

**LAPORAN AKHIR TAHUN  
PENELITIAN PROGRAM MENUJU DOKTOR SARJANA UNGGUL  
(PMDSU)**



**AKSELERASI DIFERENSIASI OSTEOGENIK *GINGIVAL*  
*MESENCHYMAL STEM CELLS* DENGAN *PLASMA RICH FIBRIN*  
UNTUK EKSPANSI TULANG MAKSILA (STUDI *INVITRO*)**

**TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 3 TAHUN**

**Prof. Dr. FEDIK ABDUL RANTAM, drh 0010035907  
Prof. Dr. DIAH SAVITRI ERNAWATI, drg., M.Si., Sp. PM 0029046007  
ALEXANDER PATERA NUGRAHA, drg. M.Imun**

**DIBIYAI OLEH:**

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJAIN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR TAHUN  
PENELITIAN PROGRAM MENUJU DOKTOR SARJANA UNGGUL  
(PMDSU)**



kicc  
kic  
LP 62/19  
Ran  
a

**AKSELERASI DIFERENSIASI OSTEOGENIK *GINGIVAL*  
*MESENCHYMAL STEM CELLS* DENGAN *PLASMA RICH FIBRIN*  
UNTUK EKSPANSI TULANG MAKSILA (STUDI *INVITRO*)**

**TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 3 TAHUN**

**Prof. Dr. FEDIK ABDUL RANTAM, drh 0010035907  
Prof. Dr. DIAH SAVITRI ERNAWATI, drg., M.Si., Sp. PM 0029046007  
ALEXANDER PATERA NUGRAHA, drg. M.Imun**

**DIBIYAI OLEH:**

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJAIN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 145/SP2H/LT/DRPM/2018  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
FEDIK ABDUL RANTAM**

**HALAMAN PENGESAHAN**

Judul : KEMAMPUAN DIFERENSIASI OSTEOGENIK  
KOMBINASI GINGIVAL MESENCHYMAL STEM  
CELLS DAN PLASMA RICH FIBRIN UNTUK  
EKSPANSI TULANG MAKSILA (STUDI IN VITRO)

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Dr. drh. FEDIK ABDUL RANTAM,  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0010035907  
Jabatan Fungsional : Guru Besar  
Program Studi : Vaksinologi dan Imunoterapetika  
Nomor HP : 08123593245  
Alamat surel (e-mail) : fed-a-r@fkh.unair.ac.id

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dr. drg DIAH SAVITRI ERNAWATI S.KG, Sp.P.M,  
: M.Si  
NIDN : 0029046007  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**

Nama Lengkap : Alexander Patera Nugraha  
NIDN :  
Perguruan Tinggi :

**Institusi Mitra (jika ada)**

Nama Institusi Mitra : Universitas Airlangga  
Alamat : Jalan. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya  
Penanggung Jawab : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 60,000,000

Mengetahui,  
Direktur Sekolah Pascasarjana, UNAIR

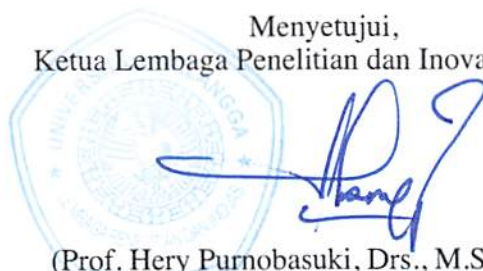
Kota Surabaya, 17 - 11 - 2018  
Ketua,



(Prof. Dr. Sri Iswati, SE., M.Si., Ak.)  
NIP/NIK 196311211991032001

(Dr. drh. FEDIK ABDUL RANTAM,)  
NIP/NIK 195910031987011001

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR



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

## RINGKASAN

Menurut *World Health Organization* (WHO), maloklusi merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut tertinggi ketiga di antara karies gigi dan penyakit periodontal. Maloklusi dapat menyebabkan beberapa gangguan pada penderitanya seperti masalah dengan fungsi rongga mulut. Maloklusi juga dapat memungkinkan penderita mendapatkan trauma psikososial karena memiliki gangguan estetik wajah. Salah satu macam maloklusi adalah gigitan silang posterior. Dalam rangka untuk mencapai perawatan ortodontik yang efektif dan optimal, diperlukan upaya mempercepat periode regenerasi setelah ekspansi maksila. Pilihan perawatan untuk koreksi gigitan silang posterior adalah dengan mengekspansi lengkung maksila. Kemampuan tulang dalam beregenerasi, terutama regenerasi pada tulang maksila setelah dilakukan ekspansi secara ortodontik masih menjadi tantangan tersendiri dalam bidang Kedokteran Gigi. Salah satu upaya untuk mempercepat regenerasi tulang adalah dengan terapi sel punca. Sel punca memiliki peran penting untuk memperbaiki setiap organ dan jaringan. Sel punca dalam upaya rekayasa jaringan tulang menawarkan solusi yang menjanjikan untuk pendekatan secara mendalam untuk meregenerasi tulang. Kombinasi GMSCs dan PRF diduga mampu meningkatkan kemampuan diferensiasi osteogenik GMSCs oleh karena PRF memiliki beberapa macam GFs yaitu: PDGF, TGF- $\beta$ 1, bFGF dan IGF. kombinasi GMSCs dan PRF dapat meningkatkan kemampuan diferensiasi osteogenik melalui peningkatan ekspresi RUNX2, ALP, OSC, OSP, OSN sehingga dapat mempercepat regenerasi dan remodeling tulang rahang selama ekspansi lengkung rahang maksila.

Pada hasil penelitian isolat GMSCs menunjukkan morfologi sel bulat kecil, memiliki bentukan spindle-shaped dan melekat pada kultur plate ketika diamati menggunakan mikroskop elektron. Isolat GMSCs yang telah homogen menunjukkan morfologi sel seperti sel fibroblast berbentuk *spindle* pada *passage* pertama hingga *passage* kelima. Pada pemeriksaan ICC GMSCs mengekspresikan *marker* positif MSC yaitu positif CD44, CD73, CD90 dan CD105 namun secara kontras tidak mengekspresikan *marker* HSCs yaitu negatif terhadap CD34 dan CD45. Pemeriksaan *flowcytometry* untuk mengetahui *marker* permukaan GMSCs konfirmasi *marker* MSCs. Pada hasil pemeriksaan *flowcytometry* diketahui bahwa GMSCs mengekspresikan *marker* positif MSC yaitu CD44, CD73, CD90 dan sangat mengekspresikan positif CD105. GMSCs mengekspresikan secara negatif *marker* HSCs yaitu CD45.

*Marker* diferensiasi osteogenik GMSCs pada setiap kelompok. Ekspresi ALP paling tinggi dijumpai pada kelompok perlakuan pada hari ke 7 ( $16.00 \pm 1.732$ ) Ekspresi RUNX2 paling tinggi dijumpai pada kelompok perlakuan hari 7 ( $14.33 \pm 2.517$ ) Ekspresi OSP pada kelompok perlakuan puncaknya pada hari ke 21 ( $13.00 \pm 2.00$ ). Ekspresi OSN puncaknya pada hari ke 21 ( $14.67 \pm 2.517$ ). Ekspresi OSC puncaknya pada hari ke 21 ( $13.67 \pm 2.309$ ). Hasil temuan baru mengungkapkan bahwa kombinasi GMSC dan PRF dengan medium osteogenik meningkatkan kemampuan diferensiasi osteogenik yakni meningkatkan ekspresi RUNX2, ALP, OSP, OSN, OSC.

## PRAKATA

Penulis memanjatkan puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa karena atas berkat dan rahmatNya penulis dapat menyelesaikan penelitian yang berjudul “Akselerasi Diferensiasi Osteogenik *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dengan *Plasma Rich Fibrin* untuk Ekspansi Tulang Maksila (Studi *In Vitro*)”. Pembuatan tesis ini tentu tidak lepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Pada kesempatan ini, penulis menyampaikan penghargaan sebesar-besarnya dan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., M.T., Ak., CMA., CA., selaku Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk menempuh pendidikan di Universitas Airlangga.
2. Prof. Dr. Sri Iswati, SE., M.Si., Ak selaku Direktur Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk menempuh pendidikan di Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga.
3. Prof., Dr., Anwar Ma’ruf, drh., M.Kes selaku Wakil Direktur I Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk menempuh pendidikan di Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga.
4. Dr. Dina Sunyowati., S.H., M.Hum selaku Wakil Direktur II Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk menempuh pendidikan di Sekolah Pascasarjana Universitas Airlangga.

5. Prof. Dr. Nasronudin., Sp.PD-KPTI selaku Direktur Rumah Sakit Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin dan kesempatan dan meminjamkan alat untuk melakukan penelitian di RS UA.
6. Prof. Maria Lucia Inge Lusida., M.Kes., Ph.D., Sp.MK(K) selaku Direktur Institute Tropical Disease (ITD) Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin dan kesempatan dan meminjamkan alat untuk melakukan penelitian di ITD Unair.
7. Prof. Bambang Sektiari Lukiswanto, Drh., DEA selaku Direktur Bidang Pendidikan UNAIR yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk menempuh pendidikan dengan beasiswa Program Menuju Doktor Sarjana Unggul (PMDSU) di Universitas Airlangga.
8. Prof. Hery Purnobasuki, M.Si. Ph.D selaku ketua LPI UNAIR yang telah memberikan bantuan dan dukungan pengusulan beasiswa penelitian Program Menuju Doktor Sarjana Unggul (PMDSU).
9. Dr. Darmawan Setijanto, drg. M.Kes yang telah memberikan ijin dan kesempatan serta dukungannya kepada saya untuk menempuh pendidikan lanjut.
10. Dr. Purwati, dr., Sp. PD., FINASIM selaku Ketua Pusat Pengembangan Stem Cell Universitas Airlangga yang telah memberikan ijin dan kesempatan dan meminjamkan alat untuk melakukan penelitian di Stem Cell Unair
11. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. selaku Dosen Pembimbing Utama dan calon promotor yang telah meluangkan waktu untuk membimbing

dan memberi masukan, kritik dan saran serta motivasi hingga selesainya tesis ini.

12. Prof. Dr. Diah Savitri Ernawati, drg., M.Si., Sp.PM selaku Dosen Pembimbing Serta dan calon Ko-promotor I yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan memberi masukan, kritik dan saran serta motivasi hingga selesainya tugas akhir ini.
13. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp. Ort (K) selaku Kepala Departemen Ortodonsia dan calon Ko-promotor II yang telah memberikan ijin dan kesempatan serta dukungannya kepada saya untuk menempuh pendidikan lanjut.
14. Dr. Agung Dwi Wahyu Widodo, dr., M.Si., M.Ked.Klin., Sp. MK, selaku Ketua Program Studi Imunologi yang telah memberikan kesempatan dan dukungan untuk menempuh pendidikan di Imunologi
15. Dr. Pudji Lestari, dr., M.Kes, selaku penguji tesis yang telah meluangkan waktu untuk membimbing dan memberi masukan, kritik dan saran serta motivasi hingga selesainya tesis ini.
16. Prof. Muhammad Rubianto, drg., MS., Sp. Perio (K) selaku Ketua Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberi ijin untuk melakukan penelitian
17. Kedua orang tua saya Bapak Ir. Soeminto dan Ibu Florentina J., drg. MMT., yang dengan penuh cinta kasih dan kasih sayang telah membesarkan, mendidik, memberi dorongan semangat, doa dan bimbingannya senantiasa kepada kami anaknya dan saudara-saudara

saya Andreas Pratama Nugraha, drg., dan Albertus Putera Nugraha yang telah memberikan dukungan selama ini, terimakasih atas perhatian dan doa restu kalian semua.

18. Seluruh Staf Pusat Pengembangan Stem Cell Universitas Airlangga, Aristika Dinaryanti, drh., M.Si., Eryk Hendrianto, S.Si., M.Si., Igo Syaiful Ihsan, drh., Helen Susilowati, SKM., M.Si, Nora Ertanti, drh., M.Si., Deya Karsari, drh., M.Si, mbak yuni, fika, arifah, mas bro, yang telah banyak membantu, mendukung, mensukseskan penelitian tesis ini.
19. Wibi Riawan, S.Si., M.Si di laboratorium Biokimia Molekuler dan Satuman S.Si., M.Kes di laboratorium Ilmu Faal Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya atas bantuan, dukungan dan kerjasamanya dalam penelitian tesis ini
20. Seluruh staf pengajar Imunologi dan staf kependidikan Sekolah Pascasarjana UNAIR yang telah memberikan banyak ilmu yang bermanfaat dalam penelitian dan penulisan tesis.
21. Seluruh staf dosen Departemen Ortodonsia, Prof. Thalca Hamid, drg., MHPEd., PhD., Sp.Ort(K), Dr. Ari Triwardhani, drg., M.Sc., Sp.Ort.(K), Dr. I Gusti Aju Wahyu Ardani., drg., M.Kes., Sp.Ort (K), Jusuf Sjamsudin, drg., Sp.Ort.(K), Ervina Restiwulan Winoto, drg., Sp.Ort., M.Kes. Alida, drg., Sp.Ort., M.Kes., Ananda Firman Putranto, drg., M.Kes, Adya Pramusita, drg., M.Si., Dwi Rahmawati, drg., M.Kes., Nurul A. Rizky Putranti., drg. telah memberikan kesempatan serta dukungannya kepada saya untuk menempuh pendidikan lanjut.



22. Staf tenaga kependidikan Departemen Ortodonsia, Pak Pur, Masrifah, SE., Wulan Novitasari.
23. Seluruh teman sejawat dan seperjuangan Imunologi 2017, 2016, 2018 yang bersama-sama berjuang keras pantang menyerah dalam menyelesaikan S2 Imunologi.
24. Seluruh teman-teman Klinik Bantuan Publikasi Journal Internasional (KBPI) FKG UNAIR, Astari Puteri, drg., Dimas Aditya Ari, drg., M.Kes., Nadia Kartikasari, drg., M.Kes., Adya Pramusita, drg., M.Si., Jennifer Widjaja, drg., Prasiddha Mahardika, drg., M.Kes., Ratih Irmalia, drg., M.Kes., Alivy Azz Zahra., drg., Nastiti Faradilla, drg., M. Yoga, SKG., Maria Andisa Mayangsari, SKG. yang selalu menemani dalam suka dan duka, memberikan dukungan dan semangat selama ini, terimakasih atas perhatian kalian semua.
25. Nama-nama yang tidak saya sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan dalam menyelesaikan skripsi ini. Semoga Tuhan Yang Maha Kuasa senantiasa membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis selama penyelesaian skripsi.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna dan masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Dengan demikian kritik dan saran sangat diperlukan untuk penyempurnaan penelitian di waktu yang akan datang.

Surabaya, 17 November 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN.....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG.....	xiv
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	5
1.3 Temuan dan Target Luaran.....	6
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Mesenchymal Stem Cells</i> .....	8
2.1.1 <i>Definisi Mesenchymal Stem Cells</i> .....	8
2.1.2 Kemampuan Imunoregulasi dan Imunomodulasi oleh <i>Mesenchymal Stem Cells</i> .....	9
2.2 <i>Tissue Engineering</i> dan sel punca di bidang Kedokteran Gigi....	10
2.3 Sel Punca berasal dari <i>Gingival Mesenchymal Stem Cells</i> .....	11
2.4 Karakterisasi <i>Gingival Mesenchymal Stem Cells</i> .....	14
2.5 <i>Plasma Rich Fibrin</i> .....	15
2.6 Jaringan Tulang .....	18
2.6.1 Osteoprotegerin.....	19
2.6.2 <i>Bone Morphogenic Protein</i> .....	20
2.6.3 <i>MicroRNAs</i> .....	20
2.6.4 Jalur pensinyalan independen SMAD .....	21
2.6.5 <i>Runt-Related Transcription Factor-2</i> .....	22
2.6.6 Osteorix.....	23
2.6.7 <i>Alkaline Phosphatase</i> .....	24
2.6.8 Osteocalcin .....	25
2.6.9 Osteopontin.....	26
2.6.10 Osteonectin .....	26
2.6.11 Osteoblast .....	27
2.7 Oklusi.....	28
2.8 Maloklusi .....	28
2.9 Macam perawatan maloklusi .....	29
2.9.1 Macam alat ekspansi.....	30
2.9.2 <i>Rapid Maxillary Expansion</i> .....	30
2.9.3 Quad Helix .....	31
<b>BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....</b>	<b>32</b>
3.1.1 Tujuan Umum.....	32
3.1.2 Tujuan Khusus .....	32
3.2 Manfaat Penelitian .....	33
3.2.1 Manfaat Penelitian Teoritis.....	33
3.2.2 Manfaat Praktis.....	33
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>34</b>
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	34

4.2 Tempat dan Waktu penelitian.....	36
4.2.1 Tempat Penelitian .....	36
4.2.2 Waktu Penelitian.....	37
4.3 Obyek Penelitian.....	38
4.3.1 Besar obyek penelitian.....	38
4.4 Variable Penelitian.....	39
4.5 Definisi Operasional Variabel .....	39
4.6 Cara kerja penelitian.....	41
4.6.1 Persiapan Laik Etik Penelitian.....	41
4.6.2 Isolasi dan <i>Thawing</i> GMSCs .....	41
4.6.3 Uji karakterisasi GMSCs .....	42
4.6.3.1 Analisa <i>Immunocytochemistry</i> .....	42
4.6.3.2 Analisa <i>Flowcytometry</i> .....	43
4.6.4 Isolasi <i>Plasma Rich Fibrin</i> .....	43
4.6.5 Analisis Diferensiasi Osteogenik In vitro GMSCs dengan PRF .....	44
4.7. Analisis Data.....	45
4.8 Kerangka Operasional Alur Penelitian .....	46
4.9 Indikator Capaian Tahunan.....	47
4.10 Luaran Penelitian .....	47
<b>BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI .....</b>	<b>48</b>
5.1 Deskripsi Hasil Penelitian.....	48
5.2 Luaran yang di capai .....	60
5.2.1 Publikasi Jurnal Internasional terindeks SCOPUS .....	60
<b>BAB 6 RENCANA DAN TAHAPAN BERIKUTNYA.....</b>	<b>62</b>
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>	<b>64</b>
7.1 Kesimpulan .....	64
7.2 Saran .....	65
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>66</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>79</b>
<b>BUKTI LUARAN PENELITIAN.....</b>	<b>85</b>

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Kemampuan imunomodulator dan imunoregulator dari MSCs pada sel imunitas .....	10
2.2 Sumber <i>stem cell</i> dari rongga mulut manusia .....	12
2.3 Darah dalam tabung vacutainer setelah disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit terbagi atas tiga fraksi; fraksi paling bawah adalah sel darah merah, fraksi bagian tengah adalah Plasma Rich Fibrin dan fraksi paling atas adalah plasma aselular .....	16
2.4 Interaksi antara <i>Bioengineered bone graft</i> dengan <i>Growth Factors Plasma Rich Fibrin</i> .....	19
2.5 Osteoblastogenesis terregulasi-pensinyalan BMPs/Wnt melalui Runx2 dan Osterix.....	22
2.6 <i>Rapid Maxillary Expansion</i> .....	31
2.7 <i>Quad Helix</i> .....	33
4.1 Skema Rancangan Penelitian invitro .....	34
4.2 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi RUNX2 GMSCs. ....	34
4.3 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi ALP GMSCs.....	35
4.4 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi Osteocalcin GMSCs.....	35
4.5 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi Osteonectin GMSCs. ....	35
4.6 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi Osteopontin GMSCs.....	36
4.7 Kerangka Operasional Alur Penelitian .....	46
5.1 Morfologi <i>Gingival Mesenchymal Stem Cells</i> menunjukkan bentuk morfologi seperti fibroblast berbentuk <i>spindle</i> dan melekat pada dasar <i>plate</i> (panah merah).....	49
5.2. GMSCs mengekspresikan <i>marker</i> permukaan MSCs positif (+) (panah merah). A, B. CD44; C, D. CD73; E, F. CD90; G, H. CD105.....	49
5.3. GMSCs tidak mengekspresikan <i>marker</i> HSC (panah merah); A, B. negatif CD34; C, D. negatif CD45. ....	50
5.4. Hasil rerata <i>marker</i> permukaan GMSCs mengekspresikan <i>marker</i> positif (+) MSCs CD44, CD73, CD90, CD105 and negatif (-) <i>marker</i> permukaan HSCs CD34 dan CD45. ....	50
5.5 Hasil pengamatan dengan <i>Flowcytometry</i> menunjukkan karakterisasi GMSCs. A. GMSCs sangat mengekspresikan CD105 namun tidak mengekspresikan CD45; B. GMSCs juga mengekspresikan <i>marker</i> MSCs yaitu CD44, CD73, and CD90.....	51
5.6 Grafik rerata ekspresi ALP, RUNX2, OSP, OSN, OSC pada kelompok kontrol negatif hari ke 7, 14, 21.....	53

5.7	Grafik rerata ekspresi ALP, RUNX2, OSP, OSN, OSC pada kelompok kontrol positif hari ke 7, 14, 21.....	53
5.8	Grafik rerata ekspresi ALP, RUNX2, OSP, OSN, OSC pada kelompok perlakuan hari ke 7, 14, 21.....	53
5.9	Ekspresi ALP pada GMSCs tikus <i>wistar (Rattus Novergicus)</i> . ..... A. ALP Kontrol Negatif; B. ALP Kontrol Positif dan C. ALP kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi ALP positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 1000x. ....	54
5.10	Rerata ekspresi ALP hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF).....	55
5.11	Ekspresi RUNX2 pada GMSCs tikus <i>wistar (Rattus Novergicus)</i> . A. RUNX2 Kontrol Negatif; B. RUNX2 Kontrol Positif dan C. RUNX2 kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi RUNX2 positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x.....	56
5.12	Rerata ekspresi RUNX2 hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF).....	56
5.13	Ekspresi OSN pada GMSCs tikus <i>wistar (Rattus Novergicus)</i> OSN Kontrol Negatif; B. OSN Kontrol Positif dan C. OSN kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi OSN positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x. ....	57
5.14	Rerata ekspresi OSN hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF).....	57
5.15	Gambaran ekspresi OSN pada GMSCs tikus <i>wistar (Rattus Novergicus)</i> . A. OSN Kontrol Negatif; B. OSN Kontrol Positif dan C. OSN kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi OSN positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x. ....	58
5.16	Rerata ekspresi OSP hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF).....	58
5.17	Gambaran ekspresi OSC pada GMSCs tikus <i>wistar (Rattus Novergicus)</i> . A. OSC Kontrol Negatif; B. OSC Kontrol Positif dan C. OSC kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi OSC positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x. ....	59
5.18	Rerata ekspresi OSC hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF).....	60

**DAFTAR TABEL**

<b>TABEL</b>		<b>Halaman</b>
1.1	Rencana Target Capaian Tahunan.....	6
2.1.	<i>Growth Factors</i> pada <i>Plasma Rich Fibrin</i> .....	16
4.1	Rancangan jadwal kegiatan penelitian.....	37
5.1	Rerata ekspresi <i>marker</i> osteogenik hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF).....	52

**DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG**

<u>Simbol/ singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BMPRI1A	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor 1-A</i>
BMSCs	<i>Bone Marrow Stem Cells</i>
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
CBFA1	<i>Core-Binding Factor Alpha-1</i>
CD	<i>Cluster Differentiation</i>
COX	<i>Cyclooxygenase 2</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
DMP-1	<i>Dentin Matrix Protein-1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DSPP	<i>Dentin Sialophosphoprotein</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ESCs	<i>Embyronic Stem Cells</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>

GFs	<i>Growth Factors</i>
Gla	<i>Gamma-Carboxylated Glutamic Acid</i>
GVHD	<i>Graft Versus Host Disease</i>
hDFPCs	<i>Dental Follicle Precursor Cells</i>
hDPSCs	<i>Dental Pulp Stem Cells</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
hGMSCs	<i>Gingiva-Derived Stem Cells</i>
hPDLSCs	<i>Periodontal Ligament Stem Cells</i>
hSCAP	<i>Stem Cells From The Apical</i>
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cells</i>
ICC	<i>Immunocytochemistry</i>
IDO	<i>Indoleamine-Pyrrole 2,3Dioxygenase</i>
IFN- $\gamma$	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i>
IGF	<i>Insuline Growth Factor</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IL	<i>Interleukin</i>
iPSCs	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
ITD	<i>Institute Tropical Disease</i>
KSCs	<i>Keratinocyte Stem cells</i>
MEPE	<i>Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein</i>
miRNAs	<i>MicroRNAs</i>



MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NK	<i>Natural Killer Cell</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
OCIF	<i>Osteoclastogenesis Inhibitory Factor</i>
OPG	<i>Osteoprogenitor</i>
OSC	Osteocalcin
OSN	Osteonectin
OSP	Osteopontin
OSX	Osteorix
SIBLING	<i>Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoprotein</i>
SLE	Sistemik Lupus Eritematosus
SPARC	<i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</i>
SPP1	<i>Secreted Phosphoprotein-1</i>
TGF-B1	<i>Transforming Growth Factor-B1</i>
TNFRSF11B	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 11B</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDGF- $\beta$	<i>Platelet Derived Growth Factor-<math>\beta</math></i>
PGE2	Prostaglandin2
PRF	<i>Platelet rich fibrin</i>
RME	<i>Rapid Maxillary Expansion</i>

<b>RUN2X</b>	<i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>
<b>TGF<math>\beta</math>-1</b>	<i>Tumor Growth Factor-<math>\beta</math>1</i>
<b>TMJ</b>	<i>Temporo Mandibular Joint</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>SHED</b>	<i>Stem Cells From The Pulp Of Human Exfoliated Deciduous Teeth</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Maloklusi merupakan penyimpangan dari oklusi normal. Maloklusi dan kelainan dentofasial disebabkan bukan hanya karena proses patologi, tetapi juga karena kelainan yang terjadi selama perkembangan secara normal. Maloklusi merupakan hasil interaksi antara berbagai faktor yang dipengaruhi oleh pertumbuhan dan perkembangan (Proffit *et al.*, 2007)

Menurut *World Health Organization* (WHO), maloklusi merupakan masalah kesehatan gigi dan mulut tertinggi ketiga di antara karies gigi dan penyakit periodontal (Sim *et al.*, 2017). Sampai saat ini, prevalensi maloklusi masih tinggi yaitu sekitar 80%. Maloklusi dapat menyebabkan beberapa gangguan pada penderitanya seperti masalah dengan fungsi rongga mulut yakni gangguan sendi temporomandibular, gangguan pengunyahan, menelan, dan berbicara. Maloklusi juga dapat memungkinkan penderita mendapatkan trauma psikososial karena memiliki gangguan estetik wajah sehingga menurunkan kualitas hidup seseorang (Narayanan *et al.*, 2016)

Salah satu macam maloklusi adalah gigitan silang posterior. Prevalensi gigitan silang posterior bervariasi yaitu sekitar 6% sampai 23%, yang paling sering adalah gigitan silang posterior unilateral yakni sekitar 6-7% dibandingkan gigitan silang posterior bilateral dengan prevalensi 1.5% - 3.5%. Pilihan perawatan untuk

koreksi gigitan silang posterior adalah dengan mengekspansi lengkung maksila. Koreksi gigitan posterior apabila dilakukan secara dini, cepat dan tepat dapat memberikan hasil yang stabil dengan pola oklusi yang normal, pertumbuhan kondylus yang simetris, pergerakan *Temporo Mandibular Joint* (TMJ) yang harmonis dan pertumbuhan mandibula yang optimal (Biondi *et al.*, 2016).

Piranti yang digunakan untuk melakukan ekspansi lengkung maksila adalah *fixed palatal maxillary expansion appliances*, *W-arches*, dan *Quad Helix* yang dapat dimodifikasi dengan mengubah panjang dari lengan piranti tetapi harus disertai dengan penambahan penjangkaran pada beberapa gigi seperti gigi molar (Magnifico *et al.*, 2017).

Dalam rangka untuk mencapai perawatan ortodontik yang efektif dan optimal, diperlukan upaya mempercepat periode regenerasi setelah ekspansi maksila. Beberapa penelitian sebelumnya menggunakan beberapa macam *Growth Factors* (GFs) seperti *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1) dosis tunggal untuk stimulasi osteogenesis pada *sutura palatinus mediana* tikus yang diekspansi. Beberapa metode telah digunakan untuk menstimulasi deposisi tulang baru pada daerah-darah yang diekspansi. Namun, mekanisme dan stimulasi *stress-mediated* osteogenesis pada sutura yang diekspansi oleh faktor eksternal masih belum dapat dijelaskan (Uysal *et al.*, 2009; Uysal *et al.*, 2010; Ekizer *et al.*, 2015).

Kemampuan tulang dalam beregenerasi, terutama regenerasi pada tulang maksila setelah dilakukan ekspansi secara ortodontik masih menjadi tantangan tersendiri dalam bidang Kedokteran Gigi. Salah satu upaya untuk mempercepat

regenerasi tulang adalah dengan terapi sel punca. Sel punca memiliki peran penting untuk memperbaiki setiap organ dan jaringan. Sel punca dalam upaya rekayasa jaringan tulang menawarkan solusi yang menjanjikan untuk pendekatan secara mendalam untuk meregenerasi tulang (Barzilay *et al.*, 2009; Egusa *et al.*, 2012).

*Mesenchymal stem cells* (MSCs) merupakan *nonhaematopoietic stromal cells*. MSCs dapat memperbarui sel secara mandiri dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam tipe sel termasuk *mesenchymal lineages* seperti kondrosit, fibroblast, osteoblast, adiposit, dan tendon. Kemampuan multipoten, imunomodulator dan kapasitas bermigrasi ke jaringan terjejas serta secara langsung menginisiasi perbaikan jaringan membuat MSCs sangat cocok untuk perkembangan kedokteran regeneratif (Augello *et al.*, 2010; Law and Chaudhuri, 2013; Gao *et al.*, 2016).

Daerah orofacial merupakan area yang unik dan kaya akan sumber sel punca. Fokus pengembangan sel punca dalam kedokteran gigi adalah untuk meregenerasi jaringan orofacial yang hilang ataupun rusak. MSCs yang bersumber dari jaringan gigi kini menjadi topik yang menarik dan terkini karena dalam proses pengambilan dari jaringan gigi dapat dilakukan dengan prosedur minimal invasif, pilihan perawatan untuk sel punca selain secara *autologous* ataupun *allogenic*, serta kemampuannya untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam tipe sel secara *in vitro* (Miran *et al.*, 2016).

Sejauh ini terdapat 6 macam tipe MSCs yang berasal dari jaringan rongga mulut manusia yang telah dideskripsikan sejauh ini yaitu (1) *Dental Follicle*

*Precursor Cells* (hDFPCs), (2) *Dental Pulp Stem Cells* (hDPSCs), (3) *Stem Cells From The Pulp Of Human Exfoliated Deciduous Teeth* (SHED), (4) *Stem Cells From The Apical Papilla* (hSCAP), (5) *Periodontal Ligament Stem Cells* (hPDLSCs), dan (6) *Gingiva-Derived Stem Cells* (hGMSCs) (Diomedea *et al.*, 2017). Pemanfaatan sel punca yang berasal dari rongga mulut masih jarang diteliti dan diaplikasikan padahal memiliki potensi yang baik untuk regenerasi jaringan oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut (Egusa *et al.*, 2012).

GMSCs dapat diperoleh dari jaringan gingiva yang mengalami hiperplasi. GMSCs memiliki karakteristik fenotip yang mirip dengan *Bone Marrow Stem Cells* (BMSCs). GMSCs memiliki kemampuan difrensiasi dan pembaruan sel. Sel punca ini juga memiliki kemampuan spesifik untuk beregenerasi menjadi jaringan periodontal seperti sementum dan tulang alveolar ketika di transplantasikan ke tikus dengan kondisi imunokompromais. GMSCs juga secara spesifik menginduksi formasi matriks tulang pada struktur lamellar dengan merekrut sel host. Kemampuan osteogenik GMSCs perlu ditelusuri secara lebih mendalam (Egusa *et al.*, 2012b; Miran, Mitsiadis and Pagella, 2016; Niibe *et al.*, 2017).

Sel punca untuk berdiferensiasi dan berproliferasi dengan lebih baik membutuhkan *Growth Factors* (GFs). *Platelet Rich Fibrin* (PRF) merupakan salah satu biomaterial natural yang memiliki banyak sekali GFs dan dapat diproduksi dengan mudah hanya dengan mensentrifuse tanpa antikoagulan. PRF kaya akan GFs seperti *Platelet Derived Growth Factor- $\beta$*  (PDGF- $\beta$ ), *Transforming Growth Factor-*

$\beta$ 1 (TGF $\beta$ -1), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Insuline Growth Factor* (IGF-I) (Baek *et al.*, 2011; Kazemi *et al.*, 2014; Kamadjaja *et al.*, 2016).

Matriks fibrin yang terkandung dalam PRF memiliki sifat fleksibel, elastis dan kuat. PRF terdiri dari konsentrasi thrombin yang lemah dengan ikatan equilateral yang membentuk anyaman fibrin yang halus dan fleksibel sehingga mendukung sitokin serta migrasi sel sehingga dapat menjadi *scaffold* yang baik untuk memfasilitasi diferensiasi osteogenik GMSCs. *Marker* osteogenik dari GMSCs yang dapat diamati yaitu *Alkaline Phospatase* (ALP), *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX2), *Osteonectin* (OSN), *Osteopontin* (OSP), *Osteocalcin* (OSC) (Granéli *et al.*, 2014; Sumarta *et al.*, 2016).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk menganalisa dan membuktikan akselerasi diferensiasi osteogenik kombinasi *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dengan *Plasma Rich Fibrin* untuk ekspansi tulang rahang secara *in vitro*.

## 1.2. Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka di rumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu

1. Bagaimanakah akselerasi diferensiasi osteogenik *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dengan *Plasma Rich Fibrin* terhadap ekspresi RUNX2 untuk ekspansi tulang maksila secara *in vitro*?
2. Bagaimanakah akselerasi diferensiasi osteogenik *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dengan *Plasma Rich Fibrin* terhadap ekspresi ALP untuk ekspansi tulang maksila secara *in vitro*?

3. Bagaimanakah akselerasi diferensiasi osteogenik *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dengan *Plasma Rich Fibrin* terhadap ekspresi OSC untuk ekspansi tulang maksila secara *in vitro*?
4. Bagaimanakah akselerasi diferensiasi osteogenik *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dengan *Plasma Rich Fibrin* terhadap ekspresi OSP untuk ekspansi tulang maksila secara *in vitro*?
5. Bagaimanakah akselerasi diferensiasi osteogenik *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dengan *Plasma Rich Fibrin* terhadap ekspresi OSN untuk ekspansi tulang maksila secara *in vitro*?

### 1.3 Temuan dan Target Luaran

**Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan.**

NO	Jenis Luaran		Indikator capaian		
			TS	TS+1	TS+2
1	Publikasi ilmiah	Internasional	V	V	
		Nasional terakreditasi			
2	Pemakalah dalam temu ilmiah	Internasional	V	V	
		Nasional			
3	Invited speaker dalam temu ilmiah	Internasional			
		Nasional	V	V	
4	Visiting Lecturer	Internasional			
5	Hak Kekayaan Intelektual (HKI)	Paten			
		Paten sederhana			
		Hak cipta			
		Merk dagang			
		Rahasia Dagang			
		Desain produk industri			
		Indikasi geografis			
		Perlindungan varietas tanaman			
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu			
6	Teknologi Tepat Guna				
7	Model/Purwarupa/Desain/Karya seni/Rekayasa Sosial				
8	Buku ajar (ISBN)				
9	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)				





## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

**2.1 *Mesenchymal Stem Cells*****2.1.1 Definisi *Mesenchymal Stem Cells***

*Mesenchymal stem cells* (MSCs) adalah sel punca nonhematopoietik yang terdapat di dalam stroma sumsum tulang dengan fraksi yang sangat kecil (0,001-0,01%) dari jumlah populasi sel berinti. Sel prekursor multipoten ini pertama kali diidentifikasi oleh Friedenstein berdasarkan penelitian yang menunjukkan bahwa sel stroma yang berasal dari sumsum tulang adalah tipe sel prekursor umum dari jaringan mesenkimal. MSCs memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi jaringan mesenkimal seperti tulang, tulang rawan, tendon, otot dan jaringan adiposa (Gao *et al.*, 2016).

MSCs memiliki aktivitas antiinflamasi, imunoregulator, dan imunomodulator. Banyak uji klinis telah dilakukan untuk transplantasi MSCs dalam mengobati berbagai penyakit yang timbul dari kegagalan sistem imunitas. MSCs memiliki kapasitas *homing* yang spesifik dengan demikian dapat memperbaiki jaringan terjejas dan memiliki kapasitas perbaikan diri sendiri. MSCs juga memiliki efek immunosupresif dengan menekan proliferasi sel dan produksi sitokin yang menunjukkan efek imunomodulator MSCs atau efek peningkatan sistem imunitas yang dihasilkan oleh agregasi sel imun kemokin termediasi (Gao *et al.*, 2016).

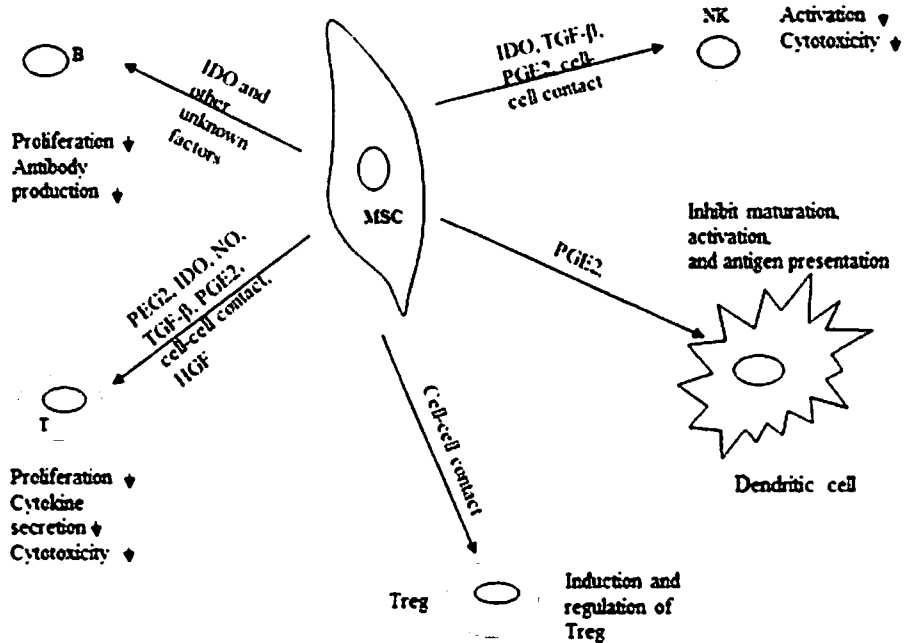
### 2.1.2 Kemampuan Imunoregulasi dan Imunomodulasi oleh *Mesenchymal Stem Cells*

MSC dewasa dapat mempengaruhi respons imun sel T dan B: (1) MSCs dewasa menekan proliferasi sel T, sekresi sitokin dan sitotoksitas dan mengatur keseimbangan Th1 / Th2. MSC dewasa mengatur fungsi sel T regulasi; (3) MSCs meningkatkan viabilitas sel B tetapi juga dapat menghambat proliferasi dan menahan siklus sel. MSCs mempengaruhi sekresi antibodi dan produksi molekul ko-stimulator dari sel B; (4) MSCs menghambat pematangan, aktivasi dan presentasi antigen sel dendritik; dan (5) MSC dewasa juga menghambat Interleukin- 2 (IL-2) dan aktivasi sel natural killer (NK) terinduksi (Gao et al., 2016).

Serupa dengan MSC dewasa, MSCs yang berasal dari pluripoten seperti *Embryonic Stem Cells* (ESCs) atau *Induced Pluripotent Stem Cells* (iPSCs) juga menunjukkan potensi kuat untuk imunomodulasi dan imunoregulator dengan penghambatan proliferasi limfosit dan sel NK. ESCs-MSCs menekan proliferasi limfosit T termasuk CD4+ atau CD8+. MSCs juga menekan efek sitotoksik dari sel NK yang diaktifkan dan menurunkan susunan reseptor pengaktif NK. iPSC-MSCs dapat menghambat proliferasi limfosit phytohemagglutinin dengan cara yang tergantung dosis (Gao et al., 2016).

MSCs memiliki efek imunomodulator pada jenis sel sistem imunitas yang sama tergantung pada *niche* atau penyakit yang diderita. MSCs menurunkan respon Th1 pada pasien dengan *Graft Versus Host Disease* akut (GvHD) dan penyakit autoimun seperti Sistemik Lupus Eritematosus (SLE) (Gao et al., 2016)

MSCs memiliki kemampuan menjaga homeostasis tubuh. Mekanisme imunomodulasi MSC belum dapat dijelaskan namun kemungkinan kemampuan imunomodulasi dan imunoregulasi MSCs dimediasi oleh berbagai sel komponen sistem imunitas (gambar 2.1). MSC mengatur sistem imun *innate* dan adaptif dengan menekan sel T dan maturasi sel dendritik, mengurangi aktivasi dan proliferasi sel B dan penghambatan proliferasi dan sitotoksitas sel NK. MSCs juga menstimulasi pembentukan sel T regulator. Kemampuan imunomodulasi dan imunoregulator MSCs termasuk mengubah *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1), Prostaglandin E2 (PGE2), *Hepatocyte Growth Factor* (HGF), Indoleamine-Pyrrole 2,3-Dioxygenase (IDO), Nitric Oxide (NO) dan Interleukin-10 (IL-10). Sitokin seperti *Interferon-γ* (IFN-γ), sendiri maupun yang dikombinasikan dengan *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α), IL-1α atau IL-1β, menginduksi MSCs untuk mengeluarkan berbagai enzim seperti *Cyclooxygenase 2* (COX-2), PGE2 dan IDO yang memediasi aktivitas immunosupresif. PGE2 diregulasi MSCs dengan menstimulasi sel mononuklear perifer menghambat proliferasi sel T. IDO mengkatalisis konversi tryptophan menjadi kynurenine, mampu menghambat pertumbuhan dan fungsi sel imunitas. NO yang diproduksi MSC adalah salah satu mediator utama sel T (Gao *et al.*, 2016).



Gambar 2.1. Kemampuan imunomodulator dan imunoregulator dari MSCs pada sel imunitas (Gao *et al.*, 2016).

## 2.2 Tissue Engineering dan sel punca di bidang Kedokteran Gigi

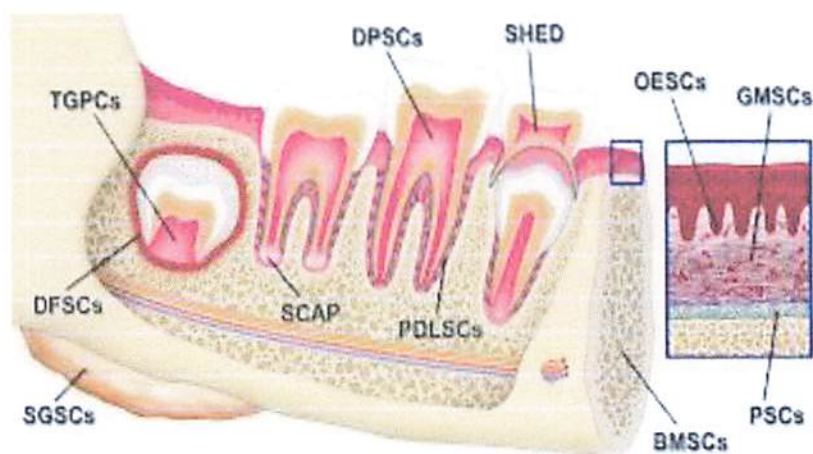
Di bidang kedokteran gigi, perawatan ortodonti dengan menggunakan metode ekspansi lengkung tulang maksila masih menjadi tantangan tersendiri. Hal tersebut dikarenakan membutuhkan waktu yang relatif lama namun memiliki hasil perawatan yang optimal. Tujuan akhir dari setiap perawatan ortodonti adalah mengoreksi maloklusi serta mencapai oklusi normal. Oklusi normal memiliki 6 (enam) karakteristik atau *Key of Occlusion* menurut Andrew (1972) yaitu: relasi molar (*molar relationship*) kelas I, angulasi mahkota (*correct crown angulation*), Inclinasi mahkota (*correct crown inclination*), tidak ada rotasi (*absence of rotation*), kontak proksimal yang rapat (*tight proximal contact*), penampang oklusal yang datar (*flat occlusal plane*) (Egusa *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2014; Chamieh *et al.*, 2016).

Berbagai macam terapi telah diperkenalkan untuk memperoleh hasil yang cepat dan optimal dalam mengekspansi lengkung tulang maksila dengan pemberian *Growth Factors* (GFs) seperti *Transforming Growth Factor-β1* (TGF-β1) dosis tunggal untuk stimulasi osteogenesis pada *sutura palatinus mediana* tikus yang diekspansi (Ekizer *et al.*, 2015). Perawatan konvensional tersebut belum memberikan hasil yang baik sehingga menjadi fenomena yang belum dapat dijelaskan. Berbagai macam komplikasi bisa terjadi misalnya infeksi, inflamasi, serta kehilangan fungsi. Keadaan ini menimbulkan keinginan untuk mencari alternatif lain yang lebih baik. Pendekatan *tissue engineering* yang berbasis sel punca diharapkan dapat memperoleh hasil perawatan ortodonti yang lebih baik dan optimal salah satunya dengan aplikasi kombinasi GMSC dan PRF untuk menstimulasi osteogenesis terhadap lekung tulang maksila yang diekspansi secara ortodonti.

### 2.3 Sel Punca berasal dari *Gingival Mesenchymal Stem Cells*

Gingiva merupakan jaringan yang unik dan merupakan komponen dari jaringan periodontal yang mengelilingi gigi dan tulang alveolar. Gingiva memiliki kemampuan untuk beregenerasi secara baik tanpa jaringan parut ketika terkena jejas. Kemampuan regenerasi dan penyembuhan luka gingiva relatif lebih cepat yakni sekitar 7-14 hari dibandingkan dengan jaringan kulit yaitu 14-21 hari. Hal tersebut menunjukkan bahwa jaringan gingiva memiliki sel punca *niche* yang memadai untuk regenerasi jaringan (Tang *et al.*, 2011; Venkatesh *et al.*, 2017).

*Gingival Mesenchymal Stem Cells* (GMSCs) teridentifikasi pada gingiva (gambar 2.2). Sumber dari GMSCs dapat diisolasi dari jaringan gingiva yang mengalami hiperplasi karena perawatan ortodonti (Tang *et al.*, 2011). GMSCs memiliki kemampuan yang menjanjikan dalam hal kemampuan regenerasi, imunoregulator dan imunomodulator. Gingiva dapat menjadi sumber MSCs yang baik karena memiliki sel punca *niche* yang melimpah dan mudah diisolasi melalui prosedur yang minimal infasif dibandingkan dengan BMSCs. GMSCs memiliki karakteristik fenotip yang mirip dengan BMSCs. GMSCs memiliki kemampuan diferensiasi dan pembaruan sel. GMSCs menunjukkan proliferasi yang lebih tinggi dan memiliki kemampuan memperbanyak diri lebih baik jika dibandingkan dengan sel punca yang berasal dari sumsum tulang belakang dewasa (Tomar *et al.*, 2010). GMSCs mampu berdiferensiasi menjadi sel osteogenik, sel adiposit, dan sel chondrogenik (Niibe *et al.*, 2017). Sel punca ini juga memiliki kemampuan spesifik untuk beregenerasi menjadi dentin, pulpa, jaringan periodontal seperti sementum dan tulang alveolar ketika ditransplantasikan *in vivo* (Egusa *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Sumber stem cell dari rongga mulut manusia (Egusa *et al.*, 2012).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, GMSCs tidak dapat berdiferensiasi secara langsung menjadi osteoblast, akan tetapi merangsang pembentukan tulang baru melalui pembentukan suatu *template* osteoinduktif untuk mendapatkan sel osteogenik pada *host murin* (Fawzy El-Sayed dan Dörfer, 2016)

Osteoblast bertanggung jawab terhadap osteogenesis dan pembentukan matriks tulang baru. Pada membran luar osteoblast terdapat kandungan ALP dimana enzim ini dapat memecah ikatan fosfat secara organik. Lalu fosfat yang bebas akan berkontribusi terhadap inisiasi dan pertumbuhan progresif dari kristal mineral tulang. Osteoblast menghasilkan berbagai macam sitokin yang membantu meregulasi metabolisme sel. Faktor kunci pada kecepatan pertumbuhan sel tulang adalah perluasan jumlah faktor pertumbuhan dari osteoblas, prekursor, atau keduanya (Rutkovskiy *et al.*, 2016).

Induksi kemampuan osteogenesis MSC dapat dilakukan meliputi pemberian rangsang rangsangan kimia seperti  $\beta$ -gliserol fosfat, dexamethasone, dan asam askorbat. Matriks mineral terbentuk dari MSCs akan menghasilkan produk osteogenik yang dapat dijadikan biomarker osteogenesis atau diferensiasi MSCs- osteoblast (Hung *et al.*, 2013).

Osteoblast dihasilkan oleh BMP superfamily antara lain BMP-2 dan TGF- $\beta$ , serta IGF-I dan IGF-II, PDGF, dan FGF. Waktu dari sekresi dan interaksi kompleks pada faktor pertumbuhan ini masih harus diklarifikasi kembali, kombinasi IGF-I, TGF- $\beta$ , dan PDGF dapat meningkatkan kecepatan dari formasi tulang dan perbaikan tulang yang berguna di masa yang akan datang pada terapi dental (Crotti *et al.*, 2015).

Kombinasi MSCs dan PRF diduga dapat digunakan untuk menstimulasi osteogenesis pada lengkung tulang maksila yang diekspansi secara ortodonti. Penelitian yang telah dilakukan periode terakhir ini memperkenalkan mekanisme yang mendasari diferensiasi GMSCs menjadi endotelium fungsional dan menunjukkan diferensiasi dari GMSCs ke arah osteoblast. Inovasi perawatan kedokteran gigi melalui teknologi *tissue engineering* dan menunjukkan bahwa regenerasi tulang dengan penggunaan sel punca pulpa yang dikombinasi dengan BMP2 dapat memacu diferensiasi sel osteoblast dalam pembentukan tulang baru. penggunaan sel punca mempunyai peranan dalam regenerasi dan perbaikan defek jaringan tulang (Tomar *et al.*, 2010; Fawzy El-Sayed dan Dörfer, 2016).

#### **2.4 Karakterisasi *Gingival Mesenchymal Stem Cells***

Karakterisasi sel untuk MSCs yang berasal dari gingiva (GMSCs) harus memiliki hasil positif yang konsisten terhadap *marker* positif (+) CD105, CD44, CD90, STRO1 CD106, CD146, CD166 dan memiliki *marker* negatif (-) CD34, CD38, CD45, CD54. MSCs yang mengekspresikan *marker* tersebut memiliki kemampuan berdeferensiasi menjadi adipogenik, khondrogenik, dan osteogenik (Jin *et al.*, 2015).

CD105 atau endoglin yang digunakan sebagai *marker* sel untuk karakterisasi MSCs berhubungan dengan proliferasi dan induksi protein hypoksia melimpah dan terlihat dalam sel Endotel Angiogenik (EA). CD105 (endoglin) terbukti merupakan reseptor yang terlibat dalam TGF- $\beta$ , mengikat TGF- $\beta$ 1 dan TGF- $\beta$ 3 yang membantu aktivasi dan proliferasi fibroblast. TGF- $\beta$  menghambat proliferasi dari Endothelial Cells (EC), migrasi, dan pembentukan pembuluh darah kapiler (Du *et al.*, 2016).

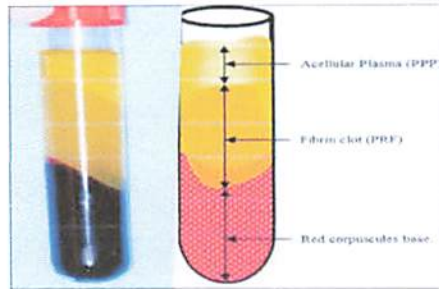


Transmembran glikoprotein CD44 diekspresikan dalam banyak jaringan dan memiliki berbagai fungsi. Merupakan reseptor penting yang terlibat dalam interaksi sel matriks dan telah ditunjukkan untuk diekspresikan pada MSCs. CD44 merupakan reseptor transmembran tunggal bertanggung jawab untuk mengikat Hyaluronat. Peningkatan kadar CD44 merupakan ciri dari aktivitas sel (Du *et al.*, 2016).

CD90 juga dikenal dengan *Thymocyte Differentiation Antigen-1* (Thy-1) berdasarkan asal ditemukannya pada timosit. CD90 terekspresikan pada beberapa MSCs, *Hematopoietic Stem cells* (HSCs), *Keratinocyte Stem cells* (KSCs) dan pada beberapa sel fibroblast, neuron, serta endothelial (Moraes *et al.*, 2016)

## **2.5 Plasma Rich Fibrin**

Regenerasi jaringan membutuhkan jumlah sel yang mencukupi dan *Growth Factors* (GFs). *Platelet Rich Fibrin* (PRF) merupakan salah satu biomaterial natural yang memiliki banyak sekali GFs dapat diproduksi dengan mudah hanya dengan mensentrifuse tanpa antikoagulan (gambar 2.3). Matriks fibrin yang terkandung dalam PRF memiliki sifat fleksibel, elastis dan sangat kuat. PRF terdiri dari konsentrasi thrombin yang lemah dengan ikatan equilateral yang membentuk anyaman fibrin yang halus dan fleksibel, sehingga mendukung sitokin serta migrasi sel sehingga dapat menjadi *scaffold* yang baik untuk memfasilitasi diferensiasi MSCs (Kamadajaja *et al.*, 2016; Sumarta *et al.*, 2016).



Gambar 2.3 Darah dalam tabung *vacutainer* setelah disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit terbagi atas tiga fraksi; fraksi paling bawah adalah sel darah merah, fraksi bagian tengah adalah Plasma Rich Fibrin dan fraksi paling atas adalah plasma aselular (Naik *et al.*, 2013).

*Platelet Rich Fibrin* (PRF) diketahui mengandung berbagai macam GFs seperti *Platelet Derived Growth Factor- $\beta$*  (PDGF- $\beta$ ), *Tumor Growth Factor- $\beta$ 1* (TGF $\beta$ -1), *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), *Insulin Growth Factor* (IGF-I) (tabel 2.1) (Baek *et al.*, 2011; Kazemi *et al.*, 2014).

Kadar GFs *in-vivo* tetap terjaga setelah dilakukan pembuatan PRF. Konsentrasi trombosit dalam PRF dapat meningkat delapan kali dari kadar trombosit di dalam darah sehingga kadar GFs di dalam plasma kaya trombosit juga meningkat delapan kali termasuk IGF-1 (Kobayashi *et al.*, 2016).

Tabel 2.1 *Growth Factors* pada *Plasma Rich Fibrin* (Kobayashi *et al.*, 2016).

GFs	Sumber	Fungsi
<i>Transforming Growth Factor- beta</i> (TGF- $\beta$ )	<i>Platelets, extracellular matrix</i> dari tulang, cartilage matrix, mengaktifkan sel Th1 dan sel <i>Natural Killer</i> (NK) makrofag/monosit dan neutrofil	Menstimulasi proliferasi MSC yang tidak terdiferensiasi, mengatur endothelial, fibroblastik dan osteoblastik mitogenesis; mengatur sintesis kolagen dan sekresi kolagenase; mengatur efek mitogenik dari GFs lainnya; menstimulasi endothelial kemotaksis dan angiogenesis; menghambat makrofag dan proliferasi limfosit.

<i>Fibroblast Growth Factor (FGF)</i>	Platelets, makrofag, sel mesenkimal, khondrosit, osteoblast	Meningkatkan pertumbuhan dan differensiasi khondrosit dan osteoblasts; mitogenetik untuk sel mesenkimal, khondrosit dan osteoblasts.
<i>Platelet Derived Growth Factor (PDGF-<math>\beta</math>)</i>	Platelets, osteoblasts, sel endotelial, makrofag, monosit dan sel otot polos	Mitogenetik untuk sel mesenkimal dan osteoblasts; menstimulasi kemosistaksis dan mitogenesis pada fibroblast/glia/sel otot polos; meregulasi sekresi dan sintesis kolagen; menstimulasi makrofag dan kemosistaksis neutrofil.
<i>Insuline Growth Factor (IGF1 and 2)</i>	Sel tulang skelet	Menstimulasi pembentukan, pertumbuhan dan metabolisme tulang, mencegah apoptosis tulang secara berlebih.

## 2.6 Jaringan Tulang

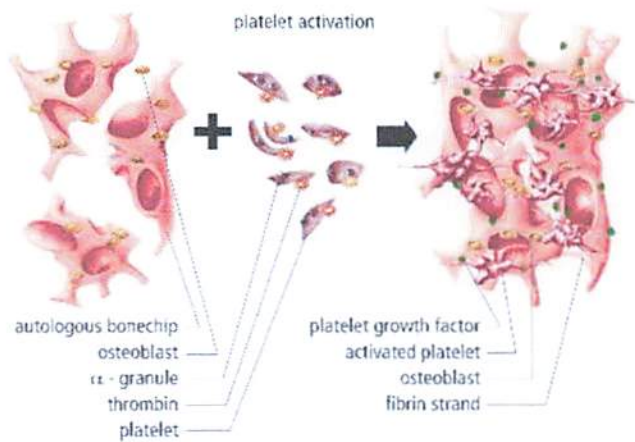
Tulang dapat didefinisikan sebagai jaringan biologis yang terdiri dari sel-sel aktif yang dinamis berintegrasi menjadi susunan yang kompak. Sel tulang terdiri dari osteoblast, osteoklas, osteosit, osteoprogenitor (OPG) dan komponen hematopoetik. Proses regenerasi tulang pada kasus fraktur atau defek tulang lainnya tergantung dari keseimbangan antara aposisi, resorpsi, *remodelling*, dan dipengaruhi berbagai komponen biokimia, biomekanis, selular dan mekanisme patologi. Selama proses regenerasi tulang, tulang dewasa membentuk osteoblast yang mensekresikan GFs yang juga terdapat pada platelet. Osteoklas berfungsi sebagai sel yang meresorpsi tulang, dikontrol oleh mekanisme hormon dan seluler. Pada kondisi homeostasis, aktivitas osteoblast dan osteoklas dalam keadaan yang seimbang (Brunetti *et al.*, 2013).

Pada regenerasi fraktur tulang (*callus formation*), PRF memiliki peran sebagai sumber eksogenus GFs yang menstimulasi aktivitas sel tulang, berdasarkan relevansi pertumbuhan. Pada kasus regenerasi luka, regenerasi tulang juga melewati 3 tahap yaitu inflamasi, proliferasi, *remodelling*. Pada defek tulang, PRF melepaskan PDGF, TGF- $\beta$ , dan EGF serta menyediakan sistem yang ideal untuk mengirimkan GFs pada jaringan yang terjejas (gambar 2.4) (Hankenson *et al.*, 2015).

Sumber yang kaya akan TGF- $\beta$  dapat di temukan pada PRF, tulang dan kartilago. TGF- $\beta$ 1 dan TGF- $\beta$ 2 terdapat pada platelets. TGF- $\beta$ 1 memiliki potensi yang sangat baik untuk regenerasi tulang karena khondrosit and osteoblast memiliki reseptor yang sesuai dengan TGF- $\beta$ 1. TGF- $\beta$  juga berkontribusi untuk regenerasi tulang pada setiap tahap. Kombinasi antara PDGF, TGF- $\beta$ , FGF, IGF secara optimum menciptakan stimulasi differensiasi dan proliferasi dari osteoblast menjadi sel osteogenik. Proliferasi osteoblast meningkat karena aksi mitogenik PDGF pada differensiasi MSC ketika TGF- $\beta$  dan EGF ditambahkan (Masuki *et al.*, 2016; Rutkovskiy *et al.*, 2016).

Kemampuan regenerasi tulang berdasarkan tiga konsep yaitu: osteogenesis, osteoinduksi, dan osteokondusi. Osteogenesis dideskripsikan sebagai kemampuan untuk memproduksi tulang baru dan dideterminasikan ketika terdapat sel osteoprogenitor dan sel prekursor osteogenik pada daerah tulang terjejas. PDGF ditemukan pada tiga sampai empat tahap selama regenerasi tulang. Osteoinduksi didefinisikan sebagai kemampuan untuk menstimulasi sel punca untuk berdiferensiasi menjadi sel dewasa melalui stimulasi GFs lokal seperti PDGF dan TGF- $\beta$  (Brunetti *et al.*, 2013; Crotti *et al.*, 2015).

Osteokonduksi didefinisikan sebagai kondisi dimana *scaffold* menyediakan untuk vaskuler dan migrasi seluler. *Scaffold* biasanya berasal dari autograft, allograft atau matriks *artificial* seperti *demineralized bone* (DMB), *hydroxyapatite*, *tricalcium phosphate*, dan kolagen Rutkovskiy, Stenslökken dan Vaage, 2016).



**Gambar 2.4** Interaksi antara *Bioengineered bone graft* dengan *Growth Factors Plasma Rich Fibrin* (Kökdere *et al.*, 2015).

### 2.6.1 Osteoprotegerin

Osteoprotegerin (OPG) juga dikenal sebagai *Osteoclastogenesis Inhibitory Factor* (OCIF), atau *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 11B* (TNFRSF11B) yang merupakan protein yang dikode oleh gen TNFRSF11B. OPG merupakan sitokin reseptor. OPG dikenal sebagai *the bone protector* yang bertugas melindungi tulang dari resorpsi tulang berlebihan dan meningkatkan sekresi osteoblast dengan cara merangsang RUNX2 dan osteorix. Ekspresi OPG diregulasi oleh pensinyalan BMP2 pada osteoblas, jalur yang sama yang meregulasi pembentukan tulang melalui osteoblastogenesis (Widschwendter *et al.*, 2015).

### 2.6.2 *Bone Morphogenic Protein*

*Bone Morphogenic Protein-2* (BMP-2) memiliki peran penting dalam pembentukan dan perkembangan tulang dan kartilago. BMP-2 terlibat dalam jalur *hedgehog* jalur pensinyalan TGF- $\beta$  dan interaksi reseptor sitokin seperti SMAD. BMP-2 juga terlibat dalam diferensiasi sel kardio dan transisi sel epitelial menjadi mesenkimal. BMP-2 secara potensial menginduksi diferensiasi osteoblast. BMP-2 dalam mekanisme diferensiasi osteogenik bekerja melalui reseptornya yaitu *Bone Morphogenic Protein Receptor 1-A* (BMPRI A) (Graves *et al.*, 2016).

### 2.6.3 *MicroRNAs*

*MicroRNAs* (miRNAs) adalah kelompok RNA beruntai tunggal tanpa kode yang berdimensi sekitar 22 nukleotida. miRNAs telah muncul sebagai regulator penting dari proses fisiologis dan patologis. MiRNA berfungsi pada tingkat post-transkripsional dengan mengatur secara negatif tranlasi mRNA target melalui pengikatan komplementer yang tidak lengkap ke domain 30- *Untranslated Region* (30-UTR). Sejumlah miRNA telah dilaporkan memiliki peran berbeda pada MSC selama diferensiasi osteogenik. Peran regulasi miRNA osteogenesis telah menarik banyak perhatian. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa miRNA dikaitkan dengan diferensiasi osteogenik. Beberapa microRNA seperti miR-142-3p, miR-100, miR-135, miR-155, miR-34c, miR-182, dan miR-22 telah terbukti terlibat secara fungsional dalam pengaturan diferensiasi osteogenik dengan menargetkan komponen jalur pensinyalan terkait pada jaringan tulang (Xu *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2016).

MiR-141 dan miR-200a terlibat dalam diferensiasi pre-osteoblas melalui regulasi target yaitu *Dlx5*. MiR-31 menurunkan kemampuan osteogenesis MSCs dengan secara langsung menargetkan *SATB2*. BMP-2 dan miR-135 meningkatkan kemampuan diferensiasi osteogenik MSCs dengan mempengaruhi *Smad5*. Tingkat ekspresi mRNA dari melalui *marker* *RUNX2*, *OSN*, *OSC* dan *OSP* dipromosikan secara signifikan oleh miR-135. MiR-135 diregulasi selama diferensiasi osteogenik. MiR-135 secara negatif mengatur ekspresi *Hoxa2*, pengatur kunci diferensiasi osteogenik, melalui pengikatan ke 3'-UTR mRNA *Hoxa2* (Xu *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2016).

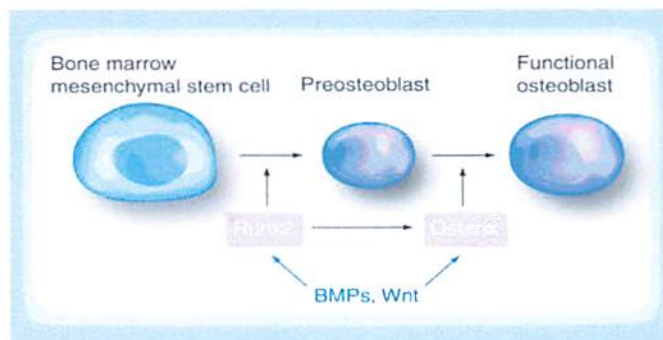
### 2.6.3 Jalur pensinyalan independen SMAD

Hampir seluruh BMP mengaktifkan jalur pensinyalan independen SMAD1/5/8 melalui R-SMAD. SMAD1/5/8-SMAD4 kompleks mentranskripsikan ekspresi *RUNX2*. Aktivasi transkripsi *RUNX2* menginisiasi ekspresi gen osteoblast. SMAD1 merupakan mediator penting dari fungsi osteogenik BMP. SMAD1 dan SMAD5 bersama-sama menjadi perantara dari peran BMP sebagai perkembangan tulang endokondral. SMAD8 sedikit berkontribusi pada perkembangan tulang dibandingkan dengan SMAD1 dan SMAD5. BMP3 mengaktifkan SMAD2/3 yang merupakan antagonis dari aktifitas osteogenik dari SMAD1/5/8 dan berlawanan fungsi dari BMP lainnya yang berperan dalam diferensiasi osteogenik. BMP dan pensinyalan TGF- $\beta$ s keduanya melalui pensinyalan SMAD4. SMAD4 memiliki berbagai macam peran dalam tumbuh kembang dan homeostasis tulang (Graves *et al.*, 2016).

#### 2.6.4 Runt-Related Transcription Factor-2

*Core-Binding Factor Alpha 1* (CBFA1) atau *Runt-Related Transcription Factor-2* (RUNX2) merupakan faktor transkripsi kunci terkait dengan diferensiasi osteoblast. Gangguan pada kedua faktor ini mengakibatkan hambatan pada pembentukan tulang karena diferensiasi osteoblast tidak terjadi. RUNX2 seringkali terekspresi pada osteoblast hari ke 7 dan 14. OSX dan RUNX2 secara berkala mengatur proses diferensiasi osteoblast (Brunetti *et al.*, 2013; Crotti *et al.*, 2015).

RUNX2 memainkan peran penting dalam tahap awal diferensiasi dari BMSC menjadi preosteoblasts (Gambar 2.5). OSX terutama mengatur proses diferensiasi preosteoblasts menjadi osteoblasts fungsional. RUNX2 secara umum menjadi pengatur awal dan osterix adalah pengatur selama diferensiasi osteoblasts. Kedua gen pengkode osteoblastogenik ini juga diatur oleh sejumlah jalur sinyal perkembangan seperti jalur pensinyalan *the canonical Wnt* dan *Bone Morphogenetic Protein* (BMP). Wnt/Cytosolic  $\beta$  catenin merangsang osteoblastogenesis melalui pengaktifan faktor transkripsi osteogenik RUNX2 dan OSX. BMP-2 menginduksi osteoblastogenesis melalui aktivasi RUNX2 dan OSX melalui pembentukan kompleks reseptor spesifik yaitu reseptor SMAD (Graves *et al.*, 2016).



Gambar 2.5 Osteoblastogenesis terregulasi-pensinyalan BMPs/Wnt melalui Runx2 and Osterix (Graves *et al.*, 2016).



Sel progenitor osteoblas mengekspresikan peningkatan aktivitas ALP yang dikenal sebagai fase preosteoblasts. Fase transisi dari preosteoblast menjadi osteoblast yang dewasa dikarakterisasi dengan peningkatan ekspresi dari Osterix dan diukur melalui sekresi protein matriks tulang seperti OSC, OSP, dan OSN. Peningkatan sekresi protein matriks tulang selaras dengan peningkatan osteosit sehingga mengindikasikan tingginya kemampuan diferensiasi osteogenik (Graves *et al.*, 2016; Rutkovskiy *et al.*, 2016).

#### 2.6.5 Osterix

Osterix (OSX) merupakan faktor transkripsi spesifik osteoblast yang mengaktifkan beberapa gen penting selama diferensiasi preosteoblast hingga menjadi osteoblasts dewasa dan osteosit. Peran penting dari OSX dalam program genetika dari pembentukan dan homeostasis tulang sedang diteliti. OSX juga dikenal sebagai Sp7 karena memiliki sifat homolog yang mirip dengan *zinc finger DNA-binding domains* dari faktor transkripsi Sp1, Sp3 dan Sp4. OSX sangat terlibat dalam jalur diferensiasi osteoblast. OSX terekspresi pada osteoblast pada *callus* fraktur tulang pada hari ke-10 dan pada hari ke-14 setelah fraktur. OSX seringkali terekspresi pada osteoblast pada daerah fraktur yang beregenerasi (Sinha dan Zhou, 2013).

Beberapa studi sebelumnya mengungkapkan peran dari jalur pensinyalan BMP2 dan IGF1 yang mengaktifasi gen osteoblast selama diferensiasi. Kompleks ligand an GFs menimbulkan kaskade dari jalur pensinyalanyang diikuti dengan fosforilasi dari substrat untuk mengontrol transkripsi gen. BMP2 juga dikenal menginduksi ekspresi OSX dan RUNX2 (Sinha dan Zhou, 2013).

Jalur pensinyalan BMP2/SMAD memiliki target untuk mengaktifasi RUNX2 dan setelah itu mengaktifasi ekspresi *Osx*. IGF1 juga meningkatkan ekspresi OSX tanpa mengganggu ekspresi RUNX2. IGF1 memberikan respon yang tidak begitu kuat apabila dibandingkan dengan BMP2. Kombinasi BMP2 dan IGF1 secara sinergis meningkatkan ekspresi OSX pada *Human Mesenchymal Stem Cells* (hMSC) apabila dibandingkan dengan pemberian tunggal IGF1. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekspresi OSX membutuhkan jalur pensinyalan kombinasi antara BMP2/SMAD/RUNX2 (Hankenson *et al.*, 2015; Kobayashi *et al.*, 2016).

#### 2.6.7 Alkaline Phosphatase

Metalloenzim yang dikenal juga sebagai *Alkaline phosphatase* (ALP) [*phosphate-monoester phosphohydrolase*] (alkalineoptimum) terdapat pada beberapa jaringan yang merupakan isoenzim yang spesifik dikode oleh beberapa gen yang terpisah. Kadar ekspresi ALP yang tinggi terdapat pada tulang. ALP berperan penting terhadap pembentukan jaringan keras seperti tulang dan gigi. ALP terekspresi pada awal perkembangan dan dapat diamati pada permukaan sel serta vesikel matriks. Setelah tahap perkembangan ekspresi ALP akan menurun dan ekspresi petanda osteogenik lainnya seperti OSC akan meningkat. Hal tersebut jelas menunjukkan bahwa ALP harus berfungsi pada fase awal dari pembentukan tulang. Prinsip yang mendasar dari regulator dan pengontrolan jalur pensinyalan diferensiasi osteogenesis, khondrogenesis dan ekspresi ALP adalah diatur oleh BMP/RUNX2 (CBAf1, AML3)/ sistem OSX dan jalur pensinyalan kaskade Wnt yang saling berinteraksi satu sama lain (Golub dan Boesze-Battaglia, 2007).

Studi mengenai sistem BMP/RUNX2 mengimplikasikan jumlah dari berbagai produk gen termasuk HOX10A yang menunjukkan kemampuan dalam menstimulasi osteogenesis dari MSCs dan secara langsung meregulasi ekspresi dari gen TNAP melalui *remodeling chromosomal*. Kontrol tambahan dari ekspresi ALP adalah melalui aksi dari 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D, asam retinoat dan Paratiroid hormon yang dapat memodulasi ekspresi ALP melalui berbagai macam jalur pensinyalan yang unik dan melalui interaksi dari sistem regulator utama. Regulasi ekspresi ALP sangat vital pada saat tahap awal perkembangan dan pembentukan jaringan keras. Ekspresi ALP merupakan *marker* awal diferensiasi sel osteogenik dari hari ke-5 sampai hari ke-14, setelah fase puncak tersebut pada hari ke-14 maka ekspresi ALP akan turun (Halling Linder *et al.*, 2017).

### 2.6.8 Osteocalcin

Osteocalcin (OSC) adalah protein spesifik tulang yang disintesis oleh osteoblas yang merupakan marker yang baik sebagai diferensiasi osteogenik. OSC umumnya digunakan sebagai penanda diferensiasi osteogenik fase akhir. OCS adalah protein sekretori dengan residu posttranslasional *Gamma-Carboxylated Glutamic Acid* (Gla) dan bekerja sebagai regulator negatif dari pembentukan tulang. Sel terdiferensiasi osteogenik harus memproduksi dan mensekresikan protein sebelum proses mineralisasi. Keberadaan protein spesifik tulang molekul gen ekspresi OSC dapat dideteksi setelah hari ke-14 selama kultur. Tahap akhir pembentukan tulang hari ke-14 sampai hari ke-28 OSC terekspresi kuat (Nakamura *et al.*, 2009).

### 2.6.9 Osteopontin

Osteopontin (OSP) juga dikenal sebagai *Secreted Phosphoprotein-1* (SPP1) merupakan protein yang larut yang terdapat hampir pada seluruh cairan tubuh. OSP hanya terdapat secara interseluler yang merupakan regulator dari cytoskeleton yang dinamis dan ekspresi gen. Ekstraseluler OSP berfungsi melalui interaksi dengan beberapa reseptor sel permukaan termasuk beberapa macam integrin ( $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$ ,  $\alpha9\beta1$ ) dan CD44. Ekspresi OSP yang berlebihan telah terlibat dalam banyak proses fisiologis dan patofisiologis, termasuk remodeling tulang, respons terhadap stres, penyembuhan luka, tumor metastasis dan gangguan autoimun. OSP banyak disekresikan oleh MSC dan dapat diatur lebih lanjut selama diferensiasi osteogenik. OSP termasuk dalam keluarga *Small Integrin-Binding Ligand N-Linked Glycoprotein* (SIBLING), yang juga meliputi *Bone Sialoprotein* (BSP), *Dentin Matrix Protein-1* (DMP1), *Dentin Sialophosphoprotein* (DSPP) dan *matrix extracellular phosphoglycoprotein* (MEPE). OSP terekspresi pada kadar yang tinggi pada tahap akhir osteogenesis dari hari ke-14 sampai hari ke-28 (Chen *et al.*, 2014).

### 2.6.10 Osteonectin

Osteonectin (OSN), glikoprotein 32.000 kd yang terlibat dalam tahap akhir mineralisasi jaringan tulang. OSN adalah penanda diferensiasi osteogenik dari sel. OSN adalah glikoprotein pada tulang yang mengikat kalsium. OSN disekresikan oleh osteoblast selama pembentukan tulang. OSN memulai mineralisasi dan mempromosikan pembentukan kristal mineral. OSN juga menunjukkan afinitas dengan kolagen selain dengan kalsium mineral tulang (Ardeshiryajimi *et al.*, 2014).

OSN hadir pada osteoblast yang aktif dan osteosit muda. OSN telah disarankan untuk menjadi penanda diferensiasi sel osteogenik pada tahap akhir. OSN adalah matriks glikoprotein ekstraselular asam yang berperan penting dalam mineralisasi tulang, interaksi matriks-sel, dan ikatan kolagen. OSN juga meningkatkan produksi dan aktivitas matriks metalloproteinase. Molekul ini terlibat dalam beberapa fungsi biologis, termasuk mineralisasi tulang, tulang rawan, mengatur homeostasis mineralisasi tulang, modulasi proliferasi sel, mempromosi pelekatan dan distribusi sel. Sejumlah fosfoprotein dan glikoprotein ditemukan di tulang. Fosfat yang terikat pada protein tulang melalui residu serin dan asam amino treonin. OSN mengikat kolagen dan hidroksiapatit di domain terpisah. OSN ditemukan dalam jumlah yang relatif besar pada tulang dewasa dan mempromosikan mineralisasi kolagen. OSN terekspresi pada kadar yang tinggi pada tahap awal diferensiasi osteogenik dari hari ke-21 sampai hari ke-35 (Ardeshirylajimi *et al.*, 2014).

### **2.6.11 Osteoblast**

Osteoblast merupakan sel yang mensintesis dan menjadi perantara mineralisasi osteoid. Osteoblast ditemukan dalam satu lapisan pada permukaan jaringan tulang sebagai sel berbentuk kuboid atau silindris pendek yang saling berhubungan melalui tonjolan-tonjolan pendek (Rutkovskiy *et al.*, 2016).

## 2.7 Oklusi

Oklusi dalam pengertian yang sederhana adalah penutupan rahang beserta gigi atas dan bawah. Pada kenyataannya oklusi merupakan suatu proses kompleks karena melibatkan gigi (termasuk morfologi dan angulasinya), otot, rahang, sendi temporo-mandibula, dan gerakan fungsional rahang. Oklusi juga melibatkan relasi gigi pada oklusi sentrik, relasi sentrik dan selama berfungsi (Proffit *et al.*, 2007).

Oklusi normal menurut Angle (1899) dilihat dari hubungan gigi molar atas terhadap gigi molar bawah sebagai kunci oklusi (gambar 2.6). Suatu oklusi dinilai baik atau normal jika terdapat keserasian antara komponen-komponen yang berperan untuk terjadinya kontak antara gigi-gigi rahang atas dan bawah. Oklusi normal dan maloklusi kelas I memiliki relasi molar yang sama namun memiliki perbedaan pada susunan gigi-geliginya. Maloklusi kelas I tidak memiliki susunan gigi-geligi yang baik (Proffit *et al.*, 2007).

Secara universal, metode yang digunakan untuk melihat suatu oklusi normal atau tidak dengan menggunakan metode yang dikemukakan oleh Angle karena kemudahannya untuk dideskripsikan dan dikomunikasikan antar para klinisi (Proffit *et al.*, 2007).

## 2.8 Maloklusi

Maloklusi adalah penyimpangan letak gigi dan atau malrelasi lengkung geligi (rahang) di luar rentang kewajaran yang dapat diterima. Maloklusi juga dapat merupakan variasi biologi tetapi karena variasi letak gigi mudah diamati dan mengganggu estetika sehingga menarik perhatian dan memunculkan keinginan untuk melakukan perawatan (Proffit *et al.*, 2007).

Istilah maloklusi juga berarti semua penyimpangan dari gigi dan rahang dari kondisi normal, termasuk beberapa kondisi yang berbeda, seperti diskrepansi antara ukuran gigi dan ukuran rahang (*crowding* dan *spacing*), malrelasi lengkung gigi (*sagital*, *transversal*, dan *vertikal*), dan malposisi dari gigi itu sendiri (Proffit *et al.*, 2007).

## 2.9 Macam perawatan maloklusi

Dalam melakukan perawatan ortodontik sering sekali diperlukan penambahan ruang untuk mengatur gigi-gigi yang malposisi, sehingga setelah perawatan gigi-gigi dapat tersusun dalam lengkung yang baik (Proffit *et al.*, 2007).

Tergantung pada jumlah kekurangan ruang yang diperlukan untuk mengatur gigi-gigi yang malposisi tersebut, dapat dilakukan antara lain *grinding*, *slicing* atau *stripping* pada gigi-gigi anterior, melebarkan (*ekspansi*) perimeter lengkung gigi, kombinasi antara ekspansi lengkung gigi dan *grinding* gigi-gigi anterior, pencabutan satu atau beberapa gigi. Pelebaran dengan alat ekspansi dapat dilakukan secara ortodonti (*pelebaran lengkung gigi*) maupun ortopedi (*pelebaran lengkung basal*). Pelebaran lengkung gigi sangat efektif dilakukan pada periode gigi bercampur, waktu sutura palatina belum menutup dan pertumbuhan pasien masih aktif sehingga selain lengkung gigi (*lingkung korona*) melebar, maka lengkung basal juga mengalami pelebaran. Pada periode gigi permanen hanya dapat dilakukan perubahan inklinasi gigi saja, yaitu melebarkan lengkung gigi tanpa diikuti pelebaran lengkung basal (Proffit *et al.*, 2007).

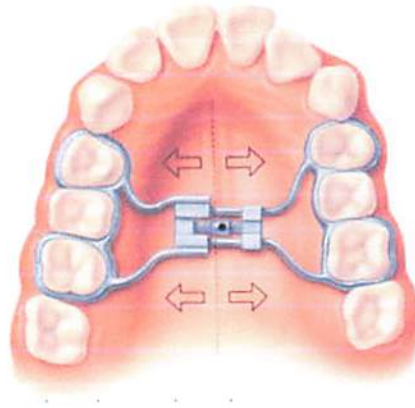
### 2.9.1 Macam alat ekspansi

Macam alat ekspansi ortodonti dibagi menjadi beberapa macam berdasarkan cara pemakaiannya dan pergerakan/reaksi jaringan. Berdasarkan cara pemakaiannya alat ekspansi dapat bersifat yakni fixed/ cekat, misalnya *Rapid Maxillary Expansion* (RME), semi cekat, misalnya *Quad Helix, Removable*/lepasan, misalnya plat ekspansi. Berdasarkan pergerakan/ reaksi jaringan yang dihasilkan yaitu alat ekspansi yang menghasilkan gerakan ortodontik, misalnya plat ekspansi, alat ekspansi yang menghasilkan gerakan ortopedik, misalnya RME (Proffit *et al.*, 2007).

### 2.9.2 *Rapid Maxillary Expansion*

RME bersifat cekat, menghasilkan pelebaran arah lateral, paralel dan simetris, digunakan untuk melakukan pelebaran lengkung basal pada periode gigi bercampur. RME terdiri dari cincin stainless yang disemenkan pada gigi-gigi molar satu desidui atau premolar satu dan gigi molar satu permanen kanan dan kiri, dihubungkan dengan sekrup ekspansi yang mempunyai daya pelebaran yang besar (gambar 2.8). RME apabila digunakan dapat melebarkan sutura palatina mediana ke arah lateral dan lengkung gigi bergerak secara bodily. Indikasi perawatan dengan ekspansi antara lain adalah gigitan silang anterior (anterior crossbite), gigitan silang posterior (posterior crossbite) bilateral atau unilateral. Lengkung gigi atau lengkung basal yang sempit yang disebabkan pertumbuhan ke arah lateral kurang. Adanya space loss sebagai akibat pergeseran gigi molar permanen ke mesial pada pencabutan gigi desidui terlalu awal (premature loss). Adanya gigi depan berjejal yang ringan, dengan diskrepansi lengkung gigi 4-6mm (Proffit *et al.*, 2007).

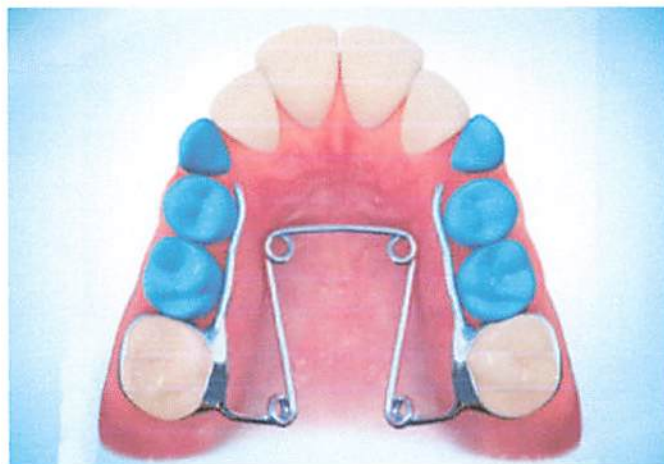




Gambar 2.6 *Rapid Maxillary Expansion* (Proffit *et al.*, 2007).

### 2.9.3 *Quad Helix*

*Quad Helix* bersifat semi cekat, dapat menghasilkan gerakan paralel simetris atau asimetris maupun gerakan non paralel simetris atau asimetris, tergantung kebutuhan. Semi cekat, karena sebagian dapat dilepas untuk diaktifkan (bagian ekspansif yang terbuat dari kawat stainless steel diameter 0,9 mm) dan cincin yang dipasang cekat dengan semen pada kedua gigi molar pertama (gambar 2.9). Pelebaran lengkung gigi diperoleh dengan cara mengaktifkan koil, lengan helix ataupun palatal bar, tergantung arah pelebaran yang diharapkan (Proffit *et al.*, 2007).



Gambar 2.7 *Quad Helix* (Proffit *et al.*, 2007).



### BAB 3

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 3.1 Tujuan Penelitian

#### 3.1.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk menganalisa dan membuktikan akselerasi diferensiasi osteogenik GMSCs dengan PRF untuk ekspansi tulang maksila secara *in vitro*.

#### 3.1.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah

1. Menganalisis akselerasi diferensiasi osteogenik GMSCs dengan PRF untuk ekspansi tulang rahang secara *in vitro* melalui *marker* positif (+) RUNX2.
2. Menganalisis akselerasi diferensiasi osteogenik GMSCs dengan PRF untuk ekspansi tulang rahang secara *in vitro* melalui *marker* positif (+) ALP.
3. Menganalisis akselerasi diferensiasi osteogenik GMSCs dengan PRF untuk ekspansi tulang rahang secara *in vitro* melalui *marker* positif (+) OSC.
4. Menganalisis akselerasi diferensiasi osteogenik GMSCs dengan PRF untuk ekspansi tulang rahang secara *in vitro* melalui *marker* positif (+) OSN.
5. Menganalisis akselerasi diferensiasi osteogenik GMSCs dengan PRF untuk ekspansi tulang rahang secara *in vitro* melalui *marker* positif (+) OSP.

## **3.2 Manfaat Penelitian**

### **3.2.1 Manfaat Penelitian Teoritis**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi informasi ilmiah dan memberikan tambahan pengetahuan khususnya di bidang ilmu ortodonti dan kepada praktisi kesehatan, terutama dokter gigi tentang pendekatan dengan terapi rekayasa jaringan berbasis sel punca diharapkan didapatkan model terapi yang merupakan alternatif terapi utama dalam meningkatkan pembentukan tulang pada lengkung maksila yang di ekspansi secara ortodonti yang kemungkinan dapat digunakan untuk acuan penelitian selanjutnya.

### **3.2.2 Manfaat Praktis**

Diharapkan berbagai permasalahan dan kendala perawatan ortodonti terutama yang membutuhkan perawatan ekspansi lengkung maksila dapat diatasi dengan terapi berbasis sel punca yang berasal dari GMSCs yang dikombinasikan dengan PRF untuk mendapatkan hasil terapi ortodontiyang relatif lebih cepat dan optimal.

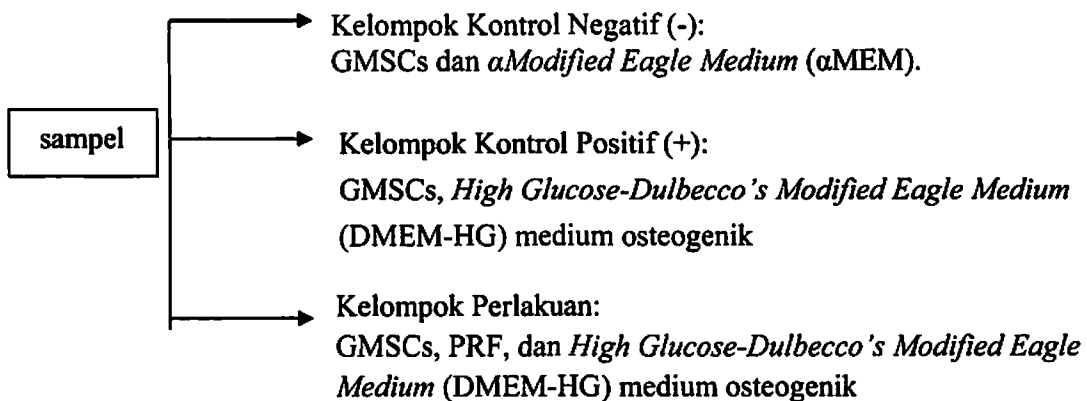
**BAB 4**

**METODE PENELITIAN**

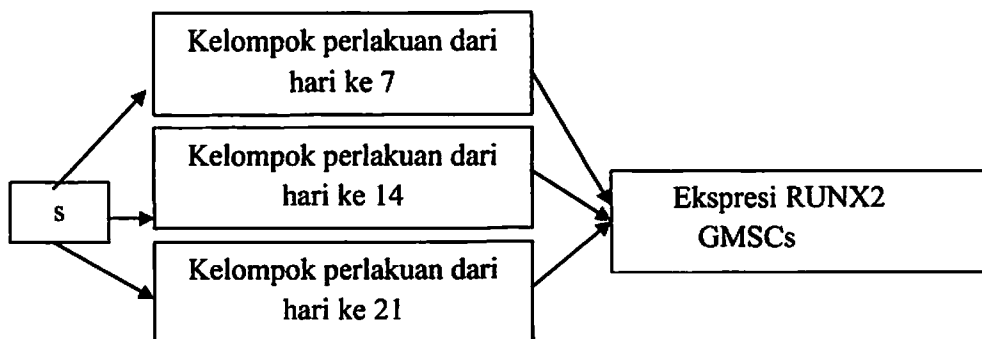
**4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah dan tujuan penelitian maka penelitian ini dilakukan secara eksperimental murni laboratoris (*True Experimental*) dengan rancangan penelitian *Post-test only Control Group Design* secara *longitudinal*.

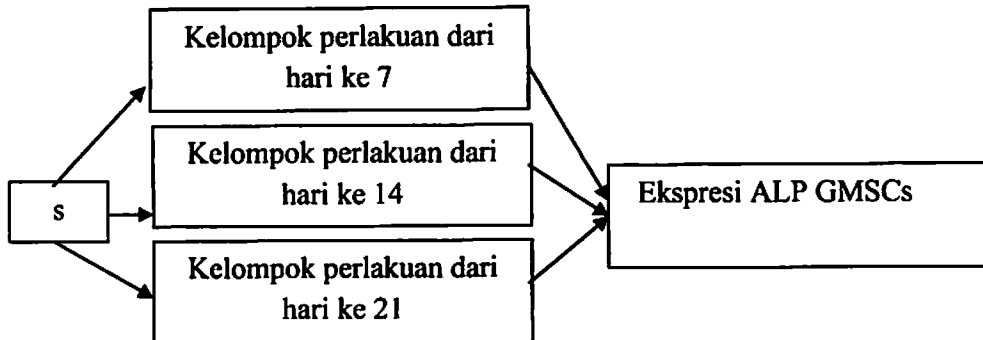
Rancangan penelitian dapat digambarkan dengan skema sebagai berikut:



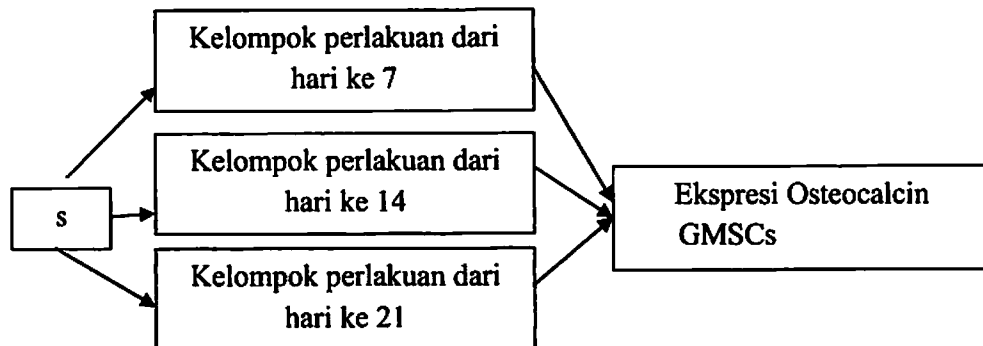
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian invitro.



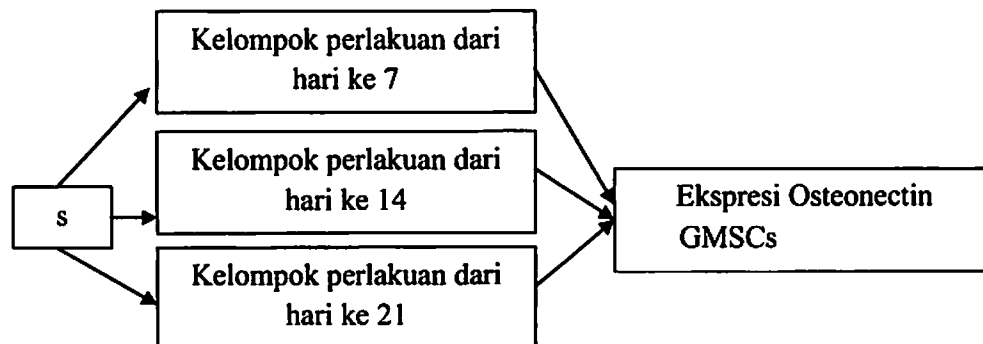
Gambar 4.2 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi RUNX2 GMSCs.



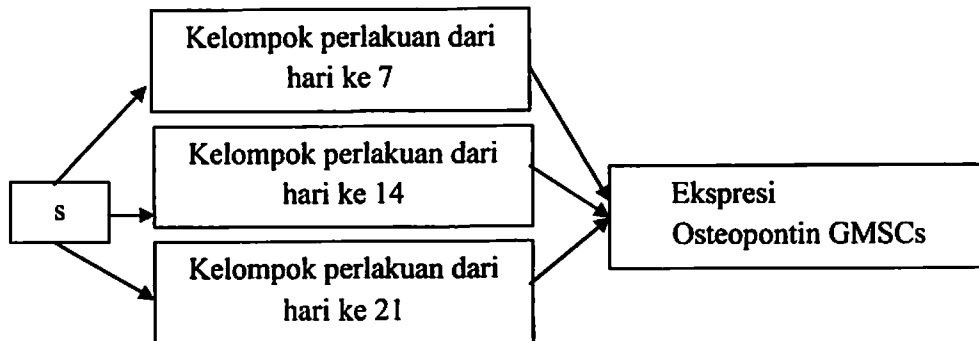
Gambar 4.3 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi ALP GMSCs.



Gambar 4.4 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi Osteocalcin GMSCs.



Gambar 4.5 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi Osteonectin GMSCs.



Gambar 4.6 Rancangan penelitian kombinasi GMSCs dan PRF terhadap ekspresi Osteopontin GMSCs.

Keterangan:

s = Sampel

## 4.2 Tempat dan Waktu penelitian

### 4.2.1 Tempat Penelitian

Lokasi penelitian ini dilakukan di beberapa tempat, yaitu:

1. Isolat GMSCs diperoleh dari Pusat Pengembangan dan Penelitian *Stem Cell*, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
2. Pemilihan untuk pengambilan PRF pada hewan penelitian tikus (*Rattus Novergicus*) dilakukan pada Pusat Pengembangan dan Penelitian *Stem Cell*, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia
3. Pemeriksaan *Immunocytochemistry* (ICC) petanda sel punca dilakukan di Pusat Pengembangan dan Penelitian *Stem Cell*, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia
4. Pemeriksaan *Flowcytometry* (FC) petanda sel punca dilakukan di Pusat Pengembangan dan Penelitian *Stem Cell*, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

5. Pemeriksaan *Immunocytochemistry* (ICC) petanda diferensiasi osteogenik RUNX2, ALP, Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin dilakukan di Pusat Pengembangan dan Penelitian *Stem Cell*, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

#### 4.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan kurang lebih selama 3 bulan, yaitu pada bulan Januari 2018 sampai Maret 2018.

Tabel 4.1 Rancangan jadwal kegiatan penelitian

Kegiatan	Bulan ke-			
	1	2	3	4
<b>1. Persiapan</b>				
1.1 Pembuatan dan pengajuan ujian proposal				
1.2 Persiapan perijinan penelitian, laboratorium, alat dan bahan				
<b>2. Pelaksanaan</b>				
2.1 Persiapan, isolasi, kultur GMSCs dan ekstraksi PRF				
2.2 manipulasi GMSCs, PRF				
2.3 uji karakterisasi				
2.4 uji proliferasi dan uji diferensiasi				
<b>3. Pengumpulan Data dan Evaluasi Hasil</b>				
3.1 Pengumpulan Data				
3.2 Evaluasi hasil				
3.3 Analisa dan pengolahan data				
3.4 Penyusunan hasil dan ujian tesis				

### 4.3 Obyek Penelitian

Obyek penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel punca berasal dari gingiva (GMSCs) dikombinasikan dengan PRF yang diisolasi dari hewan tikus *wistar (Rattus Novergicus)*.

#### 4.3.1 Besar obyek penelitian

Pada penelitian ini terdapat 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok control positif dan kelompok perlakuan 1. Replikasi sampel sebanyak 3 setiap kelompok. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus perhitungan Lameshow *et al.*, (1997):

$$n = \frac{Z \sigma^2 (Z_{1/2\alpha} + Z\beta)^2}{(\mu_1 - \mu_2)}$$

#### Keterangan

n = sampel minimum.

$\sigma$  = standar deviasi.

$Z_{1/2\alpha}$  = 1,282 (nilai distribusi pada kurva normal standart dengan  $\alpha = 0.05$ ).

$Z\beta$  = 0.842 (nilai distribusi pada kurva normal standart dengan  $\alpha = 0.2$ ).

$\mu_1$  = rerata data kelompok kontrol.

$\mu_2$  = rerata data kelompok perlakuan.



Jumlah sampel minimal perlu diketahui dengan melakukan penelitian pendahuluan.

#### 4.4 Variable Penelitian

Variabel dalam penelitian ini adalah:

1. Variabel bebas (*independent variable*): GMSCs
2. Variabel terikat (*dependent variable*): kemampuan diferensiasi osteogenik GMSCs yang meliputi ekspresi RUNX2, ekspresi ALP, ekspresi osteocalcin, ekspresi osteonectin, ekspresi osteopontin.
3. Variabel terkontrol: Cara pengambilan PRF, alat dan bahan yang digunakan, cara pengujian ekspresi RUNX2, ekspresi ALP, ekspresi osteocalcin, ekspresi osteonectin, ekspresi osteopontin.

#### 4.5 Definisi Operasional Variabel

1. GMSCs adalah sel punca yang diisolasi dari gingiva yang mampu berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel seperti osteoblast, chondrosit dan adiposit.
2. PRF adalah plasma darah yang mengandung 1.000.000 trombosit/mikroliter dengan volume 5 ml plasma.
3. Ekspresi ALP adalah perubahan sel yang terjadi pada GMSCs menjadi osteoblast dengan mengukur adanya *marker* ALP pada fase perubahan dari osteoprogenitor menjadi preosteoblast yang diperiksa dengan ICC menggunakan antibodi monoklonal ALP diamati dengan elektron mikroskop dengan pembesaran 200x.

4. Ekspresi RUNX2 adalah perubahan sel yang terjadi pada GMSCs menjadi osteoblast dengan mengukur adanya *marker* RUNX2 pada fase perubahan dari osteoprogenitor menjadi preosteoblast yang diperiksa dengan ICC menggunakan antibodi monoklonal RUNX2 diamati dengan elektron mikroskop dengan pembesaran 200x.
5. Ekspresi osteocalcin adalah perubahan sel yang terjadi pada GMSCs menjadi osteoblast dengan mengukur adanya *marker* osteocalcin pada fase perubahan dari osteoprogenitor dari preosteoblast menjadi osteoblas yang diperiksa dengan ICC menggunakan antibodi monoklonal osteocalcin diamati dengan elektron mikroskop dengan pembesaran 200x.
6. Ekspresi osteonectin adalah perubahan sel yang terjadi pada GMSCs menjadi osteoblast dengan mengukur adanya *marker* osteonectin pada fase perubahan dari osteoprogenitor dari osteoblas menjadi osteoblast dewasa yang diperiksa dengan ICC menggunakan antibodi monoklonal osteonectin diamati dengan elektron mikroskop dengan pembesaran 200x.
7. Ekspresi osteopontin adalah perubahan sel yang terjadi pada GMSCs menjadi osteoblast dengan mengukur adanya *marker* osteopontin pada fase perubahan dari osteoprogenitor dari osteoblas menjadi osteoblast dewasa yang diperiksa dengan ICC menggunakan antibodi monoklonal osteopontin diamati dengan elektron mikroskop dengan pembesaran 200x.
8. Ekspansi Maksila adalah Pelebaran dengan alat ekspansi dapat dilakukan secara ortodonti (pelebaran lengkung gigi) maupun ortopedi (pelebaran lengkung basal) dengan menggunakan piranti RME.

## 4.6 Cara kerja penelitian

### 4.6.1 Persiapan Laik Etik Penelitian

Sebelum melakukan penelitian, penelitian wajib mendapatkan sertifikat laik etik penggunaan hewan coba dari institusi terkait, dalam perihal ini laik etik dikeluarkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga yang telah sesuai dengan deklarasi Helsinki dengan nomor laik etik penelitian 289/HRECC.FODM/XII/2017 yang disahkan pada tanggal 12 Desember 2017.

### 4.6.2 Isolasi dan *Thawing* GMSCs

Metode isolasi GMSCs dilakukan berdasarkan prosedur Rantam *et al*, (2008). GMSCs diisolasi dari gingiva tikus pada regio rahang bawah yang diambil menggunakan *scalpel* dan *blade*. Gingiva tersebut dipotong kecil-kecil kemudian ditambahkan 1 mg/ml enzim trypsin kemudian dikultur dalam medium *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM, Life Technologies/GIBCO BRL) dengan penambahan 20% *Fetal Bovine Serum* (FBS, Biochrom AG, Germany), 5m M *L-glutamine* (Gibco Invitrogen), 100 U/ml penicillin-G, 100 µg/ml streptomycin, dan 100 µg/ml kanamycin.

Setelah 3 hari dilakukan pembuangan medium untuk menghilangkan bagian sel yang tidak melekat pada dish dan dilakukan pemberian medium baru. Pada tahap ini dilakukan penambahan FGF-2. Setelah sel dalam keadaan *confluent* dilakukan *passage* dengan menggunakan 0.05% *trypsin-EDTA* dan setelah itu sel dicuci dan dibiakkan lagi dalam 60- atau 100-mm *tissue culture dishes* (Corning). Setelah sel *confluent* dilakukan *passage* kembali dan sel bisa digunakan untuk penelitian selanjutnya. Bila sel tidak segera digunakan, sel harus disimpan dalam N2 cair.

*Thawing* GMSCs diawali dengan mengeluarkan *vial* sel dari mesin pembeku penyimpanan. *Vial* ditempatkan dalam waterbath bersuhu 37°C selama 1 menit hingga sel mulai mencair. Pastikan bahwa botol tidak tenggelam dan air tidak masuk ke dalam botol. *Vial* dikeluarkan dari waterbath dan hapus dengan 70% isopropanol atau etanol untuk mensterilkan *vial*. Pipet steril 2 ml digunakan untuk memindahkan sel ke dalam tabung 15 mL yang mengandung 10 ml *Iscove's Modified Dulbecco's Media* (IMDM) + 2% *Fetal Bovine Serum* (FBS). Tabung yang mengandung sel kemudian disentrifugasi lalu dibuang dan *pallet* sel diresuspensi dalam volume awal IMDM +2% FBS dan volume sel total untuk dibiakkan sampai *passage* ke-4 sesuai dengan kebutuhan penelitian (Rantam *et al.*, 2008).

#### 4.6.3 Uji karakterisasi GMSCs

##### 4.6.3.1 Analisa *Immunocytochemistry*

Sel kultur dilapisi dengan *coverslips*, dan setelah diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 - 2 jam difiksasi menggunakan formaldehida 10% selama 15 menit. Kemudian *coverslips* dibilas empat kali dengan PBS dan dikeringkan selama beberapa menit. Sel diblok dengan PBS dan FBS 1% selama 15 - 30 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak empat kali. Antibodi monoklonal berlabel FITC (Santa Cruz Biotechnology™, Dallas, Texas, United States) CD105 (anti CD105 sc-71042) positif, CD44 (anti CD44 sc-18849) positif, CD73 (sc-32299), CD90 (anti CD90 sc-53116) positif, CD44 (anti CD44 sc7297) positif dan CD45 (anti CD45 sc-53665) negatif serta CD34 (anti CD34 sc74499) negatif. Antibodi monoklonal diaplikasikan pada sel dan diinkubasi selama 60 menit. Setelah itu, sel-sel dibilas dengan PBS dua kali dan sel siap untuk analisis dengan menggunakan mikroskop fluoresensi.

#### 4.6.3.2 Analisa *Flowcytometry*

Analisa *flowcytometry* GMSCs diawali dengan persiapan sampel. GMSCs sebanyak 500.000 sel dilarutkan dalam PBS 3ml dimasukkan ke dalam falcon tube ditutup rapat dan dapat disimpan pada -20°C apabila tidak digunakan. 20 µL reagen Becton Dickson Trites antibodi monoklonal CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 berlabel FITC dan 50 µL sampel ke dalam tabung Becton Dickson Trucount. Tabung Becton Dickson Trucount berisi *lycophilized pellet* yang akan melepaskan *fluorescent beads* yang diketahui jumlahnya apabila ke dalam tabung ditambahkan reagen monoklonal antibodi dan darah EDTA, gunanya adalah untuk menghitung jumlah absolut leukosit. Reagen BD Tritest CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 berlabel FITC. Reagen tersebut merupakan reagen imunofluoresen tiga warna untuk identifikasi absolut CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 berlabel FITC. Campuran tersebut di-vortex dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu kamar (di tempat gelap). 450 µL lysing solution ditambahkan ke dalam campuran, kemudian di-vortex dan diinkubasi kembali selama 15 menit pada suhu kamar. Kemudian sampel dibaca dengan flowcytometer FACS Calibur (BD FACSCALIBUR™, Becton, Dickinson and Company, Singapore).

#### 4.6.4 Isolasi *Plasma Rich Fibrin*

Darah diaspirasi melalui ekor tikus setelah dilakukan anestesi menggunakan injeksi ketamine dosis 20 mg/berat badan dan xylazine 3 mg/berat badan. Darah sebanyak 1.5 ml diaspirasi menggunakan *disposeable syringe* 3 ml kemudian diletakkan pada tabung *vacutainer* tanpa antikoagulan setelah itu di sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm/menit selama 10.

Alat *sentrifuge* dibuat seimbang dengan memasukkan 2 tabung dengan isi air dengan berat sama dengan tabung darah. Ambil tabung dari *sentrifuge*, akan tampak 3 lapisan yaitu terbagi atas tiga fraksi; fraksi paling bawah adalah sel darah merah, fraksi bagian tengah adalah *Plasma Rich Fibrin* dan fraksi paling atas adalah plasma aselular. PRF kemudian diisolasi setelah itu PRF dipotong kecil-kecil menggunakan gunting steril dan dimasukkan ke dalam masing-masing *plate* kelompok perlakuan (Borle *et al.*, 2015; Sumarta *et al.*, 2016; Rahmawati *et al.*, 2017).

#### 4.6.5 Analisis Diferensiasi Osteogenik In vitro kombinasi GMSCs dan PRF.

Analisis dilakukan pada 3 kelompok, terdiri dari: 2 kelompok eksperimen dan 1 kelompok control. Pada kelompok perlakuan GMSC dengan PRF ditempatkan pada *plate* kultur mengandung ITS plus, 2 mM L-glutamin, 100 µg / ml natrium piruvat, 0,2 mM asam askorbat- 2 fosfat, dexamethasone 10<sup>-7</sup> M (GeneTex, AS), 10 ng / ml TGF-β<sub>3</sub>, dan glukosa berkadar tinggi-*Dulbecco's Modifikasi Eagle Medium* (DMEM-HG) kelompok perlakuan 1. Kelompok kontrol adalah GMSCs diletakkan pada *plate* kultur medium osteogenik ITS plus, 2 mM L-glutamin, 100 µg / ml natrium piruvat, 0,2 mM asam askorbat- 2 fosfat, dexamethasone 10<sup>-7</sup> M (GeneTex, AS). Setiap 3 hari, setiap medium sel kelompok diganti. Diferensiasi osteogenik dievaluasi setelah 21 hari sel kultur (Sumarta *et al.*, 2016).

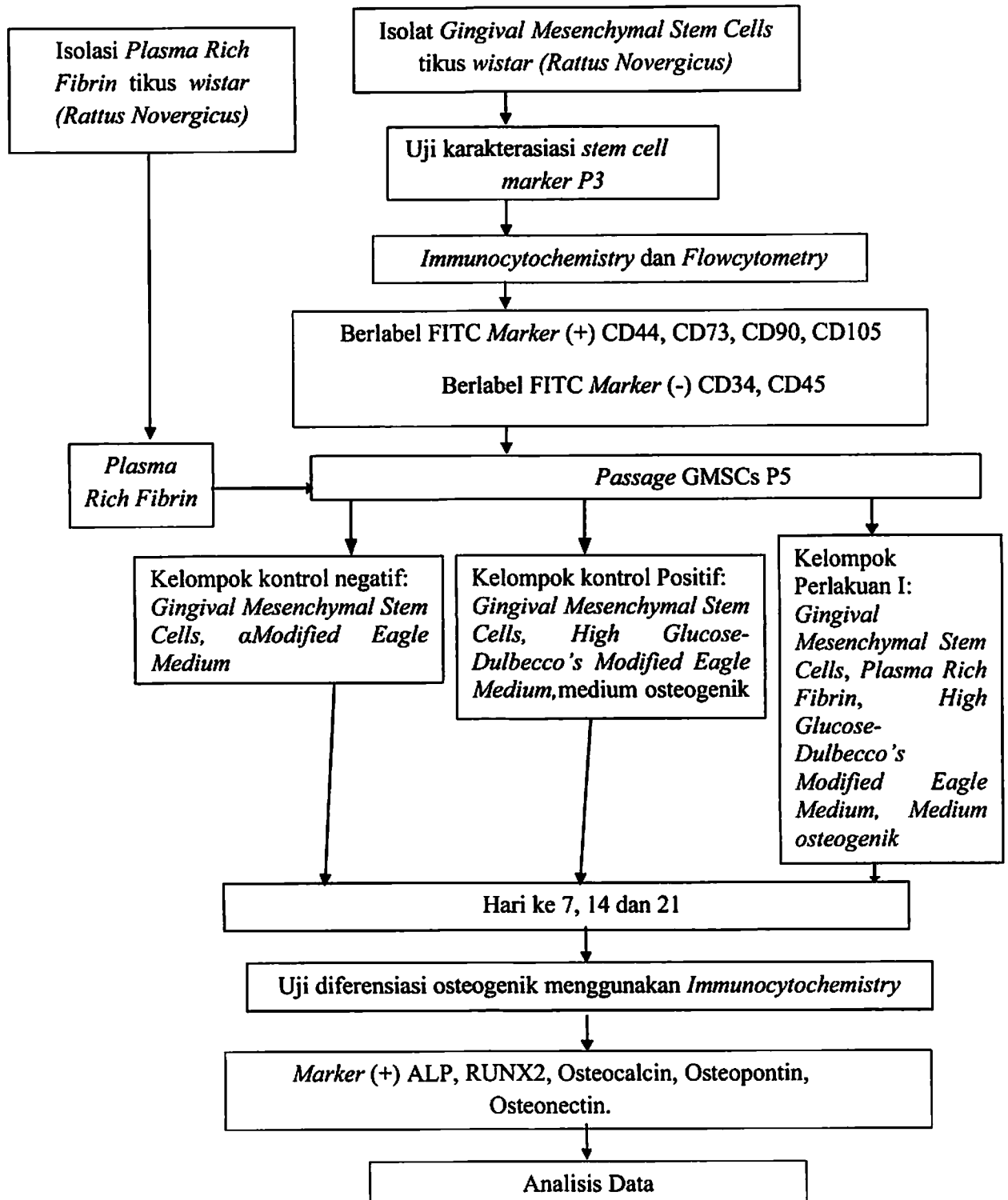
Sel kultur dilapisi dengan *coverslips*, dan setelah diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 - 2 jam difiksasi menggunakan formaldehida 10% selama 15 menit. Kemudian *coverslips* dibilas empat kali dengan PBS dan dikeringkan selama beberapa menit. Sel diblok dengan PBS dan FBS 1% selama 15 - 30 menit dan dicuci dengan PBS sebanyak empat kali.

Sampel kemudian diperiksa dengan pewarnaan imunositokimia dengan teknik *indirect* menggunakan *staining kit* 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (Pierce™ DAB Substrate Kit cat. 34002, Thermofisher™, Waltham, Massachusetts, United States) dan antibodi monoklonal (Santa Cruz Biotechnology™, Dallas, Texas, United States dan Abcam™, Cambridge, United Kingdom) dengan petanda positif (+) RUNX2 (anti RUNX2 sc10145), ALP (anti ALP sc271431), osteocalcin (anti osteocalcin sc365797), osteopontin (anti osteopontin sc21742), osteonectin (anti osteonectin sc-25574), negatif (-) sox9 (anti sox9 ab26414) dan aggregan (anti aggregan abcam 36861) sel siap untuk analisis dengan menggunakan mikroskop (Rantam *et al.*, 2008; Ekiser *et al.*, 2015; Kamadjaja *et al.*, 2016).

#### 4.7 Analisis Data

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences Software* (SPSS) edisi 20.0 (SPSS™, Chicago, United State). Hasil pengukuran ditabulasi menurut kelompok masing-masing. Hasil yang diperoleh dianalisis dengan cara menghitung ukuran pemusatan (mean, median dan modus) dan pencaran (standar deviasi dan koefisien variasi). Selanjutnya dibandingkan antar kelompok yaitu kelompok control negatif, kelompok positif dan kelompok perlakuan I. Hasil dinyatakan sebagai nilai rerata  $\pm$  standar deviasi.

**4.8 Kerangka Operasional Alur Penelitian**



Gambar 4.7 Kerangka Operasional Alur Penelitian



#### 4.9 Indikator Capaian Tahunan

Tabel 4.1 Indikator Capaian Tahunan

Obyek Penelitian	Indikator capaian	Metode	Luaran
GMSCS	Isolasi dan Karakterisasi MSCs	Kultur sel GMSCs Flowcytometri, Imunofluorosense	Isolasi dan konfirmasi GMSCs adalah MSCs
GMSCS	Diferensiasi Osteogenik RUNX2, OSC, OSN, OSP, BALP.	Imunositokimia	Akselerasi diferensiasi osteogenic GMSCs

#### 4.10 Luaran penelitian

Luaran penelitian ini adalah hasil penelitian yang telah dilakukan akan diterbitkan pada jurnal ilmiah internasional.



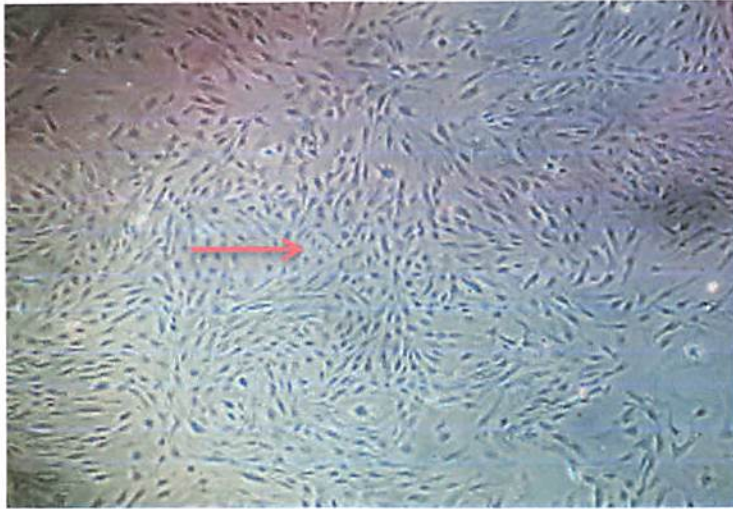
## BAB 5

### HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

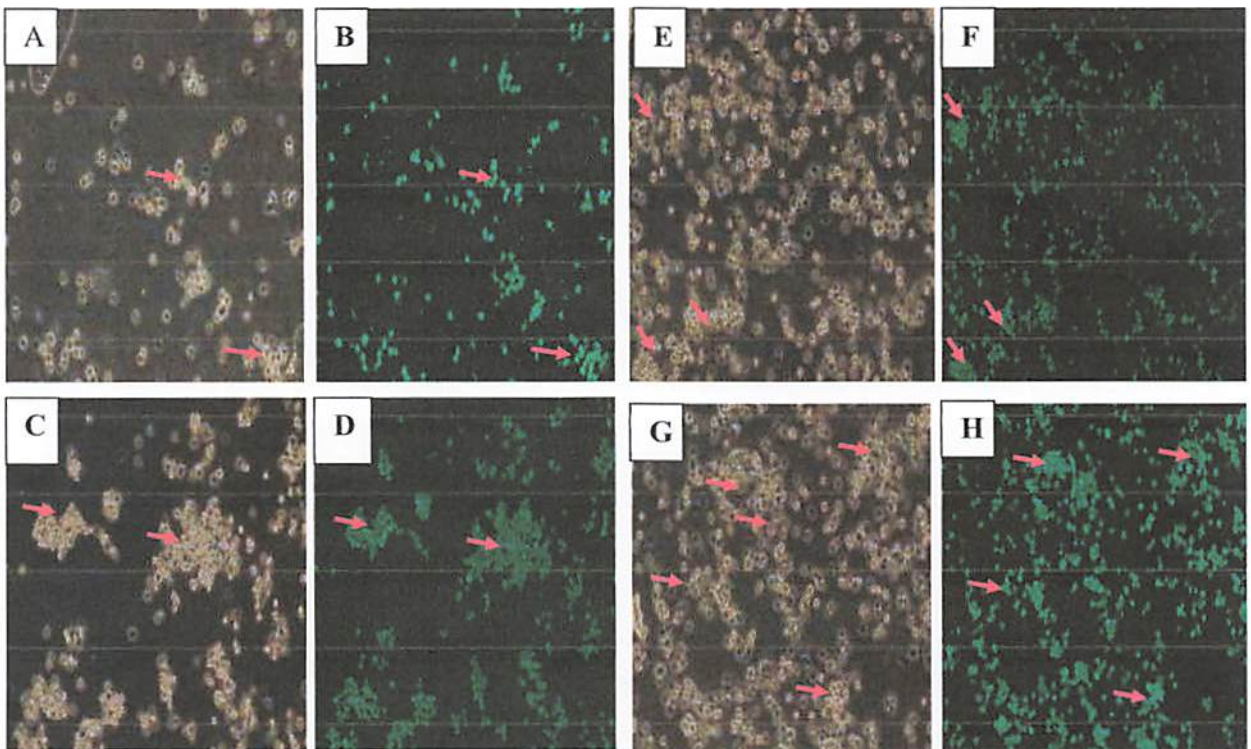
Penelitian ini dilakukan secara eksperimental murni laboratoris (*True Experimental*) dengan rancangan penelitian *Post-test only Control Group Design* secara longitudinal. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah GMSCs yang diisolasi dari gingiva rahang bawah tikus wistar (*Rattus Novergicus*), sampel dibagi menjadi tiga kelompok yaitu Kelompok Kontrol Negatif (-): GMSCs dan *αModified Eagle Medium* ( $\alpha$ MEM); Kelompok Kontrol Positif (+): GMSCs, *High Glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-HG) medium osteogenik; Kelompok Perlakuan: GMSCs, PRF, dan *High Glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM-HG) medium osteogenik. Variabel dependen dalam penelitian ini adalah RUNX2, ALP, OSP, OSN, dan OSC. Pada bagian ini memuat hasil penelitian dan analisis hasil penelitian yang berkaitan dengan tujuan dan hipotesis.

#### 5.1 Deskripsi Hasil Penelitian

Isolat GMSCs dari gingiva tikus wistar (*Rattus Novergicus*) dilakukan *splitting* dan mencapai konfluensi 95%. Pada tahap awal isolat GMSCs menunjukkan morfologi sel bulat kecil, memiliki bentuk *spindle-shaped* dan melekat pada kultur *plate* ketika diamati menggunakan mikroskop elektron. Isolat GMSCs yang telah homogen menunjukkan morfologi sel seperti sel fibroblast berbentuk *spindle* pada *passage* pertama hingga *passage* kelima (Gambar 5.1).

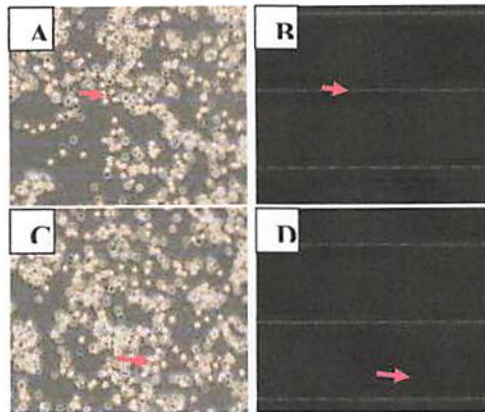


Gambar 5.1. Morfologi *Gingival Mesenchymal Stem Cells* pasase ketiga menunjukkan bentukan morfologi seperti fibroblast berbentuk *spindle* dan melekat pada dasar *plate* (panah merah). Pemeriksaan dengan mikroskop Elektron (CX22 Binocular, Olympus) dengan pembesaran 400x.



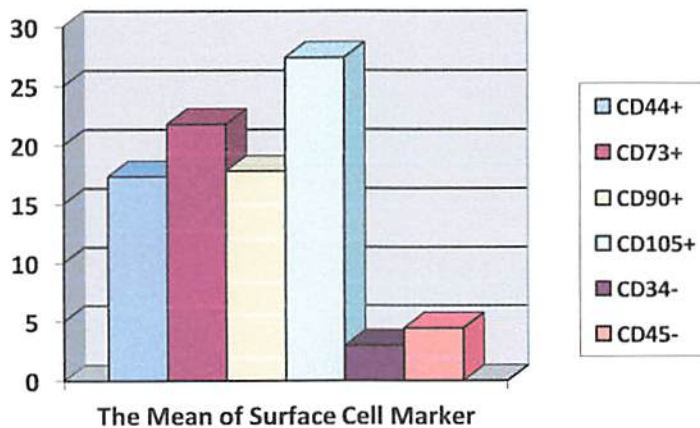
Gambar 5.2. Pemeriksaan ICC *immunofluoresence* GMSCs pasase ketiga mengekspresikan *marker* permukaan MSCs positif (+) (panah merah). A, B. CD44; C, D. CD73; E, F. CD90; G, H. CD105 berlabel FITC. Pemeriksaan dengan mikroskop Elektron (*Immunofluoresence* Mikroskop, Olympus) dengan pembesaran 100x.

GMSCs mengekspresikan *marker* positif MSC yaitu positif CD44, CD73, CD90 dan CD105 (gambar 5.2) namun secara kontras tidak mengekspresikan *marker* HSCs yaitu negatif terhadap CD34 dan CD45 (gambar 5.3).

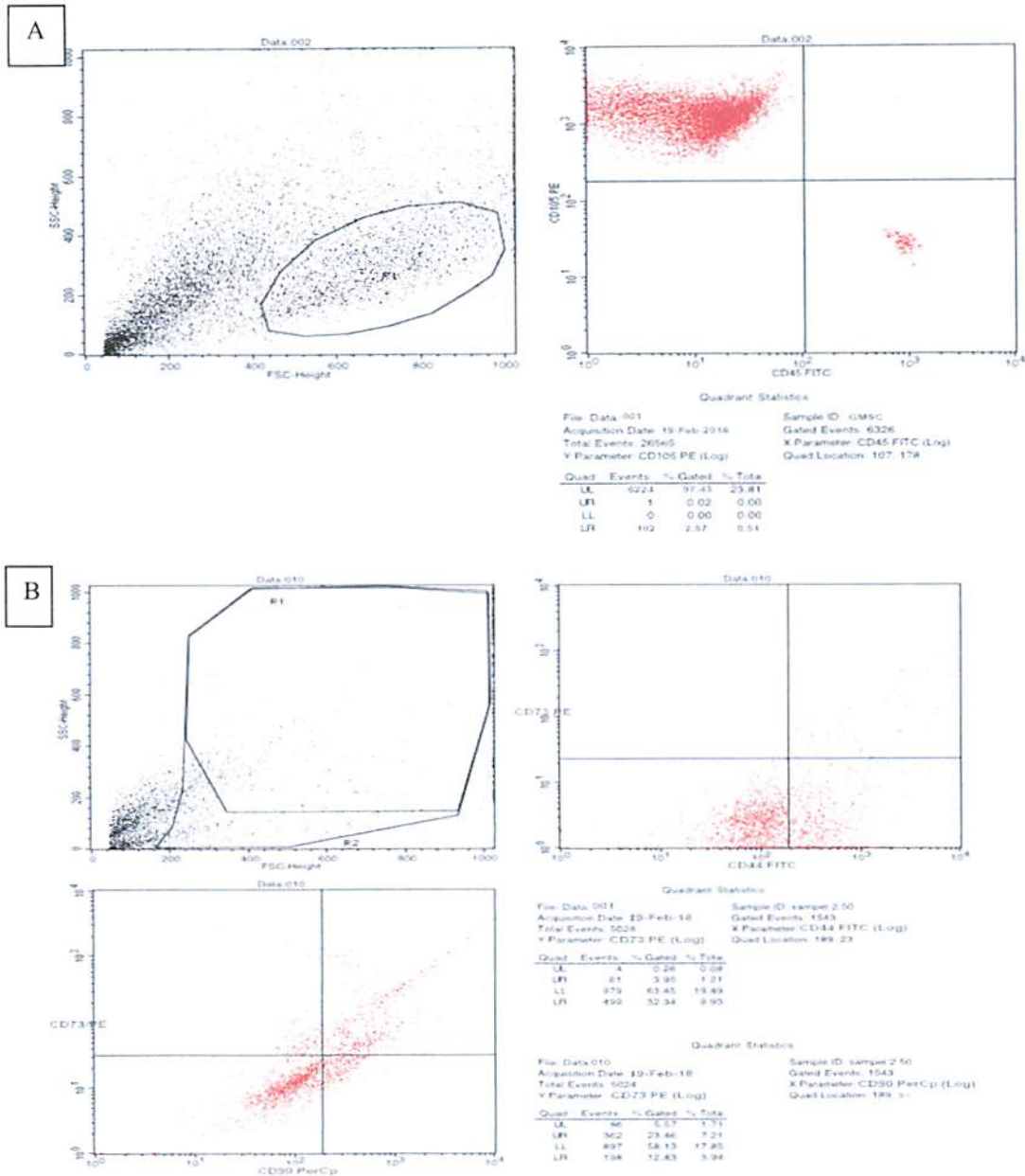


Gambar 5.3. Pemeriksaan ICC *immunofluorescence* GMSCs pasase ketiga tidak mengekspresikan *marker* HSC (panah merah); A, B. negatif CD34; C, D. negatif CD45 berlabel FITC. Pemeriksaan dengan mikroskop Elektron (*Immunofluorescence* Mikroskop, Olympus) dengan pembesaran 100x.

Hasil pengamatan terhadap rerata *marker* permukaan GMSC menunjukkan nilai rerata paling besar dijumpai pada *marker* CD105 diikuti CD73, CD90, dan CD44 yang merupakan *marker* MSCs, namun memiliki nilai rerata yang rendah terhadap CD34 dan CD45 yang merupakan *marker* HSC (gambar 5.4).



Gambar 5.4. Hasil rerata *marker* permukaan GMSCs pasase ketiga mengekspresikan *marker* positif (+) MSCs CD44, CD73, CD90, CD105 and negatif (-) *marker* permukaan HSCs CD34 dan CD45.



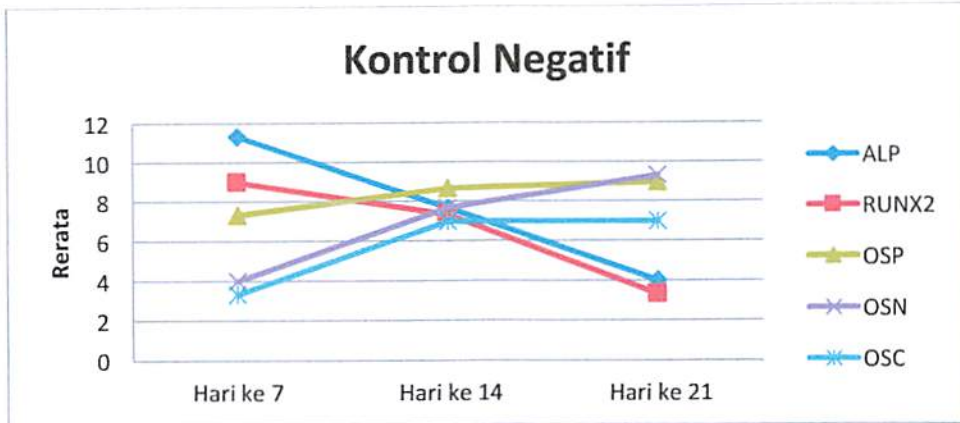
Gambar 5.5 Analisis *Flowcytometry* menunjukkan karakterisasi GMSCs pasase ketiga. A. GMSCs sangat mengekspresikan CD105 namun tidak mengekspresikan CD45; B. GMSCs juga mengekspresikan *marker* MSCs yaitu CD44, CD73, and CD90.

Pemeriksaan *flowcytometry* untuk mengetahui *marker* permukaan GMSCs konfirmasi *marker* MSCs. Pada hasil pemeriksaan *flowcytometry* diketahui bahwa GMSCs mengekspresikan *marker* positif MSC yaitu CD44, CD73, CD90 dan sangat mengekspresikan positif CD105. GMSCs mengekspresikan secara negatif *marker* HSCs yaitu CD45.

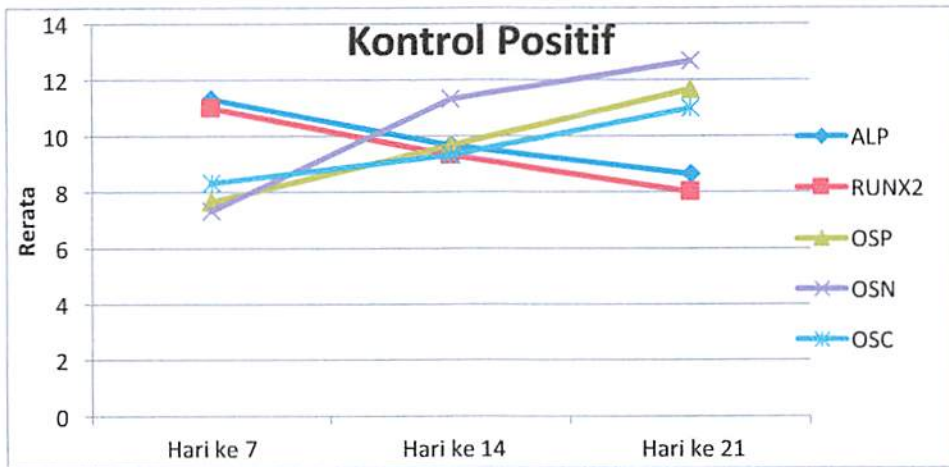
Tabel 5.1 Rerata ekspresi *marker* osteogenik hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan  $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSC, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF) pasase kelima.

Kelompok	n	Hari Ke-	Rerata $\pm$ SD				
			ALP	RUNX2	OSP	OSN	OSC
Kontrol Negatif (GMSCs+ $\alpha$ MEM)	3	7	11.33 $\pm$ 2.517	9 $\pm$ 2.000	7.33 $\pm$ 1.155	4.00 $\pm$ 1.732	3.33 $\pm$ 1.528
	3	14	7.67 $\pm$ 2.082	7.33 $\pm$ 1.528	8.67 $\pm$ 1.528	7.67 $\pm$ 2.887	7.00 $\pm$ 1.000
	3	21	4 $\pm$ 1.000	3.33 $\pm$ 1.528	9.0 $\pm$ 2.000	9.33 $\pm$ 1.528	7.00 $\pm$ 2.646
Kontrol Positif (GMSCs + DMEM+Medium Osteogenik)	3	7	11.33 $\pm$ 1.528	11 $\pm$ 1.000	7.67 $\pm$ 1.528	7.33 $\pm$ 1.528	8.33 $\pm$ 1.155
	3	14	9.67 $\pm$ 1.155	9.33 $\pm$ 0.577	9.67 $\pm$ 3.215	11.33 $\pm$ 2.082	9.33 $\pm$ 0.577
	3	21	8.67 $\pm$ 2.517	8 $\pm$ 1.115	11.67 $\pm$ 1.528	12.67 $\pm$ 2.082	11.00 $\pm$ 1.000
Kelompok Perlakuan (GMSCs + DMEM+Medium Osteogenik+PRF)	3	7	16.00 $\pm$ 1.732	14.33 $\pm$ 2.517	11.33 $\pm$ 1.155	10.67 $\pm$ 1.528	10 $\pm$ 1.000
	3	14	10.67 $\pm$ 1.528	12.67 $\pm$ 2.082	11.67 $\pm$ 1.528	12.67 $\pm$ 1.528	12.33 $\pm$ 3.055
	3	21	9.67 $\pm$ 1.155	11.67 $\pm$ 1.528	13.00 $\pm$ 2.00	14.67 $\pm$ 2.517	13.67 $\pm$ 2.309

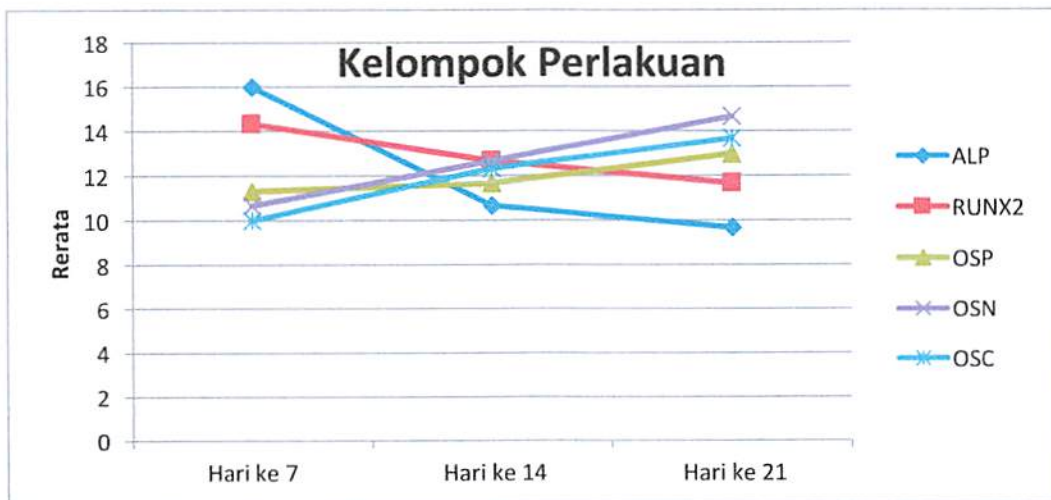
*Marker* diferensiasi osteogenik GMSCs pada setiap kelompok dapat dilihat pada Tabel 5.1. Ekspresi ALP paling tinggi dijumpai pada kelompok perlakuan pada hari ke 7 (16.00 $\pm$ 1.732) dan mulai menurun pada hari ke 14 (10.67 $\pm$ 1.528) hingga hari ke 21 (9.67 $\pm$ 1.155). Ekspresi ALP paling sedikit dijumpai pada kelompok kontrol negatif yaitu hari ke 21 (4 $\pm$ 1.000) (Gambar 5.6, 5.7, 5.8).



Gambar 5.6 Grafik rerata ekspresi ALP, RUNX2, OSP, OSN, OSC pada kelompok kontrol negatif hari ke 7, 14, 21.

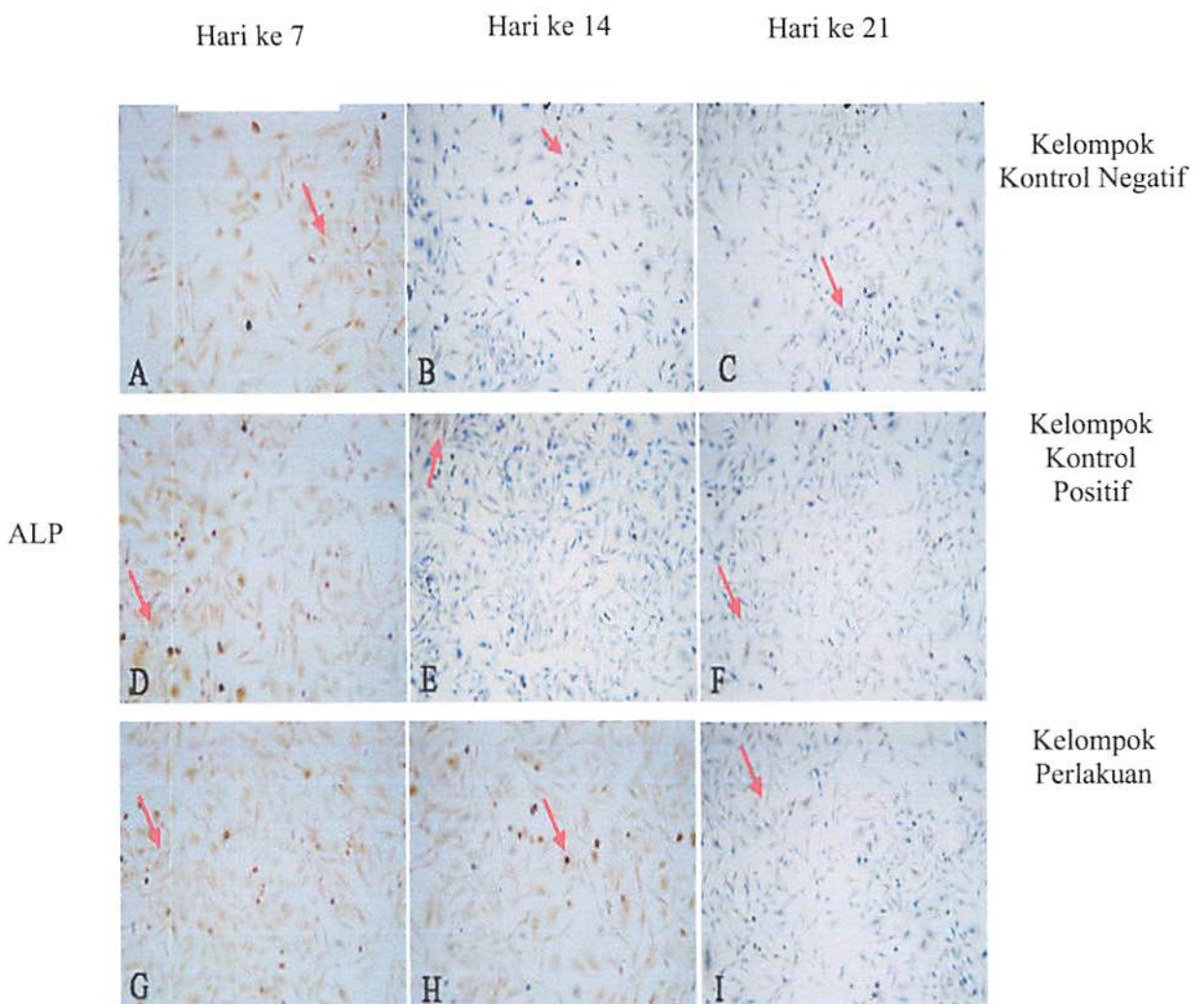


Gambar 5.7 Grafik rerata ekspresi ALP, RUNX2, OSP, OSN, OSC pada kelompok kontrol positif hari ke 7, 14, 21.



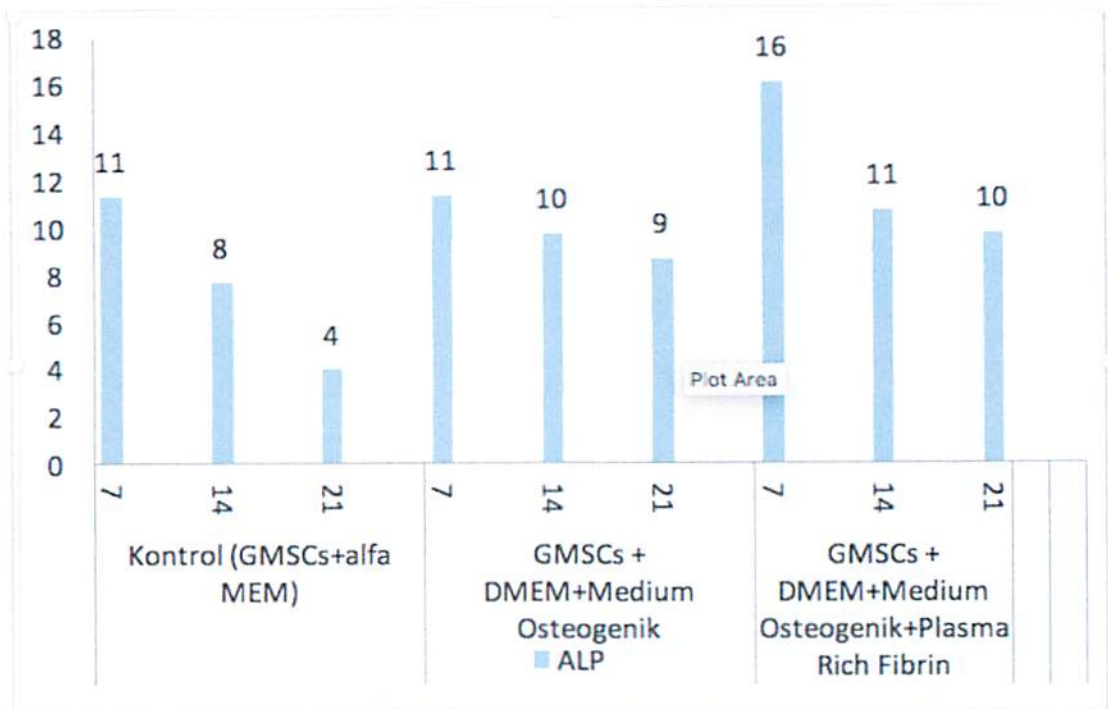
Gambar 5.8 Grafik rerata ekspresi ALP, RUNX2, OSP, OSN, OSC pada kelompok perlakuan hari ke 7, 14, 21.

Pemeriksaan ICC dengan metode DAB dilakukan untuk mengetahui jumlah GMSCs yang positif (warna coklat) mengekspresikan ALP (gambar 5.9). Hasil pengamatan terhadap ekspresi ALP pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan menunjukkan nilai rerata paling besar pada kelompok perlakuan hari ke -7 (gambar 5.10).



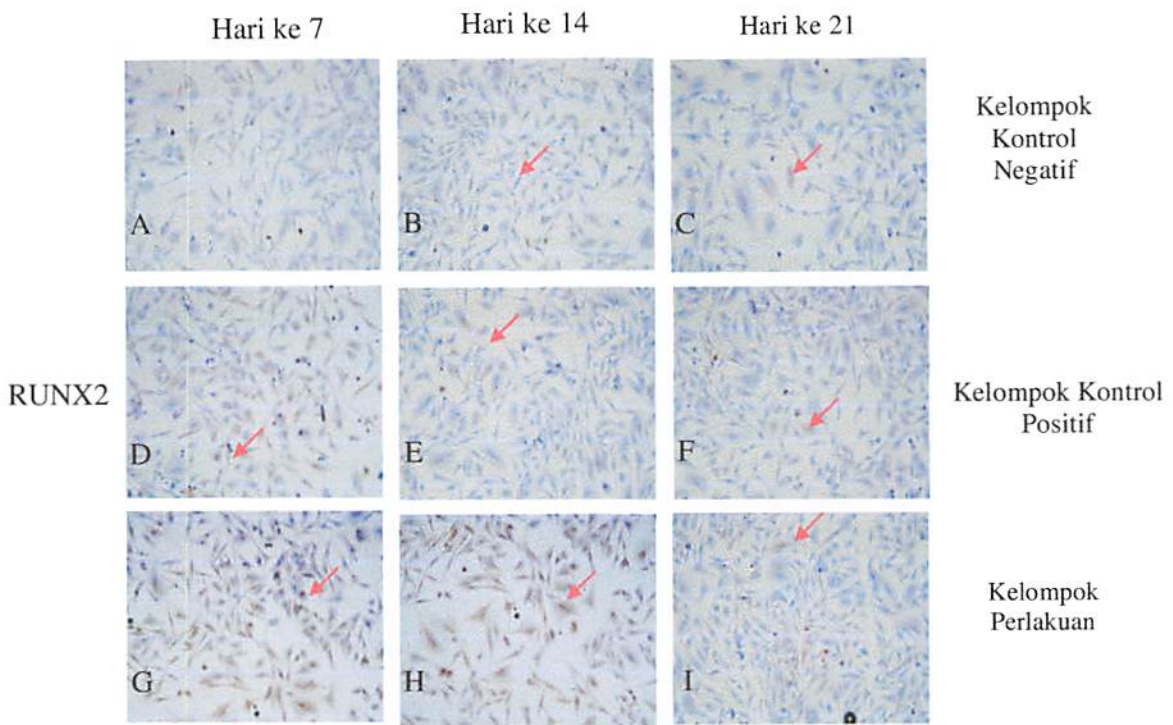
Gambar 5.9 Ekspresi ALP pada GMSCs pasase kelima tikus *wistar* (*Rattus Novergicus*). A. ALP Kontrol Negatif; B. ALP Kontrol Positif dan C. ALP kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi ALP positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x.



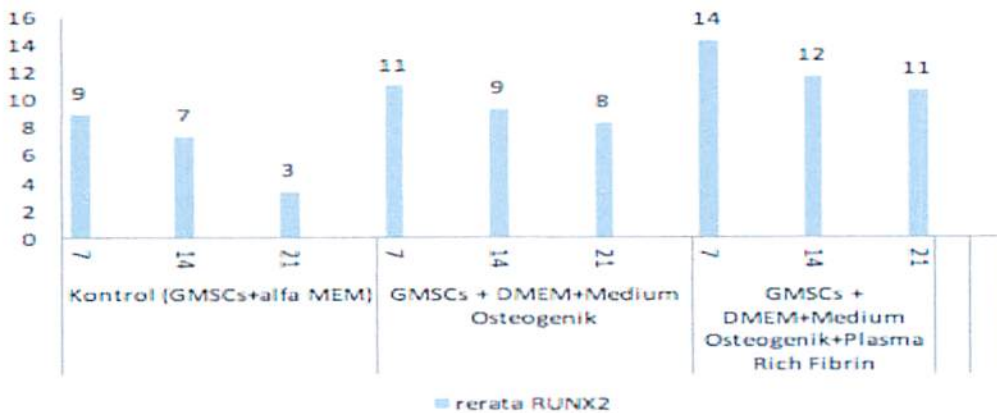


Gambar 5.10 Rerata ekspresi ALP hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan  $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF) pasase kelima.

Pemeriksaan ICC dengan metode DAB dilakukan untuk mengetahui jumlah GMSCs yang positif (warna coklat) mengekspresikan RUNX2 (gambar 5.11). Hasil pengamatan terhadap ekspresi RUNX2 pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan menunjukkan nilai rerata paling besar pada kelompok perlakuan hari ke-7 (gambar 5.12).

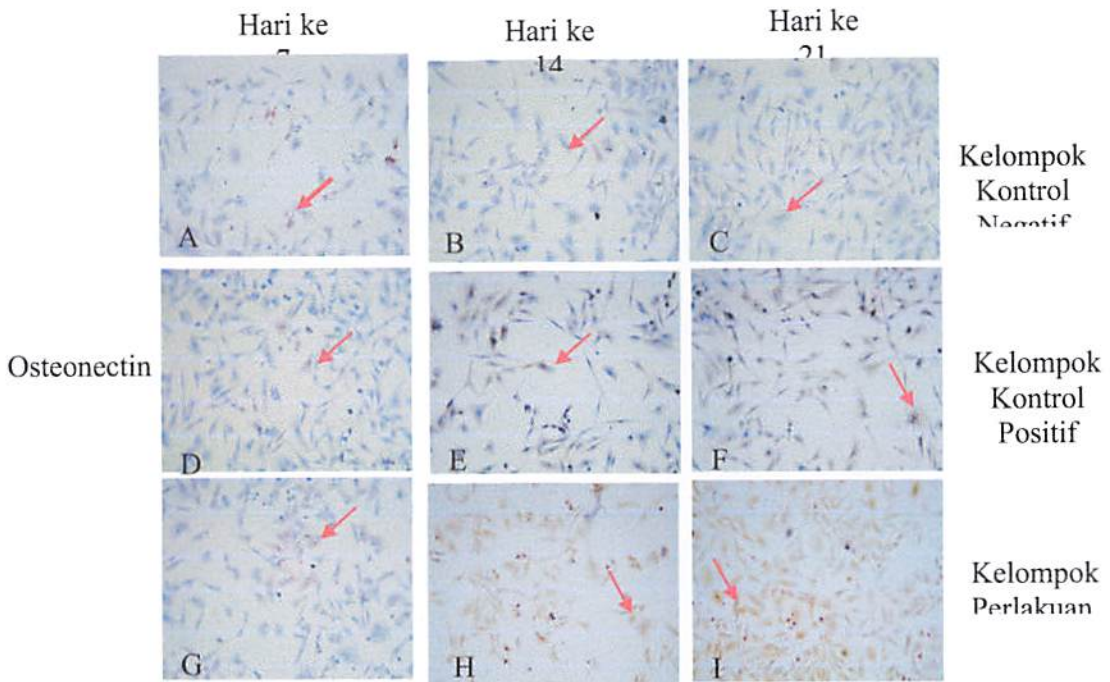


Gambar 5.11 Ekspresi RUNX2 pada GMSCs pasase kelima tikus *wistar (Rattus Novergicus)*. A. RUNX2 Kontrol Negatif; B. RUNX2 Kontrol Positif dan C. RUNX2 kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi RUNX2 positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x.

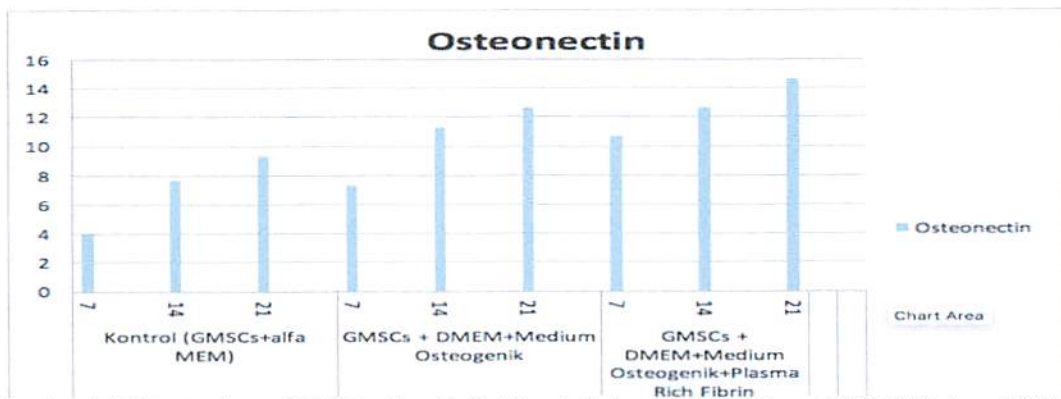


Gambar 5.12 Rerata ekspresi RUNX2 hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan  $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF) pasase kelima.

ICC dengan metode DAB dilakukan untuk mengetahui jumlah GMSCs yang positif (warna coklat) mengekspresikan OSN (gambar 5.13). Hasil pengamatan terhadap ekspresi OSN pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan menunjukkan nilai rerata paling besar pada kelompok perlakuan hari ke -21 (gambar 5.14).

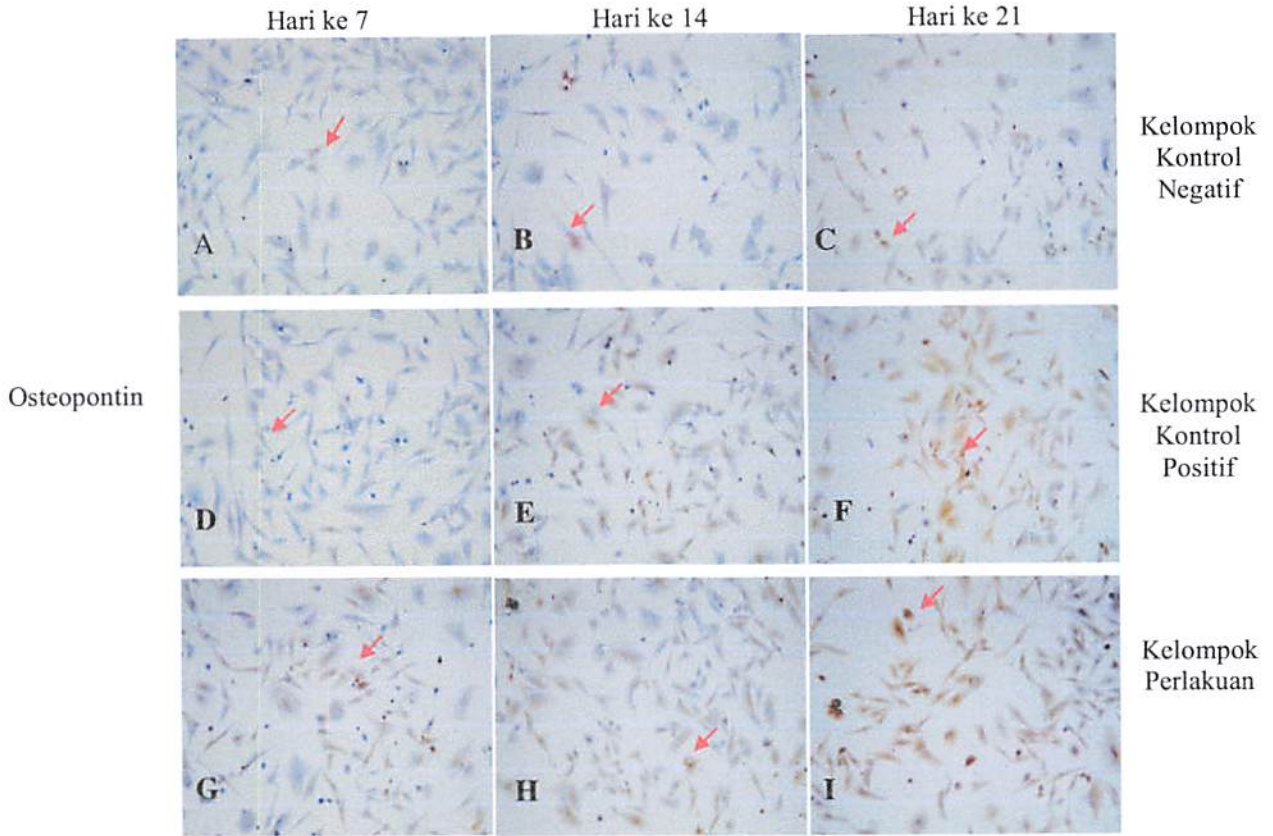


Gambar 5.13 Ekspresi OSN pada GMSCs pasase kelima tikus wistar (*Rattus Novergicus*). A. OSN Kontrol Negatif; B. OSN Kontrol Positif dan C. OSN kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi OSN positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x.

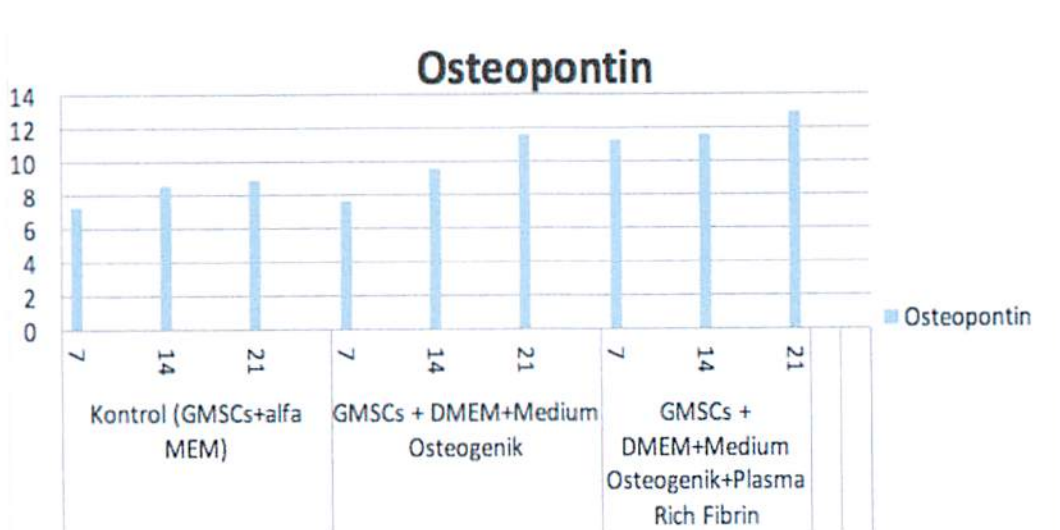


Gambar 5.14 Rerata ekspresi OSN hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan  $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF) pasase kelima.

Pemeriksaan ICC dengan metode DAB dilakukan untuk mengetahui jumlah GMSCs yang positif (warna coklat) mengekspresikan OSP (gambar 5.15). Hasil pengamatan terhadap ekspresi OSP pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan menunjukkan nilai rerata paling besar pada kelompok perlakuan hari ke -21 (gambar 5.16).

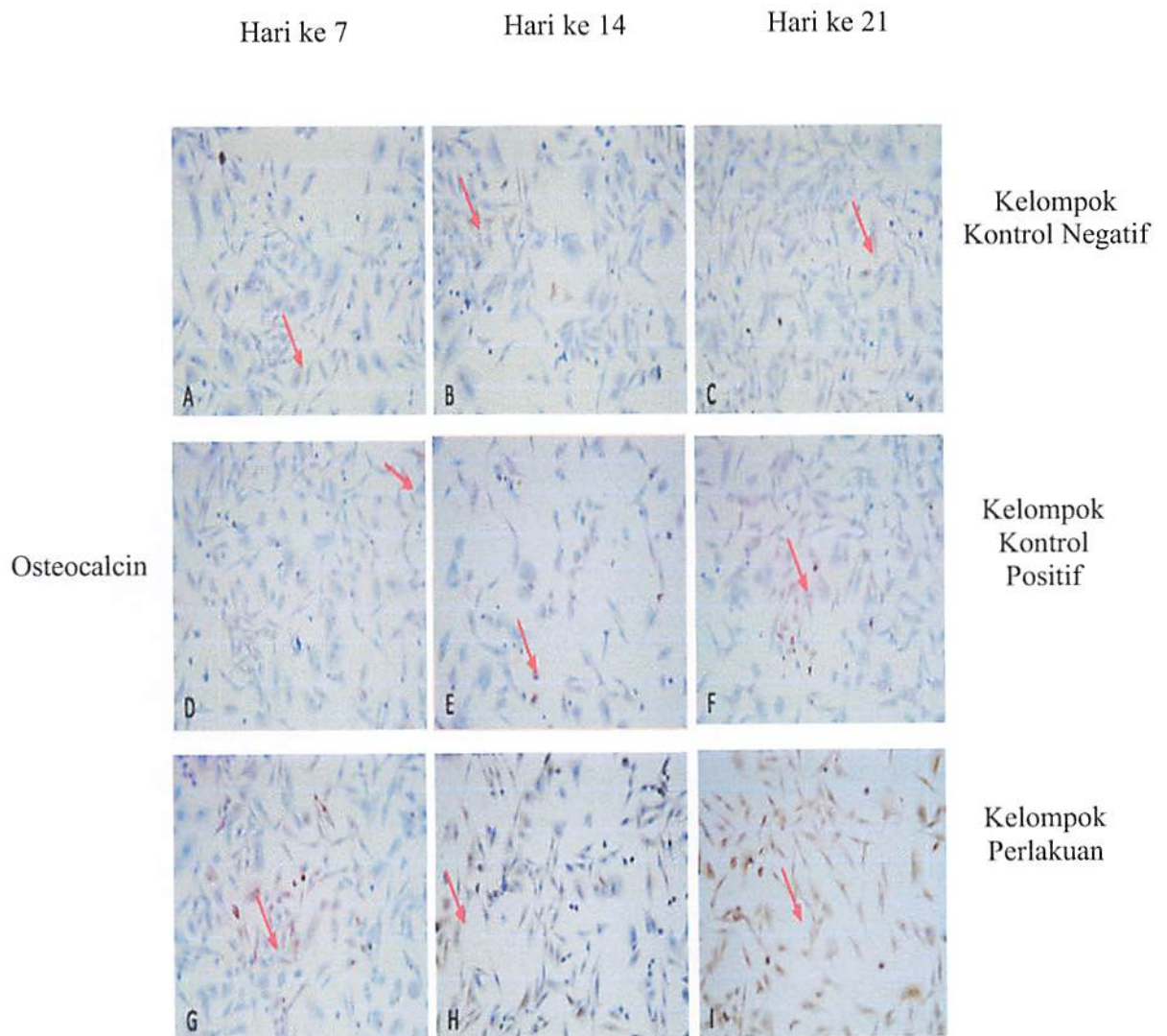


Gambar 5.15 Ekspresi OSP pada GMSCs pasase kelima tikus *wistar (Rattus Novergicus)*. A. OSP Kontrol Negatif; B. OSP Kontrol Positif dan C. OSP kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi OSP positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x.

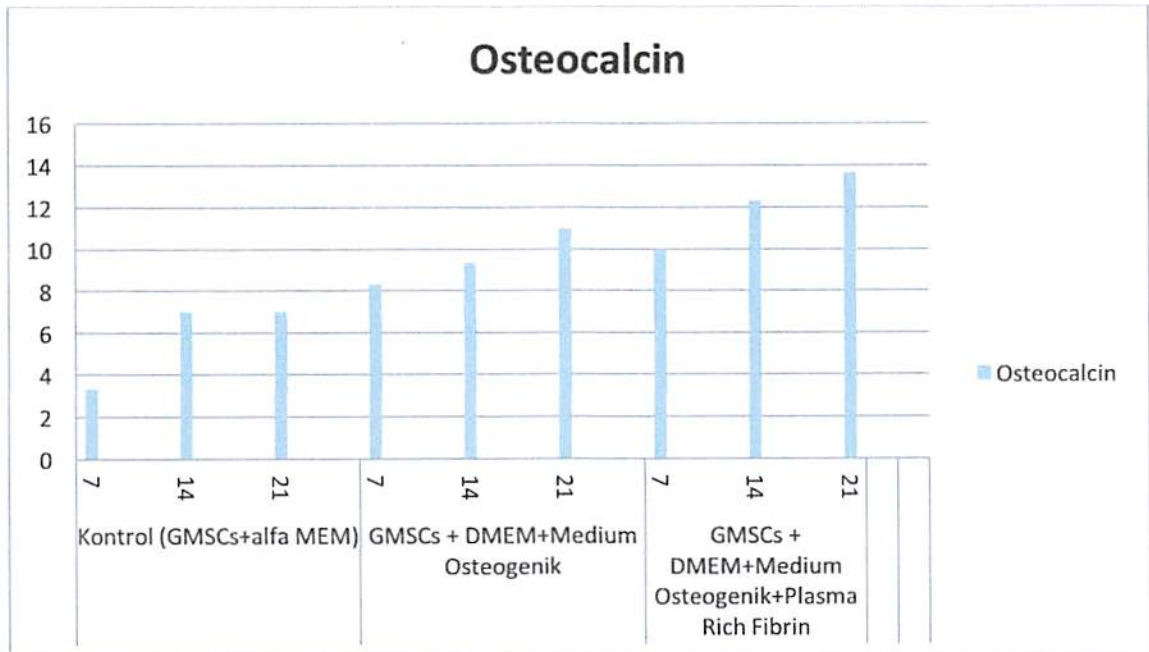


Gambar 5.16 Rerata ekspresi OSP hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan  $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF) pasase kelima.

Pemeriksaan ICC dengan metode DAB dilakukan untuk mengetahui jumlah GMSCs yang positif (warna coklat) mengekspresikan OSP (gambar 5.17). Hasil pengamatan terhadap ekspresi OSP pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan menunjukkan nilai rerata paling besar pada kelompok perlakuan hari ke -21 (gambar 5.18).



Gambar 5.17 Gambaran ekspresi OSC pada GMSCs pasase kelima tikus wistar (*Rattus Novergicus*). A. OSC Kontrol Negatif; B. OSC Kontrol Positif dan C. OSC kelompok Kontrol Ekspresi pada hari ke 7, 14 dan 21. Ekspresi OSC positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 200x.



Gambar 5.15 Rerata ekspresi OSC hari ke -7, 14, 21 pada kelompok kontrol negatif (GMSCs dan  $\alpha$ MEM), kelompok kontrol positif (GMSCs, DMEM, medium osteogenik), dan kelompok perlakuan (GMSCs, DMEM, medium osteogenik dan PRF) pasase kelima.

## 5.2 Luaran yang di capai

### 5.2.1 Publikasi Jurnal Internasional terindeks SCOPUS

**Judul :** *Bone Alkaline Phosphatase and Osteocalcin Expression of Rat's Gingival Stromal Progenitor Cells with Platelet Rich Fibrin for Bone Remodelling (In-vitro Study)*

**Penulis:** Alexander Patera Nugraha, Ida Bagus Narmada, Diah Savitri Ernawati, Aristika Dinaryanti, Eryk Hendrianto, Wibi Riawan, **Corresponding Author:** Fedik Abdul Rantam

**Jurnal :** European Journal of Dentistry Q1 SCOPUS

**Penerbit:** Medknow

**Status :** *Published*

**url:** [http://www.eurjdent.com/temp/EurJDent124566-1605631\\_002645.pdf](http://www.eurjdent.com/temp/EurJDent124566-1605631_002645.pdf)

**Judul :** *Gingival Stromal Progenitor Stem Cell Cultured in Plasma Rich Fibrin Osteogenic Potential predicted by Core-Binding Factor Subunit-Alpha1/SOX9 Expression Ratio (In-vitro).*

**Penulis:** Alexander Patera Nugraha, Ida Bagus Narmada, Diah Savitri Ernawati, Aristika Dinaryanti, Eryk Hendrianto, Wibi Riawan, **Corresponding Author:** Fedik Abdul Rantam

**Jurnal :** F1000Research Q1 SCOPUS

**Penerbit:** F1000Ltd

**Status :** *Published*

**url :** [https://f1000researchdata.s3.amazonaws.com/manuscripts/16808/8f32c0d4-9582-44f6-9218-f1f34abed9f1\\_15423\\_-\\_alexander\\_nugraha.pdf?doi=10.12688/f1000research.15423.1](https://f1000researchdata.s3.amazonaws.com/manuscripts/16808/8f32c0d4-9582-44f6-9218-f1f34abed9f1_15423_-_alexander_nugraha.pdf?doi=10.12688/f1000research.15423.1)

**Judul :** *Isolation and Characterization of Gingival Mesenchymal Stem Cells from Rats Gingiva (Rattus Novergicus) (in vitro study)*

**Penulis:** Alexander Patera Nugraha, **Corresponding Author:** Fedik Abdul Rantam, Diah Savitri Ernawati, Ida Bagus Narmada, Agung Dwi Wahyu Widodo, Pudji Lestari, A Aristika Dinaryanti, Eryk Hendrianto, Helen Susilowati, Nora Ertanti Deya Karsari

**Jurnal :** Journal of International Dental and Medical Research Q3 SCOPUS

**Penerbit:** Dicle University

**Status :** *Published*

**url:** [http://www.jidmr.com/journal/wp-content/uploads/2018/09/55D18\\_581-Layout.pdf](http://www.jidmr.com/journal/wp-content/uploads/2018/09/55D18_581-Layout.pdf)



## BAB 6

### RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

1. Menyelesaikan laporan penggunaan anggaran.
2. Menyelesaikan laporan tanggungjawab keuangan.
3. Penelitian tahap *invitro* telah selesai dan akan dilanjutkan desain penelitian *invivo* yang berjudul Mekanisme Percepatan *Remodeling* Jaringan Periodontal pada Pergerakan Gigi Ortodonti dengan Transplantasi Intrasukuler *Allogeneous Gingival Mesenchymal Stem Cell* (tahun ke 2 dan ke 3).
4. Data yang diperoleh pada tahap penelitian *invitro* akan disusun dalam draft jurnal untuk target luaran jurnal publikasi internasional terindeks scopus seperti:

**Judul :** *Invitro Bone Sialoprotein-I Expression in Combined Gingival Somatic Cell and Plasma Rich Fibrin during osteogenic differentiation.*

**Penulis:** Alexander Patera Nugraha, Ida Bagus Narmada, Diah Savitri Ernawati, Aristika Dinaryanti, Eryk Hendrianto, Wibi Riawan, Corresponding Author: Fedik Abdul Rantam

**Jurnal :** Tropical Journal of Pharmaceutical Research Q3 SCOPUS

**Penerbit:** University of Benin

**Status :** *Accepted*



**Judul :** *Accelerating Osteogenic Differentiation of Gingival Somatic Cells with Plasma Rich Fibrin Estimated with SPARC Expression (in vitro).*

**Penulis:** Alexander Patera Nugraha, Ida Bagus Narmada, Diah Savitri Ernawati, Aristika Dinaryanti, Eryk Hendrianto, Wibi Riawan, Corresponding Author: Fedik Abdul Rantam

**Jurnal :** Indian Veterinary Journal Q3 SCOPUS

**Penerbit:** Indian Veterinary Association

**Status :** *Accepted*

**Judul :** *The aggrecan expression of Gingival Medicinal Signaling Cells combined with Plasma Rich Fibrin during osteogenic differentiation (invitro)*

**Penulis:** Alexander Patera Nugraha, Ida Bagus Narmada, Diah Savitri Ernawati, Aristika Dinaryanti, Eryk Hendrianto, Wibi Riawan, Corresponding Author: Fedik Abdul Rantam

**Jurnal :** Kafkas Veterinary Journal Q3 SCOPUS

**Penerbit:** Kafkas Universitas Veteriner Fakultas

**Status :** *Submit*



## BAB 7

### PENUTUP

Hasil temuan baru mengungkapkan bahwa PRF mempercepat diferensiasi osteogenik GMSCs dengan meningkatkan ekspresi RUNX2, ALP, OSP, OSN, OSC untuk ekspansi tulang maksila (*in vitro*)

#### 7.1 Kesimpulan

Kesimpulan hasil analisis data serta pembahasan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. PRF mempercepat diferensiasi osteogenik GMSCs dengan meningkatkan ekspresi RUNX2 untuk ekspansi tulang maksila (*in vitro*).
2. PRF mempercepat diferensiasi osteogenik GMSCs dengan meningkatkan ekspresi ALP untuk ekspansi tulang maksila (*in vitro*)
3. PRF mempercepat diferensiasi osteogenik GMSCs dengan meningkatkan ekspresi OSC untuk ekspansi tulang maksila (*in vitro*)
4. PRF mempercepat diferensiasi osteogenik GMSCs dengan meningkatkan ekspresi OSP untuk ekspansi tulang maksila (*in vitro*)
5. PRF mempercepat diferensiasi osteogenik GMSCs dengan meningkatkan ekspresi OSN untuk ekspansi tulang maksila (*in vitro*)

## 7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan hewan coba (penelitian *in vivo*) mengenai kombinasi *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dan *Plasma Rich Fibrin* untuk akselerasi ekspansi tulang Maksila.
2. Perlu dilakukan pengembangan kombinasi *Gingival Mesenchymal Stem Cells* dan *Plasma Rich Fibrin* untuk akselerasi ekspansi tulang Maksila sebagai terapi ajuvan pada tata laksana perawatan ortodonti dan diperlukan kerjasama yang baik intra disiplin ilmu di FKG Unair mengingat FKG Unair sebagai rumah sakit pendidikan yang memungkinkan untuk pengembangan penelitian bagi mahasiswa dan staf pengajar.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ardeshirylajimi, A., Soleimani M., Yaghmaei P. 2014. A comparative study of osteogenic differentiation human induced pluripotent stem cells and adipose tissue derived mesenchymal stem cells, *Cell Journal*, 16(3), pp. 235–244.
- Augello, A., Kurth, T. B. and de Bari, C. 2010. Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches, *European Cells and Materials*, pp. 121–133. doi: 10.22203/eCM.v020a11.
- Baek, H. S. Lee, H.S., Kim, B.J., Chung, I.K., Kim, C.H., Jin, S.M., Hwang, H.S., Shin, S.H. 2011. Effect of platelet-rich fibrin on repair of defect in the articular disc in rabbit temporomandibular joint by platelet-rich fibrin, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(6), pp. 530–535.
- Barzilay, R., Melamed, E. and Offen, D. 2009. Introducing transcription factors to multipotent mesenchymal stem cells: Making transdifferentiation possible”, *Stem Cells*, pp. 2509–2515. doi: 10.1002/stem.172.
- Biondi, K. 2016. Evaluation of masseter muscle in different vertical skeletal patterns in growing patients”, *European Journal of Paediatric Dentistry*, 17(1), pp. 47–52.
- Borie, E., Olivi, DG., Orsi, IA., Garlet, K., Weber, B., Beltran, V., Fuentes R. 2015. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(5): 7922–7929.

- Brunetti, G., Mori, G., D'Amelio P., Faccio R. 2013 The crosstalk between the bone and the immune system: Osteoimmunology", *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. doi: 10.1155/2013/617319.
- Chamieh, F. Collingnon, A.M., Coyac, B.R., Lesieur J., Ribes S., Sadoine J., Llorens A., Nicoletti, A., Letourneur, D., Colombier, M.L., Nazhat, S.N., Bouchard P., Chaussain C., Rochefor G. 2016. Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells", *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 38814. doi: 10.1038/srep38814.
- Chang, IC., Tsai, CH., Chang YC. 2010. Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95: 327–32.
- Chen, Q. Shou, P., Zhang, L., Xu, C., Zheng, C., Han, Y., Li, W., Huang, Y., Zhang, X., Shao, C., Roberts, A.I., Rabson, AB., Ren, G., Zhang, Y., Wang, Y., Denhardt, D.T., Shi, Y. 2014. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells", *Stem Cells*, 32(2), pp. 327–337. doi: 10.1002/stem.1567.
- Cortese, A., Pantaleo, G., Caggiano, M. 2016. Platelet-rich fibrin (PRF) in implant dentistry in combination with new bone regenerative technique in elderly patients. *Int J Surg Case Rep*. 2016; 28: 52–56. doi: 10.1016/j.ijscr.2016.09.022

- Crotti, T. N., Dharmapatni A.A.S.S.K., Alias E., Haynes, D.R. 2015. Osteoimmunology: Major and Costimulatory Inflammatory Induced Bone Loss", *Journal of Immunology Research*, 2015.
- Diomede, F., Rajan, TS., Gatta V., D'Aurora, M., Merciaro, I., Marchisio, M., Muttini, A., Caputi, S., Bramanti, P., Mazzon, E., Trubiani, O. Stemness Maintenance Properties in Human Oral Stem Cells after Long-Term Passage. *Stem Cells International*, 2017;5651287:1-14. <https://doi.org/10.1155/2017/5651287>.
- Du, L., Yang, P. and Ge, S. 2016. Isolation and characterization of human gingiva- derived mesenchymal stem cells using limiting dilution method", *Journal of Dental Sciences*, 11(3), pp. 304–314. doi: 10.1016/j.jds.2016.03.010.
- Duan, X., Lin, Z., Lin, X., Wang, Z., Wu, Y., Ji, M., Lu, W., Wang, X., Zhang, D. 2018. Study of platelet-rich fibrin combined with rat periodontal ligament stem cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Mol Med*. 2018 Feb;22(2):1047-1055. doi: 10.1111/jcmm.13461.
- Egusa, H. Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., Akiyama, K. 2012. Stem cells in dentistry - Part I: Stem cell sources", *Journal of Prosthodontic Research*, pp. 151–165. doi: 10.1016/j.jpor.2012.06.001.
- Egusa, H. Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., Akiyama, K. 2012. Stem cells in dentistry - Part II: Clinical applications", *Journal of Prosthodontic Research*, pp. 229–248. doi: 10.1016/j.jpor.2012.10.001.

- Ehrenfest, DDM., Diss, A., Odin, G. 2009. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108:341–52.
- Ehrenfest, DDM., Doglioli, P., de Peppo, GM. 2010. Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) stimulates in vitro proliferation and differentiation of human oral bone mesenchymal stem cell in a dose-dependent way. *Arch Oral Biol.* 2010; 55: 185–94.
- Ekizer, A. 2015. Bone marrow mesenchymal stem cells enhance bone formation in ortodontically expanded maxillae in rats", *The Angle Ortodontist*, 85(3), pp. 394–399. doi: 10.2319/031114-177.1.
- Fawzy El-Sayed, K. M. and Dörfer, C. E. 2016. Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem", *Stem Cells International.* doi: 10.1155/2016/7154327.
- Gao, F., Chiu, S.M., Motan, D.A., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H.L., Tse, H.F., Fu, Q.L., Lian, Q. 2016. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects, *Cell death & disease*, 7, p. e2062. doi: 10.1038/cddis.2015.327.
- Giudici, C, Raynal, N, Wiedemann, H, Cabral, WA, Marini, JC, Timpl, R, Bachinger, HP., 2008 Mapping of SPARC/BM-40/osteonectin-binding sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem* 283: 19551–19560.

- Golub, E. E. and Boesze-Battaglia, K. 2007. The role of alkaline phosphatase in mineralization", *Current Opinion in Orthopaedics*, pp. 444–448. doi: 10.1097/BCO.0b013e3282630851.
- Granéli, C. Throfvé, A., Ruetschi, U., Brisby H., Thomsen, P., Lindahl A., Karlsson C. 2014. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach", *Stem Cell Research*, 12(1), pp. 153–165. doi: 10.1016/j.scr.2013.09.009.
- Graves, D. T., Oates, T., Garlet, G.P. 2016. Osteoimmunology, *Osteoimmunology*. doi: 10.1016/B978- 0-12-800571-2.00019-0.
- Halling, LC., Ek-Rylander, B., Magnusson P. 2017. Bone Alkaline Phosphatase and Tartrate-Resistant Acid Phosphatase: Potential Co-regulators of Bone Mineralization", *Calcified Tissue International*, 101(1), pp. 92–101. doi: 10.1007/s00223-017-0259-2.
- Hankenson, K. D., Gagne, K. and Shaughnessy, M. 2015. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration", *Advanced Drug Delivery Reviews*, pp. 3–12. doi: 10.1016/j.addr.2015.09.008.
- He, L., Lin, Y., Hu, X., 2009. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet- rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009; 108:707–13.



- Huang, FM., Yang, SF., Zhao, JH. 2010. Platelet- rich fibrin increases proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *J Endod.* 2010; 36: 1628–32.
- Huang, H., Williams, R. C. and Kyrkanides, S. 2014. Accelerated ortodontic tooth movement: Molecular mechanisms”, *American Journal of Ortodontics and Dentofacial Orthopedics*, pp. 620–632. doi: 10.1016/j.ajodo.2014.07.007.
- Hung, P. S., Kuo, Y.C., Chen, H.G., Chiang H.H.K., Lee, O.K.S. 2013. Detection of Osteogenic Differentiation by Differential Mineralized Matrix Production in Mesenchymal Stromal Cells by Raman Spectroscopy”, *PLoS ONE*, 8(5). doi: 10.1371/journal.pone.0065438.
- Jin, S. H., Lee, J. E., Yun, J.H., Kim, I., Ko, Y., Park, J. B. 2015. Isolation and characterization of human mesenchymal stem cells from gingival connective tissue”, *Journal of Periodontal Research*, 50(4), pp. 461–467. doi: 10.1111/jre.12228.
- Kamadajaja, M. J. K., Salim, S. and Rantam, F. A. 2016. Osteogenic Potential Differentiation of Human Amnion Mesenchymal Stem Cell with Chitosan- Carbonate Apatite. 5(September), pp. 71–77. doi: 10.15562/bmj.v5i3.296.
- Kazemi, D., Fakhrijou A., Dizaji V.M., Alishahi, A. 2014. Effect of autologous platelet rich fibrin on the healing of experimental articular cartilage defects of the knee in an animal model”, *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/486436.

- Kobayashi, E. Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B., Miron, R.J. 2016. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF", *Clinical Oral Investigations*, 20(9), pp. 2353–2360. doi: 10.1007/s00784-016-1719-1.
- Kökdere, N. N., Baykul, T. Findik, Y. 2015. The use of platelet-rich fibrin (PRF) and PRF-mixed particulated autogenous bone graft in the treatment of bone defects: An experimental and histomorphometrical study", *Dental Research Journal*, 12(5), pp. 418–424. doi: 10.4103/1735-3327.166188.
- Kuo, YC., Au, H.K., Hsu, J.L., Wang, H.F., Lee, C.J., Peng, S.W., Lai, S.C., Wu, YC., Ho, H.N., Huang, Y.H. 2018. IGF-1R Promotes Symmetric Self-Renewal and Migration of Alkaline Phosphatase+ Germ Stem Cells through HIF-2 $\alpha$ -OCT4/CXCR4 Loop under Hypoxia. *Stem Cell Reports*. 2018 Feb 13;10(2):524-537. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.12.003. Epub 2018 Jan 4.
- Law, S. and Chaudhuri, S. 2013. Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges, *American journal of stem cells*, 2(1), pp. 22–38.
- Li, Q., Pan, S., Dangaria, S.J., Gopinathan, G., Kolokythas, A., Chu, S., Geng, Y., Zhou, Y., and Luan X. 2013. Platelet-Rich Fibrin Promotes Periodontal Regeneration and Enhances Alveolar Bone Augmentation. *BioMed Research International* Volume 2013, Article ID 638043, 13 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/638043>.

- Li, Q., Reed, AD., Min, L., Gopinathan, G., Li S., Dangaria, SJ., Li, L., Geng Y., Galang, MT.,<sup>5</sup> Gajendrareddy, P., Zhou, Y., Luan, X., and Diekwisch, TGH. 2014. Lyophilized Platelet-Rich Fibrin (PRF) Promotes Craniofacial Bone Regeneration through Runx2. *Int J Mol Sci*. 2014 May; 15(5): 8509–8525. doi: 10.3390/ijms15058509.
- Loebel, MD, Czekanska EM., Bruderer M., Salzmann G., Alini M. and Stoddart MJ. 2015. In Vitro Osteogenic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Is Predicted by Runx2/Sox9 Ratio. *Tissue Eng Part A*. 2015 Jan 1; 21(1-2): 115–123. doi: 10.1089/ten.tea.2014.0096
- Magnifico, M., Blasio, A.D., Cassi, D., Cassi, D., Blasi, C.D., Gandolfini, M. 2017. Asymmetric Expansion with a Modified Quad Helix for Treatment of Isolated Crossbite, *Case Reports in Dentistry*, 2017. doi: 10.1155/2017/7275846.
- Masuki, H., Okudera T., Kawase T. 2016. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF), *International Journal of Implant Dentistry*, 2(1), p. 19. doi: 10.1186/s40729-016-0052-4.
- McCurdy, S, Baicu, CF, Heymans, S, Bradshaw, AD. 2009. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). *J Mol Cell Cardiol* 48: 544–549.

- Mira Sumarta, N. P., Rantam F.A., Hendrianto, E., Karsari D., Pramono, C. 2016. Chondrogenic Differentiation Capacity of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells with Platelet Rich Fibrin Scaffold in Cartilage Regeneration (In Vitro Study), *Bali Medical Journal*, 5(3), p. 65. doi: 10.15562/bmj.v5i3.295.
- Miran, S., Mitsiadis, T. A., Pagella, P. 2016. Innovative Dental Stem Cell-Based Research Approaches: The Future of Dentistry", *Stem Cells International*. doi: 10.1155/2016/7231038.
- Moraes, D. A., Sibov, T.T., Pavon, L.F., Alvim, P.Q., Bonadio, R.S., Da Silva, J.R., Pic-Taylor, A., Toledo, O.A., Marti, L.C., Avedo, R.B., Oliveira, D.M. 2016. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells", *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1). doi: 10.1186/s13287-016-0359-3.
- Naik, B. 2013. Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review", *Journal of Conservative Dentistry*, 16(4), p. 284. doi: 10.4103/0972-0707.114344.
- Nakamura, A., Dohi, Y., Akahane, M., Ohgushi, H., Nakajima, H., Funaoka, H., Takakura Y. 2009. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 15(2), pp. 169–180. doi: 10.1089/ten.tec.2007.0334.

- Narayanan, R. K., Jeseem, M. T. and Kumar, T. A. 2016. Prevalence of Malocclusion among 10-12-year-old Schoolchildren in Kozhikode District, Kerala: An Epidemiological Study, *International journal of clinical pediatric dentistry*, 9(1), pp. 50–55. doi: 10.5005/jp-journals-10005-1333.
- Ng, PY., Donley, M, Hausmann, E, Hutson, AD, Rossomando, EF, Scannapieco, FA. 2007. Candidate salivary biomarkers associated with alveolar bone loss: cross-sectional and in vitro studies. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49: 252–260.
- Niibe, K., Suehiro, F., Oshima, M., Nishimura, M., Kuboki, T. Egusa H. 2017. Challenges for stem cell-based “regenerative prosthodontics, *Journal of Prosthodontic Research*, pp. 3–5. doi: 10.1016/j.jpjpor.2016.09.001.
- Paldanius, PM., 2017., *The Role of Osteocalcin in Human Bone Metabolism and Glucose Homeostasis. Academic Disertation. Available on <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/173087/THEROLEO.pdf?sequence=1>, Accessed on 1 June 2018.*
- Proffit, W., Fields, H. and Sarver, D. 2007. *Contemporary Ortodontics*, St Louis. doi: 10.1038/sj.bdj.2012.829.
- Rahmawati, D., Roestamadji, R.I, Yuliati A., Bramantoro, T. 2017. Osteogenic ability of combined hematopoetic stem cell, hydroxyapatite graft and platelet rich fibrin on rats (*Rattus novergicus*), *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*, 6(4), pp. 88–95.
- Rantam FA, Ferdiansyah, Purwati, 2014. *Stem cell mesenchymal, hematopoetik dan model aplikasi*. 2nd Ed. Surabaya: Airlangga University Press, P. 38.
- Rutkovskiy, A., Stenslkken, K.-O. and Vaage, I. J. 2016. Osteoblast

- Differentiation at a Glance”, *Medical Science Monitor Basic Research*, 22, pp. 95–106. doi: 10.12659/MSMBR.901142.
- Sase, SP., Ganu, JV., Nagane, N. 2012. Osteopontin: A Novel Protein Molecule A Review. *Indian Medical Gazette*. February 2012;62-66.
- Simões, R.C., Goettems, M.L., Schuch, H.S., Torriani, D.D., Demarco, F.F. 2017. Impact of malocclusion on oral health-related quality of life of 8-12 years old schoolchildren in Southern Brazil”, *Brazilian Dental Journal*, 28(1), pp. 105–112. doi: 10.1590/0103-6440201701278.
- Sinha, K. M. and Zhou, X. 2013. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation”, *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(5), pp. 975–984. doi: 10.1002/jcb.24439.
- Tang, L., Li, N., Xie, H., Jin, Y. 2011. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva”, *Journal of Cellular Physiology*, 226(3), pp. 832–842. doi: 10.1002/jcp.22405.
- Tomar, G. B., Srivastava, R.K., Gupta, N., Barhanpurkar, A.P., Pote, S.T., Jhaveri, H.M., Mishra, G.C., Wani, M.R. 2010. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(3), pp. 377–383. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.126.
- Trombetta, JM., Bradshaw, AD., Johnson, RH. 2010. SPARC/Osteonectin Functions to Maintain Homeostasis of the Collagenous Extracellular Matrix in the Periodontal Ligament. *J Histochem Cytochem*. 2010 Oct; 58(10): 871–879. doi: 10.1369/jhc.2010.956144

- Tu, M., Li, Y., Zeng, C., Deng, Z., Gao, S., Xiao, W., Luo, W., Jiang, W., Li, L., and Lei, G. MicroRNA-127-5p regulates osteopontin expression and osteopontin-mediated proliferation of human chondrocytes. *Scientific Report 2016, Scientific Reports* | 6:25032 | DOI: 10.1038/srep25032 1-8.
- Uysal, T. Amasyali, M., Enhos, S., Sonmez, M.F., Sagdic, D. 2009. Effect of ED-71, a New Active Vitamin D Analog, on Bone Formation in an Orthopedically Expanded Suture in Rats. A Histomorphometric Study, *European journal of dentistry*, 3(3), pp. 165–72.
- Uysal, T. Olmez, H., Amasyali, M., Karslioglu, Y., Yoldas, A., Gunhan, O. 2010. Response of the expanded inter-premaxillary suture to intermittent compression. *Early bone changes, Australian ortodontic journal*, 26(1), pp. 49–55.
- Venkatesh D, Kumar K and Alur J.B. 2017. Gingival mesenchymal stem cells, *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 21(1), pp. 30–35. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP.
- Widschwendter, M., Burnell, M., Fraser, L., Rosenthal, A.N., Philpott, S., Reisel, D., Dubeau L., Cline, M., Pan, Y., Yi, P.C., Gareth Evans, D., Jacobs, I.J., Menon, U., Wood, C.E., Dougall, W.C. 2015. Osteoprotegerin (OPG), The Endogenous Inhibitor of Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL), is Dysregulated in BRCA Mutation Carriers“, *EBioMedicine*, 2(10), pp. 1331–1339. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.08.037.

- Xie, Q. Wang, Z., Zhou, H., Yu, Z., Huang, Y., Sun, H., Bi, X., Wang, Y., Shi, W., Gu, P., Fan, X. 2016. The role of miR-135-modified adipose-derived mesenchymal stem cells in bone regeneration, *Biomaterials*, 75, pp. 279–294. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.042.
- Xu, S. Cecilia Santini, G., De Veirman, K., Vande Broek, I., Leleu, X., De Becker, A., Van Camp, B., Vanderkerken, K., Van Riet, I. 2013. Upregulation of miR-135b is involved in the impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients”, *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0079752.
- Yang, S., En, L., Yanwei, G., Mingguo, W. 2015. Platelet-rich fibrin promotes osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. Volume 44, Supplement 1, October 2015, Page e310. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2015.08.393>.



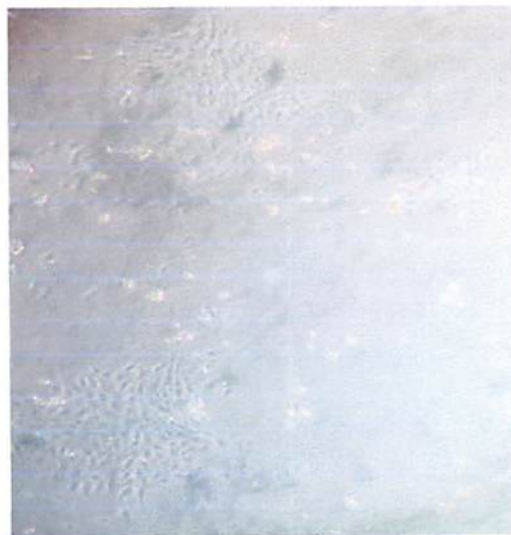


**LAMPIRAN**

**DOKUMENTASI PENELITIAN TESIS**



30 Oktober 2017. Isolasi dan Kultur Gingival Mesenchymal Stem Cells



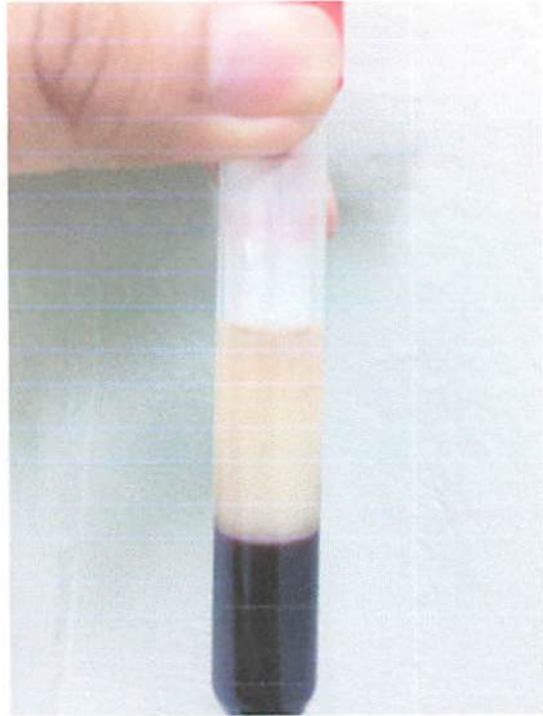
4 Januari 2018 – 08 Januari 2018 Thawing GMSCs dan Passage 3



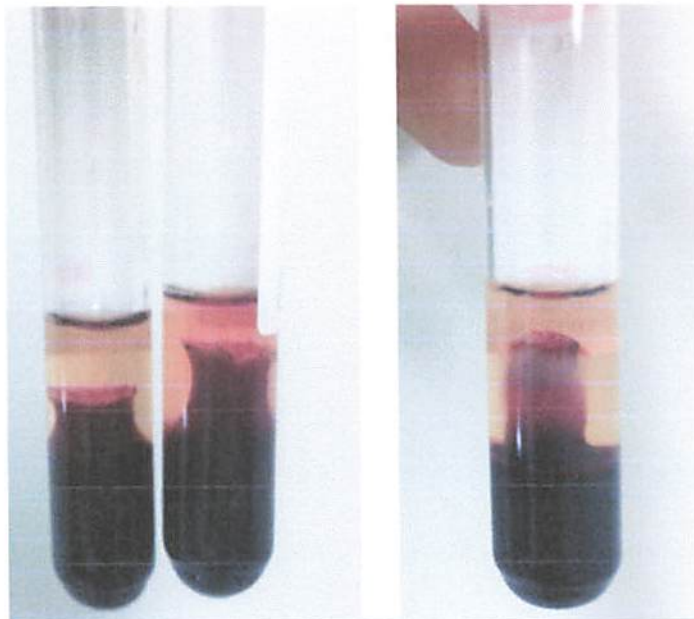
22 Januari 2018 *Gingival Mesenchymal Stem Cells Passage 4*



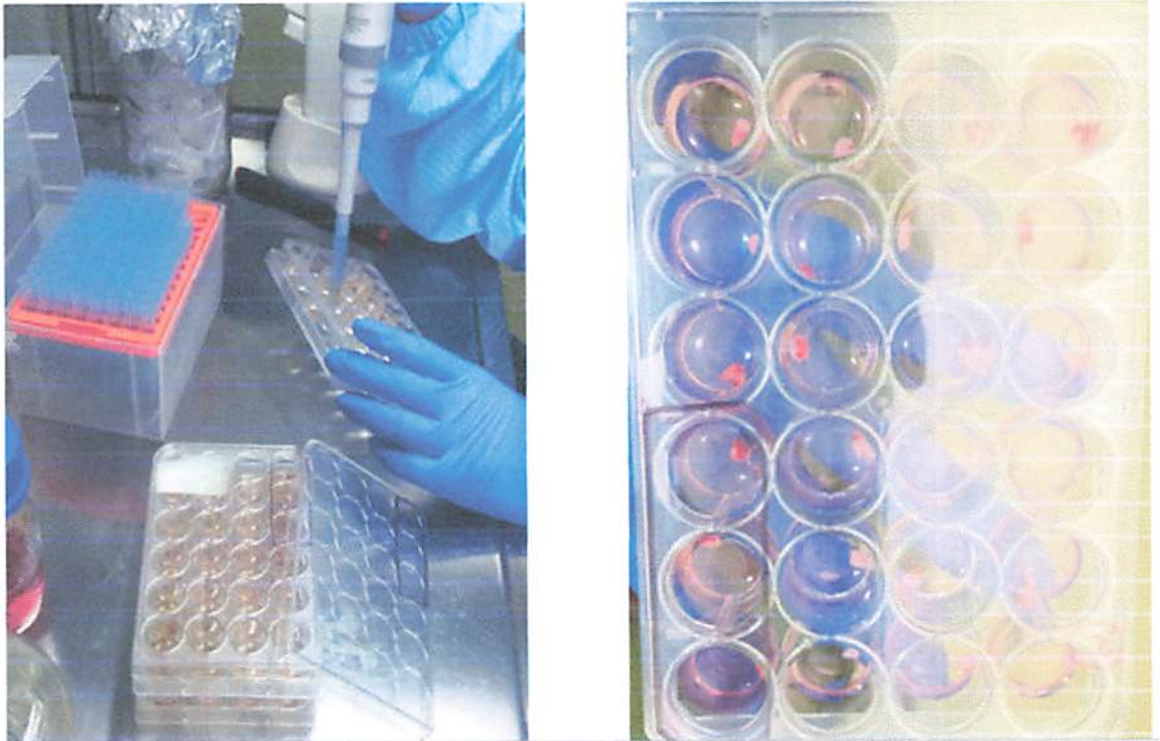
23 Januari 2018 *Isolasi Plasma Rich Fibrin dari Tikus Wistar (Rattus Novergicus)*



23 Januari 2018 Sentrifugasi Isolat *Plasma Rich Fibrin* dari Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*) yang berhasil.



23 Januari 2018 Hasil Sentrifugasi Isolat *Plasma Rich Fibrin* dari Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*) yang gagal.



Tanam GMSC+PRF+medium osteogenik 24 Januari 2018, Pemeriksaan ICC

GMSC+PRF+medium osteogenik Hari ke 7,14,21.



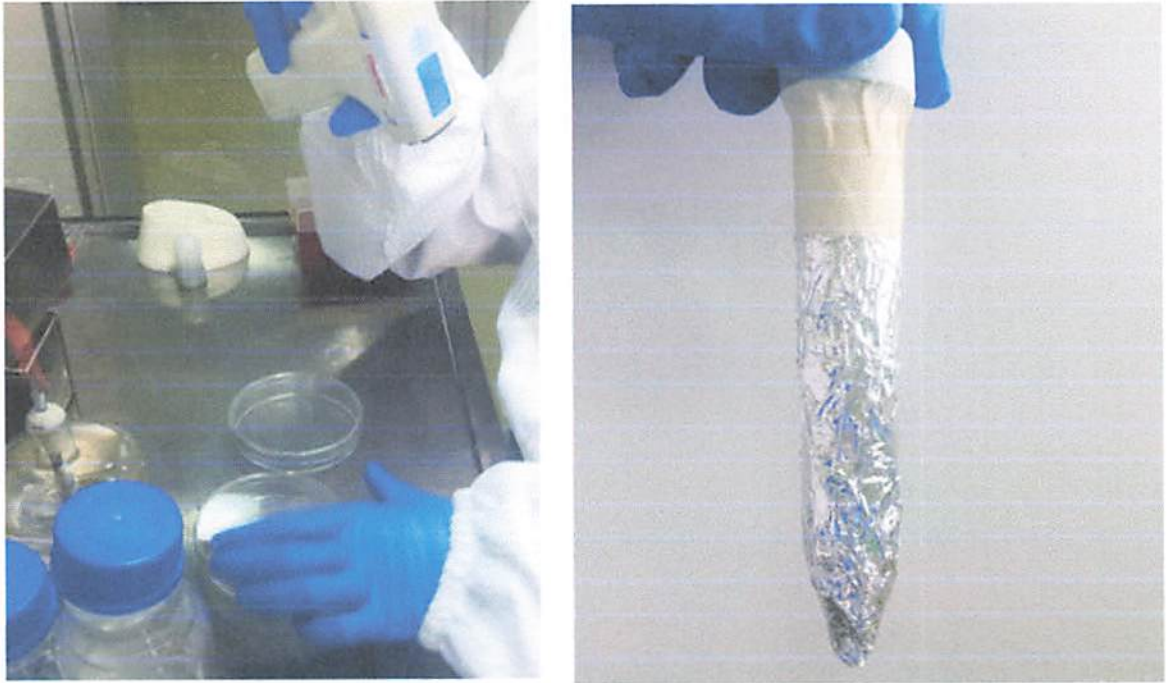
Panen kelompok perlakuan 31 Januari 2018.



Panen kelompok kontrol 5 Februari 2018



Karakterisasi MSCs dengan Immunocytochemistry 30 Januari 2018 dan 1 Februari 2018



Pemeriksaan *Flowcytometry* 1 Februari 2018

## Bone alkaline phosphatase and osteocalcin expression of rat's Gingival mesenchymal stem cells cultured in platelet-rich fibrin for bone remodeling (*in vitro* study)

Alexander Patera Nugraha<sup>1,2,3</sup>, Ida Bagus Narmada<sup>1</sup>, Diah Savitri Ernawati<sup>4</sup>, Aristika Dinaryanti<sup>3</sup>, Eryk Hendrianto<sup>3</sup>, Wibi Riawan<sup>5</sup>, Fedik Abdul Rantam<sup>3,6</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthodontic, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia, <sup>2</sup>Doctoral Student of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia, <sup>3</sup>Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia, <sup>4</sup>Department of Oral Medicine Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia, <sup>5</sup>Department of Biochemistry and Molecular, Biochemistry Biomolecular Laboratory, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Surabaya, Indonesia, <sup>6</sup>Department of Microbiology, Virology and Immunology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Correspondence: Dr. Fedik Abdul Rantam  
Email: fedik.ar@fkh.unair.ac.id

### ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to analyze the osteogenic differentiation of rat GMSCs cultured in PRF for bone remodeling. **Materials and Methods:** GMSCs were isolated from the lower gingival tissue of four healthy, 250 g, 1-month old, male rats (*Rattus norvegicus*) cut into small fragments, cultured for 2 weeks, and subsequently passaged every 4–5 days. GMSCs isolated in passage 3 were characterized by CD34, CD45, CD44, CD73, CD90, and CD105 using fluorescein isothiocyanate immunocytochemistry (ICC) examination. GMSCs in passage 3–5 cultured in five M24 plates (N = 108; n = 6/group) for 7, 14, and 21 days with three different mediums as follows: Control (-) group:  $\alpha$ -Modified Eagle Medium; Control (+) group: High-dose glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-HIG) + osteogenic medium; and treatment group: DMEM-HIG + osteogenic medium + PRF. GMSCs were osteogenic differentiation cultured *in vitro* in three different mediums by bone alkaline phosphatase (BALP) and osteocalcin (OSC) marker using ICC monoclonal antibody. **Statistical Analysis Used:** The one-way analysis of variance was performed ( $P < 0.05$ ) based on Shapiro-Wilk and Levene's tests ( $P > 0.05$ ). **Results:** GMSCs were shown to present + CD44, + CD73, + CD90, + CD105 and - CD34, - and CD45 expression as MSC's markers. The treatment group showed the highest BALP expression ( $16.00 \pm 1.732$ ) on day 7, while OSC expression ( $13.67 \pm 2.309$ ) on day 21 showed

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

Access this article online	
Quick Response Code: 	Web site: <a href="http://www.eurjdent.com">www.eurjdent.com</a>

For reprints contact: [reprints@medknow.com](mailto:reprints@medknow.com)

**How to cite this article:** Nugraha AP, Narmada IB, Ernawati DS, Dinaryanti A, Hendrianto E, Riawan W, et al. Bone alkaline phosphatase and osteocalcin expression of rat's Gingival mesenchymal stem cells cultured in platelet rich fibrin for bone remodeling (*in vitro* study). Eur J Dent 2018; 12:566-73

DOI: 10.4103/ejod.ejd\_251\_18



## RESEARCH ARTICLE

# Osteogenic potential of gingival stromal progenitor cells cultured in platelet rich fibrin is predicted by core-binding factor subunit- $\alpha$ 1/Sox9 expression ratio (*in vitro*) [version 1; referees: 1 approved, 2 approved with reservations]

Alexander Patera Nugraha <sup>1,3</sup>, Ida Bagus Narmada<sup>2</sup>, Diah Savitri Ernawati<sup>4</sup>,  
Aristika Dinaryanti<sup>3</sup>, Eryk Hendrianto<sup>3</sup>, Igo Syaiful Ihsan<sup>3</sup>, Wibi Riawan<sup>5</sup>,  
Fedik Abdul Rantam <sup>3,6</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Immunology, Postgraduate School, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132, Indonesia

<sup>2</sup>Orthodontic Department, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132, Indonesia

<sup>3</sup>Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132, Indonesia

<sup>4</sup>Oral Medicine Department, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132, Indonesia

<sup>5</sup>Biochemistry Biomolecular Laboratory, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya, Malang, 65145, Indonesia

<sup>6</sup>Virology and Immunology Laboratory, Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, 60132, Indonesia

**v1** First published: 25 Jul 2018, 7:1134 (doi: [10.12688/f1000research.15423.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.15423.1))  
Latest published: 25 Jul 2018, 7:1134 (doi: [10.12688/f1000research.15423.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.15423.1))

## Abstract

**Background:** Alveolar bone defect regeneration has long been problematic in the field of dentistry. Gingival stromal progenitor cells (GSPCs) offer a promising solution for alveolar bone regeneration. In order to optimally differentiate and proliferate progenitor cells, growth factors (GFs) are required. Platelet rich fibrin (PRF) has many GFs and can be easily manufactured. Core-binding factor subunit- $\alpha$ 1 (CBF- $\alpha$ 1) constitutes a well-known osteogenic differentiation transcription factor in SPCs. Sox9, as a chondrogenic transcription factor, interacts and inhibits CBF- $\alpha$ 1, but its precise role in direct *in vitro* osteogenesis remains unknown. GSPCs cultured *in vitro* in PRF to optimally stimulate osteogenic differentiation has been largely overlooked. The aim of this study was to analyze GSPCs cultured in PRF osteogenic differentiation predicted by CBF- $\alpha$ 1/Sox9.

**Methods:** This study used a true experimental with post-test only control group design and random sampling. GPSCs isolated from the lower gingiva of four healthy, 250-gram, 1-month old, male Wistar rats (*Rattus Norvegicus*) were cultured for two weeks, passaged every 4-5 days. GPSCs in passage 3-5 were cultured in five M24 plates (N=108, n=6/group) for Day 7, Day 14, and Day 21 in three different mediums (control negative group:  $\alpha$ Modified Eagle Medium, control positive group: High Glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-HG) + osteogenic medium, Treatment group: DMEM-HG + osteogenic medium + PRF). CBF- $\alpha$ 1 and Sox9 were examined with ICC monoclonal antibody. A one-way ANOVA continued with Tukey HSD test ( $p < 0.05$ ) based on Kolmogorov-Smirnov and Levene's tests ( $p > 0.05$ ) was performed.

**Results:** The treatment group showed the highest CBF- $\alpha$ 1/Sox9 ratio (16.00 $\pm$ 3.00/14.33 $\pm$ 2.517) on Day 7, while the lowest CBF- $\alpha$ 1/Sox9 ratio

## Open Peer Review

Referee Status:

	Invited Referees		
	1	2	3
version 1			
published 25 Jul 2018	report	report	report

- Guang Hong, Tohoku University, Japan
- Ananto Ali Alhasyimi , Godjah Mada University (UGM), Indonesia
- Berry M. Soegiharto , University of Indonesia, Indonesia

## Discuss this article

Comments (0)



**Gingival Mesenchymal Stem Cells from Wistar Rat's Gingiva (*Rattus Novergicus*) – Isolation and Characterization (In Vitro Study)**

Alexander Patena Nugraha<sup>1,2</sup>, Ida Bagus Naimada<sup>2</sup>, Diah Savitri Ernawati<sup>3</sup>, Agung Dwi Wahyu Widodo<sup>4</sup>,  
Pudji Lestari<sup>5</sup>, Anshika Dirzanjanti<sup>6</sup>, Eryk Hendrianto<sup>6</sup>, Igo Syaiful Ihsan<sup>6</sup>, Helen Susilowati<sup>6</sup>,  
Nora Entarti<sup>6</sup>, Deya Kartiani<sup>6</sup>, Fedik Abdul Rantam<sup>6,7\*</sup>

1 Doctoral Student of Medical Science, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

2 Orthodontics Department, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

3 Oral Medicine Department, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia

4 Clinical Microbiology Department, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

5 Public Health Department, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

6 Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia

7 Virology and Immunology Laboratory, Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga

**Abstract**

Gingiva is emerging as a source of Mesenchymal Stem Cells. Gingival Mesenchymal Stem Cell has been isolated and characterized from the gingival connective tissue of wistar rat (*Rattus Novergicus*). Gingival Mesenchymal Stem Cell sources are rich, attainable and easy to isolate through minimal invasive procedure. Gingival Mesenchymal Stem Cells are ideal to accelerate bone regeneration. The aim of this study was to analyze Gingival Mesenchymal Stem Cells from Wistar Rats' gingiva (*Rattus Novergicus*) isolation and characterization by CD34, CD44, CD73, CD90, CD105 expression.

This study was descriptive observational with simple random sampling method. Gingival Mesenchymal Stem Cells were isolated from healthy, 200 gram, 1 month year old, male rat's (*Rattus Novergicus*) lower gingival tissue through gingivectomy procedure (n=4). Gingiva were minced into small fragments then cultured in 2 weeks. The culture was passaged every 3-5 days after cultured and plated. The isolated Gingival Mesenchymal Stem Cells in passage 5 were characterized by CD34, CD44, CD73, CD90, CD105 using Immunocytochemistry and flowcytometry examination.

Gingival Mesenchymal Stem Cells strongly expressed CD44+, CD73+, CD90+, CD105+ but did not express CD45- and CD34-. Gingival Mesenchymal Stem Cells' morphology was fibroblast-like, spindle-shaped, colony-forming abilities, and stick to the culture plate.

Gingiva is potential Stem Cell source. Gingival Mesenchymal Stem Cells has multipotency ability with proliferation and mesenchymal stem cells characteristic advantageous for tissue engineering and regenerative therapy.

**Clinical article (J Int Dent Med Res 2018; 11(2): pp. 694-699)**

**Keywords:** Gingival Mesenchymal Stem Cells, Immunophenotyping, Isolation and Characterization, Cluster of Differentiation, Periodontal Tissue.

**Received date:** 23 February 2018

**Accept date:** 04 April 2018

**Introduction**

The regenerative medicine and tissue engineering using mesenchymal stem cell have emerged in medicine nowadays.<sup>1</sup> Recently, many clinician have been interested to overcome the

limitation in existing medical practice procedure by using mesenchymal stem cell.<sup>2</sup> Cells, biomaterials and biochemical factors were three fundamental factor of Tissue engineering. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) have considerable regeneration ability that capable in tissue engineering.<sup>3</sup> The MSCs are multipotent stromal cells which have osteogenic, chondrogenic, and adipogenic ability.<sup>4</sup> MSC regarded as readily available regenerative cells that able mobilizing to the certain signal of various cell response in the body.<sup>5</sup> The MSCs have high proliferative growth capacity. The MSCs hold abundant favorable therapy for tissue

\*Corresponding author:

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, DVM,  
Stem Cell and Tissue Engineering Development Centre,  
Universitas Airlangga, J. Mulya 4/1,  
Surabaya, Indonesia.  
E-mail: fedik44@kh.unesa.ac.id

## Bukti Accepted Jurnal Internasional Scopus

### Review Comments

#### Editorial Comments

##### 09-Oct-2018 :: Report on 1st Manuscript Submitted to Trop J Pharm Res

Prof FA Rantam  
Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia. 60132. Virology and Immunology Laboratory, Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga. 60132.  
Surabaya, Indonesia

Dear Prof Rantam

**Re: Invitro Bone Sialoprotein-I Expression in Combined Gingival Stromal Progenitor Stem Cell and Plasma Rich Fibrin during osteogenic differentiation.**

Please download the review documents (by clicking on 'Reviewed manuscript' and 'Manuscript revision instructions') in respect of your manuscript for your necessary action. You are kindly required to revise your manuscript as indicated, and send the revised manuscript to [editor@tjpr.org](mailto:editor@tjpr.org). Do NOT return via the online submission system.

Thank you for your interest in TJPR, and God bless!

Editor-in-Chief ([editor@tjpr.org](mailto:editor@tjpr.org))

##### 04-Sep-2018 :: Report on 1st Manuscript Submitted to Trop J Pharm Res

Prof FA Rantam  
Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga, Surabaya – Indonesia. 60132. Virology and Immunology Laboratory, Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga. 60132.  
Surabaya, Indonesia

Dear Prof Rantam

**Re: Invitro Bone Sialoprotein-I Expression in Combined Gingival Stromal Progenitor Stem Cell and Plasma Rich Fibrin during osteogenic differentiation.**

My apologies for the delay in the review process.

Your manuscript sent to Tropical Journal of Pharmaceutical Research (TJPR) has been duly reviewed and recommended for publication subject to your satisfactorily addressing some issues raised by the reviewers. However, before details are forwarded to enable you to revise your manuscript accordingly, please pay the publication charge of US\$500.00 (fast track) which you earlier committed yourself to pay if your manuscript is accepted for publication. Details of the various modes of payment can be found after login into your account and clicking on the link, '**Ancillary file**' or 'Payment information'.

*If you choose to use the bank payment option, ensure that you pay separately your local bank charges (including your bank's own correspondence bank charges, if any) to avoid any shortfall in the amount received by us. Note that we will not waive any shortfall, however small it is. Whichever payment mode you use, please send the scanned transaction receipt to me as an email attachment. Without actual receipt of this payment, we cannot convey the review comments, issue you a final acceptance letter and proceed to actual publication of the paper.*

Thank you for your interest in TJPR, and God bless!

Editor-in-Chief ([editor@tjpr.org](mailto:editor@tjpr.org))

**Bukti Submit Jurnal Internasional Scopus**

## KAFKAS ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University

ISSN (p) 1300 - 6045  
ISSN (e) 1309 - 2251

Dear MD. Alexander Nugraha,

Thank you for submitting your manuscript entitled "The Aggrecan Expression after Platelet Rich Fibrin addition in Gingival Medicinal Signaling Cells of Rat's (*Rattus Novergicus*) during early osteogenic differentiation (in vitro)" to The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas.

Your manuscript will first be evaluated by the editors and if it meets the Journal's standards, will be forwarded to referees for scientific review. You will be able to learn the stage of your manuscript in the review process through the author center to which you will have access with your user name and password. You can use the author center for revisions and new submissions.

<http://submit.vetdergikafkas.org>

Username: alexandersandro

Sincerely,

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

[info@vetdergikafkas.org](mailto:info@vetdergikafkas.org)



## THE INDIAN VETERINARY JOURNAL

(The Official Organ of the Indian Veterinary Association)

Dr. S. SUKUMAR  
MANAGING EDITOR

No.11, Chammers Road, Nandanam  
Chennai – 600 035, India.

Dated : November 12, 2018

### ACCEPTANCE LETTER

The following article has been accepted and will be published in **APRIL, 2019** issue of Indian Veterinary Journal.

Article No.	Title	Author (s)
342/18	Somatic Cells Acceleration by Platelet Rich Fibrin	Alexander Patera Nugraha, Ida Bagus Narmada, Diah Gavri Ernawati, Aristka Dinaryanti, Helén Susilowati, Eryk Hendrianto, Igo Syariful Ihsan, Wibi Riawan, Fedik Abdul Rantam

sd/-

Managing Editor,  
Indian Veterinary Journal

To,

Dr. Fedik Abdul Rantam.,  
Stem Cell Research and Development Center,  
Universitas Airlangga,  
Surabaya – Indonesia, 60132  
Email : fedik-a-r@fkh.unair.ac.id

THIS IS A COMPUTER GENERATED APPROVED ACCEPTANCE LETTER AND REQUIRES NO SIGNATURE

Sertifikat Presentasi Hasil dan Prestasi Internasional



IADR-SEA Vietnam Da Nang, 2018

Sertifikat Presentasi Hasil dan Prestasi Internasional



Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry, Hiroshima University, 2018