

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**BIOMEKANIK FUNGSIONAL REGENERASI DEFEK KARTILAGO
KONDILUS MANDIBULA DENGAN *HUMAN UMBILICAL CORD
MESENCHYMAL STEM CELL* DAN *PLATELET RICH FIBRIN
SCAFFOLD***

TAHUN KE -1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Ni Putu Mira Sumarta, drg., Sp.BM (K)	0029037807
Andra Rizqiawan, drg., Ph.D., Sp.BM	0023098101
Dr. Purwo Sri Rejeki, dr., M.Kes	0012067503

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**

KKA
KK
CP. 46/19
Sum
b



**BIOMEKANIK FUNGSIONAL REGENERASI DEFEK KARTILAGO
KONDILUS MANDIBULA DENGAN *HUMAN UMBILICAL CORD
MESENCHYMAL STEM CELL* DAN *PLATELET RICH FIBRIN
SCAFFOLD***

TAHUN KE -1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Ni Putu Mira Sumarta, drg., Sp.BM (K)	0029037807
Andra Rizqiawan, drg., Ph.D., Sp.BM	0023098101
Dr. Purwo Sri Rejeki, dr., M.Kes	0012067503

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



**BIOMEKANIK FUNGSIONAL REGENERASI DEFEK KARTILAGO
KONDILUS MANDIBULA DENGAN *HUMAN UMBILICAL CORD
MESENCHYMAL STEM CELL* DAN *PLATELET RICH FIBRIN
SCAFFOLD***

TAHUN KE -1 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. Ni Putu Mira Sumarta, drg., Sp.BM	0029037807
Andra Rizqiawan, drg., Ph.D., Sp.BM	0023098101
Dr. Purwo Sri Rejeki, dr., M.Kes	0012067503

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**



INFORMASI KEMENTERIAN RI
KEMENTERIAN RI
KEMENTERIAN RI

INFORMASI KEMENTERIAN RI
KEMENTERIAN RI
KEMENTERIAN RI

INFORMASI KEMENTERIAN RI
KEMENTERIAN RI
KEMENTERIAN RI

INFORMASI KEMENTERIAN RI
KEMENTERIAN RI
KEMENTERIAN RI

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Biomekanik Fungsional Regenerasi Defek Kartilago Kondilus Mandibula dengan human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell dan Platelet Rich Fibrin Scaffold

Peneliti/Pelaksana
 Nama Lengkap : Dr. drg NI PUTU MIRA SUMARTA, S.KG, Sp.B.M
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0029037807
 Jabatan Fungsional : Lektor
 Program Studi : Kedokteran Gigi
 Nomor HP : 0817307913
 Alamat surel (e-mail) : niputu.mira@fkg.unair.ac.id

Anggota (1)
 Nama Lengkap : ANDRA RIZQIAWAN S.KG, Ph.D
 NIDN : 0023098101
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
 Nama Lengkap : PURWO SRI REJEKI
 NIDN : 0012067503
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)
 Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 200,000,000

Mengetahui,
 Wakil Dekan I FKG Universitas Airlangga



(Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes.)
 NIP/NIK 195807091985032001

Kota Surabaya, 14 - 11 - 2018
 Ketua,



(Dr. drg NI PUTU MIRA SUMARTA, S.KG,
 Sp.B.M)
 NIP/NIK 197803292005012001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga



(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.)
 NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

Regenerasi jaringan fungsional memerlukan fungsi biomekanik yang sama seperti jaringan normal. Sifat biomekanik meliputi struktur dan materi yang menunjukkan morfologi seperti geometri yang membentuk sistem fungsional dan respon mekanik jaringan.

Kartilago kondilus mandibula merupakan fibrokartilago yang mempunyai komposisi, dan struktur yang berfungsi untuk mendistribusikan beban yang diterima oleh struktur disekitarnya. Fibrokartilago terutama disusun oleh kolagen tipe I dan mengandung sedikit glikosaminoglikans (GAG). Hal tersebut berbeda dengan kartilago hyalin.

Perkembangan kedokteran regeneratif dan rekayasa jaringan dengan *mesenchymal stem cell* (MSC) telah banyak digunakan dalam regenerasi jaringan termasuk pada regenerasi jaringan kartilago. Sampai saat ini masih banyak penelitian dilakukan untuk mendapatkan regenerasi jaringan kartilago fungsional dan mempunyai keberhasilan jangka panjang yang baik.

Hal tersebut mendorong peneliti melakukan penelitian tentang aplikasi human umbilical cord mesenchymal *stem cell* (hUCMSC) dengan *platelet rich fibrin* (PRF) *scaffold*. Penelitian ini merupakan bagian dari pengembangan *Teaching Industry Stem cell*. Penelitian tentang *stem cell* di Universitas Airlangga sudah sangat banyak dilakukan baik *in vitro*; *in vivo* pada hewan coba, bahkan sudah dilakukan aplikasi klinis terapi SC berdasarkan riset. Riset yang telah dilakukan meliputi kultur MSC dari berbagai sumber jaringan dewasa, potensi diferensiasi MSC menjadi berbagai sel dewasa yang diperlukan dalam terapi sel dan rekayasa jaringan. Pada bidang kedokteran gigi terapi *stem cell* juga memberikan potensi yang besar dalam regenerasi jaringan. Penelitian yang sudah dilakukan terutama mengeksplorasi potensi *stem cell* untuk regenerasi dan rekayasa jaringan tulang. Kelainan sendi temporomandibula juga merupakan masalah dibidang kedokteran gigi yang berpotensi diterapi dengan *stem cell*, sehingga peneliti melakukan penelitian tentang aplikasi human umbilical cord mesenchymal *stem cell* (hUCMSC) dengan *platelet rich fibrin* (PRF) *scaffold*. Penelitian ini merupakan dari *road map* penelitian *stem cell and tissue engineering*.

Penelitian yang telah dilakukan adalah menganalisis potensi diferensiasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* dan diaplikasikan pada defek kartilago mandibula hewan coba *rattus novergicus*. Regenerasi defek kartilago dengan aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* diharapkan dapat digunakan dalam aplikasi klinis sehingga memerlukan bukti fungsi biomekanik yang normal, metode aplikasi secara klinis.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis sifat biomekanik dari regenerasi defek kartilago mandibula dengan hUCMSC dengan PRF *scaffold*. Penelitian akan dilakukan dalam waktu 2 tahun yang terdiri dari: penelitian struktur fibrokartilago defek yang diberi aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* pada tahun pertama meliputi: (1) Perlekatan hUCMSC pada PRF *scaffold* dengan pemeriksaan SEM (*in vitro*), (2) Perbandingan ekspresi kolagen tipe 1 dan 2, (3) ekspresi GAG, (4) diameter fibril kolagen dan susunan zona kartilago. Penelitian biomekanik fibrokartilago defek yang diberi aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* (*in vivo*) pada tahun kedua meliputi: (1) *compression properties* (2) *tension properties* (3) *elastic modulus* (4) *shear strain*. Uji *in vivo* menggunakan hewan coba tikus wistar. Analisis statistik perlekatan hUCMSC pada PRF *scaffold* dengan analisis deskriptif, evaluasi struktur dan biomekanik dengan menggunakan one-way ANOVA dan T-test.

Tahapan yang sudah dilakukan penelitian ekspresi FGF 18, Sox9, Ki67, kolagen tipe II, agregkan, jumlah kondrosit, dan ketebalan kartilago. Luaran penelitian berupa publikasi internasional pada jurnal bereputasi.

Kata kunci: *human umbilical cord*, *mesenchymal stem cell*, regenerasi jaringan, kartilago mandibula



PRAKATA

Puji Syukur ke hadirat Tuhan yang Maha Esa, kami diberi kesempatan untuk menerima hibah penelitian ini. Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kami ucapkan kepada:

1. Pemerintah Indonesia Cq. Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi atas kesempatan untuk memperoleh dana hibah penelitian sehingga penelitian ini dapat terlaksana.
2. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., M.T., Ak., CMA, Rektor Universitas Airlangga, yang telah menyetujui pendanaan penelitian kami melalui Surat Keputusan Rektor tentang Pelaksanaan Penelitian Universitas Airlangga Nomor: 200/UN3.14/LT/2018
3. Prof. Dr. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D, Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi (LPI) Universitas Airlangga beserta seluruh staf LPI atas bantuan dan dukungannya kepada peneliti, terutama di lingkungan Universitas Airlangga.
4. Dr. Darmawan Setijanto, drg., M.Kes. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin dilaksanakannya penelitian ini
5. Anggota peneliti yang sama-sama berjuang untuk melaksanakan penelitian ini.

Semoga penelitian ini dapat memberikan sumbangan kelimuan dan dapat berguna dalam pengembangan terapi kelainan sendi temporomandibula dengan menggunakan mesenchymal stem cell.

Surabaya, 12 Nopember 2018

Ketua Peneliti,

Dr. Ni Putu Mira Sumarta, drg., Sp.BM

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Ringkasan	iii
Prakata	iv
Daftar Isi	v
Daftar Tabel	vii
Daftar Gambar	viii
Bab 1. Pendahuluan	1
Latar Belakang	1
Rumusan Masalah	2
Tujuan Penelitian	2
Tujuan Khusus Penelitian	2
Manfaat Penelitian	3
Target Penelitian	3
Bab 2. Renstra dan Peta Jalan Penelitian Perguruan Tinggi	4
Bab 3. Tinjauan Pustaka	5
3.1 Komposisi dan struktur kartilago kondilus mandibula	5
3.2 Biomekanik sendi temporomandibula	6
3.3 Defek kartilago kondilus mandibula	6
3.4 Terapi defek kartilago kondilus mandibula dengan MSC	7
3.5 PRF sebagai <i>scaffold</i> dalam regenerasi jaringan fibrokartilago	8
3.6 Regenerasi jaringan kartilago kondilus mandibula fungsional	8
Bab 4. Metode Penelitian	8
4.1 Uji perlekatan hUCMSC pada PRF <i>scaffold</i> dengan pemeriksaan SEM	9
4.2 Pemeriksaan struktur jaringan pasca implantasi hUCMSC pada PRF <i>scaffold</i>	11
4.3 Pemeriksaan biomekanik	14
Alur Penelitian	15
Bab 5. Hasil dan Luaran yang Dicapai	17
5.1 Implantasi hUCMSC, PRF, dan hUCMSC + scaffold PRF pada hewan coba	17
5.2 Penyembuhan defek kartilago mandibula	17
5.3 Hasil pemeriksaan ekspresi Sox 9	18

5.4 Hasil pemeriksaan ekspresi FGF 18	18
5.5 Hasil pemeriksaan ekspresi Ki67	19
5.6 Hasil pemeriksaan jumlah kondrosit	19
5.7 Hasil pemeriksaan ekspresi agrekan	20
5.8 Hasil pemeriksaan ekspresi kolagen tipe 2	20
5.9 Hasil pemeriksaan ketebalan kartilago.....	21
Bab 6. Rencana Tahapan Berikutnya	21
Bab 7. Kesimpulan dan Saran	22
Daftar Pustaka	22
LAMPIRAN	24

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Rencana target capaian tahunan	3
------------------	---	----------

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	<i>Road map Pengembangan Stem cell Universitas Airlangga</i> ...	4
Gambar 2.2	<i>Pipeline Pengembangan Stem cell Universitas Airlangga</i>	4
Gambar 4.1	Alur penelitian tahun pertama	16
Gambar 4.2	Alur penelitian tahun kedua	17
Gambar 5.1	Tali pusat dari bayi baru lahir dalam medium transport	18
Gambar 5.2	Isolasi dan kultur hUCMSC	19

BAB 1. PENDAHULUAN**Latar Belakang**

Regenerasi jaringan fungsional memerlukan fungsi biomekanik yang sama seperti jaringan normal. Sifat biomekanik meliputi struktur dan materi. Struktur menunjukkan keseluruhan sistem fungsional jaringan termasuk pengaruh morfologi, seperti geometri jaringan. Materi adalah sifat jaringan yang tidak dipengaruhi oleh geometri, merupakan model yang mendeskripsikan respon mekanik jaringan terhadap beban (Guilak, *et al.*, 2014).

Kartilago kondilus mandibula merupakan fibrokartilago yang mempunyai komposisi, fungsi, dan struktur berbeda dibandingkan dengan kartilago hyalin. Kartilago hyalin berfungsi untuk mendistribusikan beban yang diterima oleh sendi dan mengurangi koefisien friksi selama pergerakan, sedangkan fibrokartilago berfungsi untuk mendistribusikan beban yang diterima oleh struktur disekitarnya. Fibrokartilago terutama disusun oleh kolagen tipe I dan mengandung sedikit glikosaminoglikans (GAG) bila dibandingkan dengan kartilago hyalin yang tersusun oleh kolagen tipe II dan banyak kandungan GAG (Murphy *et al.*, 2015). Fibrokartilago yang menutupi kedua permukaan artikular TMJ merupakan jaringan avaskular sehingga nutrisi jaringan tergantung pada cairan sinovial intraartikular, kedua faktor tersebut menyebabkan kemampuan perbaikan jaringan yang terbatas (Kuroda *et al.*, 2009).

Kedua kartilago tersebut walaupun mempunyai komposisi dan struktur yang berbeda, keduanya merupakan jaringan yang mempunyai kemampuan regenerasi yang rendah. Hal tersebut menyebabkan potensi penyembuhan alami defek kartilago kondilus mandibula yang rendah. Hal tersebut mendorong peneliti melakukan penelitian tentang aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold*.

Kemajuan dalam bidang terapi sel terutama *stem cell* menarik peneliti untuk melakukan penelitian dengan menggunakan *stem cell* untuk mendapatkan regenerasi defek kartilago kondilus mandibula. MSC bisa didapatkan dari berbagai jaringan baik autologous maupun alogenous. Beberapa kerugian penggunaan MSC autologous seperti ketersediaan jaringan yang terbatas dan potensi perbaikan yang dipengaruhi oleh individu atau penyakit (DiMarino *et al.*, 2013). Kerugian tersebut merupakan salah satu alasan penggunaan MSC alogenous dalam perbaikan jaringan. Penelitian Gál *et al.*, (2007) membuktikan bahwa MSC alogenous bersifat *immunoprivilege* dimana tidak mengekspresikan molekul MHC kelas II atau molekul kostimulatori seperti B7 dan CD40, dan juga mengekspresikan beberapa faktor yang menekan respon imun. Salah satu sumber MSC alogenous adalah jaringan tali pusat. MSC yang berasal dari jaringan tali pusat selanjutnya disebut hUCMSC mempunyai kemampuan diferensiasi osteogenik, kondrogenik, dan adipogenik sama seperti MSC dari sumber jaringan dewasa lain. Beberapa penelitian menunjukkan potensi diferensiasi

kondrogenik hUCMSC, seperti penelitian Sumarta *et al.*, (2016) tentang potensi diferensiasi kondrogenik hUCMSC dengan PRF pada kultur *in vitro* menunjukkan terjadi diferensiasi kondrogenik melalui ekspresi kolagen tipe II dan agrekan.

Penelitian ini merupakan bagian dari pengembangan *Teaching Industry Stem cell*. Penelitian tentang *stem cell* di Universitas Airlangga sudah sangat banyak dilakukan baik *in vitro*, *in vivo* pada hewan coba, bahkan sudah dilakukan aplikasi klinis terapi SC berdasarkan riset. Riset yang telah dilakukan meliputi kultur MSC dari berbagai sumber jaringan dewasa, potensi diferensiasi MSC menjadi berbagai sel dewasa yang diperlukan dalam terapi sel dan rekayasa jaringan. Pada bidang kedokteran gigi terapi *stem cell* juga memberikan potensi yang besar dalam regenerasi jaringan. Penelitian yang sudah dilakukan terutama mengeksplorasi potensi *stem cell* untuk regenerasi dan rekayasa jaringan tulang.

Kelainan sendi temporomandibula juga merupakan masalah dibidang kedokteran gigi yang berpotensi diterapi dengan *stem cell*, sehingga peneliti melakukan penelitian tentang aplikasi human umbilical cord mesenchymal *stem cell* (hUCMSC) dengan *platelet rich fibrin* (PRF) *scaffold*. Penelitian ini merupakan dari *road map* penelitian *stem cell and tissue engineering*.

Rencana penelitian ini akan dilakukan dengan kerjasama Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dengan *Stem cell Research and Development Center* Universitas Airlangga dan Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga.

Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, dapat dirumuskan permasalahan yang mendasari penelitian ini adalah apakah aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* pada defek kartilago kondilus mandibula mempunyai biomekanik fungsional yang sama seperti jaringan kartilago kondilus mandibula normal

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis sifat biomekanik dari regenerasi defek kartilago kondilus mandibula dengan hUCMSC dengan PRF *scaffold*.

Tujuan Khusus Penelitian

Penelitian akan dilakukan dalam waktu 2 tahun yang terdiri dari:

Tahun I: penelitian struktur fibrokartilago defek yang diberi aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* meliputi: (1) Perlekatan hUCMSC pada PRF *scaffold* dengan pemeriksaan SEM (*in vitro*), (2) Perbandingan ekspresi kolagen tipe 1 dan 2, (3) ekspresi GAG, (4) diameter fibril kolagen dan susunan zona kartilago.

Tahun II: Penelitian biomekanik fibrokartilago defek yang diberi aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* (*in vivo*) meliputi: (1) *compression properties* (2) *tension properties* (3) *elastic modulus* (4) *shear strain*. Uji *in vivo* menggunakan hewan coba tikus wistar.

Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan didapat dari penelitian ini antara lain:

1. Manfaat Teoritik: membeikan pengetahuan ilmiah tentang sifat biomekanik jaringan kartilago kondilus mandibula yang terbentuk dari hUCMSC dengan PRF *scaffold*
2. Aplikatif, memberikan metode perawatan dengan terapi *stem cell* pada defek kartilago kondilus mandibula dan kelainan sendi temporomandibula

Target Penelitian

Target penelitain dalam 2 tahun ini adalah publikasi artikel ilmiah per tahun pada jurnal internasional bereputasi, dan akan dilanjutkan dengan penelitian biomaterial untuk *scaffold* naik dari bahan natural maupun sintetik sehingga dapat dibuat produk *scaffold* yang dapat digunakan dalam *terapi stem cell* dan rekayasa jaringan kartilago kondilus mandibula.

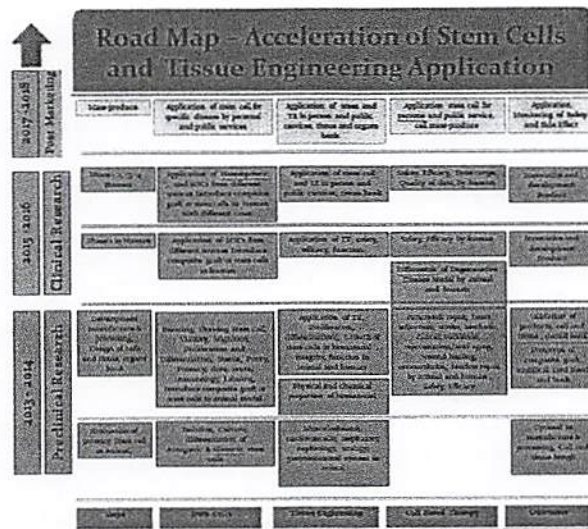
Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian	
	Kategori	Sub-Kategori	Wajib	Tambahan	TS	TS+1
1	Artikel ilmiah dimuat di jurnal	Internasional bereputasi	√		Accepted / Published	Accepted / Published
		Nasional Terakreditasi				
2	Artikel ilmiah dimuat di prosiding	Internasional Terindeks				
		Nasional				
3	<i>Invited speaker</i> dalam temu ilmiah	Internasional				
		Nasional				
4	<i>Visiting Lecturer</i>	Internasional				
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten				
		Paten sederhana				
		Hak Cipta				
		Merek dagang				
		Rahasia dagang				
		Desain Produk Industri				
		Indikasi Geografis				
		Perlindungan Varietas Tanaman				
6	Teknologi Tepat Guna	Perlindungan Topografi Sirkuit Terpadu				

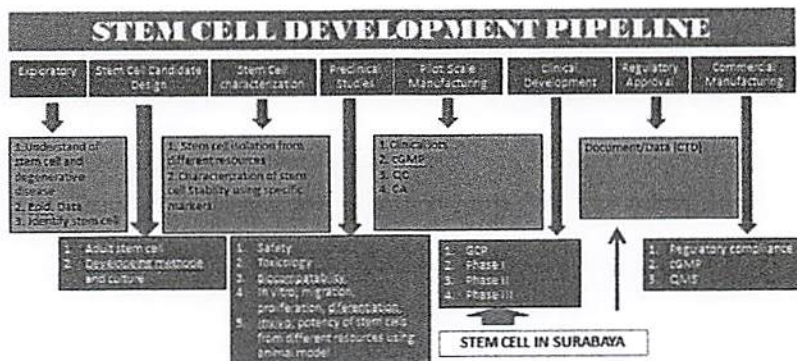
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya Seni/Rekayasa Sosial				
8	Bahan Ajar				
9	Tingkat Kesiapan Teknologi			3	3

BAB 2. RENSTRA DAN PETA JALAN PENELITIAN PERGURUAN TINGGI

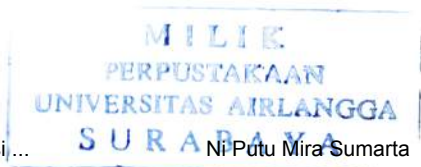
Penelitian ini merupakan bagian dari pengembangan *Teaching Industry Stem cell*, yaitu pengembangan terapi *stem cell* dan rekayasa jaringan pada jaringan neuromuskular sesuai dengan *road map* dan *pipeline* Pengembangan *Stem cell* Universitas Airlangga (gambar 2.1 dan 2.2). Penelitian tentang potensi MSC yang dikultur dari berbagai macam jaringan sudah banyak dilakukan di Universitas Airlangga dan bahkan sudah ada yang digunakan dalam terapi klinis. Usulan penelitian ini merupakan pengembangan dari terapi *stem cell* dan rekayasa jaringan pada defek kartilago kondilus mandibula dan selaras dengan pengembangan *stem cell* di Universitas Airlangga terutama dalam terapi *stem cell* dan rekayasa jaringan neuromuskular.



Gambar 2.1. Road map Pengembangan *Stem cell* Universitas Airlangga



Gambar 2.2. Pipeline Pengembangan *Stem cell* Universitas Airlangga



Rencana penelitian ini akan dilakukan bertahap dan disusun dalam *road map* penelitian aplikasi *stem cell* pada kelainan sendi temporomandibula, sebagai berikut:

1. Penelitian aplikasi *stem cell* dan rekayasa jaringan pada defek kartilago mandibula (*in vitro* maupun *in vivo* pada hewan coba)
2. Penelitian aplikasi *stem cell* dan rekayasa jaringan pada defek diskus sendi temporomandibula
3. Penelitian aplikasi *stem cell* dan rekayasa jaringan pada defek ligamen sendi temporomandibula
4. Pengembangan *scaffold* natural maupun sintetik yang dapat digunakan dalam aplikasi terapi *stem cell* dan rekayasa jaringan pada kelainan sendi temporomandibula
5. Aplikasi klinis terapi *stem cell* dan rekayasa jaringan

Luaran penelitian ini akan memberikan kontribusi pada pengembangan terapi *stem cell* dan rekayasa jaringan pada jaringan neuromuskular, sehingga akan menjadi pelengkap potensi terapi *stem cell* dan rekayasa jaringan yang nantinya diharapkan dapat digunakan dalam aplikasi klinis dan produksi yang dapat disimpan dalam bank jaringan.

BAB 3. TINJAUAN PUSTAKA

3.1 Komposisi dan struktur kartilago kondilus mandibula

Kartilago disusun oleh sel kondrosit yang terdapat dalam matriks ekstraseluler, seperti proteoglikan, glikosaminoglikan, dan kolagen tipe II, IX, dan XI (Kuroda *et al.*, 2009). Matriks ekstraseluler mempunyai peran penting dalam adhesi, survival, migrasi, proliferasi dan diferensiasi sel (Behonick & Werb, 2003; Kim *et al.*, 2011). Interaksi antara kondrosit dan matriks ekstraseluler meregulasi beberapa proses biologis yang penting dalam homeostasis dan perbaikan kartilago artikular (Gao *et al.*, 2014). Sama seperti kartilago hyalin, kartilago kondilus mandibula juga terdiri dari fase cair yang disusun oleh air dan elektrolit terlarut dengan volume 80%, yang menentukan viskoelastisitas jaringan; dan fase solid yang disusun oleh kolagen dan proteoglikan (Lu *et al.*, 2009).

Susunan zona kartilago dapat diketahui dengan pengecatan Safranin O fast green. GAG tidak didapatkan pada zona fibrous tetapi didapatkan banyak pada zona matur dan hipertrofik. Fibril kolagen pada permukaan dan zona fibrous berukuran lebih besar daripada fibril kolagen pada zona proliferasi dan matur. Fibril kolagen pada zona fibrous tersusun dalam lapisan ortogonal. Zona proliferasi tampak seperti struktur yang bercabang ke segala arah dan sel pada zona ini berbentuk bulat, kontras dengan fibroblas yang memanjang pada zona fibrous. Zona hipertrofik ditandai dengan pembesaran ukuran kondrosit yang dramatis,

jalinan kolagen mengalami remodeling sehingga volume membesar dan septa yang terkompresi diantara lakuna sel (Vanden Berg-Foels, 2016).

Kondrosit adalah satu-satunya sel yang terdapat dalam kartilago artikular. Sel tersebut tertanam dalam matriks ekstraseluler dengan kepadatan sel kira-kira 10.000 sel per mm^3 , yang merupakan 1,7% volume jaringan sehingga dapat dikatakan bahwa lebih dari 98% jaringan kartilago artikular adalah matriks ekstraseluler (Matsiko *et al.*, 2013). Kondrosit terletak terisolasi antara satu dengan yang lain oleh matriks ekstraseluler yang padat sehingga transport nutrisi dan pembuangan sisa metabolik harus terjadi melalui difusi pada matriks ekstraseluler. Hal tersebut menyebabkan kondrosit berada pada lingkungan dengan tekanan oksigen rendah yang merupakan lingkungan yang tidak mendukung penyembuhan. Kondrosit terjebak dalam lakuna dan tidak dapat bermigrasi ke daerah yang rusak, dan diperberat dengan produksi matriks ekstraseluler yang sangat lambat pada daerah yang rusak (Mobasheri *et al.*, 2014).

3.2 Biomekanik sendi temporomandibula

Sendi temporomandibula merupakan sendi diarthrodial penyangga beban. Gaya yang timbul sebagai reaksi sendi terjadi kearah atas dan kedepan melalui eminensia artikularis, bukan terjadi secara vertikal melalui dasar fossa. Gerakan mandibula menimbulkan beban statik dan dinamik. Selama pembebanan normal sendi, terjadi *compressive*, *tensile*, dan *shear load* pada permukaan artikular (Jain *et al.*, 2016). Beban statik terjadi saat *clenching*, *grinding*, dan *bruxism*, sedangkan beban dinamik terjadi saat menguap dan berbicara. Beban mekanik diperlukan dalam pertumbuhan, perkembangan dan pemeliharaan jaringan sendi (Kuroda *et al.*, 2009).

Sendi temporomandibula harus berfungsi secara berpasangan dan pergerakan sendi melibatkan kedua kompartemen sendi. Permukaan kartilago kondilus mandibula terdiri dari proteoglikan terutama agregkan dan versikan sehingga lebih tahan terhadap gaya kompresif dibandingkan dengan diskus artikularis yang sebagian besar tersusun dari serat kolagen. Modulus elastisitas kartilago kondilus mandibula serupa dengan modulus elastisitas pada kartilago hyalin pada sendi lain (Tsai *et al.*, 2015). *Finite element modeling* (FEM) telah digunakan secara luas pada penelitian biomekanik karena kemampuannya untuk mensimulasi geometri, gaya, *stress*, dan sifat mekanik komponen sendi temporomandibula. *Compressive load* dominan terjadi pada permukaan kondilus yang cembung sedangkan *tensile stress* dominan terjadi pada kompleks fossa-eminensia yang cekung (Jain *et al.*, 2016).

3.3 Defek kartilago kondilus mandibula

Trauma merupakan salah satu penyebab defek pada kartilago kondilus mandibula. Mikrotrauma maupun makrotrauma dapat menyebabkan defek pada kartilago kondilus

mandibula karena terjadi produksi mediator radang dan nyeri yang dapat menyebabkan degenerasi kartilago artikular (Tanaka *et al.*, 2008). Sitokin proinflamasi seperti interleukin 1 (IL-1) atau *tumor necrosis factor* α (TNF- α) meningkat pada sendi setelah terjadi trauma, yang mungkin berperan penting pada patogenesis artritis pasca trauma (Furman *et al.*, 2006).

Adb-Ul-Salam *et al.*, (2002) melaporkan perubahan intraartikular sendi temporomandibula yang terjadi setelah trauma *whiplash* meliputi sinovitis, adhesi, kondromalasia dan kombinasi ketiga hal tersebut. Perubahan tersebut identik dengan berbagai tahap perkembangan penyakit sendi degeneratif.

Kartilago kondilus mandibula merupakan fibrokartilago yang mempunyai komposisi, fungsi, dan struktur berbeda dibandingkan dengan kartilago hyalin (Murphy *et al.*, 2015). Sama seperti kartilago hyalin, fibrokartilago yang menutupi kedua permukaan artikular TMJ merupakan jaringan avaskular sehingga nutrisi jaringan tergantung pada cairan sinovial intraartikular, kedua faktor tersebut menyebabkan kemampuan perbaikan jaringan yang terbatas (Kuroda *et al.*, 2009). Hal tersebut menyebabkan perlunya prosedur rekonstruksi bila terdapat defek pada kartilago kondilus mandibula agar tidak menimbulkan degenerasi lebih lanjut.

3.4 Terapi defek kartilago kondilus mandibula dengan MSC

Tujuan utama terapi defek kartilago adalah untuk menghilangkan nyeri dan mengembalikan fungsi sendi, dan untuk mencegah atau menghambat kerusakan sendi lebih lanjut (Naujoks *et al.*, 2008, Sinno *et al.*, 2010). Pesatnya perkembangan terapi *stem cell*, biomaterial, dan rekayasa jaringan memberikan harapan dalam terapi defek kartilago kondilus mandibula.

MSC adalah sel yang mampu memperbarui dirinya sendiri dan mampu berkembang menjadi berbagai jaringan mesenkimal. MSC yang berasal dari jaringan dewasa telah digunakan dalam aplikasi klinis secara alogenik (Hwang *et al.*, 2008). Salah satu MSC yang mempunyai potensi diferensiasi kearah fibrokartilago adalah hUCMSC. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa MSC yang berasal dari tali pusat mempunyai potensi fibrogenesis yang lebih tinggi dengan produksi GAG dan kolagen tipe I yang lebih tinggi dibandingkan dengan MSC yang berasal dari *bone marrow* (Wang *et al.*, 2009). Hal tersebut menjadikan MSC yang berasal dari tali pusat mungkin merupakan sumber sel yang lebih baik untuk regenerasi jaringan fibrokartilago (Zhang *et al.*, 2015). Penelitian Sumarta *et al.*, (2016) juga menunjukkan potensi diferensiasi kondrogenik hUCMSC yang tinggi dimana hUCMSC yang dikultur dengan PRF scaffold mampu berdiferensiasi kearah diferensiasi kondrogenik dan membentuk matriks melalui ekspresi kolagen tipe II dan agrekan. Hal tersebut disebabkan karena MSC mampu mensekresi berbagai macam faktor bioaktif seperti faktor pertumbuhan,

sitokin, mikrovesikel dan eksosom yang merupakan faktor trofik yang penting dalam regenerasi jaringan (Zhang *et al.*, 2015).

3.5 PRF sebagai *scaffold* dalam regenerasi jaringan fibrokartilago

PRF adalah matriks fibrin yang didapatkan dari darah autologus yang dimasukkan kedalam tabung gelas tanpa penambahan antikoagulan, serta langsung dilakukan sentrifugasi (Kazemi *et al.*, 2014). Bahan ini adalah matriks sikatriks autologous yang tampak seperti *fibrin glue* atau konsentrat platelet, terdiri dari matriks fibrin yang dipolimerisasi dalam struktur tetra molekul dan terdapat platelet; faktor pertumbuhan seperti PDGF- β , TGF β -1, VEGF, IGF-I, leukosit, sitokin seperti IL-1 β , IL-6, IL-4, dan TNF α ; dan *stem cell* yang bersirkulasi.

Matriks fibrin yang terdapat dalam PRF bersifat fleksibel, elastis dan sangat kuat. Terdiri dari konsentrasi trombin lemah dengan ikatan sama sisi sehingga terbentuk jaringan fibrin yang halus dan fleksibel, yang mendukung terjadinya migrasi sitokin dan sel. Dalam regenerasi jaringan, matriks fibrin bersifat sebagai *scaffold* untuk memfasilitasi diferensiasi MSC (Khiste & Tari, 2013). Hal tersebut membuat PRF menjadi salah satu biomaterial alami yang baik sebagai *scaffold* dalam regenerasi jaringan.

3.6 Regenerasi jaringan kartilago kondilus mandibula fungsional

Faktor yang harus dipenuhi untuk mendapatkan regenerasi jaringan fungsional adalah sel, faktor pertumbuhan dan *scaffold* sebagai matriks bagi perlekatan sel dan membentuk struktur jaringan. Pada penelitian sel didapatkan dari hUCMSC. Faktor pertumbuhan berasal dari MSC dan PRF juga mengandung banyak faktor pertumbuhan selain juga merupakan *scaffold* yang baik bagi regenerasi kartilago kondilus mandibula. Regenerasi defek kartilago mandibula harus mampu menahan beban sama seperti jaringan normal sehingga regenerasi jaringan tersebut merupakan regenerasi jaringan fungsional.

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan *post test only control group design*, pada kultur sel dan hewan coba. Penelitian direncanakan dalam 2 tahun yang terdiri dari:

1. **Tahun I:** Pemeriksaan marker kondogenik FGF 18, Sox 9, Kolagen tipe II, aggrekan, penelitian struktur fibrokartilago defek yang diberi aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* meliputi: (1) Perlekatan hUCMSC pada PRF *scaffold* dengan pemeriksaan SEM (*in vitro*), (2) Perbandingan ekspresi kolagen tipe 1 dan 2, (3) ekspresi GAG, (4) diameter fibril kolagen dan susunan zona kartilago.

2. **Fahur H.** Penelitian biomekanik fibrokartilago defek yang diberi aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold* (*in vivo*) meliputi: (1) *compression properties* (2) *tension properties* (3) *elastic modulus* (4) *shear strain*. Uji *in vivo* menggunakan hewan coba tikus wistar.

4.1. Uji Perlekatan hUCMSC pada PRF *scaffold* dengan pemeriksaan SEM

Uji perlekatan dengan pemeriksaan SEM ini dilakukan setelah melalui prosedur pengambilan, isolasi dan kultur ekspansi, karakterisasi sebagai berikut:

1. Prosedur pengambilan *human umbilical cord* (hUC)

Sampel *human umbilical cord* (hUC) diambil dari tali pusat bayi yang baru dilahirkan melalui persalinan *sectio cesaria* dengan indikasi elektif dan tanpa penyulit medis. Pengambilan dilakukan setelah pemberian *informed consent* dan mendapatkan persetujuan dari ibu yang bersedia menjadi donor.

Prosedur pengambilan hUC adalah sebagai berikut. Setelah bayi dilahirkan dan UC dipotong, kemudian sampel UC diambil sepanjang 2 cm, dilakukan transportasi ke laboratorium dalam kontainer steril yang berisi bufer salin steril dan bebas jamur, serta diproses dalam 48 jam.

2. Prosedur isolasi dan kultur ekspansi hUCMSC

Untuk mengisolasi hUCMSC, tali pusat didapatkan dari persalinan *sectio cesaria* dilakukan pencucian beberapa kali dengan salin steril, pembuluh darah dibersihkan dari darah dan pembuluh darah dengan salin kemudian pembuluh darah dipisahkan dari *warthon's jelly*. Dilakukan pemotongan *warthon's jelly* menjadi fragmen ukuran $0,5 \text{ mm}^3$ setelah jaringan vena dan arteri dibuang, kemudian dilakukan digesti enzimatik dengan 0,075% kolagenase tipe II selama 30 menit dan kemudian dengan tripsin 0,125% selama 30 menit, dikocok dengan lembut dalam suhu 37°C . Campuran tersebut kemudian disaring dengan filter berukuran $100 \mu\text{m}$ untuk mendapatkan suspensi sel.

Sel ditanam dengan densitas $1 \times 10^6 \text{ sel/cm}^2$ dan dimasukkan kedalam tabung kultur. Medium pertumbuhan terdiri dari *Dubelcco's modified Eagle's medium* dengan glukosa rendah (DMEM-LG) dan *fetal bovine serum* (FBS) 5%, ditambah suplemen VEGF 10 ng/mL, EGF 10 ng/mL, penisilin/streptomisin 100 U, dan L-glutamin 2mM. Kultur dilembabkan dengan CO_2 5% dalam suhu 37°C . Setelah 3 hari kultur, medium diganti dan dilakukan pembuangan sel yang tidak melekat. Kemudian medium diganti 2 kali setiap minggu. Setelah dicapai 60-80% *confluence*, sel yang melekat dipindahkan ke lempeng kultur lain dengan densitas $1 \times 10^4 \text{ sel/cm}^2$ pada medium pertumbuhan untuk ekspansi.

3. Karakterisasi hUCMSC

Karakterisasi MSC dilakukan pada pasase 4 dengan pemeriksaan imunositokimia dan *flowcytometry* dengan mesin BD FACScalibur, sel yang telah *monolayer* dijadikan *single cell* dengan proses tripsinasi. Setelah penambahan tripsin, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm, selama 5 menit. Pelet sel ditambahkan medium penumbuh DMEM-LG sebanyak 1 ml, diresuspensi dan ditanam pada gelas obyek khusus sebanyak 20 μ l. Gelas obyek diletakkan di dalam kotak yang didalamnya sudah terdapat kertas basah, lalu diinkubasi pada suhu 37°C, selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan fiksasi dengan formaldehid 3% selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah itu dilakukan pencucian dengan PBS sebanyak 4 kali, dikeringkan, *blocking* dengan PBS yang mengandung serum 1% selama 15 menit pada suhu ruang, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 4 kali dan dikeringkan. Pada masing-masing sampel ditambahkan antibodi CD45 atau CD105 yang telah berlabel FIT-C, diinkubasi pada 37°C selama 45 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS sebanyak 4 kali, dikeringkan dengan air disekitar gelas obyek dengan kertas tisu. Selanjutnya diteteskan 50% gliserin di atas gelas obyek, langsung dilihat hasilnya dengan mikroskop fluoresen pada pembesaran 40x, bila tampak berpendar berarti hasilnya positif, kalau tidak berpendar maka hasilnya negatif.

4. Pembuatan PRF

Platelet Rich Fibrin dibuat dengan mengambil 1 ml darah vena, dimasukkan kedalam tabung kaca tanpa antikoagulan dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit sampai terpisah menjadi 3 lapisan, kemudian diambil lapisan tengah, setelah lapisan atas yang berwarna kekuningan dibuang.

5. Kultur hUCMSC dengan PRF Scaffold

PRF dengan diameter 1 mm dimasukkan kedalam *plate* kultur yang berisi medium kultur diferensiasi kondrogenik yang berisi *high glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), ITS-plus, 2 mM L-glutamin, 100 μ g/ml sodium piruvat, 0.2 mM asam askorbat- 2 fosfat, 10^{-7} M deksametason, dan 10 ng/ml TGF- β 3. Kultur dilakukan dalam 48 jam.

6. Pemeriksaan SEM

Kultur hUCMSC dengan PRF *scaffold*, difiksasi dengan larutan *glutaraldehyde* 2% selama 2-3 jam pada suhu 40C, dicuci dengan larutan PBS sebanyak 3 kali masing-masing selama 5 menit, lalu diganti dengan larutan *osmic acid* 1% selama 1-2 jam pada suhu 40C dan dilanjutkan dengan pencucian yang sama dengan PBS seperti di atas. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat: 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, dan absolut, masing-masing selama 15-20 menit. Cairan selanjutnya diganti dengan *Amyl Acette* absolut sebagai pengawet sampai menunggu waktu pengeringan. *Scaffold* dikeringkan dengan alat *critical point drying*

(CPD). Setelah ditempelkan pada *stub (holder)* dengan lem khusus dan dilapisi dengan emas murni dengan alat *vacuum evaporator*, maka *scaffold* siap untuk diamati dan dipotret dengan *scanning electron microscope (JEOL JSM-T100 Scanning Microscope, Japan)*.

4.2 Pemeriksaan Struktur Jaringan pasca implantasi hUCMSC dengan PRF *scaffold*

1. Pemeriksaan imunohistokimia ekspresi kolagen tipe I, kolagen tipe 2 dan GAG

Metode Immunohistokimia dilakukan dengan menggunakan metode *streptavidin-biotin-peroksidase* yang dilabel dengan *streptavidin biotin* (Dako, Carpinteria, USA). Jaringan yang telah disayat dengan mikrotom dengan ketebalan 4 μ yang sudah diletakkan pada gelas obyek yang telah diberi poly L-lisin dilakukan dideparafinisasi dengan *xylene* selama 15 menit dan direhidrasi dengan alkohol 100% dan alkohol yang konsentrasinya diencerkan menjadi 90%, 80%, 70% dan 60% selama masing masing 10 menit. Sediaan kemudian dicuci dengan dH₂O sebanyak 2 kali selama 5 menit dan diinkubasi dengan larutan PBS selama 5 menit. Selanjutnya, sediaan preparat diletakkan ke dalam *glass box* yang berisi bufer sitrat kemudian dimasukkan kedalam *autoclave* selama 15 menit untuk mengoptimalkan antigenitasnya. Sediaan didinginkan pada suhu ruangan selama 1 jam, dan setelah dikeringkan jaringan diberi batas dengan menggunakan *pap pen*. Sediaan dicuci dengan dH₂O selama 5 menit dan PBS selama 5 menit sebelum diinkubasi dengan hydrogen peroksidase 0.3% selama 15 menit. Kemudian setelah endogenous peroksidase diblok, sediaan diinkubasi dengan *blocking solution* selama 30 menit untuk memblok avidin yang terdapat pada jaringan. Kemudian, sediaan diinkubasi *overnight* pada suhu -4°C dengan antibodi primer yaitu antibodi poliklonal *goat anti rat* terhadap kolagen tipe I dan kolagen tipe II, *rabbit antimouse* terhadap GAG diencerkan 1:100. Sediaan dicuci lagi sebanyak 3 kali dengan dH₂O sebelum diinkubasi dengan antibodi sekunder universal *biotin conjugate* dan *streptavidin* selama masing masing 30 menit. Untuk pewarnaan digunakan 3,3 *diamino benzidine tetrahydrochloride* kurang lebih 10 menit sampai didapatkan reaksi pewarnaan yang dapat dideteksi dengan pemeriksaan mikroskopis. Setelah itu diwarnai lagi dengan hematoksilin untuk memperjelas inti sel selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir selama 5 menit. Sediaan didehidrasi dengan menggunakan alkohol yang konsentrasinya dinaikkan secara bertahap dari 70%, 80%, 90% sampai 100% selama masing masing 2 menit. Setelah itu sediaan dicelupkan kedalam *xylene* selama 5 menit. Terakhir, sediaan diberi malinol sebelum ditutup dengan *deg glass*. Hasil dari pemeriksaan imunohistokimia akan dikelompokkan berdasarkan jumlah sel yang terwarna dari pewarnaan, yaitu dikatakan positif bila terdapat *immunostaining* inti dan lebih dari 5% sel positif perwarnaan, pada mikroskop cahaya (Nikon E100) dengan pembesaran 400x dan difoto dengan kamera Sony ILCE 6000.

2. Pemeriksaan PCR kolagen tipe I, kolagen tipe 2 dan GAG

Tahapan pemeriksaan:

Hasil irigasi ditambah 1 ml RNAzol® Reagent, keduanya dicampur dengan cara di-vortex, kemudian inkubasi selama 5 menit pada suhu kamar. Selanjutnya di centrifuge 10.000 rpm selama 10 menit temperatur 4 0C, diambil viscous supernatant dan dipindahkan tabung baru. Pada tabung baru tersebut ditambahkan 0,5 ml 100% ethanol (absolute), di bolak-balik, di inkubasi pada suhu kamar selama 1-3 menit, centrifuge 4000 rpm selama 1-2 menit temperatur 40C. Supernatant dibuang dengan hati-hati agar RNA (pelet) tidak ikut terbuang. Pelet dicuci dengan 0,8-1 ml 75% ethanol sebanyak 2 kali dan setiap kali pencucian tabung dibolak-balik sebanyak 3-6 kali. Tabung diletakkan pada posisi tegak selama 0,5-1 menit, setelah itu ethanol 75% dibuang dengan cara pipeting atau decanting. Pelet dikeringkan dengan cara membiarkan tabung terbuka selama 5-15 detik. Pelet yang berisi RNA tersebut dilarutkan dengan 25-30 µl DW, di-vortex secukupnya, kemudian di simpan pada suhu -20° C. Pengukuran kadar dan kemurnian RNA pada sampel penelitian yang sebelumnya telah diekstraksi RNANYA menggunakan UV-spectrophotometer. Kemurnian RNA ini diukur dengan nilai perbandingan serapan pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Nilai panjang gelombang 260 nm digunakan untuk pengukuran kuantitas atau kadar RNA dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar RNA} = (A_{260} \times \text{faktor pengenceran} \times 50) \mu\text{g/mL}$$

Keterangan :

A₂₆₀: nilai absorbansi sampel RNA pada panjang gelombang 260 nm

50 (Konversi Spectrophotometer): Nilai satu dalam satuan absorbansi gelombang 260 nm sama dengan 50 µg/ml RNA. Idealnya, nilai ratio ($\lambda_{260} : \lambda_{280}$) yang didapatkan seharusnya berkisar antara 1.8 – 2.0 (RNA dikatakan murni atau kualitas RNA baik). Jika nilai ratio lebih kecil dari 1.8, berarti RNA tersebut telah terkontaminasi dengan protein lain. Namun bila nilai ratio lebih besar dari 2.0, ada RNA dalam sampel tersebut.

Perancangan dan optimasi PCR primer Kolagen tipe I, Kolagen tipe II, dan GAG

Program PCR (Promega Corporation, 2010):

PCR Mix sebanyak 12,5 µl ditambah dengan kedua primer (masingmasing 2,5 µl). Kemudian DNA dari lokus yang akan diperiksa (vWA). Setelah itu, tambahkan nuclease free water sehingga volume total sebesar 25µl.

- tahap I: - initial denaturation 96°C selama 2 menit
 --subsequent denaturation 94°C selama 1 menit
 - annealing 60°C selama 1 menit - extension 70°C selama 1 menit 30 detik
 - cycle: 10 cycles

- tahap II: - denaturation 90°C selama 1 menit
- annealing 60°C selama 1 menit (Tergantung pada masing-masing primer)
- extension 70°C selama 1 menit 30 detik

Visualisasi hasil PCR dengan menggunakan elektroforesis pada gel

A. Pembuatan Gel Poliacrylamide

Masing-masing plat kaca dietsa pada satu sisi kemudian ditandai. Cuci dengan ethanol 95% dan Kimwipes® sebanyak 2x pada bagian plat kaca yang panjang dan yang pendek. Aplikasikan 3ml larutan Gel slick® pada bagian plat kaca yang lebih panjang yang telah dietsa kemudian diratakan pada seluruh permukaan dengan gerakan memutar menggunakan lap kering. Tunggu 5 menit sampai larutan Gel slick® mengering. Bersihkan kelebihan larutan Gel Slick® yang masih tersisa dengan lap yang telah diberi distilled water, lalu keringkan dengan Kimwipes® tissue. Persiapkan larutan fresh binding dengan menambahkan 3µl silane kedalam 1 ml asam asetat 0,5% didalam 95% ethanol pada tabung 1,5ml. Usap bagian plat kaca pendek dengan Kimwipes® tissue yang telah disaturasi dengan larutan fresh binding. Tunggu 5 menit sampai larutan kering. Usap dengan ethanol 95% dan Kimwipes® tissue 3-4x untuk membersihkan kelebihan larutan. Hindari kontak antara 2 bagian plat kaca yang telah diberi perlakuan dengan menempatkan spacer 0,4 mm. Siapkan larutan acrylamide 6% dengan mencampurkan : Urea 31,50 gr ditambah dengan distilled water 36,25 ml + 10x TBE buffer 3,75 ml+ 40 % acrylamide:bis (19:1) 11,25 ml sehingga hasil akhir volume larutan sebesar 75 ml. Saring larutan acrylamide dengan filter 0,2 micron. Campurkan larutan acrylamide dengan TEMED 50µl dan 10% ammonium persulfate 500µl. Tuangkan perlahan larutan acrylamide diantara plat kaca, hindari terbentuknya gelembung udara dengan cara menuangkan perlahan dan konstan pada satu sisi. Berikan cetakan atau comb pada gel diantara plat kaca (yang dipakai berisi 9 cetakan).

B. Running gel elektroforesis

Pindahkan comb dan spacer yang dipasang pada gel. Tambahkan 0,5x TBE pada ruangan dibagian bawah alat elektroforesis. Masukkan sampel DNA hasil PCR pada bagian cetakan di gel sebesar masing-masing 10 µl. Masukkan larutan marker sebesar 3 µl pada sumuran yang dikehendaki. Running gel elektroforesis dengan listrik kekuatan 100 volt sampai larutan turun kebawah seluruhnya.

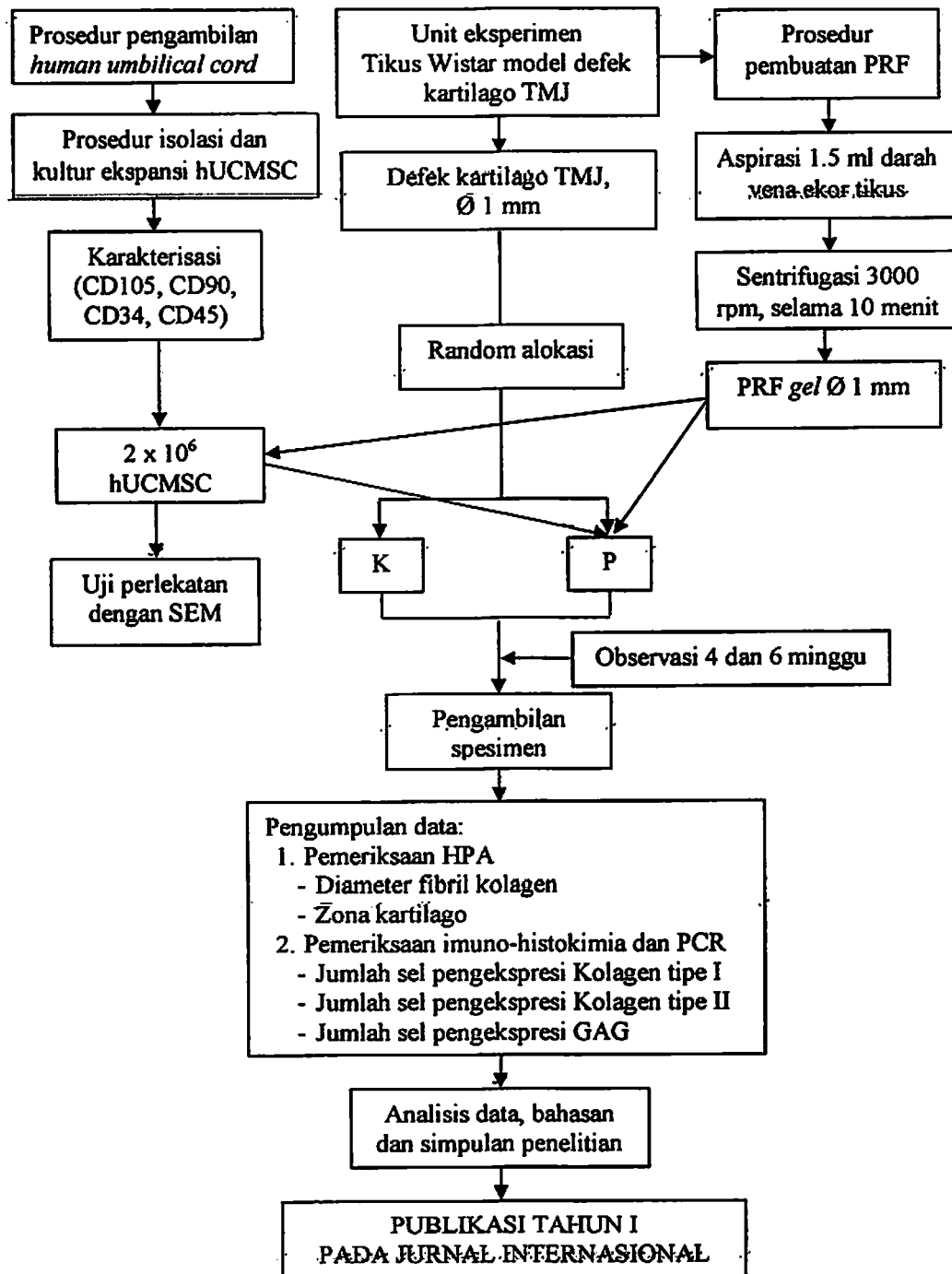
3. Pemeriksaan Diameter kolgaen fibril dan zona kartilago dengan pengecatan HE

Jaringan yang telah disayat dengan mikrotom yang sudah diletakkan pada gelas obyek kemudian dilakukan deparaffinisasi, yaitu menghilangkan parafin yang ada di dalam jaringan dengan cara memasukkan sayatan jaringan tersebut secara berturut-turut ke dalam xylol sebanyak 3 kali selama 2 menit, setelah itu dimasukkan secara berturut-turut ke dalam etanol

dengan konsentrasi bertahap menurun yaitu mulai dari etanol 100% sebanyak 3 kali, masing-masing selama 1 menit, kemudian 95% sebanyak 2 kali masing-masing selama 1 menit, selanjutnya 90%, 80% dan 70% masing-masing selama 1 menit, setelah itu dilakukan pencucian dengan air mengalir sekitar 5 menit, kemudian dimasukkan kedalam Harris Haematoxylin selama 6 menit, kemudian dibilas dengan air. Selanjutnya dimasukkan pada alkohol asam 1% dicelupkan 3-5 kali dan di bilas lagi dengan air, kemudian dicelupkan pada air amoniak sampai berwarna biru, kemudian dimasukkan ke dalam larutan eosin, dan selanjutnya berturut-turut dimasukkan ke dalam etanol 95% sebanyak 2 kali masing-masing selama 1 menit, xylol sebanyak 3 kali masing-masing selama 2 menit, kemudian dilakukan *mounting* dengan entelan, kemudian diamati pada mikroskop cahaya (Nikon E100) dengan pembesaran 400x dan difoto dengan kamera Sony ILCE 6000.

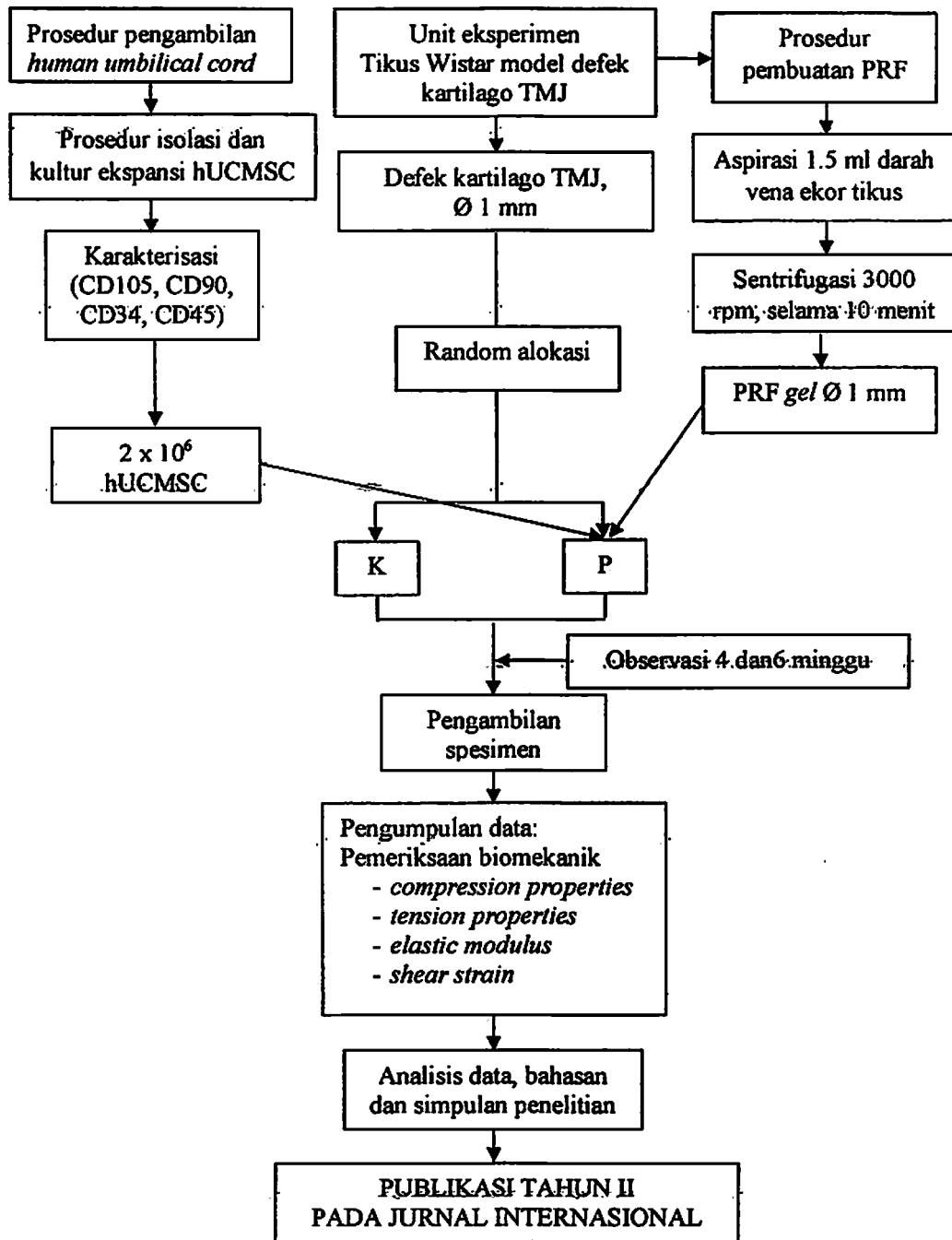
4.3 Pemeriksaan Biomekanik

Incremental stress relaxation test dilakukan dengan menggunakan sistem tes material. Sebuah tabung tertutup yang dibuat khusus dikondisikan pada lingkungan yang konstan dengan PBS 0,15M pada suhu 37°C. spesimen diambil (grip) dengan *tensile clamp* dengan menggunakan kertas amplas halus. Spesimen diberikan tekanan 0,05 N (setara dengan 9kPa). Dilakukan pengukuran awal jarak antar grip. *Strain* spesimen didapatkan dari perubahan jarak antar grip dibagi dengan panjang spesimen awal. *Stress* spesimen dihitung dengan membagi besarnya gaya tercatat pada sistem tes material dengan area kroseksional yang didapatkan dari lebar dan ketebalan awal. Sebelum tiap *stress-relaxation test* selama 10 siklus antara 0% - 2% *Strain* dengan laju 0,2% *strain* per detik. Setelah prekondisi spesimen diregangkan (*strain*) bertahap dari 5%, 10%, 15%, 20%, dan 30%, dengan periode relaksasi 15, 15, 15, 20, dan 20 menit. Young's modulus dihitung pada lengkung terbaik pada 40-100% kurva *stress-strain* selama penurunan fase tiap regangan bertahap tersebut (Wright *et al.*, 2016).

ALUR PENELITIAN**4.7.8.6 Skema Tahapan Penelitian****Tahun I**

Gambar 4.1 Alur penelitian tahun pertama

Tahun II



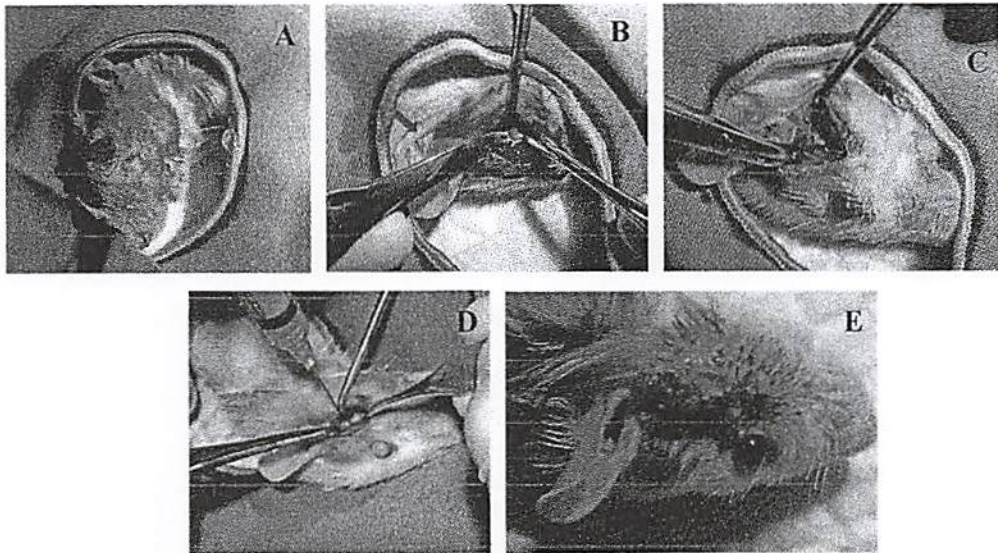
Gambar 4.2 Alur penelitian tahun kedua

BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1 Implantasi hUCMSC, PRF, dan hUCMSC + *scaffold* PRF Pada Hewan Coba

Implantasi sel dari hUCMSC pada kelompok P1 dengan densitas 2×10^6 , pada kelompok P2 diimplantasikan PRF dengan diameter 1 mm, menutupi seluruh bagian defek, dan pada kelompok P3 dilakukan implantasi sel yang telah *diseeding* pada PRF *gel* melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. PRF dan sel yang telah tercampur kedalam defek sehingga menutupi keseluruhan defek kartilago mandibula. Luka kemudian dijahit lapis demi lapis dengan benang silk 4.0.

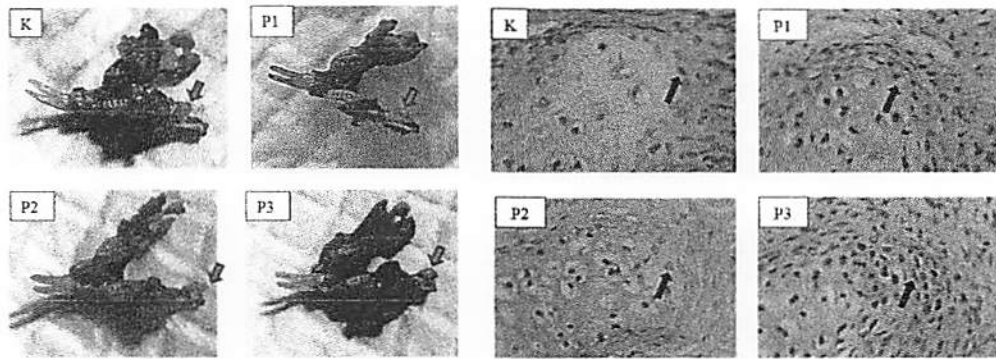


Gambar 5.1 Pembedahan pada hewan coba. (A). Desinfeksi daerah operasi yang telah dilakukan pencukuran, (B). Insisi dan diseksi sampai ditemukan kondilus mandibula (panah hijau), (C). Defek pada kartilago mandibula yang dibuat dengan bur bulat (panah hijau), (D). implantasi hUCMSC dan PRF, (E). Luka operasi dijahit dengan benang silk 4.0.

5.2 Penyembuhan defek kartilago mandibula

Pengamatan secara makroskopik yang dilakukan saat pengambilan spesimen menunjukkan penyembuhan dengan terbentuknya kembali kartilago. Kelompok perlakuan menunjukkan penyembuhan yang hampir sama, permukaan kartilago tampak halus sedangkan kelompok kontrol menunjukkan permukaan kartilago yang tidak rata seperti ditunjukkan dengan panah biru pada Gambar 5.2, dan pemeriksaan mikroskopik kontrol menunjukkan lapisan kartilago yang tipis jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan (Gambar 5.2).

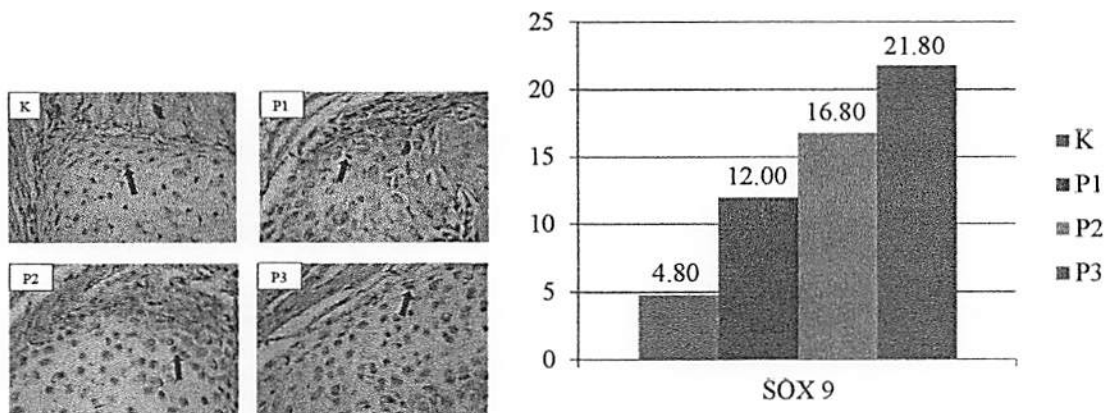
MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA



Gambar 5.2 Gambaran makroskopik dan mikroskopik penyembuhan defek kartilago mandibula kiri.

5.3 Hasil Pemeriksaan Ekspresi Sox 9

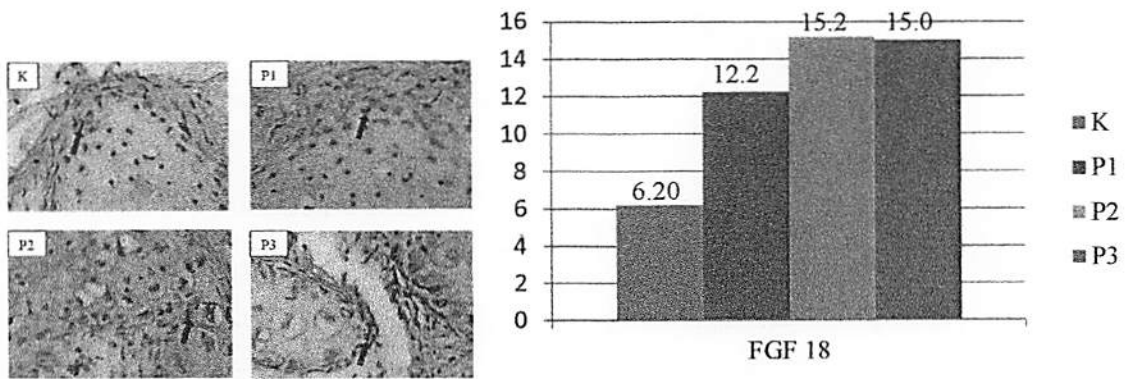
Sel pengeksresi Sox 9 tampak dalam nukleus sel pada zona proliferaatif. Sox 9 diekspresikan pada semua kelompok penelitian tetapi rata-rata jumlah sel pengeksresi Sox 9 paling rendah pada kelompok K dan paling tinggi pada kelompok P3. Hasil pemeriksaan menunjukkan rerata kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol (4.80 ± 1.483). Rerata kelompok P1 adalah 12.00 ± 1.581 , kelompok P2 adalah 16.80 ± 2.490 , dan tertinggi pada kelompok P3 yaitu 21.80 ± 3.701 , seperti ditampilkan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.3 Gambaran mikroskopik pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Sox 9 dan rerata jumlah sel yang mengekspresikan Sox 9

5.4 Hasil Pemeriksaan Ekspresi FGF 18

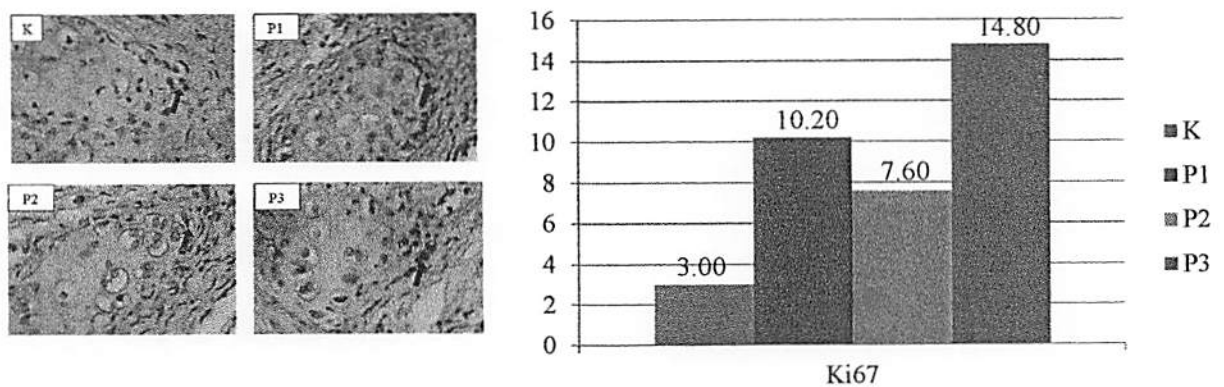
Sel pengeksresi FGF 18 tampak dalam sitoplasma sel pada zona proliferaatif. FGF 18 diekspresikan pada semua kelompok penelitian tetapi rata-rata jumlah sel pengeksresi FGF 18 paling rendah pada kelompok K dan paling tinggi pada kelompok P2. Hasil pemeriksaan menunjukkan rerata kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol (6.20 ± 2.168). Rerata kelompok P1 adalah 12.20 ± 0.837 , kelompok P2 adalah 15.20 ± 3.271 yang merupakan kelompok dengan nilai tertinggi, dan kelompok P3 15.00 ± 15.00 , seperti ditampilkan pada Gambar 5.4



Gambar 5.4 Gambaran mikroskopik pemeriksaan imunohistokimia ekspresi FGF 18 dan rerata jumlah sel yang mengekspresikan FGF 18

5.5 Hasil Pemeriksaan Ekspresi Ki67

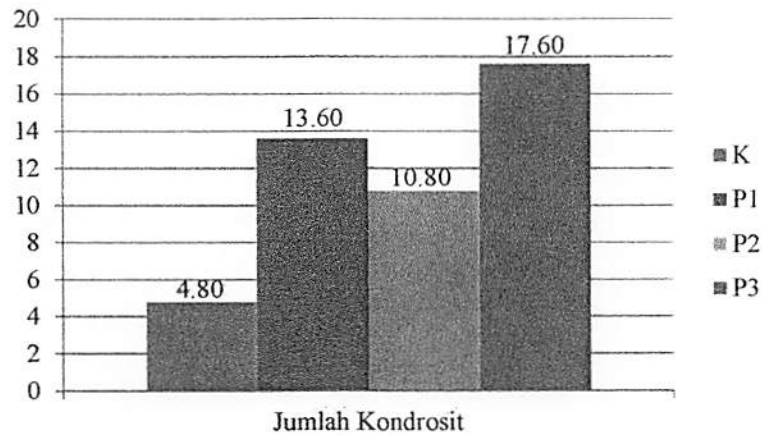
Sel pengeksresi Ki67 tampak dalam nukleus sel pada zona proliferaatif. Ki67 diekspresikan pada semua kelompok penelitian tetapi rata-rata jumlah sel pengeksresi Ki67 paling rendah pada kelompok K dan paling tinggi pada kelompok P3. Hasil pemeriksaan menunjukkan rerata kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol (3.00 ± 1.581). Rerata kelompok P1 adalah 10.20 ± 1.304 , kelompok P2 7.60 ± 2.302 , dan kelompok P3 adalah 14.80 ± 1.304 , seperti ditampilkan pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5 Gambaran mikroskopik pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Ki67 dan rerata jumlah sel yang mengekspresikan Ki67

5.6 Hasil Pemeriksaan Jumlah kondrosit

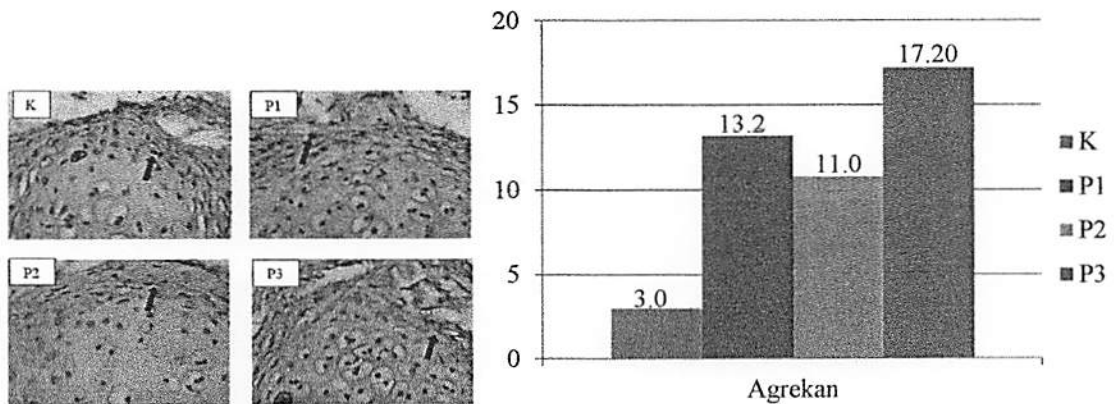
Gambaran mikroskopik jumlah kondrosit dengan pengecatan HE ditampilkan pada Gambar 5.2. Hasil pemeriksaan menunjukkan rerata kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol (4.80 ± 1.643). Rerata kelompok P1 adalah 13.60 ± 2.191 , P2 10.8 ± 1.483 , dan kelompok P3 adalah 17.60 ± 2.966 , seperti ditampilkan pada Gambar 5.6.



Gambar 5.6 Rerata jumlah kondrosit

5.7 Hasil Pemeriksaan Ekspresi Agrekan

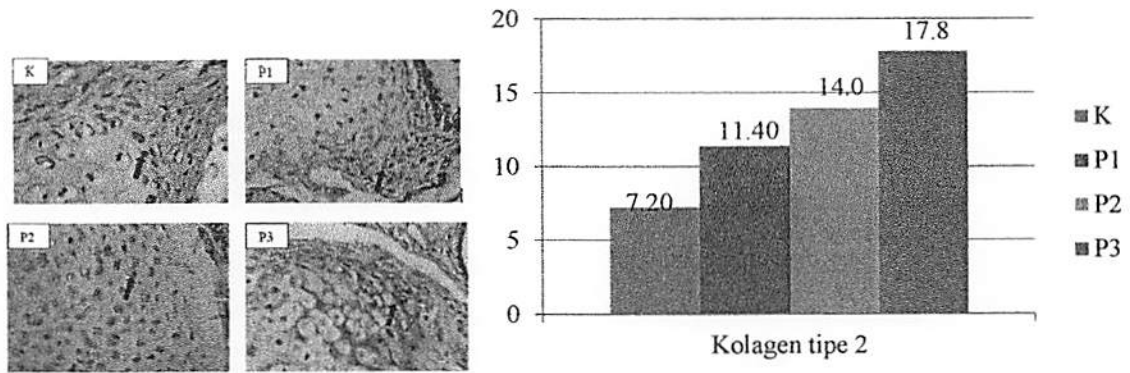
Sel pengeksresi agrekan tampak dalam sitoplasma sel pada zona proliferaatif. Agrekan diekspresikan pada semua kelompok penelitian tetapi rata-rata jumlah sel pengeksresi agrekan paling rendah pada kelompok K dan paling tinggi pada kelompok P3. Hasil pemeriksaan menunjukkan rerata kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol (3.00 ± 1.000). Rerata kelompok P1 adalah 13.20 ± 1.924 , P2 11.00 ± 1.225 , dan kelompok P3 adalah 17.20 ± 2.588 , seperti ditampilkan pada Gambar 5.7



Gambar 5.7 Gambaran mikroskopik pemeriksaan imunohistokimia ekspresi agrekan dan rerata jumlah sel yang mengekspresikan agrekan

5.8 Hasil Pemeriksaan Ekspresi Kolagen tipe 2

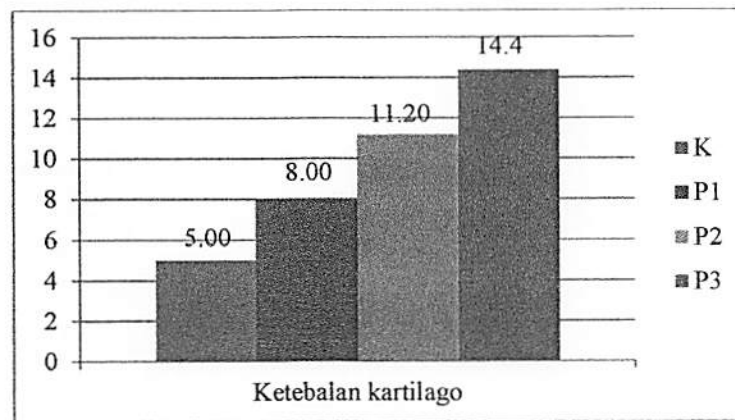
Sel pengeksresi kolagen tipe 2 tampak dalam sitoplasma sel pada zona proliferaatif. Kolagen tipe 2 diekspresikan pada semua kelompok penelitian tetapi rata-rata jumlah sel pengeksresi kolagen tipe 2 paling rendah pada kelompok K dan paling tinggi pada kelompok P3. Hasil pemeriksaan menunjukkan rerata kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol (7.20 ± 1.095). Rerata kelompok P1 adalah 11.40 ± 2.302 , P2 14.00 ± 2.236 , dan kelompok P3 adalah 17.80 ± 3.421 , seperti ditampilkan pada gambar 5.8



Gambar 5.8 Gambaran mikroskopik pemeriksaan imunohistokimia ekspresi kolagen tipe 2 dan rerata jumlah sel yang mengekspresikan kolagen tipe 2

5.9 Hasil Pemeriksaan Ketebalan kartilago

Hasil pemeriksaan menunjukkan rerata kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol (0.040 ± 0.020). Rerata kelompok P1 adalah 0.064 ± 0.016 , P2 0.085 ± 0.023 , dan kelompok P3 adalah 0.115 ± 0.017 , seperti ditampilkan pada Gambar 5.9



Gambar 5.9 Rerata ketebalan kartilago

Hasil penelitian ini sudah disusun dalam manuskrip artikel untuk dipublikasikan pada jurnal internasional bereputasi.

BAB 6

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Pada tahun pertama telah dilakukan penelitian regenerasi kartilago mandibula, penelitian tahun selanjutnya akan menilai regenerasi fibrokartilago dan fungsi biomekanik jaringan yang mengalami regenerasi, meliputi:

1. Perlekatan hUCMSC pada PRF *scaffold* dengan pemeriksaan SEM (*in vitro*)
2. Perbandingan ekspresi kolagen tipe 1 dan 2, (3) ekspresi GAG,
3. Diameter fibril kolagen dan susunan zona kartilago.



Faint, illegible text in the upper middle section of the page, likely representing the abstract or introduction.



Faint, illegible text in the lower middle section of the page, likely representing the methodology or results.

Faint, illegible text at the bottom left of the page, possibly a signature or a reference.

4. Penelitian biomekanik fibrokartilago defek yang diberi aplikasi hUCMSC dengan PRF *scaffold (in vivo)* meliputi: (1) *compression properties* (2) *tension properties* (3) *elastic modulus* (4) *shear strain*. Uji *in vivo* menggunakan hewan coba tikus wistar.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil pemeriksaan saat ini didapatkan regenerasi jaringan kartilago yang mengalami defek pasca implantasi hUCMSC dengan scaffold PRF.

DAFTAR PUSTAKA

- Behonick DJ, Werb Z, 2003. A bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. *Mech Dev* 120: 1327-36.
- DiMarino AM, Caplan AI, Bonfield TL, 2013. Mesenchymal Stem cells in Tissue Repair. *Frontiers in Immunol*; 3: 1-3.
- Furman BD, Olson SA, Guilak F, 2006. The development of posttraumatic arthritis following articular fracture. *J Orthop Trauma* 20: 719-25.
- Gál P, Nečas A, Plánka L, Kécová H, Křen L, Hlučilová J, Ušvald D, 2007. Chondrocytic Potential of Allogenic Mesenchymal Stem cells Transplanted without Immunosuppression to Regenerate Physel Defect in Rabbits. *Acta Vet BRNO* 76: 265-75.
- Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang L, Zhao B, Peng J, Wang A, Wang Y, Xu W, Lu S, Yuan M, Guo Q, 2014. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *BioMed Res Int*, diunduh 11 Mei 2016, <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/648459>>.
- Guilak F, Butler DL, Goldstein SA, Baaijens FPT, 2014. Biomechanics and Mechanobiology in functional tissue engineering. *J Biomech*; 47(9):1933-40.
- Hwang NS, Varghese S, Lee HJ, Zhang Z, Ye Z, Bae J, Cheng L, Ellisseff J, 2008. In Vivo Commitment and Functional Tissue Regeneration using human Embryonic Stem Cell-derived Mesenchymal Cells. *PNAS* 105(52). 20641-6.
- Jain A, Reddy M, Raghav P, Jain S, Popli G, Jindal S, 2016. Biomechanics of TMJ and Its Clinical Relevance to Orthodontics: A Review. *Int J Health Sci Res* 6(7): 326-36.
- Kazemi D, Fakhrjou A, Dizaji VM, Alishahi MK, 2014. Effect of autologous platelet rich fibrin on the healing of experimental articular cartilage defects of the knee in an animal model. *Biomed Res Int*. 2014: 1-10.
- Khiste SV, Tari RN, 2013. Platelet-rich fibrin as a biofuel for tissue regeneration. *ISRN Biomaterials* 2013: 1-6.
- Kim BS, Park IK, Hoshiba T, Jiang HL, Choi YJ, Akaike T, Cho CS, 2011. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 26: 238-68.
- Kuroda S, Tanimoto K, Izawa T, Fujihara S, Koolstra JH, Tanaka E, 2009. Biomechanical and Biochemical Characteristics of the Mandibular Condylar Cartilage. *Osteoarthritis Cart* 17:1408-15.
- Lu XL, Mow VC, Guo XE, 2009. Proteoglycans and mechanical behavior of condylar cartilage. *J Dent Res* 88(3): 244-8.
- Matsiko A, Levingstone TJ, O'Brien FJ, 2013. Advanced strategies for articular cartilage defect repair. *Materials* 6: 637-68.

- Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME, 2014. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas* 78: 188-98.
- Murphy MK, Masters TE, Hu JC, Athanasiou KA, 2015. Engineering a fibrocartilage spectrum through modulation of aggregate redifferentiation. *Cell Transplant*; 24(2): 235-45.
- Naujoks C, Meyer U, Weismann HP, Jäsche-Meyer J, Hohoff A, Depprich R, Handschel J, 2008. Principles of cartilage tissue engineering in TMJ reconstruction. *Head Face Med* 4(3): 1-7.
- Sinno H, Tahiri Y, Gilardino M, Bobyn D, 2010. Engineering alloplastic temporomandibular joint replacements. *MJM* 13(1): 63-72.
- Sumarta NPM, Pramono C, Hendrianto E, Susilowati H, Karsari D, Rantam FA, 2016. Chondrogenic Differentiation Capacity of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem cells with Platelet Rich Fibrin Scaffold in Cartilage Regeneration (*in vitro* study). *Bali Med J* 5(3): 65-70.
- Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG, 2008. Degenerative Disorders of the Temporomandibular Joint: Etiology, Diagnosis, and Treatment. *J Dent Res* 87(4): 296-307.
- Tsai MH, Wu CM, Lin MH, Wu CZ, Cheng HY, Ou KL, 2015. Research on Biomechanical Behavior of Temporomandibular Joint Disorders Using Occlusal Splint Treatment: Computed-Aided Analysis. *J Biomed Sci* 4(2): 1-6.
- Vanden Berg-Foels WS, 2016. Mandibular Cartilage Collagen Network Nanostructure: Insights for Regeneration. *Cartilage* 7(3): 274-83.
- Wang L, Tran I, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS, 2009. A comparison of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A* 15(8): 2259-66.
- Wright GJ, Coombs MC, Hepfer RG, Damon BJ, Bacro TH, Lecholop MK, Slate EH, Yao H, 2016. Tensile Biomechanical Properties of Human Temporomandibular Joint Disc: Effects of Direction, Region, and Sex. *J Biomech* 49(16): 3762-9.
- Zhang S, Yap AUJ, Toh WS, 2015. Stem Cells for Temporomandibular Joint Repair and Regeneration. *Stem Cell Rev and Rep* 11(5): 728-42.

Lampiran 1. Draf Artikel

**REGENERATION OF MANDIBULAR CARTILAGE DEFECT AFTER
IMPLANTATION OF HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM
CELLS OVER PLATELET RICH FIBRIN SCAFFOLD**

Ni Putu Mira Sumarta¹, David Buntoro Kamadjaja¹, Nike Hendrijantini², Coen Pramono
Danudiningrat¹, Fedik Abdul Rantam³

¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia

² Department Of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya-Indonesia

³ Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Correspondence: Dr. Ni Putu Mira Sumarta

Email: niputu.mira@fkg.unair.ac.id

ABSTRACT

Context: Mandibular cartilage defect does not completely regenerate causing chronic pain and further cartilage destruction. Various reconstruction method had not been satisfactory. Advances in stem cell therapy showed promising results. Platelet rich fibrin had been used in regeneration maxillofacial defects. **Objective:** The purpose of this study is to evaluate regeneration of mandibular cartilage defect after implantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSC) over platelet rich fibrin (PRF) as scaffold through expression of FGF 18, Sox9, Ki67, chondrocyte counts, type 2 collagen, aggrecan, and cartilage thickness. **Material and Methods:** This is a true experimental post test control group experiment on animal model of mandibular cartilage defect. Twenty male Wistar rats were randomly divided into 4 experiment groups, consist of: control group was mandibular defect without treatment (C), experiment groups were mandibular defect implanted with hUCMSC (E1), mandibular defect implanted with PRF (E2), mandibular defect implanted with hUCMSC and PRF scaffold (E3). All rats were sacrificed after 6 weeks observation for immunohistochemistry examination to evaluate the expression of Ki67, Sox9, FGF 18, type 2 collagen, and aggrecan, and histology examination to evaluate chondrosit counts and cartilage thickness. Data were analyzed with univariate analysis (ANOVA). **Results:** Expression of FGF 18, Sox9, Ki67, chondrosit counts, type 2 collagen, aggrecan, and cartilage thickness were significantly higher in group E3. Implantation of hUCMSC and PRF scaffold were able to regenerate mandibular cartilage defect.

Keywords: human umbilical cord mesenchymal stem cells, mandibular cartilage, cartilage defect

INTRODUCTION

Mandibular cartilage defect can be caused by micro and macro trauma,^[1] resulting in debilitating effect such as prolonged pain, function impairment, chronic inflammation and progressive cartilage degeneration.^[2] In fact, mandibular cartilage defect in children may

impair mandibular growth.^[3] Cartilage degeneration after trauma occur because of low regenerative capacity due to avascular, alymphatic, aneural nature of articular cartilage, chondrocyte also in a low turn over to maintain extracellular matrix.^[4]

Various methods that had been developed to reconstruct cartilage defect such as suchodral drilling, abrasion, microfracture, mosaicplasty, autologous chondrocyte implantation, matrix assisted autologous chondrocyte implantation, had not yet proven to provide a long and well functioning cartilage in large defect.^[5] Autologous chondrocyte injection that was started from 1994 had several disadvantages such as: limited cells procured, donor site morbidity, limited potential of proliferation and differentiation.^[6]

Cartilage generation requires sufficient amount of cells to replace damaged chondrocytes. Mesenchymal stem cells (MSC) were considered as a potential source in cartilage regeneration and engineering because of its high expansion rate.^[7] Umbilical cord is a potential source of MSC that had several advantages such as procured from biological waste, ethically clear, and have a high expansion rate.^[8]

Stem cell implantation requires scaffold for cell growth and development. Platelet rich fibrin (PRF) is a natural fibrin matrix polymer, attracting fibroblast and undifferentiated cells into the matrix. PRF also contain growth factors such as PDGF- β , TGF β -1, VEGF, IGF-I, IL-1 β , IL-6, IL-4, and TNF- α .^[9] However regeneration of mandibular cartilage defect with implantation of hUCMSC over PRF scaffold have not been studied yet.

This study was performed to evaluate regeneration of surgically created mandibular cartilage defect in rat model after implantation of hUCMSC over PRF scaffold through expression of FGF 18, Sox9, Ki67, chondrosit counts, type 2 collagen, aggrecan, and cartilage thickness.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of experimental animal

This study was conducted after Ethical Clearance was obtained from Animal Care and Use Committee Faculty of Veterinary Medicine Universtas Airlangga, Indonesia. This was a true experimental post test only control group study. Twenty male *Rattus novergicus* albinus strain Wistar age 3 months, 200 – 300 g were used as animal model. Rats were randomly divided into 4 experiment groups, consist of: control group was mandibular defect without treatment (C), experiment groups were mandibular defect implanted with hUCMSC (E1), mandibular defect implanted with PRF (E2), mandibular defect implanted with hUCMSC and PRF scaffold (E3).

Human umbilical cord mesenchymal stem cell isolation and expansion culture

Umbilical cord from a healthy C-section labor at Dr Soetomo public hospital Surabaya, Indonesia was collected. Isolation and expansion culture were conducted according to protocol of Stem cell Research and Develepment Center, Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga, Indonesia. Characterisation of MSC was conducted prior to implantation using immunocytochemistry and flowcytometry analysis.^[10]

Preparation of PRF

One point five ml of venous blood were aspirated from rat's tail after rat was anaesthetized with Ketamin/Zylazin. Blood were obtained with 3 ml disposable syringe without anticoagulant and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes until separated into 3 layers. Middle layer was PRF.

Implantation of hUCMSC, PRF and hUCMSC and PRF

Mandibular cartilage defect were created surgically using round bur in the anterior portion of condylar superior surface with a diameter of 1 mm.^[11] Two million (2×10^6) hUCMSC were implanted in group E1, 1 mm PRF was implanted in group E2, and group E3 were implanted with hUCMSC seeded in 1 mm PRF through centrifugation in 3000 rpm for 5 minutes. After defect were fully covered, wound were sutured in layers.

Specimens preparation and microscopic examination

Rats were terminated after 6 weeks observation, mandible was exarticulated and fixated with 20% formalin for 2 days in room temperature and decalcified in 10% *Ethylenediamine tetraacetic* (EDTA) for 8 weeks and embedded in paraffin. Each paraffin blocks were then cut axially in 4 μ m thickness, deparaffinized and dehydrated. Specimens then stained with Harris Haematoxylin-Eosin for histology examination to evaluate chondrocyte counts and cartilage thickness. Immunohistochemistry examination were done to evaluate expression of FGF18 using polyclonal antibody anti FGF18 (PAC907Mu01, Cloud-Clone Corp, USA), expression Sox9 of using polyclonal antibody anti Sox9 (sc-20095, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA), expression Ki67 of using polyclonal antibody anti Ki67 (sc-15402, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA), expression type 2 collagen of using polyclonal antibody anti Coll2 (sc-7763, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA), expression aggrecan of using polyclonal antibody anti aggrecan (GTX54920, GeneTex, USA).

Statistical analysis

Data were analyzed with univariate analysis (ANOVA) was performed using SPSS software version 21.0 (IBM SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) with $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Isolation and culture of human umbilical cord mesenchymal stem cells

Human umbilical cord mesenchymal stem cells that already been isolated and cultured showed the character of MSC that expressed surface markers such as CD45⁻, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, had been published previously.^[12]

Expression of Ki67, FGF18, Sox9 and chondrocyte counts

Proliferation of hUCMSC and its differentiation into chondrocyte were represented by the expression of Ki67, FGF18, Sox9 and chondrocyte counts. Microscopic image of cells expressing Ki67, FGF18, Sox9, and chondrocyte counts are shown in figure 1. Mean and deviation standart value of each proliferation and differentiation variables were presented in figure 2.

Expression of type 2 collagen, aggrecan, and cartilage thickness

Matrix deposition were represented by the expression of type 2 collagen and aggrecan, whereas regeneration of cartilage represented by cartilage thickness. Microscopic image of cells expressing type 2 collagen and aggrecan, as well as cartilage thickness were presented in figure 3. Mean and deviation standart value of each matrix deposition and regeneration variables were presented in figure 4.

DISCUSSION

Implantation of hUCMSC over PRF scaffold undergone proliferation and differentiation into chondrocytes to initiate extracellular matrix deposition to regenerate defected cartilage through a complex of process involving various growth factor of FGF18 and transcription factor of Sox9.

Proliferation of hUCMSC and chondrocyte differentiation were significantly higher in E3 group compared to other group may be caused by nature of PRF that are a flexible, elastic, and very strong fibrin matrix provide 3 dimension requirement for biomaterial, in addition to growth factors being released, as well as platelet and immune concentrate that required in healing and immune process.^[13,14] Seeding of hUCMSC in PRF in this study was accomplished through centrifugation where PRF undergone polymerization that reduce thrombin concentration thus forming tetramolecular and trimolecular bonding or extensive 3D equilateral bonding. Those bonding provide cytokin attachment, cell migration, and retain stem cells within PRF, chemotactically recruited MSC, that was caused by dense fibrin structure increasing growth factor and gradual release of other mediator. Those process will confine hUCMSC within the PRF.^[15,16]

High proliferation of hUCMSC in PRF scaffold was showed by high expression of Ki67. That was because of PRF is also extracelular matrix that formed tissue structure, provide regulatory signal for cell proliferation and differentiation through cell-receptor interaction, mediating diffusion of soluble growth factors and diminishing mechanical signal.^[17] Platelet derived growth factor contained in PRF might induced cell proliferation through Akt signal transduction that was important in cell proliferation.^[18;19] High expression of Ki67 was consistant with high chondrocyte counts.

High chondrocyte counts will express high FGF 18. This study showed the highest expression of FGF 18 in E3 group, compared to other experiment group that showed no significant difference. Chondrogenic differentiation was indicated by high expression of FGF 18, that was a physiologic ligand of FGFR3^[20]. Columnar and flat chondrocyte is the most proliferative cells in cartilage expressing high FGFR3^[21] enhanced chondrogenic differentiation and cartilage production through increased expression of type 2 collagen.^[22] High expression of Sox9 caused induction of chondrogenesis through Smad2/3^[23], influencing morphogenesis of the condyle.^[24] Bond of Sox9 in chondrocyte specific enhancer in intron 1-gen-pro- α 1 type 2 collagen upregulating the synthesis of α 1 type 2 collagen, Sox9 remained its high expression in fully differentiated chondrocyte.^[25] This study also showed highest expression of Sox9 after 6 weeks implantation of hUCMSC in PRF scaffold. Expression of Sox9 might be regulated by FGFR3^[26], this was in accordance to the findings in this study that showed high expression of FGF18, Sox9, and type 2 collagen, as well as aggrecan expression.

Collagen network in articular cartilage provide mechanical support to tensile forces generated by compression or interstitial swelling, protect chondrocyte, maintain proteoglycan attachment, and attaching cartilage to subchondral bone^[27] Type 2 collagen and aggrecan were molecular marker of mature chondrocyte^[28] This study showed significant difference of type II collagen and aggrecan expression in hUCMSC in PRF scaffold compared to other group consistant with the high expression of Sox9. Fibroblast growth factor 18 that were highly released in E3 group will upregulate Sox9 expression in wide range stages of chondrocyte differentiation, increasing proteoglycan deposition, aggrecan and tipe II collagen expression, and significantly decrease expression of collagen type I.^[29]

Regeneration of mandibular cartilage defect in hUCMSC in PRF scaffold was shown by the highest mean of cartilage thickness. Interaction of chondrocyte and extracelular matrix regulates important process in homeostasis and cartilage repair mediated by integrin

signaling. Mechanical nature of scaffold hold important role in tissue regeneration and in cellular level affect mesenchymal stem cell differentiation.^[30] Proliferation of hUMCSC and differentiation into chondrocyte, thus chondrocyte produce extracellular matrix such as type II collagen and aggrecan. In addition to growth factor released from PRF, it also provide mechanical nature that was required in forming cartilage thickness. Extracellular matrix provided by PRF not only form tissue structure and function but also provided regulatory signal for cell proliferation and differentiation through cell-receptor interaction, mediating soluble growth factor diffusion, and absorbed mechanical signal.^[19]

CONCLUSION

Human umbilical cord mesenchymal stem cell in platelet rich fibrin scaffold was able to regenerate mandibular cartilage defect.

REFERENCES

1. Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. *J Dent Res* 2008;87(4):296-307.
2. Naujoks C, Meyer U, Weismann HP, Jäsche-Meyer J, Hohoff A, Depprich R, Handschel J. Principles of cartilage tissue engineering in TMJ reconstruction. *Head Face Med* 2008;4(3):1-7.
3. Learreta JA, Yavich LG, 2014. Structural modifications of the mandibular condylar process as one of the sequels of traumatism in infancy. *J Cranio-Maxillofac Dis* 3(2): 85-8.
4. Goldring MB, Otero M, Plumb DA, Dragomir C, Favero M, El Hacem K, Hashimoto K, Roach HI, Olivotto E, Borzi RM, Marcu KB. Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *European Cell Mat* 2011;21:202-20.
5. Punwar S, Khan WS. Mesenchymal stem cells and articular cartilage repair: clinical studies and future direction. *The Open Orthop J* 2011;(suppl 2 M-11):296-301.
6. Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood transfus* 2007;5:120-9.
7. Vinatier C, Mrugala D, Jorgensen C, Guicheux J, Noël D. Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends Biotech* 2009;27(5):307-14.
8. Lindenmair A, Hatlapatka T, Kollwig G, Hennerbichler S, Gabriel C, Wolbank S, Redl H, Kasper C. Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells* 2012;1:1061-88.
9. Baek HS, Lee HS, Kim BJ, Chung IK, Kim CH, Jin SM, Hwang HS, Shin SH. Effect of platelet-rich fibrin on repair of defect in the articular disc in rabbit temporomandibular joint by platelet-rich fibrin. *Tissue Eng Reg Med* 2011;8(6):530-5.
10. Saluja H, Dehane V, Mahindra U. Platelet-rich fibrin: a second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgery. *Ann Maxillofac Surg* 2011;1(1):53-7.
11. Küçük N, Baş B, Soylu E, Gönen ZB, Yılmaz C, Balcioglu E, Ozdamar S, Alkan A. Effect of platelet-rich plasma on fibrocartilage, cartilage, and bone repair in the temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 2014;72:277-284.
12. Sumarta NPM, Pramono DC, Hendrianto E, Susilowati H, Karsari D, Rantam FA. Chondrogenic Differentiation capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells with platelet rich fibrin scaffold in cartilage regeneration (*in vitro* study). *Bali Med J* 2016;5(3):65-70.
13. Hotwani K and Sharma K. Platelet rich fibrin - a novel acumen into regenerative endodontic therapy. *Restor Dent Endod* 2014;(39):1-6.

14. Choukroun J, Diss A, Simonpietri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan JJA, Mouhyi J & Dohan DM. Platelet rich fibrin: A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:E56-60.
15. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan JJA, Mouhyi J & Gogly B. Platelet rich fibrin: A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:E37-44.
16. Masoudi EA, Ribas J, Kaushik G, Leijten J & Khademhosseini A. Platelet-rich blood derivatives for stem cell-based tissue engineering and regeneration. *Curr Stem Cell Rep* 2016;2:33-42.
17. Dawson JI, Wahl DA, Lanham SA, Kanczler JM, Czernuszka JT & Oreffo ROC. Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2008;29:3105-16.
18. Kim BS, Park IK, Hoshiba T, Jiang HL, Choi YJ, Akaike T & Cho CS. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. *Prog Polym Sci* 2011;26:238-68.
19. Wu CL, Lee SS, Lu KH, Zhao JH & Chang YC. Platelet-rich fibrin increases cell attachment, proliferation and collagen-related protein expression of human osteoblasts. *Aust Dent J* 2012; 57:207-12.
20. Liu Z, Xu J, Colvin JS & Ornitz DM. Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by fibroblast growth factor 18. *Genes Dev* 2002;16:859-69.
21. Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D & O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest* 2008;118(2):429-38.
22. Davidson D, Blanc A, Filion D, Wang H, Plut P, Pferrer G, Buschman MD & Henderson JE. Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis. *J Biol Chem* 2005;280(21):20509-15.
23. Studer D, Millan C, Öztürk E, Maniura-Weber K & Zenobi-Wong M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur Cells Mater* 2012;24:118-35.
24. Su CY, Kuo YP, Tseng YH, Su CH & Burnouf T. In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:56-61.
25. Lefebvre V and Crombrughe BD. Toward understanding Sox 9 function in chondrocyte differentiation. *Matrix Biology* 1998;16:529-40.
26. Murakami S, Kan M, McKeehan WL & de Crombrughe B. Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *PNAS* 2000;97(3):1113-8.
27. Chatterjee S and Jindal S. Investigation of collagen architecture in diseases of temporomandibular joint. *Pathol Discov* 2013;2013
28. Shibata S, Sakamoto Y, Baba O, Qin C, Murakami G & Cho BH. An immunohistochemical study of matrix proteins in the craniofacial cartilage in the midterm human fetuses. *Eur J Histochem* 2013; 57(e39): 262-70.
29. Wang ZH, Li XL, He XJ, Wu BJ, Xu M, Chang HM, Zhang XH, Xing Z, Jing XH, Kong DM, Kou XH & Yang YY. Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an in vitro model. *Braz J Med Biol Res* 2014;0(00):1-8
30. Gao Y, Liu S, Huang J, Guo W, Chen J, Zhang L, Zhao B, Peng J, Wang A, Wang Y, Xu W, Lu S, Yuan M & Guo Q, 2014. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes.

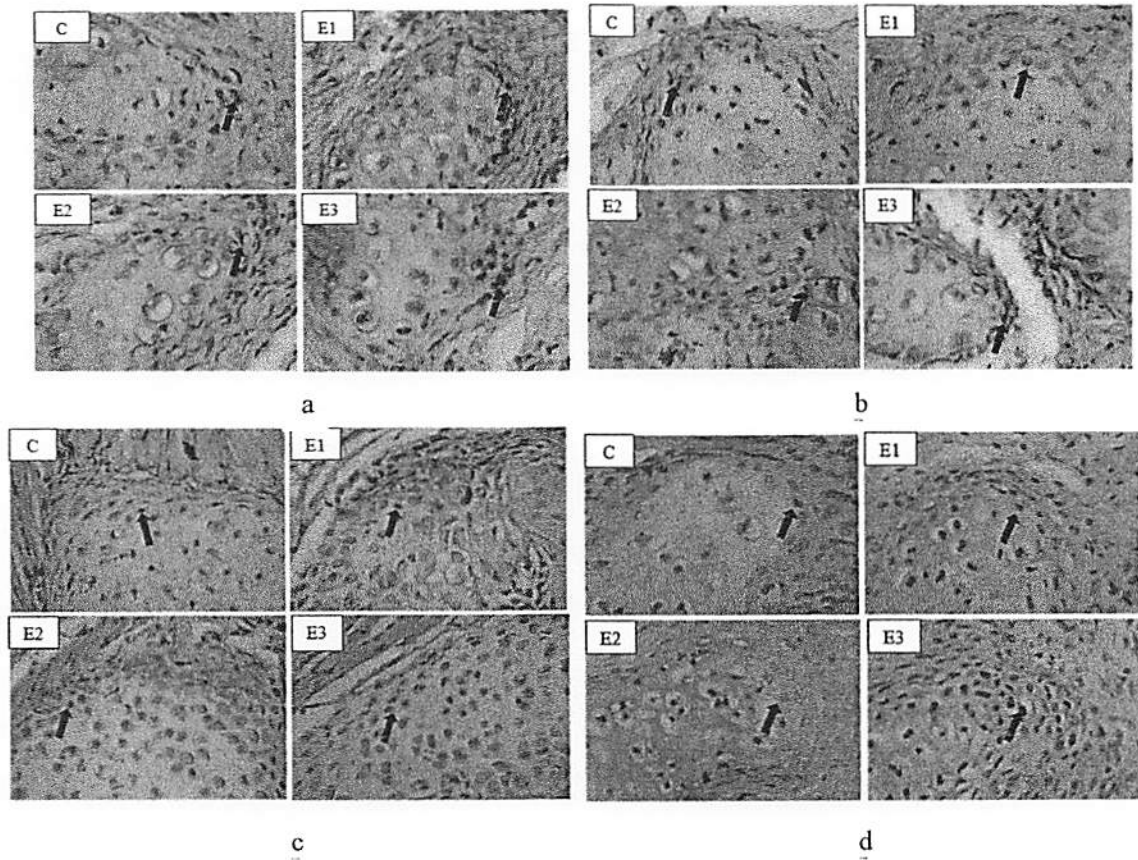


Figure 1. Microscopic image of immunohistochemistry staining of cells expressing ki67 (a), FGF18 (b), Sox9 (c), and HE staining of chondrocyte counts (d). Examination was carried under light microscope, with 400x magnification. Black arrows showed cells expressing Ki67, FGF 18, Sox9 and Chondrocyte.

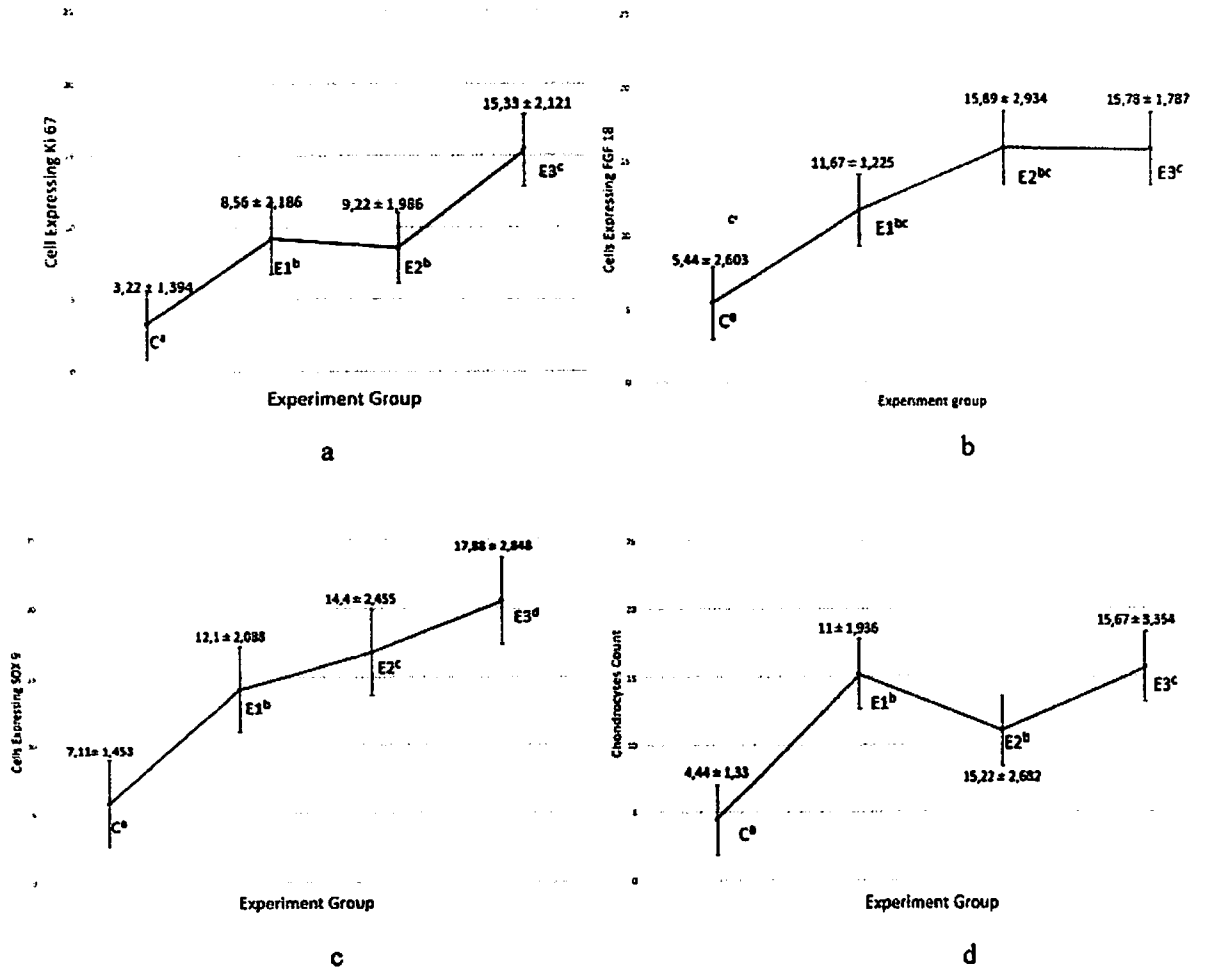


Figure 2. Graph of mean value and deviation standart of each group, a). Expression of Ki67, b). Expression of FGF 18, c). Expression of Sox9. d). Chondrocyte counts. Different superscript showed statistical difference between groups (p < 0.05).

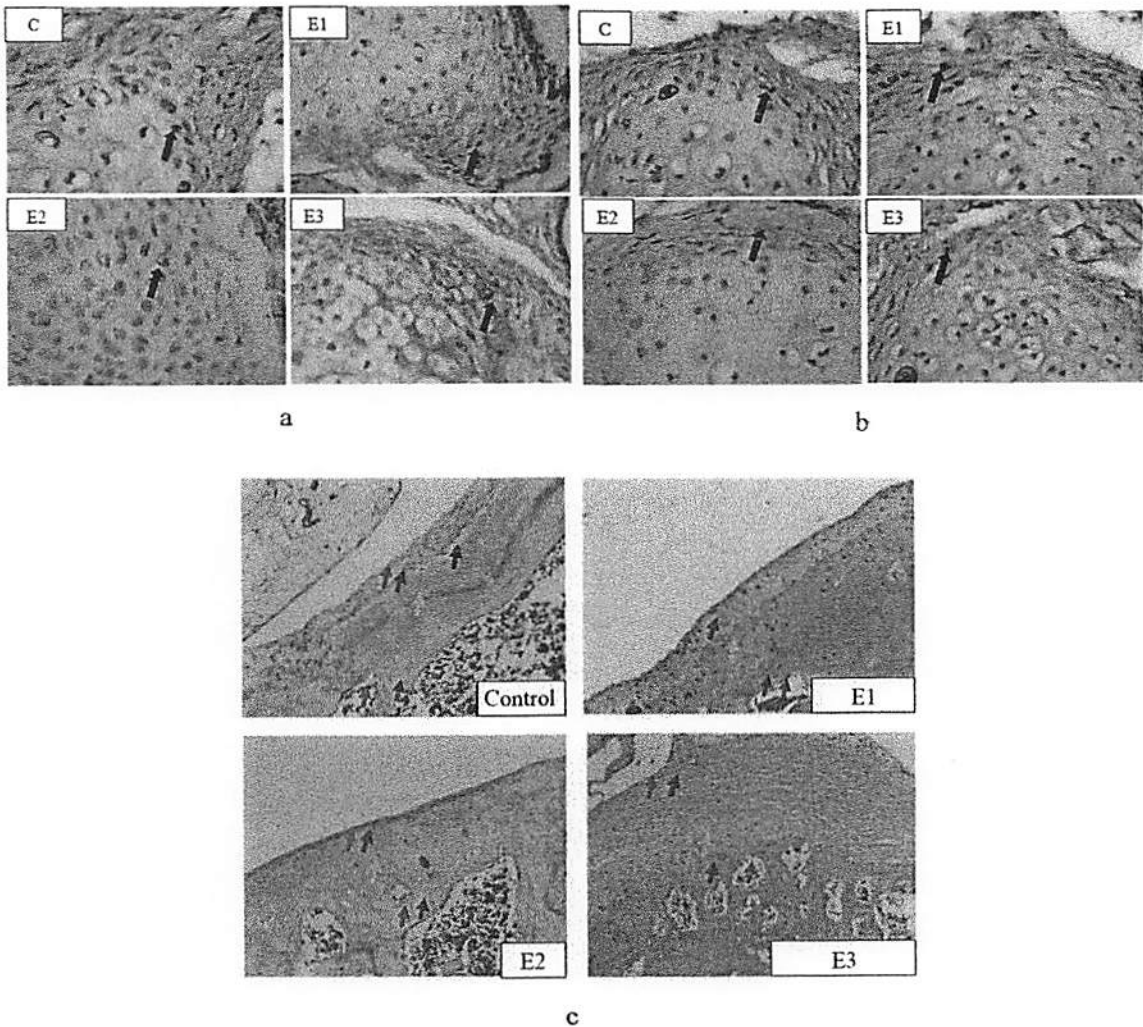


Figure 3. Microscopic image of immunohistochemistry staining of cells expressing type 2 collagen (a) and aggrecan (b). Black arrows showed cells expressing type II collagen and aggrecan, examination was carried under light microscope, with 400x magnification. HE staining of cartilage thickness (c), black arrow showed defect in proliferative and mature zone, green arrows showed fibrous zone, yellow arrows showed mature zone, brown arrows showed hypertrophic zone and blue arrows showed subchondral bone (light microscope, 100x magnification).

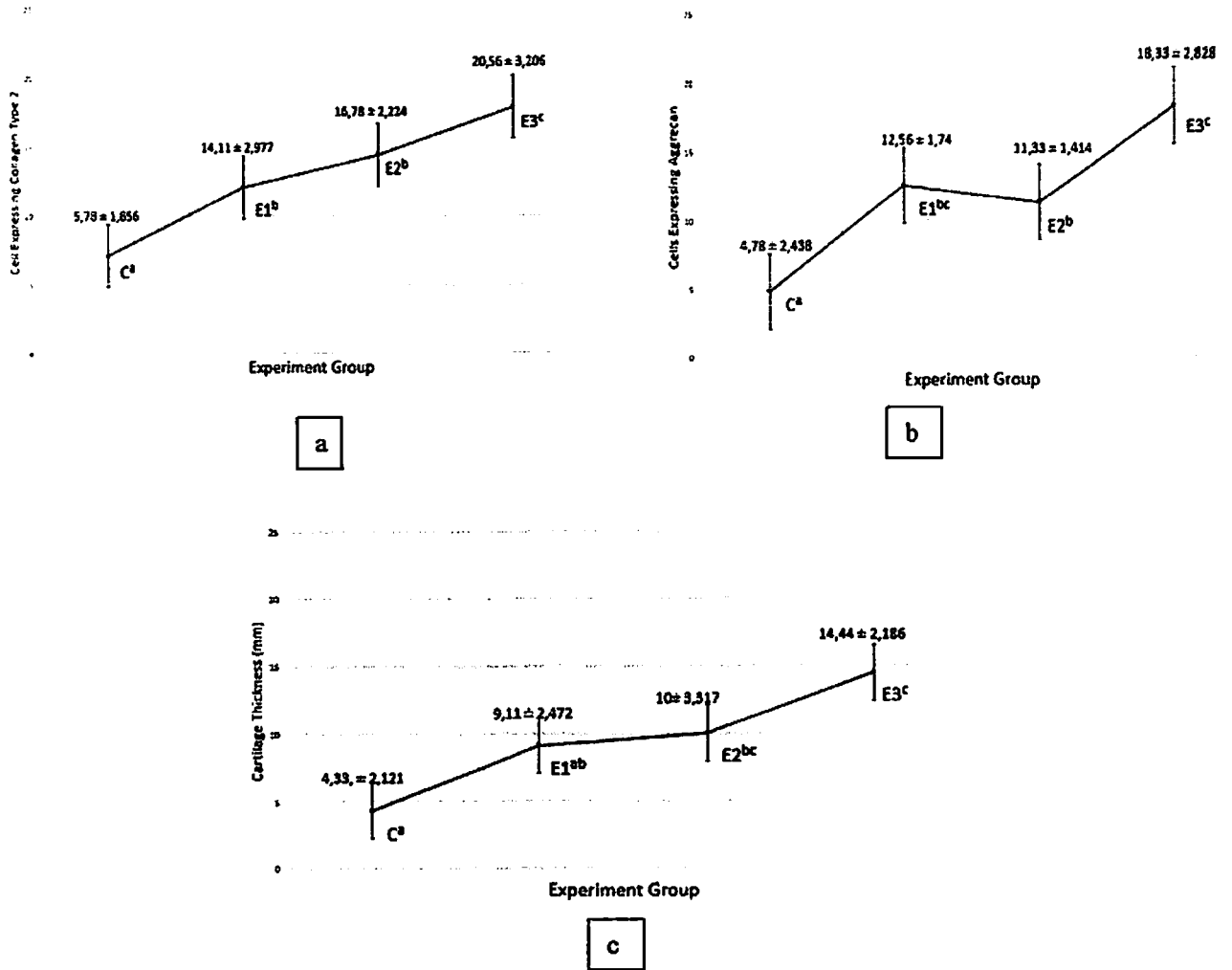


Figure 4. Graph of mean value and deviation standart of each group, a). Expression of type II collagen, b). Expression of aggrecan, c). cartilage thickness. Different superscript showed statistical difference between groups ($p < 0.05$).

Lampiran 2. Acceptance letter pada seminar internasional

