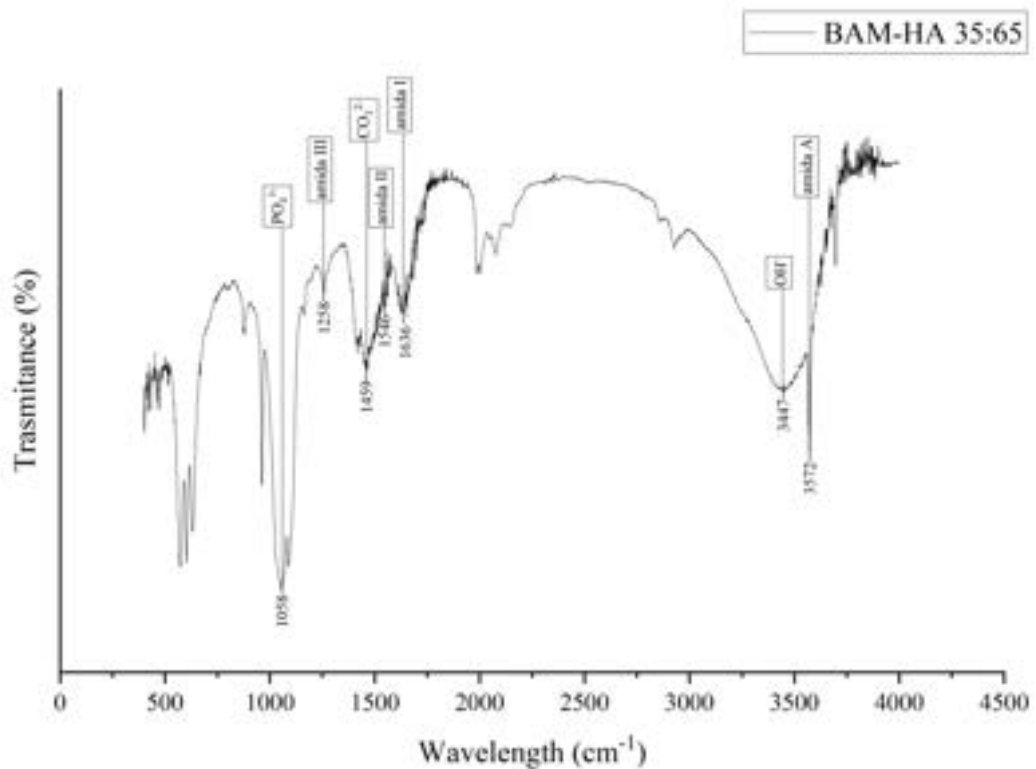
Gambar 5.2 adalah grafik hasil analisa FTIR BAM. Pada grafik tersebut terdapat puncak penyerapan amida I pada 1683 cm^{-1} Puncak penyerapan amida II pada panjang gelombang 1559 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida III pada panjang gelombang 1242 cm^{-1} . Puncak penyerapan amida A pada panjang gelombang 3565 cm^{-1} .

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



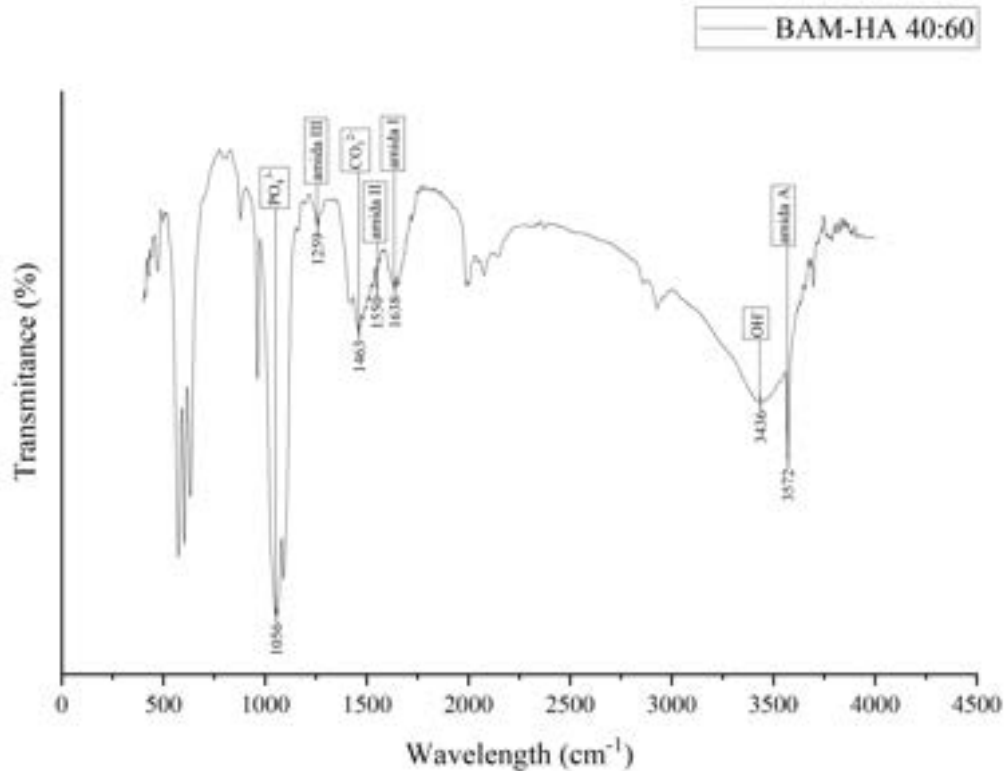
Gambar 5.3 Grafik hasil Analisa FTIR dari BAM-HA 30:70

Gambar 5.3 adalah grafik hasil analisa BAM-HA 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} .



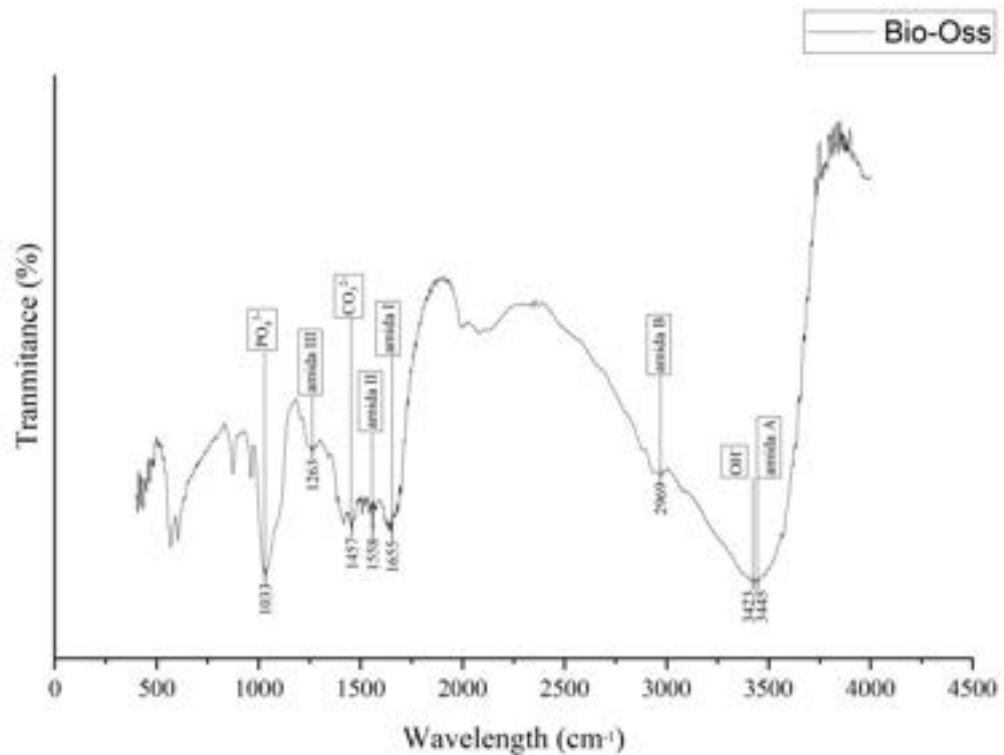
Gambar 5.4 Grafik hasil Analisa FTIR dari BAM-HA 35:65

Gambar 5.4 adalah grafik hasil analisa BAM-HA 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 5.5 Grafik hasil analisa FTIR dari BAM-HA 40:60

Gambar 5.5 adalah grafik hasil analisa BAM-HA 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 3572 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 5.6 Hasil analisa FTIR dari Bio-Oss Collagen

Gambar 5.6 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 5.1 merupakan ringkasan dari hasil analisa FTIR berdasarkan referensi peregangan gugus fungsi C=O, C-N, N-H dan O-H dan P-O-P serta pembengkokkan gugus fungsi N-H. Penelitian ini menunjukkan BAM tidak mengalami denaturasi atau perubahan saat dimodifikasi dan dikombinasi dengan

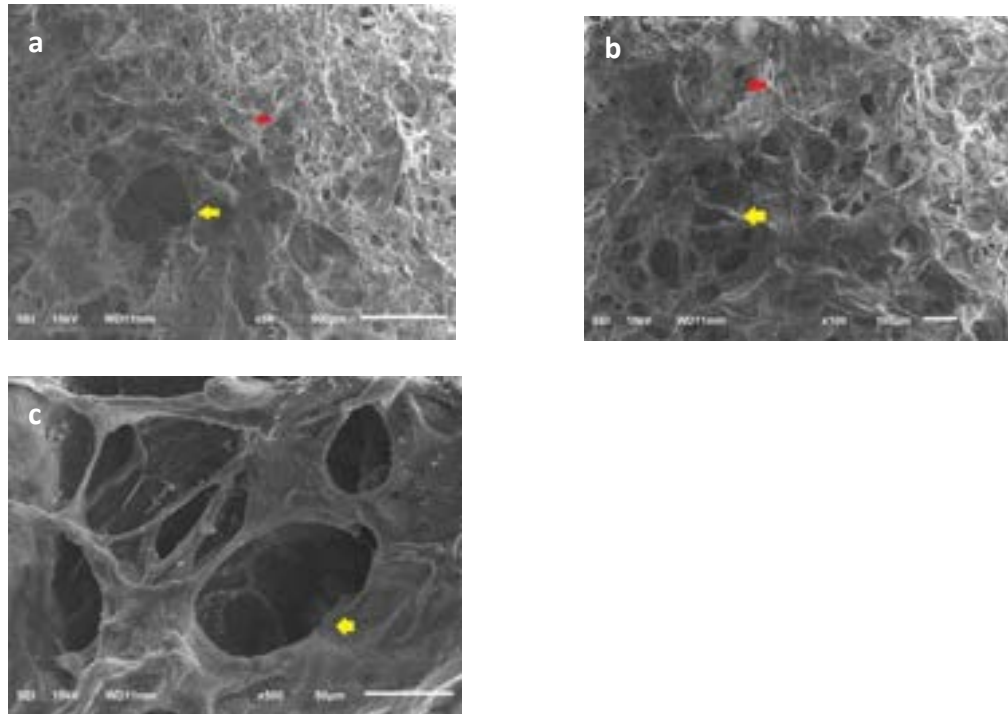
bubuk HA. BAM dengan HA teridentifikasi dapat terikat dengan baik. Biokomposit BAM-HA memiliki gugus fungsi yang sama dengan kontrol negatif dan kontrol positif yaitu gugus fungsi amida I, II, III, A, B, dan OH⁻, PO₄³⁻, CO₃²⁻.

Tabel 5.1 Puncak penyerapan gugus fungsi amida I, II, III, A, B, OH⁻, PO₄³⁻ dan CO₃²⁻ pada BAM, BAM-HA 30:70, 35:65, 40:60

Gugus Fungsi	Puncak penyerapan (cm-1)					Referensi	Mode gugus fungsi
	BAM	BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	BAM-HA 40:60	Bio-Oss Collagen		
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 asimetris C-O

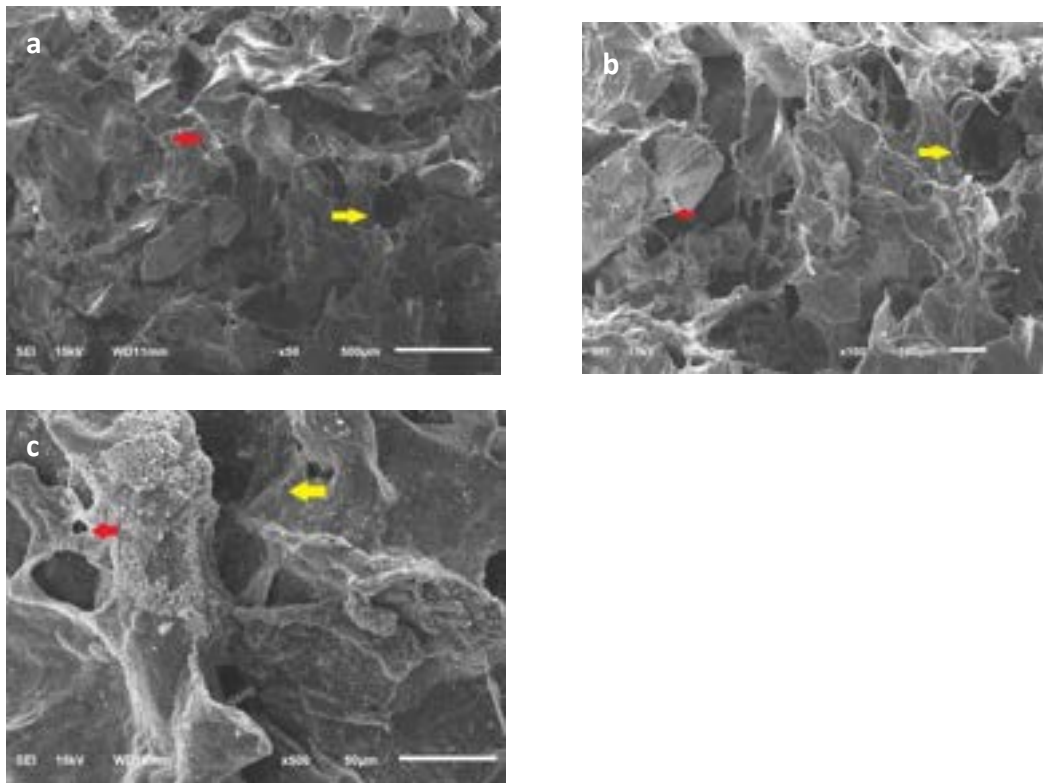
5.1.2 Hasil Pengujian *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Uji SEM dilakukan untuk mengetahui topografi, morfologi bentuk pori, ukuran dan jumlah pori yang ada pada sampel. 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.



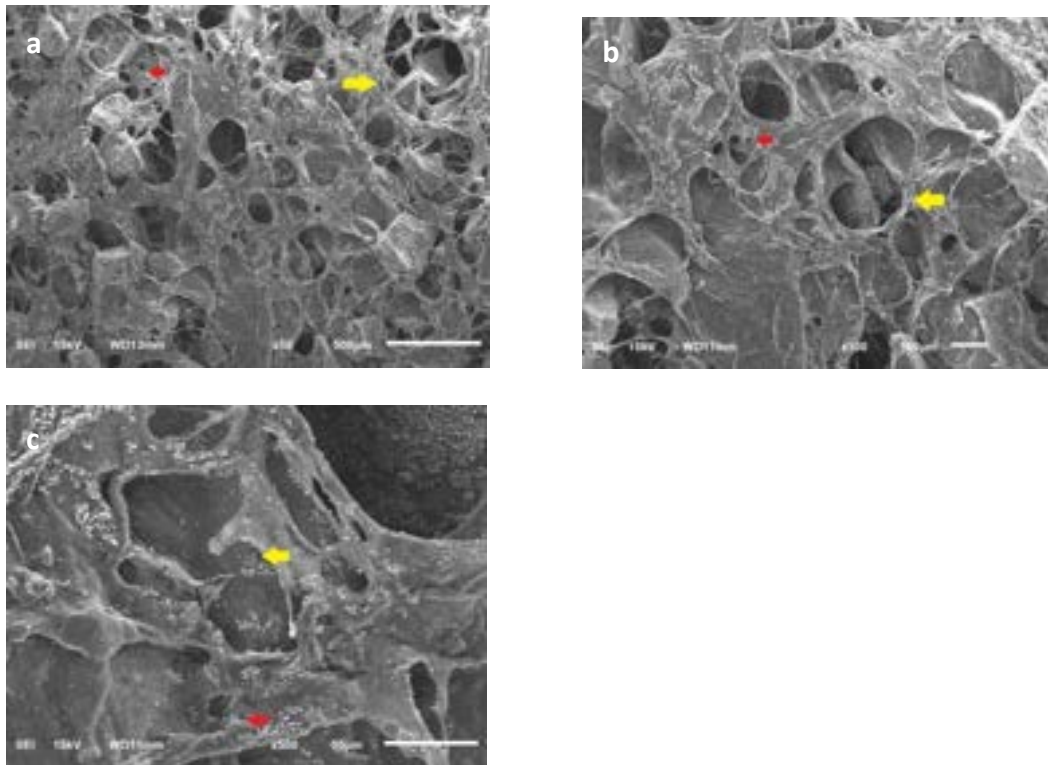
Gambar 5.7 Mikrograf SEM BAM, a. Perbesaran 50x, b. Perbesaran 100x, dan c. Perbesaran 500x

Gambar 5.7 adalah mikrograf SEM BAM dengan perbesaran 50x (Gambar 5.7a), perbesaran 100x (Gambar 5.7b) dan perbesaran 500x (Gambar 5.7c). Pada mikrograf SEM ini terlihat porus porus kecil yang tidak beraturan dan merata di permukaan sampel. Pengamatan pada mikrograf SEM 100x (Gambar 5.7b) 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 (panah kuning) dan ukuran porus terkecil 14,137 μm (panah merah).



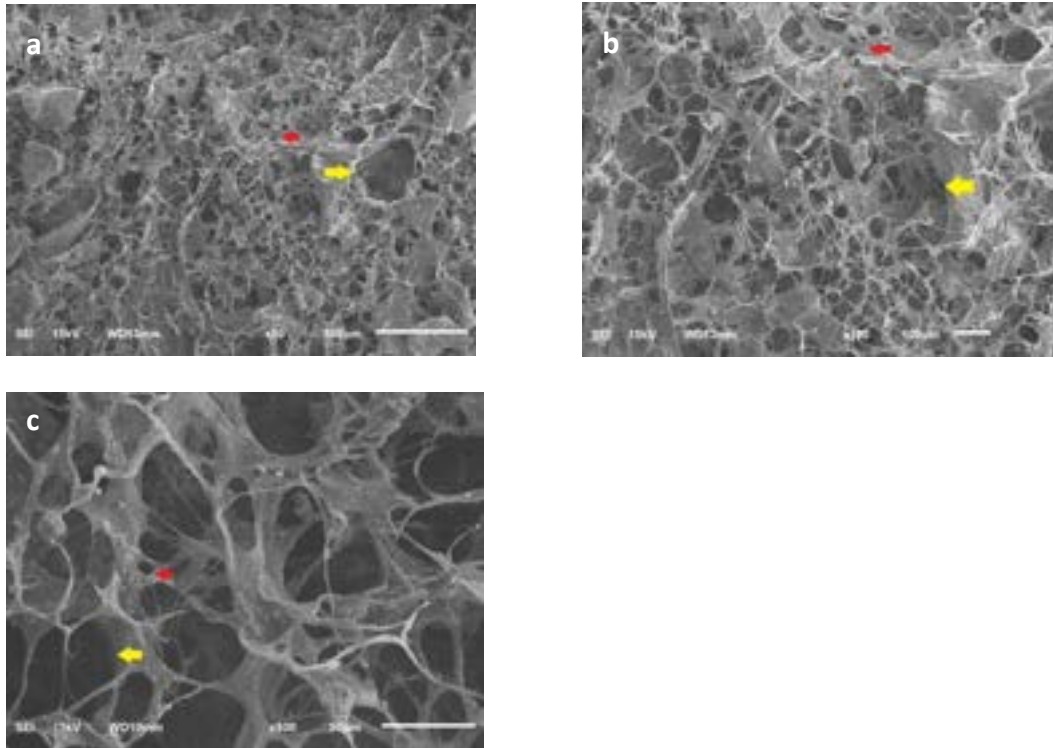
Gambar 5.8 Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 30:70 a. Perbesaran 50x b. Perbesaran 100x dan c. Perbesaran 500x

Gambar 5.8 adalah mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 30:70 dengan perbesaran 50x (Gambar 5.8a), perbesaran 100x (Gambar 5.8b) dan perbesaran 500x (Gambar 5.8c). Pada mikrograf SEM ini menunjukkan permukaan sampel tampak padat, terlihat porus-porus besar yang tidak beraturan. Pengamatan pada mikrograf SEM perbesaran 100x (Gambar 5.8b) menunjukkan jumlah porus sebanyak 15 buah. Porus-porus tersebut memiliki ukuran rerata $153,025 \mu\text{m}$, porus terbesar berukuran $420,445 \mu\text{m}$ (panah kuning) dan porus terkecil berukuran $37,990 \mu\text{m}$ (panah merah) 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.



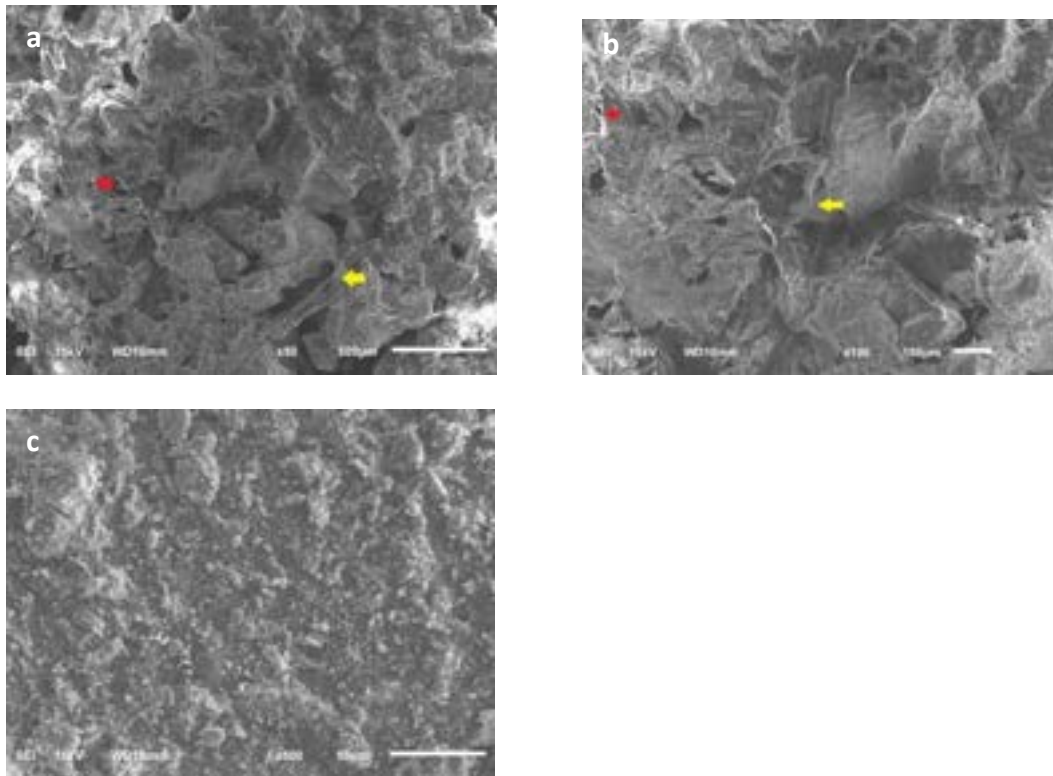
Gambar 5.9 Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 35:65 a. Perbesaran 50x b. Perbesaran 100x dan c. Perbesaran 500x

Gambar 5.9 adalah mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 35:65 dengan perbesaran 50x (Gambar 5.9a), perbesaran 100x (Gambar 5.9b) dan perbesaran 500x (Gambar 5.9c). Pada mikrograf SEM terlihat porus porus yang tidak beraturan pada permukaan sampel. Pengukuran porus pada SEM dengan perbesaran 100 x (Gambar 5.12c) menunjukkan jumlah porus sebanyak 20 buah. Porus-porus ini memiliki ukuran rerata $155,625 \mu\text{m}$, porus terbesar berukuran $316,106 \mu\text{m}$ (panah kuning) dan porus terkecil berukuran $43,395 \mu\text{m}$ (panah merah 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 5.10 Mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 40:60 a. Perbesaran 50x b. Perbesaran 100x dan c. Perbesaran 500x

Gambar 5.10 adalah mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 40:60 dengan perbesaran 50x (Gambar 5.10a), perbesaran 100x (Gambar 5.10b) dan perbesaran 500x (Gambar 5.10c). Pada mikrograf SEM terlihat porus porus yang tidak beraturan dan hampir merata pada permukaan sampel. Pengamatan pada perbesaran 100x (Gambar 5.10c), sampel memiliki jumlah porus sebanyak 40 buah. Porus-porus ini memiliki ukuran rerata $72,424 \mu\text{m}$, porus terbesar berukuran $279,896 \mu\text{m}$ (panah kuning) dan porus terkecil berukuran $20,518 \mu\text{m}$ (panah merah 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 5.11 Mikrograf SEM Bio-Oss Collagen a. Perbesaran 50x b. Perbesaran 100x dan c. Perbesaran 500x

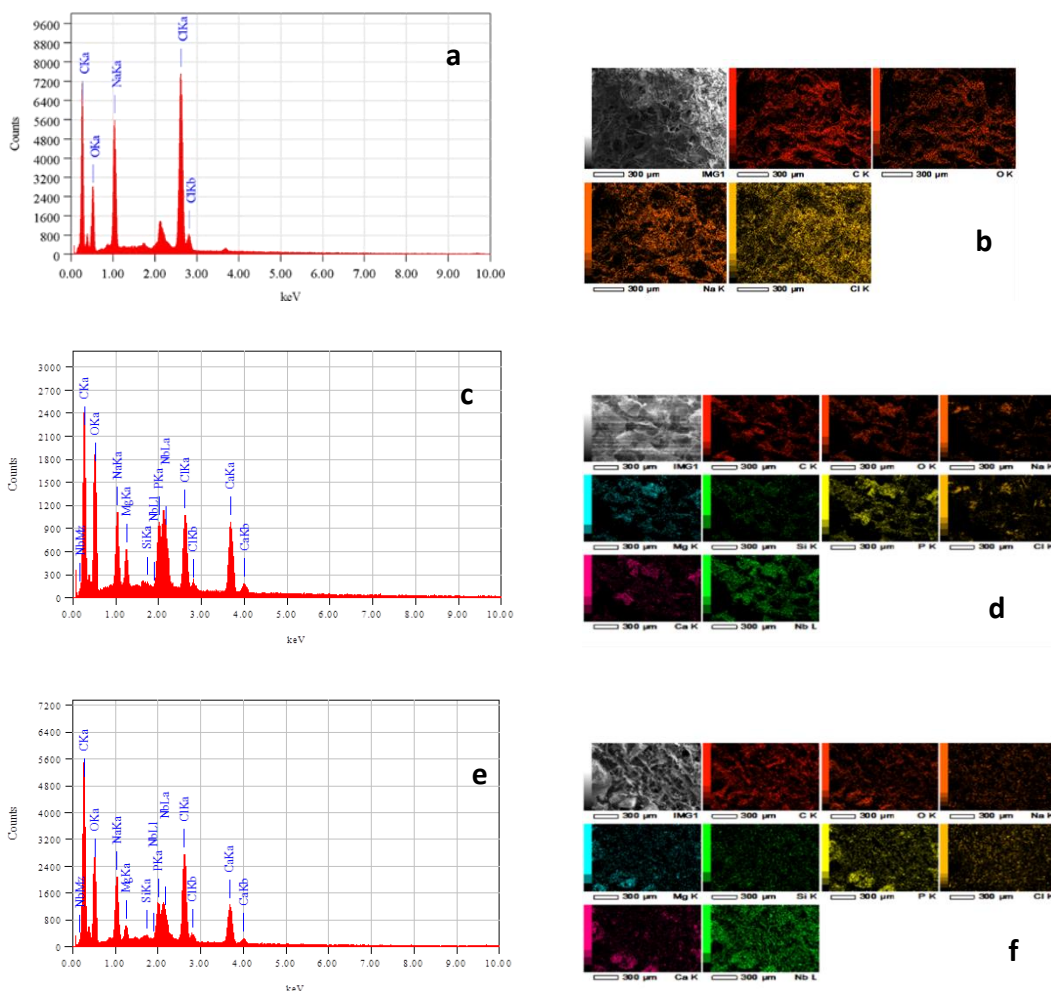
Gambar 5.11 adalah mikrograf SEM Biokomposit BAM-HA 40:60 dengan perbesaran 50x (Gambar 5.11a), perbesaran 100x (Gambar 5.11b) dan perbesaran 500x (Gambar 5.11c). Pada mikrograf SEM terlihat permukaan sampel terlihat padat dan jarang adanya porus. Pengamatan pada perbesaran SEM 100x (Gambar 5.16b) menunjukkan jumlah porus sebanyak 10 buah. Porus yang ada memiliki ukuran rerata $136,312 \mu\text{m}$, porus terbesar berukuran $277,806 \mu\text{m}$ (panah kuning) dan porus terkecil berukuran $40,096 \mu\text{m}$ (panah merah) menggunakan *software Image-J*.

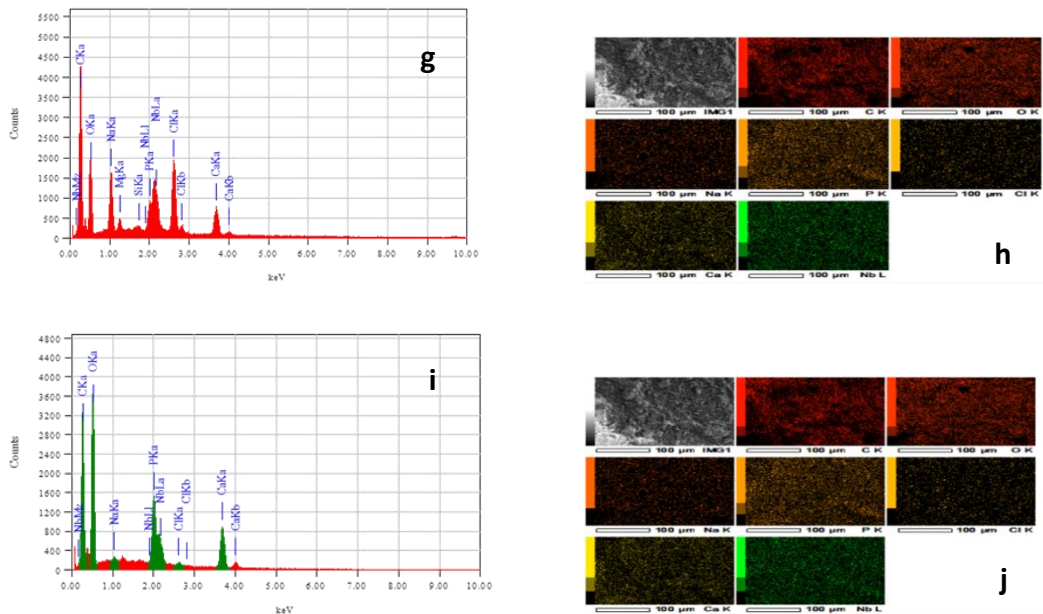
Pada penelitian ini BAM-HA bisa membentuk ikatan satu sama lain. Semakin banyak jumlah rasio BAM, maka sampel akan lebih banyak memiliki porus-porus. BAM memiliki jumlah porositas terbanyak dengan ukuran terkecil,

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.

5.1.3 Hasil Pengujian *Energy Dispersive X-ray (EDS)*

Uji EDS dilakukan untuk mengetahui unsur-unsur yang ada pada sampel. 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 menggunakan EDS.





Gambar 5.12 Gambaran Grafik dan Pemetaan EDS (a,b) BAM, (c,d) BAM-HA 30 :70, (e,f) BAM-HA 35:65, (g,h) BAM-HA 40:60, (i,j) Bio-Oss Collagen

Gambar 5.12 menunjukkan hasil analisis komponen kelima sampel yang telah dilakukan pemeriksaan Pemetaan unsur dengan EDS. Gambar 5.12(a,b) BAM menunjukkan adanya komponen (74,70% C, 16,99% O, 3,83% Na, 4,48% Cl). Gambar 5.12(c,d) 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 5.12(e,f) 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 5.12(g,h) 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 5.15(i,j) 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 5.2 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.

5.1.4 Hasil Pengujian Persentase Porositas

Uji persentase porositas dilakukan pada kelima sampel BAM, BAM-HA 30:70, BAM-HA 35:65, BAM-HA 40:60 dan Bio-Oss Collagen. Uji ini untuk dilakukan untuk mengetahui persentase porositas yang ada pada sampel. Pengujian ini menggunakan metode *liquid displacement*. Hasil uji persentase porositas dapat terlihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil pengujian persentase porositas

No	Kelompok	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Normalitas	Homogenitas	Sig Anova
1	BAM	105,93 \pm 3,81	0,608*		
2	BAM-HA 30:70	76,89 \pm 6,15	0,812*		
3	BAM-HA 35:65	89,23 \pm 7,51	0,242*	0,000**	0,000***
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), 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 5.3). 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 5.4).

Tabel 5.4 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

5.1.5 Hasil Pengujian Persentase *Swelling*

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*.

Hasil pengujian dapat terlihat pada Tabel 5.5, yang menunjukkan rerata 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 ($608,77 \pm 31,66$), Bio-Oss Collagen ($137,3 \pm 1,30$). Setelah sampel diuji kemudian dianalisa secara statistika.

Tabel 5.5 Hasil pengujian persentase *swelling*

No	Kelompok	$\bar{x} \pm SD$ (%)	Normalitas	Homogenitas	Sig Anova
1	BAM	1127,00 \pm 81,18	0,918*		
2	BAM-HA 30:70	320,53 \pm 9,16	0,124*		
3	BAM-HA 35:65	514,67 \pm 20,35	0,776*	0,000**	0,000***
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 5.5). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan ANOVA satu jalan *post hoc games howel*. Tabel 5.6 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 5.6 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

5.2 Hasil Penelitian Tahap Kedua

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 Osteoclastin pada preparat histologi dan imunohistokimia.

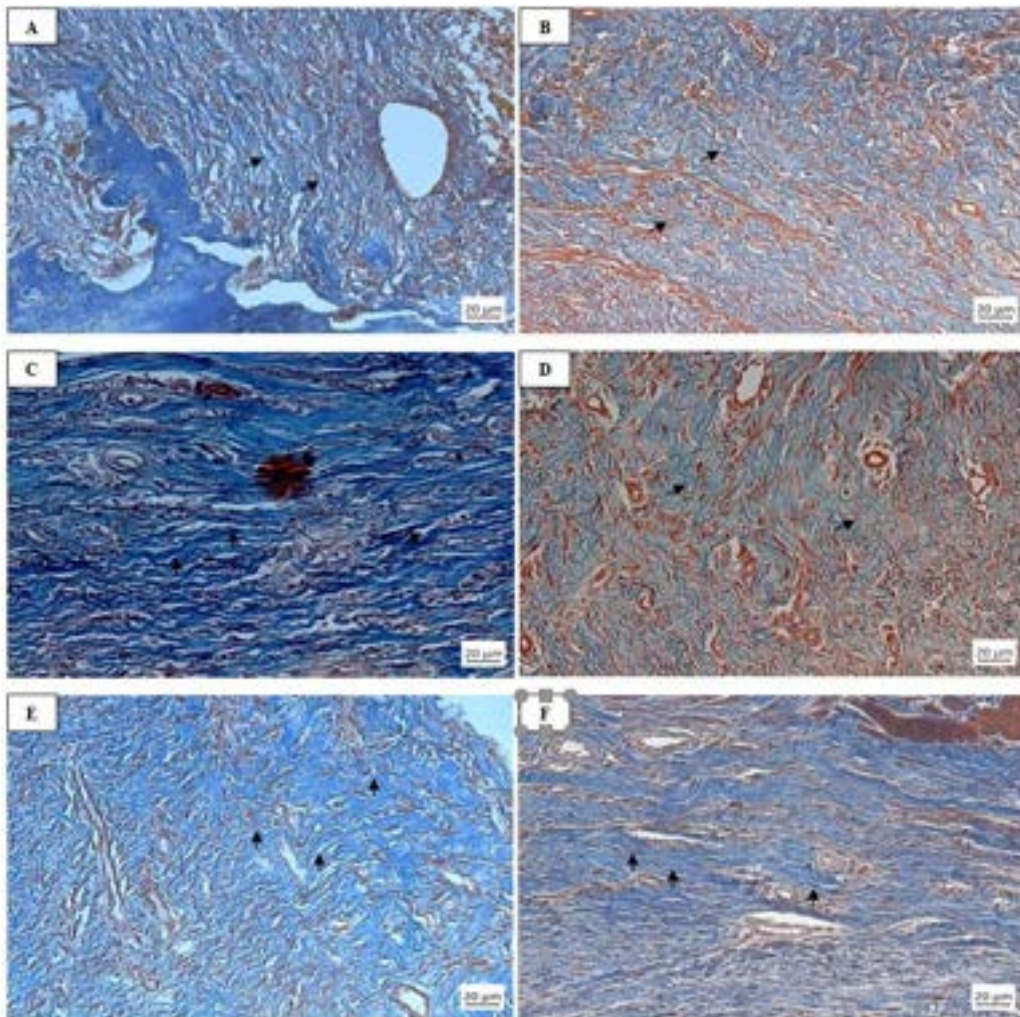
5.2.1 Hasil Analisa Ketebalan Kolagen

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

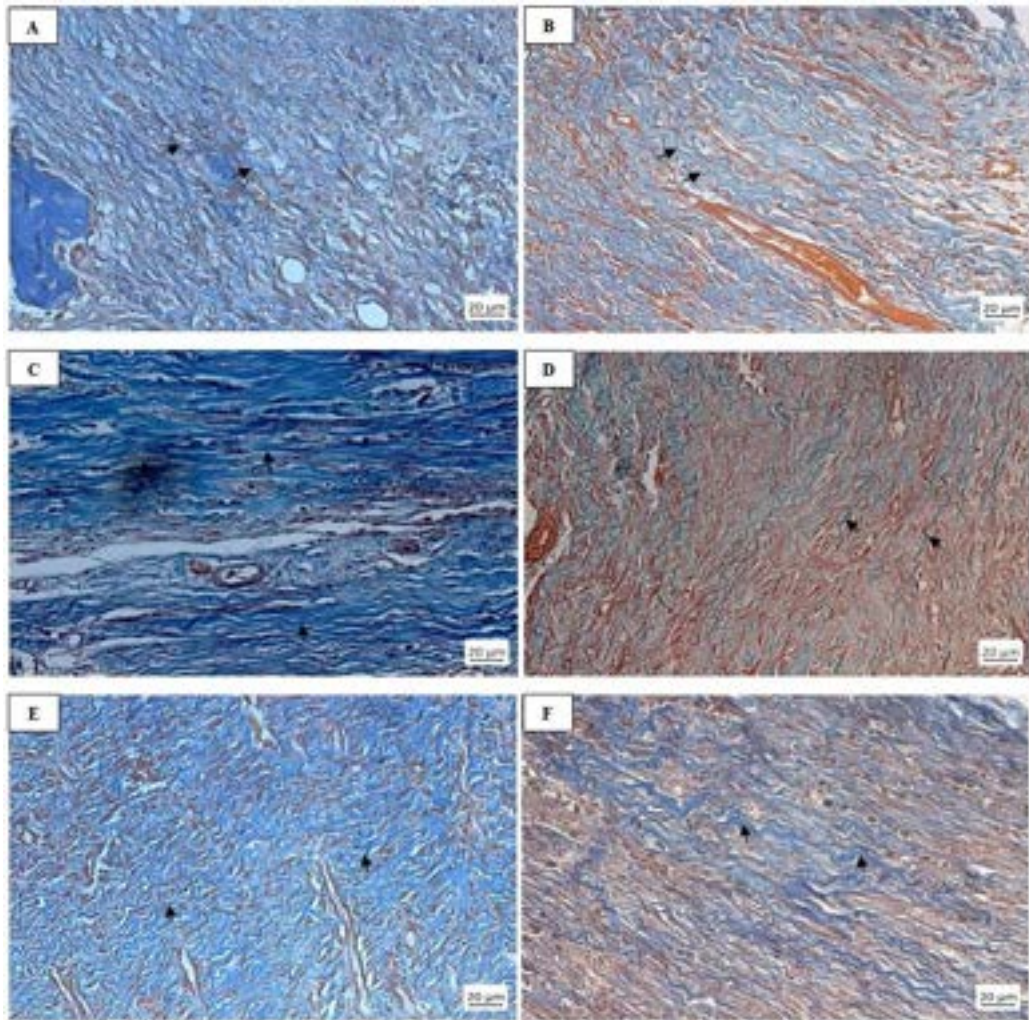
Gambar 5.13 dan 5.14 merupakan gambaran histologi kolagen hari ke-14 dan 28 pada kelompok kontrol negatif, BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss Collagen, dan BAM. Pada gambaran histologi menunjukkan peningkatan ketebalan kolagen dengan aplikasi material BAM-HA dengan berbagai rasio (tanda panah hitam). Pada gambaran histologi 5.14 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 5.6) 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 dipresentasikan dengan gambaran diagram batang (Gambar 5.15).



Gambar 5.13 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 5.14 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

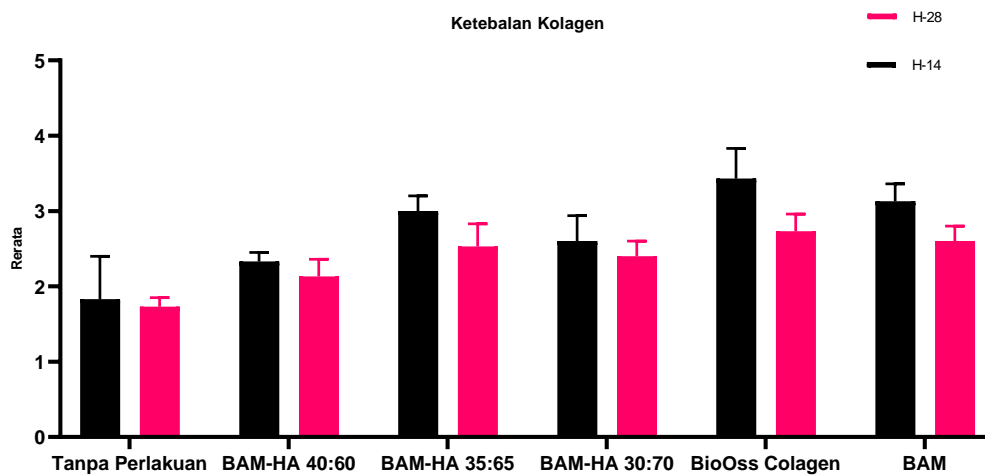
Tabel 5.7 Hasil rerata dan standar deviasi analisa ketebalan kolagen

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						
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	0,189*	0,446**	0,000°	0,000°	0,001°	0,091
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 5.15 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 5.7). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan ANOVA dua jalan jalan *post hoc* Tukey. Tabel 5.8, menunjukkan a 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.

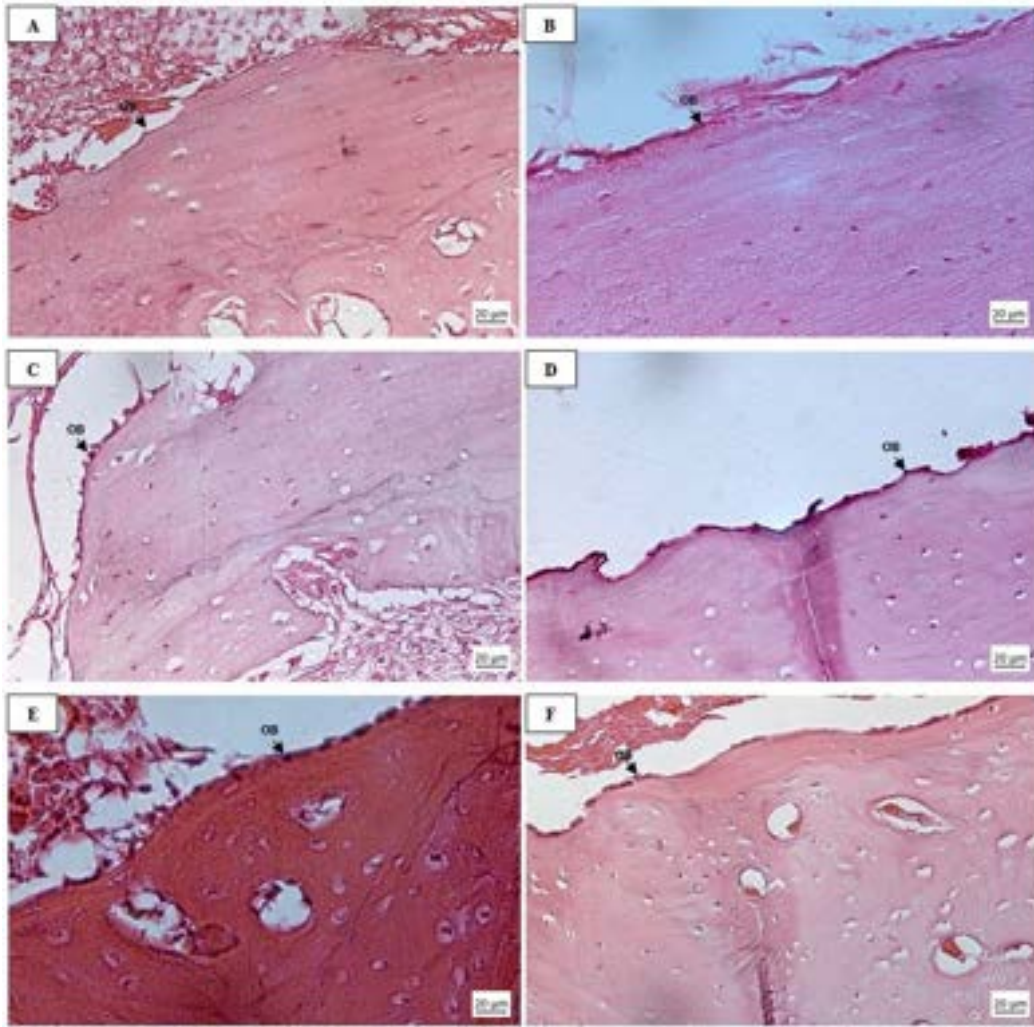
Tabel 5.8 Statistik *Two Way* ANOVA *Post Hoc* Tukey analisis ketebalan kolagen

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

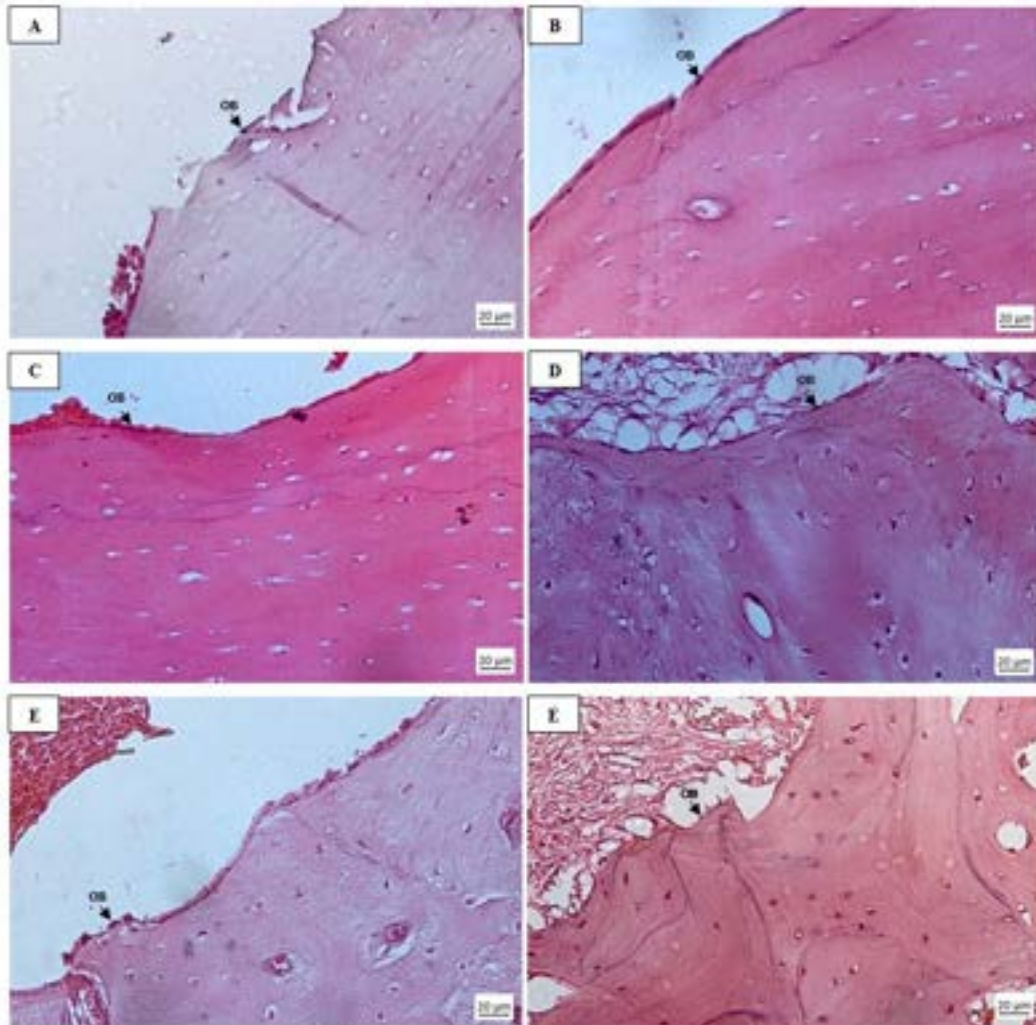
5.2.2 Hasil Analisa Proliferasi Sel Osteoblas

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 5.16) dan hari ke-28 (Gambar 5.17), 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 5.16 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 5.16A-F) Perhitungan nilai rata-rata dan standar deviasi jumlah sel osteoblas (Tabel 5.9) 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 $(17,53 \pm 0,30)$.



Gambar 5.17 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 5.17 A-F. Pada gambaran histologi ini terlihat jumlah sel osteoblas mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan hari ke-14. Tabel 5.9, 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 5.18. 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 (Tabel 5.9).

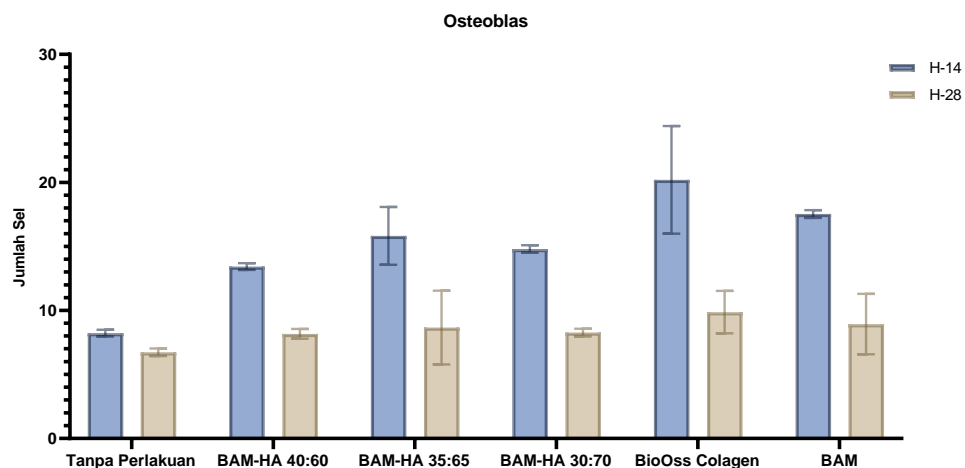
Tabel 5.9 Hasil rerata dan standar deviasi analisa proliferasi sel Osteoblas

No	Kelompok	X ± SD		N	H	Sig ANOVA	Interaksi Antar Bahan		
		Hari ke-14	Hari ke-28				Material	Waktu	M*W
1.	Kontrol Negatif	8,23 ± 0,26	6,73 ± 0,30						
2.	BAM-HA 40:60	13,43 ± 0,26	8,17 ± 0,38						
3.	BAM-HA 35:65	15,83 ± 2,26	8,67 ± 2,88						
4.	BAM-HA 30:70	14,80 ± 0,30	8,27 ± 0,30	0,060*	0,483**	0,000°	0,000°	0,000°	0,004
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 5.18 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 5.9). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan anova dua jalan jalan *post hoc Tukey*. Tabel 5.10, 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.

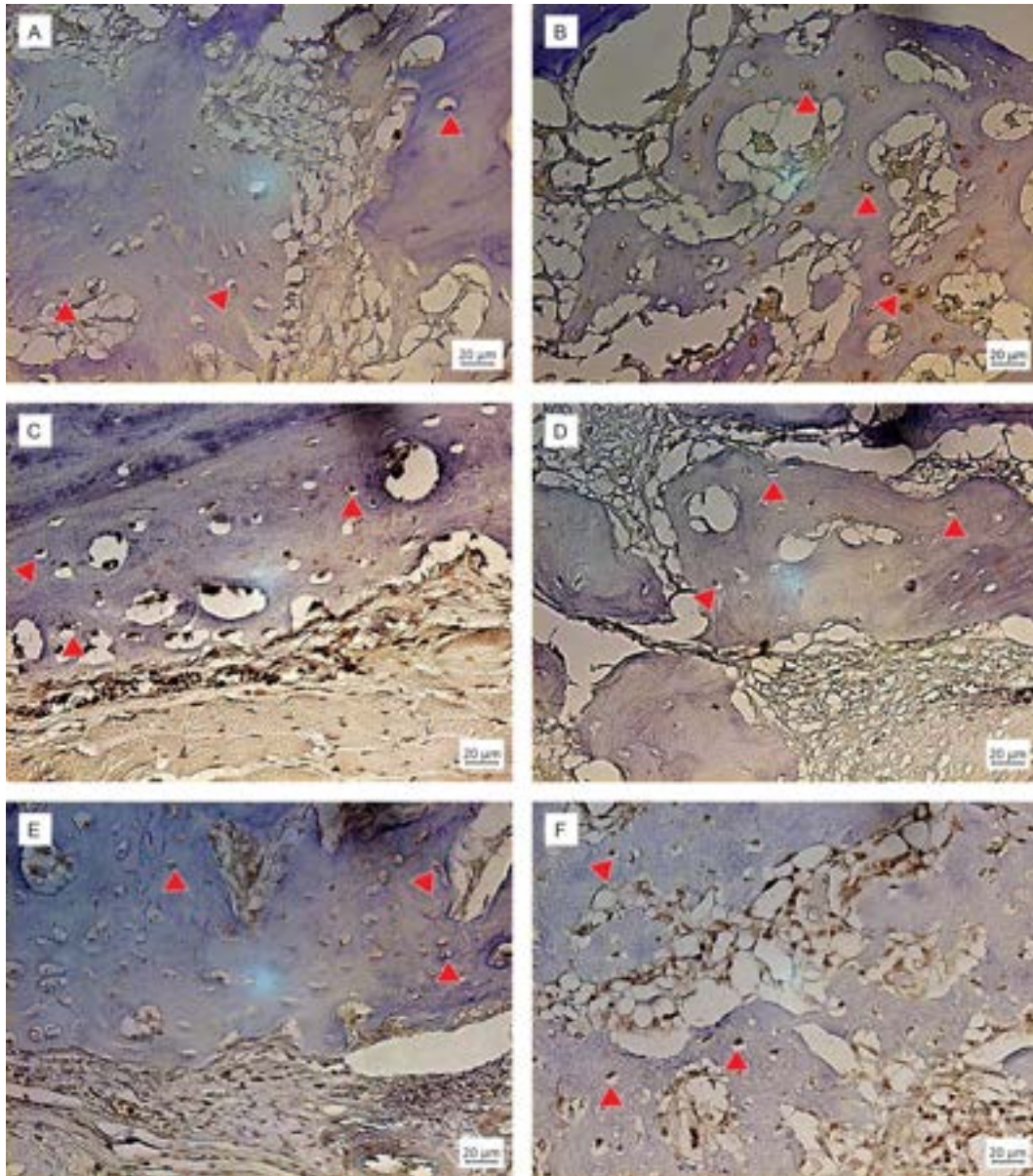
Tabel 5.10 Analisis statistik *Two Way ANOVA Post Hoc Tukey* sel osteoblas

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	-	-	-	-	-	-

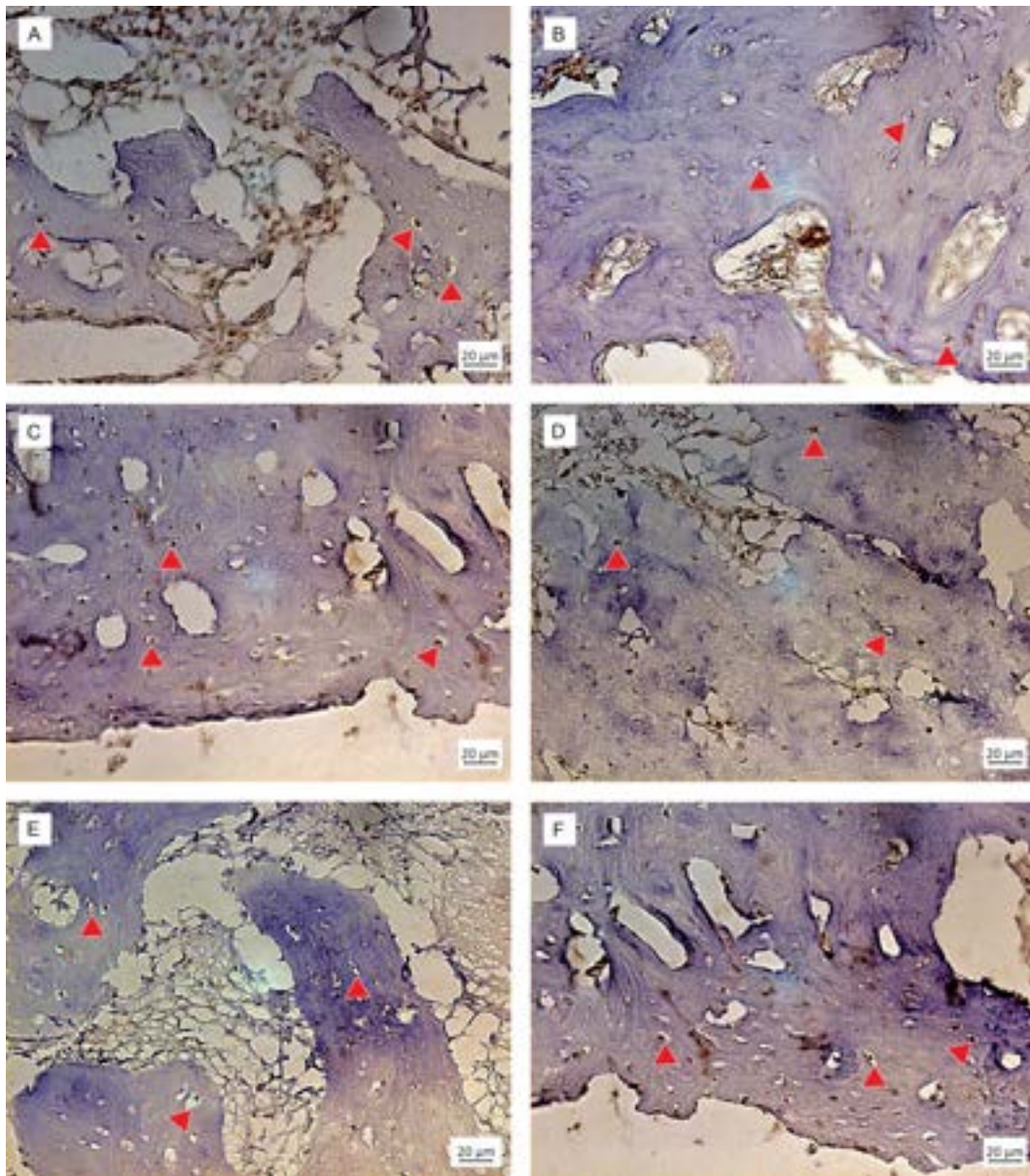
Ket : $p < 0,05$ = ada perbedaan bermakna

5.2.3 Hasil Analisa Ekspresi BMP-2

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 5.19 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 5.20 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 5.11 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						
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	0,066*	0,227**	0,000°	0,000°	0,004°	0,666
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 5.12 Analisis statistik *Two Way ANOVA Post Hoc Tukey* ekspresi BMP-2

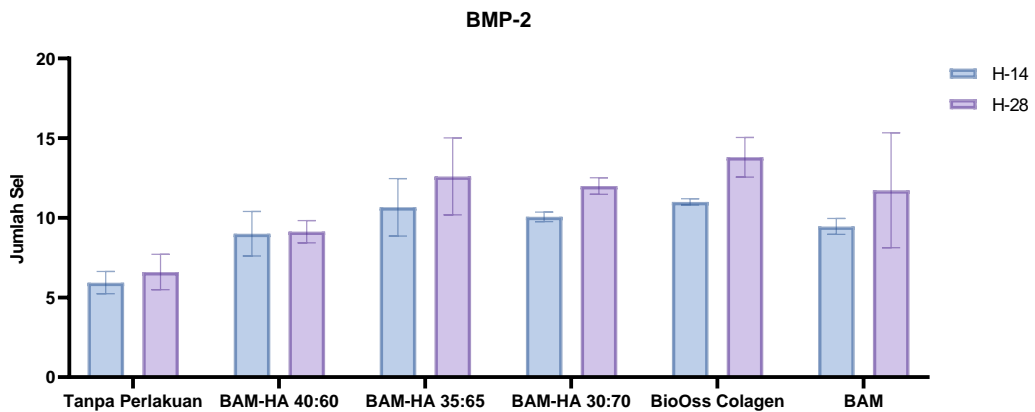
	Tanpa Perlakuan	Bio Oss Collagen	BAM- HA 30:70	BAM- HA 35:65	BAM-HA 40:60	BAM
Tanpa Perlakuan	-	0.000*	0.000*	0.000*	0.044*	0.001*
Bio Oss Collagen	-	-	0.646	0.952	0.011*	0.360
BAM-HA 30:70	-	-	-	0.983	0.270	0.996
BAM-HA 35:65	-	-	-	-	0.078	0.851
BAM-HA 40:60	-	-	-	-	-	0.531
BAM	-	-	-	-	-	-

Ket : p<0.05= ada perbedaan bermakna

Gambar 5.19 (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 5.12) 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 $(9,46 \pm 0,50)$

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 (5.20 A-F). Kelompok dengan perlakuan menunjukkan gambaran sel kondroblas yang lebih tinggi dibandingkan kelompok tanpa perlakuan. Tabel 5.12 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 5.21.



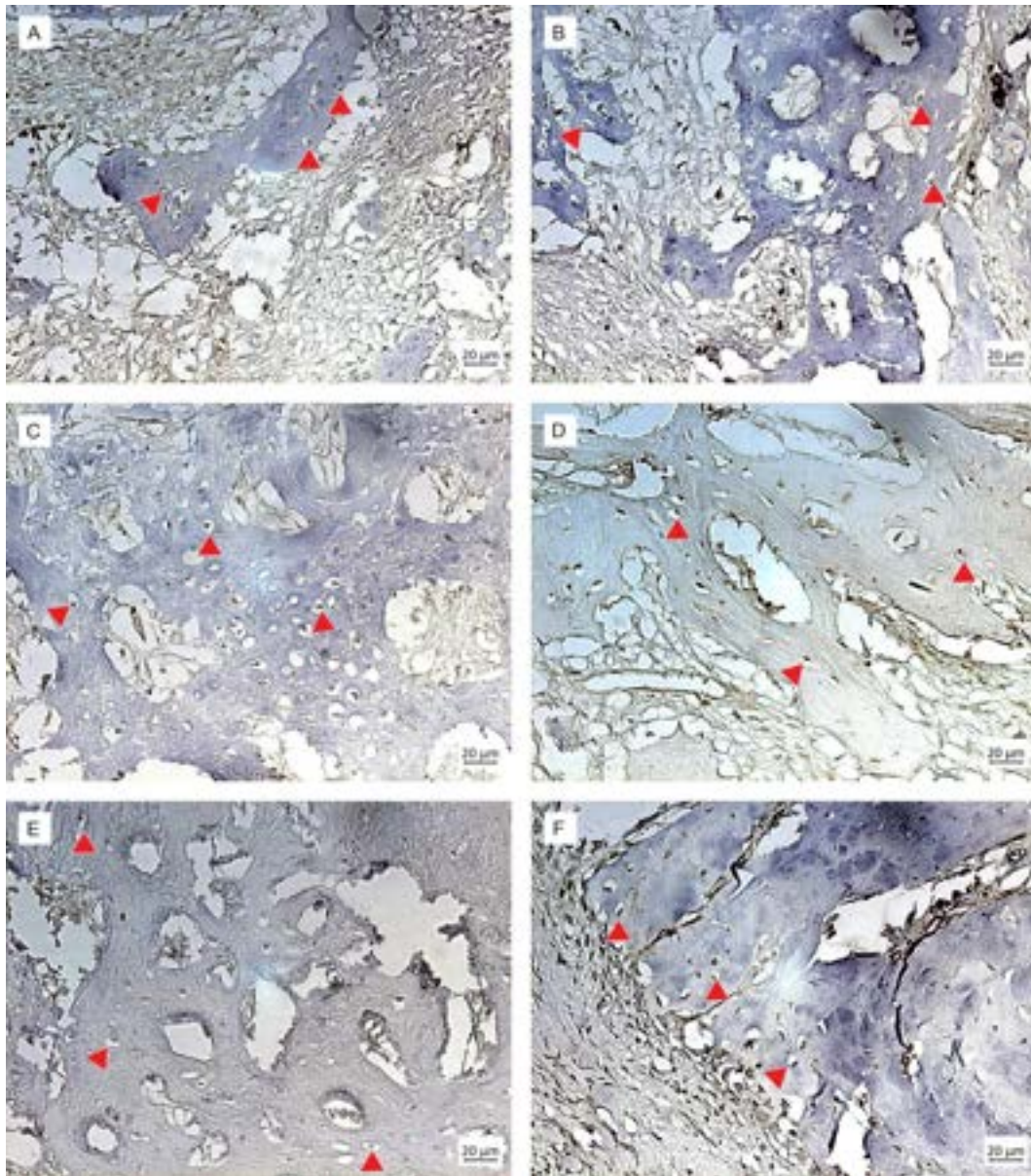
Gambar 5.21 Perbandingan rerata ekspresi BMP-2 antar kelompok

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

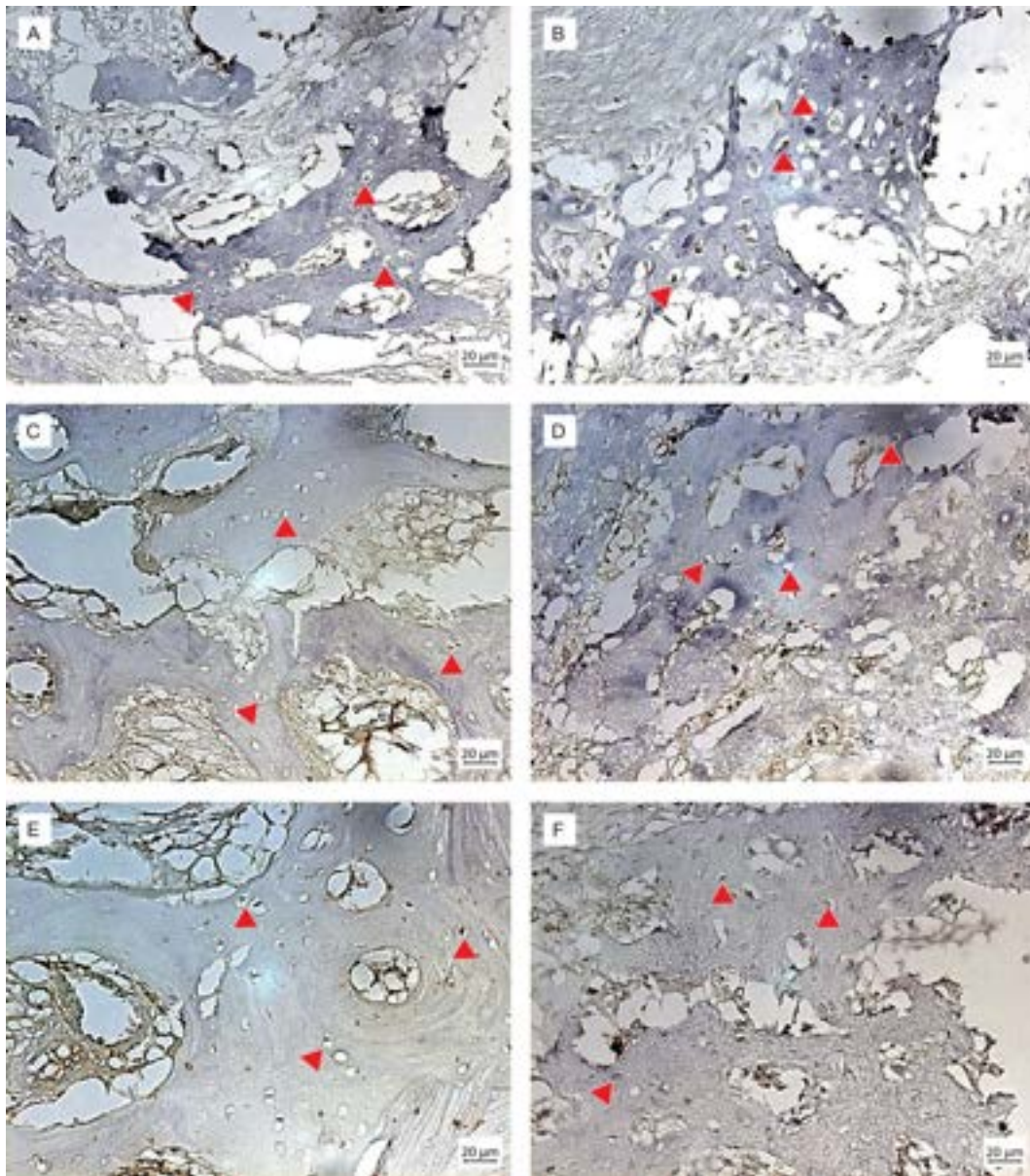
yang berbeda ($p < 0,05$), akan tetapi tidak ada hubungan antara material dengan waktu aplikasi ($p > 0,05$) (tabel 5.11). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan anova dua jalan jalan *post hoc* Tukey. Tabel 5.12, menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Penelitian ini terlihat aplikasi material BAM-HA pada soket tulang alveolar dapat meningkatkan ekspresi BMP-2.

5.2.4 Hasil Analisa Ekspresi RUNX2

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



Gambar 5.22 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 5.23 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 5.13 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						
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	0,167*	0,901**	0,000°	0,000°	0,000°	0,184
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 5.14 Analisis Statistik *Two Way ANOVA Post Hoc Tukey* Ekspresi *RUNX2*

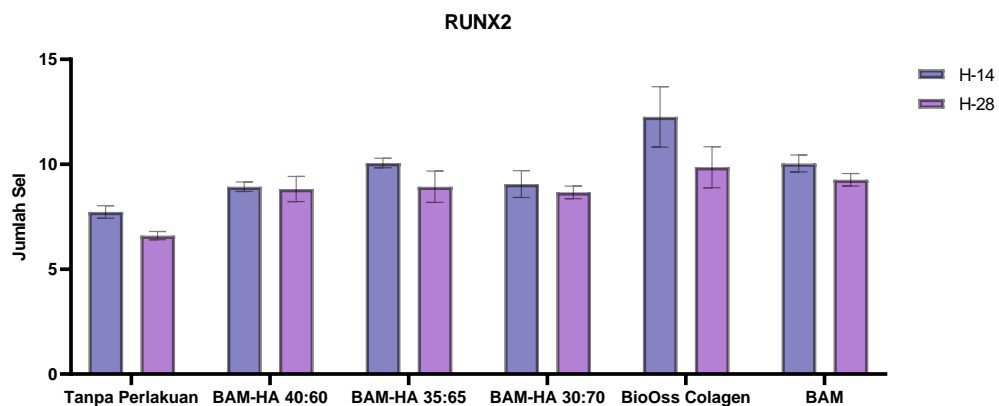
	Tanpa Perlakuan	Bio Oss Collagen	BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	BAM-HA 40:60	BAM
Tanpa Perlakuan	-	0.000*	0.002*	0.000*	0.011*	0.000*
Bio Oss Collagen	-	-	0.000*	0.004*	0.000*	0.031*
BAM-HA 30:70	-	-	-	0.545	0.964	0.137
BAM-HA 35:65	-	-	-	-	0.164	0,944
BAM-HA 40:60	-	-	-	-	-	0.025*
BAM	-	-	-	-	-	-

Ket : p<0.05= ada perbedaan bermakna

Gambar 5.22 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 di hari ke-14. Ekspresi *RUNX2* ditandai dengan adanya sel osteosit pada permukaan tulang alveolar. Gambaran ekspresi *RUNX2* terendah terdapat kelompok tanpa perlakuan (Gambar 5.22A) apabila dibandingkan dengan kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss Collagen dan BAM (Gambar 5.22 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 5.14).

Gambar 5.23 (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 di 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 5.14). Presentasi antar kelompok hari ke-14 dan hari ke-28 dapat terlihat dari gambaran diagram batang (Gambar 5.24).



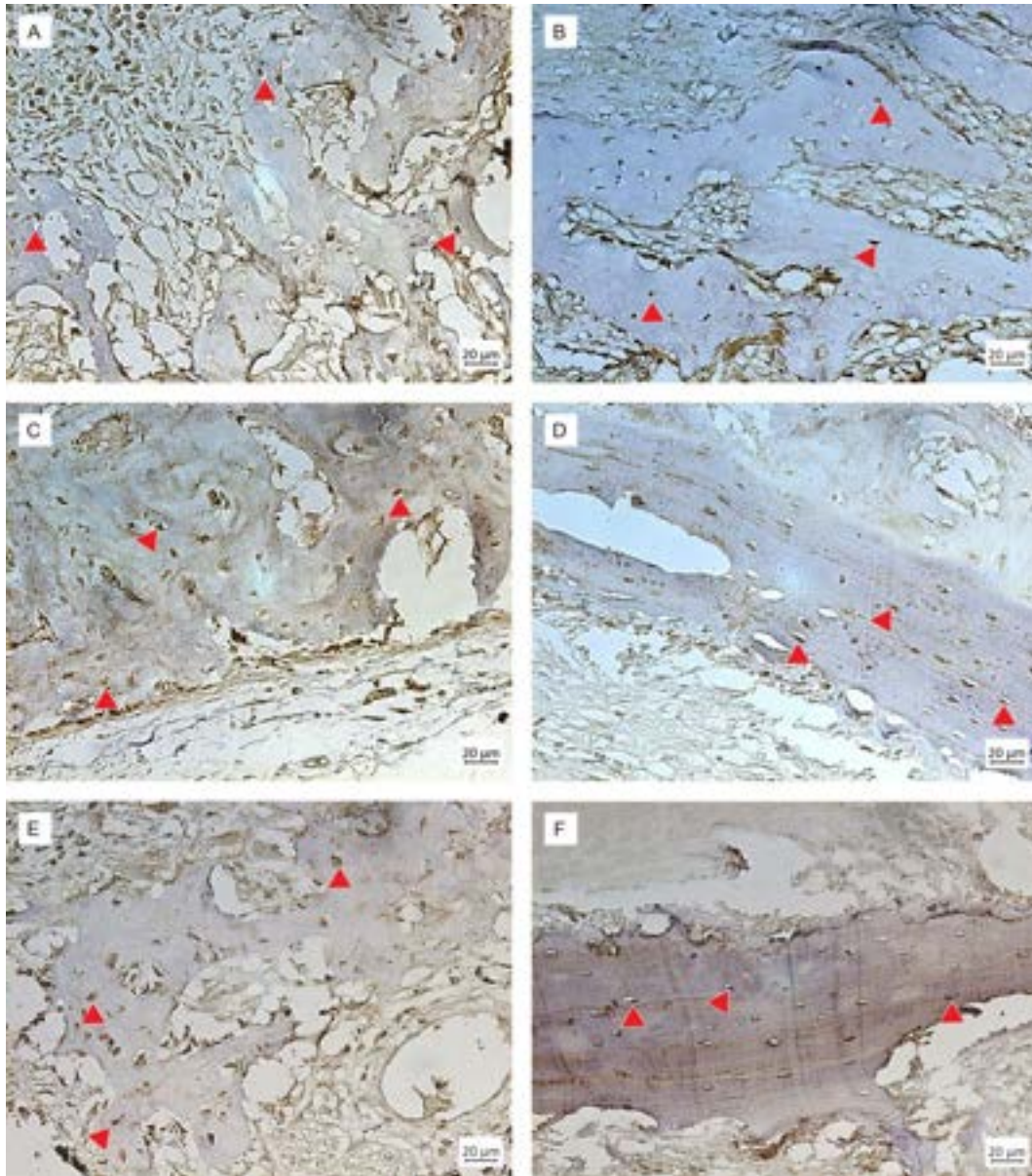
Gambar 5.24 Perbandingan rerata ekspresi RUNX2 antar kelompok

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

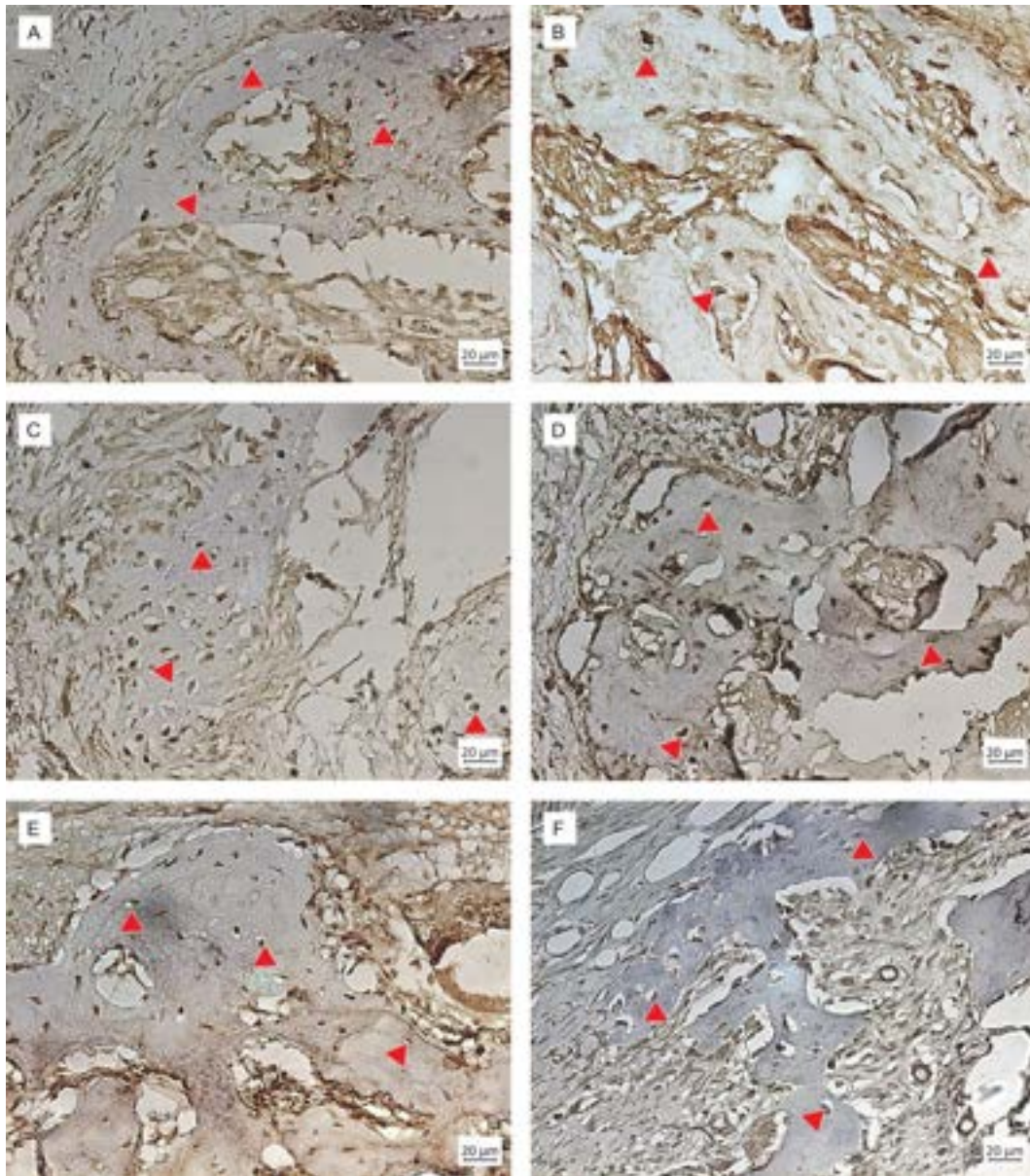
hubungan antara material dengan waktu aplikasi ($p>0,05$) (table 5.12). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan anova dua jalan jalan *post hoc* Tukey. Tabel 5.13, menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok tanpa perlakuan dengan kelompok perlakuan ($p<0.05$). Penelitian ini terlihat aplikasi material BAM-HA pada soket tulang alveolar dapat meningkatkan ekspresi RUNX-2.

5.2.5 Hasil Ekspresi *Osteocalcin*

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



Gambar 5.25 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 5.26 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 5.15 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						
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	0,461*	0,913**	0,000°	0,000°	0,000°	0,997
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

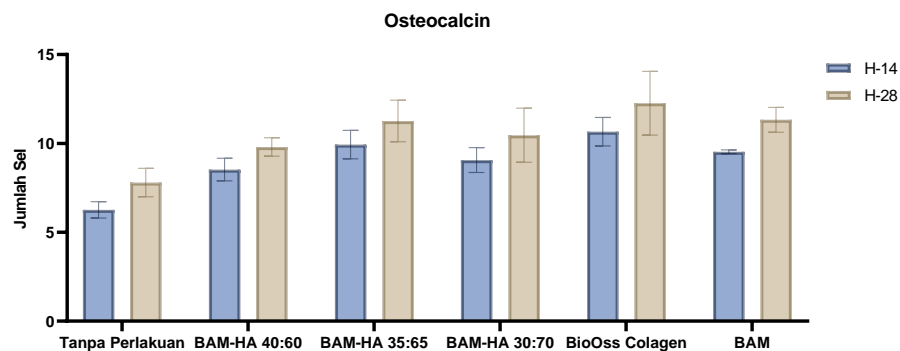
° p < 0,05 = ada perbedaan bermakna

Tabel 5.16 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 5.25 dan 5.26 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 5.25A) apabila dibandingkan dengan kelompok BAM-HA 40:60, BAM-HA 35:65, BAM-HA 30:70, Bio-Oss Collagen dan BAM (Gambar 5.25 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 5.16). Ekspresi *Osteocalcin* terlihat meningkat pada hari ke-28. (Gambar 5.26 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 ($7,80 \pm 0,80$), ($9,80 \pm 0,52$), ($11,26 \pm 1,17$), ($10,46 \pm 1,52$), ($12,26 \pm 1,79$) dan ($11,33 \pm 0,70$). Perbandingan rerata antar kelompok dapat terlihat pada diagram batang gambar 5.27.



Gambar 5.27 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 5.15). Analisa statistika pada penelitian ini menggunakan anova dua jalan jalan *post hoc* Tukey. Tabel 5.16, 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*.

BAB 6

PEMBAHASAN

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 sebagai berikut pembuatan fasa sol, gelasi sol dan penghilangan fasa cair (Liza *et al.*, 2018; Ramesh *et al.*, 2017). NaCl digunakan dalam penelitian ini adalah 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 untuk 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 inorganik 30:70 (Neel *et al.*, 2016). Komposisi tulang alveolar mendekati sementum memiliki komposisi komponen organik dan inorganik 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).

Penelitian ini dilaksanakan dalam dua tahap. Tahap pertama dilakukan analisa karakterisasi varian rasio BAM-HA dan pada tahap dua aplikasi pada hewan coba. Pada tahap pertama, BAM dengan metode pembuatan sol dan gel sebagai kontrol negatif dan Bio-Oss Collagen sebagai kontrol positif. Varian BAM-HA berbagai rasio dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif dengan uji karakteristik FTIR, SEM, EDS, *Swelling* dan Persentase Porositas. Penelitian tahap kedua, aplikasi material biokomposit BAM-HA pada soket tulang alveolar hewan

coba tikus *Sprague Dawley*. Aplikasi material ini terdiri dari 6 kelompok yaitu kelompok BAM-HA dengan rasio (30:70, 35:65 dan 40:60) dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan, BAM dan Bio-Oss Collagen.

6.1 Analisa Hasil Penelitian Tahap Pertama

6.1.1 Analisa *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR)

Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) adalah teknik analisis untuk mengidentifikasi gugus fungsional, senyawa organik, senyawa anorganik, dan molekul kompleks suatu bahan. Pada prosedur analisis FTIR, sampel akan memiliki radiasi inframerah (IR). Radiasi IR kemudian berdampak pada getaran atom molekuler dalam sampel, mengakibatkan penyerapan energi tertentu. Ini membuat FTIR berguna untuk menentukan getaran molekul spesifik yang terkandung dalam sampel (Nandiyanto *et al.* 2019).

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 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6). 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 PO_4^{3-} dan CO_3^{2-} (Gambar 5.3, 5.4, 5.5, 5.6). Gugus fungsi PO_4^{3-} dan CO_3^{2-} 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 PO_4^{3-} dan CO_3^{2-} (gambar 5.4). 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 6.1.

Tabel 6.1 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	Amida II	1480-1575 cm ⁻¹
Peregangan C-N		
Pembengkokan N-H	Amida III	1200-1300 cm ⁻¹
Peregangan C-N		
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).

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 BioOss 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* BioOss-Collagen. BAM-HA 30:70 menunjukkan gambaran spektrum yang sama dengan BioOss-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 1633cm^{-1} (Boskey & Villarreal-Ramirez, 2017). Hasil ini menunjukkan bahwa, dengan meningkatnya kandungan BAM pada bikomposit, 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 mempengaruhi *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).

6.1.2 Analisa *Scanning Electron Microscope* (SEM)

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 5.7, 5.8, 5.9, 5.10, 5.11) 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 mikrograf 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 pelekatan 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).

6.1.3 Analisa *Energy Dispersive X-ray (EDS)*

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 dan 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 (Antoniac *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 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).

6.1.4 Analisa Persentase porositas

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 hidrolis 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).

6.1.5 Analisa Kemampuan *Swelling*

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%), 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), bahwa 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.

6.2 Analisa Hasil Penelitian Tahap Kedua

6.2.1 Analisa Ketebalan Kolagen

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 $(3,13 \pm 0,23)$. 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 $(2,60 \pm 0,20)$. 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, 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 mempengaruhi 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 bermakan secara statistik ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok aplikasi BAM-HA (60:40, 35:65 dan 30:70). Kandungan HA yang lebih tinggi pada pada Bio-Oss Collagen akan mesntimulasi fibroblas dan osteoblas lebih cepat. Fibroblas yang terstimulsai lebih cepat akan menstimulasi kolagen lebih cepat. Hal ini yang menyebabkan pembentukan kolagen lebih tinggi pada kelompok Bio-Oss Collagen (Ardhiyanto, 2012).

6.2.2 Analisa Proliferasi Sel Osteoblas

Osteoblas adalah sel yang penting dalam ppenyembuhan 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 mempengaruhi 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). Fibronectin yang terkandung pada BAM dapat berinteraksi dengan HA dan mengaktifkan jalur ERK (Xu *et al.*, 2020). Jalur persinyalan ERK dapat distimulasi juga dengan adanya interaksi HA dengan *fibroblast growth factor receptor* (FGFr). FGFr akan mengikat ligan berperan untuk mengaktifasi *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 5.1). Kalsium dan fosfat merupakan unsur pembentuk tulang alveolar, semakin tingginya unsur ini akan semakin meningkatkan proliferasi sel osteoblas (Gheisari *et al.*, 2015). Penelitian yang dilakukan oleh Fan *et al.* (2021), 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).

6.2.3 Analisa 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 ini menunjukkan bahwa pada kelompok perlakuan Bio-Oss Collagen menunjukkan rerata ekspresi BMP-2 yang tertinggi diantara kelompok-kelompok lain baik di 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 memstimulasi peningkatan ekspresi BMP-2, untuk pembentukan tulang baru (Khotib *et al.*, 2021).

6.2.4 Analisa Ekspresi RUNX2

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 5.13).

Penelitian ini aplikasi BAM-HA (40:60, 35:65 dan 30:70) dibandingkan tanpa perlakuan menunjukkan adanya peningkatan ekspresi RUNX-2 yang berbeda bermakna ($p < 0,05$). Hal ini dapat disebabkan, 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 pinggiran 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 ($p < 0,05$). 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).

6.2.5 Analisa 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 standart 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* ada hari ke-28 terlihat adanya peningkatan pad 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 BioOss-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 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).

6.3 Temuan Baru

1. Biokomposit BAM-HA berpotensi untuk menjadi material preservasi soket tulang alveolar. Hal ini dapat dilihat dari uji karakteristik material dan uji pada hewan coba.
2. Biokomposit BAM-HA memiliki karakteristik berpotensi sebagai *scaffold* yang menunjang pertumbuhan dan perkembangan dari sel tulang sehingga akan mempercepat regenerasi tulang alveolar yang ditunjukkan dengan peningkatan marker dari penyembuhan tulang alveolar yaitu kolagen, osteoblas, BMP2, RUNX2 dan *Osteocalcin*.

BAB 7**KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 Kesimpulan**

1. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60 menunjukkan adanya gugus fungsi dari kolagen yaitu amida I, II, III, A, B. dan HA yaitu PO_4^{3-} dan CO_3^{2-} .
2. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60 menunjukkan struktur material dan bentuk porus yang memenuhi kriteria sebagai *scaffold* untuk preservasi soket adalah BAM-HA 35:65.
3. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60, menunjukkan semakin tinggi unsur HA akan semakin tinggi elemen kalsium, fosfor, magnesium, natrium yang berperan dalam pembentukan tulang.
4. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60, menunjukkan persentase porositas yang memenuhi kriteria sebagai perservasi soket adalah biokomposit BAM-HA 35:65.
5. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60, menunjukkan semakin tinggi kandungan BAM akan semakin tinggi kemampuan *swelling*.
6. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60 menunjukkan peningkatan ketebalan kolagen pada hari ke-14 dan menurun di hari ke-28.
7. Rasio biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60 menunjukkan peningkatan proliferasi sel osteoblas pada hari ke-14, dan menurun di hari ke-28.
8. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60 menunjukkan peningkatan ekspresi BMP-2 pada hari ke-14 dan 28.

9. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60 meningkatkan ekspresi RUNX2 pada hari ke-14 dan menurun di hari ke-28.
10. Biokomposit BAM-HA rasio 30:70, 35:65, 40:60 meningkatkan ekspresi *Osteocalcin* pada hari ke-14 dan ke-28.

7.2 Saran

1. Biokomposit BAM-HA memiliki potensi sebagai material perservasi soket tulang alveolar, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam memodifikasi biokomposit BAM-HA agar memiliki mekanisme regenerasi osteogenesis yang lebih tinggi.
2. Perlu dilakukan uji klinis untuk menunjang peranan biokomposit BAM-HA sebagai material yang dapat digunakan untuk preservasi soket tulang alveolar.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M., & Khairurrijal, K. (2009). Review: Karakterisasi Nanomaterial. *J. Nano Saintek*, 2(1), 1–9.
- Alagl, A. S., & Graves, D. T. (2008). Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *Journal Of Dental Research*, 87(2), 107–118.
- Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, 10, S96–S101. <https://doi.org/10.1007/s005860100282>
- Alcorn, J. F., & Wright, J. R. (2004). Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-independent pathway. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(1 30-1), 129–136. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00427.2002>
- Anjarsari, Dahlan, K., Suptijah, P., & Kemala, T. (2016). Sintesis dan Karakterisasi Biokomposit BCP/Kolagen Sebagai Material Perancah Tulang. *Jphpi*, 19(3), 356–361. <https://doi.org/10.17844/jphpi.2016.19.3.356>
- Annibali, S., Bignozzi, I., La Monaca, G., & Cristalli, M. P. (2012). Usefulness of the aesthetic result as a success criterion for implant therapy: A review. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 14(1), 3–40. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2009.00234.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.02.030>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01705.x>
- 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. *Stomatognatic Jurnal Kedokteran Gigi*, 9(1), 13–15.
- 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. <https://doi.org/10.20473/joints.v9i1.2020.9-16>
- Atieh, M. A., Alsabeeha, N., & Duncan, W. J. (2018). Stability of tapered and parallel-walled dental implants: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 20(4), 634–645. <https://doi.org/10.1111/cid.12623>
- Bal, Z., Kaito, T., Korkusuz, F., & Yoshikawa, H. (2020). Bone regeneration with hydroxyapatite-based biomaterials. *Emergent Materials*, 3(4), 521–544. <https://doi.org/10.1007/s42247-019-00063-3>
- 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).

- <https://doi.org/10.3390/polym12030590>
- Beck, G. R. (2003). Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(2), 234–243. <https://doi.org/10.1002/jcb.10622>
- 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. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0454>
- Boskey, A. L., & Villarreal-Ramirez, E. (2017). Intrinsically Disordered Proteins and Biomineralization. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.08.014.CagY>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33413>
- 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. <https://doi.org/10.22203/eCM.v028a19>
- 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. <https://doi.org/10.18502/kl.v3i6.1116>
- Castro-ceseña, A. B., & Camacho-villegas, T. (2016). Effect of starch on the mechanical and in vitro properties of collagen- hydroxyapatite sponges for applications in dentistry. *Carbohydrate Polymers*, 148, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.056>
- Catauro, M., & Cipriotti, S. V. (2021). Characterization of hybrid materials prepared by sol-gel method for biomedical implementations. A critical review. *Materials*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/ma14071788>
- 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. <https://doi.org/10.5897/IJPS2013.3990>
- 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. <https://doi.org/10.1002/app.45271>
- 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. <https://doi.org/10.1002/cap.10049>
- Cheng, H., Li, C., Jiang, Y., Wang, B., Wang, F., Mao, Z., Xu, H., Wang, L., & Sui, S. (2013). Facile preparation of polly sacharide-based sponges and its potential application in wound dressing. *Journal of Materials Chemistry B*, 1–8. <https://doi.org/10.1039/C7TB03000B>
- 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. <https://doi.org/10.4172/1662-100X.1000106>
- 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. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.207>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3964-1>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.06.012>
- 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. <https://doi.org/10.1159/000501145>
- De Campos Vidal, B., & Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, 42(3), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.010>
- 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. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.92065> effects
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.07.007>
- 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. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-81>
- 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. <https://doi.org/10.20473/joints.v9i2.2020.34-54>

- Faadhila, T., Valentina, M., Munadziroh, 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. https://doi.org/10.4103/japtr.JAPTR_128_20
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.03.005>
- Fauziyah, K. (2016). *Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (Rattus norvegicus) Galur Wistar dan Sprague-Dawley*.
- FDA. (2013). *Geistlich Bio-Oss*. <https://www.accessdata.fda.gov/CDRH510K/K122894.pdf>
- Ferreira, A. M., Gentile, P., Chiono, V., & Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, *8*(9), 3191–3200. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>
- Fickl, S., Zuh, O., Wachtel, H., Stappert, C. F. J., Stein, J. M., & Hürzeler, M. B. (2008). Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. *Journal of Clinical Periodontology*, *35*(10), 906–913. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01305.x>
- 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. <https://doi.org/10.3390/nano10081504>
- Fitriani, D., Cahyati, M., Prasetyaningrum, N., Budhy, T. I., & Munadziroh, E. (2018). Acceleration of wound healing with use of secretory leukocyte protease inhibitor could be seen by osteopontin expression in *Rattus norvegicus* post tooth extraction. *Journal of Physics: Conference Series*, *1073*(3). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1073/3/032033>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simoes, 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. [https://doi.org/10.1016/S0923-2532\(05\)80182-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2532(05)80182-6)
- FMIPA-ITB. (2021). *STANDAR OPERASIONAL PROSEDUR (SOP) JEOL JSM-6510 LA Scanning Electron Microscope* (pp. 1–8).
- Gadgoli, C. H. (2016). Research in Phyto-Constituents for Treatment of Wounds. *Intech*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.12.014>
- Gbadebo, O. S., Lawal, F. B., Sulaiman, A. O., & Ajayi, D. M. (2014). Dental implant as an option for tooth replacement: The awareness of patients at a tertiary hospital in a developing country. *Contemporary Clinical Dentistry*,

- 5(3), 302–306. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.137914>
- Gheisari, H., Karamian, E., & Abdollahi, M. (2015). A novel hydroxyapatite - Hardystonite nanocomposite ceramic. *Ceramics International*, 41(4), 5967–5975. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.01.033>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00613>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2011.02288.x>
- 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. <https://doi.org/10.5037/jomr.2019.10302>
- Gonzalez, A. C. D. O., Andrade, Z. D. A., Costa, T. F., & Medrado, A. R. A. P. (2016). Wound healing - A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(5), 614–620. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164741>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.107>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b12029>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5129-5>
- 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), 28–30. <https://doi.org/10.3390/JDB8030019>
- 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. <https://doi.org/10.12688/f1000research.72982.2>
- Handi, P., Sriwidodo, & Ratnawulan, S. (2017). Review Sistematis : Proses Penyembuhan dan Perawatan Luka. *Farmaka Journal*, 15(2), 251–256. <https://doi.org/10.24198/JF.V15I2.13366>

- Hashemi, M., Shakeri, V., Mosallaei, H., Kholdebarin, M., Bakhtiari, M., Mohamadpour, M., Gholami, S., & Yazdanparast, S. A. (2018). The Role of Signaling Pathway on Osteoprogenitor Cell Behavior and Bone Formation. *Thrita, In Press(In Press)*, 0–4. <https://doi.org/10.5812/thrita.81485>
- 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. <https://doi.org/10.15562/bmj.v9i1.1625>
- Herniyati. (2016). Pengaruh Ekstrak Kopi Robusta Terhadap Ekspresi Osteokalsin Pada Osteoblas Selama Pergerakan Gigi Ortodonti. *Jurnal Teknosains*, 6(1), 31–36. <https://doi.org/10.22146/teknosains.23158>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-1035-y>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34397>
- Holzappel, 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. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>
- 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. <https://doi.org/10.2741/2296>
- Huldani. (2012). Biomarker remodeling tulang. *Bone Remodelling*, 5–8.
- 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. <https://doi.org/10.1039/c6ra25182j>
- Indrawati, D. W., Munadzirroh, 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. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4103/1735-3327.266089>
- 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. <https://doi.org/10.15562/jdmfs.v4i3.996>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.08.012>
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.253187>
- Janvier-Labs. (2021). *Long Evans Rat*. https://www.janvier-labs.com/en/fiche_produit/long-evans_rat/pdf/
- Jeong, J., Kim, J. H., Shim, J. H., Hwang, N. S., & Heo, C. Y. (2019). Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials Research*, 23(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04421>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.0905-7161.2003.clr140617.x>
- Kabiri, M., Emami, S. H., Rafinia, M., & Tahriri, M. (2011). Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications. *Current Applied Physics*, 11(3), 457–461. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.08.031>
- Kaczmarek, B., & Sionkowska, A. (2018). Chitosan/collagen blends with inorganic and organic additive—A review. *Advances in Polymer Technology*, 37(6), 2367–2376. <https://doi.org/10.1002/adv.21912>
- Kalsi, A. S., Kalsi, J. S., & Bassi, S. (2019). Alveolar ridge preservation: why, when and how. *British Dental Journal*, 227(4), 264–274. <https://doi.org/10.1038/s41415-019-0647-2>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0079-5>
- Kartika, A., Siregar, H., & Fuah, A. (2013). Strategi Pengembangan Usaha Ternak Tikus (*Rattus norvegicus*) dan Mencit (*Mus musculus*) di Fakultas Peternakan IPB. *Jurnal Ilmu Produksi Dan Teknologi Hasil Peternakan*, 1(3), 147–154. <https://doi.org/10.29244/jipthp.1.3.147-154>
- 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, BTRIS36138. <https://doi.org/10.4137/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. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31853-0>
- Kawasumi, A., Sagawa, N., & Hayashi, S. (2015). Wound Healing in Mammals and Amphibians : Toward Limb Regeneration in Wound Healing in Mammals and Amphibians : Toward Limb Regeneration in Mammals. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, July. <https://doi.org/10.1007/82>
- Khalid, P., Suman, V. B., Shameema, S., Vinodini, N. A., Shela, R. P., & Chatterjee, P. K. (2014). Analytical methods for nanomaterial characterization. *International Journal of Nano Dimension Analytical Methods for Nanomaterial Characterization*, 5(4), 309–320. <https://doi.org/https://doi.org/10.7508/IJND.2014.04.001>
- Khotib, J., Gani, M. A., Budiadin, 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). <https://doi.org/10.3390/ph14070615>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30168>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2009.00671.x>
- Kim, S. W., Roh, J., & Park, C. S. (2016). Immunohistochemistry for pathologists: Protocols, pitfalls, and tips. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 50(6), 411–418. <https://doi.org/10.4132/jptm.2016.08.08>
- Kim, Y. J., Saiki, C. E. T., Silva, K., Massuda, C. K. M., De Souza Faloni, A. P., Braz-Silva, P. H., Pallos, D., & Sendyk, W. R. (2020). Bone Formation in Grafts with Bio-Oss and Autogenous Bone at Different Proportions in Rabbit Calvaria. *International Journal of Dentistry*, 2020, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2020/2494128>
- 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. [https://doi.org/https://doi.org/10.1076/0271-3683\(200003\)20:3;1-9;FT173](https://doi.org/https://doi.org/10.1076/0271-3683(200003)20:3;1-9;FT173)
- Kołodziejska, B., Kaflak, A., & Kolmas, J. (2020). Biologically Inspired Collagen / Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration — A Review. *Materials*, 13(1748), 1–17. <https://doi.org/doi:10.3390/ma13071748>
- Komori, T. (2022). Whole Aspect of Runx2 Functions in Skeletal Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/ijms23105776>
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(8), 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
- Kurnia, D. L., Ramadhani, A., & Hudyono, R. (2014). Implant Gigi One-Piece vs

- Two-Pieces dalam Praktek Sehari-Hari. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 21(2), 149. <https://doi.org/10.22146/majkedgiind.8750>
- 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. <https://doi.org/10.1039/c3tb21553a>
- León-Mancilla, B. H., Araiza-Téllez, M. A., Flores-Flores, J. O., & Piña-Barba, M. C. (2016). Physico-chemical characterization of collagen scaffolds for tissue engineering. *Journal of Applied Research and Technology*, 14(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.jart.2016.01.001>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2020.121797>
- Liza, Y. M., Yasin, R. C., Maidani, S. S., & Zainul, R. (2018). *Sol Gel : Principle and Technique (a Review)*. <https://doi.org/10.31227/osf.io/2cuh8>
- Long, H., Ma, K., Xiao, Z., & Ren, X. (2017). Preparation and characteristics of gelatin sponges crosslinked by microbial transglutaminase. *PeerJ*, 1–18. <https://doi.org/10.7717/peerj.3665>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.029>
- 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. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070602>
- 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. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-85>
- Machtei, E. E., Mayer, Y., Horwitz, J., & Zigdon-Giladi, H. (2019). Prospective randomized controlled clinical trial to compare hard tissue changes following socket preservation using alloplasts, xenografts vs no grafting: Clinical and histological findings. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 21(1), 14–20. <https://doi.org/10.1111/cid.12707>
- Mahyudin, F. (2018). Graft Tulang dan Material Pengganti Tulang (Kararakteristik dan Strategi Aplikasi Klinis). In D. N. Utomo (Ed.), *Pusat Penerbitan dan Percetakan Universitas Airlangga* (1st ed.). Airlangga University Press.
- Majelis Ulama Indonesia. (2021). *Fatwa tentang Standar Sertifikasi Barang Gunaan Yang Berbahan Hewani I*. 1–10.
- 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. <https://doi.org/10.1155/2016/9825659>
- 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.

- <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1424-6>
- Mancinelli, E., & Capello, V. (2016). Anatomy and Disorders of the Oral Cavity of Rat-like and Squirrel-like Rodents. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice*, 19(3), 871–900. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2016.04.008>
- 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. <https://doi.org/10.22146/majkedgiind.39830>
- 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. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21187>
- 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. <https://doi.org/10.22146/farmaseutik.v15i2.47542>
- Masrukan, Wagiyono, & Aditoyanto. (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. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.06.001>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jbmr.4410>
- Monje, A., Fu, J.-H., Chan, H.-L., Suarez, F., Galindo-Moreno, P., Catena, A., & Wang, H.-L. (2013). Do Implant Length and Width Matter for Short Dental Implants (<10 mm)? A Meta-Analysis of Prospective Studies. *Journal of Periodontology*, 84(12), 1783–1791. <https://doi.org/10.1902/jop.2013.120745>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2020.02.018>
- Mozartha, M. (2015). Hidroksiapatit dan Aplikasinya di Bidang Kedokteran Gigi. *Journal of Visual Languages & Computing*, 11(3), 287–301.
- Munadzirah, 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.
<https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2022.04.001>
- Munadzirah, 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. <https://doi.org/10.2147/CCID.S358897>
- Munadzirah, E., Ulfa, E. U., Labiqah, A., Asmarani, O., & Puspaningsih, N. N. T. (2020). Effect of poly-histidine tag position toward inhibition activity of secretory leukocyte protease inhibitor as candidate for material wound healing. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 12(1), 32–36.
- Murphy, C. M., Haugh, M. G., & Brien, F. J. O. (2010). Biomaterials The effect of mean pore size on cell attachment , proliferation and migration in collagen – glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>
- 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. <https://doi.org/10.30649/denta.v16i1.6>
- 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. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2007.0334>
- 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. <https://doi.org/10.17509/ijost.v4i1.15806>
- 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. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12722>
- 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. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>
- 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. <https://doi.org/10.36410/jcpr.2015.16.2.223>
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., Seifalian, M., & Sciences, I. (2008). Properties Of The Amniotic Membrane For Potential Use In Tissue Engineering. *European Cells and Materials*, 88–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.22203/ecm.v015a07>
- 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. <https://doi.org/10.34172/joddd.2020.028>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- 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. <https://doi.org/10.1002/adma.202004418>
- 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. <https://doi.org/10.1039/C5TB00477B>
- 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. <https://doi.org/10.1111/cid.12507>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.02.003>
- 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.
- Primadina, N., Basori, A., & Perdanakusuma, D. S. (2019). Proses Penyembuhan Luka Ditinjau dari Aspek Mekanisme Seluler dan Molekuler. *Qanun Medika - Medical Journal Faculty of Medicine Muhammadiyah Surabaya*, 3(1), 31–43. <https://doi.org/10.30651/jqm.v3i1.2198>
- 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. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.6.140>
- 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. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102478-2.00001-5>
- 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*. <https://doi.org/10.1186/s11671-017-2122-9>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.3364>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33651>
- Renno, A. C. M., Fávoro-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. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2011.07.002>
- 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>
- Riskesdas. (2018). *Laporan Riskesdas 2018*. [http://www.yankes.kemkes.go.id/assets/downloads/PMK No. 57 Tahun 2013 tentang PTRM.pdf](http://www.yankes.kemkes.go.id/assets/downloads/PMK%20No.%2057%20Tahun%202013%20tentang%20PTRM.pdf)
- Rohanizadeh, R., Swain, M. V., & Mason, R. S. (2008). Gelatin sponges (Gelfoam Ò) as a scaffold for osteoblasts. *J Urnal Material Science*, 1173–1182. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3154-y>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382178-2.00013-4>
- 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. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.0c00881>
- 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. <https://doi.org/10.2334/josnurd.57.319>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.1028>
- 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. <https://doi.org/10.4081/ejh.2018.2841>
- Setijanto, Darmawan; Damayanti, N. A. B. T. (2018). *Pengantar Metodologi Penelitian Kedokteran Gigi*. Airlangga University Press. <https://play.google.com/books/reader?id=UmvIDwAAQBAJ&pg=GBS.PR4>
- Shahmoradi, M., Bertassoni, L. E., Elfallah, H. M., & Swain, M. (2014). *Fundamental Structure and Properties of Enamel, Dentin and Cementum* (Issue February). https://doi.org/10.1007/978-3-642-53980-0_17
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10853-017-1229-9>
- 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. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00055-0>
- 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>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.078>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s40204-016-0053-7>
- Starecki, M., Schwartz, J. A., & Grande, D. A. (2014). Evaluation of Amniotic-Derived Membrane Biomaterial as an Adjunct for Repair of Critical Sized Bone Defects. *Advances in Orthopedic Surgery*, 2014(May), 1–4. <https://doi.org/10.1155/2014/572586>

- 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.pdgi.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).
- Swami, V., Vijayaraghavan, V., & Swami, V. (2016). Current trends to measure implant stability. *Journal of Indian Prosthodontist Society*, 16(2), 124–130. <https://doi.org/10.4103/0972-4052.176539>
- 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. <https://doi.org/10.2174/1568010054022015>
- 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. <https://doi.org/10.20473/j.djmkg.v39.i2.p43-47>
- 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. <https://doi.org/10.1177/0885328217739753>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.181>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.249>
- 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. <https://doi.org/10.1155/2012/270670>
- 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. <https://doi.org/10.1155/2019/8356872>
- Vaidyanathan, L. (2021). Growth factors in wound healing ↓ a review. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 14(3), 1469–1480. <https://doi.org/10.13005/bpj/2249>
- Vieira, A. E., Repeke, C. E., De Barros Ferreira, S., Colavite, P. M., Bigueti, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128021>
- 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. <https://doi.org/10.1002/term.2934>
- 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. <https://doi.org/10.2147/IJN.S216182>
- Wang, X., 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. <https://doi.org/10.15376/biores.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 novergicus wistar strain. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(5), 574–577. <https://doi.org/10.31838/srp.2020.5.76>
- Widiartini, W., Siswati, E., Setiyawati, A., Rohmah, I. M., & Prastyo, E. (2015). Pengembangan Usaha Produksi Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Tersertifikasi dalam Memenuhi Kebutuhan Hewan Laboratorium. *Jurnal Ilmiah*, 2(3), 1–8.
- 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. <https://doi.org/10.1111/cid.12364>
- 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. <https://doi.org/10.2174/1874120701004010071>
- 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. <https://doi.org/10.1039/d0bm00443j>
- 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. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.3390%2Fpolym12030535>
- Yuliati, A., Merlindika, Y., Munadzirroh, 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. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.829.173>
- Yunoki, S., Ikoma, T., & Monkawa, A. (2007). *Three-dimensional porous hydroxyapatite / collagen composite with rubber-like elasticity*. 18(4), 393–409.
- 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. <https://doi.org/10.1093/molehr/7.6.573>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.polyimdegradstab.2012.10.008>
- Zhang, W., Zhang, X., Wang, S., Xu, L., Zhang, M., Wang, G., Jin, Y., Zhang, X., & Jiang, X. (2013). Comparison of the Use of Adipose Tissue–Derived and Bone Marrow–Derived Stem Cells for Rapid Bone Regeneration. *Journal of Dental Research*, 92(12), 1136–1141. <https://doi.org/10.1177/0022034513507581>
- 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 Fabrication and Characterization of Marine Polysaccharides Hemostatic Dressing. *ICAMMT*, 423. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/423/1/012172>

LAMPIRAN

Lampiran 1. Keaslian Penelitian

Peneliti, tahun, Sumber Pustaka	Judul penelitian	Metode Penelitian	Hasil penelitian	Perbedaan dengan Penelitian ini
Dewey, 2020, bioxiv	1) <i>Mineralized collagen scaffolds fabricated with amniotic membran matrix increase osteogenesis under inflammatory conditions</i>	2) Pembuatan perancah amnion-kolagen-mineral Ca ²⁺ dan scaffold kolagen-mineral Ca ²⁺ . Karakteristik material dengan SEM, analisis pori, kekuatan kompresi. Evaluasi dilakukan 28 hari pada viabilitas sel, gen osteogenik, aktivitas protein, kandungan mineral.	3) Perancah amnion-kolagen-mineral Ca ²⁺ dapat menguntungkan untuk perbaikan tulang <i>craniomaxillofacial</i> terutama dengan adanya komplikasi inflamasi	4) Beda material (Kombinasi membran amnion + kolagen)
Yang, 2020, Polymer	5) <i>A Sponge-Like Double-Layer Wound Dressing with Chitosan and Decellularized Bovine Amniotic Membran for Promoting Diabetic Wound Healing Yang</i>	6) dBAM (decellularization <i>bovine amniotic membran</i>) dimodifikasi dengan kitosan dengan agen crosslink PEDGE Karakterisasi (SEM, FTIR, <i>swelling</i>), Invitro coagulation, viabilitas sel, histomorfologi tikus diabetes	7) Tikus diabetes dengan perlakuan bilayer membran menunjukkan penyembuhan luka lebih dari 80%.	8) Beda material (Kombinasi kitosan dan membran amnion)
Walsh, 2019	9) <i>Rapid healing of a critical-sized bone defect using a collagen-hydroxyapatite scaffold to facilitate low dose, combinatorial growth factor delivery</i>	10) Perancah bubuk kolagen: 1.8 g kolagen + 360 ml 0.05M glacial acetic acid (HOAc) di blender pada kecepatan 15,000 rpm selama 90 menit. Perancah bubuk CHA: 1.8 g kolagen + 320 ml 0.5 M HOAc diblender dengan kecepatan	11) Perancah kolagen-hidroksiapatit memiliki sinergi terhadap faktor pertumbuhan osteogenik dan angiogenik untuk mempercepat penyembuhan jaringan tulang	12) Beda material dan metode pembuatan

Peneliti, tahun, Sumber Pustaka	Judul penelitian	Metode Penelitian	Hasil penelitian	Perbedaan dengan Penelitian ini
		<p>15,000 rpm selama 90 menit. 3.6 g (200 wt.%) HA dilarutkan dalam 40 ml 0.5M HOAc dan ditambahkan perlahan pada bubuk kolagen dengan kecepatan 10 ml/jam 15,000 rpm diaduk selama 60 menit.</p> <p>Bubur kemudian <i>freeze drying</i> -10C dan <i>scaffolds cross-linked dehydrothermally</i> pada suhu 105°C selama 24 jam pada vacuum oven</p>		
Jiawen, 2014	13) <i>Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells and Its Application in Alveolar Defect Restoration</i>	<p>14) Kombinasi <i>Human amniotic Epithelial cells</i> (hAEC) dan β-tricalcium phosphate (βTCP) / Hidroksiapatit (HA) untuk penyembuhan defek pada tulang alveolar</p> <p><i>Scaffold</i> β-TCP dengan dimensi (panjang 4 mm; tinggi 3 mm; lebar 3 mm) + hAEC, inkubasi dalam EXP-CM selama 3 hari</p> <p>Proses Diferensiasi osteogenik <i>in vitro</i> hAECs dievaluasi dengan pewarnaan biokimia, real-time polymerase chain reaction, dan immunofluorescence. <i>Scaffold</i> βTCP dengan atau tanpa hAECs</p>	<p>15) Kapasitas osteogenik hAECs secara <i>in vitro</i> dengan regulasi RUNX2, osterix, alkaline phosphatase, collagen I, and osteopontin, dengan positive bio- chemical staining for osteoblas</p> <p>Implantasi <i>scaffolds</i> hAECs dengan penambahan b-TCP, akan meningkatkan regenerasi tulang dan memiliki kompatibilitas imun yang baik dengan host.</p>	16) Menggunakan material yang berbeda dan metode yang berbeda

Peneliti, tahun, Sumber Pustaka	Judul penelitian	Metode Penelitian	Hasil penelitian	Perbedaan dengan Penelitian ini
		diimplantasikan pada defek alveolar tikus.		
Gholami, 2012	17) <i>Clinical, histologic and histomorphometric evaluation of socket preservation using a synthetic nanocrystalline hydroxyapatite in comparison with a bovine xenograft: a randomized clinical trial</i>	18) Nanokristalin hidroksiapatit (NCHA) + <i>deproteinized bovine bone mineral</i> (DBBM), Bio-Oss® dengan membran kolagen.	19) Preservasi soket menggunakan NCHA atau DBBM kombinasi dengan membran kolagen, menghasilkan perubahan lebar ridge horizontal yang serupa dan terbatas setelah pencabutan gigi	20) Material dan metode berbeda
Siswanto, 2013	21) <i>Bovine Freeze Dried Amniotic Membran (FD-AM) Covered Sterile Gauze for Wound Dressing</i>	22) Membuat <i>Freeze dying amnion bovine</i> (FDAB) Pemeriksaan sitotosisitas, SDS-page, histopatologi	23) FDAB bisa digunakan sebagai penyembuhan luka. Menggunakan agent crosslink glutardehyde. Berat molekul protein 7kDa	24) Hanya 1 material FDAM
Anjarsari, 2016	25) <i>Synthesis and Characterization of Biocomposite BCP/Collagen for Bone Material Scaffold</i>	26) BCP/kolagen dikelompokkan menjadi tiga, yaitu 1) BCP/K5 (kolagen 5% dalam perancah), 2) BCP/K10 (kolagen 10% dalam perancah), dan 3) BCP/K15 (kolagen 15% dalam perancah). Sampel dikarakterisasi dengan Fourier Transform Infra Red (FTIR), dan Scanning Electron Microscope (SEM). Secara	27) Sintesis biokomposit BCP/kolagen tidak memengaruhi spektrum gugus fungsi, namun memengaruhi pembentukan pori pada material perancah tulang. Kata	28) Kombinasi material yang digunakan berbeda

Peneliti, tahun, Sumber Pustaka	Judul penelitian	Metode Penelitian	Hasil penelitian	Perbedaan dengan Penelitian ini
Hiratsuka, 2018	29) <i>Enhanced bone formation onto the bone surface using a hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite</i>	30) -Perendaman sampel secara invitro untuk melihat pH dan degradasi material Uji coba pada hewan coba selama 3, 5, dan 7 hari. Dilihat dengan microCT untuk melihat pembentukan tulang baru	31) HAp / Col dapat meningkatkan pembentukan tulang ke permukaan tulang melalui induksi sel multinuklear positif-TRAP, dan mungkin memiliki aplikasi klinis.	32) Beda kombinasi material
Chen, 2017	33) <i>Biomimetic porous collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering</i>	34) Observasi struktur biomimetik dan komponen, meningkatkan proliferasi sel secara signifikan, aktivitas alkaline phosphatase, dan diferensiasi osteogenik secara invitro.	35) Perancah kolagen/ HA strategi yang menjanjikan untuk rekayasa jaringan tulang	36) Beda kombinasi material
Brasinika, 2016	37) <i>Bioinspired synthesis of hydroxyapatite nanocrystals in the presence of collagen and L-arginine: Candidates for bone regeneration</i>	38) Kombinasi (Ca^{2+} : Arg = 1:1) dengan penambahan nanokristal HAp dengan perbandingan rasio berat 70/30.	39) Respon sel dengan perlekatan MSC (<i>scanning electron microscopy</i>) dan viabilitas / proliferasi (Alamar Blue) menunjukkan efek non-sitotoksik dari material baru.	40) Beda kombinasi material

Lampiran 2. Laik Etik Fakultas kedokteran Gigi Universitas Airlangga



Lampiran 3. Laik Etik LPPM IPB

 Ministry of Research, Technology and Higher Education Indonesia
Animal Care and Use Committee
BOGOR AGRICULTURAL UNIVERSITY
Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga, Bogor, 16680, Indonesia
Telp/Fax: 0251-8425503

ETHICAL APPROVAL LETTER

Title: **Bovine Amniotic Membrane Hydroxypatite Biocomposite Regeneration Mechanism On Alveolar Bone Socket Preservation (A Study on Experimental Animal Models of *Rattus norvegicus*)**

Researcher: **Octarina**

Material Reviewed:

1. Application Form ACUC Bogor Agricultural University
2. Research Protocol
3. Respon letter to ACUC

Consideration:

1. Species and Relevance of animal model
2. Justification of animal number
3. Research Procedure to animal model

Based on the items considered our opinion on this research procedure is fully followed the ethical requirement and has been done with highly intention on animal welfare of the involved animal.

Therefore, we decided to send out the *Ethical Approval* on this research.

ACUC No: 232 - 2022 IPB (IPB University)

Bogor, 12 April 2022

Head of Committee



Prof. Dr. drh. Ekowati Handharyani M.Si

Note: The ethical approval could be withdraw when the procedure of the research is not follow what has been in the protocol.

Lampiran 4. 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

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

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
--------	---------

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
--------	--------

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

Lampiran 5. Hasil pengujian Persentase Porositas

	Sampel	p (cm)	l (cm)	t (cm)	W0 (g)	W1 (g)	ρ (g/cm ³)	% Porosity
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

	Sampel	p (cm)	l (cm)	t (cm)	W0 (g)	W1 (g)	ρ (g/cm ³)	% 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

	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

	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
	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

	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

Lampiran 6. Hasil Pengujian Swelling**Kontrol**

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

Rasio 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

Rasio 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

Rasio 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

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

Lampiran 7. Pembuatan Biokomposit BAM-HA



Gambar 1 Proses Pembuatan BAM-HA (a) Persiapan BAM-HA, (b) Proses pemotongan BAM, (c) Hasil pemotongan BAM, (d) Perendaman BAM dengan NaCl 0,9%, (e) proses penghalusan dengan blender, (f) BAM-HA yang sudah homogen (g) biokomposit BAM-HA yang siap di *freeze* dan *freeze drying*.



Gambar 2 Preparasi specimen untuk sterilisasi sinar gamma 25kgy

Lampiran 8. Persiapan Spesimen untuk Pengujian

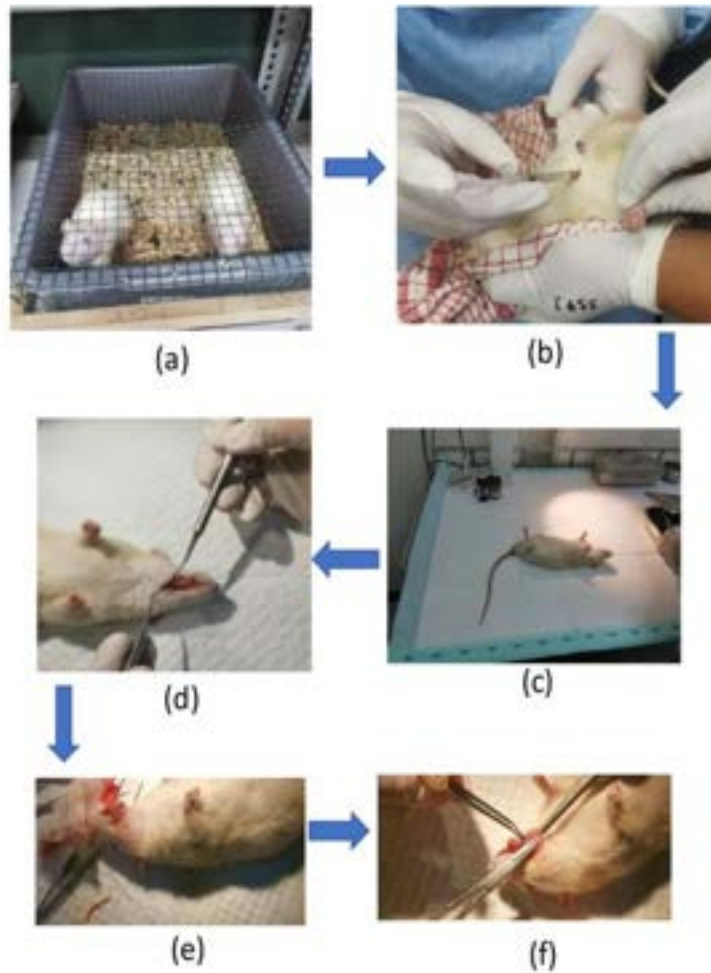


Gambar 1. Preparasi sampel biokomposit BAM-HA dengan ukuran 1x1 cm untuk uji karakterisasi

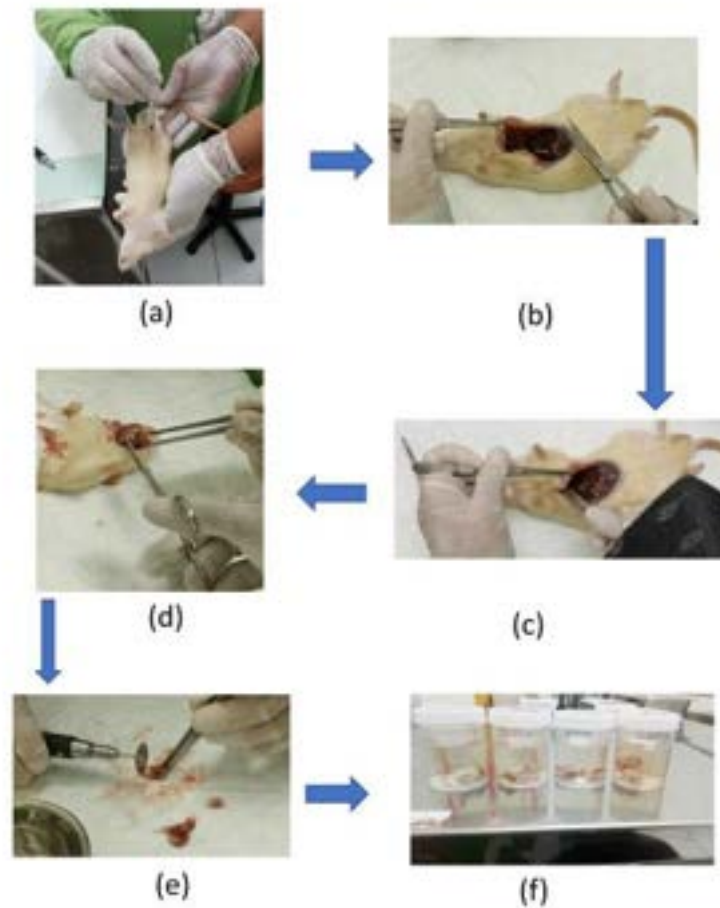


Gambar 2. Preparasi sampel dengan ukuran 3x10 mm untuk aplikasi pada soket tulang alveolar setelah pencabutan hewan coba tikus *Sprague Dawley*

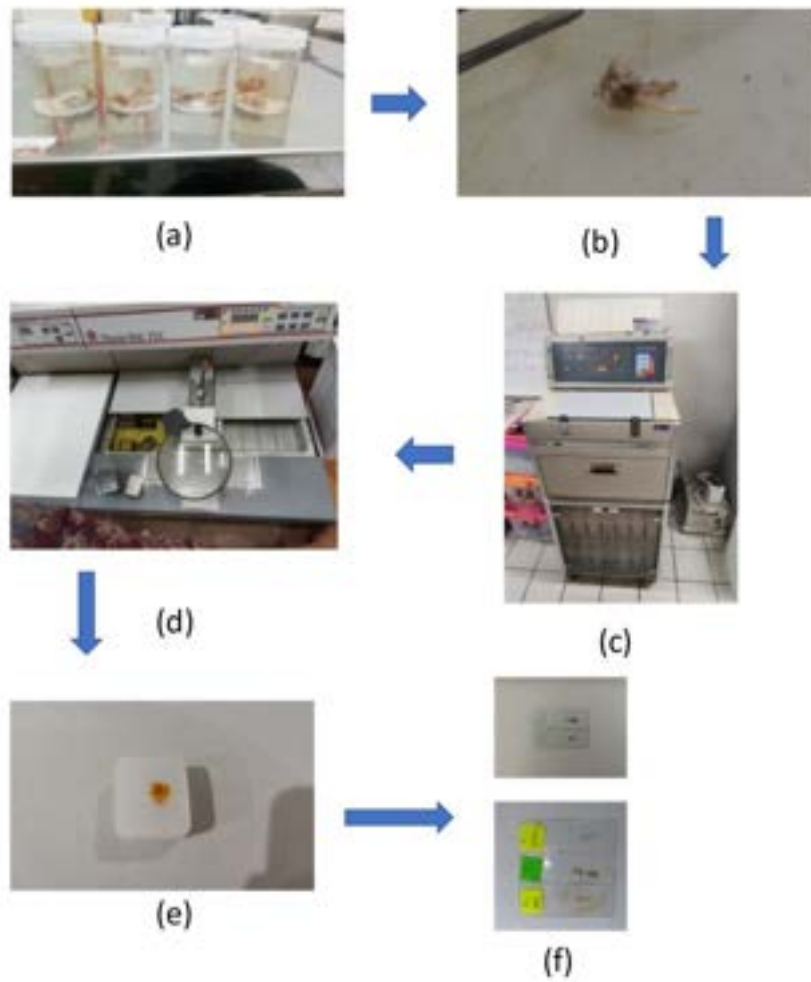
Lampiran 9. Aplikasi Material Pada Hewan Coba dan Pembuatan Preparat



Gambar 1 Aplikasi pada Hewan Coba (a) Hewan coba diletakan di dalam kandang untuk adaptasi, (b) Anestesi Intra peritoneal, (c) Hewan coba terbius total dan siap untuk pencabutan dan aplikasi material, (d) Pembukaan dan penghilangan ligamen periodontal gigi I1 bawah kanan, (e) Tikus yang sudah dicabut gigi I1 bawah kanan dan di aplikasikan material, (f) Penjahitan soket gigi



Gambar .2 Pengambilan Jaringan Tikus pada hari ke 14 dan 28. (a) Anestesi Intraperitoneal, (b) Pembukaan abdomen tikus, (c) Pemotongan arteri jantung untuk euthanasia tikus, (d) Pemotongan tulang rahang bawah, (e) Bagian soket tulang alveolar gigi I1 kanan rahang bawah di preparasi untuk pembuatan preparat, (f) Penyimpanan sampel dalam formalin 10%



Gambar 3 Proses pembuatan preparat (a) Fiksasi jaringan, (b) dekalsifikasi, (c) dehidrasi, *clearing*, impregmasi dalam *chamber*, (d) *embedding*, (e) blok paraffin, (f) preparat histologi dan imunohistokimia

Lampiran 10. Hasil Uji Analisa Statistika

HASIL DATA UJI SPSS PERSENTASE SWELLING

Case Processing Summary

Kelompok	Cases						
	Valid		Missing		Total		Percent
	N	Percent	N	Percent	N	Percent	
Uji Swelling BAM-HA 30:70	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%	
BAM-HA 35:65	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%	
BAM-HA 40:60	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%	
Kontrol	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%	
Bio-Oss	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%	
Collagen							

Descriptives

Kelompok	Statistic	Std. Error	
Uji Swelling BAM-HA 30:70	Mean	320,5300	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	313,9736
		Upper Bound	327,0864
		5% Trimmed Mean	320,2000
	Median	320,1000	
	Variance	84,002	
	Std. Deviation	9,16528	
	Minimum	311,20	
	Maximum	335,80	
	Range	24,60	
	Interquartile Range	16,20	
	Skewness	,689	,687
	Kurtosis	-,699	1,334
	BAM-HA 35:65	Mean	514,6700
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	500,1129
		Upper Bound	529,2271
		5% Trimmed Mean	515,0222
Median		514,2500	
Variance		414,098	

	Std. Deviation		20,34940	
	Minimum		476,20	
	Maximum		546,80	
	Range		70,60	
	Interquartile Range		24,28	
	Skewness		-,198	,687
	Kurtosis		,372	1,334
BAM-HA 40:60	Mean		608,7500	10,00341
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	586,1207	
		Upper Bound	631,3793	
	5% Trimmed Mean		608,0667	
	Median		604,1500	
	Variance		1000,683	
	Std. Deviation		31,63357	
	Minimum		570,70	
	Maximum		659,10	
	Range		88,40	
	Interquartile Range		62,88	
	Skewness		,438	,687
	Kurtosis		-1,293	1,334
Kontrol	Mean		1127,0000	25,67351
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1068,9225	
		Upper Bound	1185,0775	
	5% Trimmed Mean		1128,2889	
	Median		1128,7500	
	Variance		6591,293	
	Std. Deviation		81,18678	
	Minimum		978,80	
	Maximum		1252,00	
	Range		273,20	
	Interquartile Range		105,88	
	Skewness		-,286	,687
	Kurtosis		,161	1,334
	Mean		138,6900	,41405

Bio-Oss Collagen	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	137,7534	
		Upper Bound	139,6266	
	5% Trimmed Mean		138,6667	
	Median		138,7500	
	Variance		1,714	
	Std. Deviation		1,30933	
	Minimum		137,00	
	Maximum		140,80	
	Range		3,80	
	Interquartile Range		2,63	
	Skewness		,224	,687
	Kurtosis		-1,292	1,334

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Uji Swelling	BAM-HA 30:70	,169	10	,200*	,878	10	,124
	BAM-HA 35:65	,159	10	,200*	,959	10	,776
	BAM-HA 40:60	,170	10	,200*	,915	10	,320
	Kontrol	,134	10	,200*	,973	10	,918
	Bio-Oss Collagen	,152	10	,200*	,939	10	,537

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

Uji Swelling

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,719	4	45	,000

ANOVA

Uji Swelling

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5591353,825	4	1397838,456	863,739	,000
Within Groups	72826,116	45	1618,358		
Total	5664179,941	49			

Robust Tests of Equality of Means

Uji Swelling

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	2435,841	4	18,231	,000

a. Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: Uji Swelling

Games-Howell

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BAM-HA 30:70	BAM-HA 35:65	-194,14000*	7,05762	,000	-216,4910	-171,7890
	BAM-HA 40:60	-288,22000*	10,41482	,000	-322,1828	-254,2572
	Kontrol	-806,47000*	25,83659	,000	-892,8838	-720,0562
	Bio-Oss Collagen	181,84000*	2,92774	,000	172,0780	191,6020
BAM-HA 35:65	BAM-HA 30:70	194,14000*	7,05762	,000	171,7890	216,4910

	BAM-HA 40:60	-94,08000*	11,8944 6	,000	-130,7008	-57,4592
	Kontrol	-612,33000*	26,4677 0	,000	-699,2280	-525,4320
	Bio-Oss Collagen	375,98000*	6,44835	,000	354,3353	397,6247
BAM-HA 40:60	BAM-HA 30:70	288,22000*	10,4148 2	,000	254,2572	322,1828
	BAM-HA 35:65	94,08000*	11,8944 6	,000	57,4592	130,7008
	Kontrol	-518,25000*	27,5535 4	,000	-606,4703	-430,0297
	Bio-Oss Collagen	470,06000*	10,0119 8	,000	436,4187	503,7013
Kontrol	BAM-HA 30:70	806,47000*	25,8365 9	,000	720,0562	892,8838
	BAM-HA 35:65	612,33000*	26,4677 0	,000	525,4320	699,2280
	BAM-HA 40:60	518,25000*	27,5535 4	,000	430,0297	606,4703
	Bio-Oss Collagen	988,31000*	25,6768 5	,000	901,9792	1074,6408
Bio-Oss Collagen	BAM-HA 30:70	-181,84000*	2,92774	,000	-191,6020	-172,0780
	BAM-HA 35:65	-375,98000*	6,44835	,000	-397,6247	-354,3353
	BAM-HA 40:60	-470,06000*	10,0119 8	,000	-503,7013	-436,4187
	Kontrol	-988,31000*	25,6768 5	,000	-1074,6408	-901,9792

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

HASIL DATA UJI SPSS PERSENTASE POROSITAS
Case Processing Summary

	Kelompok	Valid		Cases Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
Uji Porositas	BAM	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	BAM-HA 30:70	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	BAM-HA 35:65	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	BAM-HA 40:60	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	Bio-Oss	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	Colagen						

Descriptives

	Kelompok	Statistic	Std. Error		
Uji Porositas	BAM	Mean	103,2075	1,20544	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	100,4806	
			Upper Bound	105,9344	
		5% Trimmed Mean	103,2054		
		Median	103,3418		
		Variance	14,531		
		Std. Deviation	3,81194		
		Minimum	97,79		
		Maximum	108,66		
		Range	10,87		
		Interquartile Range	6,52		
		Skewness	,139	,687	
		Kurtosis	-1,083	1,334	
		Uji Porositas	BAM-HA 30:70	Mean	76,8932
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			72,4945	
	Upper Bound			81,2920	
5% Trimmed Mean	76,7405				
Median	78,0307				
Variance	37,811				
Std. Deviation	6,14907				

	Minimum		68,19	
	Maximum		88,35	
	Range		20,16	
	Interquartile Range		9,89	
	Skewness		,281	,687
	Kurtosis		-,164	1,334
BAM-HA 35:65	Mean		89,2315	2,37693
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	83,8545	
		Upper Bound	94,6085	
	5% Trimmed Mean		89,1250	
	Median		88,0219	
	Variance		56,498	
	Std. Deviation		7,51652	
	Minimum		80,34	
	Maximum		100,04	
	Range		19,70	
	Interquartile Range		16,24	
	Skewness		,149	,687
	Kurtosis		-1,476	1,334
BAM-HA 40:60	Mean		103,2488	3,00426
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	96,4527	
		Upper Bound	110,0449	
	5% Trimmed Mean		103,2057	
	Median		105,0004	
	Variance		90,256	
	Std. Deviation		9,50030	
	Minimum		90,46	
	Maximum		116,82	
	Range		26,36	
	Interquartile Range		17,68	
	Skewness		-,097	,687
	Kurtosis		-1,494	1,334
Bio-Oss Colagen	Mean		69,2145	,51963
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	68,0390	

	Upper Bound	70,3900	
	5% Trimmed Mean	69,1854	
	Median	69,1829	
	Variance	2,700	
	Std. Deviation	1,64322	
	Minimum	67,12	
	Maximum	71,83	
	Range	4,71	
	Interquartile Range	3,06	
	Skewness	,248	,687
	Kurtosis	-1,468	1,334

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Uji Porositas	BAM	,124	10	,200 [*]	,945	10	,608
	BAM-HA 30:70	,142	10	,200 [*]	,962	10	,812
	BAM-HA 35:65	,174	10	,200 [*]	,904	10	,242
	BAM-HA 40:60	,194	10	,200 [*]	,930	10	,444
	Bio-Oss Colagen	,208	10	,200 [*]	,924	10	,389

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Test of Homogeneity of Variances

Uji Porositas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,232	4	45	,000

ANOVA

Uji Porositas

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9409,199	4	2352,300	58,284	,000
Within Groups	1816,163	45	40,359		
Total	11225,363	49			

Robust Tests of Equality of Means

Uji Porositas

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Welch	180,358	4	20,083	,000

a. Asymptotically F distributed.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Uji Porositas

Games-Howell

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
BAM	BAM-HA 30:70	26,31420*	2,28784	,000	19,2512	33,3773
	BAM-HA 35:65	13,97591*	2,66513	,001	5,6158	22,3361
	BAM-HA 40:60	-,04136	3,23708	1,000	-10,3837	10,3010
	Bio-Oss Colagen	33,99296*	1,31267	,000	29,8216	38,1643
BAM-HA 30:70	BAM	-26,31420*	2,28784	,000	-33,3773	-19,2512
	BAM-HA 35:65	-12,33829*	3,07098	,007	-21,6625	-3,0140
	BAM-HA 40:60	-26,35556*	3,57864	,000	-37,3687	-15,3425
	Bio-Oss Colagen	7,67876*	2,01274	,021	1,0892	14,2683
BAM-HA 35:65	BAM	-13,97591*	2,66513	,001	-22,3361	-5,6158
	BAM-HA 30:70	12,33829*	3,07098	,007	3,0140	21,6625
	BAM-HA 40:60	-14,01727*	3,83084	,014	-25,6653	-2,3692
	Bio-Oss Colagen	20,01704*	2,43307	,000	11,9874	28,0467
BAM-HA 40:60	BAM	,04136	3,23708	1,000	-10,3010	10,3837
	BAM-HA 30:70	26,35556*	3,57864	,000	15,3425	37,3687
	BAM-HA 35:65	14,01727*	3,83084	,014	2,3692	25,6653
	Bio-Oss Colagen	34,03432*	3,04887	,000	23,9060	44,1627
Bio-Oss Colagen	BAM	-33,99296*	1,31267	,000	-38,1643	-29,8216
	BAM-HA 30:70	-7,67876*	2,01274	,021	-14,2683	-1,0892
	BAM-HA 35:65	-20,01704*	2,43307	,000	-28,0467	-11,9874
	BAM-HA 40:60	-34,03432*	3,04887	,000	-44,1627	-23,9060

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

HASIL DATA UJI SPSS KETEBALAN KOLAGEN**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Kolagen	.138	36	.079	.958	36	.189

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Kolagen

Aplikasi Bahan	Hari	Mean	Std. Deviation	N
Kontrol Negatif	Hari ke-14	1.9333	.11547	3
	Hari ke-28	2.0667	.23094	3
	Total	2.0000	.17889	6
BAM-HA 40:60	Hari ke-14	2.3333	.11547	3
	Hari ke-28	2.1333	.23094	3
	Total	2.2333	.19664	6
BAM-HA 35:65	Hari ke-14	3.0000	.20000	3
	Hari ke-28	2.5333	.30551	3
	Total	2.7667	.34448	6
BAM-HA 30:70	Hari ke-14	2.6000	.34641	3
	Hari ke-28	2.4000	.20000	3
	Total	2.5000	.27568	6
Bio-Oss Collagen	Hari ke-14	3.4333	.40415	3
	Hari ke-28	2.7333	.23094	3
	Total	3.0833	.48339	6
BAM	Hari ke-14	3.1333	.23094	3
	Hari ke-28	2.6000	.20000	3
	Total	2.8667	.35024	6
Total	Hari ke-14	2.7389	.56479	18
	Hari ke-28	2.4111	.31788	18
	Total	2.5750	.48129	36

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kolagen	Based on Mean	1.038	11	24	.446
	Based on Median	.222	11	24	.994
	Based on Median and with adjusted df	.222	11	15.698	.992
	Based on trimmed mean	.942	11	24	.520

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Kolagen

b. Design: Intercept + Bahan + Hari + Bahan * Hari

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Kolagen

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.634 ^a	11	.603	9.824	.000
Intercept	238.703	1	238.703	3888.367	.000
Bahan	4.999	5	1.000	16.287	.000
Hari	.967	1	.967	15.751	.001
Bahan * Hari	.668	5	.134	2.176	.091
Error	1.473	24	.061		
Total	246.810	36			
Corrected Total	8.107	35			

a. R Squared = .818 (Adjusted R Squared = .735)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Kolagen

Tukey HSD

(I) Aplikasi	(J) Aplikasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Bahan	BAM-HA 40:60	-.2333	.14305	.587	-.6756	.2090
	BAM-HA 35:65	-.7667*	.14305	.000	-1.2090	-.3244
	BAM-HA 30:70	-.5000*	.14305	.020	-.9423	-.0577
	Bio-Oss Collagen	-1.0833*	.14305	.000	-1.5256	-.6410
	BAM	-.8667*	.14305	.000	-1.3090	-.4244

BAM-HA 40:60	Kontrol Negatif	.2333	.14305	.587	-.2090	.6756
	BAM-HA 35:65	-.5333*	.14305	.012	-.9756	-.0910
	BAM-HA 30:70	-.2667	.14305	.447	-.7090	.1756
	Bio-Oss Collagen	-.8500*	.14305	.000	-1.2923	-.4077
	BAM	-.6333*	.14305	.002	-1.0756	-.1910
BAM-HA 35:65	Kontrol Negatif	.7667*	.14305	.000	.3244	1.2090
	BAM-HA 40:60	.5333*	.14305	.012	.0910	.9756
	BAM-HA 30:70	.2667	.14305	.447	-.1756	.7090
	Bio-Oss Collagen	-.3167	.14305	.268	-.7590	.1256
	BAM	-.1000	.14305	.980	-.5423	.3423
BAM-HA 30:70	Kontrol Negatif	.5000*	.14305	.020	.0577	.9423
	BAM-HA 40:60	.2667	.14305	.447	-.1756	.7090
	BAM-HA 35:65	-.2667	.14305	.447	-.7090	.1756
	Bio-Oss Collagen	-.5833*	.14305	.005	-1.0256	-.1410
	BAM	-.3667	.14305	.146	-.8090	.0756
Bio-Oss Collagen	Kontrol Negatif	1.0833*	.14305	.000	.6410	1.5256
	BAM-HA 40:60	.8500*	.14305	.000	.4077	1.2923
	BAM-HA 35:65	.3167	.14305	.268	-.1256	.7590
	BAM-HA 30:70	.5833*	.14305	.005	.1410	1.0256
	BAM	.2167	.14305	.659	-.2256	.6590
BAM	Kontrol Negatif	.8667*	.14305	.000	.4244	1.3090
	BAM-HA 40:60	.6333*	.14305	.002	.1910	1.0756
	BAM-HA 35:65	.1000	.14305	.980	-.3423	.5423
	BAM-HA 30:70	.3667	.14305	.146	-.0756	.8090
	Bio-Oss Collagen	-.2167	.14305	.659	-.6590	.2256

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .061.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

HASIL DATA UJI SPSS PROLIFERASI OSTEOLAS**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Proliferasi	.138	36	.081	.942	36	.060

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Proliferasi Osteoblas

Aplikasi Bahan	Jumlah Hari	Mean	Std. Deviation	N
Kontrol Negatif	Hari ke-14	8.2333	.25166	3
	Hari ke-28	6.7333	.30551	3
	Total	7.4833	.85888	6
BAM-HA 40:60	Hari ke-14	13.4333	.25166	3
	Hari ke-28	8.1667	.37859	3
	Total	10.8000	2.89897	6
BAM-HA 35:65	Hari ke-14	15.8333	2.25019	3
	Hari ke-28	9.2000	1.96977	3
	Total	12.5167	4.09606	6
BAM-HA 30:70	Hari ke-14	14.8000	.30000	3
	Hari ke-28	8.2667	.30551	3
	Total	11.5333	3.58869	6
Bios-Oss Collagen	Hari ke-14	20.2000	4.20000	3
	Hari ke-28	9.8667	1.66533	3
	Total	15.0333	6.34024	6
BAM	Hari ke-14	17.5333	.30551	3
	Hari ke-28	8.9333	2.36925	3
	Total	13.2333	4.94678	6
Total	Hari ke-14	15.0056	4.15387	18
	Hari ke-28	8.5278	1.58441	18
	Total	11.7667	4.51556	36

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Proliferasi Osteoblas	Based on Mean	5.785	11	24	.000
	Based on Median	.989	11	24	.483
	Based on Median and with adjusted df	.989	11	5.605	.538
	Based on trimmed mean	5.165	11	24	.000

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Proliferasi Osteoblas

b. Design: Intercept + Bahan + Hari + Bahan * Hari

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Proliferasi Osteoblas

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	642.440 ^a	11	58.404	19.681	.000
Intercept	4984.360	1	4984.360	1679.650	.000
Bahan	196.323	5	39.265	13.232	.000
Hari	377.654	1	377.654	127.264	.000
Bahan * Hari	68.462	5	13.692	4.614	.004
Error	71.220	24	2.968		
Total	5698.020	36			
Corrected Total	713.660	35			

a. R Squared = .900 (Adjusted R Squared = .854)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Proliferasi Osteoblas

Tukey HSD

(I) Aplikasi	(J) Aplikasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Negatif	BAM-HA 40:60	-3.3167*	.99457	.029	-6.3918	-.2415
	BAM-HA 35:65	-5.0333*	.99457	.000	-8.1085	-1.9582
	BAM-HA 30:70	-4.0500*	.99457	.005	-7.1251	-.9749
	Bios-Oss	-7.5500*	.99457	.000	-10.6251	-4.4749
	Collagen					

	BAM	-5.7500*	.99457	.000	-8.8251	-2.6749
BAM-HA 40:60	Kontrol Negatif	3.3167*	.99457	.029	.2415	6.3918
	BAM-HA 35:65	-1.7167	.99457	.529	-4.7918	1.3585
	BAM-HA 30:70	-.7333	.99457	.975	-3.8085	2.3418
	Bios-Oss	-4.2333*	.99457	.003	-7.3085	-1.1582
	Collagen					
	BAM	-2.4333	.99457	.180	-5.5085	.6418
BAM-HA 35:65	Kontrol Negatif	5.0333*	.99457	.000	1.9582	8.1085
	BAM-HA 40:60	1.7167	.99457	.529	-1.3585	4.7918
	BAM-HA 30:70	.9833	.99457	.917	-2.0918	4.0585
	Bios-Oss	-2.5167	.99457	.155	-5.5918	.5585
	Collagen					
	BAM	-.7167	.99457	.977	-3.7918	2.3585
BAM-HA 30:70	Kontrol Negatif	4.0500*	.99457	.005	.9749	7.1251
	BAM-HA 40:60	.7333	.99457	.975	-2.3418	3.8085
	BAM-HA 35:65	-.9833	.99457	.917	-4.0585	2.0918
	Bios-Oss	-3.5000*	.99457	.019	-6.5751	-.4249
	Collagen					
	BAM	-1.7000	.99457	.539	-4.7751	1.3751
Bios-Oss Collagen	Kontrol Negatif	7.5500*	.99457	.000	4.4749	10.6251
	BAM-HA 40:60	4.2333*	.99457	.003	1.1582	7.3085
	BAM-HA 35:65	2.5167	.99457	.155	-.5585	5.5918
	BAM-HA 30:70	3.5000*	.99457	.019	.4249	6.5751
	BAM	1.8000	.99457	.478	-1.2751	4.8751
BAM	Kontrol Negatif	5.7500*	.99457	.000	2.6749	8.8251
	BAM-HA 40:60	2.4333	.99457	.180	-.6418	5.5085
	BAM-HA 35:65	.7167	.99457	.977	-2.3585	3.7918
	BAM-HA 30:70	1.7000	.99457	.539	-1.3751	4.7751
	Bios-Oss	-1.8000	.99457	.478	-4.8751	1.2751
	Collagen					

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2.968.

*. The mean difference is significant at the .05 level.

HASIL DATA UJI SPSS BMP-2

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for BMP-2	.139	36	.074	.944	36	.066

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Ekspresi BMP2

Kelompok Perlakuan	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
Kelompok Negatif	Hari 14	5.933	.7024	3
	Hari 28	6.600	1.1136	3
	Total	6.267	.9092	6
BAMHA 40:60	Hari 14	9.000	1.4000	3
	Hari 28	9.133	.7024	3
	Total	9.067	.9933	6
BAMHA 35:65	Hari 14	10.667	1.8037	3
	Hari 28	12.600	2.4249	3
	Total	11.633	2.1851	6
BAMHA 30:70	Hari 14	10.067	.3055	3
	Hari 28	12.000	.5292	3
	Total	11.033	1.1272	6
BIO OSS	Hari 14	11.000	.2000	3
	Hari 28	13.800	1.2490	3
	Total	12.400	1.7297	6
Modifikasi	Hari 14	9.467	.5033	3
	Hari 28	11.733	3.6019	3
	Total	10.600	2.6138	6
Total	Hari 14	9.356	1.9178	18
	Hari 28	10.978	2.9624	18
	Total	10.167	2.5934	36

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi BMP2	Based on Mean	2.245	11	24	.047
	Based on Median	1.420	11	24	.227
	Based on Median and with adjusted df	1.420	11	8.730	.307
	Based on trimmed mean	2.194	11	24	.052

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Ekspresi BMP2

b. Design: Intercept + Perlakuan + Waktu + Perlakuan * Waktu

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ekspresi BMP-2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	178.360 ^a	11	16.215	6.822	.000
Intercept	3721.000	1	3721.000	1565.638	.000
Perlakuan	146.987	5	29.397	12.369	.000
Waktu	23.684	1	23.684	9.965	.004
Perlakuan * Waktu	7.689	5	1.538	.647	.666
Error	57.040	24	2.377		
Total	3956.400	36			
Corrected Total	235.400	35			

a. R Squared = .758 (Adjusted R Squared = .647)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ekspresi **BMP-2**

Tukey HSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok Negatif	BAMHA 40:60	-2.800*	.8901	.044	-5.552	-.048
	BAMHA 35:65	-5.367*	.8901	.000	-8.119	-2.615
	BAMHA 30:70	-4.767*	.8901	.000	-7.519	-2.015
	BIO OSS	-6.133*	.8901	.000	-8.885	-3.381
	Modifikasi	-4.333*	.8901	.001	-7.085	-1.581

BAMHA 40:60	Kelompok Negatif	2.800*	.8901	.044	.048	5.552
	BAMHA 35:65	-2.567	.8901	.078	-5.319	.185
	BAMHA 30:70	-1.967	.8901	.270	-4.719	.785
	BIO OSS	-3.333*	.8901	.011	-6.085	-.581
	Modifikasi	-1.533	.8901	.531	-4.285	1.219
BAMHA 35:65	Kelompok Negatif	5.367*	.8901	.000	2.615	8.119
	BAMHA 40:60	2.567	.8901	.078	-.185	5.319
	BAMHA 30:70	.600	.8901	.983	-2.152	3.352
	BIO OSS	-.767	.8901	.952	-3.519	1.985
	Modifikasi	1.033	.8901	.851	-1.719	3.785
BAMHA 30:70	Kelompok Negatif	4.767*	.8901	.000	2.015	7.519
	BAMHA 40:60	1.967	.8901	.270	-.785	4.719
	BAMHA 35:65	-.600	.8901	.983	-3.352	2.152
	BIO OSS	-1.367	.8901	.646	-4.119	1.385
	Modifikasi	.433	.8901	.996	-2.319	3.185
BIO OSS	Kelompok Negatif	6.133*	.8901	.000	3.381	8.885
	BAMHA 40:60	3.333*	.8901	.011	.581	6.085
	BAMHA 35:65	.767	.8901	.952	-1.985	3.519
	BAMHA 30:70	1.367	.8901	.646	-1.385	4.119
	Modifikasi	1.800	.8901	.360	-.952	4.552
Modifikasi	Kelompok Negatif	4.333*	.8901	.001	1.581	7.085
	BAMHA 40:60	1.533	.8901	.531	-1.219	4.285
	BAMHA 35:65	-1.033	.8901	.851	-3.785	1.719
	BAMHA 30:70	-.433	.8901	.996	-3.185	2.319
	BIO OSS	-1.800	.8901	.360	-4.552	.952

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 2.377.

*. The mean difference is significant at the

HASIL DATA UJI SPSS *OSTEOCALCIN*

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized	.079	36	.200*	.971	36	.461
Residual for Ekspresi						

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptive Statistics				
Dependent Variable: Ekspresi OST				
Kelompok Perlakuan	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
Kelompok Negatif	Hari 14	6.267	.4619	3
	Hari 28	7.800	.8000	3
	Total	7.033	1.0231	6
BAMHA 40:60	Hari 14	8.533	.6429	3
	Hari 28	9.800	.5292	3
	Total	9.167	.8710	6
BAMHA 35:65	Hari 14	9.933	.8083	3
	Hari 28	11.267	1.1719	3
	Total	10.600	1.1593	6
BAMHA 30:70	Hari 14	9.067	.7024	3
	Hari 28	10.467	1.5275	3
	Total	9.767	1.3110	6
BIO OSS	Hari 14	10.667	.8083	3
	Hari 28	12.267	1.7926	3
	Total	11.467	1.5214	6
Modifikasi	Hari 14	9.533	.1155	3
	Hari 28	11.333	.7024	3
	Total	10.433	1.0838	6
Total	Hari 14	9.000	1.5293	18
	Hari 28	10.489	1.7693	18
	Total	9.744	1.7963	36

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Ekspresi	Based on Mean	2.274	11	24	.045
OST	Based on Median	.455	11	24	.913
	Based on Median and with adjusted df	.455	11	8.246	.888
	Based on trimmed mean	2.065	11	24	.067

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Ekspresi OST

b. Design: Intercept + Perlakuan + Waktu + Perlakuan * Waktu

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ekspresi *Osteocalcin*

Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Perlakuan Negatif	BAMHA 40:60	-2.133*	.5470	.008	-3.825	-.442
	BAMHA 35:65	-3.567*	.5470	.000	-5.258	-1.875
	BAMHA 30:70	-2.733*	.5470	.001	-4.425	-1.042
	BIO OSS	-4.433*	.5470	.000	-6.125	-2.742
	Modifikasi	-3.400*	.5470	.000	-5.091	-1.709
BAMHA 40:60	Kelompok Negatif	2.133*	.5470	.008	.442	3.825
	BAMHA 35:65	-1.433	.5470	.131	-3.125	.258
	BAMHA 30:70	-.600	.5470	.878	-2.291	1.091
	BIO OSS	-2.300*	.5470	.004	-3.991	-.609
	Modifikasi	-1.267	.5470	.227	-2.958	.425
BAMHA 35:65	Kelompok Negatif	3.567*	.5470	.000	1.875	5.258

	BAMHA 40:60	1.433	.5470	.131	-.258	3.125
	BAMHA 30:70	.833	.5470	.653	-.858	2.525
	BIO OSS	-.867	.5470	.616	-2.558	.825
	Modifikasi	.167	.5470	1.000	-1.525	1.858
BAMHA 30:70	Kelompok Negatif	2.733*	.5470	.001	1.042	4.425
	BAMHA 40:60	.600	.5470	.878	-1.091	2.291
	BAMHA 35:65	-.833	.5470	.653	-2.525	.858
	BIO OSS	-1.700*	.5470	.048	-3.391	-.009
	Modifikasi	-.667	.5470	.824	-2.358	1.025
BIO OSS	Kelompok Negatif	4.433*	.5470	.000	2.742	6.125
	BAMHA 40:60	2.300*	.5470	.004	.609	3.991
	BAMHA 35:65	.867	.5470	.616	-.825	2.558
	BAMHA 30:70	1.700*	.5470	.048	.009	3.391
	Modifikasi	1.033	.5470	.432	-.658	2.725
Modifikasi	Kelompok Negatif	3.400*	.5470	.000	1.709	5.091
	BAMHA 40:60	1.267	.5470	.227	-.425	2.958
	BAMHA 35:65	-.167	.5470	1.000	-1.858	1.525
	BAMHA 30:70	.667	.5470	.824	-1.025	2.358
	BIO OSS	-1.033	.5470	.432	-2.725	.658

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .898.

*. The mean difference is significant at the

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ekspresi OST

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	91.382 ^a	11	8.307	9.253	.000
Intercept	3418.351	1	3418.351	3807.569	.000
Perlakuan	71.142	5	14.228	15.849	.000
Waktu	19.951	1	19.951	22.223	.000
Perlakuan * Waktu	.289	5	.058	.064	.997
Error	21.547	24	.898		
Total	3531.280	36			
Corrected Total	112.929	35			

a. R Squared = .809 (Adjusted R Squared = .722)

HASIL DATA UJI SPSS RUNX2

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Standardized Residual for Ekspresi	.083	36	.200*	.956	36	.167

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Ekspresi RUNX2

Waktu	Kelompok Perlakuan	Mean	Std. Deviation	N
Hari 14	Kelompok Negatif	7.533	.3055	3
	BAMHA 40:60	9.067	.1155	3
	BAMHA 35:65	10.000	.2000	3
	BAMHA 30:70	9.133	.3055	3
	BIO OSS	11.000	.4000	3
	BAM Modifikasi	10.400	.4000	3
	Total	9.522	1.1785	18
Hari 28	Kelompok Negatif	6.467	.3055	3
	BAMHA 40:60	8.600	.2000	3
	BAMHA 35:65	8.900	.3000	3
	BAMHA 30:70	8.600	.2000	3
	BIO OSS	9.733	.7572	3
	BAM Modifikasi	9.267	.3055	3
	Total	8.594	1.1106	18
Total	Kelompok Negatif	7.000	.6450	6
	BAMHA 40:60	8.833	.2944	6
	BAMHA 35:65	9.450	.6442	6
	BAMHA 30:70	8.867	.3724	6
	BIO OSS	10.367	.8802	6
	BAM Modifikasi	9.833	.6976	6
	Total	9.058	1.2227	36

Levene's Test of Equality of Error Variances^{a,b}

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ekspresi	Based on Mean	1.720	11	24	.129
RUNX2	Based on Median	.475	11	24	.901
	Based on Median and with adjusted df	.475	11	6.315	.867
	Based on trimmed mean	1.608	11	24	.160

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Dependent variable: Ekspresi RUNX2

b. Design: Intercept + Waktu + Perlakuan + Waktu * Perlakuan

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Ekspresi RUNX2

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	67.160 ^a	11	6.105	14.653	.000
Intercept	3025.000	1	3025.000	7260.000	.000
Perlakuan	51.693	5	10.339	24.813	.000
Waktu	12.018	1	12.018	28.843	.000
Perlakuan * Waktu	3.449	5	.690	1.655	.184
Error	10.000	24	.417		
Total	3102.160	36			
Corrected Total	77.160	35			

a. R Squared = .870 (Adjusted R Squared = .811)

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Ekspresi **RUNX2**

Tukey HSD

(I) Kelompok Perlakuan	(J) Kelompok Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok Negatif	BAMHA 40:60	-1.400*	.3727	.011	-2.552	-.248
	BAMHA 35:65	-2.333*	.3727	.000	-3.486	-1.181
	BAMHA 30:70	-1.700*	.3727	.002	-2.852	-.548
	BIO OSS	-3.900*	.3727	.000	-5.052	-2.748
	BAM	-2.667*	.3727	.000	-3.819	-1.514
BAMHA 40:60	Kelompok Negatif	1.400*	.3727	.011	.248	2.552
	BAMHA 35:65	-.933	.3727	.162	-2.086	.219
	BAMHA 30:70	-.300	.3727	.964	-1.452	.852
	BIO OSS	-2.500*	.3727	.000	-3.652	-1.348
	BAM	-1.267*	.3727	.025	-2.419	-.114
BAMHA 35:65	Kelompok Negatif	2.333*	.3727	.000	1.181	3.486
	BAMHA 40:60	.933	.3727	.162	-.219	2.086
	BAMHA 30:70	.633	.3727	.545	-.519	1.786
	BIO OSS	-1.567*	.3727	.004	-2.719	-.414
	BAM	-.333	.3727	.944	-1.486	.819
BAMHA 30:70	Kelompok Negatif	1.700*	.3727	.002	.548	2.852
	BAMHA 40:60	.300	.3727	.964	-.852	1.452
	BAMHA 35:65	-.633	.3727	.545	-1.786	.519
	BIO OSS	-2.200*	.3727	.000	-3.352	-1.048
	BAM	-.967	.3727	.137	-2.119	.186
BIO OSS	Kelompok Negatif	3.900*	.3727	.000	2.748	5.052
	BAMHA 40:60	2.500*	.3727	.000	1.348	3.652
	BAMHA 35:65	1.567*	.3727	.004	.414	2.719
	BAMHA 30:70	2.200*	.3727	.000	1.048	3.352
	BAM	1.233*	.3727	.031	.081	2.386
BAM	Kelompok Negatif	2.667*	.3727	.000	1.514	3.819
	BAMHA 40:60	1.267*	.3727	.025	.114	2.419
	BAMHA 35:65	.333	.3727	.944	-.819	1.486
	BAMHA 30:70	.967	.3727	.137	-.186	2.119
	BIO OSS	-1.233*	.3727	.031	-2.386	-.081

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = .417.

*. The mean difference is significant at the

Lampiran 11. Hasil Publikasi Jurnal

REVIEW ARTICLE

Potential of Bovine Amniotic Membrane and Hydrxyapatite as Bio-composite Materials for Enhanced Bone Formation

Yusuf D. Dwi Nugroho, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
 *Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia

ABSTRACT

Amniotic membrane originates from the fetus and contains various growth factors and cytokines. This preparation is often formed to facilitate the migration of cells and the formation of new tissue. The amniotic membrane is a natural barrier that can be used for wound healing. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

Keywords: Bovine amniotic membrane, Hydroxyapatite, Bio-composite

Corresponding Author:

Yusuf D. Dwi Nugroho
 Email: ydwi@unma.ac.id
 Tel: +62 31 8509333

INTRODUCTION

The main objective of this study is to evaluate the potential of bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation. The amniotic membrane is a natural barrier that can be used for wound healing. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

Amniotic membrane is a natural barrier that can be used for wound healing. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

KEYWORDS

Bovine amniotic membrane, Hydroxyapatite, Bio-composite

DOI: 10.24090/IR.v11i02.10000

100

Physical Modification of Bovine Amniotic Membrane for Dental Application

Galina¹, Ely², Nurhidayah³, Fatimah⁴, Rizki⁵

¹Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
²Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
³Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
⁴Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
⁵Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia

Abstract
 Collagen sponges are used as bio-composite in the field of tissue engineering to increase the mechanical strength of bone tissue. The physical properties of the sponge are important factors in its application. This study aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation. The physical properties of the sponge are important factors in its application. This study aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

INTRODUCTION

Collagen sponge is a biomaterial used for medical applications. It is a porous material that can be used for bone regeneration and bone formation. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

Collagen sponge is a biomaterial used for medical applications. It is a porous material that can be used for bone regeneration and bone formation. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

KEYWORDS

Bovine amniotic membrane, Hydroxyapatite, Bio-composite

Volume 11 Number 4 2021

Page 100

Characterization of Bovine Amniotic Membrane (BAM) by a Novel Process for Dental Treatment

Galina¹, Ely², Nurhidayah³, Fatimah⁴, Rizki⁵

¹Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
²Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
³Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
⁴Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
⁵Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia

Abstract
 The objective of this study is to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation. The physical properties of the sponge are important factors in its application. This study aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

INTRODUCTION

Collagen sponge is a biomaterial used for medical applications. It is a porous material that can be used for bone regeneration and bone formation. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

Collagen sponge is a biomaterial used for medical applications. It is a porous material that can be used for bone regeneration and bone formation. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

Collagen sponge is a biomaterial used for medical applications. It is a porous material that can be used for bone regeneration and bone formation. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

KEYWORDS

Bovine amniotic membrane, Hydroxyapatite, Bio-composite

Volume 11 Number 2 2021

Page 87

Characterization of Bovine Amniotic Membrane with Hydroxyapatite Bio-Composite

Galina¹, Ely², Nurhidayah³, Fatimah⁴, Rizki⁵

¹Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
²Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
³Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
⁴Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia
⁵Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60132, Indonesia

Abstract
 The objective of this study is to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation. The physical properties of the sponge are important factors in its application. This study aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

INTRODUCTION

Collagen sponge is a biomaterial used for medical applications. It is a porous material that can be used for bone regeneration and bone formation. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

Collagen sponge is a biomaterial used for medical applications. It is a porous material that can be used for bone regeneration and bone formation. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

Collagen sponge is a biomaterial used for medical applications. It is a porous material that can be used for bone regeneration and bone formation. This article aims to evaluate the potential of the bovine amniotic membrane and hydroxyapatite as a bio-composite material for bone regeneration and bone formation.

KEYWORDS

Bovine amniotic membrane, Hydroxyapatite, Bio-composite

Volume 11 Number 2 2021

Page 87

