

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



**POTENSI HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS (HDPSCS) UNTUK
REGENERASI DEFEK KELENJAR SALIVA TIKUS WISTAR
(RATTUS NOVERGICUS) DENGAN DIABETES TIPE II**

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

**Dr. IDA BAGUS NARMADA, drg., M.Kes., Sp. Ort (K) 007015603
Prof. Dr. DIAH SAVITRI ERNAWATI, drg., M.Si., Sp. PM 0029046007
Dr. CHIQUITA PRAHASANTI, drg., Sp. Perio(K) 0009095807**

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

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

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



**POTENSI HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS (HDPCS) UNTUK
REGENERASI DEFEK KELENJAR SALIVA TIKUS WISTAR
(RATTUS NOVERGICUS) DENGAN DIABETES TIPE II**

TAHUN KE – 1 DARI RENCANA 2 TAHUN

**Dr. IDA BAGUS NARMADA, drg., M.Kes., Sp. Ort (K) 007015603
Prof. Dr. DIAH SAVITRI ERNAWATI, drg., M.Si., Sp. PM 0029046007
Dr. CHIQUITA PRAHASANTI, drg., Sp. Perio(K) 0009095807**

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

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

diproduksi kembali. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) merupakan jenis *stem cell* dewasa yang mempunyai kemampuan untuk bertrandiferensiasi menjadi berbagai jenis sel baik sel mesoderm, ektoderm dan endoderm. *Human Dental Pulp Stem Cells* (hDPSCs) merupakan salah satu MSCs yang dapat menjadi sumber *stem cell* yang ideal untuk perbaikan sel acinar yang rusak. Pada penelitian pendahuluan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa hDPSCs mempunyai kemampuan untuk menghasilkan beberapa cytokines dan Growth Factor yang berperan penting dalam proses proliferasi, diferensiasi serta revaskularisasi yaitu TGF-beta dan VEGF serta imunoregulator IL-10. Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*). Sebelum melakukan penelitian, tikus terlebih dahulu diadaptasikan selama 7 hari. Sel asinar digunakan sebagai indikator adanya perbaikan yang terjadi akibat suplai dari bertambahnya neovaskularisasi. Peningkatan jumlah sel asinar antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan yang walaupun tidak signifikan, menandakan bahwa HDPSC mampu meregenerasi sel asinar pada kelenjar saliva. Hasil HE kemudian dibaca untuk melihat nilai vakuolisasi pada sel acinar. Pada hari ke-7, nilai vakuolisasi antara kelompok kontrol dan perlakuan didapatkan hasil yang tidak signifikan berbeda. Hal ini menandakan bahwa proses perbaikan jaringan oleh DPSC pada hari ke-7 belum terjadi secara baik. Pada hari ke-14, nilai vakuolisasi antara kelompok kontrol dan perlakuan didapatkan hasil penurunan yang signifikan. Penurunan nilai vakuolisasi ini dapat terjadi karena dua hal, yaitu karena nilai vakuolisasi benar-benar berkurang pada jumlah sel asinar yang sama atau nilai vakuolisasi sedikit berkurang, namun jumlah sel asinar normal meningkat. Penurunan

nilai vakuolisasi ini menandakan bahwa terjadi perbaikan kondisi pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol pada minggu ke-2, antara hari ke-7 dan hari ke-14, nilai vakuolisasi cenderung meningkat baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan. Hal ini dikarenakan pada percobaan digunakan tikus diabetes yang tidak dilakukan kontrol gula darah, sehingga kerusakan yang terjadi bersifat progresif atau dengan kata lain kerusakan yang terjadi akan semakin buruk tiap harinya. Namun, peningkatan yang terjadi pada kelompok kontrol jauh lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Hal ini menandakan bahwa efek HDPSC pada percobaan ini hanya mampu untuk menurunkan progresifitas nilai vakuolisasi namun tidak menghilangkan nilai vakuolisasi sepenuhnya apabila tidak diikuti dengan kontrol gula darah.

PRAKATA

Dengan mengucapkan syukur kepada Tuhan YME akhirnya laporan akhir penelitian yang berjudul **“POTENSI HUMAN DENTAL PULP STEM CELLS (HDPCS) UNTUK REGENERASI DEFEK KELENJAR SALIVA TIKUS WISTAR (RATTUS NOVERGICUS) DENGAN DIABETES TIPE II”** pada pendanaan dari Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi tahun pertama dapat diselesaikan dengan baik. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat pada bidang kedokteran gigi khususnya untuk pengelolaan defek kelenjar saliva penderita DM tipe II.

Surabaya, 14 November 2018

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Ringkasan.....	iii
Prakata.....	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	xi
 BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.1 Rumusan Masalah.....	3
1.2 Temuan dan Target Luaran.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Diabetes Mellitus	5
2.2 Kelenjar Saliva dan Xerostomia	6
2.3 <i>Human Dental Pulp Stem Cells</i>	7
BAB 3 MANFAAT DAN TUJUAN	10
3.1 Tujuan	10
3.2 Manfaat	10
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	11

4.1 Rancangan Penelitian.....	11
4.2 Materi Penelitian.....	11
4.3 Besar sampel	11
4.4 Teknik Randomisasi.....	12
4.4 Variabel Penelitian.....	12
4.5 Definisi Operasional Variabel Penelitian.....	12
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	13
4.7 Prosedur Penelitian	13
4.8 Pengolahan dan Analisis Data	15
4.9 Alur Penelitian	15
4.10 Indikator Capaian Tahunan.....	16
4.11 Luaran Penelitian	16
BAB 5 HASIL PENELITIAN	17
5.1 Hasil penelitian I	17
5.2 Hasil penelitian II.....	24
BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	30
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
DAFTAR PUSTAKA.....	32
LUARAN DAN CAPAIAN PENELITIAN	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1 Alur Penelitian	15
Gambar 5.1. Morfologi HDPSC.	17
Gambar 5.2 Rata Rata \pm Standard deviasi jumlah neovaskularisasi pada kelompok kontrol dan perlakuan hari ke 7 dan 14.....	18
Gambar 5.3 Rata Rata \pm Standard deviasi jumlah sel asinar pada kelompok kontrol dan perlakuan hari ke 7 dan 14.	19
Gambar 5.4. Gambar proses kultur HDPSC (panah kuning) menggunakan mikroskop Nikon TMS Inverted Microscope (US). A) HDPSC pada isolasi pertama kali. B) HDPSC pada pasase pertama belum menampakkan gambaran fibroblast-like. C) HDPSC pada pasase kedua telah nampak gambaran fibroblast-like. D) HDPSC pada pasase ketiga nampak lebih banyak strutur fibroblast-like yang terbentuk.	24
Gambar 5.5. Gambar karakterisasi MSC dengan pemeriksaan ICC menggunakan mikroskop fluorensence Olympus FSX100TM. Terlihat hasil ICC menunjukkan hasil negative (tidak berpendar) pada karakterisasi CD45 dan hasil positif (berpendar) pada karakterisasi CD73, CD90, dan CD105. Kolom kiri menunjukkan gambaran non kontras, sedangkan pada kolom kanan menunjukkan gambaran kontras. A1) Gambaran non kontras dari pemerikksaan ICC CD45. A2) Gambaran kontras dari pemerikksaan ICC yang menunjukkan negative CD45. B1) Gambaran non kontras dari pemerikksaan ICC CD73. B2) Gambaran kontras dari pemerikksaan ICC yang menunjukkan positif CD73. C1) Gambaran non kontras dari pemerikksaan ICC CD90. C2) Gambaran kontras dari pemerikksaan ICC yang menunjukkan positif	

CD90. D1) Gambaran non kontras dari pemeriksaan ICC CD105. D2) Gambaran kontras dari pemeriksaan ICC yang menunjukkan positif CD105..... 25

Gambar 5.6 Vakuolisasi sel acinar (panah kuning) pada pemeriksaan histopatologi menggunakan pengecatan HE pada perbesaran 1000x menggunakan mikroskop cahaya Nikon H600L dengan kamera digital DS Fi2 300 megapixel dan software pengolah gambar Nikkon Image System. Vakuolisasi terlihat sangat jelas pada kelompok kontrol. A) Gambaran histopatologi sel asinar pada kelompok kontrol hari ke-7. B) Gambaran histopatologi sel asinar pada kelompok kontrol hari ke-14. C) Gambaran histopatologi sel asinar pada kelompok perlakuan hari ke-7. D) Gambaran histopatologi sel asinar pada kelompok perlakuan hari ke-14..... 26

Gambar 5. 7 Grafik rerata nilai vakuolisasi sel acinar..... 27

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan	4
Tabel 4.1 Indikator Capaian Tahunan.....	16
Tabel 4.2 Jadwal dan Agenda Kegiatan.....	17
Tabel 5.1. Hasil Pembacaan dan Perhitungan Jumlah Neovaskularisasi dan Sel Asinar Kelenjar Saliva Model Tikus Diabetes.	18
Tabel 5.2. Uji normalitas dengan <i>Shapiro-Wilk Test</i>	21
Tabel 5.3. Uji Homogenitas dengan <i>Levene's Test</i>	22
Tabel 5.4. Tabel Signifikansi Uji Independen T-Test pada data jumlah neovaskularisasi dan sel asinar	23
Tabel 5.5 Hasil uji normalitas (uji <i>Shapiro-Wilk</i>).....	28
Tabel 5.6 Hasil uji homogenitas (uji <i>Levene</i>)	28
Tabel 5.7 Hasil uji beda (uji <i>Mann Whitney</i>).....	29



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes Melitus (DM) adalah penyakit yang ditandai dengan terjadinya hiperglikemia dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang dihubungkan dengan kekurangan secara absolut atau relatif dari kerja dan atau sekresi insulin. Gejala yang dikeluhkan pada penderita DM yaitu polidipsia, poliuria, polifagia, penurunan berat badan, kesemutan. Menurut beberapa penelitian terjadi kecenderungan peningkatan prevalensi DM baik di dunia maupun di Indonesia (Kardika *et al.*, 2013). *American Diabetes Association* (ADA) menyebutkan bahwa prevalensi DM di dunia adalah 1,9% dan telah menjadikan DM sebagai penyebab kematian urutan ke tujuh di dunia sedangkan tahun 2012 angka kejadian DM didunia adalah sebanyak 371 juta jiwa dimana proporsi kejadian DM tipe II adalah 95% dari populasi dunia yang menderita diabetes mellitus (*American Diabetes Association*, 2012). Riset Kesehatan Dasar (Riskedas) yang dilakukan pada tahun 2007 dan 2013 terjadi peningkatan proporsi DM pada usia >15 tahun keatas hampir dua kali lipat pada tahun 2013 dibandingkan pada tahun 2007 di Indonesia (Pusat data dan informasi kementerian kesehatan RI, 2013).

DM tipe II yang tidak terkontrol dengan baik akan menimbulkan komplikasi akut dan kronis. Komplikasi DM dapat dibagi menjadi dua kategori, yaitu komplikasi akut dan kronis. Komplikasi akut meliputi hiperglikemia, kondisi dimana kadar gula darah meningkat secara tiba-tiba, dapat berkembang menjadi keadaan metabolisme yang berbahaya, antara lain ketoasidosis diabetik, Koma Hiperosmoler Non Ketotik (KHNK) dan kemolakto asidosis. Hiperglikemia cenderung menimbulkan stres oksidatif dimana pembentukan radikal bebas melebihi sistem pertahanan antioksidan tubuh sehinggamenyebabkan gangguan mikrovaskuler dan makrovaskuler. Gangguan mikrovaskuler atau mikroangiopati dapat menyebabkan kematian sel disusul dengan kerusakan jaringan. Kelenjar saliva dan sel acinar sering

terdampak dari kondisi DM tipe II sehingga menimbulkan xerostomia (Manaf, 2009; Purnamasari, 2009).

Xerostomia atau kekeringan rongga mulut adalah suatu kelainan yang disebabkan kerusakan kelenjar saliva sebagai kondisi mikroangiopati DM tipe II (David, 2002). Xerostomia yang menimbulkan beberapa akibat di rongga mulut seperti rasa nyeri, rasa terbakar, sukar bicara dan kerusakan jaringan mulut dan merupakan keluhan terbesar (58%). Kerusakan ini bersifat *irreversible* dan hingga saat ini masih belum ditemukan pengobatannya sekalipun melalui tindakan operatif (Kagami *et al.*, 2000). Terapi *stem cell* merupakan salah satu terapi pilihan yang diharapkan mampu untuk mengembalikan fungsi dari kelenjar saliva dengan cara meregenerasi sel acinar sehingga saliva dapat diproduksi kembali (Kagami *et al.*, 2008).

Mesenchymal stem cell merupakan *stem cell* dewasa yang akhir-akhir sering digunakan dalam *stem cell* terapi. *Mesenchymal stem cells* (MSCs) merupakan *nonhaematopoietic stromal cells* (Augello *et al.*, 2010). MSCs dapat memperbarui sel secara mandiri dan memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam tipe sel termasuk *mesenchymal lineages* seperti kondrosit, fibroblast, osteoblast, adiposit, dan tendon serta menjadi *ecto/endodermal lineages* seperti sel neural, hepatosit, sel paru, sel hepar, sel pankreas, sel kardiovaskuler, sel acinar dan sel endothelial (Kasper *et al.*, 2009). Kemampuan multipoten, imunomodulator dan kapasitas bermigrasi ke jaringan terjejas serta secara langsung menginisiasi perbaikan jaringan membuat MSCs sangat cocok untuk perkembangan kedokteran regeneratif (Gao *et al.*, 2016; Law *et al.*, 2013). MSCs diketahui dapat menghasilkan sejumlah *cytokines*, *chemokines* serta *Growth Factors* yang berperan penting untuk meregenerasi jaringan dengan menginduksi aktifitas *endogenous stem cells* (Sequera *et al.*, 2010).

Sumber MSCs pada manusia dapat diisolasi salah satunya dari jaringan gigi. Daerah orofacial merupakan area yang unik dan kaya akan sumber sel punca. Fokus pengembangan sel punca dalam kedokteran gigi adalah untuk meregenerasi jaringan orofacial yang hilang ataupun rusak. MSCs yang bersumber dari jaringan gigi kini menjadi topik yang menarik karena dalam

proses pengambilan dari jaringan gigi dapat dilakukan dengan prosedur minimal infasif. *Human Dental Pulp Stem cells* (hDPSCs) merupakan salah satu MSCs yang dapat menjadi sumber *stem cell* yang ideal untuk perbaikan sel acinar yang rusak (Miran *et al.*, 2016). Potensi terapeutik HDPSCs 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*. Kemokin yang berperan sebagai *homing factor* adalah reseptor-ligand CXCR4-CXCL12. Kemampuan *homing* atau migrasi HDPSC tergantung dari banyak faktor antara lain usia, kondisi kultur sel dan metode deliveri. Semakin tinggi jumlah pasase pada kultur sel maka semakin menurun kemampuan regenerasi dan migrasinya (Reddi, 2007; Rochefort *et al.*, 2006).

Berdasarkan hal tersebut diatas HDPSCs dengan kemampuan multipotensinya yang dapat bertransdeferensiasinya menjadi berbagai macam sel diharapkan dapat digunakan sebagai berpotensi sebagai terapi defek kelenjar saliva akibat mikroangiopati DM tipe II yang hingga saat ini belum ditemukan pengobatannya. Pada tahap ini peneliti akan melakukan penelitian terhadap potensi HDPSCs untuk regenerasi defek kelenjar saliva tikus wistar (*Rattus Novergicus*) dengan kondisi DM tipe II melalui pemeriksaan ekspresi enzim alpha amilase yang merupakan penanda terjadinya regenerasi sel acinar yang mensekresi saliva, namun sebelum itu terlebih dahulu akan dilakukan pemeriksaan pada tingkat kultur untuk mendeteksi ekspresi dari CXCR4-SDF-1 sebagai *homing factor* untuk regenerasi kelenjar saliva.

1.1 Rumusan masalah

Bagaimana potensi hDPSC dalam meregenerasi defek kelenjar saliva tikus wistar (*Rattus Novergicus*) yang rusak akibat kondisi mikroangiopati pada DM tipe II?

1.2. Temuan dan Target Luaran

Tabel 1.1 Rencana Target Capaian Tahunan.

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



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diabetes Mellitus

Diabetes Melitus (DM) adalah penyakit yang ditandai dengan terjadinya hiperglikemia dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang dihubungkan dengan kekurangan secara absolut atau relatif dari kerja dan atau sekresi insulin (Kardika *et al.*, 2013). DM merupakan salah satu masalah kesehatan di dunia sampai saat ini. Data dari studi global *American Diabetes Association* (ADA) menunjukkan bahwa jumlah penderita DM pada tahun 2011 telah mencapai 366 juta orang, jumlah ini diperkirakan akan terus meningkat menjadi 552 juta pada tahun 2030. Proporsi kejadian DM tipe 2 adalah 95% dari total populasi dunia yang menderita DM. DM telah menjadi penyebab kematian peringkat ketujuh di dunia dengan 4,6 juta kematian setiap tahunnya. Biaya pengobatan untuk DM telah mencapai 465 miliar USD dengan setiap tahunnya terus bertambah. ADA memperkirakan bahwa sebanyak 183 juta orang tidak menyadari bahwa mereka mengidap DM. Sebesar 80% orang dengan DM tinggal di negara berpenghasilan rendah dan menengah di wilayah Asia Tenggara termasuk Indonesia. Riset Kesehatan Dasar (Riskeddas) yang dilakukan pada tahun 2007 dan 2013 terjadi peningkatan proporsi DM pada usia >15 tahun keatas hampir dua kali lipat pada tahun 2013 dibandingkan pada tahun 2007 di Indonesia sehingga membutuhkan penanggulangan yang lebih menyeluruh (Pusat data dan informasi kementerian kesehatan RI, 2013).

DM tipe II yang tidak terkontrol dengan baik akan menimbulkan komplikasi akut dan kronis. Menurut Perkumpulan Endokrinologi Indonesia (PERKENI) komplikasi DM dapat dibagi menjadi dua kategori, yaitu komplikasi akut dan kronis. Komplikasi akut meliputi hiperglikemia, kondisi dimana kadar gula darah meningkat secara tiba-tiba, dapat berkembang menjadi keadaan metabolisme yang berbahaya, antara lain ketoasidosis diabetik, Koma Hiperosmoler Non Ketotik (KHNK) dan kemolakto asidosis. Hiperglikemia cenderung menimbulkan stres oksidatif dimana pembentukan radikal bebas melebihi sistem pertahanan antioksidan tubuh sehingga mengakibatkan gangguan mikrovaskuler dan

makrovaskuler. Peningkatan produksi radikal bebas pada DM melalui tiga mekanisme yaitu Polyol pathway, Pembentukan *Glycosylation of haemoglobin* (HbA1c) dalam darah merupakan parameter sebagai bentuk pengendalian dalam darahnya sekitar 3 bulan sesuai umur eritrosit, *Advanced Glycation End Products* (AGEs) merupakan salah satu petanda modifikasi protein sebagai akibat reaksi gula pereduksi terhadap asam amino (Brownlee, 2005). Akumulasi AGEs di berbagai jaringan merupakan sumber utama radikal bebas sehingga mampu berperan dalam peningkatan stres oksidatif. *Reactive Oxygen Species* (ROS) adalah suatu atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. AGEs prekursor dapat pula di modifikasi oleh molekul matrix setelah berdifusi keluar sel, kemudian protein ini berikatan dengan AGE reseptor sehingga ikatan ini menghasilkan berbagai sitokin proinflamasi dan *growth factor* penyebab kerusakan vaskuler yang memicu komplikasi kronis DM tipe II. Komplikasi Kronis meliputi komplikasi makrovaskuler, trombosis otak, mengalami penyakit jantung koroner (PJK), gagal jantung kongestif, dan stroke. Komplikasi mikrovaskuler yang terjadi pada penderita DM tipe II seperti nefropati, diabetik retinopati (kebutaan), neuropati, dan amputasi. Pada penderita DM tipe II juga terjadi kondisi imunokompromais dan xerostomia yang menimbulkan berbagai macam infeksi jamur dan bakteri (Manaf, 2009; Purnamasari, 2009).

2.2 Kelenjar Saliva dan Xerostomia

Kelenjar saliva terdiri dari beberapa tipe sel yaitu sel acinar yang bertanggung jawab terhadap sekresi air dan protein, sel myoepitelial disekitar acini dan duktus, serta sel duktal yang mengatur terutama komposisi dari saliva. Sistem duktal terdiri dari sel duktus interkalata, duktus striata/granular convuluted, dan duktus ekskretori. Hiposalivasi yang *irreversible* setelah kerusakan yang diinduksi iradiasi terutama disebabkan oleh sterilisasi *stem cell* primitif kelenjar saliva (Lombaert *et al.*, 2008). 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.

2.3 Human Dental Pulp Stem cells.

Stem cell atau sel punca adalah sel yang belum memiliki bentuk dan fungsi yang spesifik. *Stem cell* mempunyai sejumlah karakteristik yang yaitu *undifferentiated* atau belum berdiferensiasi, *self renewal* atau mampu memperbanyak diri dan dapat berdiferensiasi menjadi lebih dari satu sel. *Stem cell* dibagi dalam dua jenis berdasarkan tingkat maturasi sel yang menjadi sumber keberadaannya yaitu *stem cell* embrionik (*embryonic stem cell*) dan *stem cell* dewasa (*adult stem cell*). *Stem cell* embrionik adalah *stem cell* yang didapatkan saat perkembangan individu masih dalam tahap embrio yaitu *inner cell mass* yang terbentuk saat embrio berusia 3-5 hari, sedangkan *stem cell* dewasa ditemukan diantara sel-sel lain yang telah berdiferensiasi dalam suatu jaringan yang telah mengalami maturasi dalam keadaan inaktif, seperti *stem cell* hematopoietik, *stem cell* mesenkimal dan lain sebagainya (Lin *et al.*, 2009).

Stem cell dapat melakukan replikasi dan menghasilkan sel-sel yang berkarakteristik sama dengan sel induknya. Kemampuan memperbanyak diri dan menghasilkan sel-sel yang sama seperti induknya ini tidak dimiliki oleh sel-sel tubuh lainnya seperti sel jantung, otak ataupun sel kelenjar saliva. Hal itulah yang menyebabkan apabila terjadi kerusakan pada jaringan jantung, otak atau kelenjar saliva maka pada umumnya kerusakan tersebut akan bersifat *irreversible* (Tang *et al.*, 2005). Para peneliti masih berupaya mencari faktor-faktor yang mampu mengendalikan proliferasi *stem cell* tanpa adanya proses diferensiasi. Keberadaan *stem cell* sebagai sel yang belum berdiferensiasi ternyata dimaksudkan untuk menjaga kontinuitas regenerasi populasi sel yang menyusun jaringan dan organ tubuh yaitu dengan berdiferensiasi menjadi sel-sel tubuh yang dibutuhkan. Proses diferensiasi *stem cell* diduga disebabkan oleh faktor internal maupun eksternal sel. Faktor internal sel mencakup faktor genetik dan epigenetik, sedangkan faktor eksternal sel mencakup kondisi lingkungan sekitar sel, faktor pertumbuhan (*growth factor*), ataupun bergantung dari kebutuhan jaringan/organ itu sendiri. Faktor-faktor

yang menentukan terjadinya diferensiasi dari *stem cell* masih terus diteliti (Jones dan Wagers., 2008).

Sumber sel yang mungkin dapat digunakan dalam *stem cell* terapi antara lain pregenitor/*stem cell* yang berasal dari kelenjar saliva dan multipoten/pluripoten *stem cells* dari jaringan lain seperti *Human Dental Pulp Stem cells*. Isolasi sel punca dapat dilakukan pada gigi permanen, *Human Dental Pulp Stem cells* (hDPSCs) teridentifikasi pada pulpa gigi permanen premolar pertama yang diekstraksi untuk keperluan perawatan orthodonti. HDPSCs menunjukkan proliferasi yang lebih tinggi dan memiliki kemampuan memperbanyak diri lebih baik jika dibandingkan dengan sel punca yang berasal dari sumsum tulang belakang dewasa. DPSCs memiliki karakteristik fenotip yang mirip dengan *Bone Marrow Stem cells* (BMSCs) (Gronthos *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2003). hDPSCs memiliki kemampuan diferensiasi dan pembaruan sel. hDPSC mampu berdiferensiasi menjadi sel osteogenik dan sel odontogenik, sel adiposit, sel acinar, dan sel saraf. Terdapat tiga penanda molekul protein permukaan yang paling sering digunakan pada *stem cell* mesenkimal yaitu CD73, CD90 dan CD105 serta tidak mengekspresikan CD14, CD34 dan CD45 sebagai penanda protein permukaan *stem cell* hematopoetik (Miura *et al.*, 2003; Krane *et al.*, 2006; Miran *et al.*, 2016).

Baru-baru ini, terdapat dugaan kemampuan dari HDPSCs untuk meregenerasi kelenjar saliva telah dilaporkan dengan menggunakan model kerusakan karena radiasi, dari hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi sel dengan HDPSCs dapat meningkatkan produksi saliva dan berat kelenjar secara signifikan (Lin *et al.*, 2011). Feng *et al* (2009) dalam penelitiannya pada model coba tikus, menyatakan bahwa transplantasi *stem cell* yang diisolasi dari kelenjar saliva dapat memperbaiki fungsi dan morfologi dari kelenjar saliva yang rusak setelah 3 bulan tranplantasi dilakukan.

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*. Istilah *homing* pertama kali digunakan untuk mendiskripsikan proses transplantasi *stem cell* hematopoetik yang disuntikkan ke dalam pembuluh darah dan secara otomatis menuju ke bagian jaringan yang rusak. Aktifitas *stem cell* seperti ini diduga dipengaruhi oleh adanya protein spesifik yang dilepaskan oleh sel-sel tubuh yang rusak sebagai bentuk komunikasi selular (Lapidot&Kollet, 2010).



BAB 3

MANFAAT DAN TUJUAN

3.1 Tujuan

1. Menganalisa dan membuktikan potensi hDPSC dalam meregenerasi defek kelenjar saliva tikus wistar (*Rattus Novergicus*) yang rusak akibat kondisi mikroangiopati pada DM tipe II.
2. Menganalisa dan membuktikan potensi hDPSC dalam meregenerasi defek kelenjar saliva tikus wistar (*Rattus Novergicus*) yang rusak akibat kondisi mikroangiopati pada DM tipe II pada jumlah sel acinar, angiogenesis dan kadar TGF-beta.
3. Menganalisa dan membuktikan potensi hDPSC dalam meregenerasi defek kelenjar saliva tikus wistar (*Rattus Novergicus*) yang rusak akibat kondisi mikroangiopati pada DM tipe II pada jumlah vakuolisasi sel dan kadar IL-10 serum.

3.2 Manfaat penelitian

Pendekatan dengan terapi *stem cell-based tissue engineering* diharapkan didapatkan model terapi yang merupakan alternatif terapi utama bagi defek kelenjar saliva akibat kondisi mikroangiopati DM tipe II yang lebih efektif mengingat keterbatasan yang dimiliki oleh jenis terapi yang ada saat ini.

BAB 4 METODE PENELITIAN



4.1 Rancangan Penelitian

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

Identifikasi dan karakterisasi pada kultur HDPSCs dari gigi premolar pertama rahang atas atau rahang bawah manusia. Mengukur kadar IL10 dan TGF-Beta serum serta menghitung jumlah sel acinar, jumlah vakuolisasi, dan jumlah neovaskularisasi.

4.2 Materi Penelitian

Unit eksperimen pada penelitian ini adalah HDPSCs yang diambil dari gigi premolar pertama rahang atas atau rahang bawah manusia di FKG UNAIR. Kultur HDPSCs dilakukan di 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 (= 6)

r = jumlah ulangan

Jadi jumlah sampel minimal yang dibutuhkan untuk tiap kelompok adalah 3 (tiga). Jadi sampel keseluruhan adalah 12 sampel.

4.4 Teknik Randomisasi

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

4.5 Variabel Penelitian

Variabel Bebas (*Independent Variable*)

HDPSC

Variabel Tergantung (*Dependent Variable*).

- IL-10
- TGF-Beta
- Jumlah angiogenesis, vakuolisasi, dan sel acinar.

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 dental pulpa gigi premolar pertama.

4.6 Definisi Operasional Variabel Penelitian

1. Kadar IL-10 adalah kadar sitokin anti-inflamasi dalam serum darah yang diisolasi dari jantung sampel penelitian yang kemudian diperiksa dan dianalisa dengan ELISA kit untuk IL-10.
2. Kadar TGF-Beta adalah kadar faktor pertumbuhan TGF-beta dalam serum darah yang diisolasi dari jantung sampel penelitian yang kemudian diperiksa dan dianalisa dengan ELISA kit untuk TGF-beta.
3. Jumlah neovaskularisasi adalah jumlah pembuluh darah baru disekitar kelenjar submandibular yang dideteksi dengan pengecatan HE yang dilakukan pada sediaan jaringan kelenjar submandibular kemudian diamati dengan mikroskop elektron kemudian dihitung.

4. Jumlah sel acinar adalah jumlah sel acinar baru disekitar kelenjar submandibular yang dideteksi dengan pengecatan HE yang dilakukan pada sediaan jaringan kelenjar submandibular kemudian diamati dengan mikroskop elektron kemudian dihitung.
5. Jumlah vakuolisasi adalah jumlah sel acinar degeneratif yang membentuk vakuolisasi disekitar kelenjar submandibular yang dideteksi dengan pengecatan HE yang dilakukan pada sediaan jaringan kelenjar submandibular kemudian diamati dengan mikroskop electron kemudian dihitung.

4.7 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di *Laboratorium Stem cell Unair Surabaya*. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung dari bulan April – Oktober 2018

4.8 Prosedur Penelitian

Tahap 1: Isolasi dan Kultur HDPSCs dari gigi premolar pertama

HDPSCs diisolasi dari pulpa gigi permanen premolar pertama yang diekstraksi untuk keperluan perawatan ortodonsi menggunakan 1 mg/ml enzim trypsin kemudian dikultur dalam medium Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, Life Technologies/GIBCO BRL) dengan penambahan 20% fetal bovine serum (FBS, Biochrom AG, Germany), 5m M L-glutamine (Gibco Invitrogen, USA), 100 U/ml penicillin-G, 100 µg/ml streptomycin, dan 100 µg/ml kanamycin.

Setelah 3 hari dilakukan pembuangan medium untuk menghilangkan bagian sel yang tidak melekat pada dish dan dilakukan pemberian medium baru. Pada tahap ini dilakukan penambahan FGF-2. Setelah sel dalam keadaan confluent dilakukan passage dengan menggunakan 0.05% trypsin-EDTA dan setelah itu sel dicuci dan dibiakkan lagi dalam 60- atau 100-mm tissue culture dishes (Corning).

Setelah sel confluent dilakukan passage kembali dan sel bisa digunakan untuk penelitian selanjutnya. Bila sel tidak segera digunakan, sel harus disimpan dalam N2 cair.

Tahap 2: Pemilihan dan Pemeliharaan Hewan Uji

Pemilihan tikus Wistar yang akan dijadikan sampel percobaan dengan cara memilih tikus Wistar jantan yang sehat. Adanya penyakit dalam hewan uji dapat 61 menyebabkan hasil tidak dapat dipercaya. Dalam hubungannya dengan ini pemeliharaan hewan uji harus diperhatikan. Makanan yang memenuhi syarat untuk masing- masing jenis hewan uji merupakan faktor penting disamping lingkungan yang sehat, penggunaan insektisida dan sebagainya. Prinsip kandang mencit laboratorium sama dengan kandang tikus laboratorium tetapi kandang tikus perlu sedikit lebih besar. Semua jenis kandang digunakan dengan maksud sama yaitu dipakai untuk mengkandangkan hewan untuk percobaan, untuk menternakkan atau untuk hewan persediaan (hewan stok). Kandang harus cukup kuat tidak mudah rusak, dan tahan disteril ulang dengan suhu hingga mencapai 120⁰ C dan tahan di steril dengan bahan kimia. Kandang ini harus dibuat dari bahan yang baik dan mudah dibongkar, mudah dibersihkan dan mudah dipasang lagi. Kandang harus tahan gigitan, hewan tidak mudah lepas, tapi hewan harus tampak jelas dari luar.

Tahap 3: Melakukan identifikasi terhadap kadar IL-10 dan TGF-Beta

Kadar IL-10 dan TGF-beta diidentifikasi dengan ELISA-kit teknik sandwich. Sampel yang digunakan adalah serum darah dari hewan coba yang diekstraksi dari jantung ventrikel kanan hewan coba.

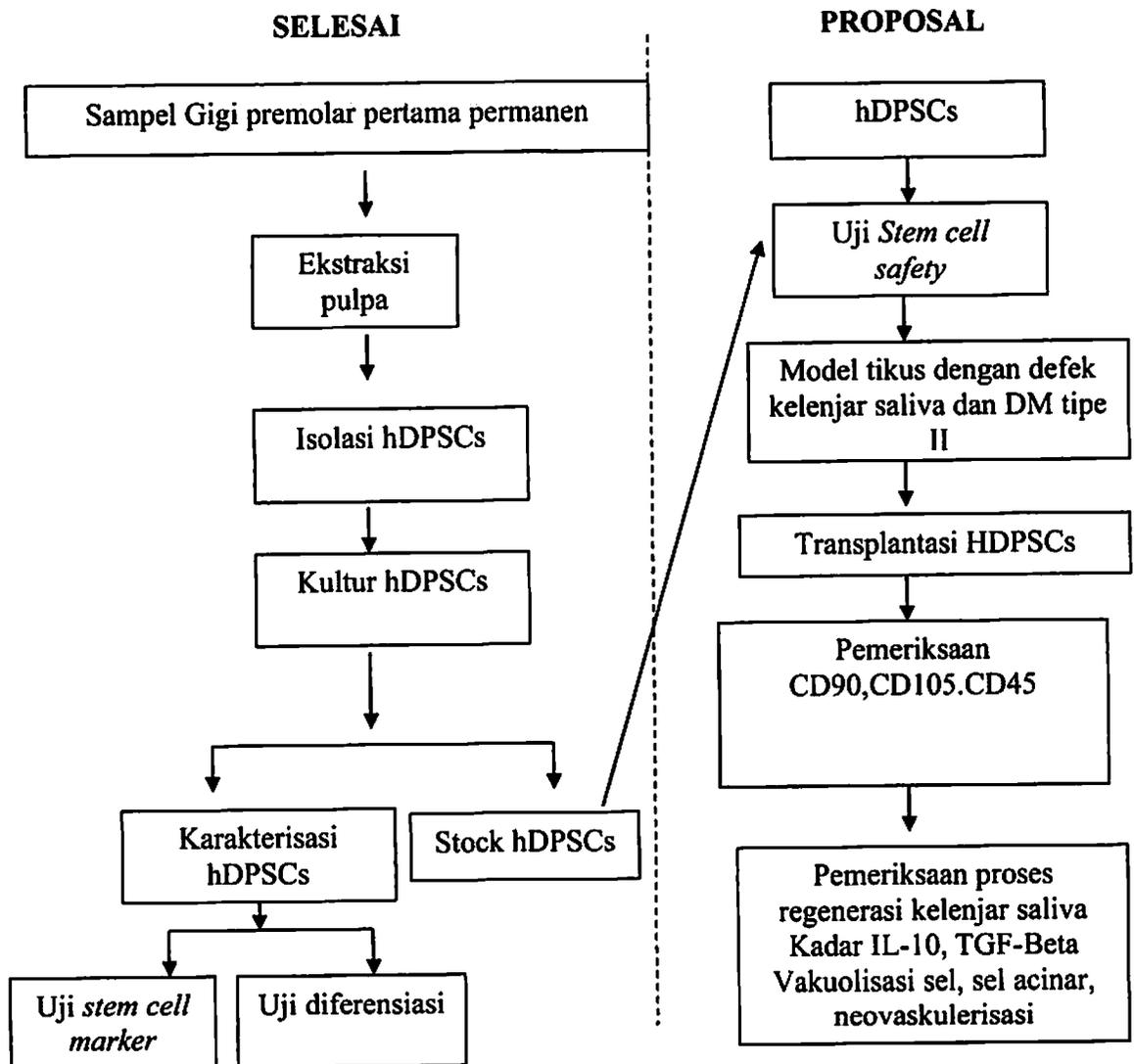
Tahap 4: Melakukan identifikasi terhadap jumlah sel acinar, neovaskulerisasi dan vakuolisasi

Jumlah neovaskularisasi, sel acinar, vakuolisasi disekitar kelenjar submandibular yang dideteksi dengan pengecatan HE yang dilakukan pada sediaan jaringan kelenjar submandibular kemudian diamati dengan mikroskop electron kemudian dihitung

4.8 Pengolahan dan Analisis Data

Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS. Data yang didapat hanya berupa dua jenis data yaitu secara kualitatif dan kuantitatif dengan skala data numerik sehingga bila berdistribusi normal maka dapat dilakukan dengan uji Multivariat Anova.

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur penelitian

4.10 Indikator Capaian Tahunan

Tabel 4.1 Indikator Capaian Tahunan

Obyek Penelitian	Indikator capaian	Metode	Luaran
Serum	IL-10	ELISA	Regenerasi defek kelenjar submandibular
Serum	TGF-Beta	ELISA	Regenerasi defek kelenjar submandibular
Jaringan Kelenjar Submandibula	Jumlah neovaskulerisasi	HE	Regenerasi defek kelenjar submandibular
Jaringan Kelenjar Submandibula	Jumlah sel acinar	HE	Regenerasi defek kelenjar submandibular
Jaringan Kelenjar Submandibula	Jumlah vakuolisasi	HE	Regenerasi defek kelenjar submandibular

4.11 Luaran penelitian

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



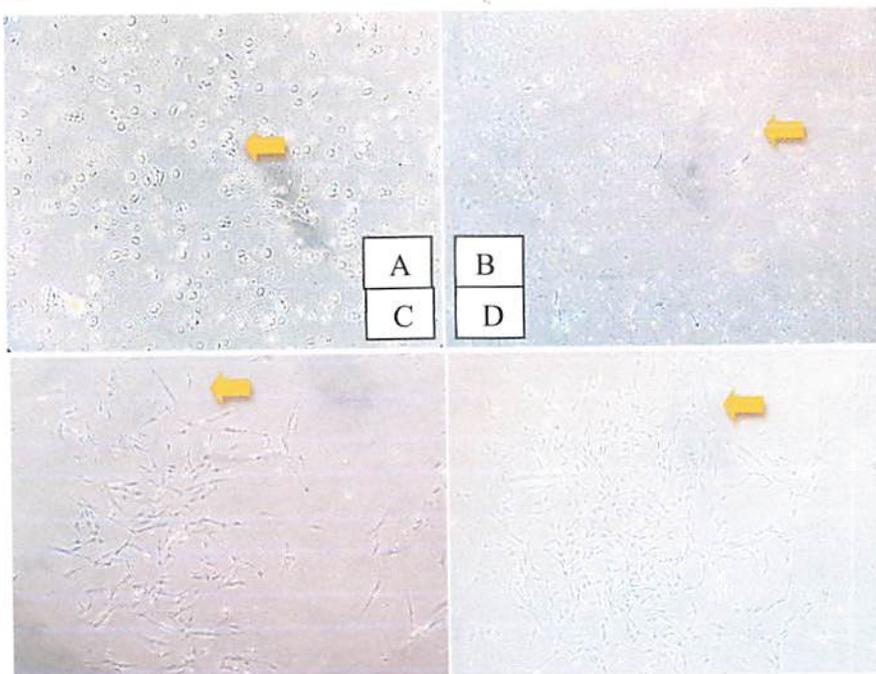
BAB 5

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian HDPSC terhadap peningkatan neovaskularisasi dan jumlah sel asinar pada defek kelenjar saliva model tikus diabetes. Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini disajikan dalam bentuk gambar dan table kemudian dianalisis dengan menggunakan statistik untuk menguji hipotesis.

5.1 Hasil Penelitian I

Setelah dilakukan isolasi dan kultur, HDPSC dipasase sebanyak tiga kali untuk mendapatkan jumlah sel yang optimal. HDPSC positif terhadap marker MSCs CD73(+), CD90(+), CD105(+), yang mana tidak mengekspresikan marker CD45(-).



Gambar 5.1. Morfologi HDPSC.

Keterangan:

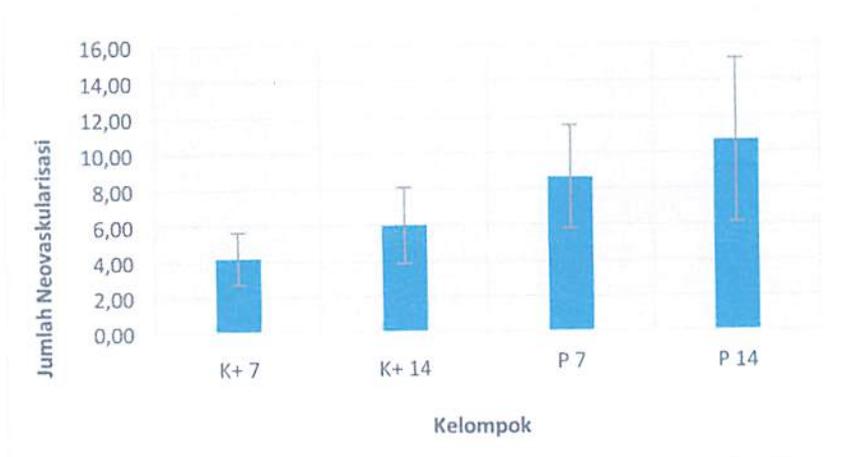
- A. Isolasi HDPSC pertama
- B. Pasase pertama, belum nampak adanya bentukan seperti fibroblas
- C. Pasase kedua, sudah nampak adanya bentukan seperti fibroblas
- D. Pasase ketiga, nampak adanya struktur seperti fibroblas yang lebih banyak

Tabel 5.1. Hasil Pembacaan dan Perhitungan Jumlah Neovaskularisasi dan Sel Asinar Kelenjar Saliva Model Tikus Diabetes.

Hari	Kelompok	Jumlah Neovaskularisasi	Jumlah sel asinar
Hari ke 7	Kontrol	25	2367
	Perlakuan	45	2885
Hari ke 14	Kontrol	36	2177
	Perlakuan	71	2392

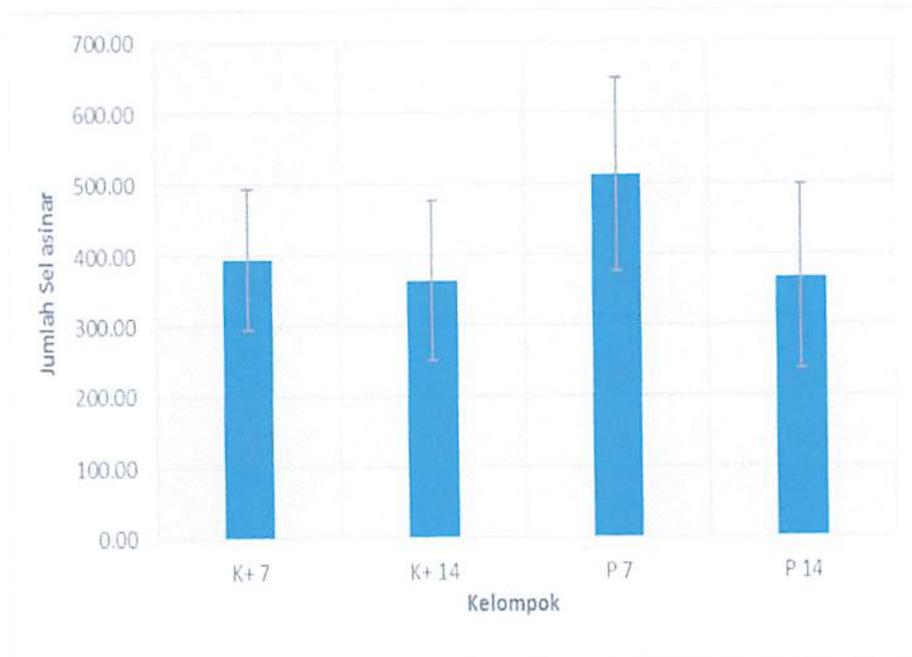
Berdasarkan data pada tabel 5.1 menunjukkan bahwa pemberian HDPSC pada kelompok perlakuan dapat meningkatkan jumlah neovaskularisasi dan sel asinar pada kelenjar saliva model tikus diabetes saat dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Dari tabel 5.1, maka dapat diperoleh rata rata dan standard deviasi jumlah neovaskularisasi dan sel asinar sebagai berikut:



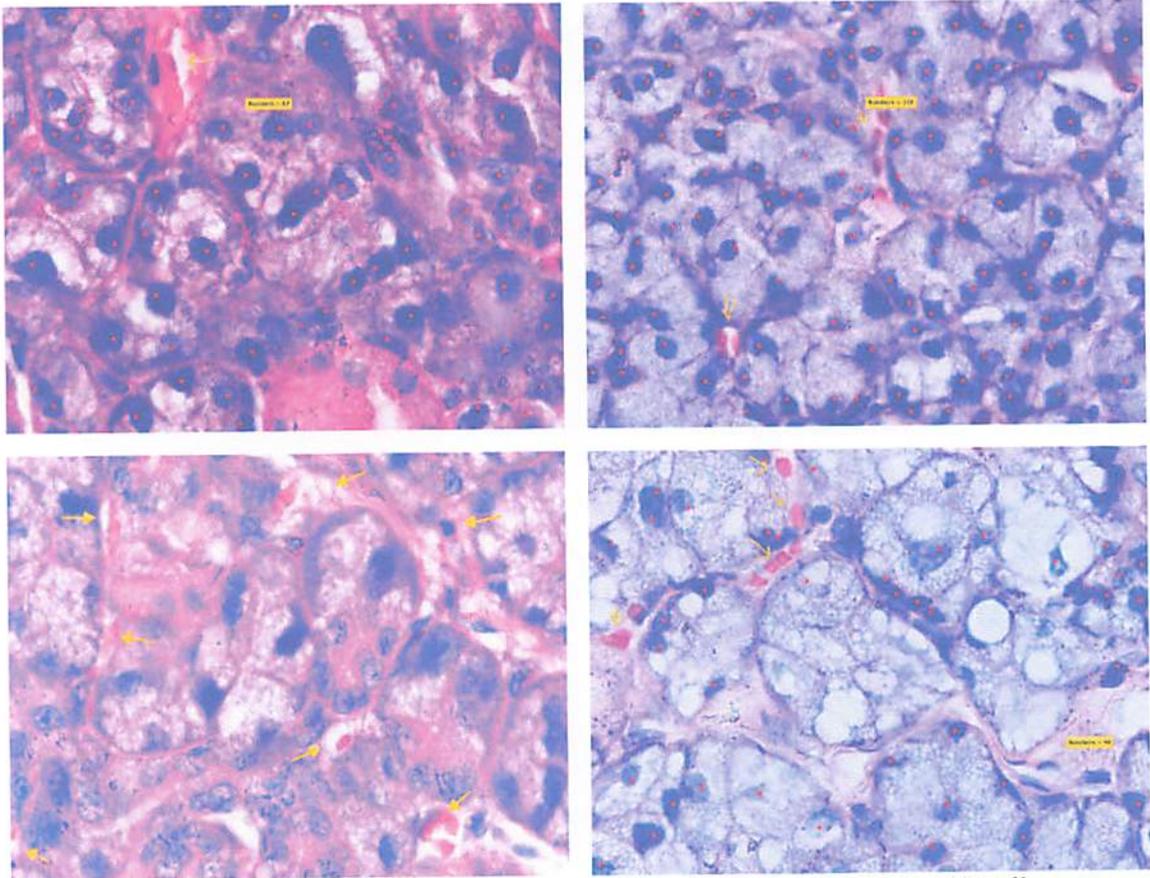
Gambar 5.2 Rata Rata \pm Standard deviasi jumlah neovaskularisasi pada kelompok kontrol dan perlakuan hari ke 7 dan 14.

Peningkatan jumlah neovaskularisasi paling tinggi yaitu pada kelompok perlakuan hari ke 14 sebesar 1.97 kali lipat dibandingkan kelompok kontrol hari ke 14. Pada kelompok perlakuan hari ke 7 terjadi peningkatan jumlah neovaskularisasi sebesar 1.8 kali lipat dibandingkan kelompok kontrol hari ke 7.



Gambar 5.3 Rata Rata ± Standard deviasi jumlah sel asinar pada kelompok kontrol dan perlakuan hari ke 7 dan 14.

Peningkatan jumlah sel asinar paling tinggi yaitu pada kelompok kontrol hari ke 7 sebesar 1.2 kali lipat dibandingkan kelompok kontrol hari ke 7. Pada kelompok perlakuan hari ke 14 terjadi peningkatan jumlah sel asinar sebesar 1.09 kali lipat dibandingkan kelompok kontrol hari ke 7.



Gambar 5.4 Perbandingan Gambaran Histologis neovaskularisasi/kapiler (panah hitam) sel asinar (panah kuning) pada kelompok kontrol dan perlakuan. A. Kelompok kontrol hari ke 7. B. Kelompok kontrol hari ke 14. C. Kelompok Perlakuan hari ke 7. D. Kelompok Perlakuan hari ke 14.

Neovaskularisasi dan sel asinar dianalisis dengan pemeriksaan HPA menggunakan pengecatan HE pada pembesaran 400x (mikroskop cahaya Nikon H600L dengan kamera digital DS Fi2 300 megapixel dan software prosesor gambar *Nikon Image System*). Bentuk neovaskularisasi berupa ruangan (kavitas) yang terdiri dari eritrosit berwarna merah dan dikelilingi sel endotel. Sel asinar berupa inti sel sentral yang terdapat pada sitoplasma eosinofilik.

Analisa Data

Uji Normalitas dengan *Shapiro-Wilk Test*

Sebelum melakukan uji perbedaan perlakuan, dilakukan pemenuhan asumsi terlebih dahulu yaitu dengan melakukan uji normalitas dan kehomogenan varians. Uji normalitas ini menggunakan *Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui apakah data berdistribusi normal.

Hipotesis yang digunakan adalah sebagai berikut:

H0: data berdistribusi normal

H1: data tidak berdistribusi normal

Statistik uji yang digunakan adalah p-value/Asymp. Sig/Sig. dalam SPSS. Apabila nilai Sig kurang dari 0.05 maka tolak H0 yang berarti data tidak berdistribusi normal. Sebaliknya, jika Sig lebih besar dari 0.05 maka H0 diterima yang artinya data berdistribusi normal.

Tabel 5.2. Uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk Test*.

Variabel	Kelompok	p value
Sel Asinar	K 7	0,540*
	K 14	0,692*
	P 7	0,150*
	P 14	0,458*
Neovaskularisasi	K 7	0,804*
	K 14	0,320*
	P 7	0,343*
	P 14	0,299*

* Distribusi Normal ($p\text{-value} > 0.05$).

Hasil uji normalitas didapatkan bahwa nilai Sig/p-value untuk kelompok kontrol dan perlakuan dari jumlah sel asinar dan neovaskularisasi bernilai lebih besar dari 0.05 sehingga H0 diterima yang artinya data berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas Varians dengan *Levene's Test*

Sebelum dilakukan uji perbandingan, maka perlu dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah variansi data homogen atau tidak.

Hipotesis untuk uji homogenitas adalah sebagai berikut:

H0: Varians data dari empat kelompok adalah sama (homogen)

H1: Varians data dari empat kelompok adalah tidak sama (tidak homogen)

Statistik uji yang digunakan adalah Sig. dalam SPSS. Apabila nilai Sig kurang dari 0.05 maka tolak H0 yang berarti varians data tidak homogen. Sebaliknya, jika Sig lebih besar dari 0.05 maka H0 diterima yang artinya varians data homogen.

Tabel 5.3. Uji Homogenitas dengan *Levene's Test*.

Variabel	Sig
Sel Asinar	0,473*
Kapiler	0,211*

* Varian Homogen ($Sig > 0.05$)

Hasil uji homogenitas didapatkan bahwa nilai Sig untuk kelompok kontrol dan perlakuan dari jumlah sel asinar dan neovaskularisasi bernilai lebih besar dari 0.05 sehingga H0 diterima yang artinya varians data bersifat homogen.

5.2.3 Uji *Independen T-Test*

Setelah data tersebut dinyatakan memiliki distribusi normal dan homogen, maka uji statistic untuk Analisa selanjutnya adalah uji *Independent T-Test*. Uji *Independen T-Test* digunakan untuk membandingkan perbedaan antara dua kelompok yaitu kelompok kontrol hari ke 7 dengan kelompok kontrol hari ke 14, kelompok kontrol hari ke 7 dengan kelompok perlakuan hari ke 7, dan kelompok kontrol hari ke 14 dengan kelompok perlakuan hari ke 14 (untuk menguji 2 perbedaan variable yaitu jumlah sel asinar dan neovaskularisasi). Uji beda dapat menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara dua variable jika p kurang dari 0.05 ($p < 0.05$).

Tabel 5.4. Tabel Signifikansi Uji *Independent T-Test* pada data jumlah neovaskularisasi dan sel asinar

Variabel	Kelompok yang dibandingkan	Sig.(2-tailed)
Jumlah neovaskularisasi	K 7 dengan K 14	0.110
	P 7 dengan P 14	0.384
	K 7 dengan P 7	0.007*
	K14 dengan P14	0.046*
Jumlah sel asinar	K 7 dengan K 14	0.616
	P 7 dengan P 14	0.085
	K 7 dengan P 7	0.155
	K14 dengan P14	0.961

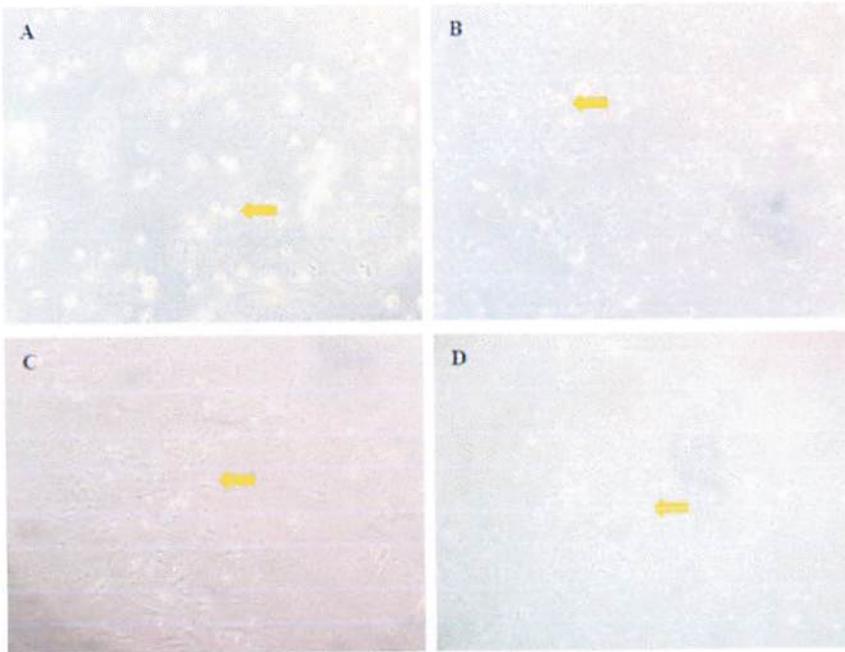
Dari hasil uji *Independent T-Test* di atas, didapatkan kelompok yang memiliki perbedaan bermakna yaitu pada K7 P7 dan K14 P14 pada variable jumlah neovaskularisasi dengan Sig. (2-tailed) = 0.007 dan 0.046. Hal ini berarti ada perbedaan bermakna pada variabel jumlah neovaskularisasi kelompok kontrol dan perlakuan pada hari ke 7 dan 14. Sedangkan perbandingan pada kelompok yang lain, tidak memiliki perbedaan yang bermakna.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek injeksi HDPSC terhadap vakuolisasi sel *acinar* pada defek kelenjar saliva model tikus diabetes pada hari ke 7 dan 14. Data yang didapatkan dari penelitian disajikan dalam bentuk gambar dan tabel dan dianalisis menggunakan uji statistik untuk menguji hipotesis

5.2 Hasil Penelitian 2

Kultur *Human Dental Pulp Stem Cell* (HDPSC)

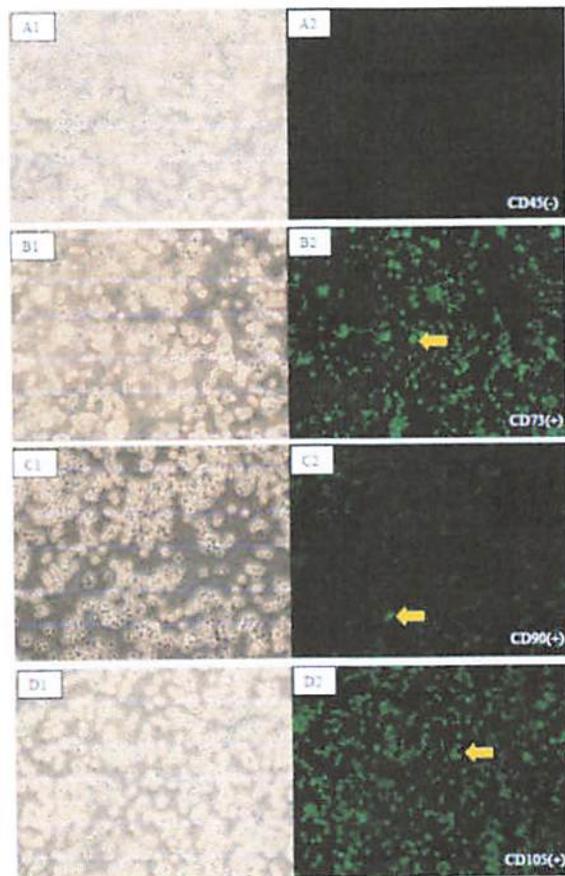
HDPSC yang telah diisolasi kemudian dikultur dan dipasase selama 3 kali untuk mendapatkan jumlah sel yang diinginkan yang tampak sebagai gambaran *fibroblast-like* pada gambar 5.4.



Gambar 5.4. Gambar proses kultur HDPSC (panah kuning) menggunakan mikroskop Nikon TMS Inverted Microscope (US). **A)** HDPSC pada isolasi pertama kali. **B)** HDPSC pada pasase pertama belum menampakkan gambaran fibroblast-like. **C)** HDPSC pada pasase kedua telah nampak gambaran *fibroblast-like*. **D)** HDPSC pada pasase ketiga nampak lebih banyak strutur fibroblast-like yang terbentuk.

Karakterisasi *Immunocytochemistry* (ICC)

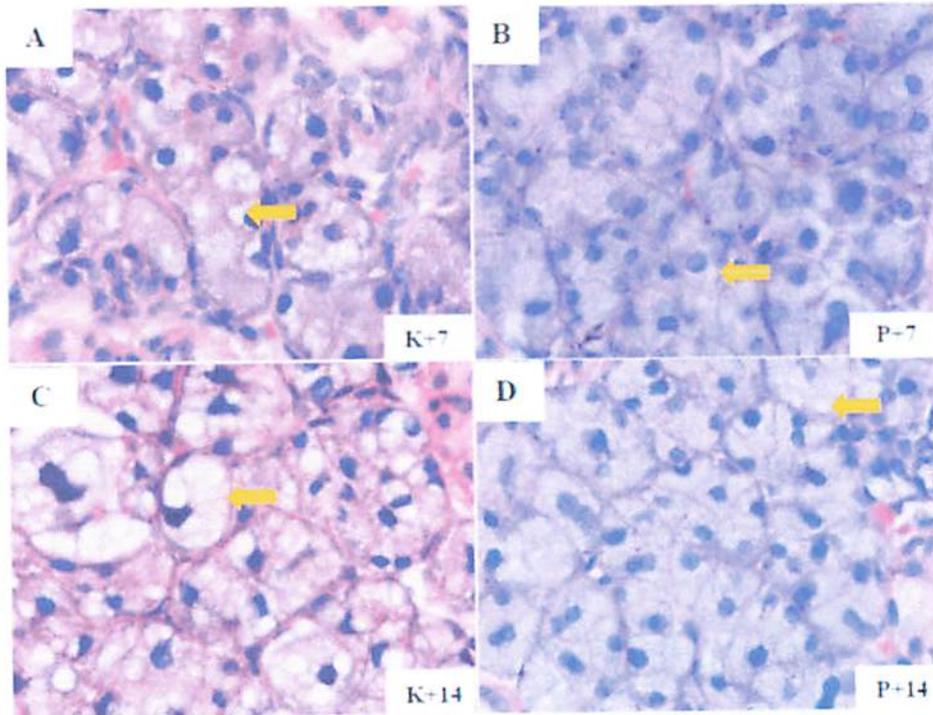
Pada pasase ke 3, HDPSC dilakukan pemeriksaan karakterisasi ICC untuk memastikan HDPSC mengekspresikan marker MSC yaitu CD73, CD90, CD105 (+) dan tidak mengekspresikan marker HSC yaitu CD45(-) menggunakan *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC) (gambar 5.5).



Gambar 5.5. Gambar karakterisasi MSC dengan pemeriksaan ICC menggunakan mikroskop fluorescense Olympus FSX100TM. Terlihat hasil ICC menunjukkan hasil negative (tidak berpendar) pada karakterisasi CD45 dan hasil positif (berpendar) pada karakterisasi CD73, CD90, dan CD105. Kolom kiri menunjukkan gambaran non kontras, sedangkan pada kolom kanan menunjukkan gambaran kontras. **A1)** Gambaran non kontras dari pemeriksaan ICC CD45. **A2)** Gambaran kontras dari pemeriksaan ICC yang menunjukkan negative CD45. **B1)** Gambaran non kontras dari pemeriksaan ICC CD73. **B2)** Gambaran kontras dari pemeriksaan ICC yang menunjukkan positif CD73. **C1)** Gambaran non kontras dari pemeriksaan ICC CD90. **C2)** Gambaran kontras dari pemeriksaan ICC yang menunjukkan positif CD90. **D1)** Gambaran non kontras dari pemeriksaan ICC CD105. **D2)** Gambaran kontras dari pemeriksaan ICC yang menunjukkan positif CD105.

Hasil pemeriksaan vakuolisasi sel acinar

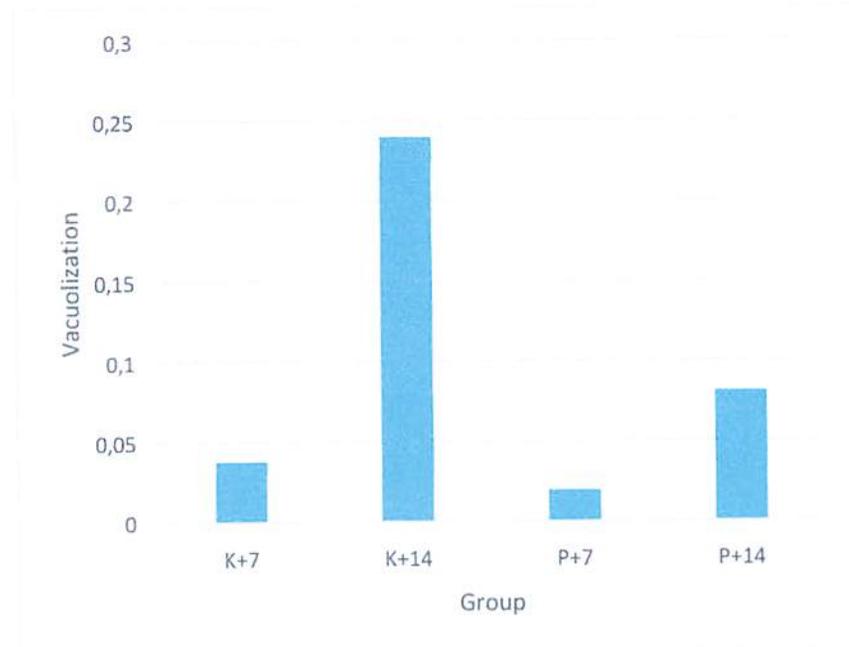
Pemeriksaan histopatologi vakuolisasi sel *acinar* dilakukan pada sediaan preparat HE. Vakuolisasi sel acinar nampak sebagai gambaran bulat berwarna putih dan berbatas tegas didalam sel acinar pada pengecatan HE (Gambar 5.6).



Gambar 5.6 Vakuolisasi sel acinar (panah kuning) pada pemeriksaan histopatologi menggunakan pengecatan HE pada perbesaran 1000x menggunakan mikroskop cahaya *Nikon H600L* dengan kamera digital DS Fi2 300 megapixel dan software pengolah gambar *Nikon Image System*. Vakuolisasi terlihat sangat jelas pada kelompok kontrol. **A)** Gambaran histopatologi sel asinar pada kelompok kontrol hari ke-7. **B)** Gambaran histopatologi sel asinar pada kelompok kontrol hari ke-14. **C)** Gambaran histopatologi sel asinar pada kelompok perlakuan hari ke-7. **D)** Gambaran histopatologi sel asinar pada kelompok perlakuan hari ke-14.

Analisa Data

Vakuolisasi sel *acinar* merupakan rerata nilai perbandingan antara jumlah sel *acinar* yang mengalami vakuolisasi dengan jumlah sel *acinar* normal pada pengecatan HE dari 5 lapang pandang berbeda. Nilai rerata vakuolisasi tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol hari ke 14 (K+14) yaitu 0.239, sedangkan nilai vakuolisasi terendah didapatkan pada kelompok perlakuan hari ke 7 (P+7) yaitu 0.019, dan nilai vakuolisasi pada kelompok kontrol hari ke 7 (K+7) yaitu 0.038 dan perlakuan hari ke 14 (P+14) yaitu 0.078 (Gambar 5.7).



Gambar 5. 7 Grafik rerata nilai vakuolisasi sel *acinar*

Uji Normalitas

Untuk mengetahui distribusi data penelitian maka dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Data yang didapatkan menunjukkan bahwa kelompok K+14 (0.665) berdistribusi normal ($p > 0.05$), sedangkan kelompok K+7 (0.206), P+7 (0.002), dan P+14 (0.007) tidak berdistribusi normal ($p < 0.05$) (Tabel 5.5).

Tabel 5.5 Hasil uji normalitas (uji *Shapiro-Wilk*)

Variabel	Kelompok	Sig.
Vakuolisasi	K+7	0.206
	K+14	0.665
	P+7	0.002
	P+14	0.007

Uji Homogenitas

Untuk mengetahui homogenitas data penelitian maka dilakukan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Data yang didapatkan menunjukkan bahwa kelompok perbandingan antara K+7 dan P+7 (0.630) ialah homogen ($p > 0.05$), sedangkan kelompok perbandingan K+7 dan K+14 (0.013), P+7 dan P+14 (0.216), serta K+14 dan P+14 (0.182) tidak homogen ($p < 0.05$) (Tabel 5.6).

Tabel 5.6 Hasil uji homogenitas (uji *Levene*)

Variabel	Kelompok	Sig.
Vakuolisasi	K+7 dan K+14	0.013
	P+7 dan P+14	0.216
	K+7 dan P+7	0.630
	K+14 dan P+14	0.182

Uji Beda

Data yang didapatkan tidak homogen dan tidak berdistribusi normal ($p < 0.05$) sehingga dilakukan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Data yang didapatkan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) pada kelompok perbandingan K+7 dan K+14 (0.006), P+7 dan P+14 (0.037) serta K+14 dan P+14 (0.037), sedangkan pada kelompok perbandingan K+7 dan P+7 (0.078) didapatkan perbedaan yang tidak signifikan (Tabel 5.7).

Tabel 5.7 Hasil uji beda (uji *Mann Whitney*)

Kelompok	Signifikasi
K+7 dan K+14	0.006
P+7 dan P+14	0.037
K+7 dan P+7	0.078
K+14 dan P+14	0.037

BAB 6

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

1. Menyelesaikan laporan penggunaan anggaran.
2. Menyelesaikan laporan tanggungjawab keuangan.
3. Meneruskan penelitian dengan beberapa parameter dan biomarker yang menunjukkan adanya pengaruh transplantasi intraglandular HDPSCs pada defek kelenjar submandibular karena DM tipe II sehingga didapatkan mekanisme yang jelas kemampuan HDPSCs pada regenerasi defek kelenjar submandibular karena DM tipe II.
4. Penentuan HDPSCs sebagai salah satu alternatif terapi definitif regenerasi defek kelenjar submandibular karena DM tipe II.



\

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. *Human Dental Pulp Stem Cell* (HDPSC) berpengaruh secara signifikan dalam peningkatan neovaskularisasi pada defek kelenjar saliva model tikus diabetes.
2. *Human Dental Pulp Stem Cell* (HDPSC) kurang berpengaruh secara signifikan dalam peningkatan jumlah sel asinar pada defek kelenjar saliva model tikus diabetes.
3. Pemberian HDPSC secara intraglandular dapat menurunkan secara signifikan progresivitas vakuolisasi sel *acinar* pada hari ke 14 pada kelenjar saliva model tikus diabetes.
4. Pemberian HDPSC secara intraglandular dapat meningkatkan secara signifikan kadar IL-10 pada hari ke 14 pada kelenjar saliva model tikus diabetes.
5. Pemberian HDPSC secara intraglandular dapat meningkatkan secara signifikan kadar TGF-Beta pada hari ke 14 pada kelenjar saliva model tikus diabetes.

7.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai proses pembuatan model tikus diabetes agar didapatkan model tikus diabetes yang lebih homogen. Serta, diperlukan penelitian mengenai marker seluler regenerasi kelenjar saliva, untuk dapat melihat lebih detail efek perubahan yang terjadi pada injeksi intraglandular HDPSC terhadap regenerasi kelenjar saliva.





DAFTAR PUSTAKA

- Aitken-Saavedra J, Rojas-Alcayaga G, Maturana-Ramirez A, Escobar-Alvarez A, Cortes-Coloma A, Reyes-Rojas M, Viera-Sapiain V, Villablanca-Martinez C, Morales-Bozo I. 2015. Salivary gland dysfunction markers in type 2 diabetes mellitus patients. *J Clin Exp Dent* 7(4): 501-5
- American Diabetes Association. 2012. Standards of Medical Care in Diabetes-2012. Available from: http://care.diabetesjournals.org/content/37/Supplement_1/S14.full#T1. Accessed on 16 Mei 2017].
- Augello A., Kurth T.B, and Bari C.D. Mesenchymal *stem cells*: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European Cells & Materials*. 2010; 20(121): 121–133.
- Cencioni C, Capogrossi MC, Napolitano M. 2012. The SDF-1/CXCR4 axis in stem cell preconditioning. *Cardiovascular Research* 94(3): 400-7
- Chen D, Xia Y, Zuo K, Wang Y, Zhang S, Kuang D, Duan Y, Zhao X, Wang G. 2015. Crosstalk between SDF-1/CXCR4 and SDF-1/CXCR7 in cardiac stem cell migration. *Sci Rep* 18(5): 1-9
- Cotroneo Emanuele, Proctor Gordon, Carpenter Guy. 2010. *Regeneration of Acinar Cells following ligation of rat submandibular gland retraces the embryonic - perinatal pathway of cytodifferentiation*. International Society of Differentiation. Published by Elsevier Ltd. hal.120 -130
- David, E.S. 2002. Pankreas: Metabolisme Glukosa dan Diabetes Melitus. In: Sylvia A. Price and Lorraine M. Wilson. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit Vol II Ed 6*. Jakarta: EGC. 1267-1270.
- Feng J, Van Zwaag 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.
- Gao F., Chiu S.M, Motan D.A. Mesenchymal *stem cells* and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death & Disease*. 2016; 7(1):62.
- Gusbi Ghada A.M, Shredah Mohamed, Soliman Abd El Hafez. 2014. *Submandibular Glands as an Evident of the Effects of Antioxidant on Alloxan Induced Diabetic Rats*. *World Journal of Medical Sciences*. hal. 210-216
- Janebodin K & Reyes M. 2012. Neural Crest-Derived Dental Pulp Stem Cells Function as Ectomesenchyme to Support Salivary Gland Tissue Formation. *Dentistry* 13(001):1-9
- Janebodin K, Zeng Y, Buranaphatthana W, Leronimakis N, Reyes M. 2013. VEGFR2-dependent Angiogenic Capacity of Pericyte-like Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res* 92(6): 524-31
- Jensen SB, Pederson AML, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, Dutilh J, Fulton JS, Jankovic J, Lopes NNF, Muniz LV, Murdock-Kinch CA, Nair RG, Napeñas JJ, Nogueira-Rodrigues A, Saunders D, Stirling B, Bültzingslöwen I, Wiekels DS, Elting LS, Spijkervet FKL, Brennan MT. A systematic review of

- salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact. *Support Care Cancer* 18(8): 1061-79
- Jiang D, Gao F, Zang Y, Wong DSH, Li Q, Tse HF, Xu G, Yu Z, Lian Q. 2016. Mitochondrial transfer of mesenchymal stem cells effectively protects corneal epithelial cells from mitochondrial damage. *Cell death dis* 7(11): 1-10
- 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.
- Kardika, I.B.W., Herawati, S., Wayan, P.S.Y. 2013. Preanalitik dan Interpretasi Glukosa Darah Untuk Diagnosis Diabetes Melitus. Available from: <http://download.portalgaruda.org/article.php?article=82599&val=970>. Accessed on 17 Mei 2017.
- Kasper H.C., Bohm S., and Jacobs R., Different populations and sources of human mesenchymal *stem cells* (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling: CCS Journal.* 2011; 9(1): 12.
- King NMP, Perrin J. 2014. Stem Cell Research and Therapy: *Ethical Issues in Stem Cell Research and Therapy.* USA: BiomedCentral hal.5:85.
- Kojima T, Kanemaru SI, Hirano S, Tateya I, Ohno S, Nakamura T, Ito J. 2011. Regeneration of Radiation Damaged Salivary Glands with Adipose-Derived Stromal Cells. *The Laryngoscope* 121(9): 1864-9
- Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ *stem cell* recruitment to the liver. *J Clin Invest.* 2003;112:160–169.
- 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.
- Kwon D, Kim JS, Cha BH, Park KS, Han I, Park KS, Bae H, Han MK, Kim KS, Lee SH. 2016. The effect of fetal bovine serum (FBS) on efficacy of cellular reprogramming for induced pluripotent stem cell (iPSC) generation. *Cell transplantation* 25(6):1025-42
- Lapidot T, Kollet O. The brain-bone-blood triad: traffic lights for stem-cell homing and mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:1–6.
- Law S., and Chaudhuri S. Mesenchymal *stem cell* and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges. *American Journal of Stem cells.* 2013; 2(1): 22–38.
- Li Shiyong, Gu Xiasong, Yi Sheng. 2017. *The Regulatory Effects of Transforming Growth Factor-β on Nerve Regeneration.* *Cell Transplantation* Vol. 26.hal . 381-394

- 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.
- 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.
- Manaf, A. 2009. Insulin: Mekanisme Sekresi dan Aspek Metabolisme. In: Sudoyo, Aru W., Bambang Setiyohadi, Idrus Alwi, Marcellus Simadibrata K., Siti Setiati. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Volume III Ed 4. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Vol III Ed 5*. Jakarta: InternaPublishing. 1868-1869.
- McCall AD and Baker OJ. 2015. Characterization of Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Human Minor Salivary Glands with Sjögren's Syndrome. *Journal of Histochemistry Cytochemistry* 63(5): 340-9
- Michalopoulos GK. 2010. *Liver regenartion after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas*. *Am J Pathol*.hal. 176: 2-13
- Miran S., Mitsiadis T.A, and Pagella P. Innovative dental *stem cell*-based research approaches: the future of dentistry. *Stem cells International*. 2016;1(1):1.
- Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G. SHED: *stem cells* from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 2003; 5807–5812.
- Monguió-Tortajada M, Roura S, Gálvez-Montón C, Franquesa M, Bayes-Genis A, Borràs FE. 2017. Mesenchymal Stem Cells Induce Expression of CD73 in Human Monocytes In Vitro and in a Swin Model of Myocardial Infarction In Vivo. *Front Immunol* 20(8): 1577
- Nam H, Kim GH, Bae YK, Jeong DE, Joo KM, Lee K, Lee SH. 2017. Angiogenic Capacity of Dental Pulp Stem cells Regulated by SDF-1 α -CXCR4 Axis. *Hindawi* 1-3
- Nassiri F, CUsimano MD, Scheithauer BW, Rotondo F, Fazio A, Yousef GM, Syro LV, Kovacs K, Lloyd R. 2011. Endoglin (CD105): A review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Research* 31(6):2283-90
- Nickerson HD & Dutta S. 2012. Diabetic Complications: Current Challenges and Opportunities. *J. of Cardiovasc. Trans. Res* 5(4): 375-9
- Park MS, Kim YH, Jung Y, Kim SH, Park JC, Yoon DS, Kim SH, Park JC, Yoon DS, Kim SH, Lee JW. 2015 In situ recruitment of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells using chemokines for articular cartilage regeneration. *Cell Transplant*. hal. 24:1067
- Purnamasari, D. 2009. *Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Melitus*. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Vol III Ed 5*. Jakarta: InternaPublishing. 1880-1882.
- Pusat data dan informasi kementerian kesehatan RI (Infodatin). 2013. *Situasi dan analisis diabetes*. Available from: www.depkes.go.id/download.php?file=download/pusdatin/infodatin/infodatin-diabetes.pdf. [Accessed 17 Mei 2017].

- Rantam FA, Ferdiansyah, Purwati. 2014. Stem cells mesenchymal, hematopoetik dan model aplikasi. 2nd Ed. Surabaya: Airlangga University Press, P. 59-60
- Reddi AH. 2007. Growth Factors and Morphogenesis Signals for Tissue Engineering. In Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD. Tissue Engineering. CDR Press, Boca Raton, London. Chapter 2.
- Rochefort 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.
- Ryu JM, Lee SH, Seong JK, Han HJ. 2015. Glutamine contributes to maintenance of mouse embryonic stem cell self-renewal through PKC-dependent downregulation of HDAC1 and DNMT1/3a. *Cell Cycle* 14(20): 3293-305
- Sakai T. 2016. Oral Science International: *Development and Regeneration of Salivary Gland Toward for Clinical Application*. Japan: Elsevier. hal. 7-14
- Sarsenov Dauren, Dogrul Ahmet, Kosemehmetoglu Kemal, Tirnaksiz Mehmet, Abbasoglu Osman. 2017. *Local and systemic angiogenic and antiangiogenic response in rats after 70% hepatectomy*. Original Article. *Int J Clin Exp Pathol*. hal. 10 (3): 2939-2949
- Slack JMW. 2018. *The Science of Stem Cells*. New Jersey: Wiley, P. 49-55
- Varghese DS, Parween S, Ardah MT, Emeralds BS, Ansari SA. 2017. Effects of Aminoglycoside Antibiotics on Human Embryonic Stem Cell Viability during Differentiation In Vitro. *Stem Cells International* 2017:1-19
- Watchrarat K, Korchunjit W, Buranasinsup S, Taylor J, Rituechai P, Wongtawan T. 2017. MEM α promotes cell proliferation and expression of bone marrow derived equine mesenchymal stem cell gene markers but depresses differentiation gene marker. *Journal of equine veterinary science* 50:8-14
- Xu J, Wang D, Liu D, Fan Z, Zhang H, Liu O, Ding G, Gao R, Zhang C, Ding Y, Bromberg JS, Chen W, Sun L, Wang S. 2012. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjögren syndrome. *Blood* 120(15): 3142-51
- Yoo C, Vines JB, Alexander G, Murdock K, Hwang P, Jun HW. 2014. Adult stem cells and tissue engineering strategies for salivary gland regeneration: a review. *Biomaterials Research* 18(9): 1-12
- Zavan B. 2016. *Dental Stem Cells: Regenerative Potential*. Switzerland: Springer, P. 14.

LUARAN JURNAL INTERNASIONAL BEREPUTASI TERINDEKS SCOPUS



KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University

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

Dear Ida Bagus Narmada,

Thank you for submitting your manuscript entitled "The Efficacy of Human Dental Pulp Stem Cell in regeneration of Submandibular Gland Defects of Diabetic Wistar Rats (*Rattus Novergicus*)" to The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Kafkas. Your manuscript will first be evaluated by the editors and if it meets the Journal's standards, will be forwarded to referees for scientific review. You will be able to learn the stage of your manuscript in the review process through the author center to which you will have access with your user name and password. You can use the author center for revisions and new submissions.

<http://submit.vetdergikafkas.org>

Username: idabagusnarmada

Sincerely,

Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi

info@vetdergikafkas.org

Info: This is an automatic system message..

1. Submit di Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi - Q3

JournalOn Web Contemporary Clinical Dentistry					
Status of manuscripts					
SR	Article Title	Manuscript Id	Current Status	Remarks / file	Action
1	The Regeneration of Salivary Gland Defects of Diabetic Wistar Rats (Rattus Novergicus) after Human D...	ccd_655_18	Under issue preparation		Click here and write to the editor

JournalOn Web Contemporary Clinical Dentistry		
Welcome Diah Ernawati	Message	Close

Dear Prof. Ernawati,

The Editorial Board of Contemporary Clinical Dentistry is pleased to inform you that your manuscript entitled The Regeneration of Salivary Gland Defects of Diabetic Wistar Rats (Rattus Novergicus) after Human Dental Pulp Stem Cells Intraglandular Transplantation on Acinar Cell Vacuolization and Interleukin-10 Serum, with manuscript number ccd_655_18, is acceptable for publication in the Journal.

We will be sending you the page proofs through the manuscript management site before publication of the manuscript. At that time, you may place the order for the extra reprints.

If you have not sent the copyright form signed by all the contributors and the images, if any, till now, you are requested to do so at the earliest. Copyright form can be emailed to copyright@medknow.com. Copyright form can be emailed to copyright@medknow.com.

Please note that the journal reserves the rights to make changes in the language, grammar, presentation, etc. to suit the journal's requirements.

We thank you for submitting your valuable research work to Contemporary Clinical Dentistry.

With warm personal regards,

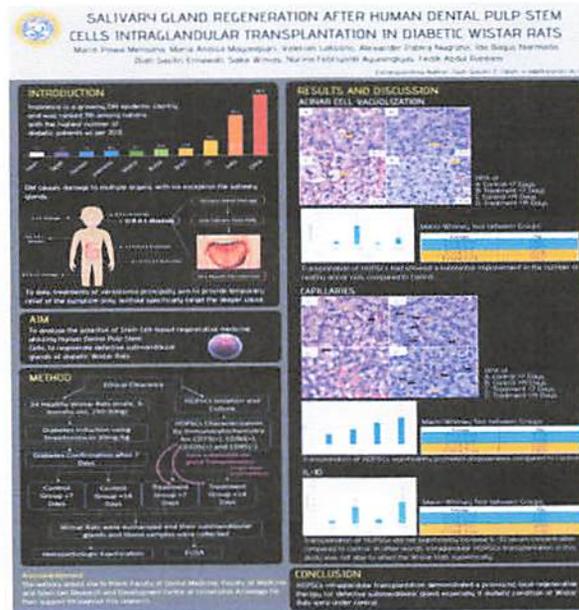
Yours sincerely,

The Editorial Team

Contemporary Clinical Dentistry

---END OF MESSAGE---

2. *Accepted di Contemporary Clinical Dentistry, Medknow - Q3 and will published.*



3. 1st Place dan Best Poster for Research in 5th Dental Science Research UGM South East Asia 2018 – Konferensi tingkat Internasional ASEAN.