

DISERTASI

**DIFERENSIASI OSTEOLAST KONDISI HIPOKSIA
TERHADAP SEKRESI *TGF B*, *BMP2*, *IGF*, DAN *VEGF*
PADA *DERIVED BM-MESENCHYMAL STEM CELL*
YANG *DISEEDING* DENGAN *DEMINERALIZED*
*BONE MATRIX***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL *IN VITRO*



MOULI EDWARD

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR

KEDOKTERAN FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2021

DISERTASI

**DIFERENSIASI OSTEOLAST KONDISI HIPOKSIA
TERHADAP SEKRESI *TGF B*, *BMP2*, *IGF*, DAN *VEGF*
PADA *DERIVED BM-MESENCHYMAL STEM CELL*
YANG *DISEEDING* DENGAN *DEMINERALIZED*
*BONE MATRIX***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL *IN VITRO*



MOULI EDWARD

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

DISERTASI

**DIFERENSIASI OSTEOLAST KONDISI HIPOKSIA TERHADAP
SEKRESI *TGF B*, *BMP2*, *IGF*, DAN *VEGF* PADA *DERIVED BM-
MESENCHYMAL STEM CELL* YANG *DISEEDING* DENGAN
*DEMINERALIZED BONE MATRIX***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL *IN VITRO*

MOULI EDWARD

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

**DIFERENSIASI OSTEOLAST KONDISI HIPOKSIA TERHADAP
SEKRESI *TGF B*, *BMP2*, *IGF*, DAN *VEGF* PADA *DERIVED BM-
MESENCHYMAL STEM CELL* YANG *DISEEDING* DENGAN
DEMINERALIZED BONE MATRIX
PENELITIAN EKSPERIMENTAL *IN VITRO***

DISERTASI

Untuk Memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan
Dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Akhir
Tahap 2 (Terbuka)

Oleh :

**MOULI EDWARD
011317017319**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

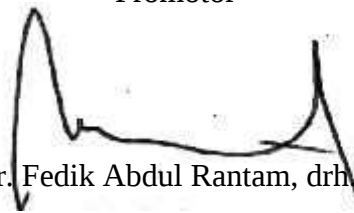
DIFERENSIASI *OSTEOBLAST* KONDISI HIPOKSIA TERHADAP SEKRESI
TGF B, BMP2, IGF, DAN VEGF PADA *DERIVED BM-MESENCHYMAL STEM*
CELL YANG *DISEEDING* DENGAN *DEMINERALIZED BONE MATRIX*

PENELITIAN EKSPERIMENTAL *IN VITRO*

TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 02 MARET 2021

Oleh

Promotor



Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., M.Sc.

NIP. 19591003 198701 1 001



Kopromotor

Dr. Ferdiansyah, dr., SpOT(K)

NIP. 19640212 198911 1 001

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai
Oleh Panitia Penguji Ujian Tahap 1 (Tertutup)
pada tanggal 17 Desember 2020**

Panitia Penguji :

Ketua : 1. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., SpOT(K)
Anggota : 1. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., M.Sc.
2. Dr. Ferdiansyah, dr, SpOT(K)
3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
4. Dr. Heri Suroto, dr., SpOT(K)
5. Dr. Asra Al Fauzi, dr., SE., MM., Sp.BS(K)., FICS., IFAANS
6. Dr. Rosy Setiawati, dr., SpRad(K)
7. Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 454/UN3.1.1/HK.04/2020
Tanggal : 17 Desember 2020

PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Mouli Edward

NIM : 011317017319

Program Studi : Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor

Judul Disertasi : Diferensiasi *Osteoblast* Kondisi Hipoksia Terhadap Sekresi *TGF B*, *BMP2*, *IGF*, dan *VEGF* Pada *Derived BM-Mesenchymal Stem Cell* Yang *Diseeding* Dengan *Demineralized Bone Matrix*
Penelitian Eksperimental *In Vitro*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa

1. Disertasi saya ini adalah asli (hasil karya sendiri) bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (*plagiarism*) dari karya orang lain.
2. Disertasi ini belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik.
3. Disertasi ini tidak terdapat pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan didalam daftar pustaka.
4. Demikian, pernyataan ini dibuat tanpa adanya paksaan dari pihak manapun, apabila pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan norma dan peraturan yang berlaku di Universitas Airlangga.

Surabaya, 2 Maret 2021



Mouli Edward

NIM 011317017319

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamu'alaikum warahmatullahi wabarakatuh

Alhamdulillah rabbil'alamiin. Tidak ada kalimat yang lebih pantas saya ucapkan selain kalimat syukur, segala puji bagi Allah SWT yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang yang melapangkan segala urusan sehingga disertasi ini dapat saya selesaikan.

Dengan izin Allah SWT, disertasi ini dapat saya selesaikan melalui dorongan, bimbingan, arahan, saran dan koreksi dari Tim Promotor dan Ko-Promotor, oleh karena itu perkenankan saya menghaturkan rasa terima kasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., MSc., guru besar di bidang Kedokteran Hewan, sebagai penasehat akademik dan Promotor yang telah dengan penuh pengertian, dan kesabaran, telah meluangkan waktu untuk berdiskusi dan memberi masukan, serta senantiasa memberikan semangat kepada saya untuk berusaha segera menyelesaikan disertasi ini. Saya ucapkan terima kasih yang tak terhingga, semoga Allah Swt melimpahkan rahmat dan hidayahNya untuk beliau.

Dr. Ferdiansyah, dr., SpOT(K)., sebagai Ko-Promotor, yang meluangkan waktu diantara kesibukan beliau, memberi arahan dan bimbingan dalam pelaksanaan penelitian, penyusunan disertasi, mengajarkan cara berpikir ilmiah, memberikan dorongan dan semangat, bahwa saya mampu menyelesaikan disertasi ini. Saya ucapkan terima kasih yang sedalam-dalamnya.

Prof. Dr. Moh. Nasih, S.E., M.T., Ak. selaku Rektor Universitas Airlangga yang telah menerima saya sebagai peserta didik Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Budi Santoso, dr., SpOG(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K) selaku mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan dan fasilitas kepada saya sebagai peserta didik Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., SpOG(K) selaku Ketua Program Studi Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., M.Sc., Sp. PD-KR selaku mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan doktoral saya.

Tri Wahyu Martanto, dr., SpOT(K) selaku Kepala Departemen/KSM Orthopaedi dan Traumatologi FK UNAIR/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., SpOT(K) selaku mantan Kepala Departemen/KSM Orthopaedi dan Traumatologi FK UNAIR/ RSUD Dr. Soetomo Surabaya beserta jajarannya, atas ijin dan segala fasilitas yang diberikan kepada saya selama menjalani pendidikan doktoral saya.

Dr. Heri Suroto, dr., SpOT(K) selaku Kepala Instalasi Bank Jaringan dan Regeneratif Sel RSUD Dr. Soetomo Surabaya beserta jajarannya, yang telah memberikan segala fasilitas, bimbingan dan membantu semua proses yang

diperlukan dalam penelitian dan selalu memberikan semangat untuk menyelesaikan disertasi.

Terimakasih yang tak terhingga kepada Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., SpOT(K), selaku pembimbing dan penguji, yang telah memberikan segala fasilitas, bimbingan dan membantu semua proses yang diperlukan dalam penelitian dan selalu memberikan semangat untuk menyelesaikan disertasi.

Terimakasih tak terhingga kepada Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES, Dr. Heri Suroto, dr., SpOT(K), Dr. Asra Al Fauzi, dr., SE., MM., Sp.BS(K), FICS., IFAANS., Dr. Rosy Setiawati, dr., SpRad(K) dan Dr. Budi Utomo, dr., M.Kes selaku pembimbing dan penguji yang sangat membantu dan memberikan dorongan, motivasi, kerjasama dan semangat dalam menyelesaikan disertasi ini dengan penuh kekeluargaan. Semoga semuanya sukses dan penuh berkah Allah SWT.

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada seluruh staf pengajar Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu dasar maupun terapan yang sangat bermanfaat sebagai dasar penyusunan disertasi saya.

Ucapan terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada guru dan dosen yang pernah mengajar saya sejak sekolah dasar hingga pendidikan magister yang telah memberikan landasan keilmuan, yang tidak mungkin saya sebutkan satu persatu.

Segenap rekan sejawat dosen dan staf Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan dorongan, motivasi, kerjasama dan semangat dalam menyelesaikan pendidikan program doktor ini

Seluruh rekan seangkatan peserta Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Universitas Airlangga Angkatan 2013, yang telah saling memberi semangat dan motivasi untuk menyelesaikan pendidikan doktoral, saya ucapkan terima kasih atas segala suka duka yang telah kita lalui bersama.

Rasa hormat, terima kasih dan kasih sayang yang sangat dalam saya sampaikan pada kesempatan ini kepada: orangtua saya tercinta, Koespadji Tjokroprawiro (Alm), dan ibu Syria Darmi (Alm), yang telah mengasuh, mendidik, memberi tauladan, serta melimpahi saya dengan kasih sayang dan perhatian hingga saat ini. Semoga saya dapat menjadi anak yang sesuai dengan harapan mereka, yang senantiasa mendoakan agar Allah SWT menyayangi mereka melebihi kasih sayang mereka kepada saya.

Kepada mertua saya, Benny Ario Widjajanto, dr. dan ibu Hermi, dr. yang telah memberikan semangat dan kasih sayang yang tidak putus-putusnya. Saya sampaikan terima kasih yang mendalam dan tulus. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahi ridlo dan lindungannya.

Rasa kasih sayang dan terima kasih setulus-tulusnya saya sampaikan kepada istri saya Irma Praminiarti, dr., SpM., yang dengan kesabarannya selalu mendampingi saya menjalani kehidupan dan selama menempuh proses pendidikan ini, memberikan waktu, kesempatan dan toleransi, mendengarkan keluh kesah, memberikan semangat, dorongan dan doa agar disertasi ini dapat diselesaikan,

serta kepada anak–anak saya Nafeeza Amalia dan Rasyidan Zayyan yang menjadi pemberi semangat dan pendorong agar saya segera menyelesaikan disertasi ini. Semoga Allah SWT senantiasa meridhoi, memberkahi dan menjaga mereka.

Kepada saudara-saudara saya tercinta, saudara-saudara ipar, yang saling mendoakan, saling menjaga, saling mengingatkan dan saling membantu dalam menjalani kehidupan. Saya ucapkan terima kasih yang tiada terkira.

Terimakasih saya sampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memotivasi, mendukung dan membantu hingga disertasi ini dapat saya selesaikan. Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas budi baik mereka.

Saya sangat menyadari bahwa tulisan ini sangat jauh dari sempurna, oleh karena itu saya menerima saran dan kritik demi perbaikan dan kesempurnaan naskah disertasi ini.

Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi kemajuan ilmu kedokteran dan bagi umat manusia. Semoga Allah SWT melimpahkan taufik dan hidayah-Nya kepada semua pihak yang telah membantu dalam bentuk apapun dalam penyelesaian disertasi ini.

Aamiin ya rabbal'amin

Billahitaufig wal hidayah

Wassalamu'alaikum warahmatullohi wabarakatuh

Surabaya, 02 Maret 2021

Penulis

RINGKASAN

Salah satu masalah yang masih menjadi problematika di bidang orthopaedi adalah defek pada tulang. Defek tulang dapat disebabkan karena penyakit metabolik seperti osteoporosis dan osteopenia, tumor pada tulang, trauma, dan infeksi. Laporan di Amerika Serikat menyebutkan bahwa masalah defek pada tulang ini menimbulkan dampak finansial karena biaya perawatan yang tinggi dengan rerata sebesar 25.000 dollar Amerika Serikat untuk setiap kasus. Selain itu, masalah defek pada tulang menyebabkan *nonunion* yang akan berdampak pada penurunan fungsi dan kualitas hidup pasien.

Beberapa usaha telah dilakukan untuk penanganan masalah ini dengan menggunakan berbagai macam cangkok tulang. Berdasarkan penelitian multisenter didapatkan data adanya kegagalan cangkok tulang sebesar 17%, baik karena infeksi, patah pada cangkok tulang dan *nonunion*. Penelitian tersebut juga dilaporkan bahwa terjadi komplikasi sebesar 13% pada operasi yang pertama, dan masalah terbesar adalah penggunaan *allograft* sepanjang 18 centimeter atau lebih. Rekonstruksi pada kerusakan tulang masif memerlukan *graft* tulang yang berukuran besar. *Graft* tulang yang ideal harus memiliki karakteristik osteoinduktif, osteokonduktif, dan osteogenesis.

Beberapa penelitian mengusahakan peningkatan kualitas tulang untuk membantu beregenerasi dengan mengaplikasikan *mesenchymal stem cell (MSC)*. atau jaringan tulang berbasis sel terapi atau sel punca mesenkimal. Namun, dalam penggunaan klinis telah terjadi hambatan karena rumitnya perlakuan terhadap sel dan

kompleksitas terapi sel tersebut, serta biaya yang berkaitan dengan pembuatan, dan peraturan yang berlaku. Saat ini, terjadi pergeseran dari pandangan terapi dari MSC yang secara langsung berkontribusi pada regenerasi jaringan, berubah menjadi MSC sebagai pemroduksi molekul bioaktif yang berguna untuk regenerasi tulang. Bioaktif yang diproduksi oleh MSC ini disekresikan oleh MSC dan biasa disebut sekretom. Bioaktif atau protein pada sekretom inilah yang akan dapat berperan pada regenerasi tulang. Metode ini tentunya akan lebih mudah, sederhana dan murah jika dibandingkan dengan terapi sel.

Untuk mendapatkan sekretom yang berguna untuk regenerasi tulang maka harus dimengerti protein apa saja yang penting untuk regenerasi tulang. Sekretom yang banyak mengandung protein yang berguna untuk regenerasi tulang ini dapat digunakan untuk terapi regenerasi tulang baik menggunakan atau tanpa *scaffold*. Berbagai faktor pertumbuhan diperlukan dalam proses diferensiasi MSC menuju *osteoblast*. *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) dalam hal ini adalah BMP 2, *Insulin Growth Factor* (IGF) dan *Transforming Growth Factor* (TGF β) dikatakan sebagai faktor pertumbuhan yang berperan dalam diferensiasi MSC menuju *osteoblast*. BMPs, TGF β , dan IGF dilaporkan dapat mengaktifasi faktor transkripsi RUNX 2 ini akan mengaktifkan faktor transkripsi yang lain, yaitu *osterix* (ORX) sehingga terjadilah proses diferensiasi MSC menuju *osteoblast*.

Pada media kultivasi konsentrasi oksigen 20% pada ruangan laboratorium berbeda dengan kondisi lingkungan asli jaringan di mana kadar oksigen sekitar 2-9%, untuk musculoskeletal adalah 5%. Kadar oksigen memainkan peran penting pada nasib MSC dalam hal proliferasi dan diferensiasi, melalui pengaturan ekspresi yang

dimediasi *hipoksia-inducible-factor 1* (HIF-1) dari gen yang berbeda. Pada akhirnya dapat disimpulkan bahwa lingkungan hipoksia dapat sangat meningkatkan kinetika pertumbuhan, stabilitas genetik, dan ekspresi reseptor kemokin selama kultivasi.

Demineralized bone matrix (DBM) merupakan suatu osteoinduktif, yang didalamnya mengandung faktor pertumbuhan yang berupa *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) 2, *insulin-like growth factor-I* (IGF-I) dan *transforming growth factor- β 1* (TGF β 1). Faktor pertumbuhan tersebut berfungsi dalam proses osteogenesis. DBM yang mengandung IGF, TGF β dan BMP2 akan mempengaruhi MSC melalui reseptornya IGFR, TGF β R dan BMPR2.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dampak produksi protein yang berguna untuk regenerasi tulang, IGF1, TGF β , BMP2, ALP, dan VEGF pada *secretome* kultur MSC dengan pengaruh perlakuan DBM dan kondisi hipoksia. Dengan adanya faktor hipoksia dan DBM akan meningkatkan metabolisme MSC dan menghasilkan sekretom yang banyak mengandung protein yang diperlukan untuk diferensiasi MSC menuju sel *osteoblast* sehingga berguna untuk terapi regenerasi tulang.

Penelitian ini adalah sebuah penelitian laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian eksperimental murni dengan menggunakan kultur MSCs. Kultur MSC dilakukan pada 2 kondisi, yaitu kondisi normoksia dan hipoksia. Kemudian masing-masing juga dikelompokkan pada media dengan *Demineralized Bone Matrix* (DBM) dan tanpa DBM. Penelitian ini merupakan *Randomized Control Post Test-Only Group Design*. MSC yang sudah diisolasi kemudian dilakukan kultur dan ekspansi. Selanjutnya, MSC dibagi menjadi empat kelompok yaitu: Kelompok P1 yang tidak

mengandung medium DBM pada kondisi normoksia, kelompok P2 yang mengandung media DBM pada kondisi normoksia, kelompok P3 yang tidak mengandung media DBM pada kondisi hipoksia, dan kelompok P4 yang mengandung media DBM pada kondisi hipoksia. Setelah dilakukan kultur selama 5 hari, sekretom yang dihasilkan diekstraksi untuk dilakukan analisis kandungan menggunakan metode ELISA.

Analisis perbandingan jumlah sel *osteoblast* antara keempat kelompok menunjukkan perbedaan yang bermakna dimana sel *osteoblast* terbanyak didapatkan pada kelompok kultur media DBM pada kondisi normoksia. Secara umum, kelompok yang dikultur pada kondisi normoksia dengan atau tanpa DBM memberikan rerata jumlah sel *osteoblast* yang lebih besar daripada kelompok pada kultur hipoksia.

Analisis kandungan *secretome* menunjukkan hasil yang berkebalikan dengan jumlah *osteoblast*. Kandungan TGF beta lebih tinggi pada kelompok yang mendapatkan kultur pada kondisi hipoksia. Pemberian media DBM pada kultur hipoksia memberikan konsentrasi TGF beta yang paling tinggi dibandingkan kelompok lain. Hipoksia merupakan kondisi yang dapat mencegah MSC berdiferensiasi menjadi *osteoblast* sehingga MSC tetap menjaga originalitasnya. Pada kelompok perlakuan hipoksia tanpa DBM, TGF beta yang diproduksi oleh MSC semakin lama akan meningkat sedangkan MSC tidak berdiferensiasi menjadi menuju *osteoblast*. Pada kelompok perlakuan hipoksia dengan DBM yang banyak mengandung IGF, TGF beta membuat MSC berploriferasi sehingga akan menghasilkan TGF beta dan tidak berdiferensiasi menuju *osteoblast*.

Analisis kandungan BMP2 dan IGF1 menunjukkan bahwa pemberian kondisi hipoksia dengan media DBM memberikan konsentrasi tertinggi juga. Menariknya,

konsentrasi BMP2 dan IGF1 pada kelompok yang mendapatkan kondisi normoksia tanpa media DBM justru menunjukkan konsentrasi yang lebih tinggi daripada kelompok normoksia dan kelompok tanpa DBM lainnya. BMP2 dan IGF1 merupakan hormon yang berfungsi untuk membuat MSC berdeferensiasi menjadi *osteoblast*. Pada kelompok perlakuan normoksia tanpa DBM, BMP2 dan IGF1 yang diproduksi oleh MSC lebih tinggi. Produksi BMP2 dan IGF1 tersebut lebih banyak untuk diferensiasi MSC. Pada kelompok yang perlakuan normoksia dengan DBM yang banyak mengandung IGF, BMP2 dan IGF1 merangsang percepatan deferensiasi sehingga banyak *mesenchymal stem cell* sudah berdiferensiasi menuju *osteoblast*, sehingga produksi BMP2 dan IGF1 pada pengamatan turun.

Kondisi hipoksia dengan media DBM juga memberikan konsentrasi VEGF yang tertinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pada kelompok perlakuan hipoksia dengan DBM yang banyak mengandung IGF, TGF β membuat MSC berproliferasi sehingga akan menghasilkan VEGF lebih tinggi karena banyak proliferasi tanpa diferensiasi.

Analisis konsentrasi ALP menunjukkan bahwa pemberian kondisi hipoksia dan media DBM akan menurunkan ekspresi ALP. Pada kelompok perlakuan hipoksia tanpa DBM, ALP yang diproduksi oleh MSC tetap ada tetapi sedikit karena MSC tidak berdiferensiasi menjadi menuju *osteoblast* karena kondisi hipoksia. Pada kelompok yang perlakuan hipoksia dengan DBM yang banyak mengandung IGF, TGF β dan BMP mencoba berdiferensiasi sehingga gagal karena kondisi hipoksia mencegah diferensiasi, dan dengan adanya faktor pertumbuhan akan lebih memicu proliferasi MSC.

Kebaruan penelitian ini adalah merupakan penelitian yang pertama menggunakan faktor perlakuan hipoksia dan DBM yang diproduksi dengan metode yang ada di Bank Jaringan RSUD. Dr. Soetomo Surabaya pada kultur MSC secara bersama. Penelitian ini secara umum juga menyimpulkan bahwa faktor perlakuan hipoksia dan DBM yang diproduksi dengan metode yang ada di Bank Jaringan RSUD. Dr. Soetomo Surabaya bermakna meningkatkan produksi faktor pertumbuhan pada sekretom kultur MSC yang berguna untuk proses osteogenesis, seperti BMP 2, IGF, TGF β dan VEGF. Teknik yang baru dengan perlakuan ganda yang digunakan untuk mendapatkan produksi *secretome* yang banyak memproduksi faktor pertumbuhan yang diperlukan untuk osteogenesis ini, dapat menjadikan suatu metode terbaru untuk memproduksi sekretom. *Secretome* yang dihasilkan dapat bermanfaat untuk rekayasa jaringan yang memerlukan banyak mengandung protein untuk osteogenesis.

SUMMARY

One of the problematic issues in orthopaedics surgery is bone defects. Bone defects can be caused by metabolic diseases such as osteoporosis and osteopenia, bone tumors, trauma, and infections. One Report in the United States showed that the bone defects had a financial impact because of the high cost of treatment with an average of US \$ 25,000 per case. In addition, bone defects cause nonunion which will result decreased in function and quality of life of the patient.

Several attempts have been made to treat the problem using various type bone grafts. Based on a multicentre study, 17% of the subjects sustained bone graft failure due to infection, fractures in bone grafts and non-union. The study also reported 13% complications rate at the first surgery, and the greatest problem was found at the use of 18 centimetres or more of allograft bone graft. Reconstruction of massive bone defects requires a large bone graft. The ideal bone graft should have the osteoinductive, osteoconductive, and osteogenetic properties.

Several studies have been done to improve bone graft's quality in order to induced regeneration process by applying the mesenchymal stem cells (MSC) as it is known as bone-tissue-based cell therapy or mesenchymal stem cells. However, there have been obstacles in clinical use due to the complexity of the treatment of these cells and the complexity of cell therapy, as well as the costs associated with their manufacture, and the applicable rules. Currently, there is a shift from the therapeutic view of MSCs which directly contribute to tissue regeneration, into MSCs as producers of bioactive molecules that are useful for

bone regeneration. Bioactives secreted by MSC are commonly referred as secretome. Bioactives or proteins in this secretome may have a role in the bone regeneration. This method by all means is easier, simpler, and cheaper than cell therapy.

In order to obtain secretome that are useful for bone regeneration, it is necessary to understand which proteins are important for bone regeneration. Secretome, which contains lots of protein is useful for bone regeneration, can be used for bone regeneration therapy with or without using scaffold. Various growth factors are required in the differentiation process of MSCs towards osteoblasts. Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in this case are BMP 2, Insulin Growth Factor (IGF) and Transforming Growth Factor ($TGF\beta$) which are said to be the growth factors that play a role in the differentiation of MSCs towards osteoblasts. BMPs, $TGF\beta$, and IGF are reported to be able to activate the transcription factor RUNX 2 which will activate another transcription factor, namely osterix (ORX) so that there is a differentiation process of MSCs towards osteoblasts.

In the cultivation medium with the oxygen concentration of 20% in the laboratory was different from the original environmental conditions where the oxygen level was around 2-9% and 5% for the tissue and musculoskeletal, respectively. Oxygen levels play an important role of MSCs in terms of proliferation and differentiation, through regulation of hypoxia-inducible-factor 1 (HIF-1) mediated expression from different genes. It could be concluded that a hypoxic environment could greatly enhance growth kinetics, genetic stability, and expression of chemokine receptors during cultivation.

Demineralized bone matrix (DBM) is osteoinductive, which contains growth factors in the form of Bone Morphogenetic Protein (BMP) 2, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and transforming growth factor- β 1 (TGF β 1). These growth factors play role in the osteogenesis process. DBM containing IGF, TGF β , and BMP2 which will affect MSC through its receptors IGFR, TGF β R and BMPR2.

This study aims to determine the impact of protein secretions which is useful for bone regeneration, IGF1, TGF β , BMP2, ALP, and VEGF on MSC culture secretomes with the effect of DBM treatment and hypoxic conditions. With the presence of hypoxic factors and DBM, it will increase MSC metabolism and produce secretions that contain lots of protein needed for the differentiation of MSCs to osteoblasts so that they are beneficial for bone regeneration therapy.

This study is an in vitro laboratory study with a pure experimental research design using MSCs culture. MSC culture was carried out in 2 conditions, namely normoxic and hypoxic conditions. Each group was also grouped into Demineralized Bone Matrix (DBM) and without DBM media. This study is a randomized control post test-only group design. The isolated MSC was then cultured and expanded. Furthermore, MSC was divided into four groups, namely: P1 which did not contain DBM medium under normoxic conditions, P2 containing DBM media in normoxic conditions, P3 which did not contain DBM media in hypoxic conditions, and P4 grup containing DBM media in hypoxic conditions. After 5 days of culture, the resulting secretomes were extracted for content analysis using the ELISA method.

Comparative analysis of the number of osteoblast cells between the four groups showed a significant difference in which the most osteoblast cells were

found in the DBM media culture under normoxic conditions group. In general, the groups which cultured in normoxic conditions with or without DBM have a greater mean number of osteoblasts than the group in hypoxic cultures.

Analysis of secretomes content showed results that were inverse to the number of the osteoblasts. The TGF β content was higher in the group that got culture under hypoxic conditions. Provision of DBM media in hypoxic culture gave the highest concentration of TGF beta compared to other groups. Hypoxia is a condition that can prevent MSCs from differentiating into osteoblasts so that MSCs maintain their originality. In the hypoxia treatment group without DBM, TGF beta produced by MSCs would increase over time, while MSC did not differentiate towards osteoblasts. In the hypoxia treatment group with DBM which contained lots of IGF, TGF beta made MSC proliferate so that it would produce TGF beta and did not differentiate towards osteoblasts.

Analysis of the content of BMP2 and IGF1 showed that administering hypoxic conditions with DBM media gave the highest concentration as well. Interestingly, the concentrations of BMP2 and IGF1 in the normoxic group without DBM media actually showed a higher concentration than the normoxic group and the other groups without DBM. BMP2 and IGF1 are hormones that function to make MSC differentiated into osteoblasts. In the normoxic treatment group without DBM, BMP2 and IGF1 produced by MSC were higher. The production of BMP2 and IGF1 is mainly for MSC differentiation. In the normoxic treatment group with DBM which contained a lot of IGF, BMP2 and IGF1, it stimulated the acceleration of differentiation so that many mesenchymal stem

cells had differentiated into osteoblasts, so that the production of BMP2 and IGF1 in the observation were decreased.

Hypoxic conditions with DBM media also gave the highest VEGF concentration compared to other groups. In the hypoxic treatment group with DBM containing lots of IGF, TGF β induces MSC proliferate so that it will produce higher VEGF because there is a lot of proliferation without differentiation.

The analysis of ALP concentrations showed that administering hypoxic conditions and DBM media could reduce ALP expression. In the hypoxic treatment group without DBM, ALP produced by MSCs remained but only few because MSC did not differentiate into osteoblasts due to hypoxic conditions. In the hypoxic treatment group with DBM containing a lot of IGF, TGF β and BMP attempted to differentiate, yet it failed because hypoxic conditions prevented differentiation, and the presence of growth factors would further trigger the MSC proliferation.

The novelty of this research is that it is the first study using hypoxic treatment factors and DBM produced by the existing method in the Tissue Bank Dr. Soetomo General Hospital Surabaya on the MSC culture together. In general, this study also concluded that the hypoxic treatment factor and DBM were produced using the existing method in the Tissue Bank Dr. Soetomo General Hospital Surabaya significantly increases the production of growth factors in the secretomes of MSC culture which is useful for the osteogenesis process, such as BMP 2, IGF, TGF β and VEGF. This new dual-treatment technique used to obtain the production of secretions which produce a large amount of the growth factors required for osteogenesis, could constitute a novel method of producing

secretions. The resulting secretomes can be useful for tissue engineering that requires substantial proteins for osteogenesis.

ABSTRAK

Latar Belakang:

Mesenchymal stem cell (MSC) dianggap sebagai sel progenitor multipoten untuk terapi regeneratif. Kondisi hipoksia diharapkan dapat memberikan situasi yang menguntungkan untuk kultur osteogenik. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi konsentrasi oksigen dan *demineralized bone matrix* (DBM) untuk memfasilitasi aktivitas MSC dengan membandingkan produksi protein spesifik dari kondisi kultur yang berbeda.

Metode:

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium *in vitro* dengan desain penelitian eksperimental murni menggunakan kultur MSCs. Dengan desain *Randomized Post Test Only*. Kultur MSC dilakukan dalam 2 kondisi yaitu kondisi normoksia dan kondisi hipoksia. Masing-masing dikelompokkan pada media dengan DBM dan tanpa DBM. Studi ini mengevaluasi kadar BMP-2, TGF, IGF, VEGF, ALP, OC, jumlah sel total, dan jumlah sel *osteoblast*.

Hasil:

Evaluasi dalam penelitian ini dilakukan pada empat kelompok perlakuan pada hari ke-5 dengan mengukur kadar TGF B, BMP-2, IGF 1, VEGF, dan ALP dengan uji ELISA baik normoksia maupun hipoksia dengan atau tanpa DBM. Jumlah sel total dan jumlah *osteoblast* secara signifikan lebih tinggi pada kelompok normoksia dengan DBM atau tanpa DBM. Kondisi hipoksia menunjukkan hasil yang menjanjikan untuk melawan kecenderungan DBM yang mendorong diferensiasi MSC dan lebih meningkatkan ekspresi protein MSC dan faktor pertumbuhan.

Kesimpulan:

Kombinasi MSC, DBM, dan kondisi hipoksia dapat menjadi pilihan untuk pengobatan defek tulang karena menyediakan semua elemen yang diperlukan dari rekayasa jaringan untuk memfasilitasi proses penyembuhan *bone defect*: sel, scaffold, dan faktor pertumbuhan.

Kata Kunci: Defek tulang, *Mesenchymal stem cell*, *Demineralized bone matrix*

ABSTRACT

Introduction:

MSCs are considered multipotent progenitor cells for regenerative therapy. Hypoxic condition is expected to provide a favorable situation for osteogenic culture. This study aimed to evaluate oxygen concentration and demineralized bone matrix (DBM) to facilitate stem cell activity by comparing the production of specific proteins from different culture conditions.

Method:

This research is an in vitro laboratory research with a pure experimental research design using MSCs culture. MSC culture was carried out in 2 conditions, namely normoxic and hypoxic conditions. Each group was grouped on the media with Demineralized Bone Matrix (DBM) and without DBM. Randomized Control Post Test-Only Group Design. This study evaluates BMP, TGF, IGF, VEGF, ALP, OC, total cell count, and osteoblast cell count.

Results:

Evaluation in this study was carried out in four treatment groups on the 5th day of stem cell culture by measuring the levels of TGF B, BMP-2, IGF 1, VEGF, and ALP with ELISA tests both with normoxic and hypoxia with or without DBM. The number of total cells and osteoblast count was significantly higher in the Normoxic group with or without DBM. Hypoxic conditions showed a promising result to counter DBM tendency to promoting MSCs differentiation and further enhance MSCs protein and growth factors expression.

Conclusion:

The combination of MSCs, DBM, and hypoxic conditions could be an option for the treatment of bone defects as this would provide all necessary elements of tissue engineering to facilitate the healing process of bone defects: the cells, the scaffold, and the growth factors.

Keyword: Bone defect, Mesenchymal stem cells, Demineralized bone matrix

DAFTAR ISI

Halaman Sampul Depan	i
Lembar Awal	ii
Lembar Prasyarat Gelar	iii
Lembar Pengesahan	iv
Lembar Penetapan Panitia Penguji	v
Lembar Pernyataan Orisinalitas	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	xii
SUMMARY	xviii
ABSTRAK	xxiv
ABSTRACT	xxv
DAFTAR ISI.....	xxvi
DAFTAR TABEL.....	xxx
DAFTAR GAMBAR.....	xxxii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxxiv
DAFTAR SINGKATAN	xxxv
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.3.1 Tujuan umum	8
1.3.2 Tujuan khusus	8
1.4 Manfaat Penelitian	9
1.4.1 Manfaat teoritis	9
1.4.2 Manfaat praktis	9

BAB 2	TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>	11
2.2	Faktor Pertumbuhan (<i>Growth Factor</i>)	14
2.2.1	<i>Insulin-like growth factor (IGF)</i>	22
2.2.2	<i>Transforming growth factor (TGF-β)</i>	26
2.2.3	<i>Bone morphogenic protein (BMP)</i>	28
2.3	Pengaruh Hipoksia pada <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	30
2.3.1	Pengaruh hipoksia pada <i>stemness</i>	38
2.4	<i>Secretome Mesenchymal Stem Cell</i>	42
2.5	<i>Bone Graft</i>	47
2.6	Pengaruh Gabungan <i>Demineralized Bone Matrix</i> dan Hipoksia pada Kultur <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	51
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN ...	53
3.1	Kerangka Konseptual	53
3.2	Hipotesis Penelitian	56
BAB 4	METODE PENELITIAN.....	58
4.1	Rancangan Penelitian.....	58
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	59
4.3	Materi Penelitian.....	59
4.3.1	Unit eksperimen	59
4.3.2	Replikasi dan jumlah sampel	59
4.4	Variabel Penelitian.....	60
4.4.1	Variabel bebas.....	60
4.4.2	Variabel tergantung.....	60
4.4.3	Variabel kendali	60

4.4.4	Definisi operasional variabel	60
4.5	Alur Penelitian	63
4.6	Alat dan Bahan.....	63
4.7	Tahapan Penelitian.....	64
4.7.1	Isolasi MSCs	65
4.7.2	Randomisasi sampel MSCs	66
4.7.3	Subkultur (<i>passage</i>) MSCs sesuai perlakuan.....	66
4.7.4	Pengukuran marker <i>secretome</i>	66
4.8	Analisa Data.....	70
BAB 5	HASIL PENELITIAN	71
5.1	Perbandingan Jumlah Total Sel pada Masing-masing Perlakuan	75
5.2	Perbandingan Jumlah Sel <i>Osteoblast</i> pada Masing-masing Perlakuan ...	78
5.3	Perbandingan Sekresi TGF β Hari Ke-5 pada Masing-masing Perlakuan	81
5.4	Perbandingan Sekresi BMP 2 Hari Ke-5 pada Masing-masing Perlakuan	83
5.5	Perbandingan Sekresi IGF 1 Hari Ke-5 pada Masing-masing Perlakuan	85
5.6	Perbandingan Sekresi VEGF Hari Ke-5 pada Masing-masing Perlakuan	87
5.7	Perbandingan Sekresi ALP Hari Ke-5 pada Masing-masing Perlakuan.....	89
BAB 6	PEMBAHASAN	92
6.1	Penghitungan Jumlah Sel Total dan <i>Osteoblast</i>	92
6.2	Kadar Sekresi TGF β pada <i>Secretome</i>	95
6.3	Kadar Sekresi BMP 2 pada <i>Secretome</i>	96

6.4	Kadar Sekresi IGF-1 pada <i>Secretome</i>	99
6.5	Kadar Sekresi VEGF pada <i>Secretome</i>	100
6.6	Kadar Sekresi ALP pada <i>Secretome</i>	102
6.7	Kebaruan Penelitian	104
6.8	Kekurangan Penelitian	109
 BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		110
7.1	Kesimpulan	110
7.2	Saran	112
 DAFTAR PUSTAKA		113
 LAMPIRAN		119

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Kadar oksigen pada beberapa jaringan dalam tubuh	33
Tabel 2.2	Pengaruh hipoksia terhadap sekresi protein pada <i>secretome</i> <i>mesenchymal stem cell</i>	38
Tabel 2.3	Kadar faktor pertumbuhan dalam DBM	48
Tabel 5.1	Perbandingan jumlah sel total kelompok perlakuan dengan DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	76
Tabel 5.2	Perbandingan jumlah sel total kelompok perlakuan tanpa DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	77
Tabel 5.3	Perbandingan jumlah sel total kelompok perlakuan dengan DBM dan tanpa DBM dalam kondisi hipoksia	77
Tabel 5.4	Perbandingan jumlah sel total kelompok perlakuan dengan DBM dan tanpa DBM dalam kondisi normoksia	78
Tabel 5.5	Perbandingan jumlah sel osteoblas kelompok perlakuan dengan DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	80
Tabel 5.6	Perbandingan jumlah sel osteoblas kelompok perlakuan tanpa DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	80
Tabel 5.7	Perbandingan jumlah sel osteoblas kelompok perlakuan dengan DBM dan tanpa DBM dalam kondisi hipoksia	81
Tabel 5.8	Perbandingan jumlah sel osteoblas kelompok perlakuan dengan DBM dan tanpa DBM dalam kondisi normoksia	81
Tabel 5.9	Sekresi TGF B pada Hari Ke-5 dengan DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	83
Tabel 5.10	Sekresi TGF B pada Hari Ke-5 tanpa DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia.....	83
Tabel 5.11	Sekresi BMP 2 pada hari Ke-5 dengan DBM dalam Kondisi Normoksia dan Hipoksia	85
Tabel 5.12	Sekresi BMP 2 pada hari Ke-5 tanpa DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	85

Tabel 5.13 Sekresi IGF 1 pada hari Ke-5 dengan DBM dalam Kondisi Normoksia dan Hipoksia	87
Tabel 5.14 Sekresi IGF 1 pada hari Ke-5 tanpa DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	87
Tabel 5.15 Sekresi VEGF pada hari he-5 dengan DBM dalam kondisi normoksia dan Hipoksia	89
Tabel 5.16 Sekresi VEGF pada hari ke-5 tanpa DBM dalam kondisi normoksia dan Hipoksia	89
Tabel 5.17 Sekresi ALP pada hari Ke-5 dengan DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	90
Tabel 5.18 Sekresi ALP pada hari Ke-5 tanpa DBM dalam kondisi normoksia dan hipoksia	91

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Perkembangan <i>mesenchymal stem cell</i>	12
Gambar 2.2	Proses diferensiasi <i>mesenchymal stem cell</i> menuju <i>osteoblast</i> ..	13
Gambar 2.3	Faktor pertumbuhan BMPs dan TGF β	16
Gambar 2.4	Siklus diferensiasi <i>mesenchymal stem cell</i> menuju osteoblas dalam hubungannya dengan osteoklas	17
Gambar 2.5	Grafik ekspresi protein osteokalsin, kolagen tipe 1 dan ALP pada kultur <i>mesenchymal stem cell</i> yang dipromosikan pada proses osteogenesis	22
Gambar 2.6	Grafik perbandingan hasil pengecatan alizarin pada pemberian IGF dan BMP 7 pada hari ke-7	25
Gambar 2.7	Grafik perbandingan hasil pengecatan alizarin pada pemberian IGF dan BMP 7 pada hari ke-14	26
Gambar 2.8	Pengaruh hipoksia terhadap <i>mesenchymal stem cell</i>	35
Gambar 2.9	Pengaruh hipoksia pada proses osteogenesis	37
Gambar 2.10	Parameter yang elektif pada <i>stemness</i> MSC	39
Gambar 2.11	Peningkatan regulasi ekspresi reseptor kemokin oleh HIF-1 α di lingkungan hipoksia untuk memfasilitasi target <i>chemotaxis</i> spesifik organ	41
Gambar 2.12	<i>Secretome</i> merupakan biokatif untuk diferensiasi <i>mesenchymal stem cell</i> menuju osteogenesis	43
Gambar 2.13	Komunikasi antar sel	44
Gambar 2.14	Metode menggunakan sekretom untuk aplikasi dunia medis	45
Gambar 2.15	<i>Secretome</i> yang dihasilkan <i>mesenchymal stem cell</i>	46
Gambar 2.16	Grafik hubungan BMP 2 terhadap ekspresi protein yang lain	49
Gambar 2.17	Grafik hubungan TGF β terhadap sekresi protein yang lain	50
Gambar 3.1	Kerangka konseptual	53
Gambar 4.1	Rancangan penelitian	58

Gambar 4.2	Skema alur penelitian	63
Gambar 5.1	Hasil kultur BM <i>derived mesenchymal stem cell</i>	72
Gambar 5.2	Karakterisasi <i>bone marrow stem cell (BM-MSCs)</i> dengan <i>flow cytometry</i> pada <i>pasase 4</i> masih menunjukkan adanya pertumbuhan <i>haemopoietic stem cell</i>	73
Gambar 5.3	Analisis BM-MSCs dengan menggunakan marker CD 105 yang dilabel <i>fluorescein isothiocyanate (FITC)</i> menunjukkan pertumbuhan sel homogen dan positif CD 105 dilihat dengan mikroskop inverted pembesaran 20x	74
Gambar 5.4	Hasil kultur stem cell pada hari ke-5	75
Gambar 5.5	Grafik perbandingan jumlah sel total pada masing-masing kelompok (dalam kondisi normoksia dan hipoksia)	76
Gambar 5.6	Hasil kultur stem cell pada hari ke-5 pada pengecatan Osteocalcin	78
Gambar 5.7	Grafik Perbandingan jumlah sel <i>osteoblast</i> pada masing-masing kelompok (dalam kondisi normoksia dan hipoksia)	79
Gambar 5.8	Grafik perbandingan kadar TGF B pada hari ke-5 dalam kondisi normoksia dan hipoksia	82
Gambar 5.9	Grafik perbandingan kadar BMP2 pada hari ke-5 dalam kondisi normoksia dan hipoksia	84
Gambar 5.10	Grafik perbandingan kadar IGF 1 pada hari ke-5 dalam kondisi normoksia dan hipoksia	86
Gambar 5.11	Grafik perbandingan kadar VEGF pada hari ke-5 dalam kondisi normoksia dan hipoksia	88
Gambar 5.12	Grafik perbandingan kadar ALP pada hari ke-5 dalam kondisi normoksia dan hipoksia	90
Gambar 6.1	Kebaruan penelitian	108

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Laik Etik	119
Lampiran 2	Proses dan hasil penelitian	120
Lampiran 3	Alat untuk pemeriksaan hipoksia merk Binder	123
Lampiran 4	Hasil pemeriksaan ELISA	124
Lampiran 5	Hasil karakteristik BM-MSK dengan Flowcytometri	130
Lampiran 6	Hasil <i>counting cell</i>	131
Lampiran 7	<i>Osteocalcin – product data sheet</i>	135
Lampiran 8	<i>Manuscript</i>	137
Lampiran 9	Hasil pemeriksaan statistik	152
Lampiran 10	Jumlah total sel kelompok perlakuan	185
Lampiran 11	<i>Quadrant statistics</i>	199

DAFTAR SINGKATAN

ALP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
AP	: <i>Aktivator Protein</i>
ATF4	: <i>Aktivator Faktor Transkripsi</i>
BDNF	: <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BM	: <i>Bone Marrow</i>
BMPs	: <i>Bone Morphogenic Factors</i>
BSP	: <i>Bone Sialoprotein</i>
COL1	: <i>Collagen Type 1</i>
Co-Smads	: <i>Common Smads</i>
DBM	: <i>Demineralized Bone Matrix</i>
DLX	: <i>Distal-less Homeobox</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	: <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	: <i>Fibrous Growth Factor</i>
FITC	: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GF	: <i>Growth Factor</i>
HIF	: <i>Hypoxia Inducible Factor</i>
HRE	: <i>Hypoxia Response Element</i>
HSC	: <i>Hematopoietic Stem Cell</i>
ICC	: <i>Immunocytochemistry</i>
IFN	: <i>Interferon</i>
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
ILs	: <i>Interleukins</i>
IRS	: <i>Insulin Receptor Substrate</i>
I-Smads	: <i>Inhibitory Smads</i>

MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NC	: <i>Negative Control</i>
NFAT2	: <i>Nuclear Factor for Activated T cells 2</i>
NGF	: <i>Nerve growth factor</i>
NIC	: <i>Domain Intraseluler Notch</i>
OC	: <i>Osteocalcin</i>
OCT-4	: <i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
ON	: <i>Osteonectin</i>
OPN	: <i>Osteopontin</i>
OSX	: <i>Osterix</i>
PBS	: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3 Kinase</i>
PKB	: <i>Protein kinase B/ Akt</i>
PKC	: <i>Protein kinase C</i>
PTH	: <i>Hormon Parathyroid</i>
RBP-Jk	: <i>Protein Pengikat Sinyal Rekombinasi – Jk</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
ROS	: <i>Reactive oxygen species</i>
RRE	: <i>RBP-Jk Response Element</i>
R-Smads	: <i>Receptor Smads</i>
RUNX2	: <i>Runt-related Transcription Factor 2</i>
SHC	: <i>Src Homology / α-collagen</i>
SLWDC	: <i>Super Long Working Distance Condenser</i>
SOX2	: <i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosing Factor</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

