

Bidang Ilmu : Ortodonsia



LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING
TAHUN 2008

KA
K
LP.153/10
Ard
S

**STIMULASI IGF-1 UNTUK MENSTIMULASI PERTUMBUHAN
PREKONDROSIT KARTILAGO SEKUNDER PADA
KONDILLI MANDIBULA:
Suatu Terapi Baru Di Bidang Ortodontik Masa Kini Untuk
Harmonisasi Tingkat Skeleto-maksilofasial**

Ketua Peneliti :
Dr. I.G.A. Wahyu Ardani, M.Kes., drg.

Anggota Peneliti :
Drg. Achmad Sjafei, M.S., Sp.Ort.(K)
Dr. Widjati, M.Si., drh.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Desentralisasi Penelitian
Nomor : 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008
Tanggal 5 Maret 2008

Fakultas Kedokteran Gigi
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Tahun 2008



LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. Judul Penelitian : Stimulasi IGF-1 Untuk menstimulasi Pertumbuhan Prekondrosit Kartilago Sekunder Pada Kondilli Mandibula : Suatu Terapi Baru Di Bidang Ortodontik Masa Kini Untuk Harmonisasi Tingkat Skeleto-maksilofasial

2. Ketua Peneli

- a. Nama Lengkap : Dr. I G.A. Wahyu Ardani, drg., M.Kes.
 b. Jenis Kelamin : Perempuan
 c. NIP : Lektor / Gol. III C/ 131 831 451
 d. Jabatan Fungsional : Lektor
 e. Jabatan Struktural : -
 f. Bidang Keahlian : Ortodonsia
 g. Fakultas/Jurusan : Ked. Gigi/ Ortodonsia
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 i. Tim Peneliti :

No.	Nama	Bidang Keahlian	Fakultas/ Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Drg. Achmad Sjafei, M.S., Sp.Ort.(K)	Ortodonsia	Kedokteran Gigi	Unair
2.	Dr. Widjiati, M.Si., drh.	Kultur jaringan	Kedokteran Hewan	Unair

3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian :

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 7 (tujuh) bulan.
 b. Biaya total yang diusulkan : Rp. 35. 000.000,- (Tiga puluh Lima Juta Rupiah)
 c. Biaya yang disetujui tahun I : Rp. 35. 000.000,- (Tiga puluh Lima Juta Rupiah)

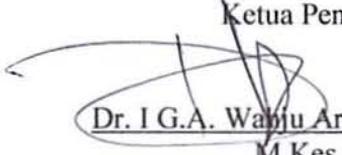
Surabaya, 10 Maret 2009

Mengetahui,
 Dekan Fakultas kedokteran Gigi
 Universitas Airlangga



Prof. Dr. Ruslan Effendy, M.S.
 Sp.KG., drg.
 NIP. 130 604 273

Ketua Peneliti



Dr. I G.A. Wahyu Ardani,
 M.Kes., drg.
 NIP. 131 831 451

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
 Universitas Airlangga



Prof. Dr. Bambang Sektiari L, DEA., drh.
 NIP. 131 837 004

RINGKASAN

JUDUL PENELITIAN : Stimulasi IGF-1 Untuk menstimulasi Pertumbuhan Prekondrosit Kartilago Sekunder Pada Kondilli Mandibula : Suatu Terapi Baru Di Bidang Ortodontik Masa Kini Untuk Harmonisasi Tingkat Skeleto-maksilofasial

KETUA PENELITIAN : Dr. I G.A. Wahyu Ardani, drg., M.Kes.

ANGGOTA PENELITIAN : Drg. Achmad Sjafei, drg., MS., Sp.Ort. (K)
Dr. Widjiati, drh., Msi.

TAHUN : Maret 2009, 27 Halaman

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya yaitu membuktikan stimulasi IGF-1 dalam pertumbuhan prekondrosit kartilago sekunder kondili mandibula melalui uji *in vitro* dengan menggunakan kultur primer kondrosit yang dikembangkan langsung dari kondrosit kondili mandibula fetus tikus (*Rattus novergicus*) : suatu terapi baru di bidang ortodontik masa kini untuk harmonisasi tingkat skeleto-maksilofasial.

Pada tahap penelitian ini, dilakukan uji *in vivo* untuk membuktikan stimulasi IGF-1 terhadap pertumbuhan kartilago kondili mandibula tikus (*Rattus noevegicus*) usia 8 hari.

Adapun tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Pembuktian pertumbuhan kondrosit dari kartilago kondili anak tikus setelah distimulasi dengan IGF-1 secara langsung pada kondili mandibula tikus.
2. Pemeriksaan reseptor IGF-1 kondrosit dari kartilago kondili anak tikus setelah distimulasi dengan IGF-1 secara langsung pada kondili mandibula tikus dengan metode imunohistokimia.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium *in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Unair dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Sampel penelitian yang digunakan tikus (*Rattus noevegicus*) galur *Wistar* yang berasal dari kandang hewan percobaan Fakultas farmasi (Unair) Surabaya. Masing-masing kelompok terdiri dari 18 ekor, dengan usia 14 hari dengan berat

...

badan 17-20 gram. Pembagian kelompok sampel yang homogen dilakukan secara alokasi random sehingga setiap anggota sampel mempunyai kesempatan sama untuk menempati kelompok kontrol, 1, 2, dan kelompok 3.

Pemberian eksogenous IGF-I dosis 50 ng/ml secara langsung. Pengamatan dilakukan setelah 14 hari dan 28 hari setelah perlakuan. Setelah itu tikus dilakukan euthanasia dengan ether. Kemudian leher dipisahkan dari bagian badan dan dicuci dengan alkohol 70 % dua kali untuk menghilangkan sisa darah kemudian dicuci dengan MEM lengkap. Siap untuk diawetkan dan dibuat blok parafin. Pemeriksaan ekspresi reseptor IGF-I menggunakan teknik imunohistokimia.

Data yang diperoleh dari ekspresi reseptor IGF-1 dianalisis secara diskriptif dan dilanjutkan uji ANOVA untuk melihat perbedaan ekspresi reseptor IGF-I setelah pemberian IGF-I 50 ng/ml pada hari ke 14 dan ke-28.

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah :
Pemberian eksogenous IGF-1 dosis tunggal 50 ng/ml dapat menstimulasi pertumbuhan kartilago kondili mandibula tikus (*Rattus noevigicus*) secara *in vivo* setelah 14 hari dan 28 hari. Aktivitas IGF-I tampaknya bekerja melalui reseptor IGF-I, hal ini ditunjukkan ada peningkatan ekspresi reseptor IGF-I secara signifikan.

Saran yang bisa disampaikan dari penelitian ini adalah :
Disarankan untuk mempelajari tingkat kematangan pada zona proliferaatif dan zona hipertrofik dengan mendeteksi ekspresi setiap zona dari kondili mandibula setelah stimulasi dengan eksogenous IGF-I. Dengan demikian diharapkan dapat diketahui tingkat diferensiasi kondrosit, transisi dari kondroblastik menjadi osteoblastik.

SUMMARY

This study is the further study about IGF-I stimulation *in vitro* prechondrocyte mandybular secondary cartilage through primary chondrocyte culture from mandybular rat condyle (*Rattus neovergicus*) : as a new inovation orthodontic therapy for skeletomaxillofacial harmonization level.

In this study, *in vivo* investigation about IGF-I stimulation for rat mandybular condyle growth (*Rattus noevigicus*) 14 days old.

The study conducted in two steps :

1. To prove the chondrocyte mandybular rat condyle after direct eksogenous IGF-1 stimulation.
2. To prove IGF-1 receptor in the chondrocyte mandybular rat condyle after direct eksogenous IGF-1 stimulation through imunohistochemistry method.

The study has done in Laboratoiu in vitro Faculty of Verinary UNAIR and Laboratorium Biomedic UNIBAW.

The sampel was used 18 rat (*Rattus noevegicus*) Wistar strain with 17-20 grams each body weight, from the Faculty of Farmacy UNAIR. This homogen sampel had the same opportunity and divided in 3 group investigation.

The aplication of exogenous IGF-1 was directly injected to mandybular rat condyle. Furthermore, the rat was euthanasia with ether. The head was split from the body and washed in 70 % alcohol and medium. The mandibular rat condyle was ready for paraffin block and the investigation of IGF-1 receptor expression through immunohystochemistry techniq.

All the diskriptif data revealed ware analysed with ANOVA test. The conclusion of this study : exogenous IGF-1 with the single dose 50 ng/ml could be stimulate the growth of mandybular rat condyle (*Rattus noevegicus*) in vivo, after 14 days and 28 days stimulation. The stimulation activity of exogenous IGF-1 through IGF-1 receptor. This was proved that the IGF-1 receptor expresion sicnivicantly were increased in every investigation.

The suggestion: to investigate the IGF-1 R in proliferative and hypertrophic zone. Furthermore, it is need to investigate the gene expression in every zone in mandybular rat condyle growth after the exogenous IGF-1 stimulation.

KATA PENGANTAR

Syukur alhamdulillah kami panjatkan kehadiratNya atas berkah dan karuniaNya sehingga dapat menyelesaikan laporan kegiatan penelitian yang berjudul : **Stimulasi IGF-1 Untuk menstimulasi Pertumbuhan Prekondrosit Kartilago Sekunder Pada Kondilli Mandibula : Suatu Terapi Baru Di Bidang Ortodontik Masa Kini Untuk Harmonisasi Tingkat Skeleto-maksilofasial.**

Penelitian ini dapat terlaksana atas pembiayaan dari dana Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi.Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional. Oleh karena itu pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih kepada :

1. Dirjen Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional.
2. Tim Panitia Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersain.
3. Rektor Universitas Airlangga Surabaya.
4. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Airlangga Surabaya.
5. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

Kami menyadari bahwa penulisan laporan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu kritik dan saran yang sifatnya menyempurnakan laporan ini sangat kami harapkan. Semoga tulisan ini bermanfaat bagi semua dan bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dibidang ortodonsi.

Surabaya, Maret 2009

Tim Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PEGESAHAN	ii
RINGKASAN DAN <i>SUMMARY</i>	iii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Subyek Penelitian	3
1.3. Hasil Yang Diharapkan	4
BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	5
2.1. Tujuan Penelitian	5
2.1.1. Tujuan Khusus	5
2.1.2. Tujuan Umum	5
2.2. Manfaat Penelitian	6
2.2.1. Manfaat Teoritis	6
2.2.2. Manfaat Praktis	6
BAB III TINJAUAN PUSTAKA	7
3.1. Teori Mekanisme Pertumbuhan Mandibula Pada Manusia	7
3.2. Karakteristik Kartilago	8
3.3. <i>Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)</i> : Suatu Hormon Pertumbuhan	10

..

BAB IV METODE PENELITIAN	12
4.1. Lokasi Penelitian	12
4.2. Rancangan Penelitian	12
4.3. Sampel Penelitian	13
4.4. Bahan Penelitian.....	14
4.5. Alat Penelitian	14
4.6. Variabel Penelitian	14
4.7. Kerangka Operasional Penelitian	15
4.8. Prosedur Pengumpulan data Penelitian	15
4.8.1. Persiapan perlakuan	15
4.8.2. Cara pengumpulan data	15
4.9. Analisis Data	17
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	18
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	25
6.1. Kesimpulan	25
6.2. Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26

...

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 5.1. : Analisis uji diskriptif : Ekspresi IGF-I R pada pengamatan hari ke-14 setelah stimulasi eksogenous IGF-I 50 ng/ml terhadap pertumbuhan kartilago mandibula tikus	23
Tabel 5.2. : Hasil uji ANOVA satu arah : Ekspresi IGF-I R pada pengamatan hari ke- 28 setelah stimulasi eksogenous IGF-I 50 ng/ml terhadap pertumbuhan kartilago mandibula tikus	23

DAFTAR GAMBAR

	halaman
Gambar 2.1. Hubungan bagian mitotik dari kartilago kondili dan berbagai zona kondroblastik dan zona lain dari jaringan kartilago	9
Gambar 5.1. ekspresi IGF-I R kartilago kondili mandibula tikus setelah 14 hari distimulasi eksogenous IGF-I 50 ng/ml (A) Kontrol; B) Perlakuan (ekspresi reseptor IGF-I dihitung dengan satuan unit/10 lapang pandang)	19
Gambar 5.2. ekspresi IGF-I R kartilago kondili mandibula tikus setelah 28 hari distimulasi eksogenous IGF-I 50 ng/ml A) Kontrol; B) Perlakuan (Keterangan : ekspresi reseptor IGF-1 dihitung dengan satuan unit/10 lapang pandang)	19



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penelitian ini dilakukan untuk mengatasi kasus-kasus disharmoni-maksilofasial yang gagal diterapi dengan perawatan konvensional. Hal ini karena pola pertumbuhan yang salah atau kekurangan pertumbuhan pada kasus tertentu seperti *pituitary dwarfism* (Laron, 2001; Watahiki dkk., 2004). Adapun terapi yang sudah dilakukan sampai saat ini adalah memanipulasi dengan meletakkan gigi-geligi pada lengkung geligi di tempat yang benar, tanpa memperhitungkan perbaikan disharmoni skeleto-maksilofasial yang sangat sulit untuk dilakukan perawatan secara konvensional. Secara teoritis kasus disharmoni skeleto-maksilofasial memerlukan perawatan kombinasi ortodontik bedah (Rakosi dan Jonas, 1989).

Pertumbuhan kartilago kondili mandibula sebagian ditentukan oleh epigenetik tetapi juga dipengaruhi oleh ekstrinsik seperti rangsangan mekanik dan sistemik, serta mediator lokal (seperti : *growth factor* dan sitokin). IGF-1 disintesis dan disekresi di hati dan organ lain setelah distimulasi oleh hormon pertumbuhan. IGF-1 mempercepat pertumbuhan, differensiasi dan aktivitas sintesis substrat di dalam osteoblast dan kondroblast. Lebih lanjut, IGF-1 dilaporkan berperan penting dalam pertumbuhan tulang panjang dan juga pertumbuhan pada kondili mandibula (Watahiki *et al.*, 2004 dan Maor *et al.*, 1993).

Insulin-like Growth Factor-1 pertama kali diisolasi oleh Salmon and Daughaday pada tahun 1957 (*cit. Laron, 2001*), yang mampu menstimulasi sulfat

dalam kartilago. IGF-1 adalah famili dari insulin, yang merupakan peptida kecil terdiri dari 70 asam amino dengan berat molekul 7649 Da. Mirip dengan insulin, IGF-1 mempunyai rantai A dan B yang dihubungkan dengan ikatan disulfida. Regio peptida C mempunyai 12 asam amino. Mempunyai struktur yang mirip dengan insulin, hal ini menjelaskan bahwa kemampuan IGF-1 untuk berikatan dengan reseptor insulin, tetapi dengan afinitas rendah (Sugiyama *et al.*, 2001).

Kondili mandibula terbentuk melalui *endochondral bone formation*. Proses ini merupakan urutan kejadian yang terprogram dengan baik, yang dikontrol oleh faktor intrinsik yang disintesis oleh sel kondrosit (Enlow *et al.*, 1996). Kondrosit di dalam lapisan proliferasi mengekspresikan Sox9 faktor transkripsi yang diperlukan untuk diferensiasi sel mesenkim menjadi kondroblast. Sox9 kemudian mengatur kondrosit mensintesis kolagen tipe II, yang membentuk *framework* matriks kartilago. Diikuti proses kematangan, proses kondrosit menjadi hipertrofi dan mensekresi kolagen tipe X, urutan matriks peptida manusia yaitu Cbfa 1 (*Core binding factor a 1*) terletak setelah *Runt domain* (Rabie *et al.*, 2004). Cbfa1 adalah gen utama yang mengontrol fungsi dari semua sel skeletal lineage melalui sintesis functional isoform yang berbeda. Lebih lanjut, proses pengkopelan Cbfa 1 pada proses kematangan kondrosit, mineralisasi matriks ekstraseluler dan degradation, maupun invasi osteoblast selama pembentukan *endochondral ossification*. Di dalam fungsi perkembangan embrionik, Cbfa1 mengatur pertumbuhan postnatal kondili mandibula (Rabie *et al.*, 2004 dan Habib *et al.*, 2004).

Penelitian ini merupakan rangkaian tahapan penelitian yang mencoba membuat suatu inovasi baru dengan cara menstimulasi pertumbuhan kartilago

sekunder kondili mandibula yang bersifat responsif terhadap stimulasi lokal faktor pertumbuhan (Graber dkk., 1985; Maor dkk., 1993; Enlow dan Hans, 1996). Sampai saat ini belum ada laporan teknik lain untuk mengatasi kasus disharmoni skeleto-maksilofasial. Hal ini menjadi sangat penting untuk menggunakan hormon pertumbuhan yaitu IGF-1 yang diberikan secara lokal untuk menstimulasi pertumbuhan kartilago sekunder kondili mandibula melalui kultur sel dan uji *in vivo* pada tikus (Cancedda dkk., 1995; Habib dkk., 2005; Laron, 2001; Shen dkk., 2005).

1.2. Subyek Penelitian

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya yaitu membuktikan stimulasi IGF-1 dalam pertumbuhan prekondrosit kartilago sekunder kondili mandibula melalui uji *in vitro* dengan menggunakan kultur primer kondrosit yang dikembangkan langsung dari kondrosit kondili mandibula fetus tikus (*Rattus neovergicus*): suatu terapi baru di bidang ortodontik masa kini untuk harmonisasi tingkat skeleto-maksilofasial.

Pada tahap penelitian ini, dilakukan uji *in vivo* untuk membuktikan stimulasi IGF-1 terhadap pertumbuhan kartilago kondili mandibula tikus (*Rattus noevigicus*) usia 8 hari.

Adapun tahapan penelitian sebagai berikut :

1. Pembuktikan pertumbuhan kondrosit dari kartilago kondili anak tikus setelah distimulasi dengan IGF-1 secara langsung pada kondili mandibula tikus.
2. Pemeriksaan reseptor IGF-1 kondrosit dari kartilago kondili anak tikus setelah distimulasi dengan IGF-1 secara langsung pada kondili mandibula tikus dengan metode imunohistokimia.

1.3. Hasil Yang Diharapkan

Hasil yang ditargetkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- 1. Memperoleh dasar teori molekuler tentang peran eksogenous IGF-1 pada kartilago sekunder kondili mandibula, untuk stimulasi pertumbuhannya.**
- 2. Membuktikan secara *in vivo* peran eksogenous IGF-1 dalam menstimulasi pertumbuhan kartilago sekunder baru kondili mandibula.**
- 3. Sebagai alternatif terapi ortodontik untuk memperbaiki disharmoni skeleto-maksilofasial, tanpa perawatan bedah.**

BAB 2

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

2.1.1. Penelitian ini mempunyai tujuan khusus, sebagai berikut :

Pemeriksaan pertumbuhan kondrosit dari kartilago kondili anak tikus setelah distimulasi dengan IGF-1 secara langsung pada kondili mandibula tikus, dengan mengukur ekspresi reseptor IGF-1.

2.1.2. Penelitian ini mempunyai tujuan umum, sebagai berikut :

- 1. Menemukan terapi disharmoni skeleto-maksilofasial tanpa melakukan pembedahan.**
- 2. Membuktikan IGF-1 dapat digunakan sebagai terapi disharmoni skeleto-maksilofasial.**
- 3. Membuktikan mekanisme IGF-1 pada proses pertumbuhan kartilago dari kartilago kondili anak tikus setelah distimulasi dengan IGF-1 secara langsung pada kondili mandibula tikus.**

2.2. Manfaat Penelitian

2.2.1. Manfaat Teoritis :

- 1. Eksogenus IGF-1 dapat digunakan sebagai terapi disharmoni maksilofasial.**
- 2. Dapat menjelaskan mekanisme eksogenous terhadap pada proses pertumbuhan kartilago sekunder kondilli mandibula.**

2.2.2. Manfaat Praktis:

Eksogenus IGF-1 dapat digunakan dalam terapi disharmoni maksilofasial tanpa melakukan pembedahan.

BAB 3**TINJAUAN PUSTAKA****3.1. Teori mekanisme pertumbuhan mandibula pada manusia**

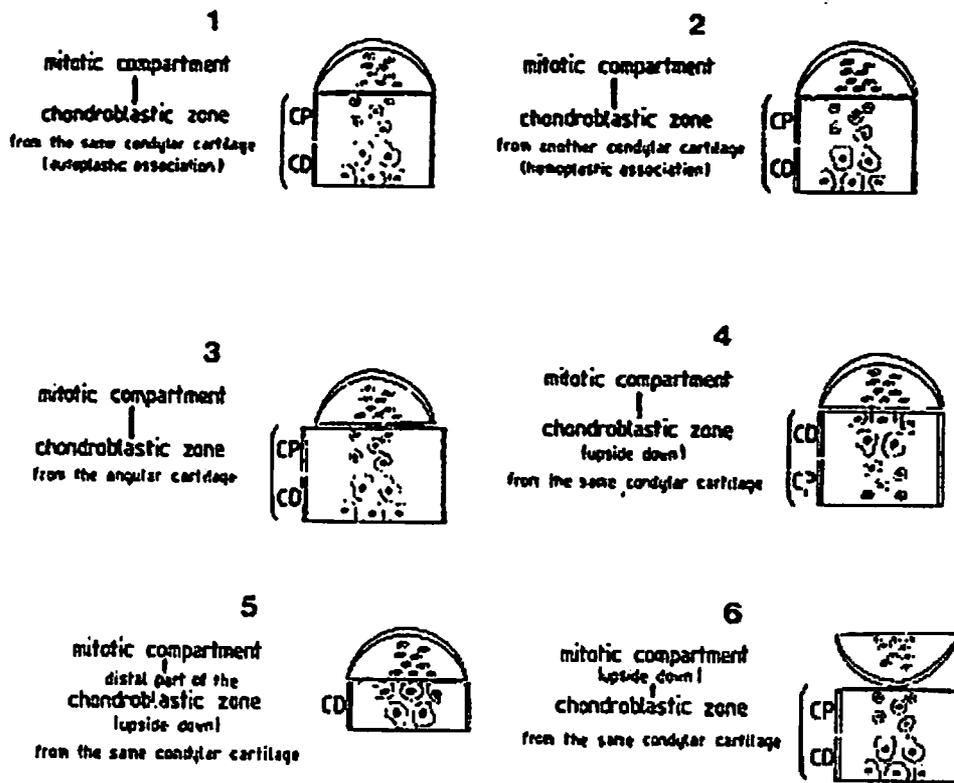
Kontribusi periosteal adalah mempunyai efek terhadap seluruh organisme dan merupakan faktor kontrol lokal terutama melalui kontraksi otot-otot. Secara fisiologis kontrol pertumbuhan tulang dan *remodeling* (aposisi dan esopsi tulang), pertumbuhan periosteal mandibula cenderung merupakan perintah dari pada pengaturan terhadap pertumbuhan. Mekanisme ini cenderung lambat dan kasar. Sedangkan kontribusi kartilago (kondili, coronoid, dan angular) lebih mudah dimodifikasi dan lebih sebagai subyek dalam sistem kontrol lokal. Kontribusi kartilago terhadap pertumbuhan mandibula, lebih cepat dan halus dalam menyesuaikan pertumbuhan mengikuti perkembangan oklusi gigi-geligi., sehingga diperoleh posisi mandibula yang harmonis terhadap muka. Pandangan ini merupakan titik penting dalam pertumbuhan kartilago kondili mandibula, yang tampaknya tergantung dari rangsangan yang bersifat lokal. Ini menunjukkan bahwa ekspresi homeostasis struktur regional yang merupakan koordinasi pertumbuhan dari perangkat mastikatori (Habib dkk., 2005; Enlow dan Hans, 1996; Maor dkk., 1993; Banani dkk., 1991; Graber dkk., 1985).

Kondili mandibula terbentuk melalui *endochondral bone formation*. Proses ini merupakan urutan kejadian yang terprogram dengan baik, yang dikontrol oleh faktor intrinsik yang disintesis oleh sel kondrosit. Kondrosit di

dalam lapisan proliferasi mengekspresikan *Sox9 transcription factor* yang diperlukan untuk diferensiasi sel mesenkim menjadi kondroblast. *Sox9* kemudian mengatur kondrosit mensintesis kolagen tipe II, yang membentuk jaring (*framework*) matriks kartilago. Diikuti proses kematangan, proses kondrosit menjadi hipertrofi dan mensekresi kolagen tipe X, urutan matriks peptida manusia yaitu *Cbfa 1* terletak setelah *Runt domain* (Alpha Diagnostic Intl.Inc., SA., USA) (Rabie et al., 2004).

3.2. Karakteristik kartilago

Ada dua jenis kartilago, yaitu kartilago primer dan sekunder. Kartilago primer ada di kerangka ekstremitas, basis tengkorak. Kartilago primer tersusun dari pembelahan kondroblast, kondroblast yang sudah mengalami diferensiasi dikelilingi oleh matriks kartilago yang mengisolasi dari faktor lokal yang mampu menstimulasi pertumbuhan kartilago. Kartilago sekunder ada di kondili dan prosesus koronoid mandibula dan sutura maksilofasial. Kartilago sekunder tersusun dari pembelahan sel kondroblast, prekondroblast yang tidak dikelilingi oleh matriks kartilago dan tidak terisolasi dengan pengaruh luar. Hal ini yang membedakan kartilago primer dan sekunder (Shen dan Darendeliler, 2005; Cancedda dkk., 1995; Graber dkk., 1985).



Gambar 2.1. : Hubungan bagian mitotik dari kartilago kondili dan berbagai zona kondroblastik dan zona lain dari jaringan kartilago (Phornphutkul dkk, 2004)

Pada gambar 2.1. ditunjukkan model *proses endochondral ossification* pada kartilago kondili mandibula yang terdiri dari beberapa zona. Zona terluar dari kartilago kondili mandibula adalah zona progenitor kondrosit yang akan menjadi kondrosit. Bila ada pertumbuhan aktif maka sel progenitor kondrosit akan menjadi kondrosit dan berproliferasi dan berbentuk pipih. Zona ini disebut zona mitotik. Kondrosit akan terus bermitosis dan akan berdiferensiasi membentuk kolom, dimana sel bebrbentuk lebih heksagonal. Zona ini disebut

hipertropik. (Phornphutkul dkk, 2004; Enlow dan Hans, 1996). Pada tahap diferensiasi akhir kondrosit ini, terjadi mineralisasi jaringan ekstraseluler dan dimulai proses apoptosis kondrosit. Akhirnya terjadi proses ossifikasi dan menjadi masa tulang. Demikian proses pemanjangan mandibula (Enlow dan Hans, 1996; Graber dkk., 1985).

3.2. *Insulin-like Growth Hormone-1 (IGF-1) : suatu hormon pertumbuhan*

IGF-1 pertama kali diisolasi oleh Salmon and Daughaday (1957), yang mampu menstimulasi sulfat dalam kartilago. IGF-1 adalah famili dari insulin, yang merupakan peptida kecil terdiri dari 70 asam amino dengan berat molekul 7649 Da. Mirip dengan insulin, IGF-1 mempunyai rantai A dan B yang dihubungkan dengan ikatan disulfida. Regio peptida C mempunyai 12 asam amino. Mempunyai struktur yang mirip dengan insulin, hal ini menjelaskan bahwa kemampuan IGF-1 untuk berikatan dengan reseptor insulin, tetapi dengan afinitas rendah (Sugiyama dkk., 2001).

IGF-1 disekresi di hati dan ditransportasikan ke jaringan lain, bertindak sebagai hormon endokrin. IGF-1 juga disekresi oleh jaringan lain, termasuk sel kartilago dan bertindak sebagai hormon autokrin (Maor dkk., 1993).

Biosintesis IGF-1 identik dengan hormon alamiah pada orang dewasa dan anak-anak. Pemberian IGF-1 setiap hari akan meningkatkan alkaline fosfatase dalam serum, yang merupakan indikator aktivitas osteoblastik, dan peningkatan prokolagen dalam serum (Habib dkk., 2005; Quarto dkk., 1997).

Telah dilakukan penelitian dengan memberikan IGF-1 pada penderita *Laron dwarfism* atau sindroma yang resisten terhadap hormon pertumbuhan pada usia dini dan mampu mencapai tinggi badan normal (Laron, 2001; Maor dkk., 1993).

Yang masih menyisakan pertanyaan sampai saat ini : apakah ada reseptor IGF-1 yang cukup di tempat zona progenitor kartilago sekunder di kondili mandibula terhadap respons eksogenous IGF-1. Seperti yang telah dibuktikan dari penelitian sebelumnya, bahwa peran eksogenous IGF-I dapat menstimulasi pertumbuhan kondrosit pada kultur primer. Pemberian eksogenous IGF-I memberikan pandangan bahwa eksogenous IGF-I menstimulasi pertumbuhan kultur primer kondrosit dari kondili mandibula fetus tikus (*Rattus noevigicus*) (Ardani, 2008 dan 2009).



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Lokasi Penelitian

Laboratorium *in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Unair dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksplorasi laboratorium secara eksperimental. Penelitian eksperimental dilakukan melalui beberapa tahapan penelitian berkelanjutan.

Penelitian ini adalah pengujian tentang konfirmasi pertumbuhan kondrosit kondili mandibula tikus setelah pemberian eksogenous IGF-1, melalui tahapan sebagai berikut :

1. Stimulasi eksogenous IGF-I kartilago kondili mandibula tikus (*Rattus noevigicus*) usia 8 hari.
2. Pemeriksaan reseptor IGF-1 kartilago kondili mandibula tikus (*Rattus noevigicus*) usia 14 hari setelah distimulasi eksogenous IGF-1 dengan teknik imunohistokimia.

4.3. Sampel Penelitian

Sampel penelitian menggunakan anak tikus jantan berumur 14 hari, dengan berat badan antara 17-20 gram. Hewan coba tikus putih yang digunakan

adalah *Rattus noevigicus* galur *Wistar* yang berasal dari kandang hewan percobaan Fakultas farmasi (Unair) Surabaya. Masing-masing kelompok *Rattus noevigicus* galur *Wistar* terdiri dari 18 ekor, dengan usia 14 hari dengan berat badan 17-20 gram. Pembagian kelompok sampel yang homogen dilakukan secara alokasi random sehingga setiap anggota sampel mempunyai kesempatan sama untuk menempati kelompok kontrol (kelompok 1); kelompok 2 (pengamatan 2 minggu setelah perlakuan); dan kelompok 3 (pengamatan 4 minggu setelah perlakuan).

4.4. Bahan Penelitian

Berbagai macam bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

Anak tikus tikus jantan (*Rattus noevigicus*) galur *Wistar* umur 14 hari; Antimouse IGF-1 (Labvision); Mouse IGF-1 (Raybiotech); Universal LSAB = kit/HRP, rabbit/mouse/goat (DAB⁺); alcohol destiled water; aquadest; CO₂.

4.5. Alat Penelitian

Berbagai alat yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut : Aiat suntik 2 ml; Pipet micro; pipet pastur; ependorf; yellow tip; scalpel; pinset; gunting; haemocytometer; Mikroskop *disecting* dan *inverted*.

4.6. Variabel Penelitian

Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah : pemberian eksogenous IGF-1 dosis tunggal sebesar 50 µl/ml.

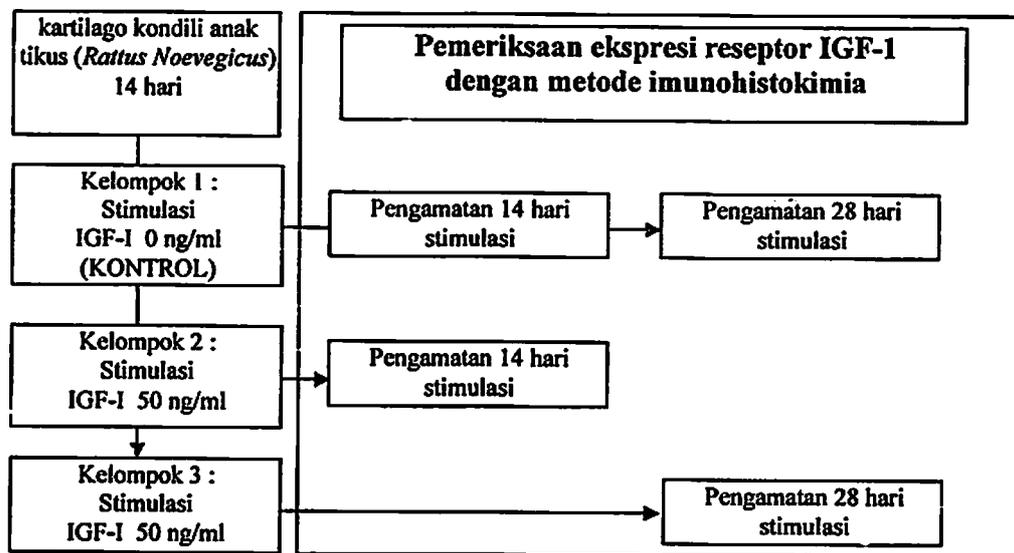
Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah : ekspresi reseptor IGF-1 setelah pemberian eksogenus IGF-1 pada waktu pengamatan yang berbeda (nol hari; 14 hari; dan 28 hari).

Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah dosis IGF-1; kondisi anak tikus, lingkungan anak tikus (makan, minum) peralatan, pemilihan alat ukur, bahan-bahan yang digunakan pada penelitian.

4.7. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1. Kerangka Operasional Penelitian

4.8. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian

4.8.1. Persiapan perlakuan

Hewan coba anak tikus (*Rattus noevigicus*) usia 14 hari dipilih dari dua induk yang sama, untuk alasan homogenitas sampel.

4.8.2. Cara mengumpulkan data :

1. Perlakuan pada anak tikus (*Rattus noevigicus*)

Tulang mandibula diambil dari anak tikus umur 14 hari, dari dua induk dan kemudian dibagi menjadi 3 kelompok. Pemberian eksogenous IGF-I dosis 50 ng/ml secara langsung. Eksogenous IGF-I diinjeksikan di daerah synovial kondili mandibula. Pertama-tama dicari sendi mandibula, dengan cara tikus dalam keadaan membuka mulut, sehingga kondili bergerak keluar. Kemudian jarum injeksi ditumpukan pada kondili tegak lurus masuk sampai sedikit dibawah kulit. Pengamatan dilakukan setelah 14 hari dan 28 hari setelah perlakuan. Setelah itu tikus dilakukan euthanasia dengan ether. Kemudian leher dipisahkan dari bagian badan dan dicuci dengan alkohol 70 % dua kali untuk menghilangkan sisa darah kemudian dicuci dengan MEM lengkap. Siap untuk diawetkan dan dibuat blok parafin.

2. Pembuatan parafin blok

Kepala Tikus direndam dalam larutan fiksatif berupa Formalin/PFA (1-7 hari). Kemudian direndam dalam etanol 70% selama minimal 24 jam, dan dilanjutkan dengan etanol 80% selama 2 jam. Direndam dalam etanol 90% dan 95% secara berurutan selama masing-masing 30 menit. Dilanjutkan

perendaman sebanyak 3 kali dalam etanol absolut selama 30 menit masing-masing dalam botol yang berbeda. Direndam dalam xylol sebanyak 2 kali masing-masing selama 30 menit. Proses selanjutnya dikerjakan dalam inkubator dengan suhu 56-58°C. Direndam dalam xylol, parafin sebanyak 3 kali, kemudian dilanjutkan dengan embedding dengan mencelupkan kepala tikus dalam parafin cair yang telah dituang dalam wadah. Setelah beberapa saat, parafin akan memadat dan kepala tikus berada dalam blok parafin.

3. Pemeriksaan ekspresi reseptor IGF-1 kartilago kultur kartilago kondillimandibula setelah distimulasi dengan IGF-1 menggunakan teknik imunohistokimia.

Preparat dicelup dalam xylol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%), dan aquades secara berurutan. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Direndam dalam 3% Hidrogen Peroksida (dalam DI water) selama 5-10 menit. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Direndam dalam 1 % BSA (atau 1% NGS) dalam PBS selama 10-30 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan antibodi primer *Rat Anti Rabbit Anti-bZP3* selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit.

Ditambahkan antibodi sekunder *Anti-Rat IgG Biotin Labelled* selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan SA-HRP (Strep Avidin-Horseradish Peroxidase) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Ditambahkan Cromogen DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*) selama 10-20 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3 x 5 menit. Dilakukan

counterstain dengan Hematoxilen selama 5 menit pada suhu ruang. Dicuci dalam aquades selama 3 x 5 menit. Dilakukan mounting dengan entellan. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop pada perbesaran 400 x.

4.9. Analisis data

Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi diusahakan sama. Data yang diperoleh dari ekspresi reseptor IGF-1 dianalisis secara diskriptif dan dilanjutkan uji ANOVA untuk melihat perbedaan ekspresi reseptor IGF-I setelah pemberian IGF-I 50 ng/ml pada hari ke 14 dan ke- 28.

BAB 5

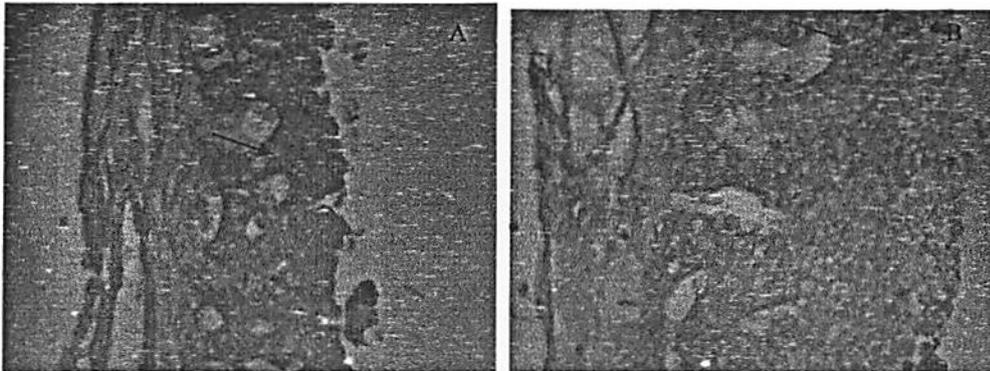
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya yaitu pengujian tentang konfirmasi proliferasi prekondrosit pada kultur sel primer kondrosit setelah pemberian IGF-1. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian eksogenous IGF-1 dapat menstimulasi pertumbuhan kultur primer kondrosit dari kartilago kondili mandibula. IGF-I bekerja melalui keberadaan reseptor IGF-I yang ditunjukkan ada peningkatan secara signifikan ekspresi reseptor IGF-1 pada kultur primer kondrosit (Ardani dkk., 2008 dan Ardani, 2009).

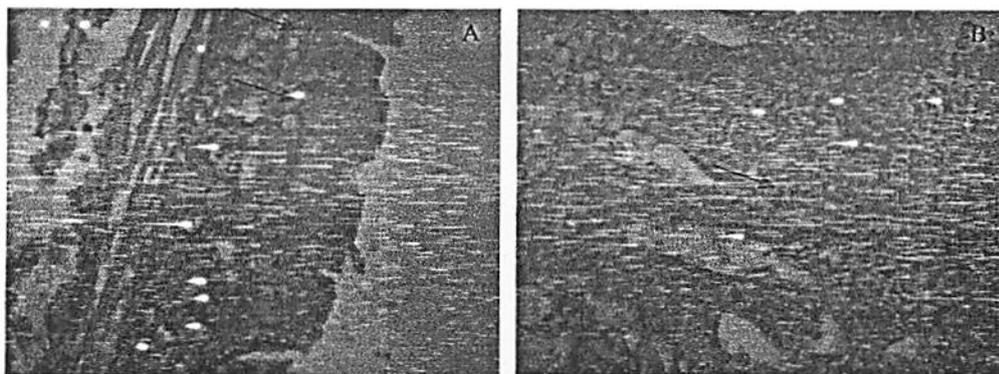
Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pemberian eksogenous IGF-1 dapat menstimulasi pertumbuhan kartilago kondili mandibula tikus (*Rattus norvegicus*) secara *in vivo*. Hasil penelitian ini adalah pemberian eksogenous IGF-I memberikan pertumbuhan dari kartilago kondili mandibula dengan baik dan tampak ada peningkatan ekspresi reseptor IGF-I secara signifikan. Ini dapat disimpulkan IGF-I bekerja melalui reseptor IGF-I. Hasil ini didukung dengan penelitian sebelumnya pada kultur primer kondrosit (Ardani dan Sjafei, 2008 dan Ardani, 2009).

Hasil penelitian ini dapat dilihat dari pemeriksaan imunohistokimia, dimana ekspresi reseptor IGF-1 kartilago kondili mandibula tikus positif ditandai dengan warna coklat. Ini menunjukkan imunoreaktivitas reseptor IGF-1 dengan kompleks antibodi avidin biotin (anak panah) (Gambar 5.1 dan 5.2). Pada gambar

tersebut merupakan kartilago kondili mandibula tikus setelah hari ke-14 dan 28 hari pemberian eksogenous IGF-I sebesar 50 ng/ml.



Gambar 5.1 : ekspresi IGF-I R kartilago kondili mandibula tikus setelah 14 hari distimulasi eksogenous IGF-I 50 ng/ml (A) Kontrol; B) Perlakuan (ekspresi reseptor IGF-1 dihitung dengan satuan unit/10 lapang pandang).



Gambar 5.2 : ekspresi IGF-I R kartilago kondili mandibula tikus setelah 28 hari distimulasi eksogenous IGF-I 50 ng/ml A) Kontrol; B) Perlakuan (Keterangan : ekspresi reseptor IGF-1 dihitung dengan satuan unit/10 lapang pandang).

IGF adalah sitokin sirkulasi yang mencapai kartilago artikuler melalui cairan synovial. IGF adalah polipeptida tunggal dengan urutan protein yang mirip dengan insulin. IGF-I mempunyai berat molekuler 7,5 kDa dan pl (isoelectric point) dari 8,5. IGF-I adalah faktor anabolik pertumbuhan untuk pertumbuhan

kartilago. IGF-1 berperan di dalam homeostasis kartilago, keseimbangan sintesis proteoglikan dan pemecahan kondrosit. Studi *in vitro* menunjukkan bahwa IGF-1 menstimulasi produksi proteoglikan dengan bergantung pada dosis. IGF-1 telah dibuktikan memperlambat katabolisme proteoglikan yang bergantung pada dosis. Produksi kolagen dan degradasi kolagen tidak diatur melalui IGF-1 (Bhakta dkk., 2000).

Kartilago kondili mandibula adalah penting sebagai tempat pertumbuhan mandibula yang penting, baik dalam pertumbuhan panjang maupun tinggi. Mandibula jelas mempunyai *growth spurt* selama periode prepubertas dan pubertas. Tampak ada pengaruh hormon pada pertumbuhan linier *synchronous* pada laki dan perempuan. Karena morfogenesis terjadi lambat pada perkembangan prenatal, kartilago kondili mandibula didesign sebagai kartilago sekunder yang berbeda dengan kartilago primer (basis kranial dan ekstremitas) (Haudenschild dkk., 2001).

Kartilago mempunyai struktur yang berbeda antara pertumbuhan tulang ekstremitas dan kartilago kondili mandibula. Pada kartilago sekunder, pembelahan sel berasal dari mesenkim yang belum mengalami diferensiasi lebih dari pada kondrosit yang sudah mengalami diferensiasi (Carson dkk., 1980, Mizoguchi dkk., 1990; Petrovic dkk., 1975; Silberman dkk., 1987).

Pembentukan tulang kondili mandibula melalui proses endonkondral dari kartilago dapat dibagi dua fase : fase kondrogenesis dan fase diferensiasi kondrosit. Sel prekursor mesenkim yang belum mengalami diferensiasi menjadi jalur signal kondrogenik, merupakan awal dari proses dimana kondroprogenitor berasal dan berproliferasi menjadi kondroblast. Pada fase ke dua, subset kondrosit

yang baru terbentuk menjadi mitotik yang aktif, berproliferasi, keluar dari siklus sel, menjadi hipertrofi, dan berhenti diferensiasi. Akhir dari tahap kondrosit yaitu apoptosis dan digantikan oleh prekursor sel tulang. Fase proliferasi dan diferensiasi kondrosit kemudian terjadi di bagian dalam lempeng kartilago. Regio ini mengontrol pertumbuhan tulang endokondral secara longitudinal (memanjang) melalui multiplikasi dan hipertrofi kondrosit (James dkk, 2004; Fuentes dkk., 2002 dan Visnapu dkk., 2002).

Hasil pemeriksaan imunohistokimia dari penelitian ini menunjukkan, distribusi reseptor IGF-I terletak pada lapisan zona proliferaatif dan hipertropik dari kondili mandibula tikus usia 28 hari – 32 hari. Keadaan ini menunjukkan bahwa tikus masih dalam masa pertumbuhan. (Gambar 5.1. dan 5.2).

Masa prepubertas tikus yaitu sebelum umur 31 hari dan masa akhir pubertas usia 42 hari. (Fuentes dkk., 2002). Penelitian ini didukung oleh Blakta dkk. (2000) bahwa imunoreaktivitas reseptor (R) IGF-I paling menonjol di daerah proliferaatif (area mitotik), lapisan kondroblast dan kondrosit hipertropik pada kondili tikus. Sedang Visnapuu dkk. (2001) dan Fuentes dkk. (2002) menemukan bahwa distribusi reseptor IGF-1 yang lebih luas pada kartilago tulang epifise yang sedang tumbuh. Dan keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan efek seluler IGF-1 diperantarai melalui ikatan dengan reseptor IGF-1.

Peningkatan ekspresi gen IGF-I akan mengalami transisi dari prepubertas (31 hari) ke dimulainya akhir pubertas (42 hari). Ini menunjukkan bahwa proliferasi kartilago kondili mandibula diatur oleh IGF-1 (Fuentes dkk., 2002). Data juga menunjukkan mekanisme yang mengatur proliferasi kartilago kondili

mandibula mungkin sama dengan pengaturan proliferasi di sutura kranial seperti di lempeng tulang (Nirav dkk., 2000).

Insulin-like growth factors (IGFs) adalah regulator kunci dari homeostasis matriks di dalam kartilago artikuler. Cairan *synovial* mempunyai konsentrasi signifikan dari IGFs yaitu antara 20-50 ng/ml pada manusia dewasa normal, dan ini merupakan sumber signifikan IGFs ke kartilago. Kartilago mengekspresikan mRNA IGF-1 dan juga berkontribusi sebagai sumber *growth factor* ini. Kartilago artikuler manusia dewasa, kondrosit tunggal mengelilingi mendekati area matriks, melalui mana IGF harus ditransportasikan untuk mencapai sel responsif (Nirav dkk., 2000). Oleh karena itu, dalam penelitian ini pemberian eksogenous IGF-1 dilakukan dengan cara langsung melalui cairan *synovial*.

Studi biologi molekuler tentang perbedaan kartilago primer dan sekunder pada fase awal perkembangan setelah lahir. Distribusi ekspresi mRNA IGF-1 di kondili mandibula dan kartilago *costae* tikus usia 1-28 hari diperiksa *in situ* hibridisasi dengan menggunakan *oligo probe cocktail* untuk IGF-1 mRNA. Di kondili, ekspresinya terlokalisasi pada selapis tipis lapisan artikuler dimana sel masih belum mengalami diferensiasi. Penting, tidak dijumpai sintesis IGF dari sampel kedua kartilago tersebut. Di kartilago *costae*, mRNA IGF-1 terletak di lapisan sel germinatif, proliferaatif, dan di lapisan awal hipertropik pada tikus umur 1-28 hari. Sekali lagi tidak ada perbedaan ekspresi mRNA IGF-1 yang menunjukkan sintesis IGF-1 selama pertumbuhan di kartilago kondili mandibula dan ini berbeda dengan kartilago *costae*. Penemuan ini menunjukkan terjadi pertumbuhan yang berlebihan pada *costochondral graft* untuk menggantikan kondili mandibula (Visnapu dkk., 2002).

Hasil penghitungan statistik mendukung bahwa ekspresi reseptor IGF-1 meningkat secara signifikan pada pengamatan hari ke-14 maupun hari ke-28 setelah dilakukan uji ANOVA satu arah.

Tabel 5.1. : Analisis uji diskriptif : Ekspresi IGF-I R pada pengamatan hari ke-14 setelah stimulasi eksogenous IGF-I 50 ng/ml terhadap pertumbuhan kartilago mandibula tikus

Lama pengamatan	N	Rerata	SD	SE
14 hari	7	21,75	2,50	1,25
28 hari	7	12,75	3,09	1,55
Kontrol	7	9,50	0,71	0,50
Total	21	15,70	5,83	1,84

Tabel 5.2. : Hasil uji ANOVA satu arah : Ekspresi IGF-I R pada pengamatan hari ke- 14 dan 28 setelah stimulasi eksogenous IGF-I 50 ng/ml terhadap pertumbuhan kartilago mandibula tikus

	Derajat kebebasan	F	Sig
Antar kelompok	2	18,82	0,002
Di dalam kelompok	7		
Total	9		

Pada mencit dengan *null reseptor growth hormone*, mengalami retardasi pertumbuhan tulang dan jumlah sirkulasi IGF-1 yang sangat rendah pada masa pertumbuhan lempeng tulang usia 2 minggu. Ini terjadi karena pengurangan lebar zona proliferaif, regio dimana kondrosit mengalami pembelahan sel. Zona hipertropik bagian yang mengalami pertumbuhan lempeng tulang dimana kondrosit meningkat dalam volume juga mengalami pengurangan. Bila IGF-1

diperikan pada binatang ini, maka perpanjangan tulang meningkat dan lebar antara zona proliferaatif dan hipertrofik kembali membaik (Phornphutkul dkk, 2004).

Seperti yang ditekankan di atas, pertumbuhan lempeng tulang melalui tiga zona, dimana terjadi proliferasi, pertumbuhan mengalami istirahat dan dimana terjadi diferensiasi akhir. Zona proliferaatif, kondrosit aktif membelah dan sel membentuk kolom dari sel yang *flatt* mensekresi matriks ekstraseluler hialine yang kaya kolagen II. Diferensiasi terjadi di zona hipertropik, yang dimulai di luar titik dimana pertumbuhan kondrosit istirahat. Zona ini ditandai dengan ekspresi kolagen X. Pada lempeng pertumbuhan, kondrosit mensintesis sejumlah besar *chondroitin 4-and 6-sulfate* dan keratan sulfat, yang terdeksi dengan pewarnaan *Alcian Blue* or *toluidine* (Chang *et al.* 1998).

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah :

Pemberian eksogenous IGF-1 dosis tunggal 50 ng/ml dapat menstimulasi pertumbuhan kartilago kondili mandibula tikus (*Rattus noevigicus*) secara *in vivo* setelah 14 hari dan 28 hari. Aktivitas IGF-I tampaknya bekerja melalui reseptor IGF-I, hal ini ditunjukkan ada peningkatan ekspresi reseptor IGF-I secara signifikan.

6.2. Saran

Saran yang bisa disampaikan dari penelitian ini adalah :

Disarankan untuk mempelajari tingkat kematangan pada zona proliferaif dan zona hipertrofik dengan mendeteksi sekresi ekstraseluler yang dihasilkan. Disamping itu juga perlu diketahui bagaimana IGF-I eksogenous dapat bekerja melalui reseptor IGF-I. Dengan demikian diharapkan dapat diketahui tingkat diferensiasi kondrosit, transisi dari kondroblastik menjadi osteoblastik.

DAFTAR PUSTAKA

- Bhakta NR, Garcia AM, Frank EH, Grodzinsky AJ and Morales TI, 2000. The Insulin-like Growth Factors (IGFs) I and II Bind to Articular Cartilage via the IGF-binding Proteins. *J Biol Chem*, Vol. 275 : 5860-5866.
- Bishara SE, 2001. *Textbook of Orthodontics*. WB Saunders Co. New York-Toronto. Pp 43-52.
- Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P, 1995. Chondrocyte differentiation. *Int Rev Cytol* (159) : 265-357.
- Castagnola P, Moro G, Descalzi-Cancedda F, and Cancedda R, 1986 : Type X Collagen Synthesis during in-vitro Development of Chick Embryo Tibial Chondrocytes. *The J Cell Biol* (102) : 231-2317.
- Enlow DH and Hans MG, 1996. *Essentials of Facial Growth*. WB Saunders. London-Sydney. Pp 57-70.
- Fränkel C and Fränkel R, 1992. *Der Funktionsregler in Der Orofazialen Orthopädie*. Huthig Buch Verlag. Heidelberg. Pp 5-21.
- Fuantes MA ; Operman LA ; Bellinger LR ; Carlson DS ; Hinton RJ, 2002. Regulation of Cell Proliferation in Rat Mandibular Condylar Cartilage in Explant Culture by Insulin-like Growth Factor-1 and Fibroblast Growth Factor-2. *Arch Oral Biol* (47) : 643-654.
- Freshney RI, 2000. *Culture of Animal Cell : A Manual Basic Technique*. Wiley-Liss, Inc. New York. United States of America.
- Graber FM, 2005. *Textbook of Orthodontics*. St. Louis-Toronto. pp. 81-98.
- Habib H, Hatta T, Udagawa J, Zhang J, Yoshimura Y, and Otani H, 2005. Fetal Jaw Movement Affects Condylar Cartilage Development. *J Dent Res* (84) : 474-479.
- Haudenschild DR; McPherson JM; Tubo R; Binette F, 2001. Differential expression of multiple genes during articular chondrocyte redifferentiation. *Anat Rec* 263:91-98.
- James CG; Appleton CTG; Veronica Ulici V; T. Michael Underhill TM; and Frank Beier F, 2005. Microarray Analyses of Gene Expression during Chondrocyte Differentiation Identifies Novel Regulators of Hypertrophy . Originally published as *MBC in Press*, 10.1091/mbc.E05-01-0084 on August 31, 2005. Vol. 16, Issue 11, 5316-5333, November 2005.
- Laron Z, 2001. Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) : A Growth hormone. *J Clin Pathol : Mol Pathol* (54) : 311-316.
- Maor G, Laron Z, Eshet R, Silbermann M, 1993. The Early Postnatal Development Of The Murine Mandibular Condyle Is Regulated By Endogenous Insulin-Like Growth Factor I. *J Endocrinol* (137) : 21-26.
- Phornphutkul C; Ke-Ying Wu; Yang X, Chen Q; and Philip A. Gruppuso PA, 2004. Insulin-like growth factor-I signaling is modified during chondrocyte differentiation. *Journal of Endocrinology*; 183 : 477-486.

- Quarto R, Campanile G, Cancedda R and Dozin B, 1997. Modulation of Commitment, Proliferation, and Differentiation of Chondrogenic Cells in Defined Culture Medium. *Endocrinology* (138) : 4966-4976.
- Rakosi T and Jonas I, 1989. *Kieferorthopädie Diagnostik*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart-New York. Pp 6-12.
- Ramirez-Yanez GO, Young WG, Daley TJ, and Waters MJ, 2004. Influence of Growth Hormone on The Mandibular Condylar Cartilage of Rats. *Arch of Oral Biology* : 586-590.
- Rantam FA, 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Schmidt MB, Chen EH and Lynch SE, 2005. A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair .*OsteoArthritis Research Society International*. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved. doi: 10.1016/j.joca.2005.10.011
- Sugiyama H, Imada M, Sasaki A, Ishino Y, Kawata T, Tanne K, (2001). The Expression Of Osteopontin With Condylar Remodeling In Growing Rats. *Clin Orthod Res* (4) : 194–199.
- Visnapuu V; Peltomäki T; Rönning O; and Syrjänen S, 2002. Distribution of Insulin-Like Growth Factor-1 mRNA in The Mandibular Condyle And Rib Cartilage Of Rat During Growth. *Arch Oral Biol* (47) : 791-798.
- Van Wyk J and Smith EP, 1999. Insulin-like Growth Factor and Skeletal Growth Possibilities for Therapeutic Interventions. *J Clin Endocrinol* (84) : 4349-4354.
- Watahiki J, Yamaguchi T, Irie T, Nakano H, Maki K, and Tachikawa T, 2004. Gene Expression Profiling of Mouse Condylar Cartilage during Mastication by Means of Laser Microdissection and cDNA Array. *J Dent Res* (83): 245-249.
- Werner H and Katz, 2004. The Emerging Role of the Insulin-like Growth Factors in Oral Biology. *J Dent Res* 83 (11) : 832-836.