

LAPORAN AKHIR
RISET KOLABORASI MITRA LUAR NEGERI



POTENSI OSTEOGENIK KOMPOSIT
***SCAFFOLD* KITOSAN-GELATIN-KARBONAT APATIT**
BERBASIS BATU KAPUR SEBAGAI KANDIDAT
BIOMATERIAL REGENERASI TULANG

TIM PENGUSUL :
Ketua: Devi Rianti, drg, M. Kes
NIP : 196309071990022001

UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN 2021

**HALAMAN PENGESAHAN
RISET KOLABORASI MITRA LUAR NEGERI**

Judul Penelitian : Potensi osteogenik komposit Scaffold Kitosan-Gelatin-Karbonat Apatit berbasis batu kapur sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang

Kode / Nama Rumpun Ilmu : 332/Ilmu Kedokteran Gigi Dasar

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Devi Rianti, drg., M.Kes
b. NIDN : 0007096308
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : Kedokteran Gigi
e. No. HP : 081331308540
f. Alamat Surel (e- mail) : devi-r@fkg.unair.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Tanzsa Setiana Putri, drg., PhD
b. NIDN : 198909282019086201
c. Fakultas : Kedokteran Gigi

Anggota Peneliti (2)

a. Nama Lengkap : Geo Fanny
b. NIM : 021711133130
c. Fakultas : Kedokteran Gigi

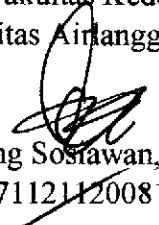
Anggota Peneliti (3)

a. Nama Lengkap : Rania Vivian Nathania
b. NIM : 021711133129
c. Fakultas : Kedokteran Gigi

Biaya Penelitian : Rp 100.000.000,-

Surabaya, September 2021

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Airlangga


Dr. Agung Sostawan, drg., M.Kes.
NIP. 197112112008121003

Ketua Peneliti,



Devi Rianti, drg., M.Kes
NIP. 196309071990022001

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
Universitas Airlangga



Dr. Gadis Meinar Sari, dr., M.Kes.
NIP. 196605041996032001

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian : Potensi osteogenik komposit Scaffold Kitosan-Gelatin-Karbonat Apatit berbasis batu kapur sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang

2. Tim Peneliti

No	Nama	Jabatan	Bidang keahlian	Fakultas asal	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Devi Rianti, drg, M.Kes	Ketua	Biomaterial KG	FKG -UNAIR	40 jam
2.	Tanzsa Setiana Putri, drg., PhD	Anggota 1	Biomaterial KG	FKG –UNAIR	40 jam

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):

Material alam batu kapur dari Padalarang dan Cirebon Jawa Barat akan disintesis menjadi *scaffold* komposit Kitosan-Gelatin-Karbonat apatit yang sesuai syarat *scaffold* untuk *bone regeneration*

4. Masa Pelaksanaan

Mulai : bulan : April tahun : 2021

Berakhir : bulan: Desember tahun: 2021

5. Usulan Biaya: Rp 100.000.000,-

6. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan) :

a. Research Center Fakultas Kedokteran Gigi UNAIR

b. Laboratorium Material Fakultas Teknologi Industri ITS

c. Meditec, Universiti Teknologi Malaysia

7. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya) :

Meditec –Universiti Teknologi Malaysia Johor Bahru untuk melakukan pemeriksaan MicroCT Scaffold

Balai Besar Keramik Indonesia Bandung, sebagai penyedia bahan baku batu kapur gunung dari Padalarang dan Cirebon yang telah disintesis menjadi karbonat apatit

8. Temuan yang ditargetkan (penjelasan gejala atau kaidah, metode, teori, produk, atau rekayasa) :

Hasil uji in vitro komposit scaffold Kitosan-Gelatin-Karbonat Apatit berbasis batu kapur pada penelitian ini selanjutnya akan di uji in vivo dan nantinya diharapkan sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang.

Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang akan mendukung pengembangan iptek) :

Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui karakteristik kemampuan komposit *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang, sehingga merupakan salah satu pemanfaatan hasil batu kapur di Indonesia. Manfaatnya untuk merancang teknologi *scaffold* tepat guna sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang, serta peningkatan kualitas luaran publikasi dan sitasi dibutuhkan kolaborasi riset dengan mitra luar negeri.

RINGKASAN

Rekayasa jaringan mengintegrasikan secara relevan prinsip *engineering* dan teknologi dalam memperbaiki organ atau struktur tubuh yang rusak. Konsep rekayasa jaringan dengan menggabungkan tiga komponen dasar berupa sel, *scaffold*, dan regulator signal yang disebut *triad tissue engineering*. Syarat sebagai bahan biomaterial *scaffold* harus memiliki sifat biokompatibel, bioaktif, *biodegradable*, mikrostruktur dan sifat mekanik yang sesuai. Biomaterial yang sering digunakan sebagai bahan dasar *scaffold* terdiri dari tiga kelompok yaitu keramik, polimer sintetis, dan polimer alami. Balai Besar Keramik Kementerian Perindustrian Republik Indonesia bertempat di Bandung telah berhasil mengekstraksi KA dari batu kapur, tetapi belum pernah diaplikasikan di bidang kesehatan. Inovasi terkini tidak hanya menggunakan satu macam biomaterial, tetapi menggabungkan beberapa macam biomaterial untuk meningkatkan efektivitasnya. Material biokeramik karbonat hidroksi apatit (KA) adalah hasil substitusi ion karbonat dengan gugus fosfat dari hidroksi apatit. Rumus kimia KA ialah $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ dengan rasio Ca/P 1,6-2,0. KA merupakan senyawa turunan kalsium fosfat yang memiliki sifat osteokonduktif lebih baik dibanding hidroksiapatit dan bersifat biokompatibel, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai material pengganti tulang. Pada penelitian ini akan menggabungkan tiga material sebagai *scaffold* komposit 3 dimensi yang terdiri dari kitosan, gelatin dan KA berbasis batu kapur. *Scaffold* harus dapat berfungsi sebagai support selama proses regenerasi jaringan pada lokasi defek. Dibanding *scaffold* geometri dua dimensi, rekayasa jaringan tulang menggunakan 3 dimensi lebih baik. Penelitian ini mengembangkan *scaffold* biomimetik yang terbuat dari KA, gelatin dan kitosan yang diharapkan mampu menyerupai *Extracellular matrix* (ECM) tulang, yang terdiri dari komponen inorganik (70%) dan komponen organik (30%). Tiga komponen utama yang berperan di dalam rekayasa jaringan yaitu *stem cell*, *scaffold* matriks ekstra seluler dan sinyal morfogenetik yang bersifat induktif yang disebut juga Triad rekayasa jaringan. Perlekatan sel terhadap *scaffold* didukung oleh karakteristik permukaan *scaffold*, kemudian mengaktifasi beberapa protein *adhesion* yang mengakibatkan terbentuknya integrin. Integrin terdiri dari FAK (*Focal adhesin Kinase*) bekerjasama untuk membuat ikatan antar sel, sehingga membuat sel akan melekat pada permukaan *scaffold*. Mekanisme selanjutnya adalah proses osteogenesis. Keterlibatan jalur pensinyalan selama prosesnya telah ditunjukkan oleh berbagai penelitian. Jalur PI3K/AKT mengatur regenerasi tulang, *remodeling* tulang dan metabolisme energi. Selain itu, pensinyalan β -catenin terlibat mempromosikan faktor transkripsi *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2), sehingga mengarahkan sel berdiferensiasi menjadi preosteoblas. Preosteoblas akan memproduksi *Alkaline Phosphatase* (ALP), protein matriks tulang kolagen tipe I serta protein non-kolagen meliputi osteokalsin (OCN). Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui potensi osteogenik komposit *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang, sehingga merupakan salah satu pemanfaatan hasil batu kapur di Indonesia. Manfaatnya untuk merancang teknologi *scaffold* tepat guna sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang, serta peningkatan kualitas luaran publikasi dan sitasi dibutuhkan kolaborasi riset dengan mitra luar negeri. Dalam hal ini kolaborasi dengan Meditec Universiti Teknologi Malaysia.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan hasil alam. Salah satu sumber daya alam yang dihasilkan adalah batu kapur dengan kandungan CaCO_3 yang besar.¹ Batu kapur di Indonesia mencapai jumlah 28,678 milyar ton. Pada tahun 2018 diperkirakan kebutuhan hidroksiapatit sebesar 10.000 ton per tahun dengan asumsi laju pertumbuhan penderita osteoporosis meningkat.² Penelitian tentang KA berbasis batu kapur yang diproduksi oleh Balai Keramik Bandung perlu dilakukan, sebagai usaha untuk memenuhi kebutuhan KA di bidang kesehatan.

Polimer kitosan sebagai bahan *scaffold* tulang terbukti meningkatkan proliferasi sel osteoblas pembentuk tulang serta pembentukan matriks tulang termineralisasi secara *in vitro*.³ Kitosan mempunyai gugus amino dan hidroksil yang berpotensi tinggi dalam aplikasi rekayasa jaringan.⁴ Gelatin adalah kolagen tipe-I yang merupakan komponen organik utama di dalam tulang (90%), memiliki fungsi utama dapat meningkatkan perlekatan, viabilitas, dan pertumbuhan sel. Gelatin bersifat *biodegradable* dan biokompatibel, namun memiliki sifat biomekanis yang rendah.⁵

Berdasarkan kelebihan dan kekurangan dari material biokeramik dan polimer yang telah dikemukakan, maka *Scaffold* biomimetik 3D Kitosan, gelatin dan KA (K-GEL:KA) diharapkan menyerupai *Extracellular matrix* tulang, yang terdiri dari komponen anorganik (70%) dan komponen organik (30%).⁶ *Scaffold* komposit K-GEL:KA berbasis batu kapur merupakan material unggul temuan baru untuk dikembangkan sebagai biomaterial *scaffold* dalam rekayasa jaringan tulang.

Prosedur rekayasa jaringan pada umumnya menggunakan pendekatan berbasis sel, salah satunya adalah menggabungkan *scaffold* biokeramik dengan *adult stem cell*. *Stem cell* memberi harapan sebagai sumber sel yang tidak terbatas. Salah satu sumber MSC, adalah *human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUCMSC)* yang berasal dari jaringan tali pusat yang mengelilingi pembuluh darah, penggunaan sebagai model penelitian karena *stem cell* didapatkan dari jaringan biologis yang dibuang, tidak menimbulkan masalah etik, dan mudah diekspansi dengan cepat.^{7,8}

Osteogenesis merupakan proses pembentukan tulang baru. Tiga langkah utama dalam osteogenesis adalah sintesis dari matriks organik ekstraseluler (osteoid), matriks mineralisasi memulai pembentukan tulang dan *remodelling* tulang dengan proses resorpsi dan reformasi.⁹

Perlekatan sel terhadap *scaffold* didukung oleh karakteristik permukaan *scaffold*, kemudian mengaktifasi beberapa protein *adhesion* yang mengakibatkan terbentuknya integrin.

Integrin terdiri dari FAK (*Focal adhesin Kinase*) bekerjasama untuk membuat ikatan antar sel, sehingga membuat sel akan melekat pada permukaan *scaffold*.¹⁰ Mekanisme selanjutnya adalah proses osteogenesis. Keterlibatan jalur pensinyalan selama prosesnya telah ditunjukkan oleh berbagai penelitian. Beberapa jalur yang penting adalah jalur pensinyalan *Wingless* (Wnt)/ β -catenin, Notch, BMP/TGF- β , PI3K/AKT, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK).¹¹ Jalur PI3K/AKT mengatur regenerasi tulang, *remodeling* tulang dan metabolisme energi. Selain itu, pensinyalan β -catenin terlibat mempromosikan faktor transkripsi *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2), sehingga mengarahkan sel berdiferensiasi menjadi preosteoblas. Preosteoblas akan memproduksi *Alkaline Phosphatase* (ALP), protein matriks tulang kolagen tipe I serta protein non-kolagen meliputi osteokalsin (OCN).^{12,13}

Komposit *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur sudah dilakukan uji karakteristik, uji viabilitas, perlekatan pada *hUCMSC* melalui skema penelitian kolaborasi mitra luar negeri. Hasil penelitian menunjukkan *scaffold* K-GEL:KA mempunyai karakteristik mirip dengan tulang kancellus, biokompatibel dan mampu meningkatkan proliferasi *hUCMSC*. Berdasarkan pemikiran tersebut maka perlu dilakukan penelitian lanjutan potensi osteogenik melalui *signaling* regenerasi tulang pada *hUCMSC* secara in vitro.

Rumusan Masalah

Apakah komposit *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur dengan rasio 40:60 (w/w) 30:70 (w/w), 20:80 (w/w) mempunyai potensi osteogenik dengan meningkatkan ekspresi Integrin, betacatenin, Runx2 dan aktivitas ALP pada *hUCMSC* secara in vitro?

Tujuan Khusus

Menganalisis komposit *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur terhadap peningkatan ekspresi Integrin α V β 3, betacatenin, RUNX2 serta aktivitas ALP pada *hUCMSC* hari ke 7, 14, 21 secara in vitro.

Manfaat Penelitian

Kandidat *novelty* biomaterial regenerasi tulang pada berbagai tata laksana kerusakan tulang yang merupakan perancangan teknologi *scaffold* tepat guna, sebagai produk dalam negeri yang memberi keuntungan kepada masyarakat terkait pemanfaatan sumber daya alam Indonesia.

TINJAUAN PUSTAKA

Rekayasa jaringan

Terapi defek tulang dengan *bone graft* yang tidak menyebabkan morbiditas daerah donor dalam jumlah banyak merupakan sebuah tantangan. Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang rekayasa jaringan telah memberikan harapan besar untuk mewujudkan tantangan tersebut. Tiga komponen utama yang berperan di dalam rekayasa jaringan yaitu *stem cell*, *scaffold* matriks ekstra seluler dan sinyal morfogenetik yang bersifat induktif yang disebut juga Triad rekayasa jaringan.¹⁴

Scaffold

Biomaterial *scaffold* harus memberikan lingkungan yang sesuai untuk regulasi sel dalam adhesi, proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sehingga dapat terbentuk jaringan fungsional.¹⁵

Pertimbangan utama dalam penentuan desain *scaffold* adalah sistem biomekanik tulang yang kompleks. *Scaffold* harus memiliki porus yang berhubungan satu sama lain hingga terbentuk interkoneksi porus. Struktur interkoneksi porus *scaffold* dibutuhkan untuk penetrasi sel, pertumbuhan jaringan, dan transportasi nutrisi.¹⁶ Keramik, polimer natural dan sintetik sering digunakan sebagai material pembuatan *scaffold*. Keramik memiliki kekerasan yang tinggi, kombinasi bahan *scaffold* dikembangkan untuk mendapatkan *scaffold* yang memiliki ukuran porus, distribusi, daya biodegradasi dan kekuatan mekanis ideal.¹⁷

Kitosan

Kitosan adalah produk deasetilasi kitin yang merupakan polimer rantai panjang. Kitosan murni mengandung gugus amina (NH_2) sedangkan kitin murni mengandung gugus asetamida (NH-COCH_3). Kitosan memiliki struktur mirip dengan glikoaminoglikan yang merupakan salah satu komponen utama matriks ekstraseluler tulang dan tulang rawan.¹⁸

Kitosan memiliki peran penting dalam pembuatan *scaffold*. Kitosan dapat mendukung perlekatan, diferensiasi dan morfogenesis osteoblas, pembentukan sel tulang karena kitosan memiliki struktur mirip dengan glikoaminoglikan pada tulang rawan ataupun kartilago.¹⁹

Kitosan sebagai bahan dasar *scaffold* memiliki kekurangan yaitu nilai mekanis yang rendah, sehingga penambahan biokeramik disarankan untuk mendukung *scaffold* kitosan.¹⁷

Gelatin

Gelatin digunakan sebagai pengganti kolagen tipe I, merupakan komponen organik dari tulang. Gelatin digunakan dalam *scaffold* karena memiliki sifat *biocompatible* dan *biodegradable*.¹⁷ Gelatin kitosan sering dijadikan campuran dalam pembuatan *scaffold*.

Gelatin yang dicampur dengan kitosan akan membentuk senyawa mirip Arg-Gly-Asp (RGD) yang mendukung perlekatan adhesi dan migrasi tulang. Gelatin merupakan bahan yang ideal untuk transportasi protein.²⁰

Karbonat Apatit dari Batu Kapur

Saat ini ilmuwan melakukan penelitian pada batu kapur untuk menjadi alternatif dibidang kesehatan sebagai pengganti kerusakan pada tulang manusia. Batu kapur yang banyak mengandung CaCO_3 , sangat mirip dengan kandungan tulang manusia yaitu HA yang merupakan unsur atau kelompok apatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).²¹

Hidroksiapatit (HA) digunakan dibidang kesehatan sebagai tulang buatan serta pengisi tulang keropos, karena mempunyai sifat yang biokompatibel, tidak toksis dan osteokonduktif. Penambahan komponen karbonat pada hidroksiapatit dapat mempengaruhi sifat yang dimilikinya, seperti peningkatan kelarutan, penurunan kristalinitas, serta perubahan morfologi dari Kristal.²² Dibandingkan dengan hidroksi apatit (HA), karbonat apatit atau karbonat hidroksi apatit (KA) memiliki keunggulan sifat dalam proses remodeling tulang, yaitu:²² (1) merupakan komposisi pada tulang manusia. (2) dapat diresorpsi dengan baik oleh osteoklas. (3) memiliki kelarutan yang baik pada kondisi asam lemah yaitu saat osteoklas bekerja meresorpsi tulang dengan mengeluarkan ion H^+ . (4) memacu osteogenesis secara sempurna.

Karbonat apatit atau $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$ sering digunakan untuk kandidat *scaffold* jaringan karena sifat biokompatibel dan sifat osteokonduktifitas sehingga material ini memiliki kemiripan dengan komponen inorganik jaringan keras tulang.²³

Karbonat apatit dijadikan kandidat material rekayasa jaringan karena memiliki beberapa sifat, antara lain meningkatkan kelarutan, menurunkan kristalisasi dan perubahan morfologi dari kristal sehingga penggunaan karbonat apatit berpotensi menghasilkan *scaffold* dengan sifat osteokonduktif yang baik.²⁴

Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell dan Pensinyalan osteogenik

Human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUCMSC) adalah populasi sel jaringan ikat multipoten yang melekat di plastik, mempunyai marker permukaan seperti CD 73, CD 90. Sel tersebut merupakan sumber sel ekstra embrionik yang mempunyai laju proliferasi yang cepat dengan waktu penggandaan yang lebih singkat.²⁵ *Human umbilical cord mesenchymal stem cell* merupakan populasi sel heterogenous, yang menunjukkan fenotip dan multipotensi yang mirip dengan *bone marrow mesenchymal stem cell (BM-MS)*, termasuk CD 44, CD 73, CD 90, CD 105, dan *human leukocyte antigen (HLA) ABC*. Setelah isolasi, sel sub amniotik mengekspresikan *stem cell* (SSEA-4, Oct-4, dan Nanog) dan marker CD 73 dan CD 105, serta mempunyai kemampuan diferensiasi adipogenik, osteogenik, kondrogenik.²⁶

Karakteristik permukaan *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur adalah bersifat hidrofilik. *Scaffold* yang bersifat hidrofilik akan memiliki *contact angle* yang rendah, sehingga akan menurunkan tegangan permukaan. Bila tegangan permukaan rendah, cairan akan lebih mudah membasahi permukaan *scaffold*.

Perlekatan *Human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSK)* pada *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur menyebabkan aktivasi molekul *adhesive* protein pada permukaan melalui reseptor perlekatan sel, utamanya oleh integrin $\alpha V\beta 3$.²⁷ Sel yang terikat dengan *scaffold* akan mengaktifkan *signaling* dalam deposisi ekstra seluler matriks, sehingga terjadi proliferasi dan diferensiasi sel melalui sekresi beberapa bahan aktif, seperti protein, sitokin dan *growth factor* sebagai *signaling* utama. *Human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUC-MSK)* memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel kondrosit atau *osteoblast* tergantung pada lingkungan dimana dia berada.

Aktivasi integrin membutuhkan *signaling* adaptor berupa FAK (*Focal Adhesion Kinase*). Integrin dapat menginduksi perekrutan dan fosforilasi FAK dan mengarah pada aktivasi PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*). Aktivasi integrin akan mengarahkan pada perekrutan dan aktivasi *integrin linked kinase* (ILK) dan bersama PI3K yang bersinergi dengan AKT. AKT adalah kinase serin/ *threonin*-protein yang berhubungan erat (AKT1, AKT2 dan AKT3) yang disebut AKT kinase, dan yang mengatur banyak proses termasuk metabolisme, proliferasi, kelangsungan hidup sel, pertumbuhan dan angiogenesis, yang teraktivasi oleh stimulasi faktor pertumbuhan melalui lintasan PI3K. PI3K yang bersinergi dengan AKT mengarahkan translokasi β -*catenin* menuju nukleus. β -*catenin* dapat meningkatkan regulasi *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2).^{11,13}

Focal Adhesion Kinase mengaktifkan aktivitas pada jalur MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*). Jalur tersebut merupakan suatu hubungan antara permukaan dan inti sel untuk mengatur migrasi, proliferasi dan diferensiasi. Jalur MAPK berperan penting dalam pembentukan tulang, karena terdapat *crossstalk* dengan semua jalur molekuler. Pada MAPK, aktivasi jalur RAS/RAF/MEK/ERK dimulai protein RAS (*Guanosine-nucleotida-binding protein*) sejenis protein yang membentuk ikatan kovalen dengan gugus farnesil molekul asam lemak pada sisi dalam membran plasma sel, yang salah satunya adalah RAF (*Rapidly Accelerated fibrosarcoma Fibrosarcoma*). Protein RAF (*Rapidly Accelerated fibrosarcoma Fibrosarcoma*) adalah komponen utama fosforilasi. Protein RAF akan menfosforilasi dan mengaktifkan MEK (*MAPK extracellular signal-regulated kinase*). Aktivasi MEK akan menfosforilasi dan mengaktifkan ERK (*extracellular signal-regulated kinase*). Aktivasi ERK

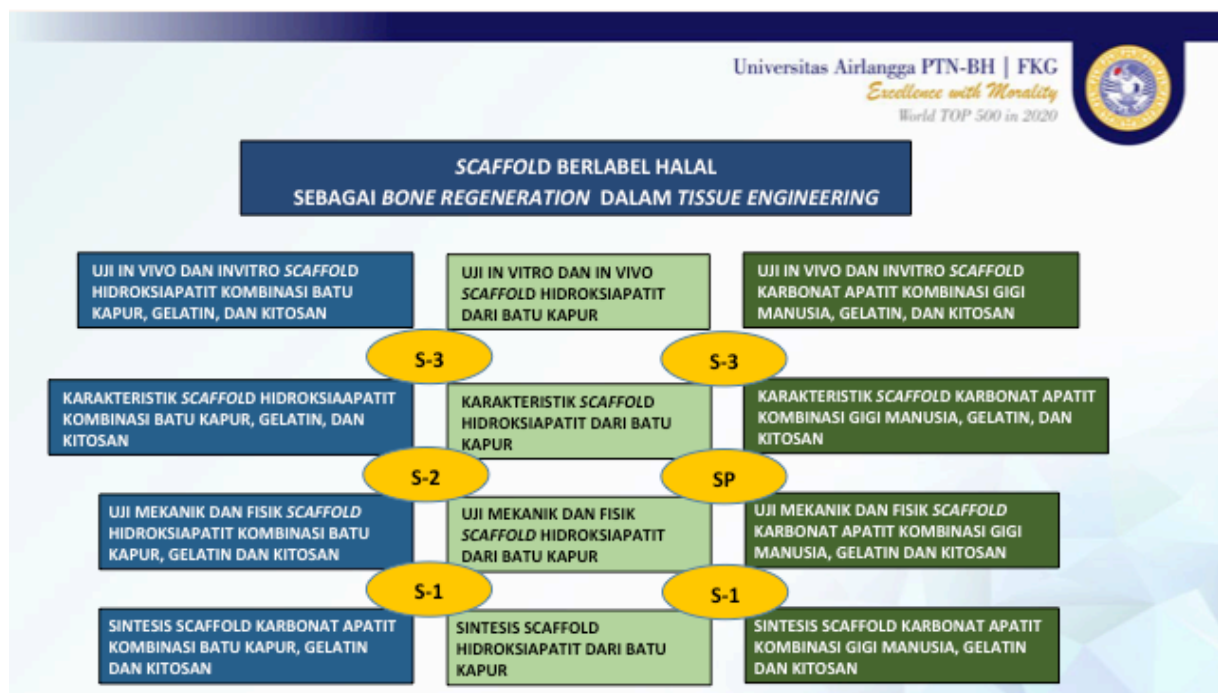
akan mengaktifkan berbagai target disitoplasma dan inti sel, sehingga akan meningkatkan ekspresi gen RUNX2.¹³

RUNX2 merupakan regulator transkripsi utama dalam diferensiasi *osteoblast* dan pembentukan tulang. RUNX2 yang teraktivasi dan meningkat regulasinya merupakan marker dari *osteoblast progenitor*. RUNX2 diperlukan dalam pembentukan tulang baik *endochondral* dan *membranous*. Hal ini menyebabkan terjadi peningkatan aktivitas ALP (*alkaline phosphatase*) dan OCN (*osteocalcin*) yang merupakan salah satu marker bahwa sel *pre-osteoblast* mulai terbentuk.¹¹

RIP DAN PETA JALAN PENELITIAN FAKULTAS

Salah satu *roadmap* penelitian di Fakultas Kedokteran Gigi adalah bidang biomaterial dan *tissue engineering*. Kedua bidang tersebut menjadi perhatian para peneliti khususnya Departemen Material Kedokteran Gigi. Biomaterial yang digunakan di kedokteran gigi kebanyakan berasal dari impor dan terus berkembang. Pemanfaatan biomaterial yang bersumber dari alam atau herbal belum banyak dimanfaatkan, padahal sumber tersebut bahan bakunya sangat melimpah.

Defek tulang sampai saat ini masih menjadi tantangan besar di bidang kedokteran gigi. Defek tulang dapat disebabkan oleh penyakit degeneratif, periodontitis agresif, trauma, reseksi rahang, dan kelainan kongenital dapat menyebabkan defek pada tulang rahang. Pada defek tulang yang kecil tubuh mampu melakukan *remodeling* secara spontan sedangkan pada defek tulang yang besar, *remodeling* tulang terbatas diperlukan biomaterial untuk memfasilitasi ke arah perbaikan dan meregenerasi jaringan yang telah rusak. Salah satu bahan yang banyak digunakan dalam perawatan ini adalah menggunakan material *bone graft* sebagai *scaffold*. Saat ini, biomaterial *bone graft* yang digunakan banyak berasal dari impor, sedangkan berasal dari alam seperti batu kapur perlu dikaji lebih dalam untuk menggantikan produk impor.



METODE PENELITIAN

Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah penelitian eksperimental laboratoris, dengan desain penelitian *Post Test Only Control Group Design*.

Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : *scaffold* K-GEL:KA rasio 40:60 (w/w) 30:70 (w/w), 20:80 (w/w), waktu kontak dengan hUCMSC pada 7, 14 dan 21 hari
- b. Variabel terikat : ekspresi Integrin alpha V dan Beta 3, Runx2, Betacatenin dan aktivasi ALP

Definisi Operasional

- a. **Karbonat apatit (KA)** adalah bahan berupa serbuk putih yang terbuat dari kalsium karbonat yang di sintesis dari batu kapur produksi Balai riset keramik Bandung Indonesia
- b. **Gelatin** adalah bubuk putih yang berasal dari denaturasi kolagen sapi yang diproduksi oleh *Wako Pure Chemical Industries* (Cat. No. 076-02765).
- c. **Kitosan** adalah serbuk putih yang dibuat dari Pabrik Sigma (93646, USA) dengan derajat deasetilasi >81%.
- d. **Scaffold kitosan-GEL:KA berbasis batu kapur** adalah komposit berbentuk tabung berdiameter 5 mm dan tinggi 5 mm yang terbuat dari kitosan (K), gelatin (GEL), dan karbonat apatit (KA) berbasis batu kapur dengan perbandingan 40:60 (w/w), 30:70 (w/w), 20:80 (w/w) dengan metode *freeze-drying*.
- e. **Differensiasi hUCMSC pada scaffold** adalah aktifitas osteogenik berupa ekspresi Integrin menggunakan Flowsitometri dan β -Catenin, RUNX2 menggunakan *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction* (q PCR)

- f. **Aktivitas ALP** dilihat secara kuantitatif dengan penghitungan hasil berupa densitas optik (OD) yang diukur dengan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil pembacaan ELISA berupa OD dilakukan konversi ke aktivitas ALP (unit/ μL) melalui rumus:

$$\text{Aktivitas ALP} = \frac{K}{15} \times a$$

Keterangan:

K : Konsentrasi pelepasan p-Nitrophenol oleh sampel (mmol/L=nmol/ μL)

15 : Durasi reaksi (menit)

a : Faktor dilusi sampel

Lokasi Penelitian

- Research center Fakultas kedokteran gigi Unair
- Medical Devices and Technology Centre (MEDITEC), Institute of Human Centred and Engineering (iHumEn), Universiti Teknologi Malaysia (UTM).
- Laboratorium Stem Cell, *Institut of Tropical Disease*, Unair.

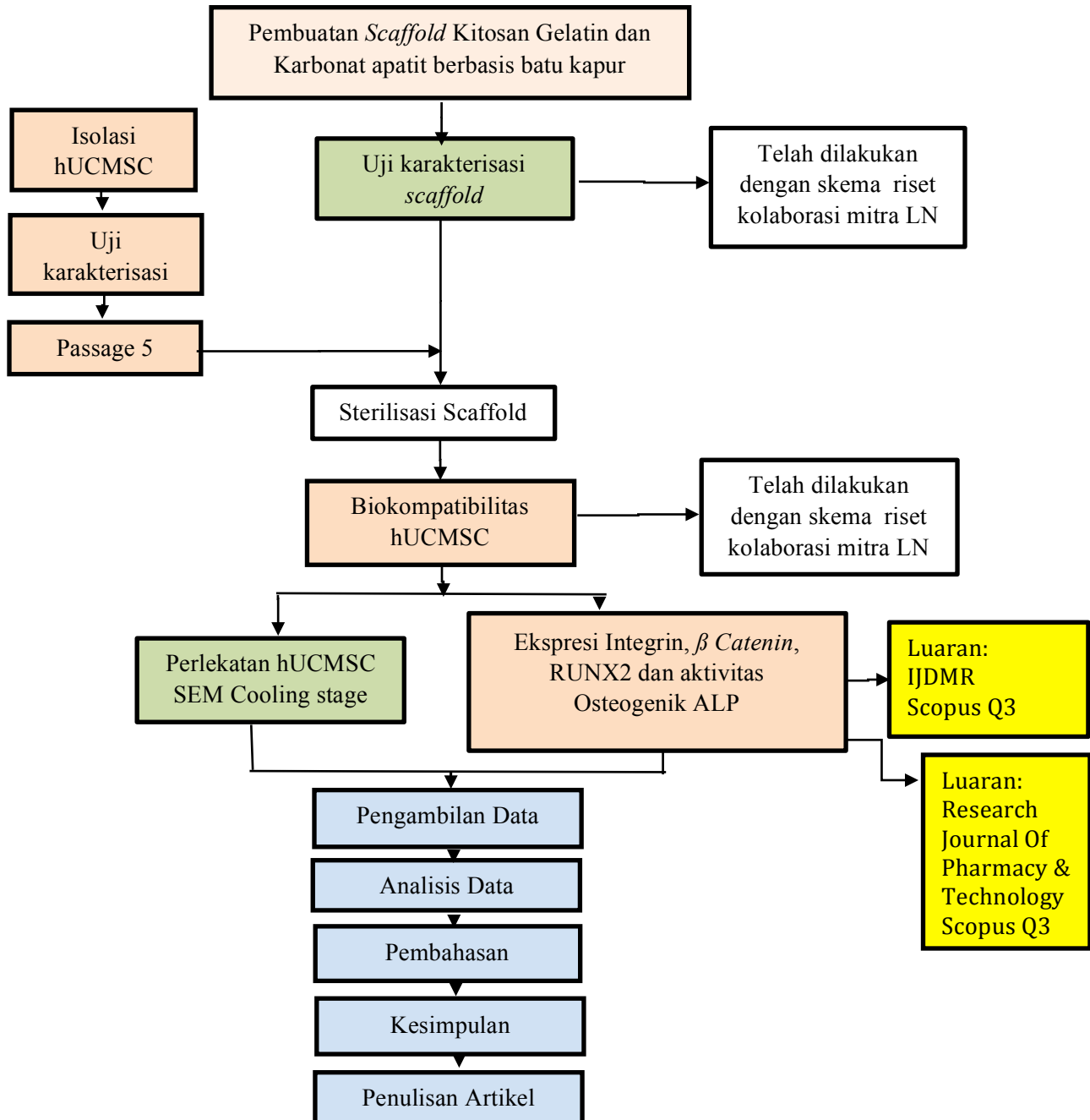
Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama bulan Februari – September 2021.

Bahan dan Alat

- Bahan : Kitosan dari cangkang kepiting dengan derajat deasetilisasi 81% (Sigma Aldrich 93646, USA), gelatin dari denaturasi kolagen sapi (Rousselot, Guangdong, China), karbonat apatit (sintesis batu kapur Balai Riset Keramik Bandung), NaOH (Merck), asam asetat (Merck), , etanol 70% (Sigma Aldrich), dan aqua destilata (Aqua Bidestilata Steril®, Ikapharmindo).
- Alat : Alat yang digunakan tabung konikal (Falcom™ Conical Centrifuge Tube), cawan petri (Nuric™ Cell Culture Thermo Fisher Scientific), filter berukuran 100 μm , mikropipet dan tip (Joan Lab®), dan inkubator (Fisher Scientific 116885H CO₂ Incubator), ELISA *reader*, *magnetic stirrer*, sensor digital (Epson Perfection V700 Photo, Epson America. Inc., USA), alat sentrifugasi (Sorvall™ Legend Micro 17R), mikroskop (Nikon TMS).

4.7 Alur Penelitian



Keterangan:

- 1. Dilakukan peneliti UNAIR
- 2. Dilakukan peneliti mitra UTM
- 3. Dilakukan bersama sama
- 4. Luaran wajib

HASIL PENELITIAN

1. Hasil Sintesis Scaffold K-GEL:KA Berbasis Batu Kapur

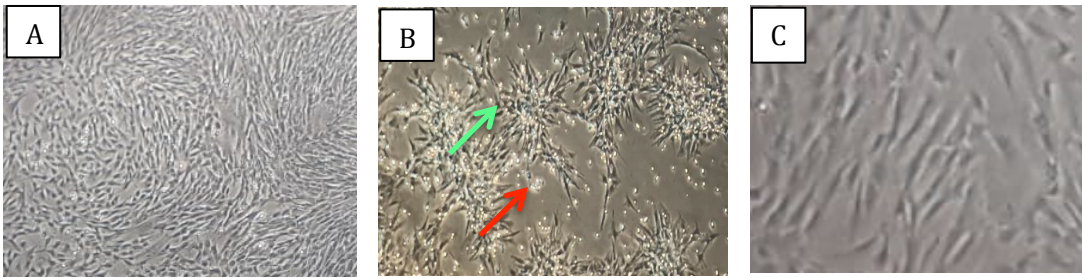
Hasil sintesis scaffold K-GEL:KA berbasis batu kapur dilakukan dengan metode freeze dry diperoleh hasil pada gambar 1.



Gambar 1 Scaffold K-GEL:KA berbasis batu kapur dengan ukuran tinggi $5 \pm 0,2$ mm dan diameter $5 \pm 0,2$ mm

2. Hasil Isolasi dan Kultur *hUCMSC*

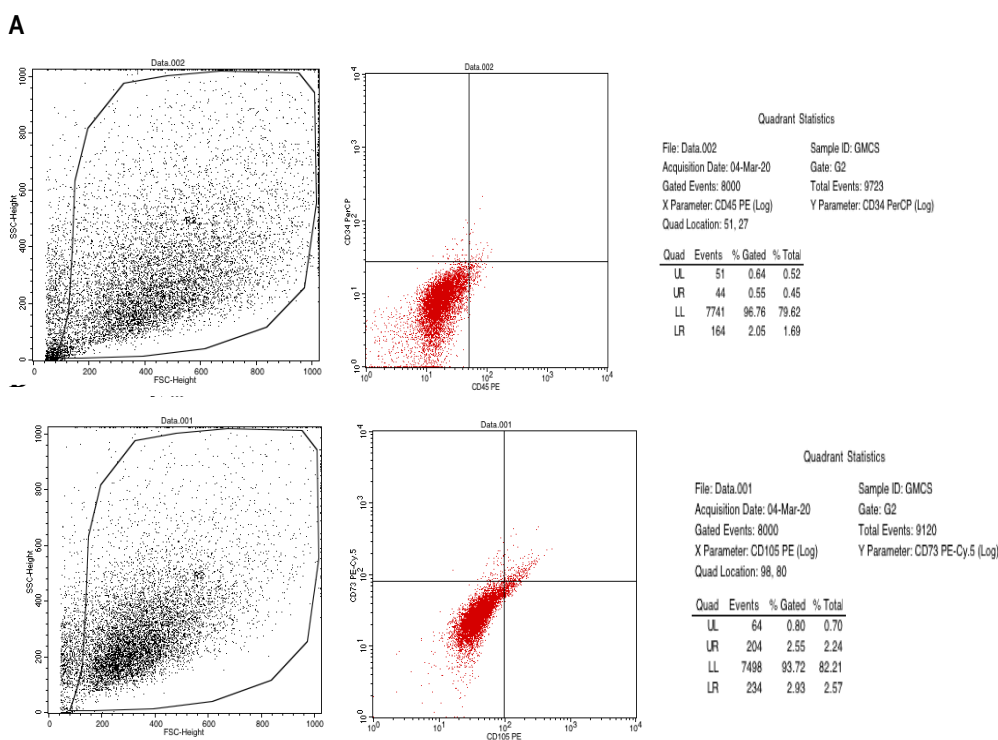
Isolasi *hUCMSC* dilakukan pada sampel tali pusat yang didapatkan dari persalinan sectio cesaria, setelah arteri dan vena dibuang. Pada 24 jam pertama sel tampak berbentuk spindle menyerupai fibroblas. Pada pasase 1 sel mulai membentuk koloni. Pada hari ke-10 mulai ditemukan sel yang menyerupai Mesenchymal Stem Cells yang ditandai dengan bentuk morfologi spindle dan sel yang menyerupai Hemapoetic Stem Cells yang ditandai dengan bentuk morfologi bulat. Medium pertumbuhan diganti setiap 3 hari. Pasase dilakukan ketika sel mencapai confluent 80%. Pada hari ke-25, dilakukan pasase ke-5 sel monolayer membentuk pola pusaran seperti tampak pada Gambar 2, kemudian sel siap untuk dilakukan pengujian selanjutnya.

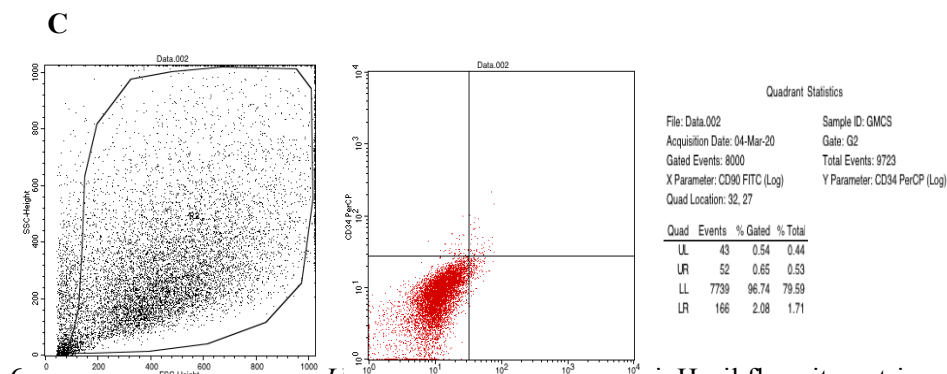


Gambar 2. Hasil isolasi hUCMSC pada pasase 1 dengan pembesaran 100x (A); Pada hari ke-10 tampak kelompok sel yang menyerupai MSCs dengan tanda panah hijau, sedangkan tanda panah merah merupakan sel yang menyerupai HSCs dengan pembesaran 40x (B); Pada hari ke-25, pasase 5 dengan pembesaran 40x (C).

3. Hasil Uji Karakterisasi hUCMSC

Uji karakterisasi hUCMSC dilakukan sebelum dilakukan pengujian lanjut terhadap kemampuan osteogenik hUCMSC setelah kontak dengan scaffold K-GEL:KA berbasis batu kapur. Pengujian ini dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa hUCMSC yang didapatkan merupakan stem cell turunan mesenchymal dan bukan turunan hematopoietic. Dilakukan pemeriksaan menggunakan flowsitometri dari ekspresi CD 34-, CD45-, CD 73+, CD 105+, CD90+, seperti ditunjukkan pada gambar 3.





Gambar 3. Karakterisasi *hUCMSC* dengan flow cytometri. Hasil flowsitometri menunjukkan sel yang diperiksa mengekspresikan (A) menunjukkan *plotting* CD 45⁺ dan CD 34⁻ (% gated kuadran LL), (B) menunjukkan *plotting* CD 73⁺ dan CD 105⁺ (% gated kuadran UR), (C) Menunjukkan *plotting* CD 90⁺ (% gated kuadran LR)

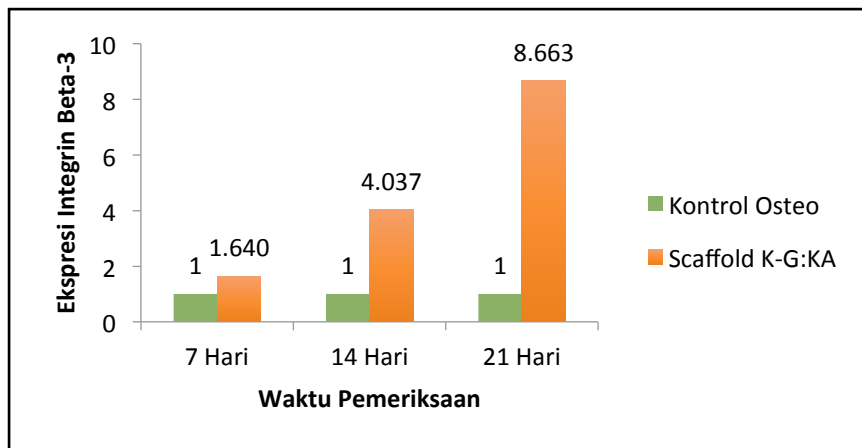
Gambar 3 A menunjukkan *plotting* CD 45⁺ dan CD34⁻ dilihat pada persentasi *gated* kuadran lower left (LL), B menunjukkan *plotting* CD 73⁺ dan CD 105⁺ dilihat pada persentasi *gated* kuadran upper right (UR), C menunjukkan *plotting* CD 90⁺ dilihat pada persentasi *gated* kuadran lower right (LR).

4. Kemampuan Osteogenik Melalui Pemeriksaan Ekspresi Integrin Sub Unit β_3 Setelah *hUCMSC* Ditanam dalam *Scaffold* K-GEL:KA Berbasis Batu Kapur

Integrin merupakan reseptor glikoprotein heterodimerik yang menempel pada matriks ekstra seluler yang dibentuk oleh sub unit β_3 . Ekspresi integrin perlu dilakukan pemeriksaan pada penelitian ini, karena penting untuk melihat perlekatan dan transduksi sinyal antara sel dan *scaffold* K-G:KA. Pada penelitian ini ekspresi Integrin β_3 dilakukan dengan metode qRT PCR, dibagi menjadi tiga durasi lama pemeriksaan, yaitu 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Hasil pengujian berupa nilai relatif ekspresi integrin β_3 . Hasil nilai relatif rerata ekspresi integrin β_3 dan simpang baku dapat dilihat pada Tabel 1. Gambaran diagram batang nilai rerata ekspresi integrin β_3 dapat dilihat pada Gambar 4.

Tabel 1 Rerata dan simpang baku nilai ekspresi Integrin β_3 setelah *hUCMSC* ditanam dalam *scaffold* K-GEL:KA

Lama pengujian	n	Medium osteogenik	<i>Scaffold</i> K-GEL:KA + <i>hUCMSC</i>
		Ekspresi β_3	Ekspresi β_3
		Rerata \pm SB	Rerata \pm SB
7 hari	3	1 \pm 0	1,640 \pm 0,311
14 hari	3	1 \pm 0	4,037 \pm 1,716
21 hari	3	1 \pm 0	8,663 \pm 4,687



Gambar 4. Diagram batang ekspresi Integrin β_3 pada durasi pemeriksaan 7 hari, 14 hari, 21 hari

4.1. Analisis Statistik Ekspresi Integrin β_3 setelah hUCMSC Ditanam dalam Scaffold K-GEL:KA Berbasis Batu Kapur

Pada pengujian normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* didapatkan nilai $p = 0,738$ ($p > 0,05$), $p = 0,005$ ($p < 0,05$), $p = 0,573$ ($p > 0,05$) pada nilai ekspresi integrin β_3 dengan durasi pemeriksaan 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Hasil nilai p ini menunjukkan bahwa data tidak berdistribusi normal.

Analisis statistik dilanjutkan analisis *Kruskall Wallis* untuk melihat ada tidaknya perbedaan pada kelompok perlakuan. Pada hasil analisis *Kruskall Wallis* didapatkan nilai $p = 0,049$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan yang bermakna diantara masing-masing kelompok yang dibandingkan, yaitu nilai ekspresi integrin β_3 dengan durasi pemeriksaan 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Untuk mengetahui perbedaan kemaknaan diantara durasi pemeriksaan tersebut, maka dilakukan pengujian lebih lanjut menggunakan *Mann Whitney*.

Tabel 2. Hasil signifikansi uji *Mann Whitney* pada nilai ekspresi Integrin β_3 pada durasi 7 hari, 14 hari dan 21 hari

Durasi pemeriksaan	7 hari	14 hari	21 hari
7 hari		0,046	0,050
14 hari			0,268
21 hari			

Keterangan: $p < 0,05$ bermakna, $p > 0,05$ tidak bermakna

Hasil pengujian *Mann Whitney* pada Tabel 2 menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara

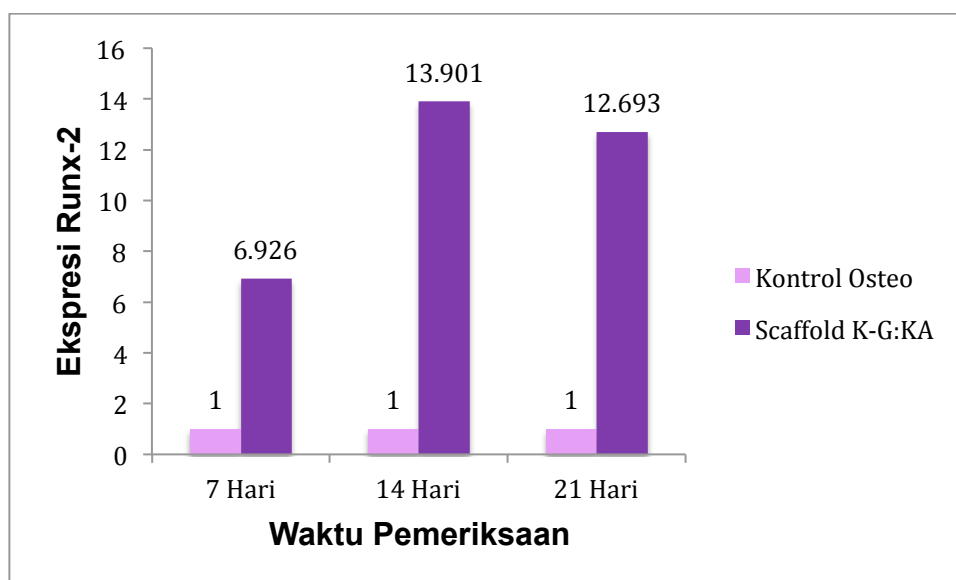
nilai ekspresi integrin β_3 pada hari ke-7 dan ke-14 serta antara hari ke-7 dan ke 21, namun tidak ada perbedaan yang bermakna antara hari ke-14 dan ke-21. Hal tersebut berarti peningkatan ekspresi integrin β_3 setelah hUCMSC ditanam dalam *scaffold* K-GEL:KA bermakna seiring dengan peningkatan durasi pemeriksaan pada hari ke-7 sampai dengan hari ke-14, namun pada hari ke-21 ekspresi integrin β_3 tidak meningkat.

5. Pemeriksaan Ekspresi Runx-2 setelah hUCMSC Ditanam dalam *Scaffold* K-GEL:KA Berbasis Batu Kapur

Pada penelitian ini ekspresi Runx-2 dilakukan dengan metode RT- qPCR, dibagi menjadi tiga durasi penelitian, yaitu 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Hasil pengujian berupa nilai relatif ekspresi Runx-2. Hasil nilai rerata relatif ekspresi Runx-2 dan standar deviasi dapat dilihat pada Tabel 3. Gambaran diagram batang nilai rerata ekspresi Runx-2 dapat dilihat pada Gambar 5.

Tabel 3. Rerata nilai ekspresi Runx-2 dan simpang baku setelah ditanam dalam *scaffold* K-GEL:KA

Lama pengujian	n	Medium osteogenik	<i>Scaffold</i> K-G:KA + hUCMSC
		Ekspresi Runx-2	Ekspresi Runx-2
		Rerata \pm SB	Rerata \pm SB
7 hari	3	1 \pm 0	6,926 \pm 1,480
14 hari	3	1 \pm 0	13,901 \pm 1,676
21 hari	3	1 \pm 0	12,693 \pm 2,013



Gambar 5. Diagram batang ekspresi Runx pada durasi pemeriksaan 7 hari, 14 hari, 21 hari

5.1 Analisis Statistik Ekspresi Runx-2 setelah hUCMSC Ditanam dalam Scaffold K-GEL:KA Berbasis Batu Kapur

Pada pengujian normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* didapatkan nilai $p = 0,861$, $p = 0,352$, $p = 0,123$ ($p > 0,05$) pada nilai ekspresi Runx-2 dengan durasi pemeriksaan 7 hari, 14 hari dan 21 hari. Hasil nilai p ini menunjukkan bahwa data berdistribusi normal. Homogenitas data di uji dengan kombinasi *Levene dan Bartlett's test* menunjukkan nilai $p = 0,753$ ($p > 0,05$), berarti data ekspresi Runx-2 durasi 7 hari, 14 hari dan 21 hari memenuhi syarat homogenitas.

Analisis statistik dilanjutkan pengujian *One way Anova*. Pengujian ini untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan ekspresi Runx-2 pada hari ke-7, ke-14 dan ke-21. Pada *One way Anova* didapatkan hasil nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$) (Tabel. 4), artinya terdapat perbedaan yang bermakna diantara masing-masing kelompok yang dibandingkan, yaitu nilai ekspresi ekspresi Runx-2. Untuk mengetahui perbedaan kemaknaan diantara durasi pemeriksaan tersebut, maka dilakukan pengujian lebih lanjut menggunakan *Post-hoc HSD test*.

Tabel 4. Hasil uji *One way Anova* ekspresi Runx-2 selama 24 jam, 72 jam dan 168 jam

Ekspresi Runx-2	Total Jumlah	df	Rerata kuadrat	F	Sig.
Antar Group	83.368	2	41.684	13.821	.000
Dalam Group	18.095	6	3.016		
Total	101.464	8			

Tabel 5. Hasil uji *HSD Post-hoc* ekspresi Runx-2 setelah hUCMSC ditanam dalam scaffold K-GEL:KA

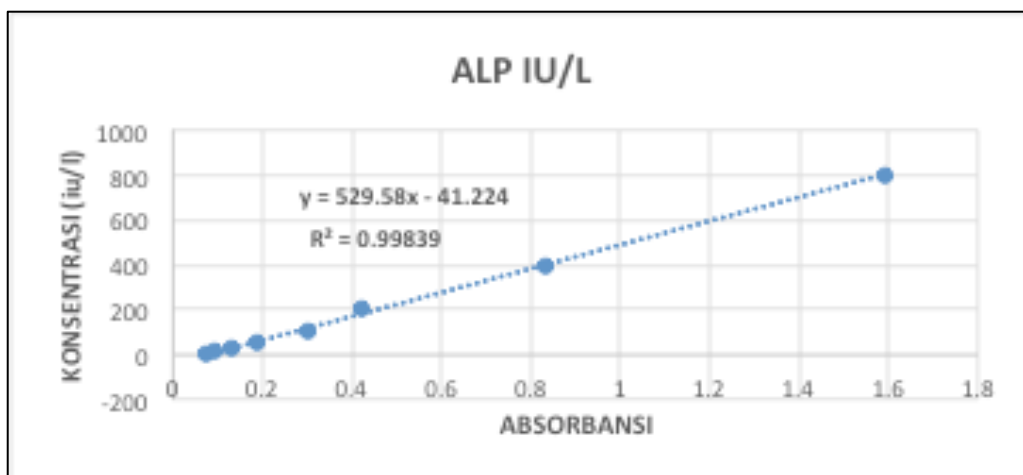
Lama pemeriksaan	7 hari	14 hari	21 hari
7 hari		0.006	0.016
14 hari			0.687
21 hari			

Keterangan: $p < 0,05$ bermakna, $p > 0,05$ tidak bermakna

Hasil pengujian *post-hoc HSD* pada Tabel 5 menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ekspresi Runx-2 antar durasi pemeriksaan selama 7 dan 14 hari, serta 7 dan 21 hari, namun antara 14 hari dan 21 hari tidak ada perbedaan bermakna. Hal tersebut berarti ekspresi Runx-2 setelah hUCMSC ditanam dalam scaffold K-G:KA pada hari ke 7 sampai hari ke-14 meningkat seiring dengan peningkatan durasi pemeriksaan, namun pada hari ke-21 ekspresi Runx-2 tidak meningkat.

6. Pemeriksaan Kadar *Alkaline phosphatase* (ALP) setelah hUCMSC Ditanam dalam *Scaffold* K-GEL:KA Berbasis Batu Kapur

Diferensiasi osteogenik dapat dilihat dari uji ALP hUCMSC yang ditanam pada *scaffold* K-GEL:KA. Pada penelitian ini, dibagi menjadi tiga durasi penelitian, yaitu 7 hari, 14 hari, dan 21 hari. Pengujian kadar ALP dilakukan dengan menggunakan metode ELISA. Hasil pengujian berupa nilai *optical density* (OD) yang menggambarkan jumlah ALP yang terdapat dalam protein yang dikoleksi pada setiap kelompok. Nilai kadar ALP dihitung dengan cara membuat kurva standar dengan rerata OD untuk setiap perlakuan pada sumbu vertikal (Y) terhadap konsentrasi pada sumbu horizontal (X) dan gambar kurva yang paling sesuai melalui titik-titik pada grafik. Perhitungan ini dapat dilakukan paling baik dengan perangkat lunak pencocokan kurva berbasis komputer dan garis paling sesuai dapat ditentukan dengan analisis regresi (Gambar 6). Nilai OD dimasukkan dalam rumus sumbu Y sehingga mendapatkan kadar ALP (IU/L). Nilai kadar ALP dapat dilihat pada Tabel 6. Gambaran diagram batang nilai rerata kadar ALP dapat dilihat pada Gambar 7.

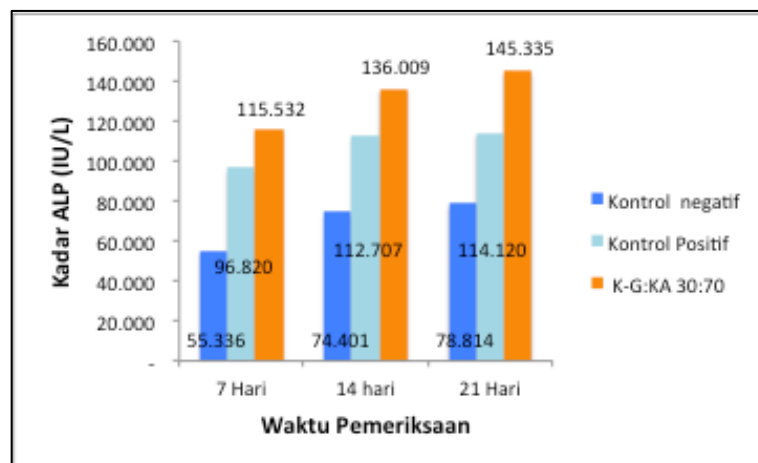


Gambar 6. Kurva baku standar ALP

Tabel 6. Rerata standar baku ALP (OD) dan kadar ALP, standar deviasi setelah kontak dengan *scaffold* K-GEL:KA (IU/L)

Waktu Uji	n	Standar Baku ALP (OD)			Kadar ALP (IU/L)		
		Rerata ± Simpang Baku			Rerata ± Simpang Baku		
		Kontrol (-)	Kontrol (+)	K-G:KA	Kontrol (-)	Kontrol (+)	K-G:KA
7 hari	3	0,182 ± 0,0025	0,261 ± 0,0064	0,296 ± 0,0072	55,336 ± 1,333	96,820 ± 3,405	115,532 ± 3,819
14 hari	3	0,218 ± 0,0025	0,291 ± 0,0015	0,335 ± 0,0092	74,401 ± 1,333	112,707± 0,809	136,009 ± 5,005

21 hari	3	0,227 ± 0,0041	0,293 ± 0,0037	0,352 ± 0,0055	78,814 ± 2,204	114,120± 2,005	145,335 ± 2,961
---------	---	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	-------------------	--------------------



Gambar 7 Diagram batang kadar ALP pada durasi pemeriksaan 7 hari, 14 hari, 21 hari

6.1 Analisis Statistik Kadar ALP setelah hUCMSC Ditanam dalam Scaffold K-G:KA pada Hari ke-7

Pada pengujian normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* didapatkan nilai $p = 0,780$, $p = 0,298$, $p = 0,537$ ($p > 0,05$). Hasil nilai p ini menunjukkan bahwa data berdistribusi normal. Homogenitas data diuji dengan kombinasi *Levene* dan *Bartlett's test* menunjukkan nilai $p = 0,445$ ($p > 0,05$), berarti data memenuhi syarat homogenitas.

Analisis statistik dilanjutkan pengujian *One way Anova*. Pengujian ini untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar ALP antara kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan pada hari ke-7.

Pada *One way Anova* didapatkan hasil nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan yang bermakna diantara masing-masing kelompok yang dibandingkan. Untuk mengetahui perbedaan kemaknaan diantara kelompok pemeriksaan tersebut, maka dilakukan pengujian lebih lanjut menggunakan *Post-hoc HSD test*.

Tabel 7. Hasil uji *one way Anova* kadar ALP pada hari ke-7

Kadar ALP pada hari ke-7	Total Jumlah	df	Rerata kuadrat	F	Sig.
Antar Group	5694,552	2	2847,276	305,602	0,000
Dalam Group	55,902	6	9,317		
Total	5750,453	8			

Tabel 8. Hasil uji *HSD Post-hoc* kadar ALP pada pemeriksaan hari ke-7

Kelompok	Negatif	Positif	<i>Scaffold</i> K-G:KA
Negatif		0,000	0,000
Positif			0,001
<i>Scaffold</i> K-GEL:KA			

Keterangan: $p < 0,05$ bermakna, $p > 0,05$ tidak bermakna

Hasil pengujian *post-hoc HSD* pada Tabel 8 menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna kadar ALP antar kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan pada waktu pemeriksaan 7 hari. Hal tersebut berarti kadar ALP meningkat berurutan pada kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan setelah hUCMSC ditanam dalam *scaffold* K-GEL:KA pada hari ke 7.

6.2 Analisis Statistik Kadar ALP setelah hUCMSC Ditanam dalam *Scaffold* K-G:KA pada Hari ke-14

Pada pengujian normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* didapatkan nilai $p = 0,780$, $p = 0,637$, $p = 0,403$ ($p > 0,05$). Hasil nilai p ini menunjukkan bahwa data berdistribusi normal. Homogenitas data diuji dengan kombinasi *Levene* dan *Bartlett's test* menunjukkan nilai $p = 0,069$ ($p > 0,05$), berarti data memenuhi syarat homogenitas.

Analisis statistik dilanjutkan pengujian *One way Anova*. Pengujian ini untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar ALP antara kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan pada hari ke-14. Pada *One way Anova* didapatkan hasil nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa nilai $p < 0,05$, artinya terdapat perbedaan yang bermakna diantara masing-masing kelompok yang dibandingkan. Untuk mengetahui perbedaan kemaknaan diantara kelompok pemeriksaan tersebut, maka dilakukan pengujian lebih lanjut menggunakan *Post-hoc HSD test*.

Tabel 9. Hasil uji *one way Anova* kadar ALP pada hari ke-14

Kadar ALP pada hari ke-14	Total Jumlah	df	Rerata kuadrat	F	Sig.
Antar Group	5805,899	2	2902,949	316,889	0,000
Dalam Group	54,965	6	9,161		
Total	5860,863	8			

Tabel 10. Hasil uji *HSD Post-hoc* kadar ALP pada pemeriksaan hari ke-14

Kelompok	Negatif	Positif	<i>Scaffold</i> K-G:KA 30:70
Negatif		0,000	0,000
Positif			0,001
<i>Scaffold</i> K-G:KA 30:70			

Keterangan: $p < 0,05$ bermakna, $p > 0,05$ tidak bermakna

Hasil pengujian *post-hoc HSD* pada Tabel 10 menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna kadar ALP antar kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan pada waktu pemeriksaan hari ke-14. Hal tersebut berarti kadar ALP meningkat berurutan pada kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan setelah hUCMSC ditanam dalam *scaffold* K-G:KA pada hari ke 14.

6.3 Analisis Statistik Kadar ALP setelah hUCMSC Ditanam dalam *Scaffold* K-G:KA pada Hari ke-21

Pada pengujian normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* didapatkan nilai $p = 0,463$, $p = 0,252$, $p = 0,918$ ($p > 0,05$). Hasil nilai p ini menunjukkan bahwa data berdistribusi normal. Homogenitas data diuji dengan kombinasi *Levene* dan *Bartlett's test* menunjukkan nilai $p = 0,868$ ($p > 0,05$), berarti data memenuhi syarat homogenitas.

Analisis statistik dilanjutkan pengujian *One way Anova*. Pengujian ini untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan kadar ALP antara kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan pada hari ke-21. Pada *One way Anova* didapatkan hasil nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa nilai $p < 0,05$, artinya terdapat perbedaan yang bermakna diantara masing-masing kelompok yang dibandingkan. Untuk mengetahui perbedaan kemaknaan diantara kelompok pemeriksaan tersebut, maka dilakukan pengujian lebih lanjut menggunakan *Post-hoc HSD test*.

Tabel 11. Hasil uji *one way Anova* aktivitas kadar ALP pada hari ke-14

Kadar ALP pada hari ke-14	Total Jumlah	df	Rerata kuadrat	F	Sig.
Antar Group	6645,865	2	3322,933	564,965	0,000
Dalam Group	35,290	6	5,882		
Total	6681,155	8			

Tabel 12. Hasil uji *HSD Post-hoc* kadar ALP pada pemeriksaan hari ke-21

Kelompok	Negatif	Positif	<i>Scaffold</i> K-G:KA 30:70
Negatif		0,000**	0,000**
Positif			0,001**
<i>Scaffold</i> K-GEL:KA 30:70			

Keterangan: **Terdapat perbedaan yang bermakna

Hasil pengujian *post-hoc* HSD pada Tabel 12 menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna kadar ALP antar kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan pada waktu pemeriksaan hari ke-21. Hal tersebut berarti kadar ALP meningkat berurutan pada kontrol negatif, kontrol positif dan perlakuan setelah hUCMSC ditanam dalam *scaffold*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Murphy CMC, O'Brien FJ, Little DDG, Schindeler A, O'Brien F, Little DDG, et al. Cell scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cells Mater*. 2013 Sep;26:120–32.
2. Tuzlakoglu K, Reis RL. Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by a biomimetic spraying process. *J Mater Sci Mater Med*. 2007 Jun;18(7):1279–86.
3. Kim G, Ahn S, Kim Y, Cho Y, Chun W. Coaxial structured collagen–alginate scaffolds: fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. *J Mater Chem*. 2011 Apr;21(17):6165–72.
4. Ariani MD, Matsuura A, Hirata I, Kubo T, Kato K, Akagawa Y. New development of carbonate apatite-chitosan scaffold based on lyophilization technique for bone tissue engineering. *Dent Mater J*. 2013;32(2):317–25.
5. Roveri N, Battistella E, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, Lelli M, et al. Synthetic Biomimetic Carbonate-Hydroxyapatite Nanocrystals for Enamel Remineralization. *Adv Mater Res*. 2008 Jun;47–50:821–4.
6. Costa-Pinto AR, Reis RL, Neves NM. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011 Oct;17(5):331–47.
7. Rodriguez I. Tissue engineering composite biomimetic gelatin sponges for bone regeneration. Thesis. Virginia Commonwealth University: Virginia; 2013.
8. Nie W, Peng C, Zhou X, Chen L, Wang W, Zhang Y, et al. Three-dimensional porous scaffold by self-assembly of reduced graphene oxide and nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Carbon N Y*. 2017;116:325–37.
9. Barralet J, Akao M, Aoki H, Aoki H. Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats. *J Biomed Mater Res*. 2000 Feb;49(2):176–82.

10. Levengood SL, Zhang M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B* [Internet]. 2014 Jun 7 [cited 2019 Jul 11];2(21):3161–84.
11. Alizadeh M, Abbasi F, Khoshfetrat AB, Ghaleh H. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Mater Sci Eng C*. 2013 Oct;33(7):3958–67.
12. Lukman MW, Yudyanto, Hartatiek. Sintesis Biomaterial Komposit CaO-SiO₂ Berbasis Material Alam (Batuan Kapur Dan Pasir Kuarsa) Dengan Variasi Suhu Pemanasan Dan Pengaruhnya Terhadap Porositas, Kekerasan Dan Mikrostruktur. Skripsi. Universitas Negeri Malang: Malang; 2013.
13. Duya P, Bian Y, Chu X, Zhang Y. Stem cells for reprogramming: could hUMSCs be a better choice? *Cytotechnology*. 2013 May;65(3):335–45.
14. Sobczak A, Kowalski Z, Wzorek Z. Preparation of hydroxyapatite from animal bones. *Acta Bioeng Biomech*. 2009;11(4):23–8.
15. Yalcinkaya TM, Sittadjody S, Opara EC. Scientific principles of regenerative medicine and their application in the female reproductive system. *Maturitas*. 2014 Jan;77(1):12–9.
16. Pace A, Valenza A, Vitale G. Mechanical characterisation of human cancellous bone tissue. In: *I materiali biocompatibili per la medicina/Biomaterials for Medicine*. Palermo: Universitas Studiorum; 2014. p. 15–8.
17. Khanchan M, Dasgupta S, Kundu B & Bissoyi A .Development of gelatin-chitosan-hydroxyapatite based bioactive bone scaffold with controlled pore size & mechanical strength. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2015; 26(16): 1190-1209.
18. Thein-Han WW, Saikhun J, Pholpramoo C, Misra RDK, Kitiyanant Y. Chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP–buffalo embryonic stem cells. *Acta Biomater*. 2009 Nov;5(9):3453–66.
19. Hunter KT, Ma T. In vitro evaluation of hydroxyapatite-chitosan-gelatin composite membrane in guided tissue regeneration. *J Biomed Mater Res Part A*. 2013 Apr;101A(4):1016–25.
20. Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, et al. Biodegradable Polymer Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers (Basel)*. 2016 Mar;8(4):115.
21. Bartoš, M., Suchý, T., & Foltán, R. Note on the use of different approaches to determine the pore sizes of tissue engineering scaffolds: what do we measure? *BioMedical Engineering OnLine*, 2018; 17(110), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12938-018-0543-z>
22. Blair, H.C., Larouture, Q.C., Li, Y., Lin, H., Beer-Stoltz, D., Liu, L., Tuan, R.S., Robinson, L.J., Schlesinger, P.H., Nelson, D.J. Osteoblast differentiation and bone

matrix formation in vivo and in vitro. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 2017; 23(3), 268–280. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0454>