

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



**TERAPI XEROSTOMIA AKIBAT RADIASI DENGAN MENGGUNAKAN
*BONEMARROW MESENCHYMAL STEM CELL (BMSCs)***

Tahun ke-2 dari rencana 2 tahun

Dr. Sri Wigati Mardi Mulyani, drg., M.Kes. NIDN 0001016613
Dr.Eha Renwi Astuti, drg., Mkes., SpRKG NIDN 0013056102
Otty Ratna Wahyuni, drg., M.Kes NIDN. 0023105905

Dibiayai Oleh ;
Direktorat Riset Dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jendral Penguatan Riset Dan Pengembangan
Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi
Sesuai Dengan Perjanjian Pendanaan Penelitian Dan Pengabdian
Kepada Masyarakat
Nomor ; 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)



KKA
kk
CP. 42/19
Mul
t

**TERAPI XEROSTOMIA AKIBAT RADIASI DENGAN MENGGUNAKAN
BONEMARROW MESENCHYMAL STEM CELL (BMSCs)**

Tahun ke-2 dari rencana 2 tahun

Dr. Sri Wigati Mardi Mulyani, drg., M.Kes. NIDN 0001016613
Dr. Eha Renwi Astuti, drg., Mkes., SpRKG NIDN 0013056102
Otty Ratna Wahyuni, drg., M.Kes NIDN. 0023105905

Dibiayai Oleh ;
Direktorat Riset Dan Pengabdian Masyarakat
Direktorat Jendral Penguatan Riset Dan Pengembangan
Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi
Sesuai Dengan Perjanjian Pendanaan Penelitian Dan Pengabdian
Kepada Masyarakat
Nomor ; 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018

UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : TERAPI XEROSTOMIA AKIBAT RADIASI DENGAN
MENGUNAKAN BONE MARROW
MESENCHYMAL STEM CELLS (BMSCs)

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr SRI WIGATI MARDI MULYANI, S.KG, S.KG,
M.Kes

Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0001016613
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Kedokteran Gigi
Nomor HP : 0877 7553 7373
Alamat surel (e-mail) : sri-w-m-m@fkg.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr EHA RENWI ASTUTI S.KG, M.Kes
NIDN : 0013056102
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : OTTY RATNA WAHYUNI M.Kes, S.KG
NIDN : 0023105905
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

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



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

Kota Surabaya, 13 - 11 - 2018
Ketua,

(Dr SRI WIGATI MARDI MULYANI, S.KG,
S.KG, M.Kes)
NIP/NIK 196601011991032003

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi

(Prof Drs Hery Pumobasuki, Msi., Ph.D.)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) telah banyak menarik perhatian para klinisi karena aplikasi potensialnya dalam terapi berbasis sel. MSCs dapat ditemukan hampir pada semua jaringan tubuh dan merupakan sumber sel utama untuk memperbaiki dan meregenerasi jaringan yang rusak termasuk xerostomia akibat defek kelenjar saliva yang disebabkan paparan radiasi ionisasi. Efikasi dan potensi terpiutik MSCs tergantung pada beberapa hal antara lain kondisi peradangan pada daerah injuri pada saat akan ditransplantasikan. Ketika kerusakan jaringan terjadi, MSCs baik di daerah sekitar atau yang berasal dari sumsum tulang dimobilisasi dan bermigrasi ke jaringan yang rusak. Pada umumnya kerusakan jaringan akan disertai dengan pelepasan faktor proinflamasi. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ada interaksi dua arah antara MSCs dan sel inflamasi, yang menentukan hasil proses perbaikan jaringan yang dimediasi oleh MSCs. Mekanisme perbaikan jaringan yang dimediasi MSC sangat kompleks, namun faktor tropik yang dilepaskan MSC seperti fibroblas growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), stromal derived factor-1 (SDF-1), CXCR4 dan lain-lain mempunyai peran yang penting yaitu meregulasi homing, retensi dalam microenvironment dan memberikan signal untuk cell growth dan diferensiasi.

Pada keadaan akut pada umumnya kerusakan jaringan diikuti oleh inflamasi, diduga bahwa faktor inflamasi yang dihasilkan selama immune respon bertindak untuk mengaktifkan kapasitas immunosupresif MSCs. Sebaliknya, beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa MSCs tidak dapat bertahan hidup pada saat ditransplantasikan atau tidak dapat menekan Graft vs Host Disease (GvHD), meskipun secara *in vitro* dapat menekan proliferasi limfosit sampai batas tertentu. Oleh karena itu, status peradangan pada kondisi akut ataupun kronis pada lingkungan mikro tertentu yang terkait dengan kerusakan jaringan mungkin perlu dipertimbangkan saat dilakukan transplantasi MSCs.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mencari waktu pemberian transplantasi MSCs yang tepat sehingga dapat meningkatkan efikasi dan potensi terapi dari MSCs ini sehingga diharapkan dapat terjadi proses regenerasi jaringan yang lebih optimal. Penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *post test only control group design*. BM-MSCs diisolasi dari femur tikus jantan Wistar dengan umur 3-4 bulan dan berat 200 gram, kemudian dikultur dalam kondisi normoksia (O₂ 21%) dan kondisi hipoksia dengan menggunakan hypoxia chamber yang mengandung N₂ 95%, CO₂ 5% dan O₂ 1% selama 48 jam. Sebanyak 30 ekor tikus Wistar jantan dibagi dalam 6 kelompok yaitu 2 kelompok Kontrol (kontrol normal dan kontrol defek) serta 4 kelompok perlakuan. Seluruh sampel kecuali kontrol normal dibuat defek pada kelenjar salivanya dengan cara memberi paparan radiasi sebesar 15 Gy pada daerah ventral leher tikus.

Pada kelompok perlakuan kemudian diberi transplantasi BM-MSCs pada 4 minggu setelah radiasi dan kemudian dibandingkan dengan pemberrian BM-MSCs pada 4 minggu setelah radiasi. Pengamatan terhadap sampel dilakukan setelah 30 hari pasca transplantasi terhadap proses regenerasi kelenjar saliva melalui ekspresi sejumlah chemokines dan protein yaitu SDF1-CXCR4, Bcl2 pada jaringan kelenjar saliva yang defek dengan metode Imunohistokimia dan pemeriksaan aktivitas enzim α -amilase yang diproduksi sel acinar dengan cara ELISA aktivitas sebagai penanda terjadinya proses regenerasi kelenjar saliva. Data yang terkumpul dianalisis dengan uji statistik MANOVA.

Key word : mesenchymal stem cells, xerostomia, akut, kronis/subakut, CXCR4, Bcl2, enzim α amilase.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

WISATA

Meskipun banyak penelitian yang dilakukan mengenai perubahan pada karies, namun aplikasi metode statistik dalam terapi radiasi masih sangat terbatas. Penelitian mengenai perubahan karies dan perubahan jaringan lunak merupakan aspek yang sangat penting dalam penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia.

Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia.

Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia.

Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia. Penelitian mengenai perubahan karies yang diakibatkan oleh radiasi dilakukan pada hewan uji yang dikawatirkan karena tidak dapat dilakukan pada manusia.

www.meskipun.com
Surabaya

PRAKATA

Puji syukur dipanjatkan kehadirat Allah S.W.T. atas Rahmat-Nya sehingga kami dapat melaksanakan penelitian dengan judul **“Terapi Xerostomia Akibat Radiasi dengan Menggunakan Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells”**. Penelitian ini merupakan aplikasi dari penelitian sebelumnya, besar harapan kami agar penelitian ini dapat digunakan sebagai pijakan untuk penelitian selanjutnya sehingga pada akhirnya dapat digunakan sebagai terapi penderita xerostomia akibat terapi radiasi di daerah kepala dan leher.

Pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih kepada Bapak Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga, Ketua dan Ketua Lab. Stem /Cells Institute Tropical Disease, atas kesempatan serta fasilitas serta pembiayaan yang telah diberikan kepada kami untuk melaksanakan program Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi ini melalui pembiayaan oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat – Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi Tahun 2017 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Kegiatan Penelitian Desentralisasi-Penelitian Terapan Unggulan Perguruan Tinggi Nomor: **01/E/KPT/2018** dengan perjanjian kontrak Nomor **200/UN3.14/LT/2018**

Semoga Allah S.W.T melimpahkan karunia dan Rahmat-Nya kepada semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini. Dan dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang stem cells.

Surabaya, November 2018

KATA PENGANTAR

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi xerostomia akibat radiasi pada pasien kanker kepala leher. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi xerostomia akibat radiasi pada pasien kanker kepala leher. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi xerostomia akibat radiasi pada pasien kanker kepala leher. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya. Penelitian ini dilaksanakan di rumah sakit di Surabaya.

Surabaya, November 2018

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	1
LEMBAR PENGESAHAN	2
RINGKASAN.....	3
PRAKATA	4
DAFTAR ISI	5
BAB 1 PENDAHULUAN.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	8
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....	11
BAB 4. METODE PENELITIAN	12
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	18
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	28
DAFTAR PUSTAKA.....	29
LAMPIRAN	33
1. Jurnal Veterinary World yang terindeks Scopus (Q2) Vol 11, July 2018 (published).....	33
2. Hasil penelitian sebagian telah dipresentasikan pada seminar Internasional di Hiroshima Jepang pada bulan Maret 2018 (Proceeding dan sertifikat)	38
3. Hasil penelitian akan dipresentasikan pada seminar Internasional 32nd IADR–SEAA di Nang Dang Vietnam pada bulan September 2018 (Proceeding dan sertifikat)	42
4. Hasil penelitian akan disubmitkan di jurnal Internasional yang terindex Scopus (draft)	45

UNIVERSITAS AIRLANGGA
PERPUSTAKAAN
Jl. M. YUSUF KAHAR, 1
60155 SURABAYA

DAFTAR ISI

1 HALAMAN JUDUL

2 LEMBAR PENGESAHAN

3 KONGRASA

4 PRAKATA

5 DAFTAR ISI

6 BAB I PENDAHULUAN

8 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

11 BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

17 BAB 4 METODE PENELITIAN

18 BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

28 BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

29 DAFTAR PUSTAKA

32 LAMPIRAN

1. Jurnal Veterinary World yang terbitkan Suprius (2017) Vol 11 July 2018
 (published)..... 34

2. Hasil penelitian sebagian telah dipresentasikan pada seminar internasional
 di Hincinina (yang pada bulan April 2018 (Prosiding dan scribble) 36

3. Hasil penelitian akan dipresentasikan pada seminar internasional 2018
 (VIR SIA di Yang Yang Vietnam pada bulan September 2018
 (Prosiding dan scribble) 37

4. Hasil penelitian akan dipublikasikan di jurnal internasional yang terbitkan
 Suprius (2018) 38

BAB 1 PENDAHULUAN



1.1. Latar Belakang

Kelenjar saliva merupakan salah satu organ yang sensitif terhadap radiasi ionisasi. Sebagai akibatnya ketika dilakukan terapi radiasi di daerah kepala dan leher kelenjar saliva seringkali terkena dampaknya, yaitu terjadinya defek kelenjar saliva yang bersifat *irreversible*. Defek kelenjar saliva dapat menyebabkan penurunan produksi kelenjar salivayang sangat hebat yang disebut xerostomia. Xerostomia merupakan salah satu komplikasi *irreversible* yang paling banyak ditemukan dan dikeluhkan pasien dengan terapi radiasidaerah kepala dan leher (Rhodus dan Bereuter, 2000). Radiasi ionisasi menyebabkan kerusakan pada jaringan glandular dan keadaan ini terjadi dengan cepat sehingga terjadi hilangnya sekresi saliva secara *irreversible*. Dosis radiasi 2,25 Gy pada pasien menyebabkan penutrunan sekresi saliva istirahat 50% dalam 24 jam pasca radiasi. Penurunan sekresi saliva mencapai 90% setelah dosis total 40 Gy (Spijkervet, 1996). 91,8% pasien terapi radiasi yang dilakukan oleh Epstein *et al.* (1999) mengeluh adanya kekeringan pada rongga mulut.

Komplikasi ini merupakan keluhan terbesar (58%) dari seluruh penderita yang mendapat terapi radiasi di daerah kepala dan leher, dimana seringkali menimbulkan beberapa keluhan di rongga mulut seperti rasa nyeri, rasa terbakar, sulit mengunyah, gangguan pengecapan dan kerusakan jaringan lunak. Beberapa penelitian menunjukkan penurunan kualitas hidup penderita akibat defek kelenjar saliva setelah terapi radiasi (Feng et al, 2009). Apabila hal ini tidak mendapat perhatian yang serius maka akan berakibat terganggunya fungsi pencernaan sehingga dapat memperburuk kesehatan penderita secara umum. Sampai saat ini kelainan ini belum ditemukan cara pengobatannya meskipun dengan tindakan operatif. Hiposalivasi yang *irreversible* setelah kerusakan yang diinduksi iradiasi terutama disebabkan oleh sterilisasi *stem cell* primitif kelenjar saliva. Pada kelenjar yang mengalami kerusakan parah dan jaringan yang tertinggal tidak dapat diperbaiki, maka diperlukan suatu pendekatan alternatif untuk mengatasinya. Salah satu pendekatan alternatif untuk tujuan ini adalah terapi *stem cell*.

Mesenchymal stem cells (MSCs) atau yang juga dikenal sebagai *mesenchymal stromal cells* merupakan salah satu pilihan yang sering digunakan dalam aplikasi klinis untuk memperbaiki dan meregenerasi jaringan yang rusak.

1.1.1 Latar Belakang

Keluhan saliva merupakan salah satu organ yang sering terdampak radiasi ionisasi. Sebagai akibatnya ketika dilakukan terapi kanker di bagian kepala dan leher keluhan saliva seringkali terdapat keluhan lain seperti mulut kering, kesulitan menelan, kesulitan berbicara. Efek keluhan saliva dapat mempengaruhi kemampuan produksi kelenjar saliva yang sangat besar yang disebut xerostomia. Xerostomia merupakan salah satu komplikasi perawatan yang paling banyak ditemukan dan dibutuhkan perhatian dengan terapi radiasi kepala dan leher (RKH) dan sekitar 2000 kasus kanker yang terdapat di bagian kepala dan leher yang diobati dengan cara radiasi. Perawatan radiasi kepala dan leher pada pasien terdapat keluhan saliva yang dapat mempengaruhi kualitas hidup pasien. Dosis radiasi 5-75 Gy pada pasien terdapat keluhan saliva perantara saliva sekitar 70% setelah dosis total 40 Gy (Spitzer et al, 1990). 91,8% pasien terdapat keluhan yang dikaitkan oleh Epstein et al (1999) merupakan keluhan kelenjar pada rongga mulut.

Komplikasi ini merupakan keluhan terbesar (58%) dan seluruh penderita yang mendapat terapi radiasi di daerah kepala dan leher dimana seringkali menimbulkan keluhan di rongga mulut seperti rasa perih, mulut kering, sulit menyalivasi, gangguan berbicara dan kesulitan menelan. Keluhan kelenjar menimbulkan penurunan kualitas hidup penderita akibat efek keluhan saliva setelah terapi radiasi (Tog et al, 2000). Penderita ini tidak mendapat perhatian yang sesuai maka akan kesulitan menggunakan fungsi perantara saliva dalam mempertahankan kesehatan penderita secara umum. Gejala lain ini keluhan ini belum diteliti secara mendalam, meskipun dengan tindakan operasi. Hipotesis yang dikemukakan oleh beberapa peneliti yang dikemukakan bahwa keluhan ini disebabkan oleh perubahan saliva yang terjadi akibat radiasi yang menimbulkan perubahan pada dan jaringan yang terdapat tidak dapat diperbaiki. Oleh karena itu keluhan ini berkaitan dengan mekanisme untuk meningkatkan saliva dan kesehatan alamiah untuk keluhan ini adalah terapi radiasi.

Saliva yang dihasilkan oleh kelenjar saliva yang rusak yang mengalami xerostomia. Saliva merupakan salah satu bagian yang sering digunakan dalam proses hidup untuk melindungi dan memelihara jaringan yang rusak.

Pada penelitian ini peneliti menggunakan *MSCs* sebagai sumber *stem cells* yang diambil dari *bone marrow* tikus Wistar karena beberapa sifat yang tidak dimiliki oleh *stem cells* lain yaitu kemampuannya untuk bertransdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel diluar jalur diferensiasinya, mudah diisolasi dan dikembangkan secara *in vitro* serta diketahui mempunyai sifat non imunogenik atau *immunosuppressive* sehingga aman digunakan sebagai *allo-transplantation*. Selain itu banyak laporan yang menyatakan bahwa *MSCs* mensekresi berbagai macam faktor yang meningkatkan *tissue repair*, menstimulasi proliferasi dan diferensiasi dari sel progenitor endogenous serta tidak menimbulkan imun respon sehingga sangat berguna untuk transplantasi allogenic dan perbaikan jaringan (Nicole et al, 2008).

Pada penelitian terdahulu telah dilakukan pemeriksaan secara Imunohistokimia mengenai pengaruh prekondisi hipoksia terhadap ekspresi CXCR4 dan SDF-1. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa perlakuan prekondisi hipoksia O₂ 1% dapat meningkatkan secara signifikan ekspresi CXCR4 dan SDF-1 sebagai faktor homing yang berperan penting untuk meningkatkan kemampuan *MSCs* bermigrasi ke daerah defek serta menginduksi endogenous stem cells untuk dapat berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel yang dibutuhkan.

Pada penelitian ini dilakukan transplantasi *MSCs* yang telah dibuat adaptif pada kelenjar saliva tikus yang telah dibuat defek terlebih dahulu dengan paparan dosis radiasi pengion sebesar 15 Gy. Pada umumnya kerusakan jaringan akan disertai dengan pelepasan faktor proinflamasi. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ada interaksi dua arah antara *MSCs* dan sel inflamasi, yang menentukan hasil proses perbaikan jaringan yang dimediasi oleh *MSCs*. Pada keadaan akut, diduga faktor inflamasi yang dihasilkan selama immune respon bertindak untuk mengaktifkan kapasitas immunosupresif *MSCs*. Sebaliknya, beberapa penelitian lain menemukan bahwa *MSCs* tidak dapat memperpanjang kelangsungan hidup graft atau menekan GvHD secara *in vivo*. Oleh karena itu, status peradangan pada lingkungan mikro tertentu yang terkait dengan penyakit spesifik mungkin perlu dipertimbangkan saat mengembangkan strategi terapeutik baru yang melibatkan *MSCs*.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui waktu pemberian transplantasi *MSCs* yang tepat sehingga dapat meningkatkan efikasi dan potensi terapi dari *MSCs* ini sehingga diharapkan dapat terjadi proses regenerasi jaringan yang lebih optimal melalui pemeriksaan ekspresi binding CXCR4-SDF1, Bcl2, ERK dan enzim alpha amilase yang merupakan penanda terjadinya regenerasi sel acinar yang mensekresi saliva. Sehingga ke depannya diharapkan terapi *MSCs* dapat digunakan sebagai harapan baru untuk pengobatan xerostomia akibat terapi radiasi dengan waktu pemberian yang tepat.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi radiasi terhadap kualitas hidup pasien kanker payudara stadium lanjut. Penelitian ini menggunakan desain penelitian kuantitatif dengan metode kuisioner. Sampel penelitian diambil dari pasien kanker payudara stadium lanjut yang menjalani terapi radiasi di rumah sakit di Kota Malang. Instrumen penelitian adalah kuisioner yang terdiri dari kuisioner umum dan kuisioner khusus. Uji coba kuisioner dilakukan terlebih dahulu untuk mengetahui reliabilitas dan validitas kuisioner. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 20.0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi radiasi berpengaruh signifikan terhadap kualitas hidup pasien kanker payudara stadium lanjut. Hal ini dapat dilihat dari nilai p-value yang kurang dari 0,05. Penelitian ini dapat memberikan informasi yang berguna bagi tenaga kesehatan dan peneliti lain yang tertarik dengan topik ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi radiasi terhadap kualitas hidup pasien kanker payudara stadium lanjut. Penelitian ini menggunakan desain penelitian kuantitatif dengan metode kuisioner. Sampel penelitian diambil dari pasien kanker payudara stadium lanjut yang menjalani terapi radiasi di rumah sakit di Kota Malang. Instrumen penelitian adalah kuisioner yang terdiri dari kuisioner umum dan kuisioner khusus. Uji coba kuisioner dilakukan terlebih dahulu untuk mengetahui reliabilitas dan validitas kuisioner. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 20.0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi radiasi berpengaruh signifikan terhadap kualitas hidup pasien kanker payudara stadium lanjut. Hal ini dapat dilihat dari nilai p-value yang kurang dari 0,05. Penelitian ini dapat memberikan informasi yang berguna bagi tenaga kesehatan dan peneliti lain yang tertarik dengan topik ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi radiasi terhadap kualitas hidup pasien kanker payudara stadium lanjut. Penelitian ini menggunakan desain penelitian kuantitatif dengan metode kuisioner. Sampel penelitian diambil dari pasien kanker payudara stadium lanjut yang menjalani terapi radiasi di rumah sakit di Kota Malang. Instrumen penelitian adalah kuisioner yang terdiri dari kuisioner umum dan kuisioner khusus. Uji coba kuisioner dilakukan terlebih dahulu untuk mengetahui reliabilitas dan validitas kuisioner. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 20.0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi radiasi berpengaruh signifikan terhadap kualitas hidup pasien kanker payudara stadium lanjut. Hal ini dapat dilihat dari nilai p-value yang kurang dari 0,05. Penelitian ini dapat memberikan informasi yang berguna bagi tenaga kesehatan dan peneliti lain yang tertarik dengan topik ini.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi radiasi terhadap kualitas hidup pasien kanker payudara stadium lanjut. Penelitian ini menggunakan desain penelitian kuantitatif dengan metode kuisioner. Sampel penelitian diambil dari pasien kanker payudara stadium lanjut yang menjalani terapi radiasi di rumah sakit di Kota Malang. Instrumen penelitian adalah kuisioner yang terdiri dari kuisioner umum dan kuisioner khusus. Uji coba kuisioner dilakukan terlebih dahulu untuk mengetahui reliabilitas dan validitas kuisioner. Analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 20.0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi radiasi berpengaruh signifikan terhadap kualitas hidup pasien kanker payudara stadium lanjut. Hal ini dapat dilihat dari nilai p-value yang kurang dari 0,05. Penelitian ini dapat memberikan informasi yang berguna bagi tenaga kesehatan dan peneliti lain yang tertarik dengan topik ini.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

Kelenjar saliva merupakan salah satu organ tubuh yang sangat sensitive terhadap radiasi ionisasi. Sebagai akibatnya pada saat dilakukan terapi radiasi di daerah kepala dan leher, kelenjar saliva seringkali terkena dampaknya yaitu menyebabkan defek kelenjar saliva yang bersifat *irreversible* yaitu ditandai dengan penurunan sekresi saliva yang sangat hebat, keadaan ini disebut dengan xerostomia (Baum et al, 2009).

Radiasi ionisasi menyebabkan kerusakan pada jaringan glandular dan keadaan ini terjadi dengan cepat sehingga terjadi hilangnya sekresi saliva secara *irreversible*. Dosis radiasi 2,25 Gy pada pasien menyebabkan penurunan sekresi saliva istirahat 50% dalam 24 jam pasca radiasi. Penurunan sekresi saliva mencapai 90% setelah dosis total 40 Gy (Spijkervet, 1996). 91,8% pasien terapi radiasi yang dilakukan oleh Epstein *et al.* (1999) mengeluh adanya kekeringan pada rongga mulut. Hasil studi retrospektif yang dilakukan oleh August *et al.* (1996) menunjukkan adanya xerostomia pada pasien dengan terapi radiasi. Produksi saliva menurun antara 36,67% sampai 47,9% pada satu minggu paska radiasi, kemudian menetap pada kadar tersebut untuk minggu selanjutnya (Epstein *et al.*, 1998). Eisburch *et al.* (1999) menyatakan bahwa terdapat ambang dosis radiasi yang bila terlampaui maka kelenjar saliva akan sangat sedikit bahkan tidak memproduksi saliva. Perubahan fungsi yang terjadi pada kelenjar saliva akibat radiasi dengan dosis tunggal lebih dari 7,5 Gy pada daerah kepala dan leher tikus akan menyebabkan hiposalivasi (Nagler *et al.*, 1998).

Pada kelenjar yang mengalami kerusakan parah dan jaringan yang tertinggal tidak dapat diperbaiki, maka diperlukan suatu pendekatan alternatif. Salah satu pendekatan alternatif yang paling menarik untuk tujuan ini adalah terapi stem cell, dengan menggunakan beberapa stem cell, growth factor dan beberapa faktor transkripsi sebagai signal untuk meregenerasi jaringan.

Transplantasi *stem cell* merupakan salah satu terapi pilihan yang diharapkan mampu untuk mengembalikan fungsi dari kelenjar saliva yang defek akibat radiasi dengan cara meregenerasi sel acinar sehingga dapat memproduksi saliva kembali. Keberhasilan terapi *stemcells* selain dibutuhkan bahan *stem cells* yang adaptif, kondisi *microenvironment* yang kondusif, juga pada saat ditransplantasikan *stem cells* harus melekat kuat dan berintegrasi dengan *niche*-nya.

STRES
TITIK TITIK TITIK

kegiatan sehari-hari yang menimbulkan stres yang signifikan terhadap
kehidupan sehari-hari. Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk mengurangi
dampak negatif dari stres tersebut. Salah satu cara untuk mengurangi
dampak negatif dari stres adalah dengan melakukan kegiatan yang dapat
mengurangi stres.

Salah satu cara untuk mengurangi stres adalah dengan melakukan
kegiatan yang dapat mengurangi stres. Salah satu cara untuk
mengurangi stres adalah dengan melakukan kegiatan yang dapat
mengurangi stres. Salah satu cara untuk mengurangi stres adalah
dengan melakukan kegiatan yang dapat mengurangi stres. Salah satu
cara untuk mengurangi stres adalah dengan melakukan kegiatan yang
dapat mengurangi stres. Salah satu cara untuk mengurangi stres
adalah dengan melakukan kegiatan yang dapat mengurangi stres.

Salah satu cara untuk mengurangi stres adalah dengan melakukan
kegiatan yang dapat mengurangi stres. Salah satu cara untuk
mengurangi stres adalah dengan melakukan kegiatan yang dapat
mengurangi stres. Salah satu cara untuk mengurangi stres adalah
dengan melakukan kegiatan yang dapat mengurangi stres. Salah satu
cara untuk mengurangi stres adalah dengan melakukan kegiatan yang
dapat mengurangi stres. Salah satu cara untuk mengurangi stres
adalah dengan melakukan kegiatan yang dapat mengurangi stres.

Salah satu cara untuk mengurangi stres adalah dengan melakukan
kegiatan yang dapat mengurangi stres. Salah satu cara untuk
mengurangi stres adalah dengan melakukan kegiatan yang dapat
mengurangi stres. Salah satu cara untuk mengurangi stres adalah
dengan melakukan kegiatan yang dapat mengurangi stres. Salah satu
cara untuk mengurangi stres adalah dengan melakukan kegiatan yang
dapat mengurangi stres. Salah satu cara untuk mengurangi stres
adalah dengan melakukan kegiatan yang dapat mengurangi stres.

Stem cell niche dibutuhkan untuk meningkatkan dan mempertahankan viabilitas *stem cell* yang ditransplantasikan pada daerah defek sehingga memiliki lingkungan *microenvironment* yang sama seperti kondisi mikrofisiologis sel asal dan dapat mendukung *stem cells* dapat berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi seperti sel asalnya. Disamping itu terdapat permasalahan yang tetap ada hingga sekarang ini dalam terapi berbasis sel (*cell-based therapies*) yaitu proses *delivery cell* atau migrasi sel ke daerah injuri atau yang biasa disebut *homing*. MSCs diketahui mempunyai kemampuan untuk bermigrasi ke daerah defek, akan tetapi mekanisme yang mendasar proses migrasi tersebut masih belum jelas.

Mesenchymal stem cell merupakan stem cell dewasa yang akhir-akhir sering digunakan dalam stem cell terapi. MSCs dikenal mempunyai sifat multipoten yaitu mempunyai kemampuan untuk dapat bertransdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel yaitu sel mesoderm, ectoderm dan endoderm selain berdiferensiasi mengikuti jalur diferensiasinya termasuk jaringan tulang, kartilago dan jaringan adipose (Kean et al, 2013). Selain itu MSCs diketahui dapat menghasilkan sejumlah *cytokines*, *chemokines* serta *Growth Factors* yang berperan penting untuk meregenerasi jaringan dengan menginduksi aktifitas *endogenous stem cells* (Sohni and Verfaillie, 2013).

Potensi terapiutik MSCs juga tergantung pada kemampuannya untuk menghasilkan sejumlah *juxtacrine/paracrine factors* dimana efek dari *juxtacrine factor* ini menyebabkan MSCs dapat bermigrasi ke daerah defek atau yang dikenal sebagai *homing factor*. Salah satu kemokin yang berperan sebagai *homing factor* adalah reseptor-ligand CXCR4-SDF-1.

Stromal-Derived Factor-1 α (SDF-1 α) atau CXCL12 merupakan molekul kecil dengan bentuk gabungan dan berasal dari famili kemokin CXC. *N-terminus* molekul ini berfungsi dalam ikatan dan aktivasi reseptor kemokin. Reseptor SDF-1 α yang paling banyak diteliti adalah CXCR4 molekul dengan 352 asam amino. Jika teraktivasi reseptor ini akan melakukan transduksi berbagai sinyal yang dapat mengatur beberapa fungsi biologis seperti kemotaksis, proliferasi, apoptosis, ketahanan (*viability*), dan diferensiasi sel. Salah satu fungsi utama SDF-1 α /CXCR4 adalah regulasi *trafficking* dari sel progenitor (PGC) saat fase perkembangan embrionik, kemotaksis sel, dan *postnatal homing* pada daerah yang cedera. Hingga saat ini, para peneliti masih berupaya menemukan metode dan jalur administrasi stem cell ke dalam tubuh yang paling optimal. Metode pertama yang bisa digunakan adalah mentransplantasikan stem cell tersebut secara langsung ke dalam jaringan yang rusak, metode ke dua adalah mentransplantasikan stem cell melalui pembuluh darah. Mengingat kemudahan aplikasinya dibanding metode yang pertama, maka metode yang kedua inilah yang banyak digunakan dan diuji efektivitasnya.

Hal itu membutuhkan suatu konsep optimalisasi distribusi stem cell ke jaringan yang rusak, yang dikenal sebagai konsep *Homing*. Sejumlah kemokin diduga mempunyai peran penting didalam proses homing, salah satu diantaranya adalah SDF-1 beserta reseptornya CXCR4.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan pemeriksaan sejumlah ekspresi dari *chemokines* yaitu CXCR4 dan CXCL12 (SDF1) pada kultur *BMSCs* dan saat ditransplantasikan. Secara fungsional permukaan *BMSCs* yang mengekspresikan chemokines reseptor mempunyai peran penting dalam proses *cell growth*, diferensiasi dan migrasi ke daerah defek pada saat ditranplantasikan (Wozniak et al, 2004). Efikasi dan potensi dari *MSCs* juga tergantung pada *time pf delivery* atau waktu yang tepat pada saat ditransplantasikan, karena beberapa faktor seperti peradangan atau inflamasi mempunyai pengaruh yang cukup signifikan terhadap efikasi dan kemampuan *MSCs* dalam meregenerasi jaringan yang rusak. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ada interaksi dua arah antara *MSCs* dan sel inflamasi, yang menentukan hasil proses perbaikan jaringan yang dimediasi oleh *MSCs*. Mekanisme perbaikan jaringan yang dimediasi *MSC* sangat kompleks. Pada keadaan akut pada umumnya kerusakan jaringan diikuti oleh inflamasi, diduga bahwa faktor inflamasi yang dihasilkan selama immune respon bertindak untuk mengaktifkan kapasitas immunosupresif *MSCs*. Sebaliknya, beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa *MSCs* tidak dapat bertahan hidup pada saat ditransplantasikan atau tidak dapat menekan Graft vs Host Disease (GvHD), meskipun secara *in vitro* dapat menekan proliferasi limfosit sampai batas tertentu. Oleh karena itu, status peradangan pada kondisi akut ataupun kronis pada lingkungan mikro tertentu yang terkait dengan kerusakan jaringan mungkin perlu dipertimbangkan saat yang tepat untuk dilakukan transplantasi *MSCs*.

Hal ini membuktikan bahwa konsep optimalisasi diet pada pasien yang
tidak dapat dikendalikan sebagai konsep yang optimal dalam meningkatkan
kegiatan belajar proses belajar siswa dengan metode ZIGI secara sistematis
GZIGI.

Penelitian sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai ekspresi dan
keberhasilan yaitu ZIGI dan GZIGI (SDP) pada kultur WMAK dan saat
dinasipkan. Secara fungsional penelitian ini dapat meningkatkan kemampuan
respon terhadap bentuk belajar dalam proses belajar. Penelitian ini memiliki ke-
lebihan dari penelitian sebelumnya (Widiana et al, 2004). Hal ini dapat dilihat dari
hasil yang terdapat pada WMAK yang menunjukkan bahwa WMAK yang dapat
dinasipkan. Hal ini berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan
kemampuan yang cukup signifikan terhadap WMAK. Hal ini menunjukkan bahwa
jaringan yang rusak setelah perawatan dapat meningkatkan kemampuan yang berbeda
MDC dan sel jaringan yang menunjukkan hasil proses penelitian yang berbeda
dari MDC. Kemampuan penelitian jaringan yang berbeda MDC akan berbeda dari
kelebihan dari penelitian sebelumnya karena menunjukkan bahwa MDC yang dapat
injeksi yang dilakukan selama perawatan dapat meningkatkan kemampuan
injeksi MDC. Sehingga, beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa MDC tidak
dapat bertahan hidup pada saat perawatan. Hal ini menunjukkan bahwa MDC yang
Dikoreksi (ZIGI) memiliki kemampuan yang berbeda dengan penelitian lainnya pada
waktu. Oleh karena itu, hasil penelitian pada kondisi akan sangat penting pada
kegiatan ini. Hal ini menunjukkan bahwa penelitian jaringan jaringan yang
diperhatikan. Hal ini dapat dilihat dari hasil penelitian ZIGI.

BAB 3**TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN****3.1. Tujuan Penelitian**

Untuk mengetahui manakah waktu pemberian yang paling efektif dengan membandingkan hasil transplantasi MSCs pada kondisi akut (24 jam setelah radiasi) dan pemberian pada kondisi subakut/kronis (2 minggu setelah radiasi) pada kelenjar saliva yang defek akibat radiasi pengion dengan cara :

1. Mengukur ekspresi reseptor-ligand CXCR4-SDF-1 pada jaringan kelenjar saliva setelah diberi terapi MSCs.
2. Melihat sebaran sel MSCs yang telah dilabel dengan menggunakan PKH 26 pada kelenjar saliva setelah transplantasi.
3. Mengukur ekspresi BCl2 pada jaringan kelenjar saliva setelah diberi terapi MSCs.
4. Mengukur aktivitas enzim alpha amilase yang dihasilkan oleh sel acinar pada jaringan kelenjar saliva setelah diberi terapi MSCs sebagai penanda terjadinya proses regenerasi kelenjar saliva.

3.2. Manfaat Penelitian

Mengetahui waktu transplantasi MSCs yang tepat untuk mendapatkan hasil terapi yang optimal sebagai dasar pengobatan xerostomia yang disebabkan kerusakan kelenjar saliva akibat paparan radiasi dosis tinggi. Sehingga kedepannya diharapkan terapi MSCs dapat digunakan sebagai harapan baru untuk penderita xerostomia yang umumnya terjadi akibat efek samping terapi radiasi didaerah kepala dan leher.

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

BAR 3

LEMBER DAN MANEVAAL PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi penguatan otot lidah terhadap kemampuan berbicara pada pasien dengan disfungsi artikulasi akibat stroke. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pemberian terapi penguatan otot lidah dapat meningkatkan kemampuan berbicara pada pasien dengan disfungsi artikulasi akibat stroke.

1. Mengetahui apakah pemberian terapi penguatan otot lidah dapat meningkatkan kemampuan berbicara pada pasien dengan disfungsi artikulasi akibat stroke.

2. Mengetahui apakah pemberian terapi penguatan otot lidah dapat meningkatkan kemampuan berbicara pada pasien dengan disfungsi artikulasi akibat stroke.

3. Mengetahui apakah pemberian terapi penguatan otot lidah dapat meningkatkan kemampuan berbicara pada pasien dengan disfungsi artikulasi akibat stroke.

4. Mengetahui apakah pemberian terapi penguatan otot lidah dapat meningkatkan kemampuan berbicara pada pasien dengan disfungsi artikulasi akibat stroke.

3.2. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi penguatan otot lidah terhadap kemampuan berbicara pada pasien dengan disfungsi artikulasi akibat stroke. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah pemberian terapi penguatan otot lidah dapat meningkatkan kemampuan berbicara pada pasien dengan disfungsi artikulasi akibat stroke.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratoris dan dilanjutkan dengan *true experimental* pada tahap pertama dengan menggunakan animal model, dimana penelitian ini melalui beberapa tahapan penelitian, yaitu :

1. Identifikasi dan karakterisasi pada kultur MSCs dari *bone marrow* tulang *femur tikus Wistar jantan*.
2. Melakukan pemberian radiasi dosis tunggal sebesar 15 Gy didaerah leher tikus untuk membuat kondisi defek pada kelenjar saliva tikus.
3. Transplantasi MSCs yang dilakukan secara *direct* pada daerah defek kelenjar saliva tikus jantan yang terlebih dahulu diberi label.
4. Mengukur ekspresi binding CXCR4-SDF-1, BC12 dan aktivitas enzim alpha amilase pada kelenjar saliva yang sudah diberi terapi MSCs.

4.2. Materi Penelitian

Unit eksperimen pada penelitian ini adalah stem cell mesenchymal (MSCs) yang diambil dari *bone marrow* tulang femur tikus *Wistar* dan tikus *Wistar jantan* dengan usia 3 bulan dan berat sekitar 200 gram sebagai animal model. Penggunaan hewan coba ini akan dilakukan melalui Laik Etik penelitian di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

4.3. Besar Sampel

Pada penelitian ini jumlah sampel ditentukan berdasarkan jumlah ulangan dengan rumus Federer sebagai berikut :

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

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$(r-1) \geq 15/5 \longrightarrow r \geq 3$$

Keterangan : k = jumlah kelompok subyek (= 10)

r = jumlah ulangan

Jadi jumlah sampel yang dibutuhkan untuk tiap kelompok adalah 10 (sepuluh). Jadi sampel keseluruhan adalah 30 sampel.

DAFTAR

LAMPIRAN

4.1.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium dan dilaksanakan dengan cara sebagai berikut dengan menggunakan minimal model dengan penelitian ini melalui beberapa tahapan penelitian yaitu :

1. Identifikasi dan karakteristik pada tahun 2012 dan tahun 2013 yang akan diteliti

2. Melakukan penelitian melalui dasar teoretis sebagai landasan penelitian

3. Melakukan penelitian dengan menggunakan minimal model dengan penelitian sebagai landasan penelitian

4. Melakukan penelitian dengan menggunakan minimal model dengan penelitian sebagai landasan penelitian

4.2.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium dan dilaksanakan dengan cara sebagai berikut dengan menggunakan minimal model dengan penelitian ini melalui beberapa tahapan penelitian yaitu :

4.2.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium dan dilaksanakan dengan cara sebagai berikut dengan menggunakan minimal model dengan penelitian ini melalui beberapa tahapan penelitian yaitu :

1. Melakukan penelitian melalui dasar teoretis sebagai landasan penelitian

$$k = 1 - (1 - r)^n$$

$$r = 1 - (1 - k)^{1/n}$$

$$r = 1 - (1 - k)^{1/n}$$

k = jumlah kelainan yang diteliti

r = jumlah kelainan

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium dan dilaksanakan dengan cara sebagai berikut dengan menggunakan minimal model dengan penelitian ini melalui beberapa tahapan penelitian yaitu :

4.4. Teknik Randomisasi

Teknik randomisasi dari sampel pada penelitian ini adalah berdasarkan hasil random dari sejumlah sampel MSCs berkualitas baik. didasarkan pada kriteria yang ditetapkan oleh tim stem cell dan bank jaringan Surabaya bertempat di ITD Universitas Airlangga.

4.5. Variabel Penelitian

a. Variabel Bebas (*Independent Variable*)

Menchymal stem cell yang diberi prekondisi hipoksia 1% dan normoksia.

b. Variabel Tergantung (*Dependent Variable*)

- Ekspresi CXCR4 pada kultur MSCs sesudah diberi perlakuan hipoksia (O₂ 1%) dan normoksia (O₂ 21%).
- Ekspresi enzim alpha amilase pada kelenjar saliva tikus setelah diberi terapi MSCs yang diberi prekondisi hipoksia (O₂ 1%) dan normoksia (O₂ 21%).

c. Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah : umur, strain dan jenis kelamin hewan coba, kandang dan suhu lingkungan, pakan dan *handling* hewan coba, operator, waktu isolasi dan cara isolasi stem cell dari *bone marrow*.

4.6. Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. **Hipoksia** adalah kondisi MSCs yang didapat dari bone marrow melalui tulang femur kelinci New Zeland dikultur dalam hypoxic chamber (O₂1%, CO₂ 5% dan N₂ 95%) dan hipoksia mimetic agent Cobalt Chloride (CoCl₂).
2. Ekspresi *binding* CXCR4-CXCL12 pada kelenjar saliva tikus yang merupakan penanda terjadinya proses homing/migrasi baik dari MSC yang diinjeksikan maupun endogenous stem cell pada daerah defek.
3. Ekspresi Bcl2 adalah ekspresi protein antiapoptosis sebagai penjaga integritas membran mitokondria sehingga mencegah terlepasnya apoptosom kompleks.
4. Ekspresi ERK adalah merupakan ekspresi suatu protein yang diaktivasi oleh Mek. ERK yang teraktivasi menyebabkan terjadinya translokasi ERK kedalam nucleus dimana faktor transkripsi difosforilasi sehingga aktivitasnya diregulasi untuk mempengaruhi transkripsi gen.
5. Aktivitas enzim α amylase merupakan enzim yang dihasilkan oleh kelenjar saliva sehinggadapat digunakan sebagai penanda terjadinya regenerasi kelenjar saliva yang rusak.

3.4. Teknik Penelitian

Teknik penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi langsung dan wawancara mendalam. Observasi langsung dilakukan dengan cara mengamati langsung perilaku komunikasi yang terjadi dalam situasi komunikasi yang sedang berlangsung. Wawancara mendalam dilakukan dengan cara mengajukan pertanyaan-pertanyaan yang mendalam dan terbuka kepada informan yang diteliti.

3.4.1. Jenis Penelitian

a. Jenis Penelitian (Jenis Penelitian)

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi langsung dan wawancara mendalam.

b. Jenis Penelitian (Jenis Penelitian)

• Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi langsung dan wawancara mendalam (Gibson, 2002).

• Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi langsung dan wawancara mendalam (Gibson, 2002).

c. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi langsung dan wawancara mendalam. Observasi langsung dilakukan dengan cara mengamati langsung perilaku komunikasi yang terjadi dalam situasi komunikasi yang sedang berlangsung. Wawancara mendalam dilakukan dengan cara mengajukan pertanyaan-pertanyaan yang mendalam dan terbuka kepada informan yang diteliti.

3.4.2. Definisi Operasional Jenis Penelitian

1. Observasi langsung adalah kegiatan yang dilakukan dengan cara mengamati langsung perilaku komunikasi yang terjadi dalam situasi komunikasi yang sedang berlangsung. Observasi langsung dapat dilakukan dengan cara mengamati langsung perilaku komunikasi yang terjadi dalam situasi komunikasi yang sedang berlangsung.

2. Wawancara mendalam adalah kegiatan yang dilakukan dengan cara mengajukan pertanyaan-pertanyaan yang mendalam dan terbuka kepada informan yang diteliti. Wawancara mendalam dapat dilakukan dengan cara mengajukan pertanyaan-pertanyaan yang mendalam dan terbuka kepada informan yang diteliti.

3. Observasi tidak langsung adalah kegiatan yang dilakukan dengan cara mengamati langsung perilaku komunikasi yang terjadi dalam situasi komunikasi yang sedang berlangsung. Observasi tidak langsung dapat dilakukan dengan cara mengamati langsung perilaku komunikasi yang terjadi dalam situasi komunikasi yang sedang berlangsung.

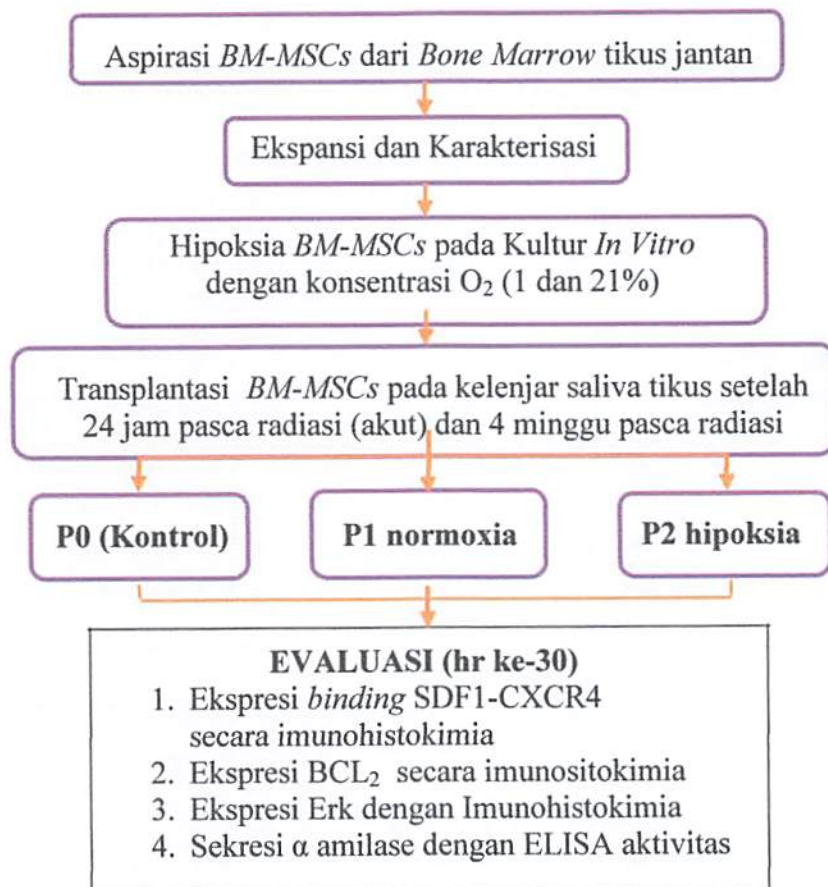
4. Wawancara tidak langsung adalah kegiatan yang dilakukan dengan cara mengajukan pertanyaan-pertanyaan yang mendalam dan terbuka kepada informan yang diteliti. Wawancara tidak langsung dapat dilakukan dengan cara mengajukan pertanyaan-pertanyaan yang mendalam dan terbuka kepada informan yang diteliti.

5. Wawancara campuran adalah kegiatan yang dilakukan dengan cara mengajukan pertanyaan-pertanyaan yang mendalam dan terbuka kepada informan yang diteliti. Wawancara campuran dapat dilakukan dengan cara mengajukan pertanyaan-pertanyaan yang mendalam dan terbuka kepada informan yang diteliti.

4.7. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Stem Cell - Institute Tropical Disease (ITD) Unair Surabaya. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung dari bulan April-Oktober 2017.

4.8. Alur pelaksanaan penelitian



4.9. Prosedur Penelitian

Tahap 1 : Isolasi dan Kultur MSCs dari bone marrow tikus *Wistar* jantan.

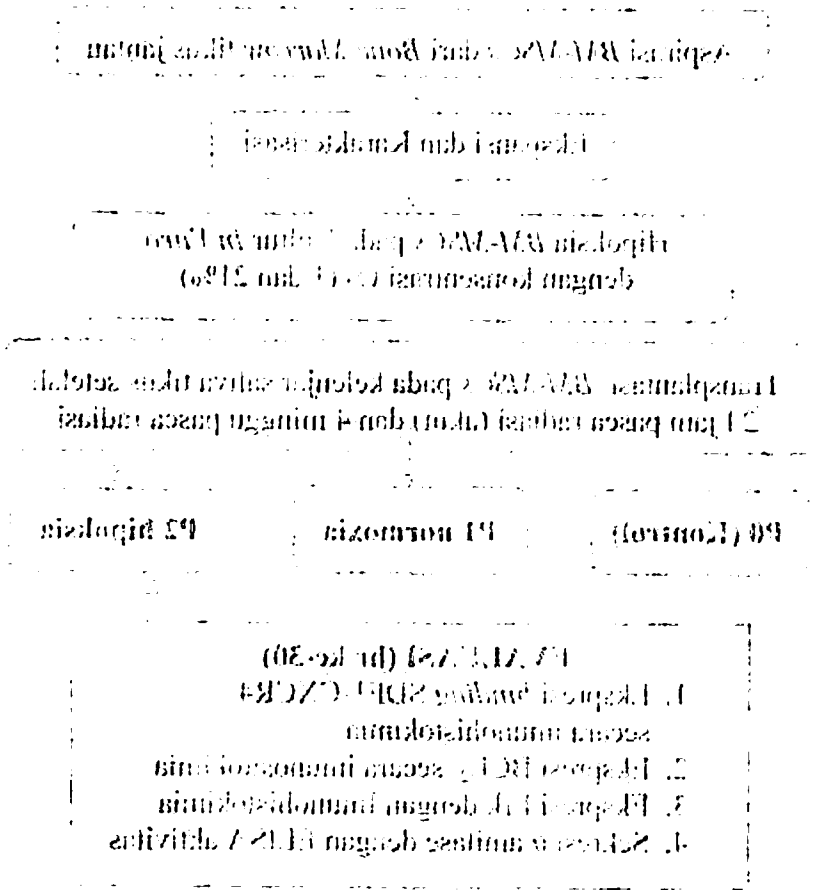
Prosedur Isolasi MSCs dari bone marrow.

Prosedur isolasi MSCs dari bone marrow diawali dengan pelaksanaan sterilisasi semua perlengkapan dan reagen, selanjutnya semua prosedur kultur harus dibuat dalam sebuah kultur jaringan tertutup dengan menggunakan teknik yang aseptis. Semua material harus dibersihkan dengan ethanol 70% dimasukkan dalam Biological Safety Cabinet (BSC). Penggunaan jas laboratorium dan gloves harus dikenakan. Media kultur dan

4.7. Analisis Wacana Kritis

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Komunikasi dan Bahasa (LKB) Universitas Airlangga. Penelitian ini dilaksanakan dan dilaksanakan oleh peneliti.

4.8. Alat penelitian penelitian



4.9. Prosedur Penelitian

Tabel 1 : Prosedur dan Instrumen Penelitian

Prosedur penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Ilmu Komunikasi dan Bahasa (LKB) Universitas Airlangga. Penelitian ini dilaksanakan dan dilaksanakan oleh peneliti.

buffers harus dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 37° C sebelum digunakan. Tahapan isolasi dapat diikuti seperti di bawah ini :

Tikus diterminasi dengan diberi eter terlebih dahulu sebelum dilakukan pengambian tulang femurnya. Kemudian dilakukan aspirasi bone marrow dari kedua tulang femur untuk mendapatkan jumlah bone marrow yang cukup untuk dikultur. Aspirat ditepatkan pada tabung 15 mL Heparin yang sebelumnya diisi dengan 3 mL α -MEM.

Masing-masing aspirat di transfer dalam 15 mL tabung steril bertutup biru dan diencerkan dengan 1 X Phosphat Bufer Saline (PBS) steril sampai total volume 8 mL. Masing-masing tabung kemudian dibilas dua kali dengan 5 mL 1 X PBS dan isi dikombinasi dengan larutan aspirat. Pada masing-masing aspirat, diletakkan pada ruang temperatur Ficoll dalam tabung 15 mL terpisah. Selanjutnya dilakukan pelapisan masing-masing aspirat dan lam Ficoll. Selanjutnya dilakukan sentrifugai pada 1.600 rpm selama 15 menit pada suhu ruangan. Setelah sentrifugasi selesai, dilakukam koleksi pada lokasi "buffy coat" pada permukaan Ficoll-PBS dengan pipet pasteur steril dan diletakkan dalam tabung 15 mL.

Masing-masing sampel dilarutkan dengan 1 X PBS sampai total volume 15 mL, agar campuran merata, tabung dibolak-balik 3-5 kali. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan 1600 rpm selama 10 menit. Langkah berikutnya buang supernatan dan sel-sel yang melayang-layang dengan 6 mL dari CCM sebelum dipanaskan. Kemudian letakkan sel dalam plate sebanyak 10 cm² atau 5 cm². Selanjutnya sel diikubasi pada suhu 37° C dengan kelembaban 5% CO₂ dibiarkan selama 18-24 jam agar sel melekat.

Kira-kira 24 jam kemudian buang media dan sel-sel yang tidak melekat. Selanjutnya tambahkan 5 mL 1 X PBS sebelum dipanaskan dalam kultur, kocok dengan baik dan tutup permukaan area, dan kemudian buang dengan 1 X PBS. Ulangi pencucian 2 kali.

Selanjutnya tambahkan 10 menit 10 mL CCM segar pada dish dan masukkan kembali dalam inkubator. Inkubasi sel pada suhu 37°C dengan kelembaban CO₂ 5-10%. Dilakukan pengamatan pada kultur setiap hari dengan mikroskop inverted.

Selanjutnya setiap tiga hari, media dibuang, bilas sel dengan 10 mL atau 5 mL 1 X PBS sebelum dipanaskan, buang PBS dan isi dengan 10 mL CCM segar. Dilanjutkan terus sampai sel confluent antara 60-80%. Jika sel berkembang meluas dalam pabrik sel, maka pabrik sel harus diseimbangkan dalam incubator pada kelembaban 5% CO₂ dan suhu 37° C selama 48 jam sebelum digunakan.

... dan ...

... dan ...

... dan ...

... dan ...

... dan ...

... dan ...

Prosedur Kultur MSCs dari bone marrow

Setelah sampel bone marrow dilarutkan dengan 3 volume sama rata dari medium penumbuh MSCs dan didistribusikan sama rata secara menyilang pada beberapa dish. Masing-masing dish 10 cm kultur dish mendapatkan 10 mL dari aspirat yang diencerkan. Disimpan kembali pada inkubator dengan CO₂ 5% dan dikultur tanpa diganggu pada inkubator suhu 37°C selama 4-5 hari.

Setelah 4-5 hari, medium yang lama diaspirasi tanpa mengganggu untuk memindahkan sel-sel berwarna merah yang telah menetap. Selanjutnya, medium diganti setiap 3-4 hari, dan kontaminasi sel-sel berwarna merah dan sel-sel yang tidak repikasi serta tidak melekat akhirnya diencerkan dan dibilas untuk menghilangkannya.

Koloni-koloni MSCs kecil dari sel-sel fibroblast yang terlekat dan terlihat pada 5-7 hari. Selanjutnya dibagi, koloni-koloni yang berkembang sama dan yang tidak berkembang yang pada akhirnya menjadi tua. Setelah 12-14 hari, koloni-koloni kecil mudah ditemukan. Pada kondisi ini, sel-sel dibilas dengan serum-free α -MEM dan subkultur. 5 mL dari 0,05% trypsin/0,23 mM EDTA. ditambahkan dan setelah beberapa menit, sel mulai dikirim dari substrat. Dialkukan pengamatan di bawah mikroskop. Kelebihan larutan trypsin/EDTA dapat secara hati-hati diaspirasi dibuang sepanjang sel-sel secara penuh belum dikirim. Jika sel-sel telah mulai dipindahkan dari substrat, fresh medium penumbuh berisi FBS ditambahkan dan menghilangkan aktivitas trypsin.

Selanjutnya MSCs dibilas dari permukaan dengan medium penumbuh dengan pipet dan dibagi dalam dua dish pada tahap ini konsentrasi rendah tapi akan berkembang dengan cepat. Masing-masing dish diisi 10 mL dari susensi sel dan dimasukkan kembali dalam inkubator 5% CO₂.

Tahap 2 : Melakukan identifikasi terhadap ekspresi binding CXCR4-SDF1, Bcl2 dan Erk pada kultur MSCs melalui pemeriksaan Imunohistokimia

Imunohistokimia untuk mengevaluasi ekspresi binding CXCR4-SDF1, Bcl2 dan ERK dalam sediaan sel *BM-MSCs* yang ditransplantasikan. Pewarnaan sediaan sel menimbulkan ikatan antibodi pada antigen di permukaan atau di dalam sel yang selanjutnya dapat dideteksi dengan cara dilabel dengan enzim, isotop, *fluoropore*, atau *coloidal gel*. Sel difiksasi kemudian dilokalisasi diantara sel dan divisualisasikan dengan mikroskop elektron atau mikroskop cahaya (Rantam, 2003).

Perubahan Kultur Hidup Masyarakat

Setelah muncul konsep perubahan perilaku di kalangan tenaga kesehatan serta para dokter, perawat, dan tenaga kesehatan lainnya yang bertanggung jawab terhadap pasien, maka perubahan perilaku ini akan mempengaruhi secara langsung perilaku masyarakat yang dituju. Hal ini dapat diartikan bahwa perubahan perilaku masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien.

Perubahan perilaku masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien. Hal ini dapat diartikan bahwa perubahan perilaku masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien.

Kelompok-kelompok masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien. Hal ini dapat diartikan bahwa perubahan perilaku masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien. Hal ini dapat diartikan bahwa perubahan perilaku masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien.

Perubahan perilaku masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien. Hal ini dapat diartikan bahwa perubahan perilaku masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien.

Tabel 2 : Identifikasi Identifikasi Terjadinya Ekspansi Perilaku (2014-2017) Berdasarkan Perubahan Perilaku Masyarakat

Identifikasi Identifikasi Terjadinya Ekspansi Perilaku (2014-2017) Berdasarkan Perubahan Perilaku Masyarakat. Hal ini dapat diartikan bahwa perubahan perilaku masyarakat yang dituju akan dipengaruhi oleh perubahan perilaku tenaga kesehatan yang bertanggung jawab terhadap pasien.

Proses Fiksasi, bertujuan untuk memfiksasi suatu bahan, maka yang perlu diperhatikan adalah perbandingan antara larutan fiksasi dengan bahan yang hendak difiksasi. Pada umumnya perbandingan antara bahan yang difiksasi dengan larutan fiksasi berkisar antara 1: 10. Sedangkan lama fiksasi disesuaikan dengan ketebalan sel. Adapun tujuan dari fiksasi adalah untuk: 1. mempertahankan morfologi sel semula, dengan maksud agar sel yang diperiksa sesuai dengan keadaan pada waktu diisolasi; 2. mencegah terjadi otolisis, karena apabila setelah sel diisolasi kemudian dibiarkan dalam beberapa saat, maka sistem pembungkus enzim proteolitik yang berada pada sitoplasma sel akan mengalami kerapuhan sehingga enzim proteolitik akan keluar dari sistem pembungkus, akhirnya merusak protein penyusun sel lainnya dan terjadi kerusakan sel atau lisis; 3. mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur.

Selanjutnya dilakukan pewarnaan pada sel. Metode pewarnaan sel dilakukan melalui metode pewarnaan rutin dan metode pewarnaan khusus. Metode pewarnaan rutin adalah dengan menggunakan haematoxylin Eosin (H.E), sedangkan metode pewarnaan khusus termasuk pewarnaan imunositokimia. Prinsip teknik imunositokimia merupakan perpaduan dari dua macam reaksi, *reaksi imunologis* dan *reaksi kimiawi* (Sudiana, 2005), dimana reaksi imunologis ditandai adanya reaksi antara antigen dengan antibodi, dan reaksi kimiawi ditandai adanya reaksi antara enzim dengan substrat. Reaksi imunositokimia bersifat spesifik karena bahan yang dideteksi akan direaksikan dengan antibodi spesifik yang dilabel dengan suatu enzim. Untuk menandai reaksi enzimatik digunakan suatu indikator warna (*chromogen*) (Sudiana, 2005).

Pengolahan dan Analisis Data

Data yang didapat hanya berupa satu jenis data yaitu secara kuantitatif dengan skala data numerik. Sehingga bila berdistribusi normal maka dapat dilakukan dengan pengujian Manova.

Proses fisiologi pernafasan untuk memastikan semua bagian tubuh yang perlu diperbaiki adalah pernafasan untuk memastikan oksigen dengan yang dibutuhkan. Pada umumnya pernafasan normal dalam yang dibutuhkan dengan jumlah oksigen per liter antara 100-200ml. Sedangkan pada keadaan fisiologi normal dibutuhkan oksigen untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh. Untuk memastikan bahwa oksigen tersebut dapat dengan mudah mencapai semua bagian tubuh, maka diperlukan sistem pernafasan yang baik. Pada keadaan normal, sistem pernafasan akan melakukan pertukaran gas yang diperlukan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh. Pada keadaan normal, sistem pernafasan akan melakukan pertukaran gas yang diperlukan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh. Pada keadaan normal, sistem pernafasan akan melakukan pertukaran gas yang diperlukan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh.

Salah satu faktor yang mempengaruhi pernafasan adalah perubahan tekanan udara. Pada keadaan normal, tekanan udara di permukaan laut adalah 1013 mb. Sedangkan pada ketinggian, tekanan udara akan semakin rendah. Hal ini akan mempengaruhi pernafasan karena pada ketinggian, tekanan udara yang dibutuhkan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh akan semakin rendah. Untuk memastikan bahwa oksigen tersebut dapat dengan mudah mencapai semua bagian tubuh, maka diperlukan sistem pernafasan yang baik. Pada keadaan normal, sistem pernafasan akan melakukan pertukaran gas yang diperlukan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh. Pada keadaan normal, sistem pernafasan akan melakukan pertukaran gas yang diperlukan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh.

Pengaruh dari radiasi pada pernafasan

Salah satu faktor yang mempengaruhi pernafasan adalah perubahan tekanan udara. Pada keadaan normal, tekanan udara di permukaan laut adalah 1013 mb. Sedangkan pada ketinggian, tekanan udara akan semakin rendah. Hal ini akan mempengaruhi pernafasan karena pada ketinggian, tekanan udara yang dibutuhkan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh akan semakin rendah. Untuk memastikan bahwa oksigen tersebut dapat dengan mudah mencapai semua bagian tubuh, maka diperlukan sistem pernafasan yang baik. Pada keadaan normal, sistem pernafasan akan melakukan pertukaran gas yang diperlukan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh. Pada keadaan normal, sistem pernafasan akan melakukan pertukaran gas yang diperlukan untuk metabolisme sel-sel dalam tubuh.



BAB 5

HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil

Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian yang sebelumnya dan dilaksanakan untuk mengetahui waktu pemberian transplantasi MSCs yang tepat sehingga dapat meningkatkan efikasi dan potensi terapi dari MSCs ini. Dengan demikian diharapkan dapat menghasilkan proses regenerasi jaringan yang lebih optimal.

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu: Tahap pertama. Pemeriksaan fenotip CD 105, CD 90, CD 45, CD 34 dengan metode *Flowcytometri*. Tahap kedua, perlakuan defek kelenjar saliva pada tikus Wistar jantan melalui pemberian radiasi dengan dosis tunggal 15 Gy di daerah ventral leher tikus Wistar. Tahap ketiga, transplantasi *MSCs* pada kelenjar saliva tikus dengan cara intra glandular pada kelenjar submandibularis tikus. Tahap keempat adalah analisis mekanisme regenerasi kelenjar saliva tikus melalui ekspresi *binding* SDF1-CXCR4, Bcl₂ dan Erk dengan pemeriksaan Imunohistokimia dan ELISA aktivitas untuk mengukur aktivitas enzim α amilase.

5.1.1 Hasil Pemeriksaan Fenotip dari *MSCs*

CD105, CD90, CD45 dan CD34 merupakan marker positif dan marker negatif dari *mesenchymal stem cells (MSCs)*, karakterisasi fenotip *stem cells* terhadap beberapa marker tersebut bertujuan untuk menjamin validitas bahwa *stem cells* yang dikultur adalah *mesenchymal stem cells*. Karakterisasi terhadap CD90 dan CD105 sebagai penanda permukaan sel spesifik dari *MSCs* dan CD34 dan CD45 sebagai penanda permukaan sel spesifik HSCs (marker negatif) dilakukan melalui metode *flowcytometri*.

Identifikasi dengan menggunakan *flowcytometri* terhadap CD105, CD90, CD45 dan CD34, marker yang digunakan adalah monoklonal *APC anti-mouse cross anti-rabbit CD 105 (Biolegend)*, *FITC anti-rabbit CD 90 (Biossusa)*, *PerCP-Cy5.5 anti-human cross anti-rabbit CD45(BD)* dan *PerCP-Cy 5.5 anti human cross anti-rabbit CD34 (BD)*. Hasil identifikasi yang didapat berdasarkan *flowcytometri* menunjukkan bahwa sel yang dikultur adalah *mesenchymal stem cells (MSCs)* (Gambar 5.1 - 5. 4)

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

102

HASIL DAN PEMBAHASAN PENELITIAN

2.1. Hasil

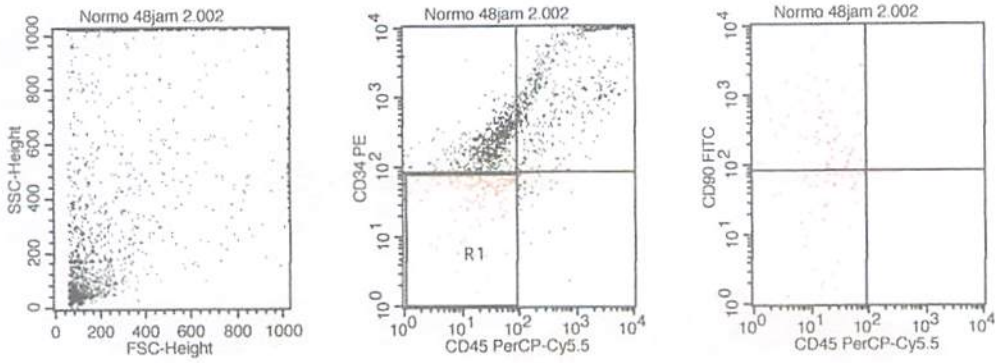
Penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian yang sebelumnya dan dilaksanakan untuk mengetahui apakah penelitian terdahulu mengenai MPO yang telah dilakukan sebelumnya dapat dilanjutkan dengan penelitian yang lebih lanjut.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode kuantitatif dengan menggunakan teknik analisis data statistik. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 2.1.1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara MPO pada pasien dengan dan tanpa radiasi. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 2.1.1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara MPO pada pasien dengan dan tanpa radiasi. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 2.1.1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara MPO pada pasien dengan dan tanpa radiasi.

2.1.1. Hasil Penelitian Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara MPO pada pasien dengan dan tanpa radiasi. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 2.1.1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara MPO pada pasien dengan dan tanpa radiasi.

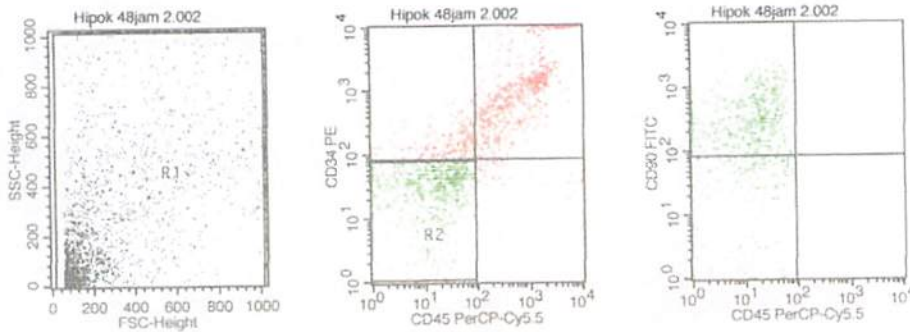
Identifikasi mengenai terdapat perbedaan yang signifikan antara MPO pada pasien dengan dan tanpa radiasi. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada tabel 2.1.1. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara MPO pada pasien dengan dan tanpa radiasi.



Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	63	61.76	5.00	26.64	17.00	611.50	347.72
UR	0	0.00	0.00	***	***	***	***
LL	39	38.24	3.10	29.17	20.28	38.55	21.78
LR	0	0.00	0.00	***	***	***	***

Gambar 5.1 Pemeriksaan fenotip MSCs pada kondisi normoksia dengan flowcytometri menunjukkan ekspresi positif lemah CD90 5% dan ekspresi negatif pada CD45.

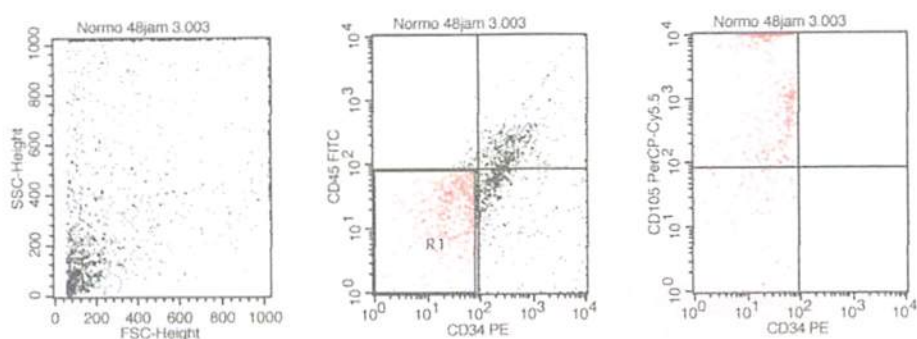
Hasil identifikasi berdasarkan gambar 5.1 menunjukkan bahwa ekspresi CD90 (*quadrant statistic* pada area upper left (UL)) pada kultur MSCs kondisi normoksia menunjukkan ekspresi positif lemah sebesar 26,12% dan ekspresi negatif CD34.



Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	504	70.99	25.07	19.73	11.81	551.42	363.40
UR	0	0.00	0.00	***	***	***	***
LL	206	29.01	10.25	23.31	12.72	35.56	19.35
LR	0	0.00	0.00	***	***	***	***

Gambar 5.2 Pemeriksaan fenotip MSCs dengan flowcytometri pada MSCs menunjukkan ekspresi positif CD90 pada kondisi hipoksia 25,07% dan menunjukkan ekspresi negatif pada CD45.

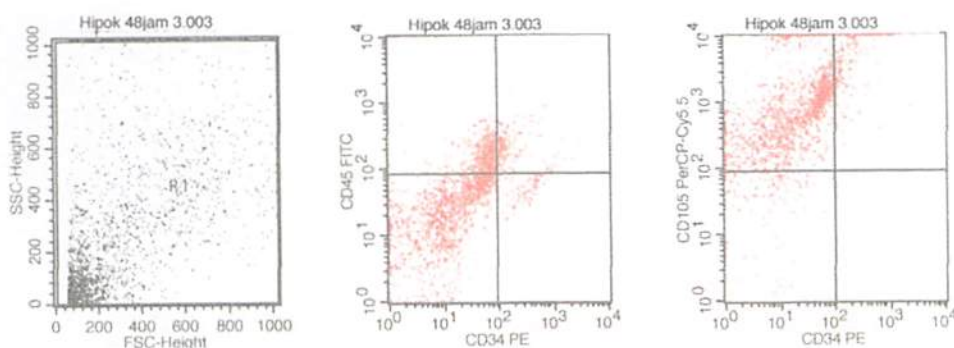
Hasil identifikasi berdasarkan gambar 5.2 menunjukkan bahwa ekspresi CD90 (*quadrant statistic* pada area *upper left* (UL)) pada kultur MSCs kondisi hipoksia menunjukkan ekspresi positif sebesar 26,12% dan ekspresi negatif CD34.



Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	337	80.62	26.12	36.82	27.09	3551.93	1229.76
UR	0	0.00	0.00	***	***	***	***
LL	81	19.38	6.28	19.66	12.33	32.84	18.81
LR	0	0.00	0.00	***	***	***	***

Gambar 5.3 Identifikasi CD105 secara flowcytometri pada MSC rat yang dikultur dalam kondisi normoxia.

Hasil identifikasi berdasarkan gambar 5.3 menunjukkan bahwa ekspresi CD105 (*quadrant statistic* pada area *upper left* (UL)) pada kultur MSCs kondisi normoksia menunjukkan ekspresi positif sebesar 26,12% dan ekspresi negatif CD34.



Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	X Geo Mean	Y Mean	Y Geo Mean
UL	1419	80.58	70.07	31.90	18.13	1919.65	840.79
UR	208	11.81	10.27	303.85	225.50	5636.34	4178.12
LL	134	7.61	6.62	9.30	5.10	43.87	28.17
LR	0	0.00	0.00	***	***	***	***

Gambar 5.4 Identifikasi CD105 secara flowcytometri pada MSC rat yang dikultur dalam kondisi hipoxia.

Hasil identifikasi berdasarkan gambar 5.4 menunjukkan bahwa ekspresi CD105 (*quadrant statistic* pada area *upper left* (UL)) pada kultur *MSCs* kondisi hipoksia menunjukkan ekspresi positif sebesar 70,07% dan ekspresi negatif CD34.

5.1.2 Transplantasi *Mesenchymal Stem Cells* (*MSCs*) pada Kelenjar Saliva Tikus

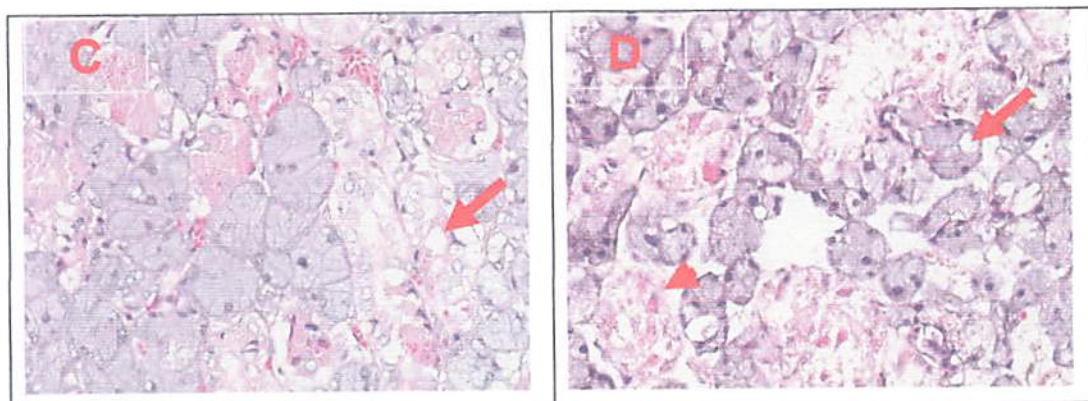
Transplantasi *mesenchymal stem cells* dilakukan dengan cara injeksi langsung pada kelenjar submandibularis/intraglandular tikus sebanyak 5×10^5 sel setelah 24 jam dan 4 minggu pasca radiasi. Sebelumnya *MSCs* dilabel terlebih dahulu dengan menggunakan PKH 26 untuk mengamati perkembangan dan migrasi dari *MSCs* yang ditransplantasikan pada jaringan kelenjar submandibularis tikus.

Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap kematian sel, ekspresi SDF1-CXCR4, Bcl₂, Erk yang dilakukan secara imunohistokimia dan mengukur aktivitas enzim α amilase kelenjar saliva tikus dengan ELISA aktivitas. Pemeriksaan ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat pengaruh transplantasi *MSCs* terhadap regenerasi kelenjar saliva tikus.

5.1.3 Hasil pemeriksaan Histopatologi kelenjar saliva tikus Wistar

Defek pada kelenjar saliva tikus dilakukan dengan memberikan pemajanan dosis tunggal radiasi 15 Gy pada permukaan ventral leher tikus. Setelah itu dilakukan pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan HE setelah 4 minggu pasca radiasi yang bertujuan untuk melihat kerusakan kelenjar submandibularis tikus, dibandingkan dengan gambaran histopatologi kelenjar submandibularis setelah mendapat transplantasi *MSCs*.

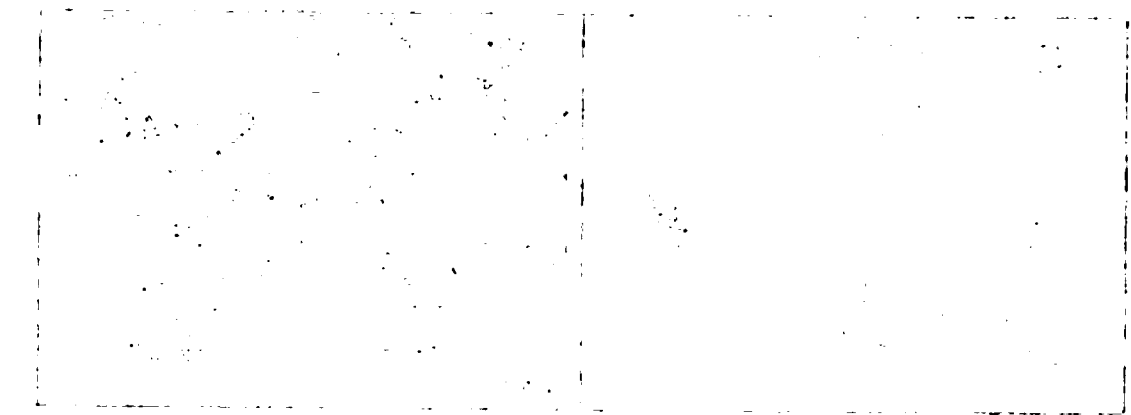
Pemeriksaan ini dilakukan untuk melihat perubahan histopatologi kelenjar saliva tikus Wistar setelah mendapat transplantasi *MSCs*. Gambaran perubahan histopatologi tikus Wistar setelah mendapat transplantasi *MSCs* pada masing-masing kelompok dapat dilihat pada gambar dibawah ini :

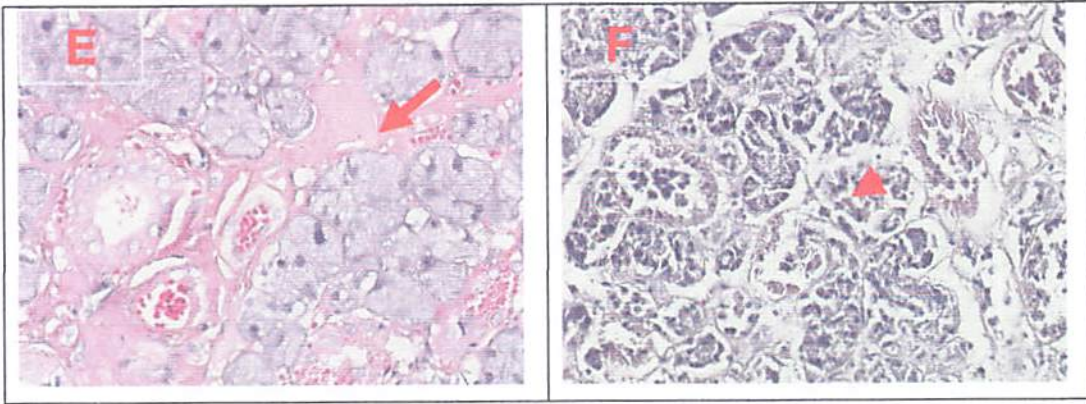


hasil identifikasi berdasarkan gambar 2.4 menunjukkan bahwa kelompok C100 (pemeriksaan awal) pada masa sebelum dan sesudah terapi menunjukkan perbedaan yang signifikan (p < 0,05) dan kelompok C200 menunjukkan perbedaan yang signifikan (p < 0,05).

2.1.2. Transplantasi Salivasi (XST) pada Keluaran Saliva Titik Waktu 100 dan 200 menit. Analisis statistik menggunakan uji t menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan (p < 0,05) antara kelompok C100 dan C200 pada waktu 100 menit dan 200 menit. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan (p < 0,05) antara kelompok C100 dan C200 pada waktu 100 menit dan 200 menit. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan (p < 0,05) antara kelompok C100 dan C200 pada waktu 100 menit dan 200 menit.

2.1.3. Hasil pemeriksaan Histopatologi Keluaran Saliva Titik Waktu 100 dan 200 menit. Pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan memberikan gambaran tentang keadaan seluler dan struktural jaringan. Hasil pemeriksaan histopatologi menunjukkan adanya perubahan seluler dan struktural jaringan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan (p < 0,05) antara kelompok C100 dan C200 pada waktu 100 menit dan 200 menit.





Gambar 5.10. Perubahan histopatologi kel. Submandibula pasca perlakuan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa skor kerusakan kel. Submandibula kelompok perlakuan hipoksia baik akut maupun kronis (C dan E) relatif lebih ringan dibandingkan dengan kelompok normoksia, baik akut maupun kronis (D dan F). Gambaran perubahan histopatologi yang dominan adalah vakuolisasi (panah) dan nekrosis (kepala panah) baik pada sel-sel ductulus maupun acinus, serta pembentukan fibrosis (f) (pewarnaan HE; pembesaran 400x; mikroskop NikonH600L; digital camera DS Fi2 300 megapixel)

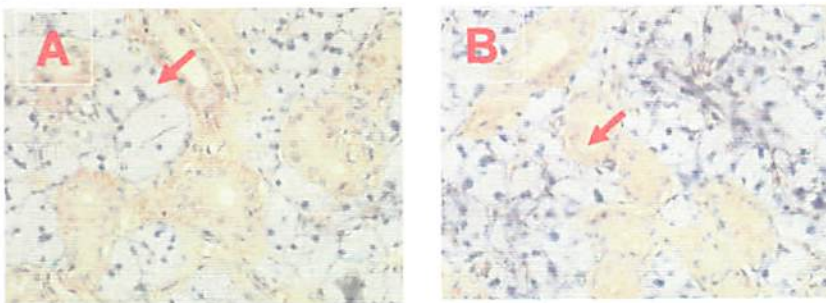
Tabel 5.4 Nilai rerata dan standar deviasi (SD) ekspresi kematian sel pada kultur MSCs

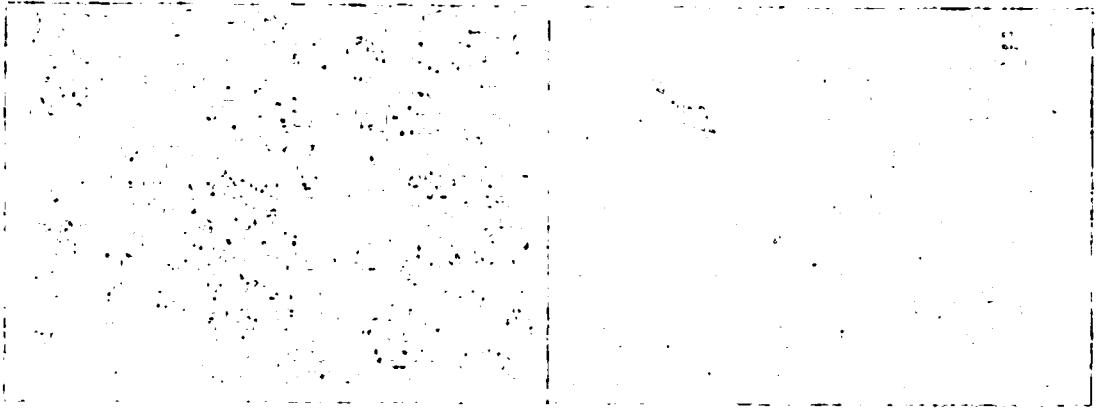
Kelompok	Kematian sel		p
	Rerata	SD	
KN	2.200	1.643	0.000
KD	16.000	0.000	
HA	3.400	2.302	
HK	12.600	3.209	
NA	5.400	1.949	
NK	16.000	0.000	

* signifikan ($p < 0,05$)

Hasil uji Manova pada Tabel 5.4 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi kematian sel antara kelompok kontrol normal, kontrol defek, hipoksia akut, hipoksia kronis, normoksia akut dan normoksia kronis.

5.1.4 Hasil pemeriksaan IHC ekspresi SDF1-CXCR4 pada kelenjar saliva tikus Wistar





Gambar 1.1. Hasil uji statistik uji t dua sampel. Gambar 1.1.1 menunjukkan hasil uji t dua sampel dengan asumsi varians sama. Hasil uji t dua sampel dengan asumsi varians sama menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok. Gambar 1.1.2 menunjukkan hasil uji t dua sampel dengan asumsi varians tidak sama. Hasil uji t dua sampel dengan asumsi varians tidak sama menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok.

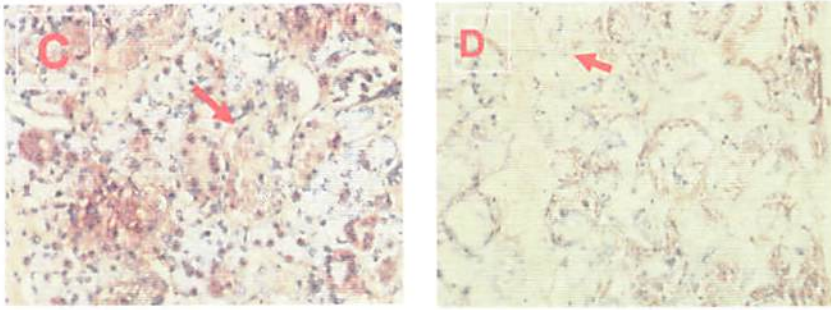
Tabel 2.1. Hasil uji statistik uji t dua sampel (Z) dan uji statistik uji t dua sampel (t)

p	Kategori	
	Kelompok 1	Kelompok 2
0,000	10,000	10,000
	2,500	2,500
	5,000	5,000
	7,500	7,500
	10,000	10,000
	12,500	12,500

* signifikan (p < 0,05)

Hasil uji statistik uji t dua sampel menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok. Hasil uji statistik uji t dua sampel menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok.

2.1.1. Hasil penelitian uji t dua sampel (Z) dan uji statistik uji t dua sampel (t) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok.



Gambar 5.13 Gambaran perbandingan ekspresi CXCR4 (coklat kromogen) diantara perlakuan. Pada slide diatas nampak bahwa kelompok yang dikondisikan hipoksia akut (A) dan kronis (C) menunjukkan ekspresi CXCR4 terutama pada ductus yang lebih kuat dibandingkan dengan kelompok normoksia baik akut (B) maupun kronis (D) (pewarnaan immuno histokimia, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel)

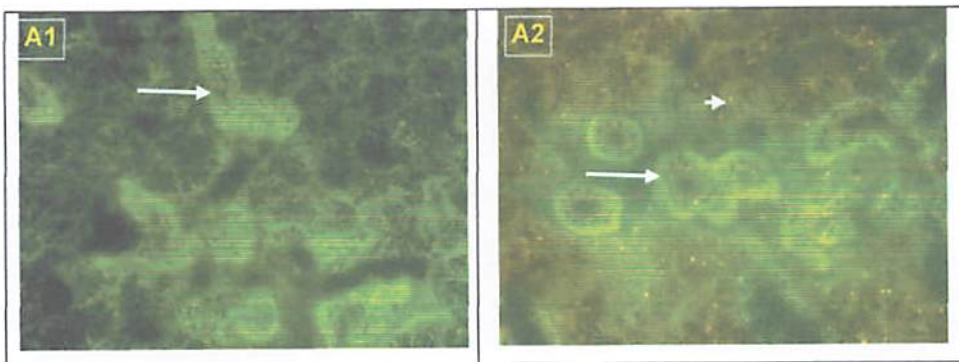
Tabel 5.6 Nilai rerata dan standar deviasi (SD) ekspresi SDF1-CXCR4 pada kultur MSCs

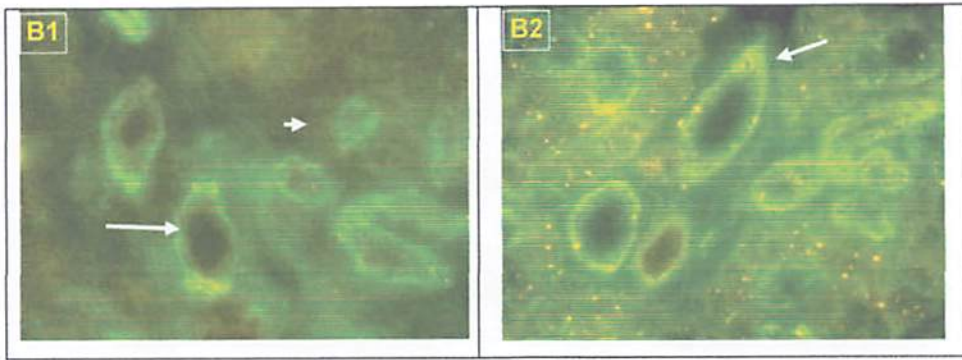
Kelompok	SDF1-CXCR4		p
	Rerata	SD	
KN	1.640	0.555	0.000
KD	1.160	0.219	
HA	3.720	1.825	
HK	5.280	1.591	
NA	2.920	0.540	
NK	2.720	0.995	

* signifikan ($p < 0,05$)

Hasil uji Manova pada Tabel 5.6 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi SDF1-CXCR4 antar kelompok perlakuan.

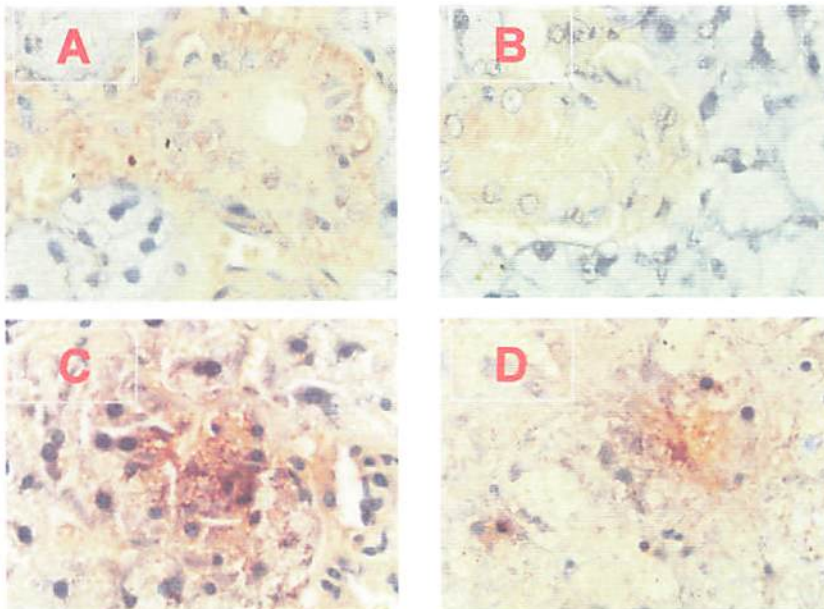
5.1.5 Hasil pemeriksaan sebaran/migrasi eksogenous MSCs pada kelenjar saliva tikus





Gambar 5.14 Gambaran mikroskopik sel *BMSCs* yang dilabel dengan menggunakan PKH 26. Pendaran warna hijau pada gambar menunjukkan sebaran sel *BMSCs* yang sudah dilabel. Pada gbr A2-B2. Pendaran warna hijau terlihat lebih kuat pada kelompok hipoksia akut maupun kronis dibanding kelompok normoksia A1-B1

5.1.6 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi *Bcl2* pada kelenjar saliva tikus



Gambar 5.16 Gambaran perbandingan ekspresi *Bcl2* (coklat kromogen) diantara perlakuan. Pada slide diatas nampak bahwa kelompok yang dikondisikan hipoksia baik akut maupun kronis (A dan C) menunjukkan ekspresi *Bcl2* yang lebih kuat dibandingkan dengan kelompok normoksia baik akut maupun kronis (B danD) (pewarnaan *immuno histokimia*, Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel).

Tabel 5.8 Nilai rerata dan standar deviasi (SD) ekspresi *Bcl2* pada kultur *MSCs*

Kelompok	<i>Bcl2</i>		p
	Rerata	SD	
KN	23.600	5.176	0.000
KD	4.000	1.870	
HA	11.800	1.303	
HK	18.200	1.302	
NA	5.400	1.140	
NK	8.200	1.303	

* signifikan ($p < 0,05$)

Hasil uji Manova pada Tabel 5.8 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi Bcl_2 antar kelompok perlakuan.

5.1.7 Hasil pemeriksaan ELISA aktivitas ekspresi α amilase pada kelenjar saliva tikus

Tabel 5.12 Nilai rerata dan standar deviasi (SD) ekspresi α amilase pada kultur MSCs.

Kelompok	α amilase		p
	Rerata	SD	
KN	289259.000	18645.313	0.000
KD	95330.400	31503.973	
HA	186118.400	5971.156	
HK	331095.600	170273.0800	
NA	152088.200	6434.510	
NK	153023.600	11076.034	

* signifikan ($p < 0,05$)

Hasil uji Manova pada Tabel 5.12 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi α amilase antar kelompok perlakuan.

Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan transplantasi pada daerah defek kelenjar salivatikus akibat paparan radiasi dosis tunggal 15 Gy dengan menggunakan *Mesenchymal stem cells (BM-MSCs)* yang telah diberi prekondisi hipoksia dengan konsentrasi O_2 1%. Transplantasi MSCs dilakukan dengan cara injeksi secara langsung intraglandular ke daerah defek dan diberikan 24 jam setelah paparan radiasi atau diberikan pada kondisi akut.

BM-MSCs yang akan ditransplantasikan terlebih dahulu dilabel dengan PKH 26 untuk membuktikan bahwa sel *BM-MSCs* yang ditransplantasikan (*exogenous stem cells*) dapat tetap *survive* dan bermigrasi ke dalam jaringan kelenjar saliva yang mengalami defek. Sel *BM-MSCs* yang dilabel akan menghasilkan pendaran warna hijau pada jaringan yang ditransplantasikan. Pada hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa sel *BM-MSCs* yang telah diberi prekondisi hipoksia mempunyai kemampuan terapiutik yang lebih baik dibanding kondisi normoksia sehingga dapat menginduksi proses perbaikan sel. Hal itu dapat dilihat dari pendaran warna hijau dari gambaran mikroskopis jaringan kelenjar saliva yang lebih banyak menempati di bagian basal membran duktus. Hal itu menunjukkan adanya proses migrasi sel *BM-MSCs* di bagian basal membran dari duktus dan sel *acinar* yang banyak mengalami kerusakan akibat paparan radiasi. Distribusi *BM-MSCs* yang telah dilabel PKH 26 menunjukkan pendaran warna hijau terlihat lebih kuat pada kelompok hipoksia dibanding kelompok normoksia.

Hasil uji Manova pada Tabel 2.2 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi sel pada kelompok penelitian.

2.1.7. Hasil pemeriksaan FISH aktivitas ekspresi gen pada jaringan saliva kelenjar

Tabel 2.13 nilai rata-rata seluler positif ekspresi gen pada kelenjar saliva kelenjar

p	Kategori		Kelompok
	Kelompok	Kelompok	
0.000	11076.034	11082.000	KA
	6737.310	6712.000	KB
	731002.000	731002.000	LA
	731002.000	731002.000	LB
	31507.077	31507.000	LB
	18413.313	18413.000	LA

Signifikan ($p < 0.05$)

Hasil uji Manova pada Tabel 2.13 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi gen pada jaringan kelenjar saliva kelenjar.

Pada penelitian seluler positif dilakukan untuk mempelajari pada jaringan kelenjar saliva kelenjar. Rata-rata seluler positif ekspresi gen pada jaringan kelenjar saliva kelenjar pada kelompok KA sebesar 11076.034, kelompok KB sebesar 6737.310, kelompok LA sebesar 731002.000, dan kelompok LB sebesar 731002.000. Hasil uji Manova menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi gen pada jaringan kelenjar saliva kelenjar.

Manova yang akan digunakan untuk mempelajari perbedaan pada jaringan kelenjar saliva kelenjar adalah uji Manova yang digunakan untuk mempelajari perbedaan pada jaringan kelenjar saliva kelenjar. Pada hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa uji Manova yang dilakukan menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi gen pada jaringan kelenjar saliva kelenjar. Untuk mempelajari perbedaan pada jaringan kelenjar saliva kelenjar digunakan uji Manova yang digunakan untuk mempelajari perbedaan pada jaringan kelenjar saliva kelenjar. Pada hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa uji Manova yang dilakukan menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$) dari ekspresi gen pada jaringan kelenjar saliva kelenjar.

Selain itu dari hasil penelitian menunjukkan terdapat peningkatan yang cukup bermakna dari ekspresi SDF1-CXCR4, Bcl₂ dan Erk pada kelompok hipoksia dibanding kelompok normoksia yang diikuti dengan peningkatan secara bermakna terhadap ekspresi enzim α amilase yang diproduksi sel *acinar* sebagai penghasil saliva sebagai penanda terjadinya proses regenerasi kelenjar saliva. Hasil ini sekaligus membuktikan bahwa pemberian perkondisi hipoksia dapat meningkatkan kemampuan *BM-MSCs* untuk mempertahankan serta mengekspresikan

Efikasi dan potensi dari *MSCs* juga tergantung pada *time of delivery* atau waktu yang tepat pada saat ditransplantasikan, karena beberapa faktor seperti peradangan atau inflamasi mempunyai pengaruh yang cukup signifikan terhadap efikasi dan kemampuan *MSCs* dalam meregenasi jaringan yang rusak. Pada umumnya setiap kerusakan jaringan akan disertai dengan pelepasan faktor proinflamasi. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ada interaksi dua arah antara *MSCs* dan sel inflamasi, yang menentukan hasil proses perbaikan jaringan yang dimediasi oleh *MSCs*. Pada keadaan akut, diduga faktor inflamasi yang dihasilkan selama immune respon bertindak untuk mengaktifkan kapasitas immunosupresif *MSCs*. Sebaliknya, beberapa penelitian lain menyatakan bahwa *MSCs* kondisi tersebut menyebabkan *MSCs* tidak dapat mempertahankan kelangsungan hidup graft atau menekan GvHD secara *in vivo*. Oleh karena itu pada penelitian kali ini dilakukan untuk mengetahui waktu pemberian yang tepat dengan membandingkan hasil transplantasi *MSCs* pada kondisi akut (24 jam setelah radiasi) dan pemberian pada kondisi subakut/kronis (2 minggu setelah radiasi) pada kelenjar saliva yang defek akibat radiasi pengion melalui pemeriksaan ekspresi binding CXCR4-SDF1, Bcl₂, Erk dan enzim alpha amilase yang merupakan penanda terjadinya regenerasi sel *acinar* yang mensekresi saliva.

Pada hasil penelitian menunjukkan bahwa *MSCs* yang ditranplantasikan pada kondisi kronis atau 4 minggu setelah paparan radiasi menunjukkan penurunan jumlah sel *acinar* yang nekrosis pada kelenjar submandibula tikus dibanding pada kondisi akut. Selain itu juga menunjukkan peningkatan ekspresi ikatan CXCR4/SDF-1 yang bertanggung jawab terhadap proses migrasi dari sel *MSCs* yang ditransplantasikan serta peningkatan terhadap ekspresi Bcl₂ dan aktivitas enzim alpha amilase yang merupakan penanda terjadinya proses regenerasi pada kelenjar saliva.

selain itu ada hasil penelitian mengenai terapi rehabilitasi yang cukup banyak dan terdapat beberapa studi yang menunjukkan hubungan kelompok kontrol yang diberikan dengan peningkatan secara signifikan sebagai tempat dimana proses penelitian tersebut akan lebih baik dan lebih bermanfaat bagi penelitian-penelitian lainnya yang berkaitan dengan penelitian ini. Selain itu, penelitian-penelitian tersebut juga diharapkan dapat meningkatkan kemampuan WAWAW dalam

mempertahankan serta meningkatkan kemampuan bahasa yang dimiliki dan potensi lain yang dapat diaktakan pada WAWAW yang lebih dari 45% yang artinya dapat berkomunikasi dengan bahasa yang diucapkan atau dituliskan dan dapat memahami bahasa yang diucapkan atau dituliskan. Selain itu, penelitian-penelitian tersebut juga diharapkan dapat meningkatkan kemampuan bahasa yang dimiliki dan potensi lain yang dapat diaktakan pada WAWAW yang lebih dari 45% yang artinya dapat berkomunikasi dengan bahasa yang diucapkan atau dituliskan dan dapat memahami bahasa yang diucapkan atau dituliskan. Selain itu, penelitian-penelitian tersebut juga diharapkan dapat meningkatkan kemampuan bahasa yang dimiliki dan potensi lain yang dapat diaktakan pada WAWAW yang lebih dari 45% yang artinya dapat berkomunikasi dengan bahasa yang diucapkan atau dituliskan dan dapat memahami bahasa yang diucapkan atau dituliskan. Selain itu, penelitian-penelitian tersebut juga diharapkan dapat meningkatkan kemampuan bahasa yang dimiliki dan potensi lain yang dapat diaktakan pada WAWAW yang lebih dari 45% yang artinya dapat berkomunikasi dengan bahasa yang diucapkan atau dituliskan dan dapat memahami bahasa yang diucapkan atau dituliskan. Selain itu, penelitian-penelitian tersebut juga diharapkan dapat meningkatkan kemampuan bahasa yang dimiliki dan potensi lain yang dapat diaktakan pada WAWAW yang lebih dari 45% yang artinya dapat berkomunikasi dengan bahasa yang diucapkan atau dituliskan dan dapat memahami bahasa yang diucapkan atau dituliskan.

Sebagai kesimpulan dari penelitian ini, penulis berharap penelitian-penelitian tersebut dapat meningkatkan kemampuan bahasa yang dimiliki dan potensi lain yang dapat diaktakan pada WAWAW yang lebih dari 45% yang artinya dapat berkomunikasi dengan bahasa yang diucapkan atau dituliskan dan dapat memahami bahasa yang diucapkan atau dituliskan. Selain itu, penelitian-penelitian tersebut juga diharapkan dapat meningkatkan kemampuan bahasa yang dimiliki dan potensi lain yang dapat diaktakan pada WAWAW yang lebih dari 45% yang artinya dapat berkomunikasi dengan bahasa yang diucapkan atau dituliskan dan dapat memahami bahasa yang diucapkan atau dituliskan.

5.2. Luaran yang dicapai

1. Luaran yang dicapai pada saat ini adalah sebagian hasil penelitian telah dipublish ke jurnal *Veterinary World* yang terindeks Scopus (Q2) Vol 11, July 2018.
2. Hasil penelitian sebagian telah dipresentasikan pada seminar Internasional di Hiroshima Jepang pada bulan Maret 2018.
3. Hasil penelitian telah dipresentasikan pada seminar Internasional 32nd IADR –SEAA di Nang Dang Vietnam pada bulan September 2018.
4. Hasil penelitian telah disubmitkan di *European Journal of Dentistry* yang terindex Scopus (Q1) dan sedang direview.

2.2. Literatur yang dirujuk

1. Literatur yang dirujuk pada saat ini adalah sebagai berikut yang diambil dari *Journal Veterinary World* yang terbit pada 11 Juli 2018.
2. Hasil penelitian mengenai efek radiasi terhadap sistem peredaran darah pada ikan *Channa striata* dapat dilihat pada tahun 2018.
3. Hasil penelitian mengenai efek radiasi terhadap sistem peredaran darah pada ikan *Channa striata* dapat dilihat pada tahun 2018.
4. Hasil penelitian mengenai efek radiasi terhadap sistem peredaran darah pada ikan *Channa striata* dapat dilihat pada tahun 2018.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, menunjukkan bahwa MSCs yang ditranplantasikan pada kondisi kronis atau 4 minggu setelah paparan radiasi menunjukkan penurunan jumlah sel acinar yang nekrosis pada kelenjar submandibula tikus dibanding pada kondisi akut. Selain itu juga menunjukkan peningkatan ekspresi ikatan CXCR4/SDF-1 yang bertanggung jawab terhadap proses migrasi dari sel MSCs yang ditransplantasikan serta peningkatan terhadap ekspresi Bcl2 dan aktivitas enzim alpha amilase yang merupakan penanda terjadinya proses regenerasi pada kelenjar saliva.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai metode dan jalur administrasi stem cell ke dalam tubuh yang paling optimal.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai cara aplikasi dan cara penghitungan yang tepat terhadap jumlah sel yang dilabel PKH26 untuk mendapatkan gambaran yang lebih pasti mengenai jumlah sel yang viabel dan bermigrasike daerah defek.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai upaya induksi dan mobilisasi stem cell endogen mengingat hingga saat ini masih belum ditemukan metode administrasi yang tepat.



BAB 6

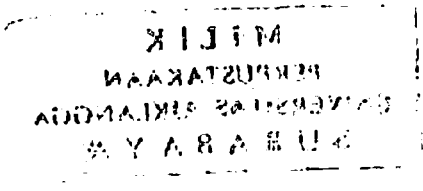
KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa XRT yang ditransplantasikan pada kondisi kronis atau akut dengan perawatan radasi menunjukkan penurunan jumlah sel seluler pada kelenjar ludah submandibular lebih dibanding pada kondisi akut. Selain itu juga menunjukkan peningkatan ekspresi protein C/EBPβ-1 yang bertanggung jawab terhadap proses inflamasi seluler yang ditransplantasikan in vivo pada kelenjar ludah. Hasil dan analisis statistik yang menunjukkan peningkatan terhadap faktor Bcl-2 dan ekpresi protein seluler yang menunjukkan adanya terjadinya proses regenerasi pada kelenjar ludah.

6.2. Saran

- 1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai metode dan jumlah seluler yang ditransplantasikan ke dalam tubuh yang lebih optimal.
- 2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai cara optimal dan cara penghindaran yang tepat terhadap jumlah sel yang diteliti PK150 untuk mendapatkan gambaran yang lebih baik mengenai jumlah sel yang hidup dan pertumbuhannya dalam tubuh.
- 3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai upaya hidup dan mobilisasi stem cell yang akan digunakan hingga saat ini masih belum ditemukan metode transplantasi yang tepat.





DAFTAR PUSTAKA

- Arrigo AP. 2005. In search of the molecular mechanism by which small stress proteins counteract apoptosis during cellular differentiation. *J Cell Biochem.* 94(2):241-6.
- Amerongen AVN.1991. Ludah dan kelenjar ludah, arti bagi kesehatan gigi, alih bahasa Abyono. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Alcaez TM, Naranjo SS, Jimenez C. 2001. Hypoxia induces the activation of the PI3K/Akt cell survival pathway in PC12 cells – protective role in apoptosis. *J Biol Chem.* 276:22368-74.
- Baum BJ, Zheng C, Cotrim AP, McCullagh L, Corine M, Goldsmith. Aquaporin-1 Gene Transfer to Correct Radiation-Induced Salivary Hypofunction. *Handb Exp Pharmacol.* 2009; 190: 403-418.
- Beer KT, 1998. Campaign against radio-xerostomia. *Ther Umsch.* 55(7):453-455.
- Bizzari A, Koehler H, Cajlakovic M, Pasic A, Schaupp L, Klimant I, Ribitsch V. 2006. Continuous oxygen monitoring in subcutaneous adipose tissue using microdialysis. *Analytica Chimica Acta.* 573:48-56.
- Carpenter HG and Cotroneo E. Salivary Gland Regeneration. In Tucker AS and Miletich I. *Salivary Gland : Development, Adaptations and Disease.* Renhardt Druck Publisher. 2010. Vol 14 : pp 107-128.
- Charette SJ, Lavoie JN, Lambert H, Landry J. 2000. Inhibition of Daxx-mediated apoptosis by heat shock protein 27. *Mol Cell Biol.* 20(20):7602-12.
- Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. 2001. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J.* 81: 685-696.
- Coppess RP and Stokman MA. Stem cells and the repair of radiation-induced salivary gland damage. *J. Oral Disease.* 2011 March; 17(2) : 143-153.
- D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC, 2006. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone.* 39:513-522.
- Dang Howard, Lin AL, Zhang B, Zhang HM, Katz MS and Yeh CK. A Role for Notch Signaling in Salivary Acinar Cell Growth and Differentiation. *Dev Dyn.* 2009 March ; 238(3) : 724-731.

- Denny PC, Ball WD and Redman Rs. 1997. Salivary Gland: A Paradigm for Diversity of Gland Development. 8:52.
- Dong Z, Wang JZ, Yu F. 2003. Apoptosis resistance of hypoxic cells: multiple factors involved and a role IAP-2. *Am J Pathol.* 163:663-71.
- Feng J, Van Zwaaq M, Stokma MA, Van Os R, Coppes RP. 2009. Isolation and characterization of human salivary gland cells for stem cell transplantation to reduce radiation-induced hyposalivation. *J.Radiotherapy & Oncology.* 92(3): 466-471.
- Friedlander RM, 2003. Mechanism of disease Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Disease. *The new england J of Med.* 1365-75.
- Goaz and White SS. 1994. Oral radiology principles and interpretation. St Louis-London-Toronto. Mosby Company. 24-28.
- Greijer AE. 2012. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol.* 57:1009-14.
- Guzy RD, Schumacher PT, 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol.* 91:807-819.
- Kagami H, Hishida S, Okazaki Y, Horie K, Oda Y and Ueda M, 2000. Salivary Growth Factors in Health and Disease. *Adv Dent Res.* 14:99-102.
- Kagami H, Wang S, Hai B. 2008. Restoring the function of salivary glands. *Oral Disease.* 14:15-24.
- Kermer P, Liman J, Weishaupt AH and Baer M, 2004. Neural apoptosis in neurodegenerative disease: from basic research to clinical application. *Neurodegenerative Dis.* (1):9-19.
- Kern S, Eichler H, Stoeve J, Beiback K. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical or adipose tissue. *Stem Cells.* 24:1294-1301.
- Kim KK, Kim R, Kim S. 1998. Crystal structure of a small heat shock protein. *Nature.* 394 (6693) : 595-9.
- Kim JY, Park JH. 2003. ROS-dependent caspase 9 activation in hypoxic cell death. *FEBS Lett.* 549:94-8.
- Krane CM, Fortner CN, Hand AR, McGraw DW, Lorenz JN, and Menon AG. 2008. Cloning and characterization of murin AQP5 : evidence for a conserved aquaporin gene cluster. *Mammalian Genome.* 2001. 10: 498-505.
- Lapidot T, Dar A, Koller O. 2005. How do stem cells find the way home?. *Blood.* 106:1901-1910.

Henry PC, Bull WB and Roberts R. 1997. *Cellular Growth: A Handbook for University of Gland Development* 8:23.

Dong X, Wang J, Yu F. 2002. *Epigenetic regulation of specific cells: multiple factors involved and a role for HAT-1 and TAF-1* 103:66 - 71.

Feng A, Van Zwam JI, Schmitt M, Zeng H, O. J. Cooper KR. 2009. *Isolation and characterization of human salivary gland cells for stem cell transplantation to reduce radiation-induced hypoxanthine thymidine phosphorylation (Oncology) 92(2): 400-411*

Friedlander RM. 2003. *Maintenance of disease-specific and changes in neural gene expression: The new paradigm of stem cell* 136:5-7.

Gottmann WD, Weiss SS. 1994. *Cell biology principles and implications: From stem cell to tissue* 22:1904.

Grigori AV. 2012. *The role of epigenetic inhibitor TAF-1 in the regulation of gene expression* 1 Clin Pathol 2: 1009-1011.

Guzk RD, Schmitt M, Yu F. 2006. *Epigenetic control of pluripotency in complex tissues: The importance of the repressed state of pluripotency during epigenetic reprogramming* 18:87-97.

Hegami H, Hoshida S, Okada T, Hara K, Oka Y, and Tachibana M. 2000. *Salivary Gland factors in Health and Disease* Adv Dent Res 13:99-107.

Kagan H, Wang J, Liu B. 2003. *Assessing the function of salivary gland-derived pluripotent stem cells* 14:1-21.

Kramer B, Eisman A, W. Stamer A, and Ben H. 2001. *Stem cell properties in nonembryonic tissues: Evidence from basic research to clinical applications* Stem Cell Res 1:139-147.

Lewis S, Richter H, Sheng J, Roberts R. 2006. *Genomewide analysis of non-coding RNA in human stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and placenta* Cells 24:1304-1307.

Kim H, Kim R, Kim S. 1998. *Clonal expansion of a small stem cell protein, Nt5g2, in the mouse embryo* 1:302-9.

Kim H, Park H. 2003. *ROS-dependent expression of pluripotency in specific cell death* 138:1: 34-44.

Lane DM, Eisman A, Hoshida S, Okada T, Hara K, Oka Y, and Tachibana M. 2008. *Cloning and characterization of human AQP2: evidence for a conserved aquaporin gene cluster* 4 J Nephrol 2001: 101-99-107.

Lipford T, Durr A, Keller C. 2007. *How do stem cells find the way home?* Blood 100:1907-1910.

- Lin CY, Chang FH, Chen CY, Huang CY, Hu FC, Huang WK, Chen MH. 2011. Cell Therapy for Salivary Gland Regeneration. *J.Dental Research*. February 4. 90(3): 341-346.
- Lin Yang, Chuan Hsiao, Hong Young. Comparison of PLGA, PCL and Chitosan in Salivary Gland Branching Morphogenesis. *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communication*.20(5): 287-296.
- Lombaert MA, Brunsting JF, Wierenga PK, Faber H, Stokman MA, Visser WH. 2008. Rescue of Salivary Gland Function after Stem Cell Transplantation in Irradiated Glands. *PloS ONE*.2008; 3(4):e2063.
- Marimoto RI, 1998. Regulation of The Heat Shock Transcription Response: Cross Talk between a Family of Heat Shock Factor and Negative Regulators. *Gens&Dev*. 12:3788-98.
- Monfort R, Slingsby C, Vierling E. 2001. Structure and function of small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperon. *Adv Protein Chem*. 59:105-56.
- Petreaca M and Green MM. 2007. The Dynamic of Cell-ECM Interaction. In Lanza R, Langer R, vacanti J. *Principles of Tissue Engineering*.3^{ed} . Elsevier Academic Press, Burlington.MA. Pp 81-92.
- Pradhan Swati, Zhang Chu, Ja Xinqiao, Carson DD, and Witt R. 2009. Perlecan Domain IV Peptide Stimulates Salivary Gland Cell Assembly in Vitro. *Tissue Engineering Part A*. 15(11): 3309-3320.
- Rantam, Ferdiansyah, Nasronudin and Purwati. 2009. *Stem Cell Exploration. Method isolation and culture*.First Ed. Airlangga University Press. Surabaya.
- Reddi AH. 2007. Growth Factors and Morphogenesis Signals for Tissue Engineering. In Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD.*Tissue Engineering*. CDR Press, Boca Rafon, London. Chapter 2.
- Rocheftort GY, Delorme B, Lopez A, Herault O, Bonnet P, Charbord P, 2006. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells*. 24:2202-08.
- Tang YL, Zhang YC, Qian LP, Shen and Philips MI. 2005. Improved Graft Mesenchymal Stem Cell survival in Ischemic Heart with a Hypoxia regulated heoxygenase1 vector. *J. Am.Coll.Cardiol*. 46:1339-1350.
- Sequera SJ, Larsen M, Devine T, 2010. Extracellular Matrix and Growth Factors in Salivary Gland Development. *Front Oral Biol*, Karger. 14:48-77.

Lin CY, Chang HJ, Chen CT, Huang CY, Hu FC, Huang WL, Chen KH. 2011. Efficacy of Salivary Gland Regeneration in Dental Research Laboratory. *J Dent Res* 90(11):241-246.

Lin F, Yang C, Han H, Liu J, Wang J, et al. 2011. Efficacy of stem cell transplantation in irradiated salivary gland. *Journal of Cellular Biochemistry* 102(5):287-293.

London MA, Brantley JE, Winters PK, Fisher H, Zinkman MA, Weiss WH. 2008. Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS ONE* 3(4):e2908. doi:10.1371/journal.pone.0029088

Mahimooti RA. 1998. Regulation of the Rat Salivary Gland Transcription Response to the between a Family of Heat Shock Factor and Negative Regulators. *Genes Dev* 12:2788-2798.

Maehara R, Zhang Y, Li Z, Wang H. 2001. Structure and function of small heat shock protein alpha-crystallin family of proteins. *European Journal of Biochemistry* 274(1):1-10.

Marshall CJ and Cohen MM. 2003. The Dynamics of the HNF1 Transcription Factor in Lung. *Development* 130(18):4191-4202.

Meijneke RW, Zhang Q, Liu J, Zeng J, Chen J, et al. 2009. Pediatric Bone Marrow Transplantation Stimulates Salivary Gland Cell Proliferation in Vulpes Laribus. *Transplantation* 87(11):1709-1716.

Meijneke RW, Zeng J, Zhang Q, Liu J, Wang J, et al. 2009. Stem Cell Transplantation Mediates Radiation-Induced Salivary Gland Regeneration and Functional Recovery. *Transplantation* 87(11):1717-1724.

Meijneke RW. 2007. Growth factors and biological signals for tissue formation in radiation-induced salivary gland regeneration. *Cellular Engineering* 7(2):103-110.

Meijneke RW, Nikolic AV, Bronkema CD. 2009. *Salivary Gland Regeneration*. CRC Press, Boca Raton, London, Chapter 2.

Meijneke RW, DeBorja H, Lopez A, Hwang G, Bonner J, et al. 2009. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells* 27(12):2502-2508.

Meijneke RW, Zhang Y, Chen H, Shi X, and Phillips ML. 2005. Improved Graft Revascularization of Stem Cell Survival in Ischemic Heart with a Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell. *Am J Cell Physiol* 188(1):139-147.

Meijneke RW, Zhang Y, Chen H, Shi X, and Phillips ML. 2005. Improved Graft Revascularization of Stem Cell Survival in Ischemic Heart with a Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cell. *Am J Cell Physiol* 188(1):139-147.

- Scheller EI, Krebsbach PH, and Kohn DH. 2009. Tissue engineering : state of the art in oral rehabilitation. *J.Oral Rehabil.* 36(5): 368-389.
- Taub R. 2004. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:836-847.
- Tran SD, Pillemer SR, Dutra A. 2003. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molocular study. *Lancet.* 361:1084-88.
- Yoon JG and Gores GJ, 2002. Death receptor apoptosis and the liver .*J Hepatol.* (37).

Lampiran 1. Jurnal Veterinary World yang terindeks Scopus (Q2) Vol 11, July 2018 (published)

Veterinary World, EISSN: 2231-0916
Available at www.veterinaryworld.org/Vol.11/July-2018/13.pdf

RESEARCH ARTICLE
Open Access

Hypoxic preconditioning effect on stromal cells derived factor-1 and C-X-C chemokine receptor type 4 expression in Wistar rat's (*Rattus norvegicus*) bone marrow mesenchymal stem cells (*in vitro* study)

Sri Wigati Mardi Mulyani¹, Diah Savitri Ernawati², Eha Renwi Astuti³ and Fedik Abdul Rantam^{1,4}

1. Department of Dentomaxillofacial Radiology, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; 2. Department of Oral Medicine, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; 3. Stem Cell Research Center and Development, Airlangga University Surabaya, Indonesia; 4. Lab of Virology and Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

Corresponding author: Diah Savitri Ernawati, e-mail: diah-s-e@fkg.unair.ac.id

Co-authors: SWMM: sri-w-m-m@fkg.unair.ac.id, ERA: eha-r-a@fkg.unair.ac.id, FAR: fedik-a-r@fkh.unair.ac.id

Received: 25-01-2018, **Accepted:** 04-06-2018, **Published online:** 19-07-2018

doi: 10.14202/vetworld.2018.965-970 **How to cite this article:** Mulyani SWM, Ernawati DS, Astuti ER, Rantam FA (2018) Hypoxic preconditioning effect on stromal cells derived factor-1 and C-X-C chemokine receptor type 4 expression in Wistar rat's (*Rattus norvegicus*) bone marrow mesenchymal stem cells (*in vitro* study), *Veterinary World*, 11(7): 965-970.

Abstract

Aim: To examine the effect of hypoxic preconditions on the ability of bone marrow stem cells culture mediated expression C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) and stromal cells derived factor-1 (SDF-1) *in vitro*.

Materials and Methods: Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were derived from 12 femurs of 200 g Wistar male rats. The animals were euthanized before BMSCs isolation. BMSCs were divided into two groups, control group: Normoxic condition 21% O₂, and treatment group: Hypoxic condition 1% O₂. The characterization of BMSCs was analyzed using flow cytometry by cluster differentiation 34 and cluster differentiation 105. The expression of CXCR4 and SDF-1 measured using immunocytochemistry immunofluorescence label after 48-h incubation in a low-tension oxygen chamber with an internal atmosphere consisting of 95% N₂, 5% CO₂, and 1% O₂. All data were subjected to a normality test and then analyzed using t-test statistic (p<0.05).

Results: The characterization of bone marrow stem cells showed positive cluster differentiation 34 and cluster differentiation 105. A hypoxic precondition (1% O₂) in culture increases CXCR4 (p=0.000) and SDF-1 expression than normoxic conditions (p=0.000) (p<0.05).

Conclusion: Hypoxic preconditioning with 1% O₂ increase CXCR4 and SDF1 expression.

Keywords: bone marrow stem cells, C-X-C chemokine receptor type 4, hypoxic preconditioning, mesenchymal stem cells, stromal cells derived factor-1.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) constitute a population of adult stem cells that can transdifferentiate not only into types of mesodermal lineage cells but also into multilineage cell types [1]. Preliminary studies have shown that MSCs are capable of producing a range of cytokines and growth factors such as basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor (VEGF). In addition, there is another factor that significantly influences the success of therapy by inducing stem cells to migrate into defective areas. The other factors that can mediate such migration are stromal derived-cell factor 1 (SDF1) and C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) [2].

SDF-1 is a small molecule of chemokines which, by binding with a CXCR4 receptor, executes an

important role in regulating the adhesion, expansion, migration, and homing of MSCs. A recent study indicates that CXCR4 and SDF-1 are highly expressed in bone marrow MSCs (BMSCs), but is lost on culturing at a high passage number. Under hypoxic conditions, a number of cytokines, chemokines including CXCR4 and SDF-1 expression can be re-established, thereby maintaining the efficacy of MSCs. The survival and proliferation of transplanted progenitor cells in tissue would require cell adaptation to the harsh, low oxygen tension environment [3]. The previous study demonstrated that hypoxia preconditioning can increase the ability of transplanted stem progenitor cells to survive and proliferate ability *in vitro* [4]. Hypoxia preconditioning mimics the situation that the cells will meet when they are transplanted into the tissue defect. Accordance to the previous study demonstrated that Hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 α), CXCR4, anti-apoptotic gene Bcl-2, p-Akt, SDF-1 α , and VEGF expression were all elevated after hypoxia preconditioning and were further verified by increased anti-apoptosis and migration capacity *in vitro* and decreased apoptosis and better cardiac rescue potency *in vitro*. However, the mechanisms

Copyright: Mulyani, et al. Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Veterinary World, EISSN: 2231-0916

965



underlying the beneficial effects of hypoxia preconditioned progenitor cells remain incomplete [5].

The aim of this study was to examine the effect of hypoxic preconditions on MSCs culture to expression CXCR4 and SDF-1 *in vitro*.

Materials and Methods

Ethical approval

All animal studies were performed through a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga and complied with the National Research Council's guidelines ethical approval number: No 366-KE through the ethical seminar. The research was conducted at an experimental laboratory within the Stem Cell and Tissue Engineering Development Centre, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

Animal model

All animals were housed in polycarbonate cages, subjected to a 12-h light-dark cycle at the constant temperature of 23°C, and fed a standard pellet diet (expanded pellets, Stepfield, Witham, Essex, UK) with tap water *ad libitum*. The exploration of MSCs involved the use of 200 femurs from 12 Wistar male rats. The sampling technique of the BMSCs from the rat's femurs was determined by Lemeshow's method. The animals were euthanized before Bone Marrow isolation.

BMSCs isolation

BMSCs isolation and culture according to Rantan *et al.*'s [6] method aspirate from femur bones produces sufficient marrow to be cultured. Aspirate of bone marrow was attached to a 15 ml Heparin tube (Sigma-Aldrich', USA) previously filled with 3 ml α -minimum essential medium (MEM). Each aspirate was transferred to a 15 ml sterile tube with a blue cap and diluted with 1 \times phosphate buffer saline (PBS) (Sigma-Aldrich', USA) sterile to a total volume of 8 ml. Each tube was then rinsed twice with 5 ml \times PBS, and the contents were combined with an aspirate solution. In every case, the aspirate was placed in a Ficoll (Sigma-Aldrich', USA) temperature chamber in a separate 15 ml tube. Furthermore, each aspirate was coated with Ficoll before being centrifuged (SorvallTM MX Series Floor Model Micro-Ultracentrifuge, Thermo Fisher, USA) at 1600 rpm for 15 min at room temperature. After centrifugation, the collection was effected at the "buffy coat" location on the surface of Ficoll-PBS using a sterile Pasteur pipette and placed in a 15 ml tube (Sigma-Aldrich', USA).

Each sample was diluted with 1 \times PBS to a total volume of 15 ml, with the tube being turned 3-5 times as a means of achieving an even mix. At the next stage, centrifugation was undertaken for 10 min at a speed of 1600 rpm before the supernatant and cells suspended in 6 ml of cell culture medium (CCM) were removed before heating. Having placed between 5 cm² and

10 cm² of cells on the plate, they were incubated at 37°C at 5% CO₂ moisture and allowed to attach to the cell for 18-24 h. Approximately 24 h later, the media and cells not attached were disposed of. 5 ml 1 \times PBS was then added before being heated in the culture, shaken well and used to cover the surface area. It was then disposed of with 1 \times PBS before the washing process being repeated twice.

Ten minutes later, 10 ml of fresh CCM was added to the dish before it was returned to the incubator. The cells were incubated at 37°C and 5-10% CO₂ moisture with the culture being observed daily using an inverted microscope. Every 3 days, the media were removed and the cells rinsed with 5 ml or 10 ml of 1 \times PBS before heating. The PBS was subsequently discarded and the dish filled with 10ml of fresh CCM. This process was continued until the concentration of confluent cells reached between 60% and 80%. If the cell developed in the cell plant, the latter had to be balanced in the incubator at 5% CO₂ moisture and 37°C for 48 h before use.

BMSCs identification surface markers by flow cytometry

BMCs were harvested by centrifugation at the end of coculture and made in single cells before flow cytometry analysis. The cells are then incubated in test tubes or microtiter plates with unlabeled or fluorescently conjugated antibodies and analyzed through flow cytometry (Becton Dickson FACSVerser, San Diego, USA). MSCs were trypsinized for identification of a number of MSC surface markers, approximately 2 \times 10⁵ cells per sample were washed twice with PBS. The antibodies for surface markers were anti-CD34 - Allophycocyanin (Cat no 1345804) anti-CD105 Fluorescein Isothiocyanate (FITC) (Cat. No 561443) (Becton Dickson Pharmingen, San Diego, USA).

BMSCs culture

Bone marrow samples were dissolved in three equal volumes of the MSC growing medium and distributed uniformly across 10 cm culture dishes. Each dish produced 10 ml of diluted aspirate. Stored in an incubator (Thermo Scientific Heraeus, USA) with 5% CO₂ and cultured at a constant temperature of 37°C for 4-5 days. The medium was replaced every 3-4 days, and the contamination of red cells and unreplicated, unattached cells were eventually diluted and rinsed to eradicate it.

Small MSC colonies of fibroblast cells were attached and perceptible within 5-7 days. After 12-14 days, small colonies could easily be detected. In this condition, cells were rinsed with serum-free α -MEM and subculture. 5 ml of 0.05% trypsin was added and, after a few minutes, cells began to be dispatched from the substrate. Dial the observations under a microscope (JEOL, JSMT1000, Scanning Microscope, Japan). The trypsin ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma-Aldrich', USA)

solution could be carefully aspirated and removed as long as the full cells had not been delivered. If the removal of cells from the substrate had begun, a fresh growing medium containing fetal bovine serum was added which eliminated trypsin activity. The MSCs were then flushed from the surface with a flask grower incorporating a pipette and divided into two dishes at this stage of low concentration and then rapidly expanded. Each dish was filled with 10 ml of cell susceptibility before being placed in 5% CO₂ incubator. BMSCs were divided into two groups: control group: Normoxic condition 21% O₂, and treatment group: hypoxic condition 1% O₂.

Hypoxia preconditioning

Hypoxia was achieved by placing the cells in a Modular Incubator Chamber (Billups-Rothenberg, Del Mar, CA) according to the manufacturer's instructions. After a brief time spent in the chamber, the cells were flushed with a mixture of 0.1% O₂, 5% CO₂, and 94.9% N₂ for 5 min. The chamber was then closed and the cells incubated at 37°C for various lengths of time. Next, the cells were cultured under normoxic or hypoxic conditions for 3 h, 6 h, 12 h, and 24 h.

Identification of CXCR4 and SDF-1 expression by immunofluorescence

Trypsin was added and centrifuged at 1600 rpm for 5 min. The pellets were added to 1 ml of α -MEM growth medium (Sigma-Aldrich[®], USA), suspended and grown on a special glass of 20 μ l. The object glass was placed in a box containing wet paper and then incubated at 37°C for 1 h before being washed 4 times with PBS and dried. Anti-CXCR4 (Cat No. MAB172) and anti-SDF-1 (Cat No. MAB350) monoclonal antibodies (Sigma Aldrich[®], USA) were added to each sample and then incubated at 37°C for 45 min. After that, the PBS washing and drying processes were repeated. At the next immunofluorescence, FITC labeled examination on glass object and viewed the results with a fluorescence microscope (Automated Fluorescence Microscope, BX63, Olympus[®], USA).

Statistical analysis

Data in normal distribution were analyzed using a t-test. Statistical analysis was analyzed using of Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 17.0 software for windows 8.1 by SPSS Inc., Chicago, United States.

Results

Flow cytometry analysis of BMSC phenotypes and BMSC cultures treated with hypoxic preconditioning was expressed more strongly at CD105 (70.07%) than the normoxic condition (26.12%) and CD34 expression negatively in both conditions (Figure-1). The mean of SDF-1 and CXCR4 expression significantly expressed in hypoxic preconditioning group than normoxic. The t-test result indicated a significant difference (p<0.05) between the SDF1 C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12) expression between groups (Figure-2 and Table-1). The t-test result demonstrated that there was a significant difference (p<0.05) between CXCR4 expressions of the hypoxic preconditioning group and the normoxic group (Figure-3 and Table-2).

The immunofluorescence of SDF-1 expression result showed the normoxic condition (O₂ 21%) to be weakly expressed but more strongly so after a 48-h hypoxic precondition (O₂ 1%) (Figures-4 and 5). The immunocytochemical of CXCR4 expression result showed weakly expressed in normoxic condition (O₂ 21%) but strongly expressed (chocolate chromogen) in hypoxic condition (O₂ 1%) (Figure-6).

Discussion

The important factor in cell-based regenerative therapy is the ability of stem cells to migrate to the defect areas through trafficking and successful engraftment when stem cells are transplanted. This is strongly influenced by the CXCR4 chemokine receptor bond with the SDF-1 ligand chemokine. The loss of this chemokine receptor during expansion *in vitro* culture will decrease the regenerative ability of stem cells [7]. The culture environment affects cell aging and expression of the chemokine marker that plays

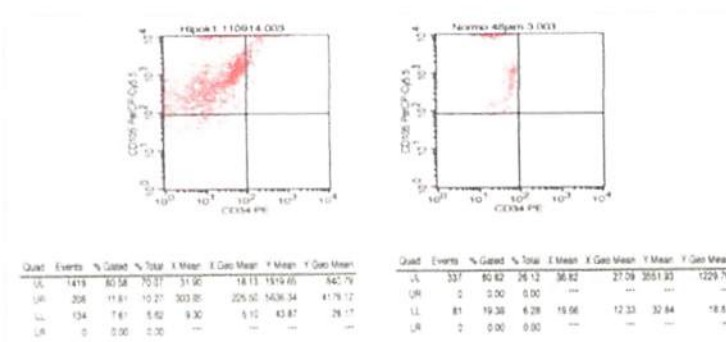


Figure-1: Phenotypic characterization of bone marrow mesenchymal stem cells identified by flow cytometry examination.

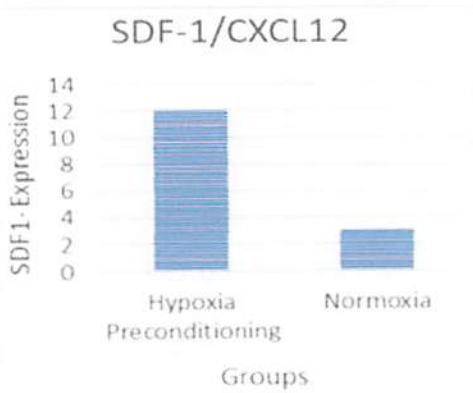


Figure-2: The mean of stromal cells derived factor-1/C-X-C motif chemokine 12 expressions in bone marrow mesenchymal stem cells cultured in both hypoxia preconditioning and normoxia group.

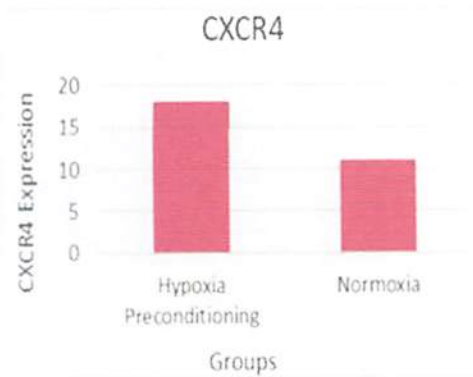


Figure-3: The mean of C-X-C chemokine receptor type 4 expression in mesenchymal stem cells cultured in both hypoxia preconditioning and normoxia group with ICC examination.

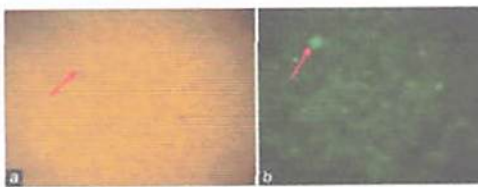


Figure-4: The expression of stromal cells derived factor-1 at 4th passage in a normoxic group with 100 \times magnification. (a) Mesenchymal stem cells without filter; (b) with fluorescent filter (NikkonH600L Microscope; digital camera DS Fi2 300 megapixel).

an important role in migratory cells and engraftment when MSCs are transplanted. These problems can be minimized by modifying the microenvironment in stem cell culture by providing precondition of hypoxia with the oxygen concentration in accordance with its niche environment (O₂ 1-3%) [8].

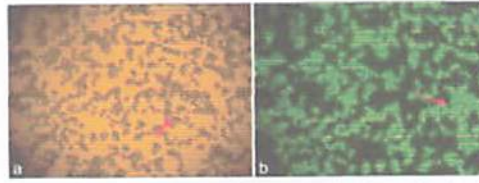


Figure-5: The expression of stromal cells derived factor-1 at 4th passage in hypoxic preconditioning group with 100 \times . (a) Mesenchymal stem cells without filter; (b) with fluorescence filter (NikkonH600L Microscope; digital camera DS Fi2 300 megapixel).

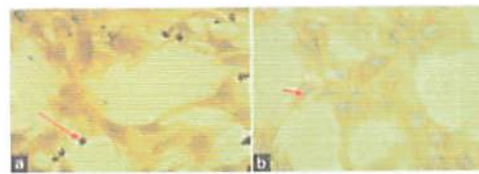


Figure-6: C-X-C chemokine receptor type 4 expression (chocolate chromagen) on the mesenchymal stem cell hypoxic preconditioning group (a) showed strong expression, whereas the normoxic group demonstrated weak expression (Slide B) with immunocytochemistry with 400 \times (NikkonH600L Microscope; digital camera DS Fi2 300 megapixel).

Table-1: T-test result of SDF-1 expression in BMSCs culture hypoxic preconditioning and normoxic groups.

Group	SDF-1 Mean \pm SD	Significant
Hypoxic	11.677 \pm 2.447	p=0.000*
Normoxic	3.517 \pm 0.969	

*Significant (p<0.05). SDF-1=Stromal cells derived factor-1, BMSCs= Bone marrow mesenchymal stem cells, SD=Standard deviation

Table-2: T-test result of CXCR4 expression in BMSCs culture hypoxic preconditioning and normoxic groups.

Group	Mean \pm SD	P
Hypoxic	18.200 \pm 5.596	0.000*
Normoxic	10.750 \pm 5.748	

*Significant (p<0.05). BMSCs= Bone marrow mesenchymal stem cells, SD=Standard deviation, CXCR4=C-X-C chemokine receptor type 4

MSCs are known to have some beneficial properties such as being found in BMSCs [9]. Previous studies reported the ability of MSCs to secrete cytokines, chemokine, and growth factors in cultured cells which play an important role in the regeneration process such as SDF-1, CXCR4, VEGF, fibroblast growth factor, and insulin-like growth factor. These factors contribute to the migration cell process, survival cells, angiogenesis, cell proliferation, and differentiation that relates to tissue repair and regeneration [10].

The decreased potential of MSCs *in vivo* may be due to cell culture conditions and the total subcultures performed. Sohn and Verfaillie [11] revealed that the

higher the number of passages made in a stem cell culture will decrease the potential for differentiation, viability, and effectiveness. Previous studies reported that term culture (40 days) will lead to loss of chemokine receptor expression followed by decreased expression of specific surface receptors (CD105 and CD90). Therefore, it can be concluded that MSCs require microenvironment to maintain their viability and plasticity [12]. Several studies suggest that hypoxic preconditioning will activate some transcription factors in the nucleus such as HIF-1 α , nuclear factor kappa β , Wnt4, and miR210, where these will also interact with paracrine factors such as MEK, PI3K, Erk, and Akt that will increase the secretion of SDF-1 and CXCR4 expression [13].

One of the primary functions of the SDF1-CXCR4 is the trafficking regulation of MSC cells in homing in on the injury site [14]. The previous study demonstrated that MSC therapy to mice that produced a defect in their brains suggested that the migration process from MSCs to defective areas is probably mediated by chemokine and their receptors SDF1-CXCR4 through the mechanism of MSC's trafficking G-protein-coupled receptor signaling. SDF1-CXCR4 also plays a role in cellular retardation, proliferation, and differentiation mechanisms by MAPK PI3K signaling pathway through increased expression of BCL2 and ERK [15].

In this study was to determine whether hypoxia preconditioning can improve the expression of chemokine receptors and ligand (CXCR4-SDF-1) in cells culture. BMSCs were taken from the femur of male Wistar rat and are cultured in hypoxic conditions (O₂ 1%) at the 4th passage and compared with normoxic condition (O₂ 21%). The phenotypic characterization of MSCs using by flow cytometry in hypoxic condition showed strong expression of CD 105 compared to normoxic condition, the specific surface marker of MSCs and negative expression of CD 34 in both conditions, the specific marker of hematopoietic stem cells. It was assumed that the cell culture in hypoxic condition has purely isolated of MSCs than normoxic condition cell culture (Figure-1). The result of an examination on the effect of hypoxic precondition in the cell culture using immunofluorescence and immunocytochemical indicated strongly expressed of SDF-1 and CXCR4 after 48 h hypoxic precondition compared to the normoxic condition.

It was in accordance with Yellowley that revealed under hypoxic condition a number of cytokines, chemokines including CXCR4 and SDF-1 expression can be reestablished, so the efficacy of MSCs can be maintained. The expression of the transcription factor hypoxia-inducible factor-1, α -subunit (HIF-1 α), may drive the upregulation of SDF-1 CXCL12 in hypoxic condition and ultimately regulate the homing of CXCR4 stem cells and progenitor cells. Under hypoxic conditions, the activity of PHD2 is

reduced, and HIF-1 α degradation is inhibited; HIF-1 α accumulates and binds to its consensus sequence, the hypoxia-responsive element on HIF-1 α target genes. 63 HIF-1 α has been shown to induce the expression of SDF-1 and CXCR4. Finally, when MSCs transplanted can improve the ability of MSCs to migrate into defected tissues, proliferate, and differentiate into origin-like cells, and promote resident stem cells growth and proliferation.

Conclusion

Hypoxic preconditioning 1% O₂ can promote increasing CXCR4 and SDF1 expression that may play an important role to improve BMSCs migration into defect areas, proliferation, and differentiation into origin-like cells.

Author's Contributions

SWMM, DSE, ERA, FAR: Conception and design of the study. SWMM, DSE, ERA, FAR: Acquisition of data. SWMM, DSE, ERA, FAR: Analysis and interpretation of the data. SWMM, DSE, ERA, FAR: Drafting and revising the manuscript critically for important intellectual content. SWMM, DSE, ERA, FAR: All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia. This laboratory work was supported by grants from DIPABO. The authors would like to thank Universitas Airlangga and Stem Cell and Tissue Bank Center RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Indonesia. The research grant is funded by Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) 2017 DIPADIRPM Research, Technology and Higher Education Ministry of Indonesia. Letter of Appointment Agreement of Research Program number: 137, PUPT, thp-1 2017; 586, UN3 2017 May 12, 2017.

Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

- 1 Pratheesh, M. D., Dubey, P. K., Nath, A., Gade, S. E., Kumar, R., and Sharma, G. J. (2011) Mesenchymal stem cells and it's Characterization. *Vet World*, 4(12): 571.
- 2 Safitri, I., Utama, S., Bumi, C., Mulyani, S.W.M., Retnowati, F., Prasetyo R.H., Mas'ud, H., Auliaman, A., Feidiansyah, M. and Jodik, A.R. (2014) Hypoxic preconditioning for viable and self-renewing mesenchymal stem cells (MSCs) as the regeneration of spermatogenesis process. *Id. An. Ippsi Sci.*, 8: 42-47.
- 3 Khan, M., Kwiatkowski, P., Rivera, B.K. and Kuppasamy, P. (2010) Oxygen and oxygenation in stem-cell therapy for myocardial infarction. *Life Sci.*, 87: 269-274.
- 4 Chacko, S.M., Ahmed, S., Selvendiran, K., Kuppasamy, M.I., Khan, M. and Kuppasamy, P. (2010) Hypoxic preconditioning induces the expression of pro-survival and proangiogenic markers in mesenchymal stem cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 299: C1562-C1570.

Lampiran 2. Hasil penelitian sebagian telah dipresentasikan pada seminar Internasional di Hiroshima Jepang pada bulan Maret 2018 (Proceeding dan sertifikat)



7th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry



“Diversity in Oral Science Research”



Itsukushima Shrine: Bugaku dancer (Court dance and music)
Photo Courtesy of Hiroshima Prefecture



Hiroshima University School of Dentistry

C-1 Hypoxic Precondition Induces SDF-1 -CXCR4 Expression in Bone Marrow –Derived Mesenchymal Stem Cells Culture

Sri Wigati Mardi Muljani¹, DiahSavitri Ernawati² and EhaRenwi Astuti¹

¹ Departement of Dentomaxillofacial Radiology

² Departement of Oral Medicine, Faculty of Dentistry Airlangga University, Surabaya-Indonesia,
Jl. Prof.Dr. Moestopo 47 Surabaya, E-Mail: swigati.nina@gmail.com

Mesenchymal Stromal Stem Cells (MSCs) constitute a population of adult stem cells that have the ability to transdifferentiate. Stromal Derived-Cell Factor 1 (SDF1) and C-X-C Chemokine Receptor Type 4 (CXCR4) are important factors that influence stem cell capability to migrate into a defective area and play a significant role in regulating the adhesion, expansion, migration and homing of MSCs. CXCR4 and SDF-1 are both strongly expressed in bone marrow MSCs, but are lost upon culturing with a high passage number. Nevertheless, under hypoxic conditions certain cytokines, CXCR4 and SDF-1 expression can be re-established and maintained.

AIM : to examine the effect of hypoxic preconditions on the ability of MSCs culture mediated expression CXCR4 and SDF-1.

METHODS : MSCs was derived from the femurs of 200 gr Wistar male rats. Stem cell culture was performed in hypoxic conditions (1%O₂) and the expression of CXCR4

and SDF-1 measured by using immunocytochemistry, ELISA and immunofluorescence after 48-hour incubation in a low tension oxygen chamber with an internal atmosphere consisting of 95% N₂ 5% CO₂ and 1% O₂. All data were subjected to a normality test and then analyzed by means of Manova statistic (p<0.05).

RESULTS : a hypoxic precondition (1%O₂) in MSCs culture increases CXCR4 and SDF-1 expression more than normoxic condition

CONCLUSION : a hypoxic precondition with 1% O₂ can promote increasing CXCR4 and SDF1 expression that may play a important role in improving MSCs migration into defective areas, proliferation and differentiation into origin-like cells and resident stem cells growth.

Key words : Bone Marrow Stem Cells, Mesenchymal Stem Cells, Hypoxic Precondition, CXCR4, SDF-1, Homing Factors

7th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry
at Koujin Conference Hall, Kasumi Campus, Hiroshima University on
March 29-30, 2018

Certificate of Attendance and Presentation



Presents to

Dr. Sri Wigati Mardi Muljani

This is to certify that the above person has attended the conference and
successfully delivered her presentation based on her abstract.

Dr. Koichi Kato, Ph.D.

President of the Organizing Committee
7th Hiroshima Conference on Education and
Science in Dentistry
Dean, School of Dentistry
Professor and Chair, Department of Biomaterials
Graduate School of Biomedical & Health Sciences
Hiroshima University



Official Seal

Date: April 12, 2018

TRAVEL AWARD



Presents to

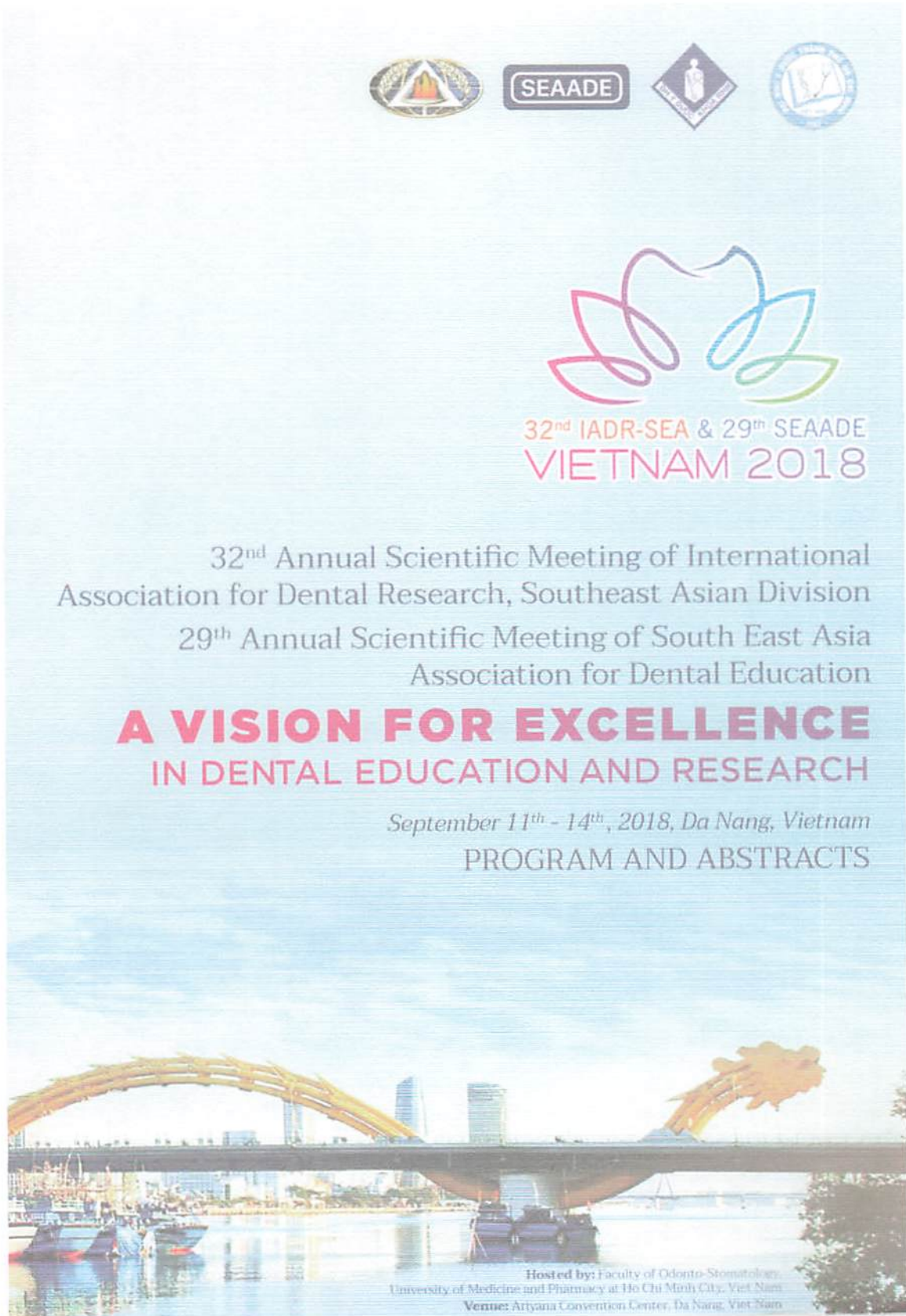
Dr. Sri Wigati Mardi Muljani

the recognition of the outstanding abstract
for 7th Hiroshima Conference
on Education and Science
in Dentistry
on March 29 - 30, 2018

加藤 功一

Professor Koichi Kato
President, 7th Hiroshima Conference on Education and Science
in Dentistry
Dean, School of Dentistry, Hiroshima University

Lampiran 3. Hasil penelitian akan dipresentasikan pada seminar Internasional 32nd IADR –SEAA di Nang Dang Vietnam pada bulan September 2018 (Proceeding dan Sertifikat)





0231

Prostacyclin Promotes Human Dental Pulp Cells Migration Via Matrix Metalloproteinase-9-Related Pathway

Chalida Limjeerajarus¹, Sonntana Seang², Prasit Pavasant¹

¹Department of Physiology, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, ²Graduate School of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, ³Department of Anatomy, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

Objectives Dental pulp healing is the crucial event for dental pulp regeneration. This study investigated the role of prostacyclin (PGI₂) on promoting human dental pulp cells (HDPCs) migration.

Methods The wound scratch assay was performed on HDPCs. The HDPCs were treated with PGI₂ for 24 and 72 h. The qPCR gene analysis and ELISA were performed. The inhibitor of PGI₂ (IP) receptor and protein kinase A (PKA) signaling pathway was performed by the treatment of IP antagonist/PKA inhibitor.

Results The closure of a mechanical scratch in HDPCs in cell culture was accelerated and reduced the wounded area at 72 h upon the treatment of iloprost. The increase of MMP-9 mRNA and protein expression in HDPCs was observed and these effects were inhibited by PKA-inhibitor. Upon the activation of forskolin, the MMP-9 expression was upregulated.

Conclusions PGI₂ accelerated wound closure in the scratch test assay in HDPCs. The expression of MMP-9 is increased by iloprost by the IP-PKA pathway. These observations suggested that PGI₂ can stimulate wound healing through the enhanced production of MMP-9. The treatment of PGI₂ might be another promising biomolecule in dental pulp regenerative treatments.

0232

Dlx5-Augmentation in Neural Crest Cells Induced Calvarial Ectopic Cartilages.

Tri H. Vu¹, Masaki Takechi¹, Miki Shimizu², Taro Kitazawa², Hiroki Higashiyama², Hiroki Kurihara², Sachiko Iseki¹

¹Molecular Craniofacial Embryology, Tokyo Medical and Dental University, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo, Japan, ²Department of Physiological Chemistry and Metabolism, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Objectives *Distal-less homeobox (Dlx)* genes are essential for craniofacial skeletal patterning. This research is to propose the *Dlx5* functions in bone and cartilage development in the calvarium.

Methods *Wnt1 Cre; Rosa26^{lacZ}* (*NCC-Dlx5*) mice in which *Dlx5* is continuously expressed in the neural crest cell (*NCC*) lineage were used. *In situ* hybridization (ISH), alizarin red & alcian-blue skeletal staining, hematoxylin & eosin (H&E)

staining, toluidine blue staining, and transmission electron microscopic (TEM) analyses were performed.

Results Endogenous expression of *Dlx5* in the distal part of mandibular arch, otic vesicle and some parts of the brain at the embryonic day (E) 10.5 wild-type mouse was confirmed by ISH. Then, it was first detected in a certain population of *NCC*-derived head mesenchyme between the surface ectoderm and the future meningeal mesenchyme at E11.5. In *NCC-Dlx5* mice, low levels of expression of *Dlx5* was found in *NCC*-derived mesenchyme in craniofacial subregions that normally lack *Dlx5* expression. Subsequently, a striated ectopic cartilage formation was found in the frontal bone forming area from the lateral side of the head to the apex crossing the midline at E13.5. At E18.5, the apically expanded mineralized frontal bone and the ectopic cartilage overlapped at the posterior part of the frontal bone, prior to the coronal suture. Semi-thin sections and TEM observations demonstrated that the ectopic cartilage seemed to form in the dura mater layer of the meninges, underneath the developing frontal bone.

Conclusions The augmented expression of *Dlx5* in the *NCC* resulted in ectopic cartilage formation in a certain part of the meninges that covers the cerebral hemisphere. This observation suggests heterogeneity of head mesenchyme in response to *Dlx5* expression.

0233

Tranplantation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell for Acute Xerostomia due to Ionized Radiation

Sri Mardimulyani¹, Eha R. Astuti¹, Diah S. Ernawati²

¹Dental Radiology, Faculty of Dental Medicine, Surabaya, East Java, Indonesia, ²Oral Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia

Objectives The purpose of study was to explain the mechanism of regeneration of salivary gland defect due to ionizing radiation by BM-MSCs transplantation that have been given hypoxic precondition with 1% of O₂ concentration.

Methods This research was a true experimental post test control group design. The exploration of BM-MSCs was isolated from femur of Wistar male rats. Stem cell culture was performed in normoxic condition (O₂ 21%) and hypoxic conditions by 48 hour incubation in low oxygen tension chamber consisting 95% N₂, 5% CO₂ and 1% O₂. A total of 30 male Wistar rats were divided into six groups: two groups of control (normal and defect group), and four groups of treatment. All treatment groups were defected in the salivary glands by exposure with a single dose of 15 Gy radiation in the ventral of the neck region. BM-MSCs transplant was given in the treatment groups for normoxia and hypoxia after 24 hours (acute phase) post radiation. The regeneration process of salivary gland defect were determined after 4 weeks post BM-MSCs transplantation by expression of a number of chemokines and protein such binding SDF1-CXCR4, Bcl₂, Erk on the tissue by Immunohistochemistry methods and the activity of enzyme

154



International Association for Dental Research
Southeast Asian Division



32nd IADR-SEA & 29th SEAADDE
VIETNAM 2018

CERTIFICATE OF PRESENTATION

This is to certify that you have poster presentation at
The 32nd IADR-SEA Division Annual Scientific Meeting
Held on September 13th - 14th, 2018, Da Nang, Vietnam

SRI WIGATI MARDI Mulyani

Assoc. Prof. Ngo Thi Quynh Lan
Chairperson of LOC

Prof. Chun-Pin Lin
President of IADR-SEA

Lampiran 4. Hasil penelitian akan disubmitkan di jurnal Internasional yang terindex Scopus (draft)

XEROSTOMIA THERAPY due to IONIZED RADIATION USING PRECONDITIONED BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

Sri Wigati Mardi Mulyani¹, Eha Renwi Astuti¹, Otty Ratna Wahyuni¹, Nastiti Faradilla Ramadhani¹

¹Departement of Dentomaxillofacial Radiology Faculty of Dentistry Airlangga University Surabaya - Indonesia
Jl. Prof.Dr. Moestopo 47
Surabaya Email.

Correspondence : Sri Wigati Mardi Mulyani, Departemen of Dentomaxillofacil Radiology Faculty of Dentistry Universitas Airlangga Jl. Prof.Dr. Moestopo 47 Surabaya Indonesia. Email. swigati.nina@gmail.com

ABSTRACT

Objectives.The purpose of study was to explain the mechanism of regeneration of salivary gland defect due to ionizing radiation by BM-MSCs transplantation that have been given hypoxic precondition with 1% of O₂ concentration.

Methods.Stem cell culture was performed in normoxic condition (O₂ 21%) and hypoxic conditions by 48 h incubation in low oxygen tension chamber consisting 95% N₂, 5% CO₂ and 1% O₂. Thirty of male Wistar rats were divided into four groups: two groups of control, and two groups of treatment. All treatment groups were defected in the salivary glands by exposure with a single dose of 15 Gy radiation in the ventral of the neck region. BM-MSCs transplant was given in the treatment groups for normoxia and hypoxia after 24 h post radiation.

Result.The result of the study showed a significant increase in the expression of binding SDF1-CXCR4, BCl₂ (p<0.05) and also in the activity of the enzyme α amylase in all groups of hypoxia.

Conclusions.The conclusion demonstrated that BM-MSCs transplantation with hypoxic precondition increasing the expression of binding SDF1-CXCR4, BCl₂ that contribute of cell migration, cell survival and cell differentiation.

Keywords : BM-MSCs, hypoxic precondition, salivary gland defect, SDF1-CXCR4, BCl₂, α amylase

INTRODUCTION

Salivary gland is one of the normal tissue frequently affected by the side effects of head and neck radiation therapy. One of the side effects is the occurrence of irreversible salivary gland defect. The salivary gland defect result in the decrease of saliva production, and in a very severe condition it is called xerostomia.¹ Irreversible hyposalivation after irradiation-induced damage is mainly caused by the stem cell sterilization of the primitive salivary glands.² It is required to apply an alternative approach to treat the severe damage glands and the left tissue. One of the alternative approach for this purpose is the stem cells therapy.

The succes of stem cell therapy is depend on some factors, the stem cells have to strongly attach and survive in the defect area and can integrate with the surrounding microenvironment.³ However, the lack of viability in the form of the survival of the transplanted stem cells results in the effectiveness of stem cell therapy have reduced. The temporary underlying assumptions of the decline in the viability and function of stem cells is

Journal of International Health Research and Education (JIHRE)

RESEARCH CENTER FOR RADIATION THERAPY AND RADIATION PHYSICS

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

Department of Radiation Therapy, Faculty of Health Sciences, Universitas Airlangga

the conventional stem cell culture it is done in normoxia conditions (O_2 21%), contrary to the condition of *in vivo* stem cell requires a hypoxic environment between 1-7% depending on the type and location of stem cell.⁴ It assumed that the same of microenvironment condition is required to improve and maintain the viability of the transplanted stem cells in the defect tissue, so it support the stem cells to proliferate and differentiate into origin-like cells.⁵ In addition to the appropriate microenvironment, there are others factor that also play a role in the succes of stem cells therapy, the factors that can induce stem cells capability to migrate into defect area. One of the mediators that plays an important role the migration process into defect area is stromal derived-cell factor 1 (SDF1) through binding with CXCR4 receptor.⁶

The purpose of study was to explain the mechanism of regeneration of salivary gland deffect due to ionizing radiation by BM-MSCs transplantaion that have been given hypoxic precondition with 1% of O_2 concentration.

MATERIAL AND METHODS

Ethical approval

All animal studies were performed via a protocol approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga and complied with the National Research Council's guidelines (366-KE) through ethical seminar.

Salivary Gland Defect in Animal Model

Defect salivary gland due to ionized radiation in male Wistar rat were defected by exposure with a single dose of 15 Gy radiation in the ventral of the neck region of rat. The laboratory animals used in this study were healthy male Wistar rats, 3-4 month-old and each 250-300 g weight. Healthy condition was determined by their active movement. Rats kept in an individual plastic cage in laboratory for Experimental Animal of Institute Tropical Disease, Universitas Airlangga with adequate ventilation.

Treatment:

This researh was a true experimental post test control group design. The exploration of BM-MSCs was isolated from femur of Wistar male rats. Stem cell culture was performed in normoxic condition (O_2 21%) and hypoxic conditions by 48 hour incubation in low oxygen tension chamber consisting 95% N_2 , 5% CO_2 and 1% O_2 .

A total of 40 male Wistar rats were divided into four groups: two groups of control (normal and defect group),

A total of 40 male Wistar rats was divided into four groups, each has 10 replications.

They were:

1. The negative control group (T0-): Rats with salivary glands normal (not irradiated) and without MSCc treatment
2. The positive control group (T0+): Rats with defect salivary gland and without MSCs treatment
3. The treatment Group 1 (T1): Rats with defect salivary gland, given MSCs transplant with normoxia condition after 24 hour post radiation
4. The treatment Group 2 (T2): Rats with defect salivary gland, given MSCs transplant with hypoxic condition 24 hour post radiation.

The regeneration process of salivary gland deffect were determined after 4 weeks post BM-MSCs transplantaion by expression of a number of chemokines and protein such binding SDF1-CXCR4, BCl_2 . on the tissue by Immunohistochemistry methods and the

activity of enzyme α - amilase produced by acinar cells through ELISA activity as a marker of salivary gland regeneration process. Data were analyzed with MANOVA statistic.

Immunohistochemical methods for observation of SDF1-CXCR4 and BCl₂

Immunohistochemical observation was performed to determine the expressions of SDF1-CXCR4 and BCl₂.⁷ First, made an incision through salivary gland transversely from paraffin blocks. The IHC techniques using monoclonal antibodies anti- SDF1-CXCR4 and anti- BCl₂. Observations of SDF1-CXCR4 and BCl₂ expressions were made using a light microscope with a magnification of 200 times. The expression of each variable is indicated by the number of cells with brown discoloration due to DAB-chromogen in each incision.⁸

Histological observation of salivary gland

Identification of salivary gland histology and regenerate acinar cells performed through light microscopy examination. Histological preparations such as the following: Fixation of rat submandibulay gland in 10% buffer formalin. Subsequently dehydration with a series of alcohol, i.e., from 70%, 80%, 90%, and 96% (absolute). Clearing of the gland tissues of rat in xylene solution. The tissues were infiltrated with embedding agent, the liquid paraffin. The sectioning was done with microtome that could be set with a distance at 4-6 μ , and the sections were placed on a slide. The embedding process must be reversed to get the paraffin wax out of the tissue and allow water soluble dyes to penetrate the sections. Therefore, before any staining can be done, the slides are "deparaffinized" by running them through xylenes to alcohols to water. The staining used was the routine H & E. The stained section then mounted with Canada balsam and placed a coverslip on it. Observations and identifications of submandibulary gland and acinar cells regenerations are based on the histological measures of that of the normal tissue.⁹

RESULT

Table 1. Average value and standard deviation (SD) expression of SDF1-CXCR4

Kelompok	SDF1-CXCR4		p
	Rerata	SD	
KN	1.640	0.555	0.000
KD	1.160	0.219	
HA	3.720	1.825	
NA	2.920	0.540	

*significance (p<0.05)

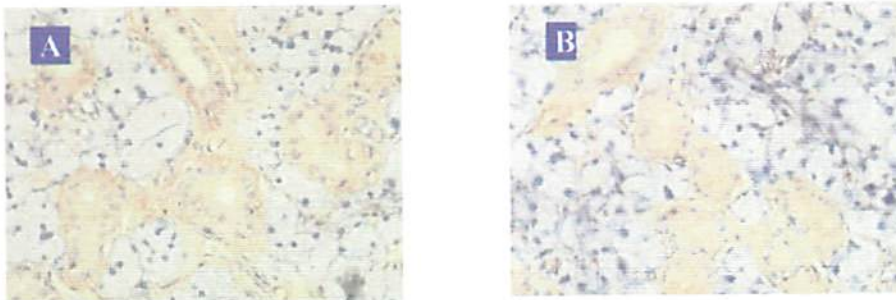


Figure 2. Comparison of CXCR4 (brown chromogen) expression between treatments. In the slide above it appears that groups hypoxic conditioned in acute conditions showed mainly CXCR4 expression (A) that was stronger than the normoxia group (B)

(immunohistochemical staining, 400x magnification; Nikon H600L microscope; 300 megapixel camera DS Fi2)

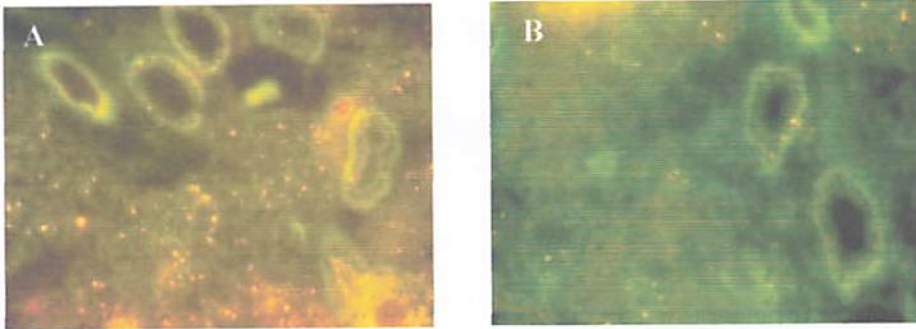


Figure 3. Microscopic images of BM-MSCs cells labeled using PKH 26. The green light in the image shows the distribution of BM-MSCs cells that have been labeled.

Table 2. Average values and standard deviations (SD) of expression of Bcl2

Kelompok	Bcl ₂		p
	Rerata	SD	
KN	23.600	5.176	0.000
KD	4.000	1.870	
HA	11.800	1.303	
NA	5.400	1.140	

*significance (p<0.05)

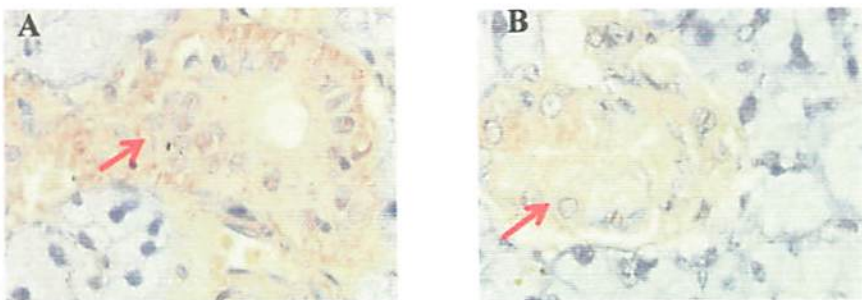


Figure 4. Comparison of the expression of Bcl2 (brown chromogen) between treatments. In the slide above, it appears that groups with acute hypoxia (A) showed stronger Bcl2 expression compared to the acute normoxia group (B) (immuno histochemical staining, 400x magnification; Nikon H600L microscope; 300 megapixel camera DS Fi2).

Table 3. Average values and standard deviations (SD) of α amylase enzyme expression

Groups	α amilase		p
	Mean	SD	
KN	289259.000	18645.313	0.000
KD	95330.400	31503.973	
HA	186,118.400	5971.156	
NA	152,088.200	6434.510	

* significance (p<0,05)

Table 1. The mean value of the total score of the saliva gland function test of the patients with xerostomia.

Group	Saliva gland function test		
	Mean	SD	Significance
Control	12.17	0.00825	NS
Group 1	11.57	0.00811	NS
Group 2	11.09	0.00811	NS
Group 3	11.91	0.00811	NS

Figure 1. The mean value of the total score of the saliva gland function test of the patients with xerostomia.

Table 2. The mean value of the total score of the saliva gland function test of the patients with xerostomia.

Group	Saliva gland function test		
	Mean	SD	Significance
Control	12.17	0.00825	NS
Group 1	11.57	0.00811	NS
Group 2	11.09	0.00811	NS
Group 3	11.91	0.00811	NS

NS

NS

The results of the study show that the mean value of the total score of the saliva gland function test of the patients with xerostomia is significantly different from the control group. The mean value of the total score of the saliva gland function test of the patients with xerostomia is significantly different from the control group. The mean value of the total score of the saliva gland function test of the patients with xerostomia is significantly different from the control group.

Table 3. The mean value of the total score of the saliva gland function test of the patients with xerostomia.

Group	Saliva gland function test		
	Mean	SD	Significance
Control	12.17	0.00825	NS
Group 1	11.57	0.00811	NS
Group 2	11.09	0.00811	NS
Group 3	11.91	0.00811	NS

DISCUSSION

The results of this study indicate that BM-MSCs cells that have been given hypoxic preconditions have better therapeutic ability than normoxia conditions so that they can induce cell repair processes. It can be seen from the green color of the microscopic picture of salivary gland tissue that occupies more of the ductal basal membrane. This shows the migration process of BM-MSCs in the basal membrane of the ducts and acinar cells which are heavily damaged by radiation exposure. The distribution of BM-MSCs that have been labeled PKH 26 shows that green coloration is stronger in hypoxic groups than the normoxia group. The Immunohistochemical examination results, in the hypoxic group showed the expression of binding SDF1-CXCR4 and Bcl₂ increased significantly than normoxia group.

These results are in inline with those of previous studies which states that the activation of SDF-1-CXCR4 bonds in tissues plays a role in the transduction of various signals that can regulate several biological functions such as cell survival, proliferation, chemotaxis and cell differentiation. One of the main functions of SDF1-CXCR4 bond is the trafficking regulation of BM-MSCs cells in the homing process in the injured area.⁹

Furthermore, the Manova test results showed that there were significant differences ($p < 0.05$) of α amylase expression between treatment groups. The acute hypoxia group showed a significant increase in α amylase enzyme compared to the acute normoxia group after transplantation. The results of this study indicate that the regeneration process of the salivary glands which is characterized by increased activity of the α amylase enzyme as a marker of acinar cells regeneration.

All these have shown the influential effect of low O₂ concentration on MSCs biology and raised serious concern over its therapeutic efficiency and biosafety.¹⁰ The higher O₂ concentration might cause environmental stress to the in vitro cultured MSCs. Moreover, in recent years, several studies have presented clear evidence regarding the negative influence of ambient O₂ concentration on MSCs, including early senescence, longer population doubling time, DNA damage,⁸ and poor engraftment following transplantation.⁷ Several number of studies suggest that hypoxia activates several transcription factors in the nucleus such as HIF-1 α , NF κ B, these factors will also interact with paracrine factors such as MEK, PI3K/Akt.¹¹ All of these interactions will increase the secretion of several growth factors such as stromal-derived factor 1 (SDF-1), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) with increased expression of each receptor such as CXCR4, increased secretion of some anti-protein apoptotics such as Bcl-2 and Bcl-xL as a survival factor.¹²

CONCLUSION

The conclusion demonstrated that (1) BM-MSCs transplantation with hypoxic precondition of 1% O₂ increasing of expression SDF1-CXCR4 and Bcl₂ that contribute of cell migration and cell survival (2) BM-MSCs can improve regeneration process of salivary gland defect through increasing activity of the α - amylase enzyme as a marker of regeneration process in salivary gland tissue.

ACKNOWLEDGEMENT

This laboratory work was supported by grants from DIPA BO. The authors would like to thank Universitas Airlangga, Institute of Tropical Disease, Stem Cell Division, Faculty of Dental Medicine and Stem Cell and Tissue Bank Center RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Indonesia.

REFERENCES

1. Sohni A., and Verfaillie C.M. Mesenchymal Stem cells Migration Homing and Tracking. *Stem Cells International* 2013 ;13: 1-10.
2. Estrada J.C. Albo, A. Bengur'ia et al..Culture of human mesenchymal stem cells low oxygen tensio nimpoves growth and genetic stability by activating glycolysis.*Cell Death and Differentiation*.2012,vol.19,no.5,pp.743–755.
3. Lin C.Y., Chang F.H., Chen C.Y., Huang C.Y., Hu F.C., Huang W.K., Chen M.H. Cell Therapy for Salivary Gland Regeneration. *J.Dental Research*. 2011;90(3): 341-346.
4. Haque N., Rahman M.T., Kasim N.H., Alabsi A.M. Hypoxic Culture Conditions as a Solution for mesenchymal Stem Cell Based Regenerative Therapy. *The Scientific World Journal* 2013;7:1-12.
5. Feng J., Zwaag V.M., Stokma M.A., Van O.R., Coppes R.P. Isolation and characterization of human salivary gland cells for stem cell transplantation to reduce radiation-induced hyposalivation. *J.Radiotherapy & Oncology*. 2009; 92(3): 466-471.
6. Alcaez T.M., Naranjo S.S., Jimenez C. Hypoxic induces the activation of the PI3K/Akt cell survival pathway in PC12 cells – protective role in aptosis. *J Biol Chem*. 2001; 276:22368-74.
7. Greijer A.E. The role of hypoxic inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxic induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2012; 57:1009-14.
8. Kagami H, Wang S, Hai B. 2008. Restoring the function of salivary glands. *Oral Disease*. 14:15-24.
9. Buravkova L.B.,Andreeva E.R.,Gogvadze V., Zhivotovsky B. Mesenchymal Stem cells and hypoxic : Where are we?. *J Mitochondrion* 2014 ;1-8.
10. Mohamadnejad M,Pournasr B,Bagherietal M..Transplantation of allogeneic bone marrow mesenchymal stromal cell derived hepatocyte-like cells in homozygous familial hypercholesterolemia.*Cytotherapy*.2010,vol.12,no.4,pp.566–568.
11. Rantam F.A, Ferdiansyah M, Purwati A. *Stem Cell Mesenchymal, Hematopoetik dan Model Aplikasi*. 2nd ed. Surabaya: Airlangga University Press; 2014. pp. 45–50. 145-155.
12. Crosby K, Simendinger J, Grange C, Ferrante M, Bernier T, Stanen C. Immunohistochemistry protocol for paraffin-embedded tissue section-advertisement. *Cell Signal. Technol*. 2016. [Accessed on 15-06-2016]. Available from: <https://www.jove.com/.../immunohistochemistry-protocol-for> .

DAFTAR PUSTAKA

1. Sobin LH and Wittekindt C. *M. Mesenchymal stem cells: A potential therapy and target for cancer* (Cell International 2007; 11: 1-14)
2. Kishida H, Albert Z. *Biogenesis of human mesenchymal stem cells: role of oxygen, cell growth, and genetic stability* (Cell International 2007; 11: 19-27)
3. Liu CY, Chang EHL, Chen CY, Huang CY, Hsu LC, Huang WL, Chen MH. *Cell Therapy for Xerostomia and Regeneration* (Dental Research 2001; 100: 241-245)
4. Lopez S, Robinson M, Kishida H, Albert Z. *Human Mesenchymal Stem Cells: A Potential Solution for Mesenchymal Stem Cell-based Regenerative Therapy* (The Scientific World Journal 2007; 1: 1-12)
5. Peng H, Xiang Y, Zhang M, Van G, Van G, Van G. *Characterization of human mesenchymal stem cells and their differentiation to bone* (Radiation-induced gene expression) (Gene Therapy & Cell Biology 2006; 82: 14-24)
6. Alvarez EA, Narmjo K, Jones C. *Epigenetic changes in the regulation of the hESVAA cell surface protein in CD13 cells - potential role in disease* (J Biol Chem 2001; 276: 2366-71)
7. Grijalva AE. *The role of hypoxia in the regulation of HIF-1 in hypoxia-induced apoptosis* (Cell Prolif 2012; 7: 1009-14)
8. Kojima H, Wong H, Liu H. *2008. Restoring the function of salivary gland* (Cell Disease 14: 17-24)
9. Ivanova L, Ivanova L, Ivanova L, Ivanova L, Ivanova L, Ivanova L. *Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? (J. Biotechnology 2014; 1-3)*
10. Ivanova L, Ivanova L, Ivanova L, Ivanova L, Ivanova L, Ivanova L. *Human mesenchymal stem cell derived paracrine-like cells in bone marrow* (Journal of Biotechnology 2010; 11: 200-208)
11. Kojima H, Wong H, Liu H. *2008. Restoring the function of salivary gland* (Cell Disease 14: 17-24)
12. Grijalva AE. *The role of hypoxia in the regulation of HIF-1 in hypoxia-induced apoptosis* (Cell Prolif 2012; 7: 1009-14)

