



**KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOMOR: 394 /UN3.1.2/2022**

TENTANG

**TUGAS MENJADI TIM PENGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA
SEMESTER GASAL TAHUN AJARAN 2022/2023**

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA

Menimbang : a. bahwa untuk menjamin kelancaran pelaksanaan pendidikan/pengajaran pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga khususnya dalam melaksanakan kurikulum Sistem Kredit Semester, maka perlu menugaskan tenaga pengajar untuk menguji sesuai dengan kondisi pandemi pada bidangnya masing-masing;

b. bahwa tenaga pengajar yang namanya tersebut dalam daftar terlampir memenuhi syarat untuk menjadi penguji pada ujian Disertasi Tertutup sesuai bidangnya;

c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud pada huruf a dan b, perlu diterbitkan Keputusan Dekan tentang Tugas Menjadi Tim Penguji Pada Ujian Disertasi Tertutup Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Semester Gasal Tahun Ajaran 2022/2023.

Mengingat : 1. Undang-Undang Nomor 20 tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78 Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia nomor 4301);

2. Undang – Undang nomor 14 tahun 2005 tentang Guru dan Dosen (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2005 Nomor 157 Tambahan Lembaran Negara Republik Indonesia Nomor 4586);

3. Peraturan Menteri Pendayagunaan Aparatur Negara dan Reformasi Birokrasi Nomor 17 Tahun 2013 tentang Jabatan Fungsional Dosen dan Angka Kreditnya;

4. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 36 tahun 2017 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor Berbasis Riset Universitas Airlangga;

5. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 39 Tahun 2017 tentang Perubahan atas Peraturan Rektor Nomor 42 Tahun 2016 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Airlangga;

6. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 11/UN3/2020 tentang Pedoman Pendidikan Universitas Airlangga;

7.Peraturan.....

7. Peraturan Rektor Universitas Airlangga Nomor 20/UN3/2020 tentang Perubahan Atas Peraturan Rektor Nomor 36/UN3/2017 tentang Pedoman Pendidikan Program Doktor Berbasis Riset Universitas Airlangga;
8. Keputusan Rektor Universitas Airlangga Nomor 762/UN3/2020 tentang Pengangkatan Dekan Fakultas dan Direktur Sekolah Pascasarjana, dan Direktur Rumah Sakit Universitas Airlangga Periode 2020 – 2025.

MEMUTUSKAN :

- Menetapkan : KEPUTUSAN DEKAN TENTANG TUGAS MENJADI TIM PENGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA SEMESTER GASAL TAHUN AJARAN 2022/2023.
- KESATU : Menugaskan kepada tenaga pengajar yang namanya tercantum dalam daftar terlampir, untuk menjadi Tim Penguji pada Ujian Disertasi Tertutup sebagaimana tersebut dalam lampiran Keputusan Dekan ini.
- KEDUA : Dalam melaksanakan tugasnya sebagai penguji tersebut bertanggung jawab kepada Dekan melalui Koordinator Program Studi.
- KETIGA : Keputusan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Surabaya
Pada tanggal 16 Agustus 2022
Dekan,



AGUNG SOSIAWAN
NIP. 197112112008121003

KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA
 MOR : 394 /UN3.1.2/2022 TANGGAL 16 AGUSTUS 2022
 TENTANG : TUGAS MENJADI TIM PENGGUJI PADA UJIAN DISERTASI TERTUTUP PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU
 KEDOKTERAN GIGI FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA SEMESTER GASAL TAHUN
 AJARAN 2022/2023

No.	Nama Calon Doktor	Judul Disertasi	Nama Penguji		Tanggal Ujian
			Ketua	Anggota	
	Vivin Ariestania, drg.,Sp.Pros. NIM : 021910173008	"Mekanisme Kombinasi <i>Human Umbilical Cord</i> <i>Mesenchymal Stem</i> <i>Cells</i> (hUCMSCs) Dan Scaffold <i>HA+TCP</i> Untuk Regenerasi Bone Loss Pada <i>Model</i> <i>Peri implantitis</i> (Penelitian Eksperimental Pada <i>Rattus Norvegicus</i>)"	Prof. Dr. Rini Deviyanti Ridwan, drg., M.Kes.	1. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg., M.Kes., Sp.Pros.(K). 2. Prof. Dr. Chiquita Prahasanti S., drg., Sp.Perio (K). 3. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. 4. Prof. Dr. R. Darmawan Setijanto, drg., M.Kes. 5. Dr. Eha Renwi Astuti, drg., M.Kes., Sp.RKG (K). 6. Dr. Michael Josef K. drg., M.Kes., Sp.Pros (K).	23 Agustus 2022

Surabaya, 16 Agustus 2022
 DEKAN,



AGUNG SOSIAWAN
 NIP 197112112008121003

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**MEKANISME KOMBINASI *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells*
(hUCMSCs) DAN SCAFFOLD HA-TCP UNTUK REGENERASI BONE
LOSS PADA MODEL PERIIMPLANTITIS**

(Penelitian eksperimental pada Rattus Norvegicus)

DISERTASI



**VIVIN ARIESTANIA
NIM 021810173008**

**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

IR – PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**MEKANISME KOMBINASI *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells*
(hUCMSCs) DAN SCAFFOLD HA-TCP UNTUK REGENERASI BONE
LOSS PADA MODEL PERIIMPLANTITIS**

(Penelitian eksperimental pada Rattus Norvegicus)

DISERTASI



**VIVIN ARIESTANIA
NIM 021810173008**

**PROGRAM STUDI DOKTOR
ILMU KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

MEKANISME KOMBINASI *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (hUCMSCs) DAN *SCAFFOLD HA-TCP* UNTUK REGENERASI BONE LOSS PADA MODEL *PERI IMPLANTITIS*

(Penelitian eksperimental pada *Rattus Norvegicus*)

DISERTASI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan Pendidikan Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya

Oleh :

VIVIN ARIESTANIA
NIM : 021810173008

Menyetujui

Promotor

Prof. Dr. Nike Hendrijantini ,drg., M.Kes.,
Sp.Prof(K)
NIP 195910061986012001

Ko Promotor

Prof. Dr. Chiquita Prahasanti
S.drg., Sp. Perio (K)
NIP 195809091985032001

**Koordinator Program Studi
Doktor Ilmu Kedokteran Gigi**

Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp Ort (K)
NIP 195601071981031003

**PENETAPAN PANITIA PENGUJI
DISERTASI TERTUTUP**

**Disertasi ini telah di uji pada Ujian Tertutup
tanggal : 23 Agustus 2022**

Ketua : Prof. Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes.

Anggota :

- 1. Prof. Dr. Nike Hendrijantini ,drg., M.Kes., Sp.Pros (K) (Promotor)**
- 2. Prof. Dr. Chiquita Prahasanti S, drg., Sp. Perio (K) (Ko-Promotor)**
- 3. Prof. Dr. R. Darmawan Setijanto., drg., M.Kes**
- 4. Dr. Eha Renwi Astuti, drg., M.Kes., Sp.RKG (K)**
- 5. Dr. Michael Josef Kridanto Kamadjaja. drg., M.Kes., Sp.Pros (K)**
- 6. Prof. Dr. Aulanni'am., drh, DES**

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini saya :

Nama : VIVIN ARIESTANIA, DRG. Sp.PROS
NIM : 021810173008
Program Studi : ILMU KEDOKTERAN GIGI
Alamat / No. Telp : KALIJUDAN NO. 1 SURABAYA

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli dan benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas namakan saya, serta bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiatism) dari hasil karya orang lain. Disertasi belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik baik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh. Karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya,

Yang membuat pernyataan,



NIM. 021810173008

UCAPAN TERIMAKASIH



Segala puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan perkenanNya sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi. Penelitian dan disertasi ini dapat dilaksanakan dan diselesaikan dengan atas bimbingan, arahan, perbaikan dan bantuan dari banyak pihak, oleh karena itu perkenankan saya untuk mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg., M.Kes., Sp.Pros (K), selaku guru, Pembimbing Akademik, Promotor yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menempuh pendidikan jenjang Doktor. Terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada beliau yang selalu memberikan bimbingan, dukungan, arahan selama saya menempuh pendidikan ini, terutama dalam melakukan penelitian dan penulisan disertasi.

Prof. Dr. Chiquita Prahasanti S., drg., Sp.Perio (K) atas kesediaan beliau menjadi Ko-promotor, selalu menyempatkan waktu untuk memberikan bimbingan, dukungan dan arahan di tengah kesibukannya. Terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya atas wawasan dan kesempatan, pemikiran yang luas serta semangat positif yang diberikan dalam penelitian dan penulisan disertasi.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Moh. Nasich, SE., MT., Ak selaku Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan, ijin, dan fasilitas yang telah diberikan untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan pada Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Dr. Agung Sosiawan, drg., M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG (K) selaku Wadep I, Dr. Muhammad Lutfi, drg., M.Kes selaku Wadep II, Andra Rizkiawan, drg., PhD., Sp.BM selaku Wadep III beserta seluruh jajarannya, atas kesempatan yang telah diberikan untuk menempuh pendidikan ini.

Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort (K) sebagai Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi Jenjang Doktor yang telah memberikan banyak bantuan dan dukungan dalam melaksanakan pendidikan, penelitian, dan setiap tahap ujian yang ditempuh dalam pendidikan.

Prof. Maria Lucia Inge Lusida, dr., M.Kes., Ph.D sebagai ketua *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga atas ijin penggunaan fasilitas laboratorium selama saya melaksanakan penelitian.

Prof. Dr. A. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes, yang telah bersedia menyediakan waktu untuk konsultasi ditengah kesibukan beliau yang begitu padat serta memberi masukan dan bimbingan yang sangat berharga dalam penelitian dan penyusunan disertasi.

Dr. Taufan Brahmantoro, drg., M.Kes yang telah membantu memberikan masukan, kritik dan saran atas penyusunan disertasi ini.

Prof. Dr. Tuti Kusumaningsih, drg., M.Kes.(alm) yang telah memberikan masukan dan bimbingan yang sangat berharga dalam penelitian dan penyusunan disertasi.

Prof. Dr. R. Darmawan Setijanto., selaku penguji yang telah bersedia menjadi penguji ditengah kesibukan beliau sehingga dapat memberikan masukan dan bimbingan dalam penulisan disertasi.

Prof. Dr. Aulanni'am., drh., DES selaku penguji yang telah bersedia menjadi penguji ditengah kesibukan beliau sehingga dapat memberikan masukan dan bimbingan dalam penulisan disertasi

Dr. Eha Renwi Astuti, drg., M.Kes., SpRKG (K) yang telah memberikan masukan dan bimbingan yang sangat berharga dalam penelitian dan penyusunan disertasi.

Dr. Michael Josef K. drg., M.Kes., Sp.Pros (K) yang telah memberikan masukan dan bimbingan yang sangat berharga dalam penelitian dan penyusunan disertasi.

Rektor Universitas Hang Tuah Surabaya, Prof. Dr. Ir. Supartono M.M., CIQAR yang telah mengizinkan dan memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan jenjang doktor di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah Surabaya, Dr. R.A., Nora Lelyana, drg., M.H.Kes., FICD, WD1 Dr Kristanti Parisihni, drg., M.Kes., WD2 Dr Syamsulina Revianti, drg., M.Kes., WD3 Dr. Arya Brahmanta, drg., Sp.Ort., Direktur RSGM drg Lita Agustia., M.H.Kes yang telah mengizinkan dan memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan jenjang doktor di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

Kepala Bagian Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah drg. Chaterina Diyah Nanik, drg., Sp.Pros dan staf pengajar Prostodonsia Prof. Dr. Arifzan Razak, drg., M.Kes., Sp.Pros., (K), drg. Widaningsih, Sp.Pros, drg. Paulus Budi Teguh, Sp.Pros., Meinar Nur Ashrin, drg., PhD, Anindita Apsari, drg., Sp.Pros, Rizko Wira, drg., Sp.Pros, IGAM Oka Lestari, drg., MAP yang telah mengizinkan dan memberikan kesempatan serta dorongan dan semangat kepada saya untuk mengikuti pendidikan jenjang doktor di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

Terima kasih yang tulus saya ucapkan kepada staf pengajar di Program Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberikan ilmu pengetahuan dasar dan terapan yang sangat berharga dan bermanfaat dalam penyusunan disertasi.

Dr. Purwati, dr., Sp.PD., K-PTI, FINASIM, selaku ketua *Stem Cells Research and Development Center* Universitas Airlangga atas ijin penggunaan fasilitas laboratorium selama saya melaksanakan penelitian. Eryk Hendrianto, S.Si, M,Si, Deya Karsari, drg, M.Si, Aristika Dinar Yanti, drh, M.Si, Nora Ertanti, drh, M.Si, Risty, Igo, dan seluruh staf laboratorium *Stem Cells Research and Development Center* Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian.

Endah Sujani S,Si, Mas Ari, mb Uma terima kasih atas bantuannya dalam pemeriksaan di laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Wibi Irawan, terima kasih atas bantuannya dalam pemeriksaan di Departemen Laboratorium Biokimia Biomolekuler Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya..

Terimakasih juga saya ucapkan bagi teman-teman di Program Studi Doktoral Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga angkatan 2018, terutama drg Aprilia, Sp.KG, Dr. Devi Rianti, drg., M.Kes, Devi Eka Juniarti drg., M.Kes, Sp.KG terima

kasih atas bantuan dan masukannya dalam penulisan disertasi ini, dan teman-teman lainnya Dr. Alexander Patera Nugraha, drg., M.Imun, Dr. Mefina Kuntjoro, drg., M.Kes., Sp.Pros(K)., Dr. Eric Priyo Prasetyo, drg., M.Kes., Sp.KG, serta semua yang tidak bisa disebutkan satu persatu tidak mengurangi rasa penghargaan saya. Terimakasih atas saran, semangat, dukungan, kebersamaan dalam suka dan duka selama menempuh pendidikan ini.

Terimakasih juga saya ucapkan bagi teman-teman di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang tuah, terutama Dr. Rima Parwati Sari, drg., M.Kes, Dr. Endah Wahjuningsih, drg., M.Kes, Aulia Dwi Maharani, drg., M.Kes., Bunga Fauzia, drg., Fitri Puji Rahayu, S.E, Erik Duwijayanti, Amd. Dwiane Risalona S.Psi, Faisal Racmat Romadhoni S.Kom, Cahyo Kuncoro S.AP, Supriyanto, ST., Miq Angkasa, Kurnia Chomarrudin Basyar Amd., Ika Dewi Noviyanti, Amd., Arofatur Nur Ainiah, S.Pd, Nanda Budiarto, Amd. Terima kasih atas bantuan dalam penulisan disertasi ini, dan teman-teman lainnya yang tidak bisa disebutkan satu persatu tidak mengurangi rasa penghargaan saya.

Terima kasih dan penghargaan yang luar biasa dan tak terhingga kepada suami saya Rudi Setiawan, S.STP., M.Si., M.H., dan putra kebanggaan saya Rajendra Hadyan Putra Setiawan atas ijin, pengertian, kesabaran, pengorbanan, dukungan dan doa selama saya menempuh pendidikan ini.

Pendidikan ini dapat diselesaikan tidak terlepas dari dukungan keluarga, terimakasih yang tulus saya sampaikan pada orang tua saya, R.Prasetijo Soekirman (alm), RR. Hariwitarti, S.K.M , Sylvana Erlina, S.PD.,serta saudara-saudara saya Siska Savitri S.P, Yusuf Wibisono S.P., terima kasih atas doa-doanya, dukungan dan semangat yang diberikan selama saya menempuh pendidikan ini.

Semua pihak tanpa mengurangi rasa hormat yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu dalam penelitian dan penulisan disertasi ini.

Besar harapan saya penelitian ini dapat bermanfaat bagi kemajuan Ilmu Kedokteran Gigi khususnya bidang Prostodonsia dan semoga Allah SWT selalu melimpahkan keberkahan dan kekuatan bagi kita semua sehingga dapat mengemban dan berbagi ilmu pengetahuan untuk kepentingan kemanusiaan. Aamiin ya robbal' Alamin.

Surabaya, 2022

Penulis

ABSTRAK**MEKANISME KOMBINASI *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (hUCMSCs) DAN SCAFFOLD HA-TCP UNTUK REGENERASI BONE LOSS PADA MODEL PERIIMPLANTITIS****(Penelitian eksperimental pada *Rattus norvegicus*)**

Latar belakang : Defek tulang akibat kasus *periimplantitis* merupakan tantangan terbesar dibidang kedokteran gigi yang sampai saat ini belum ada terapinya selain terapi *debridement*. *Scaffold* merupakan struktur pengganti sementara dari matriks ekstraseluler yang rusak. Kelemahan penggunaan *scaffold* jenis biomaterial tunggal yang terbuat dari polimer alami adalah kekuatan mekanik rendah dan cepat terdegradasi, sehingga diperlukan kombinasi dengan bahan lain untuk menutupi kelemahan tersebut. *Mesenchymal stem cells* (MSCs) merupakan suatu alternatif untuk terapi regenerasi tulang. Penelitian pendahuluan dengan menggunakan *Mesenchymal Stem Cell* dari tali pusat bayi menunjukkan potensi osteogenik yang baik. Scaffold HA-TCP juga merupakan suatu pilihan bahan yang bermanfaat untuk regenerasi tulang. Penggabungan hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP diharapkan untuk mempercepat proses regenerasi tulang pada *bone loss* akibat *periimplantitis*. **Tujuan :** menjelaskan mekanisme kombinasi hUCMSCs dan scaffold HA-TCP untuk regenerasi *bone loss* pada *periimplantitis* serta membuktikan kemampuan percepatan regenerasi tulang. **Metode :** Ada 2 tahapan penelitian. Tahap 1 uji *in vitro* dilakukan karakterisasi HUCMSCs melalui *flowcytometry* dan kultur sel, kemudian dilakukan uji cytotoxicity HUCMSCs dengan *scaffold* serta uji perlekatan antara keduanya. Tahap 2 uji *in vivo* dengan cara melakukan perlakuan terhadap 70 ekor tikus jantan yang dipasang implan di area *femur* kemudian dibagi menjadi 10 kelompok yaitu KN2 dan KN4, KP2 dan KP4, KPA2 dan KPA4, KPU2 dan KPU4, KPAU2 dan KPAU4. Pada minggu ke-2 dan minggu ke-4 hewan diterminasi. Dilakukan pemeriksaan imunohistokimia TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, LL-37, dan pemeriksaan HE osteoblas, osteoklas, dan BIC. **Hasil :** Terdapat penurunan ekspresi TNF- α , IL-1 β dibandingkan kelompok kontrol pada minggu ke-2 dan ke-4 yang artinya terapi tersebut mampu menurunkan inflamasi, terdapat peningkatan ekspresi LL-37 dibandingkan kelompok kontrol pada minggu ke-2 dan ke-4 yang artinya memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan terdapat peningkatan ekspresi Runx2, COL-1, osteoblas, dan BIC dibandingkan kelompok kontrol pada minggu ke-2 dan ke-4 yang artinya terjadi proses osteogenik. **Kesimpulan :** Pemberian kombinasi hUCMSC dan *scaffold* HA-TCP pada minggu ke-2 sudah mampu menurunkan proses inflamasi pada kondisi *periimplantitis*, meningkatkan antibakteri dan juga memiliki efek osteogenik didalam regenerasi tulang.

Kata kunci: *human umbilical cord mesenchymal stem cells, scaffold, HA-TCP, periimplantitis, bone remodelling*

ABSTRACT

MECHANISM OF Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUCMSCs) AND SCAFFOLD HA-TCP COMBINATION FOR BONE LOSS REGENERATION IN PERIIMPLANTITIS MODELS (Experimental research on Rattus norvegicus)

ABSTRACT

Background: Bone defects caused by periimplantitis are the biggest challenges in dentistry, there is no therapy until now other than debridement therapy. Scaffold is a temporary replacement structure of the damaged extracellular matrix. The disadvantage of using a single dose of biomaterial scaffold made from natural polymers is that it has low mechanical strength and is rapidly degraded, so it is necessary to combine it with other materials to cover these weaknesses. Mesenchymal stem cells (MSCs) is a material that is currently used for bone regeneration. Preliminary experimental studies using human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) have shown good osteogenic potential. Scaffold HA-TCP ones of materials alternatif that is currently used for bone regeneration. The combination of hUCMSCs and scaffold HA-TCP is a good therapy to treat bone loss due to periimplantitis. **Objectives:** To explain mechanism combination hUCMSCs and scaffold HA-TCP for bone loss regeneration by periimplantitis and to prove the osteogenic accelerate ability. **Methods:** There were 2 stages of research. Stage 1 in vitro characterization of hUCMSCs through flowcytometry and cell culture, then conducted cytotoxicity test of hUCMSCs with scaffold as well as the attachment test between those two. Stage 2 in vivo conducting an in vivo test by performing therapy on 70 male rats implanted in the femur area then divided into 10 groups, that are KN2 and KN4, KP2 and KP4, KPA2 and KPA4, KPU2 and KPU4, KPAU2 and KPAU4. At week 2 and week 4 the animals were terminated. TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1 LL-37 expression were examined using IHC and osteoblasts, osteoclasts, BIC were examined using HE. **Results:** There was an expression decrease TNF- α , IL-1 β compared in control groups in 2 weeks and 4 weeks which means that this therapy is capable to reduce inflammation, there was expression increase LL-37 compared by control grups in 2 weeks and 4 weeks, which means it has antibacterials ability and there was expression increase of Runx2, COL-1, osteoblasts and BIC compared by control groups in 2 weeks and 4 weeks that proves it has osteogenic effect. **Conclusion:** The combination hUCMSc and scaffold HA-TCP in 2 weeks is capable to reduce the inflammatory process in periimplantitis and also has an osteogenic effect in bone regeneration

Keywords: human umbilical cord mesenchymal stem cells, Scaffold, HA-TCP, periimplantitis, bone remodeling

RINGKASAN

Perawatan gigi tiruan implan merupakan perawatan rehabilitasi untuk penggantian gigi tiruan yang paling banyak diminati dan dipilih sebagai alternatif utama, karena pemakaiannya seperti gigi asli yang tanpa harus dilepas sehingga lebih nyaman. Perawatan tersebut merupakan bagian perawatan di bidang gigi tiruan, yang mayoritas dilakukan pada penderita lanjut usia. Perawatan yang paling diminati saat ini adalah gigi tiruan implan. Pada proses pemasangan gigi tiruan implan sering dijumpai kegagalan pada pemasangannya. Kegagalan pada proses pemasangan implan ini biasanya disebabkan oleh karena terjadi infeksi bakteri dari rongga mulut. Bakteri yang sering menyebabkan peradangan pada implan yang biasa disebut *periimplantitis* adalah *P. gingivalis* atau *A. actynomecetemcomitans*. Gambaran klinis terjadinya *periimplantitis* salah satunya adalah terjadinya *bone loss* disekitar implan.

Penelitian eksperimental terbaru dengan pendekatan *tissue engineering* yaitu menggabungkan antar 2 metode terbaru didalam menangani terjadinya *bone loss* yang diakibatkan oleh karena *periimplantitis*. Dua metode yang digunakan adalah penggabungan terapi menggunakan MSCs yang berasal dari *umbilical cord* atau yang biasa dikenal dengan *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (HUCMSCs) dan menggunakan *scaffold* yang berasal dari bahan HA-TCP. Peran *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) didalam proses regenerasi pada tulang mandibula sudah pernah dilakukan dan hasilnya cukup baik. Peranan *scaffold* yang berasal dari HA-TCP juga sangat membantu dalam proses regenerasi tulang yang mengalami kerusakan atau defek.

Saat ini, *mesenchymal stem cell* yang berasal dari tali pusat bayi (hUCMSCs) yang bersifat multipoten, mulai banyak dipertimbangkan sebagai pilihan MSC dan mulai banyak disimpan di tempat penyimpanan jaringan sebagai alternatif terapi sel punca berbagai macam

penyakit atau kelainan, akan tetapi penelitian hUCMSCs untuk aplikasi rekayasa jaringan tulang mandibula juga belum pernah dilakukan sampai saat ini.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan keberhasilan dan menjelaskan mekanisme regenerasi tulang femur pada tikus yang telah dipasang implan dan dibuat peradangan menggunakan LPS *P.Gingivalis* dengan pemberian hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP.

Penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *Post Test Only Control Group Design*. Sebanyak 70 ekor tikus Wistar jantan dibagi ke dalam 7 kelompok masing-masing kelompok 7 ekor yaitu kelompok tikus kontrol normal (*sham surgery*) (KN), kelompok tikus model *periimplantitis* pada minggu ke 2 (KP2) dan ke 4 (KP4), kelompok tikus model *periimplantitis* yang diberi terapi *scaffold* HA-TCP selama 2 minggu (KPA2) dan 4 minggu (KPA4), kelompok tikus model *periimplantitis* yang diberi terapi hUCMSCs pada minggu ke 2 (KPU2) dan ke 4 (KPU4), kelompok tikus model *periimplantitis* yang diberi terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada minggu ke 2 (KPAU2) dan ke-4 (KPAU4). Variabel tergantung yang digunakan berupa penanda diferensiasi osteoblastogenesis yaitu Runx2, COL-1 dan BIC, serta jumlah sel osteoblas yang dihasilkan. Selain itu penanda proses menurunnya inflamasi digunakan variabel tergantung pemeriksaan TNF- α , IL-1 β dan LL-37 sebagai antibakteri.

Tikus model *periimplantitis* yang diberi terapi kombinasi jumlah sel osteoblas dan luas *bone implant contact* (BIC) tulang femurnya yang lebih tinggi dibandingkan tikus yang dilakukan *sham surgery* (KN). Hal ini menunjukkan model tikus *periimplantitis* yang digunakan pada penelitian ini dapat mewakili kondisi peradangan.

Dengan pemberian hUCMSC dan kombinasi *scaffold* HA-TCP didapatkan diferensiasi osteoblastogenesis yang lebih tinggi pada tikus model *periimplantitis* yang diberikan terapi tersebut, ditunjukkan dengan ekspresi Runx2 dan COL-1 yang lebih tinggi serta dibuktikan dengan jumlah sel osteoblas yang juga lebih banyak dibandingkan kontrol ($p < 0,05$). Setelah

terbukti terjadi diferensiasi MSC pada hUCMSC menjadi sel osteoblas yang lebih banyak, dilakukan juga evaluasi kemampuannya dalam melakukan pembentukan dan mineralisasi tulang. Pada penelitian ini didapatkan ekspresi kolagen tipe 1 sebagai protein utama matriks tulang yang lebih tinggi pada tikus *periimplantitis* yang diberikan hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP. Secara keseluruhan didapatkan area BIC tulang yang lebih luas pada tikus *periimplantitis* yang diberikan kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP sehingga terbukti pemberian terapi rekayasa jaringan ini dapat memperbaiki kondisi *periimplantitis*.

Kesimpulan penelitian ini adalah hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP merupakan salah satu terapi alternatif didalam meningkatkan regenerasi tulang yang mengalami *periimplantitis*.

DAFTAR ISI

SAMPUL LUAR.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PANITIA PENGUJI.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK.....	vii
RINGKASAN DISERTASI.....	ix
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR TABEL.....	xviii
DAFTAR SINGKATAN.....	xix
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan Penelitian.....	8
1.3.1 Tujuan umum penelitian.....	8
1.3.2 Tujuan khusus penelitian.....	8
1.4 Manfaat Penelitian.....	9
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	9
1.4.2 Manfaat Praktis.....	10
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1 <i>Periimplantitis</i>	11
2.1.1 Gambaran Klinis <i>Periimplantitis</i>	14
2.1.2 Patobiologi <i>Periimplantitis</i>	14
2.2 Tulang.....	18
2.2.1 Struktur Penyusun Tulang.....	19
2.2.2 Sel Tulang.....	19
2.2.3 Mekanisme resorpsi tulang alveolar.....	22
2.2.4 Mekanisme reparasi dan regenerasi tulang alveolar.....	26
2.2.5 Osteoblastogenesis.....	32
2.3 <i>Tissue Engineering</i>	33
2.3.1 <i>Stem Cell</i>	34
2.3.2 <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i>	38
2.3.3 Diferensiasi MSCs menjadi osteoblas.....	39
2.3.4 <i>Scaffold</i>	42
2.3.5 <i>Hydroxyapatite</i>	44
2.3.5.1 Struktur.....	44
2.3.5.2 <i>Tricalcium Phosphate</i>	47
2.3.6 <i>Growth Factors</i>	49
2.4 LL-37 / <i>Human Antimicrobial Peptide</i> (AMP).....	49
2.5 <i>Run-Related Transcription Factor-2</i>	53
2.6 <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i> (TNF- α).....	54

2.7 Interleukin 1 Beta (IL-1 β).....	56
2.8 Kolagen tipe 1 (COL-1).....	56
2.9 Osteoblas.....	57
2.10 Osteoklas.....	58
2.11 <i>Bone Implant Contact</i> (BIC).....	60
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	62
3.1 Kerangka Konsep.....	62
3.2 Hipotesis.....	66
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	68
4.1 Jenis Penelitian.....	68
4.2 Rancangan Penelitian.....	69
4.3 Populasi.....	71
4.4 Sampel Penelitian.....	71
4.4.1 Kriteria Inklusi.....	71
4.4.2 Kriteria Ekslusi.....	71
4.4.3 Kriteria Putus Uji.....	72
4.4.4 Besar Sampel.....	72
4.4.5 Teknik Pengambilan Sampel.....	72
4.5 Variabel Penelitian.....	74
4.5.1 Variabel Bebas.....	74
4.5.2 Variabel Tergantung.....	74
4.5.3 Variabel Terkendali.....	74
4.6 Definisi Operasional Variabel.....	75
4.7 Bahan dan Alat Penelitian.....	77
4.8 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	79
4.9 Cara Kerja.....	80
4.9.1 Prosedur Isolasi dan Kultur Ekspansi HUCMSCs	80
4.9.2 Karakteristik HUCMSCs.....	82
4.9.3 Pemeriksaan Imunositokimia.....	82
4.9.4 Pemeriksaan <i>Flowcitometry</i>	83
4.9.5 Uji Perlekatan <i>Scaffold</i> HA-TCP pada HUCMSCs secara <i>in vitro</i>	84
4.9.6 Uji Toksisitas HUCMSCs terhadap <i>scaffold</i> HA+TCP dengan <i>MTT-Assay</i>	85
4.9.7 Pembenuhan <i>seeding</i> HUCMSCs pada <i>Scaffold</i> HA-TCP.....	85
4.9.8 Pembuatan <i>bone loss</i> pada model <i>periimplantitis</i>	86
4.9.9 Prosedur injeksi kombinasi HUCMSCs dan <i>scaffold</i> HA-TCP pasca <i>seeding</i> pada femur tikus <i>bone loss</i>	87
4.9.10 Terminasi hewan coba dan pengambilan spesimen penelitian.....	87
4.9.11 Pemrosesan dan pemeriksaan spesimen penelitian.....	88
4.9.12 Pewarnaan dan Pembacaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE).....	89
4.9.13 Pewarnaan Imunohistokimia (IHC).....	91
4.10 Alur Penelitian.....	94
4.11 Kelaikan Etik.....	96
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....	97
5.1 Deskripsi hasil penelitian <i>in vitro</i> (tahap 1).....	97

5.1.1	Isolasi dan Kultur hUCMSCs.....	97
5.1.2	Karakteristik hUCMSCs.....	97
5.1.3	Uji Viabilitas (Cytotoxicity) hUCMSCs terhadap Scaffold HA-TCP.....	99
5.1.4	Uji perlekatan dan analisa hUCMSCs yang melekat pada <i>scaffold</i> HA-TCP menggunakan BrDU dengan pemeriksaan <i>confocal lightning scanning microscope</i> (CLSM).....	102
5.2	Deskripsi hasil penelitian in vivo (tahap II).....	104
5.2.1	Hasil pemeriksaan imunohistokimia (IHC) variabel inflamasi.....	104
5.2.1.1	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi LL-37.....	105
5.2.1.2	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi TNF- α	108
5.2.1.3	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL-1 β	111
5.2.2	Hasil pemeriksaan IHC variabel <i>remodelling</i> tulang.....	114
5.2.2.1	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Runx2.....	114
5.2.2.2	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi COL-1.....	117
5.2.2.3	Hasil pemeriksaan histopatologi jumlah ekspresi Osteoblas.....	120
5.2.2.4	Hasil pemeriksaan histopatologi jumlah ekspresi Osteoklas.....	123
5.2.2.5	Hasil pemeriksaan histopatologi jumlah luas BIC (<i>Bone Implant Contact</i>).....	126
5.3	Hubungan kausalistik antar variable yang diteliti.....	129
5.3.1	Analisa jalur kausalistik antar variabel kelompok minggu 2.....	130
5.3.2	Analisa jalur kausalistik antar variabel kelompok minggu 4.....	131
BAB 6 PEMBAHASAN.....		132
6.1	Isolasi dan Kultur hUCMSCs	134
6.2	Karakteristik hUCMSCs.....	134
6.3	Uji biokompatibilitas toksisitas dan perlekatan hUCMSCs terhadap scaffold HA-TCP.....	137
6.4	Mekanisme <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i> (hUCMSCs) dan scaffold HA-TCP terhadap ekspresi LL-37 pada proses inflamasi.....	140
6.5	Mekanisme <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i> (hUCMSCs) dan scaffold HA-TCP terhadap ekspresi TNF- α pada proses inflamasi.....	143
6.6	Mekanisme <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i> (hUCMSCs) dan scaffold HA-TCP terhadap ekspresi IL-1 β pada proses inflamasi.....	144
6.7	Mekanisme <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i> (hUCMSCs) dan scaffold HA-TCP terhadap ekspresi Runx2 pada proses osteoblastogenesis.....	145
6.8	Mekanisme <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i> (hUCMSCs) dan scaffold HA-TCP terhadap ekspresi COL-1 pada proses osteoblastogenesis.....	147
6.9	Mekanisme <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i> (hUCMSCs) dan scaffold HA-TCP terhadap jumlah osteoblas pada proses osteoblastogenesis.....	148
6.10	Mekanisme <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i> (hUCMSCs) dan scaffold HA-TCP terhadap jumlah osteoklas pada proses osteoclastogenesis.....	150
6.11	Mekanisme <i>Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells</i> (hUCMSCs) dan scaffold HA-TCP terhadap jumlah BIC pada proses osteoblastogenesis	151
6.12	Mekanisme kombinasi hUCMSCs dan <i>scaffold</i> HA-TCP dalam menurunkan inflamasi akibat <i>periimplantitis</i>	154
6.13	Mekanisme hUCMSCs dan scaffold HA-TCP sebagai perawatan <i>bone remodelling</i>	154

6.14. Analisis Jalur Mekanisme Remodeling Tulang pada proses penyembuhan <i>periimplantitis</i>	160
6.14.1 Analisis Jalur Mekanisme Remodeling Tulang pada proses penyembuhan <i>periimplantitis</i> pada minggu ke-2.....	160
6.14.2 Analisis Jalur Mekanisme Remodeling Tulang pada proses penyembuhan <i>periimplantitis</i> pada minggu ke-4.....	162
6.15 Temuan baru.....	163
6.16 Keterbatasan penelitian.....	164
BAB 7 PENUTUP	165
7.1 Kesimpulan.....	165
7.2 Saran.....	166
DAFTAR PUSTAKA	167
LAMPIRAN	194

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	(A) Gambaran radiografi berupa cekungan defek tulang pada kondisi peri implantitis yang disebabkan karena retensi semen dan crown yang tidak tertutup dengan penuh (B) Cekungan seperti defek tulang yang diakibatkan retensi semen yang berlebihan (C) Tanda panah menunjukkan retensi semen yang berlebihan antara tepi <i>crown</i> dan <i>abutment</i> sehingga <i>crown</i> tidak duduk sempurna dan mengakibatkan oklusi yang berlebihan.....	11
Gambar 2.2	Komponen penyusun tulang	18
Gambar 2.3	Kondisi homeostasis dan inflamasi terjadinya resorpsi tulang pada jaringan periodontal.....	24
Gambar 2.4	Skema aktivitas osteoklas pada proses terjadinya resorpsi tulang.....	25
Gambar 2.5	Pembentukan dan resorpsi tulang.....	31
Gambar 2.6	Area <i>tissue engineering</i> dalam regenerasi jaringan periodontal.....	33
Gambar 2.7	<i>Mesengensis</i>	37
Gambar 2.8	<i>Scaffold</i> HA-TCP.....	42
Gambar 2.9	Pendekatan <i>Tissue engineering</i> untuk regenerasi jaringan periodontal menggunakan kombinasi <i>stem cells</i> dan <i>scaffold</i>	44
Gambar 2.10	Struktur HA.....	45
Gambar 2.11	Aktivitas biologi LL-37.....	51
Gambar 2.12	Osteoblastogenesis terregulasi pensinyalan BMPs/Wnt melalui Runx2 dan Osterix.....	53
Gambar 2.13	Peran Runx2 pada osteoblas.....	54
Gambar 2.14	Regulasi pembentukan dan fungsi osteoklas.....	59
Gambar 2.15	(A) Tulang dengan defek yang sedang dalam masa penyembuhan membentuk tulang baru dan area defek (B) Tulang tibia tanpa defek dihitung menggunakan skala kotak-kotak untuk menganalisa luas tulang trabekula..... (a) Eksperimen implan titanium dengan lubang-lubang setelah 8 minggu proses penyembuhan pada maksila tulang babi (b) ROI untuk evaluasi terbentuknya tulang baru.....	61
Gambar 3.1	Kerangka konsep.....	62
Gambar 4.1	Rancangan Desain Penelitian.....	68
Gambar 4.2	Perhitungan BIC.....	90
Gambar 4.3	Alur penelitian.....	94
Gambar 5.1	Morfologi HUCMSCs pada <i>passage</i> keempat berbentuk memanjang dan confluent 80%.....	97
Gambar 5.2	Morfologi HUCMSCs.....	98
Gambar 5.3	Karakteristik HUCMSCs pada <i>passage</i> keempat.....	99
Gambar 5.4	Uji <i>MTT Assay</i> HUCMSCs yang diberi <i>scaffold</i> HA-TCP.....	100
Gambar 5.5	Diagram batang mean dan SD viabilitas HUCMSCs dan <i>scaffold</i> HA-TCP dengan <i>MTT-Assay</i>	101

Gambar 5.6	Diagram batang rerata dan SD perlekatan HUCMSCs dan <i>scaffold</i> HA-TCP dengan BrDU.....	103
Gambar 5.7	Perlekatan HUCMSCs dengan <i>scaffold</i> HA-TCP menggunakan BrDU.....	103
Gambar 5.8	Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia LL-37 pada daerah peri-implan (diberi kotak dengan pembesaran 1000x).....	105
Gambar 5.9	Diagram batang rerata dan SD ekspresi LL-37 antar kelompok....	106
Gambar 5.10	Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia TNF- α pada daerah <i>periimplant</i> (diberi kotak dengan pembesaran 1000x).....	108
Gambar 5.11	Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi TNF- α antar kelompok.....	110
Gambar 5.12	Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia IL-1 β pada daerah <i>periimplant</i> (diberi kotak dengan pembesaran 1000x).....	111
Gambar 5.13	Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi IL-1 β antar kelompok.....	112
Gambar 5.14	Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia Runx2 pada daerah <i>periimplant</i> (diberi kotak dengan pembesaran 1000x).....	115
Gambar 5.15	Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi Runx2 antar kelompok.....	116
Gambar 5.16	Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia COL-1 pada daerah peri-implan (diberi kotak dengan pembesaran 1000x).....	118
Gambar 5.17	Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi LL-37 antar kelompok.....	119
Gambar 5.18	Gambaran hasil pemeriksaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE) Osteoblas pada daerah peri-implant (diberi kotak dengan pembesaran 1000x).....	121
Gambar 5.19	Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi osteoblas antar kelompok.....	121
Gambar 5.20	Gambaran hasil pemeriksaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE) ekspresi Osteoklas antar kelompok.....	124
Gambar 5.21	Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi osteoklas antar kelompok.....	124
Gambar 5.22	Gambaran HPA dari hasil pewarnaan <i>Hematoxylin Eosin</i> (HE) terhadap luas area tulang yang terbentuk pada daerah disekeliling implan (BIC).....	127
Gambar 5.23	Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) luas BIC antar kelompok	127
Gambar 5.24	Hasil analisis jalur mekanisme pembentukan BIC yang diberi diberi <i>scaffold</i> HA-TCP dan hUCMSCs pada minggu ke-2.....	130
Gambar 5.25	Hasil analisis jalur mekanisme pembentukan BIC yang diberi diberi <i>scaffold</i> HA-TCP dan hUCMSCs pada minggu ke-4.....	131

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Deskripsi rerata, simpang baku (SD) dan uji beda antar kelompok (Anova) hasil persentasi viabilitas (<i>cytotoxicity</i>) hUCMSCs setelah diberi <i>scaffold</i> HA-TCP.....	101
Tabel 5.2	Deskripsi rerata, standar deviasi (SD) dan uji <i>Mann-Whitney</i> pada perlekatan hUCMSCs terhadap <i>scaffold</i> HA-TCP setelah di sheeding selama 24 jam and 72 jam.....	102
Tabel 5.3	Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji normalitas dan homogenitas antar kelompok ekspresi LL-37.....	106
Tabel 5.4	Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD LL-37.....	107
Tabel 5.5	Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji normalitas dan homogenitas antar kelompok ekspresi TNF- α	109
Tabel 5.6	Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD TNF- α	109
Tabel 5.7	Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji normalitas dan homogenitas antar kelompok ekspresi IL-1 β	112
Tabel 5.8	Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD IL-1 β	113
Tabel 5.9	Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas antar kelompok ekspresi Runx2.....	116
Tabel 5.10	Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Runx2.....	115
Tabel 5.11	Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas kelompok ekspresi COL-1.....	118
Tabel 5.12	Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD COL-1.....	119
Tabel 5.13	Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas kelompok ekspresi Osteoblas.....	122
Tabel 5.14	Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Osteoblas.....	122
Tabel 5.15	Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas antar kelompok ekspresi Osteoklas.....	125
Tabel 5.16	Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> LSD Osteoklas.....	125
Tabel 5.17	Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas dan uji beda antar kelompok luas area BIC.....	128
Tabel 5.18	Hasil Uji <i>Post-Hoc</i> Mann-Whitney U BIC.....	128

DAFTAR SINGKATAN

<i>P. gingivalis</i>	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
BOP	: <i>bleeding on probe</i>
HUCMSCs	: <i>Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells</i>
LL-37	: <i>Human cathelicidin</i>
α -MEM	: <i>Alpha Minimum Essential Medium</i>
HA	: <i>Hydroxiapatite</i>
TCP	: <i>Tri Calcium Phosphate</i>
TNF α	: <i>Tumor Necrosis Factors Alpha</i>
IL -1 β	: <i>Interleukin 1 Beta</i>
COL-1	: <i>Collagen 1</i>
Runx2	: <i>Runt-related transcription actor 2</i>
IL-1 α	: <i>Interleukin 1 Alpha</i>
RANKL	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand</i>
RANK	: <i>Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B</i>
MMP-8	: <i>Matrix Metalloproteinase 8</i>
PAMPs	: <i>Pathogen Associated Molecule Pattern</i>
M1	: <i>Macrophage 1</i>
M2	: <i>Macrophage 2</i>
IL-1	: <i>Interleukin 1</i>
IL-6	: <i>Interleukin 6</i>
IL-10	: <i>Interleukin 10</i>

NF- κ B	: <i>Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells</i>
OPG	: <i>Osteoprotegrin</i>
IGFI	: <i>Insulin Growth Factor-I</i>
PTH	: <i>Parathyroid hormone</i>
MMP-9	: <i>Matrix Metalloproteinase 9</i>
GLA-protein	: <i>Galactosidase Alpha</i>
TGF β	: <i>Transforming Growth Factor-β</i>
BMP	: <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
ALP	: <i>Alkaline Phosphatase</i>
OCN	: <i>Osteocalcin</i>
TRAP	: <i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>
TLR	: <i>toll-like reseptor</i>
MyD88	: <i>Myeloid Differentiation Primary Response 88</i>
IRAK	: <i>IL-1 Receptor-Associated Kinase 1</i>
TRAF6	: <i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>
c-Fos	: <i>proto oncogene</i>
AP-1	: <i>Activating Protein-1</i>
M-CSF	: <i>Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
PTHrP	: <i>Paratiroid related</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
MSCs	: <i>Meshencymal Stem Cells</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
IGF-2	: <i>Insulin-like Growth Factor-2</i>
BMD	: <i>Bone Mineral Density</i>

Cbfa1	: <i>Core binding factor a1</i>
Smad	: <i>Small Mother against decapentaplegic</i>
ECM	: <i>extracellular matrix</i>
CaCO ₃	: <i>calcium carbonate</i>
<i>β-TCP</i>	: <i>Betha - tricalcium phosphate</i>
OPN	: <i>Osteopontin</i>
ISCT	: <i>International Society for Celluler Theraphy</i>
CD 105	: <i>Cluster of differentiation 105</i>
CCR1	: <i>Chemokine Receptor</i>
CXCR5	: <i>Chemokine receptor type 5</i>
SDF	: <i>Stromal cell derived factor 1</i>
ESC	: <i>Embryonal stem cell</i>
BM-MSCs	: <i>Bone Marrow Meshencymal Stem Cells</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
IFN- γ	: <i>Interferon-Gamma</i>
OSX	: <i>osterix</i>
VEGF	: <i>Vascular Endhotelial Growth Factors</i>
PPAR γ	: <i>Peroxisome Proliferator Activator Receptor – Gamma</i>
MSX-2	: <i>Homeobox protein MSX-2</i>
BSP	: <i>Bone Sialo Protein</i>
MAPK	: <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
AMP	: <i>Anti Microbial Peptide</i>
LBP	: <i>LPS-binding protein</i>
GMSCs	: <i>Gingival Mesenchymal Stem Cells</i>
NK cell	: <i>natural killer cell</i>

CRP	: <i>C- Reactive Protein</i>
HSC	: <i>Haematopoeitic Stem Cells</i>
RER	: <i>Reticular Endhoplasma Rough</i>
DC-STAMP	: <i>Dendrocyte Expressed Seven Transmembrane Protein</i>
Atp6v0d2	: <i>ATPase H⁺ Transporting V0 Subunit D2</i>
c-Src	: <i>Proto-oncogene tyrosine- protein kinase Src</i>
avb3	: <i>Alpha-v beta-3</i>
ROI	: <i>Region Of Interest</i>
ERK	: <i>Extra celuller signal Regulated Kinase</i>
STAT	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
PBS	: <i>Phosphat Buffer Saline</i>
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i>
FACS	: <i>Fluorescent activated cell sorting</i>
HE	: <i>Hematoxylin Eosin</i>
HRP	: <i>Horseradish Peroxidase</i>
FBS	: <i>fetal bovine serum</i>
GBPT	: <i>Gedung Bedah Pusat Terpadu</i>
ITD	: <i>Institute Tropical Desease</i>
RL	: <i>Ringer Lactate</i>
PFA	: <i>Para Formal Adehid</i>
EDTA	: <i>Ethylene Dianine Tetra Acetic Acid</i>
IHC	: <i>imunohistochemistry</i>
FITC	: <i>Fluoresence Isothiocyanate</i>
BrDU	: <i>5-Bromo-deoxyuridine</i>
CLSM	: <i>Confocal Lightning Scanning Microscope</i>

Sox-2	: <i>sex determining region Y-box2</i>
Oct-4	: <i>octamer binding transcription factor</i>
TiO ₂	: <i>Titanium Oxide</i>
E.Colli	: <i>Escherria Colli</i>
ADMSCs	: <i>adipose tissue-derived MSCs</i>
CFU-F	: <i>colony forming unit – fibroblast</i>
IDO	: <i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
siRNA	: <i>small interfering RNA</i>
rCRAMP	: <i>Rat Cathelicidin related antimicrobial peptide</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Publikasi penelitian in vitro	194
Lampiran 2	Publikasi penelitian in vitro	195
Lampiran 3	Uji kelaikan etik FKG Universitas Airlangga	196
Lampiran 4	Uji kelaikan etik RSUD Dr. Soetomo	197
Lampiran 5	<i>Informed Consent</i>	198
Lampiran 6	Uji statistic Analisis Viability hUCMSCs dengan MTT-Assay	200
Lampiran 7	Uji statistic perlekatan <i>scaffold</i> HA-TCP terhadap hUCMSCs dengan metode Confocal	207
Lampiran 8	Uji Statistik Imunohistochemistry TNF- α	211
Lampiran 9	Uji statistik IHC IL-1 β	218
Lampiran 10	Uji Statistik IHC Runx2	229
Lampiran 11	Uji Statistik IHC COL-1	236
Lampiran 12	Uji Statistik IHC LL-37	243
Lampiran 13	Uji Statistik HE Osteoblas	250
Lampiran 14	Uji Statistik HE Osteoklas	257
Lampiran 15	Uji Statistik HE BIC	264
Lampiran 16	Isolasi dan kultur sel	293
Lampiran 17	Pembuatan <i>scaffold</i> dan HA-TCP	294
Lampiran 18	Pembuatan model sample <i>periimplantitis</i>	295
Lampiran 19	Aplikasi pemberian hUCMSCs dan <i>scaffold</i> HA-TCP	296
Lampiran 20	Gambaran Radiologis Kelompok KP dan KPAU	297

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Perawatan implan merupakan salah satu *treatment* pilihan yang sangat diminati dan sudah dikenal sejak 30 tahun yang lalu. Pemasangan *dental implant* ini merupakan salah satu perawatan terbaik yang dapat dilakukan pada kasus *edentulous area* (Valente & Andreana, 2016).

Peningkatan kebutuhan perawatan implan seringkali disertai dengan komplikasi jangka pendek maupun jangka panjang yang meningkat. Salah satunya adalah terjadinya *periimplantitis*, yaitu suatu peradangan yang terjadi disekitar implan, *periimplant disease* secara umum disebut sebagai *periimplantitis*. Malo & Nobre (2017) mendapatkan sebanyak 13,9% dari 22.009 pasien yang diamati menderita *periimplantitis*. Pengamatan pada 662 pasien, 184 orang diantaranya mengalami *periimplantitis*, yang ditandai dengan *progressive bone loss* pada satu atau lebih implan yang terpasang dan dari 3.413 implan yang dipasang dijumpai sebanyak 423 (12,4%) kasus implan yang terlepas dari tulang (Valente & Andreana, 2016). Menurut Cosgarea *et.al* 2019, angka keberhasilan pemasangan implan selama 25 tahun menunjukkan sebesar 83,8% sedangkan angka keberhasilan pemasangan implan selama 10 tahun sebesar 96,1%.

Periimplant tissue hampir memiliki aspek yang serupa dengan *periodontal tissue*, yang membedakan hanyalah keberadaan *ligament periodontal* yang masih vital pada jaringan periodontal. Vaskularisasi pada *peri implant tissue* lebih sedikit dibandingkan *periodontal tissue*, dan disertai lapisan tipis *proteoglycan* yang berada

diantara implan dan permukaan tulang (Smeets *et al.*, 2014). Pada kasus periodontitis kronis akan terlihat adanya penurunan tulang alveolar yang dapat dilihat dengan *dental radiografi* dan radiografi *mikro-CT (µ-CT)* dengan parameter *scan source voltage* 80 kV, *source current* 50 [A, *image pixel size* 24,2 [m, *exposure* 125 ms (Bruker Sky Scan 1173, High Energi Micro-CT, FMIPA ITB) (Sari *et al.*, 2018).

Periimplantitis adalah komplikasi biologis dari pemasangan *dental implant* yang didefinisikan sebagai reaksi inflamasi dari *soft tissue* disekitar implan, dan biasanya disertai dengan terjadinya kehilangan tulang yang melebihi proses remodeling dari fisiologis normal (Froum, 2018). Mombelli mengatakan penyebab utama *periimplantitis* disebabkan karena infeksi bakteri yang dimulai dari adanya akumulasi plak (Mombelli & Juodzbaly, 2016). Bakteri penyebab *periimplantitis* yang terbanyak adalah bakteri plak anaerob *Gram negative* yang memiliki karakteristik khusus sehingga dapat menimbulkan efek berlawanan terhadap kesehatan jaringan periimplan. Bakteri yang dapat menyebabkan *periimplantitis* salah satunya adalah *Porphyromonas gingivalis (P.gingivalis)* dan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A. actinomycetemcomitans)*. Bakteri tersebut mengalami kolonisasi yang dimulai 30 menit setelah pemasangan implan (Valente & Andreana, 2016). Bakteri tersebut merupakan kelompok bakteri *Gram negative* anaerob yang terdeteksi pada pasien yang mengalami *periimplantitis*. *Periimplantitis* juga merupakan *poly-microbial* anaerob infeksi yang memiliki gambaran klinis serupa pada kondisi periodontitis, dimana pada daerah peri implan merupakan tempat berkumpulnya bakteri (Smeets *et al.*, 2014).

Bakteri *Gram negative* memiliki endotoksin pada dinding sel. Komposisi endotoksin terdiri dari polisakarida (*polymerized sugars*), lipids (*complexes containing fatty acids*) dan protein (Leonardo *et al.*, 2004). Endotoksin pada bakteri

Porphyromonas gingivalis sering disebut dengan *lipopolysaccharide* (LPS) (Dixon & Darveau, 2005; Bainbridge *et al.*, 2008). LPS pada bakteri tersebut dapat menyebabkan destruksi yang cepat yang diawali dengan adanya berkumpulnya *multiple bacteria* (Graves, Oates, & Garlet, 2011). Adanya organisme patogen yang menghuni biofilm rongga mulut menjadi pencetus penyakit tersebut, kerusakan jaringan menjadi akibat dari tidak mampunya *host* menstimuli respon imun melawan biofilm patogen. (Prathapachandran, 2012). Kerusakan tulang pada periodontitis diawali dengan adanya bakteri plak yang terdapat pada *sulcus gingiva* dan permukaan gigi, berakhir sampai terjadinya destruksi perlekatan *connective tissue* implan terhadap tulang secara permanen (Graves, Oates, & Garlet, 2011).

Gambaran klinis terjadinya *periimplantitis* pada jaringan peri implan adalah adanya *mucositis* yang merupakan proses awal induksi bakteri, kemudian diikuti proses terjadinya inflamasi yang ditandai adanya kemerahan, pembengkakan dan *bleeding on probe* (BOP) yang merupakan tanda klinis dari *periimplant disease* (Smeets *et al.*, 2014). Menurut Charalampakis (2014), *periimplantitis* juga merupakan *irreversible inflammatory* yang menyebabkan kerusakan jaringan disekitar implan dengan disertai adanya kerusakan tulang. Secara mikroskopis dan level molekuler tampak perbedaan menyolok antar *periimplant tissue* dan periodontium yang sehat. Terjadi penurunan vaskularisasi dan orientasi paralel dari jaringan kolagen, sehingga pada daerah *periimplant tissue* lebih rentan daripada jaringan periodontal yang normal (Smeets *et al.*, 2014).

Kondisi *periimplantitis* pada pasien yang mengakibatkan terjadinya *bone loss* membutuhkan regenerasi tulang. Sampai saat ini belum ada prosedur *gold standart* untuk terapi *periimplantitis*, terapi yang biasa digunakan sampai saat ini hanya

difokuskan untuk terapi kehilangan tulangnya saja, baik secara bedah maupun non bedah (kuret) (Prathapachandran, 2012). Berbagai bahan dan teknik rekayasa jaringan sampai saat ini masih berkembang sebagai terapi regeneratif untuk mengatasi terjadinya kerusakan tulang yang disebabkan berbagai macam faktor penyebab salah satunya adalah kerusakan tulang yang disebabkan oleh *periimplantitis* (Newman *et al.*, 2012). Terapi regenerasi tulang dengan menggunakan *stemcell* yang berasal dari tali pusat (hUCMSCs) pada mandibula pada tikus osteoporosis dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas secara signifikan, sehingga menyebabkan densitas tulang mandibula meningkat seperti tulang normal (Hendrijantini *et al.*, 2018). Penggunaan hUCMSCs selain meningkatkan sel osteoblas juga dapat berfungsi sebagai antimikroba dengan adanya indikator LL-37 yang juga memiliki peran sebagai *immunomodulatory*. LL-37 juga mempunyai peran menginduksi makrofag pro inflamasi dan anti inflamasi untuk memodulasi lingkungan mikro. (Kahlenberg & Kaplan, 2013).

Teknik *tissue engineering* dengan menggunakan *stemcells* disarankan dalam perbaikan tulang yang mengalami kerusakan (Liang *et al.*, 2014). Berdasarkan teori rekayasa jaringan, maka dimungkinkan untuk membuat jaringan baru yang diinginkan dengan menggabungkan 3 komponen, yaitu *stemcell*, *scaffold matriks ekstraseluler* dan *growth factors*, yang disebut sebagai konsep *Triad of Tissue Engineering* (Reddi, 2007).

Kelebihan lain hUCMSC adalah mudah didapatkan karena merupakan limbah biologis yang selalu dibuang atau tidak terpakai sehingga secara etik tidak akan ada masalah untuk digunakan. Pengambilan hUCMSC dilakukan melalui prosedur *caesar* dan kondisinya aseptik untuk mencegah terjadinya kontaminasi yang berlebihan.

hUCMSC secara *in vitro* memiliki kemampuan osteogenesis sehingga mampu digunakan sebagai *bone cell* terapi. MSC adalah sel imatur yang belum terdiferensiasi. Selain kemampuannya melakukan proliferasi, MSC juga memiliki kemampuan potensial untuk menjadi berbagai progenitor yang bisa berdiferensiasi (Minguell, Erices & Conget, 2001). Setiap tubuh manusia memiliki MSC endogen yang berfungsi meregenerasi dan memperbaiki jaringan. Bila terjadi defek luas, populasi MSC endogen tidak memadai untuk meregenerasi jaringan, oleh karena itu diperlukan pendekatan rekayasa jaringan dengan pemberian MSC secara eksogen (Braniak & McDevitt, 2010). Penggunaan hUCMSC dengan pelarut gelatin dan α -MEM dirasa lebih aman dan lebih efektif sebagai medium pembawa hUCMSC pada proses *in vivo* untuk regenerasi tulang (Hendrijantini *et al.*, 2015).

Terapi hUCMSCs digunakan untuk pembentukan regenerasi tulang yang memiliki waktu penyembuhan di minggu ke-4 (Hendrijantini *et al.*, 2015), untuk mempercepat proses dari penyembuhan diperlukan suatu kerangka atau *scaffold* yang berfungsi sebagai tempat menempelnya sel-sel. *Scaffold* merupakan struktur tiga dimensi yang digunakan sebagai media penyangga untuk mendukung proses pertumbuhan dan perkembangan jaringan tulang baru (Laurencin, 2008). *Scaffold* digunakan untuk menginduksi pembentukan jaringan yang diinginkan, menginduksi pertumbuhan sel didaerah sekitarnya. *Scaffold* harus memiliki pori yang saling terkoneksi dan terintegrasi, memiliki *neovascularisasi* untuk pertumbuhan tulang. Idealnya *scaffold* memiliki sifat *biocompatible*, *biodegradable* dan *nontoxic* (Patil *et al.*, 2013).

Bahan *bone graft* ideal harus memiliki sifat-sifat umum seperti osteoinduktif, osteokonduktif, osteointegrasi dan osteogenensis (Rucci, 2008). Salah satu bahan

alami yang berpotensi untuk digunakan sebagai kandidat *bone substitute material* yaitu berupa *scaffold* yang berasal dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*). Pada penelitian awal tentang senyawa yang terdapat pada cangkang kerang darah yang diambil dari limbah rumah makan (*seafood*) yang sudah dibersihkan mengandung CaCO_3 100%. Setelah melalui serangkaian proses sintesis dengan menggunakan metode *hydrothermal* maka didapatkan adanya kandungan *Hydroksiapatite* (HA) sebesar 72% dan TCP sebesar 21% (Prananingrum & Revianti, 2017). *Scaffold* kombinasi HA-TCP dapat digunakan sebagai pengganti tulang karena bersifat biokompatibel, dapat meningkatkan pembentukan tulang baru, melalui efek osteokonduksi dapat menambah massa tulang di area defek (Rimawati *et al.*, 2016)

Penggabungan antara terapi pemberian sel punca hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kasus *periimplantitis* diharapkan dapat memperbaiki kondisi *bone loss* pada tulang mandibula lebih cepat dan optimal dengan cara terjadinya *osseointegration*.

Penelitian ini menggunakan hewan coba yang dipasang implan di femur lalu dibuat kondisi *periimplantitis* dengan induksi LPS. Pemasangan implan di femur dilakukan karena struktur tulang femur menyerupai tulang mandibula tikus dan mampu menghasilkan proses osteogenesis (Barry & Murphy, 2004). Kemampuan hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP diharapkan dapat menstimulasi *growth factor* dan molekul biokatif untuk bergerak lebih cepat ke arah defek tulang dan berproliferasi serta berdiferensiasi membentuk jaringan tulang alveolar yang baru

1.2 Rumusan Masalah:

1. Apakah pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi LL-37 sebagai antibakteri untuk menghambat inflamasi pada kasus *periimplantitis*?
2. Apakah pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada proses inflamasi yang terjadi pada *periimplantitis*?
3. Apakah pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi IL -1 β pada proses inflamasi yang terjadi pada *periimplantitis*?
4. Apakah pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi RunX2 pada proses *remodelling* tulang model *periimplantitis*?
5. Apakah pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi COL-1 pada proses *remodelling* tulang model *periimplantitis*?
6. Apakah pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan jumlah Osteoblas pada proses *remodelling* tulang model *periimplantitis*?
7. Apakah pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan jumlah Osteoklas pada proses *remodelling* tulang model *periimplantitis* ?
8. Apakah pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan jumlah BIC pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*?
9. Bagaimana penjelasan proses inflamasi yang berhubungan dengan *remodelling* tulang melalui analisa jalur pada minggu ke-2?
10. Bagaimana penjelasan proses inflamasi yang berhubungan dengan *remodelling* tulang melalui analisa jalur pada minggu ke-4?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui mekanisme terjadinya penghambatan proses inflamasi dan meningkatkan percepatan regenerasi tulang melalui terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kasus *bone loss* model *periimplantitis*.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Menganalisis pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat mengekspresikan LL-37 sebagai antibakteri untuk menghambat inflamasi pada kasus *periimplantitis*
2. Menganalisis pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*
3. Menganalisis pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi IL -1 β pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*
4. Menganalisis pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi RunX2 pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*
5. Menganalisis pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi Col-1 pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*
6. Menganalisis pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan jumlah osteoblas pada regenerasi tulang model *periimplantitis*

7. Menganalisis pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan jumlah osteoklas pada regenerasi tulang model *periimplantitis*
8. Menganalisis pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan BIC pada kasus regenerasi tulang model *periimplantitis*
9. Menganalisis mekanisme jalur inflamasi terhadap proses regenerasi tulang pada *periimplantitis* di minggu ke-2
10. Menganalisis mekanisme jalur inflamasi terhadap proses regenerasi tulang pada *periimplantitis* di minggu ke-4

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Dengan hasil penelitian yang didapat dari penelitian ini, diharapkan dapat :

1. Memberikan kontribusi ilmiah tentang potensi pemberian kombinasi hUCMSCs dengan *scaffold* HA-TCP secara *in vitro* maupun *in vivo*
2. Memberikan kontribusi ilmiah mengenai mekanisme regenerasi tulang pada model *periimplantitis* setelah pemberian terapi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP
3. Sebagai dasar pengembangan ilmu terhadap penggunaan hUCMSCs pada regenerasi tulang model *periimplantitis*
4. Sebagai dasar pengembangan ilmu terhadap penggunaan terapi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP sebagai salah satu alternatif perawatan kasus *periimplantitis* non bedah.

1.4.2. Manfaat Praktis

Dengan hasil penelitian yang didapat dari penelitian ini, diharapkan dapat :

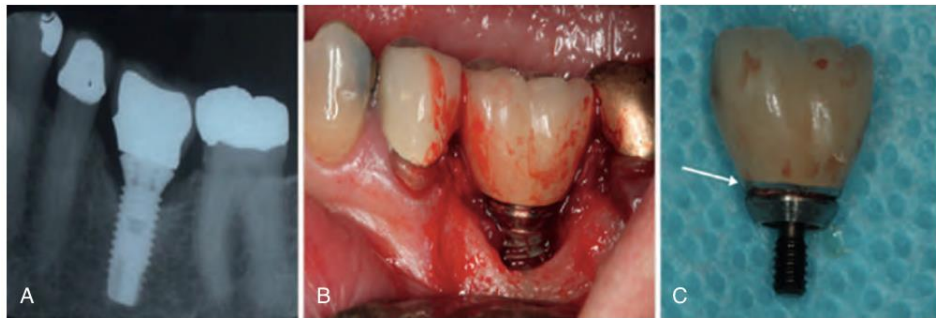
1. Sebagai sumber rekayasa jaringan baru melalui potensi pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP
2. Pemanfaatan pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP sebagai perawatan *periimplantitis*
3. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP mampu diaplikasikan sebagai penanganan *bone defect*

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Periimplantitis*

Periimplantitis adalah suatu kondisi adanya proses inflamasi yang menyerang jaringan disekitar implant yang sudah mengalami osseointegrasi sehingga menyebabkan *progressive bone loss* pada tulang penyangga (Newman *et al*, 2012). *Dental plaque* dan infeksi bakteri merupakan etiologi terbesar dari penyakit periodontal dan *periimplant disease* (Ramesh & Jayaprakash, 2015). Mombelli (2016) mengatakan bahwa hipotesis *periimplantitis* disebabkan karena infeksi bakteri yang dimulai dari adanya akumulasi plak sebagai etiologi yang dapat diterima, tapi sebenarnya penyebab infeksi bakteri pada kasus *periimplantitis* ini adalah multi faktorial tidak hanya adanya akumulasi plak saja melainkan disebabkan karena kebiasaan pasien, tindakan bedah dan penggunaan protesa yang salah juga dapat memperparah kondisinya (Ramesh & Jayaprakash, 2015))



Gambar 2.1 **A.** Gambaran radiografi berupa cekungan defek tulang pada kondisi *periimplantitis* yang disebabkan karena retensi semen dan crown yang tidak tertutup dengan penuh. **B.** Cekungan seperti defek tulang yang diakibatkan retensi semen yang berlebihan. **C.** Tanda panah menunjukkan retensi semen yang berlebihan antara tepi crown dan abutment sehingga crown tidak duduk sempurna dan mengakibatkan oklusi yang berlebihan (Newman *et.al*, 2018)

Jaringan periimplan hampir memiliki aspek yang serupa dengan jaringan periodontal, yang membedakan hanyalah keberadaan ligamen periodontal yang masih vital, vaskularisasi pada jaringan peri implan lebih sedikit dibandingkan pada jaringan periodontal, serta adanya lapisan tipis *proteoglycan* yang berada diantara implan dan permukaan tulang (Smeets, 2014).

Periimplantitis adalah komplikasi biologis dari *dental implant*, yang didefinisikan sebagai reaksi inflamasi dari *soft tissue* disekitar implan, dan biasanya disertai dengan terjadinya *bone loss* yang melebihi proses remodeling fisiologis normal (Froum, 2018). Etiologi *periimplantitis* banyak yang mengatakan disebabkan karena bakteri plak anaerob *gram negative* yang menimbulkan efek berlawanan terhadap kesehatan jaringan peri implan. Bakteri-bakteri yang dapat menyebabkan *periimplantitis* salah satunya adalah *P. gingivalis* dan *A. actinomycetemcomitnas*, kolonisasi bakteri terjadi 30 menit setelah pemasangan implan (Valente & Andreana, 2016). Penelitian sebelumnya telah mengindikasikan komposisi biofilm penyakit *periimplantitis* terbanyak karena infeksi bakteri *gram negative* *A. actinomycetemcomitna*., *P. gingivalis*, *T. forsythia* dan *Fusobacterium* (Carranza, 2012). Bakteri-bakteri seperti *P. gingivalis* dan *A. actinomycetemcomitans* adalah kelompok bakteri *gram negative* anaerob yang terdeteksi terdapat didalam pasien yang mengalami *periimplantitis*. *Periimplantitis* merupakan *poly-microbial* anaerob infeksi yang serupa terdapat pada kondisi periodontitis, sedangkan pada lesi peri implan merupakan tempat berkumpulnya bakteri (Smeets *et al.*, 2014).

Sejumlah besar *black-pigmented bacteria* ditemukan pada kondisi *periimplantitis* pasien yang masih bergigi. Dari kondisi tersebut diasumsikan

periimplantitis ini terjadi karena infeksi dari organisme tertentu yang berlebihan yang tumbuh dari lingkungan *microbiota* di daerah sirkular gigi-gigi asli (Carranza, 2012). Gram negatif khususnya *dark (black) pigmented bacteria (Porphyromonas)* mendapatkan perhatian khusus karena memiliki faktor virulensi dan produk yang bersifat toksik terhadap jaringan periapikal gigi (Cohen & Hargreaves, 2006). Bakteri *gram negative* memiliki endotoksin pada dinding sel. Komposisi endotoksin terdiri dari *polysaccharides (polymerized sugars)*, *lipids (complexes containing fatty acids)* dan *protein* (Leonardo *et al.*, 2004). Endotoksin pada bakteri *Porphyromonas* disebut juga *lipopolysaccharide (LPS)* berdasarkan struktur kimianya ada beberapa macam LPS dengan berbagai gugus *acyl* yang menentukan heterogenitas lipid A. Lipid A merupakan komponen LPS yang paling aktif (Dixon & Darveau, 2005; Bainbridge *et al.*, 2008). Destruksi yang cepat pada tulang diawali dengan adanya multipel bakteri dan produknya yaitu LPS. Bakteri ini menstimulasi resorpsi dengan cara menginduksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-1 α , mengaktifkan reseptor ligand (RANKL) atau TNF- α (Graves, Oates & Garlet, 2011).

Adanya organisme *pathogen* yang merusak jaringan menjadi akibat dari tidak mampunya *host* menstimuli respon imun melawan biofilm patogen. Organisme biofilm tertanam didalam matriks ekstraseluler substansi polimer yang memproduksi sel untuk berkomunikasi satu dengan yang lain. Selebihnya organisme biofilm patogen menghambat perubahan fenotipe dengan cara menghambat pertumbuhan organisme tersebut, gen transkripsi dan resistensi antimikroba (Prathapachandran, 2012).

2.1.1 Gambaran Klinis *Periimplantitis*

Tanda-tanda klinis terjadinya inflamasi pada jaringan periimplan ditandai dengan adanya *mucositis* yang merupakan awal terjadinya induksi bakteri, proses terjadinya inflamasi mengakibatkan pada daerah periimplan mengalami kemerahan, pembengkakan dan *bleeding on probe* (BOP, semua ini merupakan *typical sign* dari *periimplant disease* (Smeets *et al.*, 2014). Secara mikroskopis dan level molekuler tampak perbedaan menyolok antar *periimplant tissue* dan periodontium yang sehat. Disini tampak penurunan vaskularisasi dan orientasi paralel dari jaringan kolagen, pada *periimplant tissue* lebih rentan daripada jaringan periodontal yang normal. Secara imunohistokimia terjadinya periodontitis ditandai dengan peningkatan MMP-8 pada lesi periimplan (Smeets *et al.*, 2014).

2.1.2 Patobiologi *Periimplantitis*

Menurut (Ramesh & Jayaprakash, 2015) faktor-faktor yang mempengaruhi *periimplantitis* adalah biofilm dan mikroflora. Istilah biofilm tidak dapat menentukan bahwa koloni mikroba dapat melekat pada permukaan gigi atau suatu bahan yang keras atau material yang tebal. *Dental implant* adalah suatu bahan seperti gigi asli dimana permukaannya dapat ditumbuhi oleh biofilm, yang menunjang penumpukan populasi mikroba.

Menurut (Ramesh & Jayaprakash, 2015) *biofilm* sering dihubungkan dengan infeksi yang resisten terhadap terapi antimikroba. Hal yang menyebabkan terjadinya resisten adalah:

1. Adanya substansi ekstra seluler polimer yang menjadi pelindung sehingga antimikroba gagal berpenetrasi kedalam biofilm

2. Kemampuan resistensi dalam beradaptasi fenotip terhadap sifat multiseluler biofilm
3. Peranan penting biofilm dalam menyebarkan resistensi suatu antibiotic
4. Biofilm mikroorganisme bukan suatu plankton yang dapat hidup bebas dan aktif di dalam mikroorganisme melainkan selalu terjadi kompetisi diantara organisme yang berbeda didalam biofilm. Sedangkan agen antimikroba tidak aktif didalam biofilm sebagai plankton mikroorganisme

Mikrobiota yang berhubungan dengan *periimplant disease* adalah 1.) *Mixed*; 2.) Sedikit bervariasi; 3.) Didominasi oleh bakteri *gram negative*. Pada implan yang stabil, *Staphylococcus sanguis* dan *staphylococcus mitis* masih mendominasi. *A. actinomycetemcomitans* dan *P. gingivalis* jarang muncul. Sedangkan *Prevotella intermedia* dan *Prevotella nigrescens* lebih sering tampak (Ramesh & Jayaprakash, 2015).

Lesi osteolitik pada periodontitis diawali dengan adanya plak bakteri yang terdapat di *sulcus gingiva* dan permukaan gigi. *Periimplantitis* terjadi dalam 4 fase; 1) akumulasi bakteri biofilm yang terdapat di *sulcus gingiva* (kolonisasi), (2) penetrasi bakteri pada ephitelium dan *connective tissue* pada gingiva yang dekat dengan permukaan implan (invasi), (3) stimulasi respon *host* untuk mengaktifkan imun respon (inflamasi) dan (4) sampai destruksi perlekatan *connective tissue* implan terhadap tulang secara *irreversible* (Graves, Oates & Garlet, 2011).

Destruksi yang cepat pada tulang diawali dengan adanya *multiple bacteria* dan produknya yaitu LPS. Bakteria ini menstimulasi resorpsi dengan cara

menginduksi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-1 α , mengaktifkan reseptor ligand (RANKL) atau TNF- α (Grave, Oates & Garlet, 2011). LPS merupakan salah satu *inducer* makrofag tipe M1 dalam reaksi inflamasi dan respon imun (Geng *et al.*, 2017). LPS akan menstimulasi sel makrofag melepaskan mediator sitokin osteogenik (Graves, Oates & Garlet, 2011)

Saat terjadinya suatu proses inflamasi oleh LPS, sistem imun bawaan (*innate*) diaktifkan sebagai suatu respon yang dikenal tubuh sebagai *pathogen associated molecule pattern* (PAMPs). Kondisi lingkungan yang hipoksia dapat menstimulasi banyak jenis sel, termasuk sel inflamasi. Seiring dengan masuknya neutrophil, monosit yang bersirkulasi memasuki luka dan berdiferensiasi menjadi makrofag. Makrofag memiliki berbagai macam fenotipe, yaitu M1 dan M2. Pada awal inflamasi, M1 berfungsi mengeliminasi patogen yang masuk ke dalam tubuh, mengakibatkan di dalam tubuh makrofag terjadi proses signaling intraseluler yang melepas sitokin-sitokin proinflamasi diantaranya *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) dan interleukin-6 (IL-6). Apabila terjadi reaksi inflamasi yang berlebihan maka salah satu sel yang berperan untuk meregulasi reaksi tersebut adalah makrofag M2 yang mengekspresikan IL-10 yang berperan sebagai anti inflamasi (Yang *et. al*, 2014).

Mekanisme respon inflamasi LPS yang menstimulasi diferensiasi osteogeni dimulai adanya intervensi infeksi bakteri yang menyebabkan masuknya inflamasi mononuklear di seluruh komponen seluler . Sejumlah limfosit T dan B juga ditemukan pada sel inflamatori yang terdapat di jaringan gingiva sebagai antigen. Pada penelitian sebelumnya ditemukan sejumlah osteoklas pada puncak *alveolar*

bone tikus yang mendapat *antigen-specific lymphocytes*, dan berimplikasi kuat terhadap respon imun yang menginduksi resorpsi tulang. Reseptor NF- κ B mengaktifasi ligand (RANKL) melalui TNF yaitu suatu sitokin yang terdapat didalam proses osteoklastogenesis yang menyebabkan terjadinya resorpsi tulang. Ekspresi RANKL sebagai indikator awal terjadinya proses osteoklastogenesis pada proses resorpsi tulang yang berbanding terbalik dengan proses *bone remodeling*. Salah satu bahan yang mampu mengurangi jumlah koloni bakteri *P.gingivalis* adalah anti-RANKL antibodi atau OPG dengan cara merusak lingkungan ekologi *P. gingivalis* sehingga pertumbuhan bakteri dapat dikurangi (Graves, Oates and Garlet, 2011)

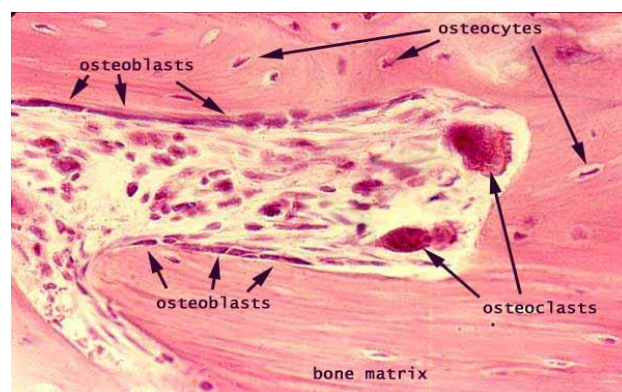
Sitokin pro inflamasi seperti TNF- α , *insulin growth factor-I* (IGFI), *parathyroid hormone* (PTH) dan IL-6 akan mengaktifkan permukaan sel osteoblas yang dalam kondisi diam. Aktifnya sel osteoblas ini pada permukaan sel akan meningkatkan ekspresi RANKL yang mampu berikatan dengan reseptor RANK yang diekspresikan oleh pre-osteoklas. Ikatan RANK-RANKL dapat memicu pre osteoklas untuk berdiferensiasi menjadi osteoklas. Pada fase resorpsi, osteoklas mengalami polarisasi sehingga dapat menempel pada permukaan tulang dan mulai melarutkan tulang. Saat pelarutan tulang ini membutuhkan 2 aktifitas yaitu 1) melarutkan komponen *inorganic* melalui pengasaman *bone matrix* dan 2) mengeluarkan *enzim lysosome* (MMP9) untuk mendegradasi komponen organik tulang. Ketika fungsi keduanya selesai osteoklas akan mengalami apoptosis. (Grave, Oates and Garlet, 2011)

Terjadinya resorpsi tulang sering ditandai dengan proses osteoclastogenesis. Sinyaling RANK/RANKL tergantung pada interaksi sel-sel prekursor osteoblas dan

osteoklas. Osteoprotegerin (OPG) adalah suatu reseptor umpan dari RANKL yang disekresi oleh osteoblas yang dapat mengganggu jalur RANKL dan mempunyai sifat osteoprotektif. OPG adalah protein yang disekresi dan memiliki struktur yang sama dengan RANK sehingga OPG mampu melekat pada RANKL untuk mencegah terjadinya interaksi dengan RANK yang berkonsekuensi menghambat osteoclastogenesis. Fungsi dari osteoklas ini adalah untuk degradasi komponen inorganic pada matriks tulang (Graves, Oates and Garlet, 2011).

2.2 Tulang

Tulang merupakan salah satu komponen jaringan terkeras yang berada di dalam tubuh. Tulang merupakan bentuk khusus jaringan ikat yang tersusun oleh Kristal-kristal mikroskopik fosfat kalsium, terutama hidroksiapatit dan matriks kolagen (Fadillah *et al*, 2013). Kalsium adalah mineral makro yang berperan penting di dalam tubuh, lebih dari 99% kalsium ditemukan pada jaringan keras yaitu pada tulang dan gigi manusia dalam bentuk kalsium fosfat (Guyton and Hall, 2016). Tulang merupakan jaringan hidup dan merupakan jaringan penghubung (*connective tissue*) yang mempunyai tiga fungsi utama yaitu fungsi mekanik untuk gerakan dan melekatnya otot, melindungi organ vital, dan sebagai cadangan kalsium dan fosfat (Mahmudiati, 2015).



Gambar 2.2 Komponen penyusun tulang
(University of Western Australia, 2004)

2.2.1 Struktur Penyusun Tulang

Tulang terdiri atas 3 tiga komponen utama yaitu: 1) Senyawa organik utama penyusun tulang adalah protein, dan protein utama penyusun tulang adalah COL-1 yang merupakan 90-95% bahan organik utama sedang sisanya adalah medium homogen yang disebut substansi dasar, 2) Substansi dasar tulang terdiri atas cairan ekstraseluler ditambah dengan proteoglikan khususnya kondroitin sulfat dan asam hialuronat. Fungsi utama dari bahan tersebut belum diketahui, akan tetapi diduga membantu pengendapan garam kalsium. Bahan anorganik utama adalah garam kristal yang diendapkan di dalam matriks tulang, terutama terdiri dari kalsium dan fosfat yang dikenal sebagai kristal hidroksi apatit (Guyton and Hall 2006). Substansi dasar juga mengandung protein non kolagen, dan beberapa protein tersebut sangat spesifik pada tulang. Protein non kolagen tersebut antara lain: osteonektin, osteokalsin (*bone GLA-protein*), osteopontin (*bone sialoprotein I*) dan *bone sialoprotein II*, *growth factor* (IGF-I dan II), *transforming growth factor- β* (TGF β), *bone morphogenetic protein* (BMP) (Murray, 2003). Protein non kolagen utama adalah osteokalsin, yang menyusun matriks tulang sebesar 1% (Baron, 2006). 3) Komponen sel yang terdiri atas empat tipe sel yaitu: osteosit, osteoblas, osteoklas, *osteoprogenitor cell* (Mahmudati, 2015).

2.2.2 Sel Tulang

a. Osteoblas

Osteoblas adalah bentuk sel tulang muda, fungsi penting dari sel ini adalah untuk sintesis bahan organik matriks tulang yaitu serabut kolagen dan glikoprotein (Harjana, 2011). Osteoblas berperan pada sintesis komponen organik matriks

tulang yang terdiri atas kolagen tipe I, proteoglikan, dan glikoprotein termasuk osteonektin. Deposisi komponen anorganik tulang juga bergantung pada adanya osteoblas aktif. Osteoblas hanya terdapat pada permukaan matriks tulang dan letaknya bersebelahan, yang mirip dengan epitel selapis. Bila osteoblas aktif mensintesis matriks, osteoblas memiliki bentuk kuboid sampai silindris dengan sitoplasma basofilik. Bila aktivitas sintesisnya menurun, sel tersebut menjadi pipih dan sifat basofilik pada sitoplasmanya akan berkurang. Aktivitas osteoblas dirangsang oleh hormon paratiroid (PTH) (Mescher, 2010; Murray *et. al*, 2009).

Osteoblas ini juga bertanggung jawab pada pembentukan dan proses mineralisasi tulang. Osteoblas mensintesis kolagen dan *glycosaminoglycans* dari matriks tulang dan berperan dalam proses mineralisasi tulang. Osteoblas yang matang akan mengekspresikan beberapa senyawa kimia yang bisa digunakan identifikasi aktivitas osteoblas dalam serum yang biasa diberi istilah *biochemical bone marker* yaitu: COL-I, ALP dan OCN (Robling *et al.*, 2006). Osteoblas bertanggung jawab untuk produksi kolagen dan protein non-kolagen termasuk *osteocalcin*, *bone sialoprotein*, *osteopontin*, dan *osteonectin*. Osteoblas juga menghasilkan sitokin termasuk *insulin-like growth factor* I, II (IGF-I,II), TGF- β , dan BMP. *Growth factor* memainkan peran penting dalam diferensiasi dan fungsi osteoblas. Osteoblas merupakan sebuah parameter baku yang dapat dijadikan acuan proses penyembuhan dan regenerasi tulang (Nakamura, 2007).

b. Osteosit

Osteosit adalah sel-sel tulang yang matur yang terbungkus dalam lapisan-lapisan matriks tulang yang telah mengalami mineralisasi (Harjana, 2011). Setiap osteoblas secara bertahap dikelilingi oleh produk sekresinya sendiri dan menjadi osteosit

yang terselubung sendiri-sendiri dalam ruang yang disebut lakuna. Pada transisi dari osteoblas menjadi osteosit, sel yang menjulurkan banyak tonjolan sitoplasma panjang, yang juga diselubungi oleh matriks termineralisasi. Suatu osteosit dan prosesusnya menempati setiap lakuna dan kanalikuli yang menyebar darinya (Mescher, 2010; Junquera dan Carnaiero, 2009). Kanalikuli ini berfungsi sebagai jalur untuk memasok nutrisi dan oksigen dari kapiler darah ke osteosit (Hienz *et al.*, 2015). Sejumlah pertukaran molekul antara osteosit dan pembuluh darah juga terjadi melalui sejumlah kecil cairan ekstrasel yang berada di antara osteosit dan matriks tulang (Mescher, 2010; Mahmudati, 2013).

Hubungan antara sitoplasma dengan kanalikuli melalui *gap junction* yang memungkinkan osteosit dapat memberikan tanggapan oleh adanya signal mekanik dan biokimiawi. Osteosit diyakini memainkan peran dalam hal merespon stimulasi mekanik, sensor adanya strain dan inisiasi respon terhadap modeling dan remodeling melalui beberapa *mesenger* kimia (Robling *et al.*, 2006).

c. Osteoklas

Osteoklas merupakan sel raksasa yang berperan untuk perombakan matriks tulang dan perubahan bentuk jaringan tulang (Harjana, 2011). Osteoklas adalah sel motil bercabang yang sangat besar dengan inti multipel. Ukuran yang besar dan inti yang multipel pada osteoklas terjadi karena asalnya dari penggabungan sel yang berasal dari sumsum tulang. Di area terjadinya resorpsi tulang, osteoklas terdapat di dalam lekukan atau kriptus yang terbentuk akibat kerja enzim pada matriks, yang dikenal sebagai *resorption bays* (dulu disebut lakuna Howship) (Mescher, 2010).

Pada osteoklas yang aktif, permukaan yang menghadap matriks tulang terlipat secara irregular, yang membentuk batas bergelombang (*ruffled border*).

Pembentukan batas bergelombang tersebut berhubungan dengan aktivitas osteoklas. Batas bergelombang ini dikelilingi oleh zona sitoplasma terang yang kaya akan filamen aktin dan merupakan tempat adhesi osteoklas pada matriks tulang. Zona adhesi sirkumferensial ini menciptakan lingkungan mikro di antara osteoklas dan matriks tempat terjadinya resorpsi tulang (Mescher, 2010). Sel osteoklas ini kaya dengan enzim lisosom yang meliputi *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP). Osteoklas berperan pada proses resorpsi tulang dan selama proses resorpsi, ion hidrogen yang dibentuk dari *carbonic anhydrase* (karbonik anhidrase) memasuki plasma membran untuk melarutkan matriks tulang, lebih lanjut enzim lisosom yaitu kolagenase dan katepsin K dikeluarkan untuk kemudian mencerna matriks tulang (Robling *et al.*, 2006).

Selama resorpsi tulang, osteoklas memproduksi serta mengeluarkan enzim lisosom, proton hidrogen, radikal bebas dalam celah antar tulang yang akan melarutkan mineral serta mendegradasi matriks tulang (Duhe, 2003). Osteoklas memiliki reseptor untuk kalsitonin, yakni suatu hormon tiroid, tetapi bukan untuk hormon paratiroid. Osteoblas yang diaktifkan oleh PTH akan memproduksi suatu sitokin yang disebut faktor perangsang osteoklas. Jadi, aktivitas kedua sel tersebut terkoordinasikan dan keduanya penting pada *bone remodelling* (Mescher, 2010).

2.2.3 Mekanisme resorpsi tulang alveolar

Resorpsi tulang adalah proses morfologi kompleks yang berhubungan dengan adanya erosi pada permukaan tulang dan *giant cell multinucleated* (osteoklas). Resorpsi tulang alveolar berhubungan dengan penyakit *periimplantitis* dapat dilihat pada pemeriksaan radiografis. Rata-rata terjadinya *bone loss* sekitar 1,7 mm dan ada daerah terbuka pada implan yang tidak ada tulangnya sekitar ≥ 1

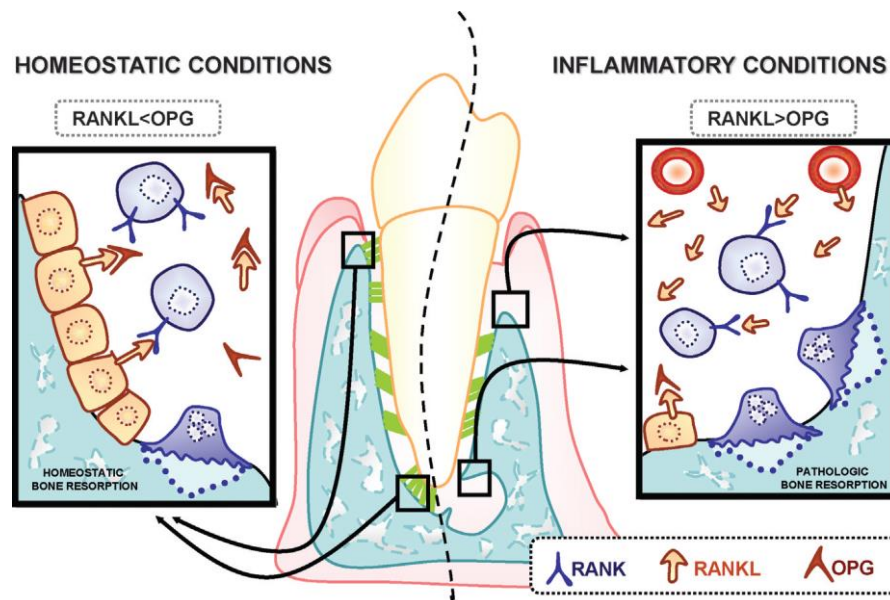
mm sampai 3 mm. Destruksi tulang membentuk *curved*, terdapat BOP positif, supuratif, *probing depth* ≥ 7 mm dimana nilai ini 2x lebih besar daripada periodontitis biasa. Sejumlah besar plasma sel, makrofag dan neutrophil ditemukan pada struktur vaskuler baik diluar maupun didalam sel. Secara imunohistokimia tampak sitokin IL-1 α yang mendominasi saat dilakukan biopsi. (Carranza, 2012)

Signal *toll-like reseptor* (TLR) merupakan jalur memulai sinyal kompleks *lipopolysaccharide* (LPS) yang melibatkan TLR4. Ikatan LPS dengan TLR-4 akan memicu MyD88 dan merekrut IRAK dan TRAF6. yang mengaktifasi NF κ B dan c-Fos, yang disebut belakangan berdimerisasi dengan c-Jun dan membentuk kompleks AP-1 dan mengeluarkan banyak sitokin pro- inflamasi dan gen kemokin dan mengaktifkan faktor transkripsi. Sitokin yang dikeluarkan TNF- α , IL-1 dan IL-6 dan MMP-8. MMP-8 disebut juga enzim kolagenase yaitu enzim yang dapat memecah kolagen pada peristiwa remodeling jaringan. Enzim MMP-8 ini dihasilkan oleh bakteri penyebab kelainan periodontal yang berpotensi merusak jaringan penyangga gigi dengan cara merusak COL-I. Penelitian pada hewan coba dengan pemberian LPS bakteri *A. actinomycetemcomitans per oral* dapat menyebabkan kehilangan tulang alveolar dan produksi sitokin inflamatori selama 8 minggu (Rogers *et al.*, 2007 *cit* Intini *et al.*, 2014).

Resorpsi tulang periodontal diperantai oleh infiltrasi sel imun dalam jaringan periodontal gingiva. Makrofag yang distimulasi oleh LPS menyebabkan TNF- α , IL-1 dan IL-6 menginduksi ekspresi RANKL pada osteoblas. IL-1 dan TNF merangsang pembentukan sel-sel osteoklas. IL-1 menstimulasi osteoklastogenesis dan resorpsi tulang, terutama melalui regulasi reseptor aktivator untuk *nuclear factor-kB* (RANK) ligan, sedangkan TNF- α bisa merangsang osteoklastogenesis

langsung atau tidak langsung melalui RANKL. RANKL mengikat RANK yang diekspresikan pada progenitor *hematopoietic* osteoklas dan mengaktifkan sinyal transduksi yang menyebabkan osteoklastogenesis. OPG yang dihasilkan oleh osteoblas adalah reseptor umpan untuk RANKL yang menghambat ikatan RANKL-RANK (Graves *et al.*, 2011; Carranza *et al.*, 2012).

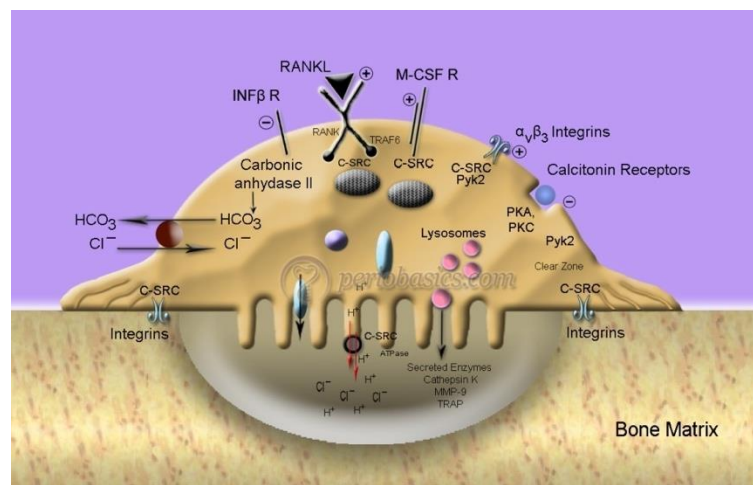
Selama fase resorpsi osteoklas melepaskan mineral dan komponen organik dari matriks tulang. Ciri dari adanya permukaan yang resorpsi adalah *scalloped erosion*, disebut *Howship's* atau lakuna. Fase resorpsi berlangsung sekitar 8-10 hari, diasumsikan sesuai dengan masa hidup osteoklas. Setelah sebagian besar mineral dan matriks organik telah hilang, ada fase interval yang berlangsung 7-14 hari, menandai transisi dari resorpsi menuju perbaikan. Setelah selesai resorpsi satu lacuna, osteoklas bergerak sepanjang permukaan tulang dan bekerja melakukan resorpsi kembali atau mengalami apoptosis (Hienz *et al.*, 2015).



Gambar 2.3 Kondisi Homeostatis dan inflamasi terjadinya resorpsi tulang pada jaringan periodontal (Graves *et al.*, 2011).

Sel stroma mengeluarkan *macrophage-colonystimulating factor* (M-CSF) sebagai tanda mulainya proses resorpsi tulang. M-CSF akan berikatan dengan c-Fms yang terdapat pada permukaan prekursor osteoklas. Proses ini akan merangsang proliferasi dan diferensiasi hematopoetik menjadi pre-osteoklas yang kemudian mengekspresikan RANK. Mekanisme aksi dari M-CSF dengan meningkatkan regulasi RANK dan menurunkan ekspresi OPG pada sel progenitor osteoklas sehingga osteoklas menjadi aktif.

Keseimbangan RANKL/OPG merupakan faktor penting dalam meregulasi resorpsi tulang di jaringan periodontal. Osteoklas menjadi aktif dan berdiferensiasi karena interaksi RANK dengan ligannya RANKL. OPG merupakan reseptor umpan dari RANKL yang memiliki fungsi menghambat ikatan RANK-RANKL. Pada keadaan homeostatis kadar RANKL dan OPG seimbang sehingga proses osteogenesis dan resorpsi tulang sangat kecil. Jika ada inflamasi kadar rasio RANKL/OPG meningkat pada jaringan periodontal dan menyebabkan osteoklas menjadi aktif dan terjadi resorpsi tulang (Graves *et al.*, 2011).



Gambar 2. 4 Skema aktivitas osteoklas pada proses terjadinya resorpsi tulang (Baron dan Horne, 2005)

Kemampuan dalam adhesi dan migrasi sel osteoklas tergantung dari reseptor dan regulasi sitoskeleton, terutama kecepatannya dalam merusak protein sitoskeleton pada daerah adhesi (podosomes). Sekresi tergantung dari transpor pembuluh darah, transpor vesikel dari endoplastik retikulum ke badan golgi dan dari badan golgi ke pola sekresi dari sel seperti *ruffled border* (Baron dan Horne, 2005).

Pada penyakit periodontal, bakteri dan faktor *host-derived* terlibat dalam proses resorpsi tulang alveolar dan remodeling. Bahan modulator memainkan peran yang sangat kompleks, dan beberapa jenis sel sering terlibat. Sulit untuk memastikan siapa yang berperan dari sitokin atau *growth factor* secara *in vitro* dan *in vivo*, karena beberapa faktor lokal sering memodifikasi dalam penelitian *in vivo*.

2.2.4 Mekanisme reparasi dan regenerasi tulang alveolar

Perbaikan atau penyembuhan biasanya terjadi dengan cepat dan menghasilkan jaringan sikatrik (*fibrous*) yang mengisi celah. Jaringan yang terbentuk biasanya tidak berfungsi maksimal, sehingga jika ada beban fungsi dari jaringan ikat tersebut tidak optimal. Regenerasi periodontal dapat didefinisikan sebagai restorasi menyeluruh dari jaringan yang hilang atau rusak menjadi bentuk dan berfungsi seperti aslinya. Regenerasi periodontal tergantung empat komponen dasar yaitu signal sel, suplai pembuluh darah yang memadai, *scaffold*, dan sel yang menyediakan bahan untuk pertumbuhan jaringan baru atau sel-sel baru (Lin *et al.*, 2008).

Salah satu indikator penting pada regenerasi tulang adalah pembentukan sel osteoblas pada tulang. Faktor yang mempengaruhi aktivitas dari sel tulang adalah

sirkulasi hormon (*parathyroid hormone* dan estrogen), sitokin dan *growth factors* dan beban mekanik. Pembentukan mineral tulang membutuhkan kalsium dan penting untuk pengaturan proses fisiologik dan biokimia. Kalsium diperlukan untuk memaksimalkan puncak massa tulang dan mempertahankan kepadatan tulang yang normal. Hormon yang mengatur keseimbangan kalsium darah, yaitu hormon paratiroid, vitamin D dan kalsitonin. Hormon paratiroid (PTH) dan hormon *paratiroid related* (PTHrP) merupakan polipeptida yang dapat mengikat dan mengaktifkan *reseptor G-coupled* (PTH-R1). PTH disekresikan oleh kelenjar paratiroid, sedangkan PTHrP disekresikan beberapa jaringan tulang, ginjal dan usus (Deschaseaux *et al.*, 2009).

Tingginya kadar PTH akan meningkatkan kadar kalsium dalam darah yang akan berpengaruh pada aktivitas osteoklas untuk meresorpsi tulang. Kadar kalsium yang tinggi akan di absorpsi oleh usus dengan mengekspresikan vitamin D oleh PTH. Hormon PTH ini melakukan fungsinya dengan cara mengurangi ekskresi kalsium dari ginjal sehingga meningkatkan kadar kalsium dalam cairan ekstraseluler, dan meningkatkan absorpsi kalsium oleh usus. Ikatan reseptor osteoblas dengan PTH menginduksi ekspresi RANKL, yang akan merangsang osteoklastogenesis, resorpsi tulang dan pelepasan kalsium (Chau *et al.*, 2009).

Proses diferensiasi osteoblas merupakan salah satu faktor penting dalam proses remodeling tulang. Proses proliferasi dan diferensiasi osteoblas diatur oleh *growth factor* yang dihasilkan oleh osteoblas. *Growth factor* yang berperan diantaranya *insulin-like growth factor* (IGF I dan II), *bone morphogenic proteins* (BMPs), *fibroblast growth factor* (FGF), dan *platelet-derived growth factor* (PDGF) yang bekerja secara autokrin dan parakrin (Robling *et al.*, 2006).

Proses perbaikan dapat dibagi menjadi tiga tahap yaitu inflamasi, reparatif, dan remodeling.

1. Fase inflamasi

Fase inflamasi ditandai adanya hematoma karena terputusnya pembuluh darah pada daerah periosteum dan terjadi dalam waktu 24-48 jam. Kerusakan vaskuler endotelial menghasilkan infiltrasi dari neutrofil, limfosit, monosit, makrofag, osteoklas dan sel *undifferentiation*. Sel-sel tersebut mengekspresikan *growth factor* dan sitokin. *Growth factor* akan merekrut sel fibroblas, *mesenchymal cells* dan sel osteoprogenitor menuju ke arah injuri. Sel osteoklas mulai melakukan absorpsi tulang yang nekrotik. Fase inflamasi ini akan mengaktifkan mekanisme seluler yang dibutuhkan untuk fase reparatif. Hematoma akan berubah menjadi jaringan fibrous menyebabkan fragmen tulang saling menempel membentuk *soft callus* dan terjadi proses angiogenesis.

2. Fase reparatif

Fase reparatif terjadi dalam 2 hari sampai 2 minggu. Selama fase ini terjadi proliferasi sel fibroblas, kondroblas dan osteoblas. Proses ini ditandai dengan pembentukan *soft callus*. *Soft callus* akan digantikan oleh jaringan fibrous. Pembentukan *callus* mulai mengalami penulangan dalam pertengahan minggu ke-dua melalui proses penulangan endokondral. *Woven bone* akan membentuk kalus primer dan secara perlahan-lahan diubah menjadi tulang yang lebih matang oleh aktivitas osteoblas. Pada pemeriksaan radiologis *woven bone* sudah terlihat dan merupakan indikasi radiologik pertama terjadinya proses remodeling.

3. Fase remodeling

Fase remodeling merupakan fase akhir dari kerusakan tulang dan dimulai dari penggantian *woven bone* menjadi lamelar *bone* dan resorpsi dari *callus*. Fase ini ada keseimbangan antara resorpsi tulang dan pembentukan tulang baru. Remodeling tulang dimulai dengan adanya sinyal dari osteoblas sehingga terjadi perekrutan sel-sel prekursor osteoklas. Sel-sel ini berdiferensiasi menjadi osteoklas. Osteoklas yang matang kemudian mensintesis enzim proteolitik yang mencerna matriks kolagen, dimana fase resorpsi ini terjadi 8-10 hari. Fase dari proses aktivitas osteoklas beralih ke aktivitas osteoblas itu disebut fase reversal yang memakan waktu 7-14 hari. Kemudian siklus remodeling menarik preosteoblas dari *bone marrow* dan terbentuk osteoblas matur yang mensintesis matriks tulang, terutama COL-I dan mengatur mineralisasi tulang. Proses remodeling tulang terjadi dalam jangka waktu 3 bulan (Sfeir *et al.*, 2005; Hienz *et al.*, 2015).

Peranan *growth factor* dalam perbaikan dan regenerasi tulang:

1. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) berfungsi sebagai *chemoattractant* yang poten bagi makrofag, meningkatkan angiogenesis, menyebabkan diferensiasi MSCs menjadi kondroblas dan osteoblas, meregulasi kalsifikasi cartilago dan mengaktifkan osteoblas, meningkatkan produksi kolagen tipe I, II, III, IV, VI dan X, *fibronectin*, *osteopontin*, *osteonectin*, *proteoglycans* dan *alkaline phosphatase*.
2. *Fibroblast Growth Factor-1* (FGF-1) berfungsi pembentukan pembuluh darah dan peningkatan kolagen tipe IV

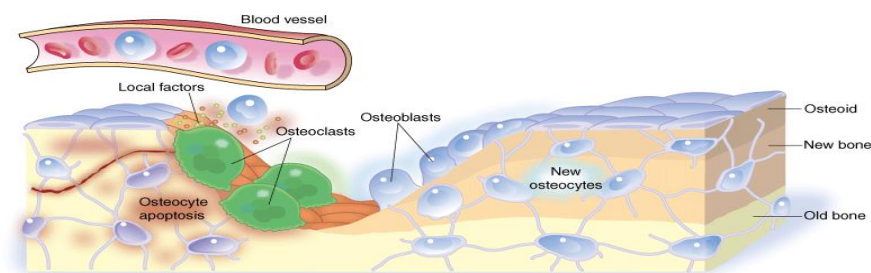
3. *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2) berfungsi pembentukan pembuluh darah dan peningkatan kolagen tipe IV, *chemoattractant* dan mitogen untuk kondrosit dan mengatur diferensiasi pertumbuhan kondrosit
4. *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) berfungsi menstimulasi MSCs berproliferasi, pembentukan cartilago dan intramembran dan pembentukan callus, mitogen yang poten untuk jaringan ikat, menstimulasi sel DNA tulang dan sintesis protein dan meningkatkan resorpsi melalui sintesis prostaglandin
5. *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1) berfungsi meningkatkan sintesis kolagen dan menurunkan degradasi kolagen, menstimulasi replika sel preosteoblas
6. *Insulin-like Growth Factor-2* (IGF-2) berfungsi meningkatkan sintesis kolagen dan menurunkan degradasi kolagen, meningkatkan proliferasi sel prekursor osteoblas selama resorpsi, memodulasi sel osteoklas dalam remodeling tulang.
7. *Bone Morphogenic Protein* (BMP-2, BMP-4, BMP-7) berfungsi BMP-2 meningkatkan ekspresi IGF-1 dan IGF-2 pada osteoblas tikus, BMP-2 meningkatkan ekspresi TGF- β dan IL-6, BMP-4 berikatan dengan kolagen tipe IV, tipe I dan heparin dan berperan dalam angiogenesis pada penyembuhan tulang yang fraktur. BMP-7 meningkatkan ekspresi *Osf2/Cbfa1*, faktor transkripsi yang berhubungan dengan diferensiasi osteoblas dan meningkatkan ekspresi reseptor IGF-II (Sfeir *et al.*, 2005).

Ketidakeimbangan antara resorpsi dan pembentukan tulang pada proses remodeling tulang dapat mengakibatkan kepadatan tulang berkurang sehingga dapat menimbulkan penyakit metabolik tulang. Berkurangnya kepadatan sel tulang

dapat diakibatkan oleh berkurangnya jumlah osteosit atau kurangnya kadar mineral, namun keduanya dapat mengakibatkan kerapuhan tulang (Robling *et al.*, 2006).

Kepadatan mineral tulang (*Bone Mineral Density*, BMD) dihitung sebagai massa per volume. Hal ini diukur dengan prosedur yang disebut densitometri, sering dilakukan dalam radiologi. Kekuatan tulang ditentukan oleh kualitas dan kuantitas tulang. Kuantitas yaitu kepadatan tulang sedangkan kualitas yaitu ukuran (massa) tulang, kandungan mineral dan mikroarsitektur tulang. Histomorfometri tulang merupakan pengukuran untuk menilai sel dan struktur dari tulang secara histologis (Allen dan Burr, 2013).

Beberapa studi menunjukkan bahwa periosteum memiliki sel osteogenik dalam lapisan kambiumnya. Studi graf tulang menunjukkan bahwa ekspansi populasi sel progenitor sebagian besar dari periosteum untuk pembentukan tulang rawan dan tulang dalam kalus (Intini *et al.*, 2014).



Gambar 2.5 Pembentukan dan resorpsi tulang (Schorge, *et. al.*, 2018)

Resorpsi tulang adalah tugas osteoklas, sedangkan pembentukan tulang baru merupakan tugas osteoblas. Resorpsi dan pembentukan tulang tidak dapat dibedakan dan bukan merupakan proses yang terpisah. Osteoklas yang menempel pada tulang akan meresorpsi dengan cara pengasaman dan proteolitik. Setelah itu,

osteoklas akan meninggalkan tempat resorpsinya dan osteoblas akan datang ke tempat tersebut untuk membentuk dan mensekresi osteoid.

2.2.5 Osteoblastogenesis

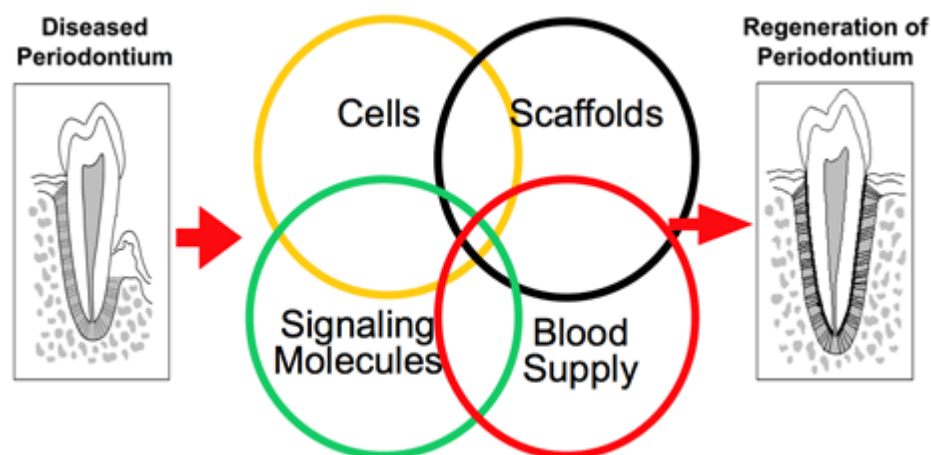
Faktor yang dapat menginisiasi osteoblastogenesis dari progenitor adalah *bone morphogenetic protein* (BMP) terutama BMP-2. BMP akan meregulasi *Core binding factor a1* (Cbfa1) / *Runt-related transcription factor* (Runx2) yang berperan untuk membentuk *lineage* osteogenik secara spesifik, Runx2 ini akan menghambat diferensiasi MSC menjadi sel yang lain kecuali osteoblas (Chen, Deng, & Li, 2012). Runx2 merupakan faktor transkripsi *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) penting dalam menentukan jalur spesifik osteogenik. Runx2 akan mengaktifkan gen spesifik pada osteoblas seperti *osteopontin*, *bone sialoprotein*, kolagen tipe 1 dan *ostecalcin* (Manolagas, 2010).

Runx-2 dimodulasi oleh TGF- β 1 dan *Bone Morphogenetic Protein* (BMP)-2. Pada tahap awal diferensiasi osteoblastik (diferensiasi MSC ke sel osteoprogenitor), Runx2 menghambat diferensiasi MSC menjadi jenis selain sel osteoblas. Pada tahap kedua dari diferensiasi sel osteoprogenitor ke osteoblas, TGF- β 1 menginduksi ekspresi Runx2 untuk meningkatkan diferensiasi. Namun, pada tahap akhir diferensiasi osteoblas (osteoblas matang), TGF- β 1 menghambat BMP-2, mengaktifkan *Mother against decapentaplegic homolog* (Smad) 3 yang akan berinteraksi dengan Runx2 sehingga menekan ekspresi Runx2. Runx2 menghambat diferensiasi sehingga osteoblas matang menjadi osteosit, dan mempertahankan mereka dalam fase istirahat. Dengan demikian, TGF- β 1 dapat meningkatkan pembentukan osteosit melalui regulasi Runx2 dalam osteoblastamatang (Manolagas, 2010).

Osteoblas akan melakukan mineralisasi dengan memproduksi dan mensekresi matrix tulang. Produk protein utama yang dibentuk adalah kolagen tipe 1. Protein lainnya adalah *osteocalcin* dan beberapa protein minor lainnya seperti *osteopontin*, *sialoprotein*, *fibronectin* dan *vitronectin* (Manolagas, 2010). Proses mineralisasi ini dimulai 30 hari setelah terjadi resorpsi tulang dan berakhir hingga 90 hari pada tulang trabekular dan 130 hari pada tulang kortikal (Kini & Nandeesh, 2012).

2.3 *Tissue Engineering*

Tissue engineering merupakan teknik regenerasi jaringan periodontal yang hilang sudah diperkenalkan oleh Langer dan teman-temannya tahun 1993. *Tissue engineering* adalah ilmu interdisipliner yang menerapkan prinsip-prinsip, metode teknik dan ilmu-ilmu kehidupan ke arah pengembangan pengganti biologis untuk memulihkan, mempertahankan, dan meningkatkan fungsi jaringan organ yang rusak. Tujuan dari *tissue engineering* adalah untuk meningkatkan penyembuhan, dan idealnya dapat terjadi regenerasi dengan struktur dan fungsi yang sama dengan aslinya (Pandit *et al.*, 2011).



Gambar 2.6 Area *tissue engineering* dalam regenerasi jaringan periodontal (Varma *et al.*, 2012)

Keberhasilan perawatan *tissue engineering* pada periodontal berdasarkan faktor-faktor adanya pasokan yang cukup dari sel progenitor dengan kemampuannya dalam berdiferensiasi menjadi osteoblas, sementoblas dan fibroblas, adanya sinyal yang memodulasi diferensiasi selular dan neogenesis jaringan dan adanya *scaffold* 3-dimensi yang mendukung dan memfasilitasi proses ini. Sinyal angiogenesis meningkatkan jaringan vaskuler yang baru yang penting sebagai nutrisi untuk pertumbuhan jaringan dan homeostatis (Han *et al.*, 2014).

Tissue engineering terdiri dari empat komponen yaitu sel/progenitor, sinyal molekul dan *scaffold* atau ekstraselular matrik (ECM) dan pembuluh darah. Sumber sel/progenitor merupakan parameter penting untuk mempertimbangkan teknik *tissue engineering* untuk mengembalikan fungsi jaringan yang hilang. MSCs dianggap kandidat yang cocok untuk strategi teknik *tissue engineering* berbasis sel karena MSCs berpotensi untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel-sel beberapa organ (Han *et al.*, 2014).

Sinyal molekul merupakan protein yang bekerja secara lokal atau sistemik dan mempengaruhi pertumbuhan sel-sel. Sinyal molekul bisa *growth factor* atau sitokin dalam ECM seperti BMP, FGF-2, IL-6, IGF, PDGF, dan TGF- β . Beberapa studi dilaporkan peranan ECM pada proliferasi sel, diferensiasi, migrasi dan apoptosis melalui interaksi dengan sel dan reseptor sel (Patil *et al.*, 2013).

2.3.1 *Stem Cell*

Stem cells adalah sel imatur yang belum terdiferensiasi dan mempunyai kemampuan membelah secara asimetrik, yaitu pembelahan dengan dua hasil yang

berbeda. Hasil pertama merupakan sel yang sama dengan induknya yang belum mengalami diferensiasi (*self renewal*) dan hasil kedua yaitu sel yang telah mengalami diferensiasi. (Bongso & Lee, 2005).

Mesenchymal Stem Cells (MSCs) memiliki potensi memperbaiki beberapa macam penyakit periodontal. MSCs memiliki dua karakteristik penting yaitu *self-renewal* dan *potential differentiation*. *Self renewal* disini memiliki kemampuan untuk memperbaiki dirinya sendiri melalui cara bermitosis, sedangkan *potential differentiation* berarti stem cell mampu berdiferensiasi menjadi phenotype yang berbeda, sehingga dengan kedua karakteristik ini maka *stem cell* dapat berproliferasi dan meregenerasi jaringan. Berdasarkan metode regenerasinya dibagi menjadi 1.) *embryonic stem cells*, 2.) *post-natal stem cells*, 3.) *reprogrammed stem cells*. *Embryonic stem cells* memiliki sifat *pluripotent* dan berasal dari *inner cell mass* dari *blastocyst* yang memiliki kemampuan untuk terapi regenerasi. *Embryonic stem cells* ini juga memiliki kekurangan yaitu dapat menimbulkan tumor dan reaksi imunogenitas, sehingga secara etik tidak disarankan. (Jung, 2009; Lu *et al.*, 2009). *Post-natal stem cells* secara etik tidak dipermasalahkan, karena sel ini didapatkan dari isolasi berbagai macam sumber jaringan diantaranya *bone marrow*, *epithelium*, *adipose tissue*, *liver*, *nervous system*, gigi dan *periodontal ligament* (Barker, 2014, Bassir, 2016). Sifat dari *post natal stem cells* ini adalah multipoten dan memiliki potensi keterbatasan untuk berdiferensiasi sehingga lebih aman dibandingkan *embryonic stem cells*. (Wang *et al.*, 2011)

Stem cell yang mempunyai sifat *self renewal* dan plastisitas yang dapat berdiferensiasi serta memperbanyak diri menjadi berbagai macam sel untuk membentuk individu, dapat dieksplorasi dari embrional maupun dari individu

dewasa (*adult stem cell*) yang sudah terlahir (Rantam, Ferdiansyah & Purwati, 2014).

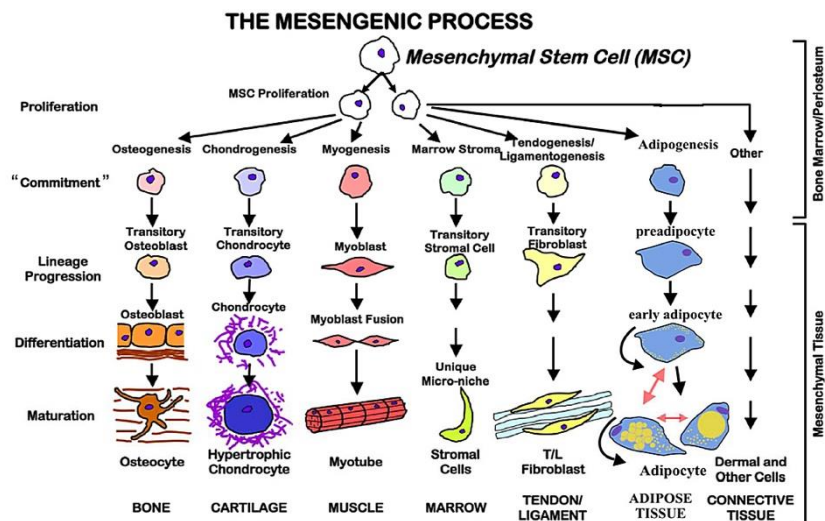
Stem cells merupakan sel dari embrio, fetus, atau sel dewasa yang berkemampuan untuk memperbanyak diri sendiri dalam jangka waktu yang lama, belum memiliki fungsi spesifik, dan mampu berdiferensiasi menjadi tipe sel tertentu yang membangun sistem jaringan dan organ dalam tubuh (Rantam *et al.*, 2014).

Stem cell mempunyai sifat *self-renewal* yaitu dapat memperbaharui diri dan *multilineage differentiation* yaitu berdiferensiasi terus menerus. *Stem cells* dewasa juga dapat berdiferensiasi menjadi jaringan lain mempunyai sifat plastisitas, artinya selain berdiferensiasi menjadi sel yang sesuai jaringan asalnya oleh karena itu penggunaan *stem cells* dewasa tidak kontroversial karena produksinya tidak membutuhkan destruksi embrio.

Suatu sel bisa dikatakan *stem cells* jika belum berdiferensiasi (*undifferentiated*) mampu memperbanyak diri sendiri (*self renewal*) dan dapat berdiferensiasi menjadi > 1 jenis sel (multipoten/pluripoten). *Stem cells* merupakan sel yang belum memiliki bentuk dan fungsi spesifik layaknya sel lainnya pada organ tubuh. *Stem cells* dapat melakukan replika dan menghasilkan sel-sel berkarakteristik sama dengan induknya. Kemampuan memperbanyak diri dan menghasilkan sel-sel yang sama seperti sel induknya ini tidak dimiliki oleh sel tubuh lain. Kemampuan *stem cells* berdiferensiasi dinilai lebih istimewa dibanding sel lain yang lebih matur, karena *stem cells* mampu berdiferensiasi menjadi > 1 jenis sel tubuh. Hal ini berarti *stem cell* bersifat multipoten atau pluripoten. *Stem cells* bersifat pluripoten bila mampu berdiferensiasi menjadi sel tubuh apapun yang

berasal dari lapisan embrional yaitu ektoderm, mesoderm dan endoderm dan bersifat multipoten yang hanya mampu berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel (Halim *et al.*, 2010).

Kriteria minimal karakteristik dari MSCs ada 3 berdasarkan *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. Pertama, pada saat dikultur sel MSCs melekat pada flask, membentuk *single cell colony*, kriteria kedua MSCs harus mengekspresikan antara lain CD105, CD73, CD90 dan tidak mengekspresikan CD45, CD34, CD14, CD79, CD 11a dan CD-19 atau MHC class II antigen. Kriteria ketiga MSCs dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, adiposa dan kondroblas secara *in vitro*. Sumber MSCs selain di *bone marrow* juga ada di jaringan lemak, plasenta, pulpa gigi, ligamen periodontal, endometrium, *umbilical cord*, *umbilical cord blood* dan *peripheral blood* (Feng-Juan., *et al.*, 2014)



Gambar 2.7 Mesengensis: Stem cell multipoten pada *adult bone marrow* dan dapat berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk sel khusus (Caplan dan Dennis, 2006)

MSCs yang diberikan secara *exogenous* pada manusia dan hewan, akan selalu bermigrasi ke jaringan yang rusak yang mengalami inflamasi. MSCs ini mengeluarkan sitokin dan *growth factor* yang bekerja melalui efek parakrin dan autokrin yang akan merangsang MSCs *endogenous* menjadi aktif. MSCs akan migrasi ke daerah inflamasi atau daerah target dengan melalui endotel pembuluh darah (*homing*) selanjutnya berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi matang. Sitokin dan kemokin faktor penting dalam proses migrasi dan *homing*. Sel MSCs mengekspresikan reseptor kemotaktik seperti CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5 dan CXCR6. Kemokin spesifik seperti SDF-1 penting untuk lokalisasi dan *homing* MSCs. CXCR4 merupakan reseptor dari SDF-1 dan mengatur regulasi migrasi dari MSCs. Sitokin yang berperan dalam migrasi adalah PDGF (*platelet derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), IGF (*insulin growth factor*), TGF (*transforming growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*)

Kemampuan *homing* selain untuk transmigrasi ke daerah luka juga memiliki kemampuan untuk merekrut sel progenitor di sekitar daerah luka. Tetapi mekanisme bagaimana MSCs merekrut sel progenitor masih belum banyak diketahui (Sohni dan Verfaillie, 2013; Rantam *et al.*, 2014).

2.3.2 Human Umbilical Stem Cell (hUCMSCs)

Sumber sel yang ideal untuk rekayasa jaringan harus memenuhi syarat dimana untuk mendapatkan bahannya mudah didapat, jumlah sel yang dihasilkan mencukupi dan kemampuan imunokompatibilitas dari sel tersebut. BM-MSc memiliki keterbatasan yaitu kemampuan diferensiasi yang terbatas. *Embryonal stem cell* (ESC) secara teori memiliki sel yang belum terdiferensiasi dalam jumlah

yang tak terbatas, namun masalah etik dan kemungkinan pembentukan teratoma saat transplantasi serta rejeksi sel imun menjadi kekurangan dari sel ini. Salah satu sumber *mesenchymal stem cell* (MSCs) selain *bone marrow* (BM-MSCs) adalah *human umbilical cord mesenchymal stem cell* (hUC-MSCs) yang berasal dari jaringan tali pusat yang mengelilingi pembuluh darah. Sumber hUC-MSCs ini menjadi pilihan dibandingkan BM-MSCs karena proses pengambilan MSCs dari *bone marrow* yang sangat kompleks, menimbulkan nyeri dan invasif (Ding *et al*, 2015). Keunggulan hUC-MSCs selain mudah didapatkan, jumlahnya banyak, mudah diperbanyak dengan cepat (Wang *et al*, 2011) dan memiliki imunokompatibilitas yang baik, sumber stem cell ini merupakan limbah biologis yang dibuang atau tidak terpakai sehingga tidak menimbulkan masalah etik (Lindenmair *et al*, 2012; Qin *et al*, 2016). Bila dibandingkan dengan BM-MSCs, hUC-MSCs memiliki sel yang lebih primitif sehingga memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel yang berbeda, bersifat multipoten, non hematopoetik, mempunyai kemampuan untuk memperbaiki diri dan berdiferensiasi menjadi sel yang lain seperti osteoblas, jaringan lemak dan kondroblas (Zarrabi *et al*, 2014).

2.3.3 Diferensiasi MSCs menjadi sel osteoblas

Penggunaan MSCs memiliki biokompatibilitas tinggi serta dapat dikombinasi dengan material *bone graft* lain sehingga dapat meminimalkan biaya perawatan (Gronthos *et al.*, 2000, Bassir *et al.*, 2016). Pemberian MSCs *allogenic* dapat memberikan efek terapi pada suatu inflamasi. Penelitian Eggenhofer *et al.*, 2014 menyatakan bahwa MSCs *exogenous* dapat merangsang MSCs *endogenous* untuk mengaktifkan sel progenitor melalui mekanisme parakrin. MSCs *exogenous* dapat menginduksi *stem cell* lain yang ada diberbagai organ tubuh untuk bergerak

berproliferasi menuju jaringan yang mengalami kerusakan dan meregenerasi tulang alveolar yang rusak (Halim *et al.*, 2010; Kawai *et al.*, 2013)

Penelitian baru-baru ini menunjukkan efek parakrin dari MSCs yang mampu mensekresi faktor penting dalam perbaikan dan regenerasi jaringan setelah terapi *stem cell*. Peran MSCs *secretome* untuk penyembuhan jaringan dengan menginduksi mediator inflamasi seperti *interleukin-1* (IL-1), IL-6, *Prostaglandin E2* (PGE2) secara *in vitro* dan menurunkan reaksi awal inflamasi pada *in vivo* dengan memodulasi sitokin proinflamatori yaitu menghambat *tumor nuclear factor- α* (TNF- α), *interferon γ* (IFN- γ), IL-1 dan meningkatkan sekresi anti-inflamatori yaitu IL-10 dan IL-4. Interleukin-10 memediasi MSCs untuk meregulasi aktivasi dan diferensiasi sel-T (Vizoso *et al.*, 2017; Lin & Du, 2018)

Regulasi proliferasi dan diferensiasi melalui signal *pathway* osteogenic. Diferensiasi osteoblas dimulai dari sel osteoprogenitor MSCs menjadi matang dengan mengekspresikan gen osteoblas secara fenotif. Proses diferensiasi ini di kontrol oleh *growth factor* atau sitokin, dimana IGF sebagai pemicu dari sel osteoblas untuk berproliferasi, meningkatkan ekspresi OSX dan meningkatkan massa tulang secara *in vivo*. TGF- β menstimulasi produksi ECM, memproduksi matrik tulang osteoblas dan meningkatkan RUNX-2 secara *in vivo*. BMP-2 meningkatkan ekspresi RUNX-2 pada osteoprogenitor dan sel osteoblas dan mengekspresikan OSX pada sel osteoblas. VEGF yang bertugas meregulasi vaskularisasi dan perkembangan tulang. PDGF sebagai *chemoattractant* untuk sel target seperti osteoblas (Papachroni *et al.*, 2009; Chau *et al.*, 2009).

Tahapan pembentukan osteoblas dari *bipoten mesenchymal stem cell*, *tripoten mesenchymal stem cell*, *committed osteoprogenitor cell*, preosteoblas, osteoblas dan osteosit. MSCs akan berdiferensiasi menjadi adiposit, kondrosit dan osteosit pada tahap *bipoten mesenchymal stem cell* dan *tripoten mesenchymal stem cell*, ciri fenotif yang nampak antara lain *renewing-cell*, ekspresi STRO-1, AP-1 (activator protein-1), dan kolagen tipe I, III, V. Diferensiasi osteogenik dan adipogenik dari MSCs karena adanya sinyal kaskade sebagai faktor transkripsi yaitu PPAR γ dan RUNX-2. PPAR γ umumnya mengatur adipogenesis dan memiliki efek anti-osteoblastogenic. Demikian juga, Runx2 dan *Osterix* dianggap sebagai regulator osteogenesis. Faktor transkripsi PPAR γ dan Runx2 bertanggung jawab untuk memediasi efek dari berbagai sitokin dalam diferensiasi MSCs menjadi adipogenik dibanding osteogenik. Biasanya, meningkatnya ekspresi salah satu faktor transkripsi berhubungan dengan penurunan regulasi dari yang lain. Diferensiasi MSCs menjadi mioblas dikontrol oleh ekspresi MyoD, diferensiasi MSCs menjadi kondrosit dikontrol oleh Sox9. Runx2 dan *Osterix* keduanya dibutuhkan dalam diferensiasi osteoblas untuk membentuk kalsifikasi tulang secara *in vivo* (Hughes *et al.*, 2006; Chau *et al.*, 2009).

Tahap *committed osteoprogenitor cell*, gen MSX-2 menstimulasi peningkatan ekspresi faktor transkripsi Runx2. MSX-2 bersama dengan Runx2 mengatur transkripsi *osteocalcin* yang dibutuhkan untuk proses mineralisasi tulang. Sel osteoprogenitor berdiferensiasi menjadi sel pre osteoblas karena faktor transkripsi Runx2 dengan bantuan MSX-2. Pada tahap akhir TGF- β menghentikan diferensiasi dan mineralisasi dari osteoblas dengan menghambat gen Runx2 sehingga sel tidak terus berproliferasi. Pada tahap akhir ciri fenotif dari tulang yang

nampak adalah ALP, BSP, kolagen tipe I, PTH-related protein *osteopontin* dan *osteocalcin* (Hughes *et al.*, 2006; Isaka dan Kobayashi, 2008; Tatsuya *et al.*, 2010).

2.3.4 Scaffold

Scaffold merupakan suatu struktur tiga dimensi yang digunakan sebagai media penyangga sementara untuk mendukung proses pertumbuhan dan perkembangan jaringan tulang baru. Adanya interaksi dengan tubuh menuntut *scaffold* memiliki karakteristik biokompatibel sehingga tidak menimbulkan respon penolakan oleh tubuh. Sifat lain yang harus dimiliki oleh *scaffold* adalah porus. Pori-pori yang terdapat pada *scaffold* berfungsi sebagai penyedia ruang bagi sel untuk menempel dan tumbuh menjadi suatu jaringan tulang baru (Laurencin, 2008)

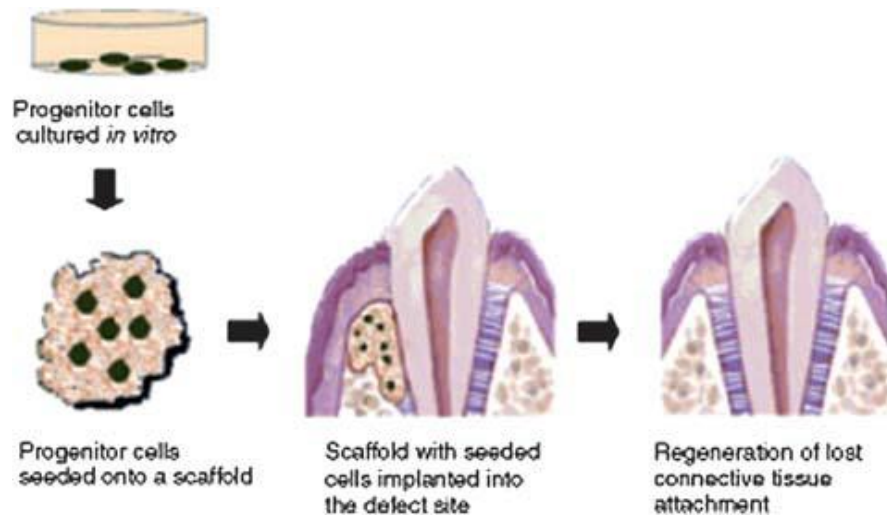


Gambar 2.8 (A) HA-TCP masih berbentuk bubuk (B) HA-TCP sudah berbentuk *scaffold* silinder ϕ 1 mm x 2mm

Scaffold bertindak sebagai matrik sementara yang digunakan untuk menginduksi pembentukan jaringan yang diinginkan, menginduksi pertumbuhan sel di daerah sekitarnya dan sebagai pembawa untuk sel autogeneus. Idealnya *scaffold* memiliki sifat *biocompatible*, *biodegradable* dan *non toxic*. *Scaffold* dapat mendukung untuk terjadinya perlekatan, migrasi, proliferasi dan diferensiasi sel

serta sintesis dari matrik yang baru. *Scaffold* juga harus memiliki kekuatan mekanikal untuk menahan stres fisiologis dan melindungi terjadinya stres pada jaringan disekitar tulang. *Scaffold* harus memiliki pori yang saling terkoneksi dan terintegrasi, memiliki kemampuan dalam pembentukan pembuluh darah baru untuk pertumbuhan tulang. Sifat *scaffold* seperti ukuran pori, ukuran bentuk, ketebalan dinding pori, permukaan dinding pori, porositas, dan permukaan morfologi dapat mempengaruhi penyembuhan tulang (Patil *et al.*, 2013).

Scaffold dapat dikategorikan berdasarkan jenis bahan yang digunakan yaitu natural dan sintetis. Termasuk *scaffold* natural adalah kolagen, elastin, fibrin, alginat, sutra, glikosaminoglikan seperti hyaluronidase, dan chitosan. *Scaffold* natural memiliki kekuatan struktural yang tinggi, kompatibel dengan sel dan jaringan serta biodegradable. *Scaffold* sintetis terdiri dari asam poli laktat asam glikolat poli dan mereka kopolimer, poli asam laktat-co-glikolat. *Scaffold* sintetis di sisi lain memberikan keuntungan yang sangat baik dalam hal sifat kimia dan mekanik dan memiliki kontrol yang tinggi dalam karakteristik fisikokimia, seperti berat molekul, konfigurasi rantai polimer. Kekurangan dari *scaffold* sintetis dapat menjadi inflamasi akut dan kronis (Galler *et al.*, 2010).

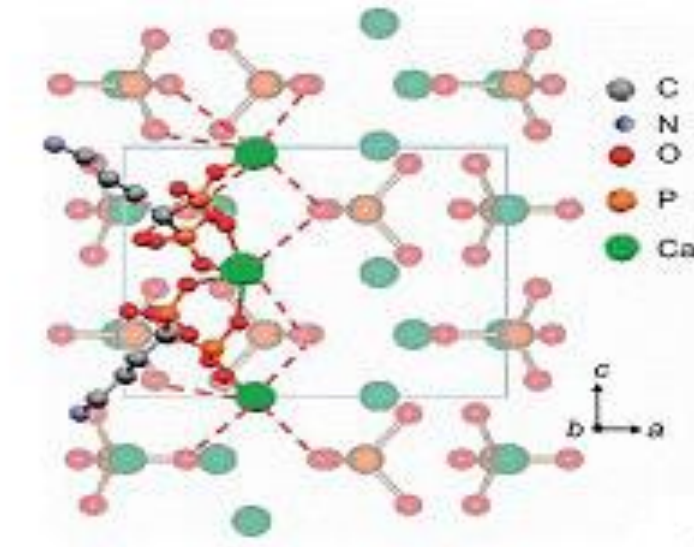


Gambar 2.9 Pendekatan *tissue engineering* untuk regenerasi jaringan periodontal menggunakan kombinasi *stem cells* dan *scaffold* (Galler *et al.*, 2010)

2.3.5 Hydroxyapatite

2.3.5.1 Struktur

Hydroxyapatite (HA) merupakan senyawa mineral apatit dengan rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ yang dibuat dengan rasio konsentrasi Ca/P 1,67. Pada struktur HAP terdapat dua bagian struktur yaitu heksagonal dan monoklinik. Struktur monoklinik dihasilkan dari susunan OH-, sedangkan struktur heksagonal dapat diperoleh pada kondisi stoikiometrik jika susunan OH- tidak teratur (Gambar 2.10) (Ningsih *et al.*, 2014).



Gambar 2.10 Struktur HA (Ningsih *et al.*, 2014)

Hidroksiapatit sintetik dapat diperoleh melalui pengolahan senyawa kalsium karbonat (CaCO_3). CaCO_3 merupakan jenis mineral yang bersifat stabil. CaCO_3 mempunyai sifat fisik yaitu terjadi dalam dua bentuk, kristal hexagonal yang disebut kalsit, dan bentuk orthorombik yang disebut *aragonite* (Pancawati, 2016). CaCO_3 berpotensi untuk meniru komposisi, struktur, dan sifat-sifat asli tulang. Selain itu, CaCO_3 memiliki sifat perlekatan yang berperan untuk pertumbuhan tulang baru serta Bersama platelet akan menurunkan proses inflamasi (Kamba & Zakaria, 2014; Nirmalasari *et al.*, 2016). CaCO_3 pada material *bone graft* dapat diperoleh dari bahan alam, salah satunya dari cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) (Harahap *et al.*, 2015).

Hidroksiapatit (HA) dengan rumus kimia $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ merupakan salah satu senyawa anorganik penyusun jaringan keras tubuh manusia seperti tulang dan gigi (Darwis & Warastuti, 2013; Zhang, 2013). HA juga menyumbang 60-70% dari fase mineral dalam tulang manusia. HA memiliki sifat yang biokompatibel,

osteokonduktif, dan tidak toksik sehingga banyak digunakan sebagai bahan material implan (Anjarsari *et al.*, 2016). HA juga memiliki sifat osteokonduktif karena HA mampu menginduksi serta menstimulasi sel-sel punca dan sel osteoblas untuk berproliferasi dan berdiferensiasi dalam pembentukan tulang baru atau proses regenerasi tulang (Ardhiyanto, 2011). Pada jaringan tulang, HA juga memiliki kemampuan mengurangi reaksi inflamasi dan menghasilkan respon imun pada area yang dilakukan pemasangan implan dengan penambahan bahan biomaterial (Ansari *et al.*, 2011). Selain itu HA berperan meningkatkan stimulasi FGF sehingga meningkatkan stimulasi sel fibroblas. Sel fibroblas tersebut bermigrasi ke area luka dan mulai mensintesis pembentukan kolagen pada proses *healing* (Milorio *et al.*, 2004; Pezzatini *et al.*, 2007).

Menurut Gayathri & Kamaraj (2011), HA memiliki kemampuan dalam menekan produksi sitokin pro inflamasi dari makrofag sehingga proses *healing* dapat berlangsung lebih cepat. Akan tetapi dibalik kelebihan yang dimiliki, HA juga cenderung bersifat *nonresorbable* dan *bioinert* (HA memiliki kekuatan mekanik yang baik namun sulit diserap secara biologis oleh tubuh). Oleh sebab itu, penggabungan HA dengan material lain sangat diperlukan, salah satunya dengan *tricalcium phosphate* (TCP) (Purwandiono *et al.*, 2018; Ivanova *et al.*, 2014)

HA menunjukkan sifat bioaktif, karena bersifat osteoinduktif, osteokonduktif dan osteogenesis, namun cenderung lambat atau tidak bias diresorpsi (Rujitanapanich, 2014). HA juga tidak menunjukkan toksisitas, respon peradangan, respon pirogenetik. Namun HA memiliki *tensile stress* yang relatif rendah (Wahl and Czernuszka, 2006). HA yang diberikan dalam bentuk tunggal tidak dapat diuraikan sehingga memberi efek negative terhadap jaringan sekitar lokasi

pemberian. Penambahan *β -tricalcium phosphate (β -TCP)* akan mampu menguraikan *hydroxyapatite* dan mengurangi efek negatif yang ditimbulkan (Mao *et al.*, 2013).

2.3.5.2 Tricalcium Phosphate

TCP merupakan bahan biomaterial yang memiliki kemampuan untuk berinteraksi dengan jaringan tubuh manusia dan memiliki sifat yang mirip dengan fase mineral tulang dibandingkan biomaterial lain seperti alumina, zirconia, dan HA (Adiani *et al.*, 2016). TCP merupakan senyawa kalsium fosfat berpori atau dikenal sebagai abu tulang [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)$] yang mudah diasimilasi dan diserap oleh tubuh (Sulaiman *et al.*, 2013).

TCP memiliki dua bentuk kristalografi, yaitu α -TCP dan β -TCP. Struktur kristal α -TCP bersifat monoklinik dan terdiri dari kolom kation, sedangkan β -TCP memiliki struktur *rhombohedral*. Bentuk α -TCP kurang stabil dibandingkan β -TCP sehingga β -TCP memiliki sifat biokompatibilitas dan osteoinduktivitas yang lebih baik, serta digunakan sebagai *filler resorbable* untuk pembentukan tulang baru. Kekurangan β -TCP adalah memiliki kekuatan mekanis yang lemah. Di dalam tubuh manusia, sifat *bioresorbable* dan *bioresorption* β -TCP terjadi melalui aktivitas osteoklastik (Nahar *et al.*, 2017). TCP berperan didalam mengatasi terjadinya penyakit periodontal, defek tulang alveolar dan augmentasi alveolar ridge pada dimensi vertical dan horizontal (Sheikh *et al.*, 2017; Jangid *et al.*, 2016). Selain itu TCP dapat meningkatkan osteopontin (OPN). OPN merupakan salah satu sitokin yang terakumulasi dalam jaringan kalsifikasi. OPN dikenal sebagai aktivitas awal limfosit serta terlibat dalam pembentukan dan aktivitas makrofag (Nanci, 2008;

Tian *et al.*, 2017). OPN berperan penting dalam perlekatan sel-sel tulang dengan matriks tulang, diperlukan untuk vaskularisasi yang efisien melalui sel-sel endothelial hemangiogenik, menginduksi sel osteoblas, dan berperan dalam maturase sel osteoblas selama proses pembentukan tulang dan mineralisasi jaringan (Hartono, 2013; Kusuyama *et al.*, 2017).

Bubuk TCP dapat disintesis melalui proses *solid state* dan proses netralisasi melalui proses kimia basah. Partikel yang dihasilkan dengan sifat fisik seperti luas permukaan, ukuran, kepadatan, dan porositas yang berbeda mempengaruhi sifat dan kinerja bubuk tersebut sehingga bubuk dapat digunakan dalam tujuan yang berbeda (Nahar *et al.*, 2017)

TCP mempunyai sifat resorbabilitas yang sangat tinggi sehingga TCP lebih cepat larut dalam sistem biologi. Gabungan HA dan TCP dikenal dengan *Biphasic Calcium Phosphate* (BCP), dimana gabungan HA dan TCP ini dapat mengatur laju degradasi yang tepat untuk pembentukan tulang baru (Anjarsari *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Pratama (2017) dan Resaldi (2018) menyatakan bahwa senyawa kalsium karbonat CaCO_3 , hidroksiapatit (HA) dan *tricalcium phosphate* (TCP) berhasil disintesis dari *Anadara Granosa* dengan menggunakan metode hidrotermal. Metode hidrotermal merupakan suatu metode penumbuhan material berupa kristal didalam air pada tekanan tinggi dengan temperature reaksi yang dapat dinaikkan diatas titik didih air (Harahap *et al.* , 2015). Kelebihan dari metode ini adalah mampu menghasilkan partikel dengan kristalinitas tinggi, kemurnian tinggi, dan distribusi partikel yang homogen (Arrafiqie, 2015).

2.3.6 *Growth Factors*

Transforming growth factor (TGF- β 1) merupakan sitokin yang bekerja mendatangkan osteoblas akibat aktivitas osteoklas sebelumnya. *Growth factor* ini menarik MSC ke daerah resorpsi tulang dan akan mengalami diferensiasi menjadi osteoblas (Teitelbaum, 2010; Manolagas, 2010). Faktor lain seperti TGF- β 1, *platelet derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor* (IGF) dapat juga menstimulasi diferensiasi osteoblas. Diantara sitokin ini, TGF- β 1 merupakan polipeptida osteotropik yang poten, terdapat dalam jumlah banyak di matriks tulang dan diproduksi sebagai respon terhadap berbagai faktor yang berhubungan dengan stimulasi resorpsi tulang. Aplikasi TGF- β ini akan menyebabkan terjadinya proliferasi dan diferensiasi serta melawan apoptosis osteoblas. (Garrett, 2007; Kini & Nandeesh, 2012).

2.4 LL-37 / *Human Antimicrobial Peptide* (AMP)

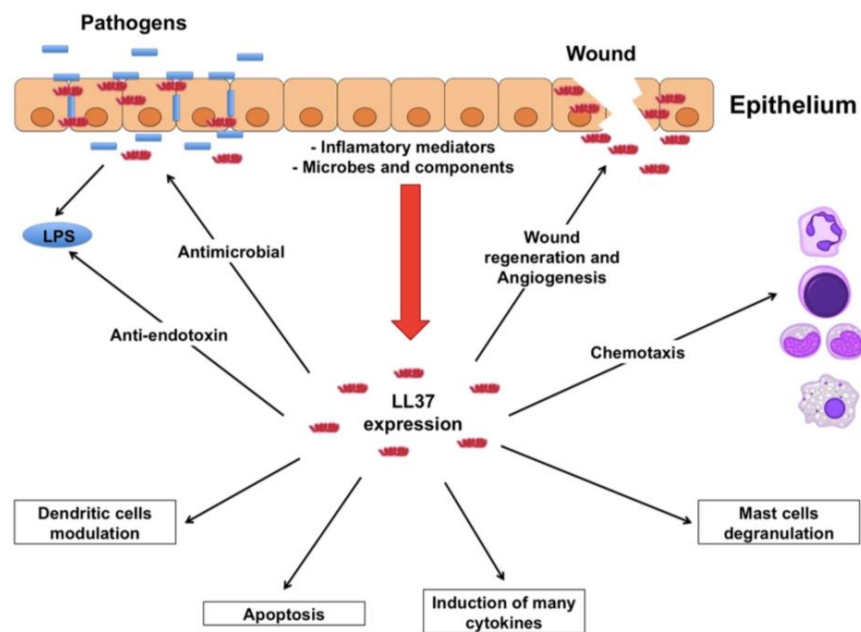
LL-37 adalah *human antimicrobial peptide* (AMP) yang memiliki potensi menstimulasi proses terjadinya osteogenesis. LL-37 distimuli oleh *bone marrow stem cell* (BMSC) untuk berproliferasi, migrasi dan berdiferensiasi melalui mekanisme jalur *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan ditangkap oleh reseptor (P2X7R). LL-37 dapat ditemukan pada monosit dan neutrofil pada *bone marrow* dan darah yang terdapat di epitel, kulit dan membran mukosa. Memiliki fungsi menghambat aktivitas bakteri *broad spectrum* baik gram positif maupun gram negative. LL 37 tidak hanya memiliki pengaruh terhadap pro inflamasi melainkan juga respon antiinflamasi dengan cara melakukan kemotaksis pada *immune cell* dan neutrofil, sehingga mampu menginduksi produksi beberapa sitokin

dan chemokines. LL-37 memiliki kemampuan dalam memicu ekspresi sitokin *inflammatory cytokines* yaitu IL-1 β , TNF- α dan reseptor RANKL baik pada tingkat protein maupun gen, dan mampu melemahkan LPS yang dapat menghambat terjadinya osteogenesis. Hal ini dibuktikan dengan pewarnaan imunofluoresense yang menyatakan tampak adanya reseptor P2X7R pada *bone marrow mesenchymal stem cell* (BMSCs) (Yu *et al.*, 2018). Reseptor P2X7R dapat ditemukan pada ATP *gated-receptor* yang aktifitasnya adalah mengeluarkan *pro-inflammatory cytokines*, apabila kekurangan reseptor P2X7R ini dapat melemahkan respon inflamasi (Volonte *et al.*, 2012).

LL-37 dan prekursornya hCAP18 ditemukan dalam konsentrasi berbeda di berbagai sel, jaringan dan cairan tubuh, paling dominan ditemukan pada leukosit dan beberapa lapisan ephitelial. Ekspresi hCAP18/LL37 juga dilaporkan terdapat di beberapa jaringan yang lain atau cairan tubuh seperti air susu, keringat, cairan luka, saliva, gingiva, testis, spermatozoa, cairan plasma, cairan amniotic, dan masih banyak lagi lainnya (Durr *et al.*, 2006). Banyak sedikitnya LL-37 dapat diidentifikasi diberbagai macam penyakit menggunakan ELISA. Makin tinggi konsentrasi peptide maka makin tinggi pula terjadinya infeksi. Pada kondisi akut inflamasi, konsentrasi LL-37 juga semakin meningkat (Kim *et al.*, 2005). Ekspresi LL-37 dapat dipengaruhi oleh beberapa rangsangan stimulus diantaranya sitokin pro-inflamasi, *growth factors*, nutrien dan produk bakteri yang menyebabkan inflamasi dan perbaikannya. Regulasi mekanisme produksi LL-37 belum banyak diketahui (Ramos *et al.*, 2011)

Mikroorganisme juga dapat berperan meregulasi ekspresi LL37. Produk bakteri baik *gram* positif maupun *gram negative* juga mampu meningkatkan

produksi LL-37 (Nell *et al.*, 2004). LL-37 pertama kali dikenal sebagai media antimikroba. Namun LL-37 juga ditemukan didalam proses pertahanan tubuh sebagai mekanisme respon inflamasi dan sel *chemo-attract* pada luka atau daerah infeksi, dengan cara melekatkan dan menetralkan LPS, sehingga mencetuskan terjadinya re-epitelial dan penutupan luka (Ramos *et al.*, 2011)



Gambar 2.11 Aktivitas biologi LL-37 (Ramos *et al.*, 2011)

LL-37 selain berfungsi sebagai antimikroba, juga memiliki peran sebagai *immunomodulatory*. LL-37 memiliki kemampuan untuk memproduksi sitoki proinflamatori dan anti inflamatori dan lingkungan mikro bertindak sebagai modulator. Sebagai contoh apabila pemberian sejumlah LL-37 merangsang makrofag untuk berdiferensiasi menghasilkan respon proinflamatori yang mengakibatkan sitokin IL-10 akan mengalami penurunan dan IL12p40 mengalami peningkatan. LL-37 dapat meningkatkan produksi sitokin inflamatori dengan memproduksi ekspresi IL-1 β . LL-37 juga dapat memiliki fungsi yang kuat sebagai

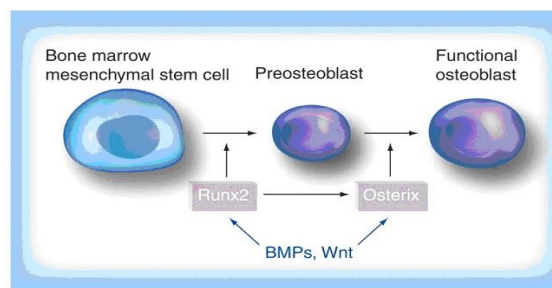
anti inflamatori melalui modulator TLR. LL-37 juga memiliki sifat mampu memodulasi produksi *chemokines* untuk merangsang proses *chemotaxis*. LL-37 akan dikeluarkan pada saat kondisi terjadi infeksi atau *tissue injury* yang mendukung respon inflamasi dan menginisiasi perbaikan luka. Ketika terjadi pengeluaran LPS maka makrofag akan mengaktifkan fungsinya dengan cara melepaskan TNF- α sebelum LL-37 terekspose. LPS sebagai modulator monosit dan mengaktifkan makrofag sebagai proses inflamasi sehingga memproduksi IL-1 β dan IL-18 yang kemudian diikuti stimulasi LL-37 (Kahlenberg and Kaplan, 2013).

LPS merupakan produk utama dari bakteri *gram negative*, pada kasus terjadinya infeksi oleh produk LPS, akan terlihat LPS melepaskan sel-sel mati, kemudian mengaktifkan *mononuclear phagocytes* (monosit dan makrofag) untuk memproduksi dan melepaskan sitokin proinflamatori seperti TNF-alfa, IL-6 (Dobrovolskaia, 2002). Proses ini dimulai dengan melekatnya LPS dengan LPS-binding protein (LBP), kemudian diikuti dengan perlekatan kedua dari LPS-LBP dengan CD14 yang merupakan reseptor utama LPS. LPS-CD14 menginisiasi sinyal intraseluler dengan cara berinteraksi dengan TLR-4, yang mengaktifkan jalur transkripsi NF-kB, sehingga menghasilkan produksi dan sekresi sitokin pro-inflammatory (Rosenfeld, 2006). Beberapa AMP juga mampu menetralkan LPS dengan cara menghambat perlekatan LPS dengan LPS-LBP atau CD14 (Larrick 1995 *cit* Nagaoka 2002). Pendapat lain ada juga yang mengatakan bahwa LL-37 melekat langsung dengan CD14, sehingga menghambat pertemuan LPS dengan reseptornya. (Mokherjee, 2006)

2.5. *Runt-Related Transcription Factor-2*

Core-Binding Factor Alpha 1 (CBFA1) atau *Runt-Related Transcription Factor-2* (Runx2) merupakan faktor transkripsi kunci terkait dengan diferensiasi osteoblas. Gangguan pada kedua faktor ini mengakibatkan hambatan pada pembentukan tulang karena diferensiasi osteoblas tidak terjadi. Runx2 seringkali terekspresi pada osteoblas hari ke 7 dan 14. *Osterix* dan Runx2 secara berkala mengatur proses diferensiasi osteoblas (Brunetti *et al.*, 2013; Crotti *et al.*, 2015).

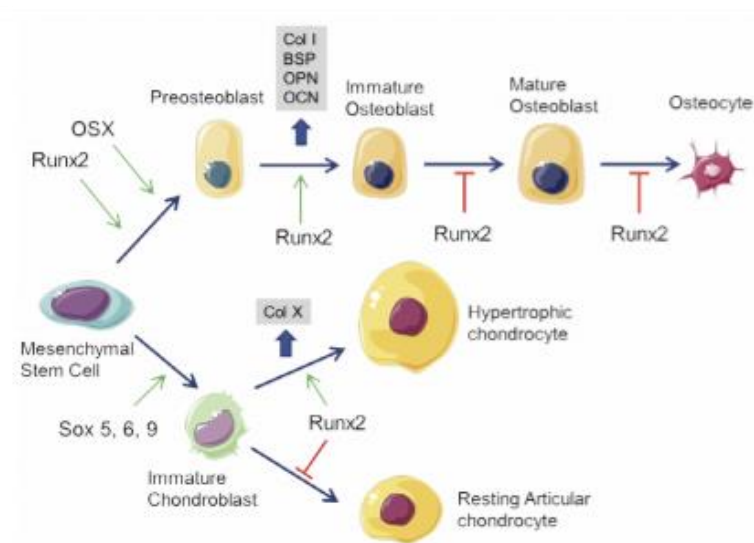
Runx2 memainkan peran penting dalam tahap awal diferensiasi dari BMSCs dan GMSCs menjadi preosteoblas (Gambar 2.12). OSX terutama mengatur proses diferensiasi preosteoblas menjadi osteoblas fungsional. RUNX2 secara umum menjadi pengatur awal dan osterix adalah pengatur selama diferensiasi osteoblas. (Graves *et al.*, 2016)



Gambar 2.12 Osteoblastogenesis terregulasi-pensinyalan BMPs/Wnt melalui Runx2 dan Osterix (Graves *et al.*, 2016)

Sel punca mesenchymal berdiferensiasi menjadi osteoblas imatur, yang mengekspresikan gen protein matriks tulang, melalui ekspresi Runx2, *Osterix*, dan b-catenin (Gambar 2.13). Osteoblas yang belum matang, yang mengekspresikan tingkat tinggi osteopontin, berdiferensiasi menjadi osteoblas matang yang mengekspresikan tingkat tinggi osteokalsin, dan akhirnya osteoblas dewasa tertanam dalam matriks tulang untuk menjadi osteosit (Graves *et al.*, 2016).

Runx2 mengatur proses diferensiasi osteoblas pada berbagai tahap. Pengaturan Runx2 berlangsung secara positif pada tahap awal diferensiasi sel punca, sementara Runx2 menghambat proses di tahapan selanjutnya. MSC yang tidak berdiferensiasi ke osteoblas terjadi dalam fase yang berbeda, dan masing-masing dari fase-fase ini dicirikan oleh suatu pola tertentu gen penanda osteoblas diekspresikan (Graves *et al.*, 2016).



Gambar 2.13 Peran RUNX2 pada osteoblas (Graves *et al.*, 2016)

2.6 Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α)

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) merupakan sitokin utama pada respon inflamasi akut terhadap bakteri Gram- negatif dan mikroba lainnya. Infeksi yang berat dapat memicu produksi TNF dalam jumlah besar yang menimbulkan reaksi sistemik. TNF disebut TNF- α atas dasar historis dan untuk membedakannya dari TNF- β atau limfotoksin. Sumber utama TNF- α ialah fagosit mononuklear dan sel T yang diaktifkan antigen, sel NK, dan sel mast. Lipopolisakarida merupakan

rangsangan poten terhadap makrofag untuk menyekresi TNF. IFN- γ yang diproduksi sel T dan sel NK juga merangsang makrofag antara lain meningkatkan sintesis TNF- α (Baratawidjaya., 2010)

TNF- α mempunyai beberapa fungsi dalam proses inflamasi, yaitu dapat meningkatkan peran pro trombotik dan merangsang molekul adhesi dari sel leukosit serta menginduksi sel endotel, berperan dalam mengatur aktivitas makrofag dan respon imun dalam jaringan dengan merangsang faktor pertumbuhan dan sitokin lain, berfungsi sebagai regulator dari hematopoetik serta komitogen untuk sel T dan sel B serta aktivitas sel neutrofil dan makrofag. TNF- α juga memiliki fungsi tambahan yang menguntungkan termasuk peranannya dalam respon imun terhadap TNF. TNF- α mempunyai beberapa fungsi bakteri, virus, jamur, dan invasi parasit. (Soeroso, 2007 *cit* Yani, 2011)

Hampir semua proses inflamasi mengakibatkan aktivasi makrofag jaringan dan infiltrasi monosit darah. Aktivasi ini menyebabkan banyak perubahan dalam sel, di antaranya ialah produksi TNF, IL-1, dan IL-6, yaitu sitokin yang menyebabkan efek multipel pada hospes. Efek-efek ini meliputi: 1) induksi demam; 2) respon fase akut hepatic yang disertai lekositosis dan produksi protein fase akut seperti *C- Reactive Protein* (CRP); dan 3) diferensiasi atau aktivasi dari sel T, sel B dan makrofag. (Ishartadiati, 2009)

2.7 Interleukin 1 Betha (IL-1 β)

Interleukin 1 adalah bentukan dari *interleukin 1* yang dibentuk sebagian besar oleh sel darah putih, makrofag. *Interleukin 1 betha* merupakan sitokin yang

berperan sebagai kunci mediator respon inflamasi atau sering disebut sebagai sitokin pro-inflamatori yang krusial sebagai pertahanan host response terhadap adanya inflamasi atau *injury* (Dinarello, 1996). Istilah *interleukin 1* diperkenalkan pada tahun 1979. Ada dua jenis yaitu IL- 1a dan IL-1b, IL-1 dihasilkan oleh fibroblas, monosit-makrofag dan *marrow stromal cells* juga oleh sementoblas, sementoklas, osteoblas, osteoklas mempunyai kemampuan untuk menstimulasi resorpsi tulang alveolar. Stimulasi IL-1 tersebut dengan jalan pembentukan osteoklas dan meningkatkan aktivitas resorpsi tulang osteoklas, pada penelitian ini diduga bahwa IL-1 mempunyai peran penting pada osteoporosis setelah menopause, dijumpai kadar IL-1tinggi pada pasien osteoporosis dibandingkan dengan pasien tidak mengalami osteoporosis. IL-1 berperan dalam resorpsi tulang (Graves *et al.*, 2016; Delves *et al.*, 2017).

2.8 Kolagen tipe 1 (COL-1)

Extracellular matrix (ECM) pada ligamen periodontal merupakan jaringan ikat fibrous yang menghubungkan gigi dengan tulang alveolar disekitar akar gigi. ECM kolagen terdiri dari tipe 1 kolagen (Col-I) dan tipe III kolagen namun, COL-I adalah kolagen yang paling dominan dan matur (Xu *et al.*, 2014).

Beberapa *growth factor* seperti TGF- β 1 yang memiliki beberapa peran, yaitu meningkatkan diferensiasi MSC dan sel osteoblas serta modulasi ekspresi Runx2 untuk membantu fungsinya dalam pembentukan tulang. Sel osteoblas yang terbentuk dari osteoprogenitor akan mengekspresikan ALP, memproduksi protein kolagen terutama kolagen tipe 1 dan protein non kolagen seperti *osteocalcin*,

osteopontin dan *sialoprotein*. Akibat dari mekanisme ini akan terjadi pembentukan tulang yang baik ditandai dengan peningkatan luas trabekula tulang sehingga diharapkan dapat memperbaiki osteoporosis pada tulang mandibula.

Jaringan tulang dewasa terdiri atas matriks tulang dan sel-sel. Matriks tulang ini merupakan matriks ekstraseluler, disebut juga osteoid yang disekresi oleh osteoblas. Osteoid terdiri atas protein kolagen terutama kolagen tipe 1 (90-95% dari kolagen yang lain) dan protein non-kolagen seperti *osteocalcin*. Sel-sel di dalam tulang meliputi osteoblas yang memproduksi matriks tulang / osteoid, osteosit yang merupakan sel osteoblas non aktif dan mengalami mineralisasi, osteoklas yang aktif dalam resorpsi tulang dan sel punca, yaitu *hematopoietic stem cells* (HSC) yang memproduksi sel-sel darah serta osteoklas dan *mesenchymal stem cells* (MSC) sebagai osteoprogenitor yang berdiferensiasi menjadi osteoblas dan memicu proses osifikasi atau pembentukan tulang baru (Manolagas, 2010).

2.9 Osteoblas

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

Saat pre-osteoblas mengalami pematangan, osteoblas membentuk tonjolan-tonjolan pendek dengan osteoblas yang berdekatan dan menyesuaikan menjadi sebuah bentuk kuboid. Setiap osteoblas mengandung sejumlah besar Retikular Endoplasma Kasar (RER), mitokondria, dan badan golgi yang mencerminkan kapasitas mereka untuk mensintesis protein. Komponen mikroskopis lain yang

ditemukan pada osteoblas adalah mikrotubulus, mikrofilamen, lisosom, glikogen, dan lipid. Osteoblas yang aktif mensintesis dan mensekresi matriks protein kolagen dan non- kolagen pada tulang, termasuk tingkat tinggi tipe 1, ALP dan osteokalsin, yang bertanggung jawab untuk pembentukan matriks tulang serta inisiasi proses mineralisasi tulang (Graves *et al.*, 2016; Nugraha *et al.*, 2019).

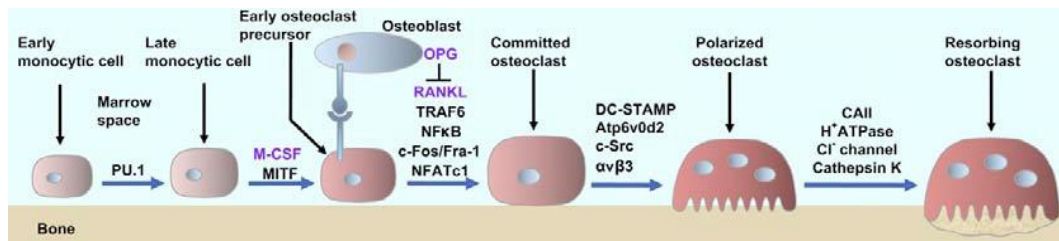
Osteoblas yang mengalami diferensiasi terlibat dalam perlindungan tulang dan pemeliharaan cairan tulang. Selain itu, osteoblas juga terlibat dalam propagasi sinyal aktivasi untuk memulai proses resorpsi tulang dan remodeling tulang Fungsi utama osteoblas adalah pengaturan osteoklastogenesis. Osteoblas dapat mensekresi sitokin yang penting untuk pengaturan pembentukan dan diferensiasi osteoklas, termasuk *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF), *Receptor Activator Of Nuclear Factor (NF)- κ B Ligand* (RANKL) dan *Osteoprotegerin* (OPG). Osteoblas diperlukan untuk mensekresikan berbagai *growth factor* (GFs, termasuk *Insulin-Like Growth Factors* (IGFs), *Platelet-Derived Growth Factors* (PDGFs), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) and *Transforming Growth Factor-B* (TGF β). Fungsi osteoblas dapat meningkatkan massa tulang melalui peningkatan sekresi osteoid dan dengan menghambat kemampuan osteoklas untuk menghancurkan jaringan tulang. Osteoblas juga mengekspresikan reseptor untuk faktor-faktor ini dan memainkan peran dalam mengatur aktivitas osteoblas secara autokrin atau parakrin (Graves *et al.*, 2016).

2.10 Osteoklas

Osteoklas adalah anggota monosit/keluarga makrofag. Osteoklas berdiferensiasi non spesifik pada awal dan sepanjang jalur osteoklas bergantung

pada faktor transkripsi. Proliferasi dan kelangsungan hidup makrofag bergantung pada sitokin *Macrophage Colony Stimulation Factor* (M-CSF). Pengaktifan *Receptor Activator Of Nuclear Factor Kappa-B* (RANK) oleh RANKL yang diekspresikan osteoblas menentukan kondisi osteoklas, yang dimediasi oleh molekul pensinyalan seperti faktor transkripsi AP-1, *Tumor Necrosis Factor Associated Factor 6* (TRAF6), NF κ B, c-Fos, dan Fra-1 (Kitaura *et al.*, 2014; Graves *et al.*, 2016; Delves *et al.*, 2017).

Osteoklastogenesis yang distimulasi oleh RANKL-stimulated dihambat oleh mekanisme umpan balik RANKL dan reseptor *Osteoprotegerin* (OPG) (gambar 2.). Osteoklas mengekspresikan gen fusogenik *Dendrocyte Expressed Seven Transmembrane Protein* (DC-STAMP) dan *ATPase H⁺ Transporting V0 Subunit D2* (Atp6v0d2) yang memungkinkan pembentukan sel *multinukleat* (Gambar 2.14) (Delves *et al.*, 2017).



Gambar 2.14 Regulasi pembentukan dan fungsi osteoklas (Graves *et al.*, 2016)

Kejadian awal dalam pengembangan kapasitas resorptif dari osteoklas dewasa adalah polarisasi osteoklas yang membutuhkan *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src* (c-Src) dan integrin *Alpha-v beta-3* (avb3). Osteoklas setelah terpolarisasi akan memobilisasi komponen mineral tulang. Mobilisasi tulang dicapai melalui pengasaman molekul yaitu karbonat anhidrase II CAII, H β ATPase

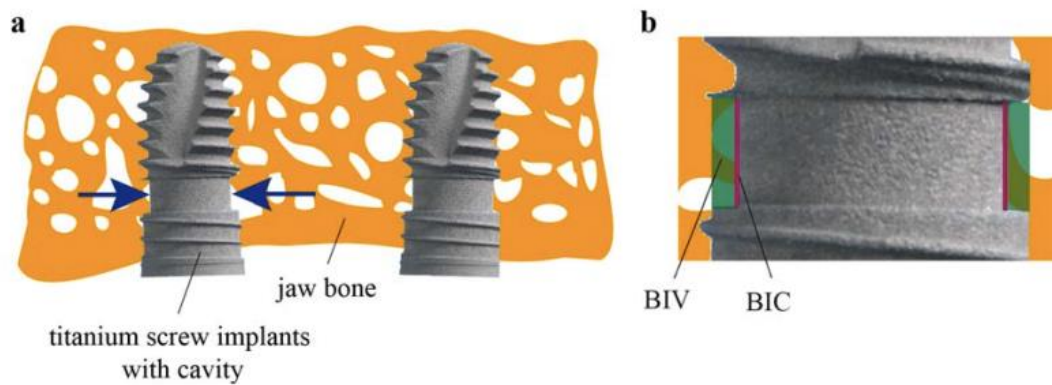
elektrogenik dan saluran Kalsium yang diberi muatan. Cathepsin K memediasi degradasi matriks organik tulang (Graves *et al.*, 2016).

2. 11 *Bone Implant Contact (BIC)*

Bone Implant Contact (BIC), adalah ketebalan dari tulang yang baru tumbuh disekitar implan sampai ke dalam area *bone marrow* (J. M Han., *et al.*, 2016). *Bone Implant Contact (BIC)* persentase berhubungan dengan kebutuhan stabilitas implan dan sebagai indikasi kesuksesan osseointegrasi (Bernhardt, 2012) (Y.S., Park, 2005). Setelah pemasangan implan, *primary implant stability* harus didapatkan melalui fiksasi mekanikal pasif dari host. Proses resorpsi dan pembentukan tulang selalu berjalan berdampingan sehingga menghasilkan stabilitas implan sekunder melalui proses osseointegrasi. Pencapaian osseointegrasi dan stabilitas implan sekunder sangat penting untuk keberhasilan perawatan implan (Sennerby *et al.*, 2001). BIC yang memegang peranan penting dalam menciptakan stabilitas implan sekunder. BIC ini biasanya dipelajari dengan cara histomorfometri (C.B. Johansson, 1990), meskipun pemeriksaan BIC juga memungkinkan menggunakan teknik electron mikroskopis (Linder *et al.*, 1983; Oyonarte *et al.*, 2005).

Pemeriksaan BIC dilakukan pada tulang yang diberi implan yang telah dilakukan pemotongan dengan ketebalan sekitar 600 μm . Hanya bentuk potongan implan yang utuh yang dilakukan analisis setelah dilakukan staining Masson-Goldner. Potongan preparat tersebut di lakukan pembuatan foto lalu dianalisis menggunakan *light microscopy* (Olympus BX 61, Hamburg, Germany) yang dihubungkan dengan sistem *software histomorphometry (Analysis, Soft Imaging System, Munster, Germany)*.

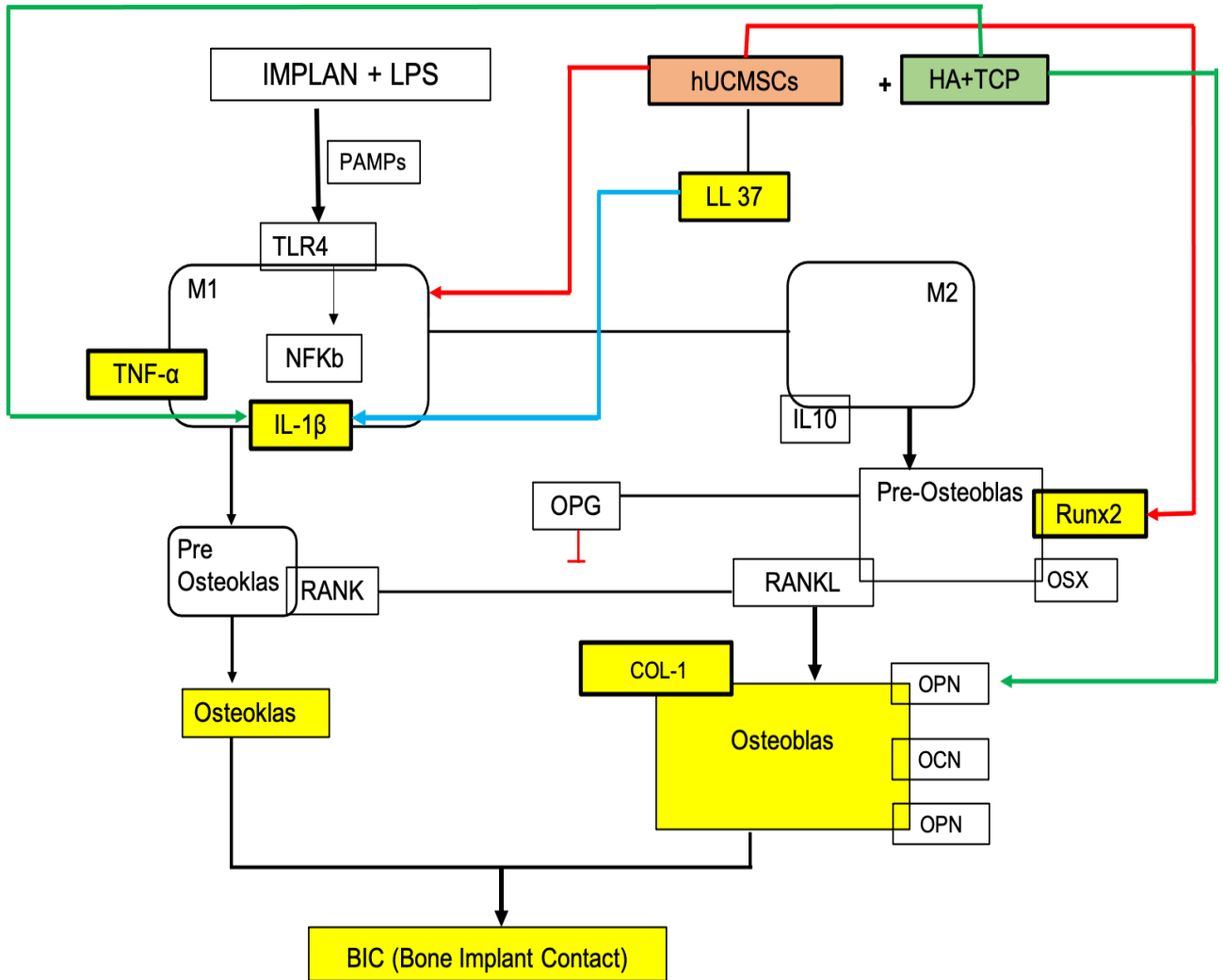
BIC disepanjang area implan dihitung setiap potongan histologi nya menggunakan *Region Of Interest* (ROI) dan dua garis independent per potongan (gambar 2.15 (a)). Tulang yang tampak dari pemeriksaan ROI dihitung secara prosentase pada area permukaan dalam ROI yang ditumbuhi tulang (gambar 2.15 b, merah)



Gambar 2.15 (a) Ekperimen implan titanium dengan lubang setelah 8 minggu proses penyembuhan pada tulang maksila babi. (b) ROI untuk evaluasi terbentuknya tulang baru (BIC; Bone implant Contact, BIV: bone implant volume) (R. Bernhardt, 2012)

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan:

- : variable yang diteliti
- : menghambat
- : mekanisme terapi hUCMSCs
- : mekanisme terapi Ha-TCP
- : mekanisme LL-37

Keterangan Kerangka Konseptual :

Keberadaan LPS pada jaringan periimplan akan menyebabkan respon inflamasi yang dikenali tubuh sebagai jalur *pathogen associated molecule pattern* (PAMPs). LPS ini diikat oleh sel M1 (yang merupakan makrofag yang berperan pada proses proinflamasi) melalui reseptor permukaan yaitu TLR 4 yang akan memicu MyD88 dan merekrut IRAK dan TRAF6 yang mengaktifkan NFkB. Selanjutnya akan terjadi proses signaling yang akan mengaktifasi IKK dan NFKb yang akan translokasi ke inti untuk menginduksi DNA sehingga terjadilah proses transkripsi , translasi, dan mensekresi sitokin pro inflamasi seperti TNF α , IL-1 β dan IL-6 dan MMP-8. Enzim MMP-8 ini dihasilkan oleh bakteri yang berpotensi merusak jaringan penyangga dengan cara merusak COL-1.

Jalur PAMPs juga dikenali oleh reseptor M2 (yang berperan terhadap proses anti inflamasi) yang merupakan polarisasi dari M1. Protein STAT yang aktif akan translokasi ke inti melalui porus nucleus dan selanjutnya akan berikatan dengan promotor gen sehingga terjadi proses transkripsi, translasi dan mensekresi sitokin anti inflamasi TGF β 1 dan IL-10 (yang berperan sebagai anti inflamasi) sehingga mampu menghambat proses yang terjadi didalam M1.

Makrofag merupakan faktor kunci dalam proses perbaikan jaringan yang melibatkan fagositosis, dan sekresi berbagai sitokin, kemokin, dan faktor pertumbuhan yang memodulasi proses perbaikan. Proses ini dikaitkan dengan keseimbangan modulasi Makrofag 1 dan Makrofag 2, yang akan mempengaruhi proses regenerasi jaringan. Makrofag 1 bertugas dalam sekresi sitokin pro

inflamasi, seperti TNF- α dan IL-1 β , sedangkan Makrofag 2 bertugas dalam sekresi sitokin anti-inflamasi dan *growth factor*. Produk-produk sitokin pro-inflamasi, seperti IL-1 β dan TNF- α dapat menginduksi terbentuknya RANKL pada osteoblas

Sitokin pro inflamasi akan meningkatkan aktifitas osteoklastogenesis dengan memicu preosteoklas untuk mengeluarkan RANK sedangkan preosteoblas akan mengeluarkan RANKL sehingga apabila RANK dan RANKL berikatan ini akan membuat osteoklas menjadi matang. Sitokin anti inflamasi akan meningkatkan aktifitas osteoblasogenesis dengan memicu preosteoblas untuk mengeluarkan reseptor RANKL dan OPG, berbeda dengan RANKL, apabila OPG ini berikatan dengan RANK, maka osteoklas tidak akan terbentuk. Sel osteoprogenitor yang berupa preosteoblas juga mampu menstimulus Runx2 untuk menginduksi terbentuknya osteoblas yang matur dengan mensekresi ALP, osteopontin, *osteocalcin* sehingga memicu peningkatan pembentukan kolagen tipe 1 (COL-1) yang menyebabkan peningkatan luas trabekula sehingga jumlah tulang yang terbentuk makin banyak dan BIC juga makin meningkat.

Terapi hUCMSCs dapat menginduksi LL-37 dimana LL-37 ini cenderung berinteraksi dengan mikroba, sehingga berpengaruh dalam menghambat *signaling* bakteri *gram negative* melalui TLR-4. LL 37 memiliki efek anti inflamasi yang kuat untuk menentralkan aktivasi TLR4 yang dikeluarkan oleh LPS

Aktivitas regenerasi dari MSC dapat distimulasi oleh LPS atau TLR dengan cara induksi produksi parakrin. MSC memiliki kemampuan mensekresi faktor anti-inflamasi, proses sekresi anti inflamasi ditandai dengan meningkatnya aktifitas sekresi TSG-6, PGE2 dan IL-1ra yang akan menghuni makrofag. TSG-6 akan

menekan aktifitas NF- κ B masuk kedalam nucleus atau inti sel sehingga dapat menurunkan sekresi sitokin proinflamatori (TNF- α , IL-1 α dan IL-1 β) melalui ekspresi CD44. HUCMSCs memiliki beberapa *growth factor* yang dapat mengurangi sekresi faktor inflamasi dari makrofag, dengan tujuan untuk meningkatkan kecepatan penyembuhan. *Growth factors* ini termasuk *fibroblast growth factor* (FGF), *transforming growth factor- β* (TGF- β), *insulin-like growth factor* (IGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Telah dilaporkan bahwa *growth factors* ini bertanggung jawab untuk mengatur ekspresi Runx2.

Runx2 merupakan faktor transkripsi penting dalam diferensiasi osteogenik, salah satunya adalah stimulasi pembentukan gen transkripsi pada osteoblas, seperti osteokalsin. Osteoblas akan diproduksi oleh MSC yang melakukan diferensiasi osteogenik. Runx2 akan diproduksi oleh MSC dan osteoprogenitor, untuk memastikan MSC berdiferensiasi secara spesifik menjadi osteoblas. Calcium adalah *messenger signaling* yang berpotensi memodulasi berbagai fungsi seluler dimulai dari *cell growth* sampai diferensiasi sel dan berakhir di *cell death*. Begitu juga kebalikannya, transkripsi gen osteopontin ditunjukkan dengan adanya peningkatan fosfat, sedangkan kristal *hydroxyapatite* berfungsi sebagai OPN (osteopontin) promoter yang melewati reseptor *glucocorticoid*. Kombinasi ion Ca²⁺ dan PO³⁻₄ secara *in vitro* berfungsi sebagai pemicu proses diferensiasi osteogenik melalui sinyaling jalur BMPs/SMAD.

3.2 Hipotesis

1. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi LL-37 sebagai antibakteri untuk menghambat inflamasi pada kasus *periimplantitis*
2. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kondisi *periimplantitis* dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada proses regenerasi tulang
3. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kondisi *periimplantitis* dapat menurunkan ekspresi IL -1 β pada proses regenerasi tulang.
4. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kondisi *periimplantitis* dapat meningkatkan ekspresi RunX2 pada proses regenerasi tulang
5. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kondisi *periimplantitis* dapat meningkatkan ekspresi Col-1 pada proses regenerasi tulang
6. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kondisi *periimplantitis* dapat meningkatkan jumlah osteoblas pada regenerasi tulang
7. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kondisi *periimplantitis* dapat menurunkan jumlah osteoklas pada regenerasi tulang.
8. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada kondisi *periimplantitis* dapat meningkatkan BIC pada kasus regenerasi tulang

9. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP menunjukkan adanya jalur dari proses inflamasi terhadap regenerasi tulang pada *periimplantitis* di minggu ke-2
10. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP menunjukkan adanya jalur dari proses inflamasi terhadap regenerasi tulang pada *periimplantitis* di minggu ke-4

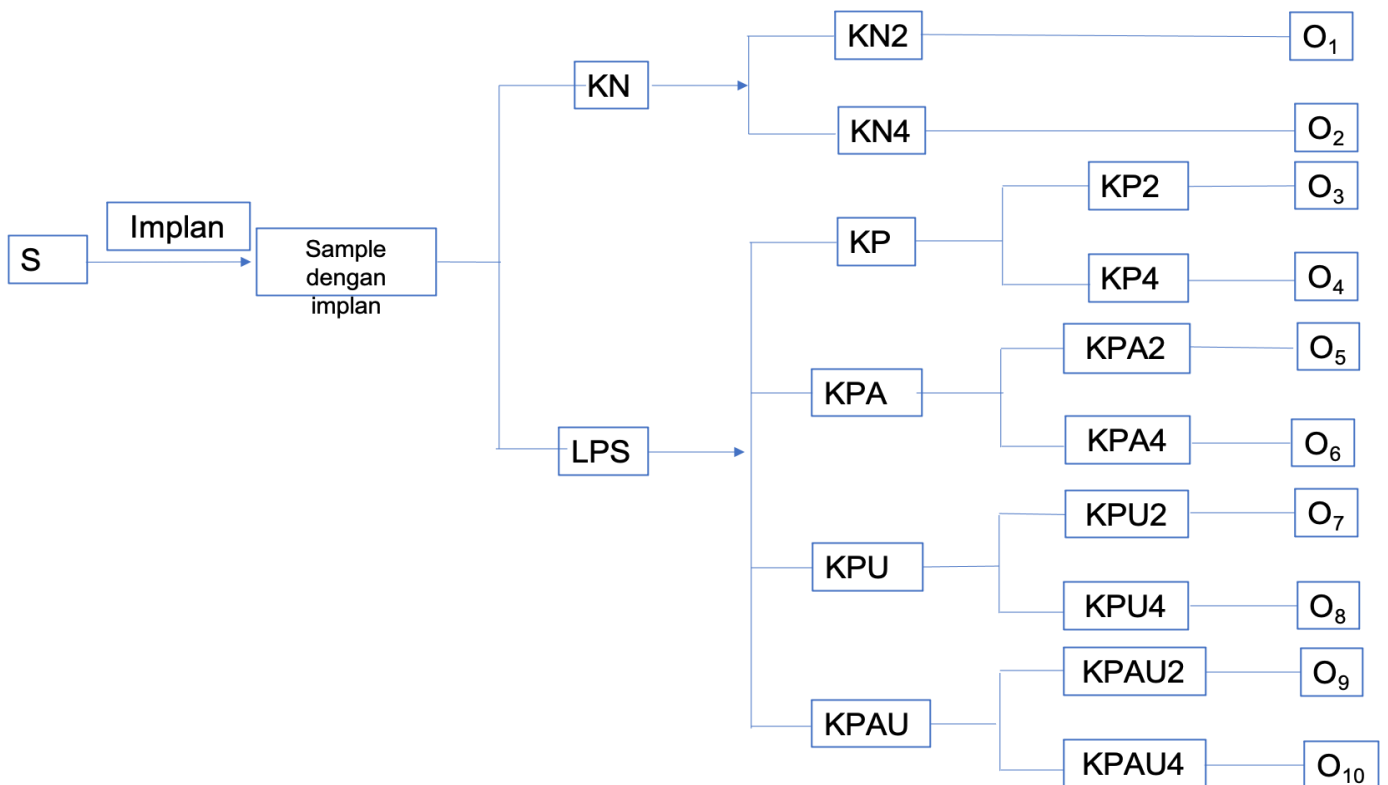
BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan studi *true experimental* pada hewan coba

4.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design*.



Gambar 4.1 Rancangan Desain Penelitian

Keterangan :

S : Sampel

KN2 : Kelompok kontrol negatif yang dipasang implan di femur dan diterminasi setelah 2 minggu

- KN4 : Kelompok kontrol negatif yang dipasang implan di femur dan diterminasi setelah 4 minggu
- KP2 : Kelompok kontrol positif yang dipasang implan di femur dan diberi LPS diterminasi 2 minggu
- KP4 : Kelompok kontrol positif yang dipasang implan di femur dan diberi LPS diterminasi 4 minggu
- KPA2 : Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan *scaffold* HÁ-TCP dan diterminasi setelah 2 minggu
- KPA4 : Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan *scaffold* HÁ-TCP dan diterminasi setelah 4 minggu
- KPU2 :Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan hUCMSCs dan diterminasi 2 minggu
- KPU4 :Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan hUCMSCs dan diterminasi 4 minggu
- KPAU2 :Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan injeksi hUCMSCs dan *scaffold* HÁ-TCP, diterminasi setelah 2 minggu
- KPAU4 :Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan injeksi hUCMSCs dan *scaffold* HÁ-TCP, diterminasi setelah 4 minggu
- O₁ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok negatif minggu-2
- O₂ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok negatif minggu-4

- O₃ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok positif minggu-2
- O₄ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok positif minggu-4
- O₅ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok pemberian *scaffold* HÁ-TCP minggu-2
- O₆ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok pemberian *scaffold* HÁ-TCP minggu-4
- O₇ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok pemberian hUCMSCs minggu-2
- O₈ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok pemberian hUCMSCs minggu-4
- O₉ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HÁ-TCP minggu-2
- O₁₀ : Output hasil pemeriksaan ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, jumlah hitung osteoblas, osteoklas, BIC, pada kelompok pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HÁ-TCP minggu-4

4.3 Populasi

Populasi penelitian ini adalah hewan coba tikus jenis *Rattus norvegicus* strain Wistar jantan dewasa umur 20 minggu dengan berat badan 325-350 gram yang sudah dilakukan *aklimatisasi* beberapa minggu dan diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba *Institute Tropical Disease* (ITD) Universitas Airlangga

4.4 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah implan yang dipasang pada regio *femur dextra* pada tikus Wistar jantan yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk digunakan hingga besar sampel yang dibutuhkan kemudian dilakukan randomisasi untuk menentukan tikus yang dijadikan model peri implantitis dan mendapatkan perlakuan.

4.4.1 Kriteria Inklusi

1. Tikus dalam keadaan sehat sesuai kriteria produksi hewan coba
2. Jenis kelamin jantan
3. Berat badan antara 325-350 gram
4. Umur 20 minggu

4.4.2 Kriteria Eksklusi

1. Pernah dipakai sebagai hewan coba penelitian lain
2. Hewan dinyatakan oleh dokter hewan konsultan terbukti berpenyakit atau cedera fisik dalam kurun waktu evaluasi klinis dalam kondisi lingkungan yang sesuai
3. Hewan berperilaku agresif, dalam pengamatan sering menyerang hewan lain dalam kelompok

4.4.3 Kriteria Putus Uji

Tikus sakit atau mati selama dilakukan perlakuan

4.4.4 Besar Sampel

Sampel diperoleh menggunakan rumus Lemeshow: (Lemeshow *et al.*, 1990).

$$n \geq \frac{2 \cdot \sigma^2 (z_{1-\alpha/2} + z_{1-\beta})^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Keterangan :

- n : jumlah sampel setiap kelompok
- $Z_{1-\alpha/2}$: nilai pada table normal untuk $\alpha = 1.96$
- Z_{β} : nilai pada table normal untuk $\beta = 1.28$
- σ : Standar deviasi dari respon kelompok kontrol SD variabel ($\sigma = 0.671$)
- μ_1 : rerata hitung respon kelompok 1 yang diharapkan = 2.821
- μ_2 : rerata hitung respon kelompok 2 yang diharapkan = 4.022
- α : 0,05
- β : 0,10

Rerata hitung berdasarkan penelitian sebelumnya yang berjudul “Mekanisme regenerasi tulang alveolar yang mengalami resorpsi dengan pemberian komposit *Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells* (ADMSCs) dengan *Demineralized Dentin Matrix* (DDM)” (Sandra. DS, 2019). Dari sampel diatas didapatkan jumlah sampel sebanyak 7 dan Pada penelitian ini terdapat 10 kelompok sehingga diperlukan 70 ekor tikus

4.4.5 Teknik Pengambilan Sampel

Randomisasi pada penelitian ini dilakukan dengan teknik *simple random sampling*. Tujuh puluh ekor tikus dibagi menjadi 10 kelompok masing – masing kelompok 7 ekor, yaitu:

1. Kelompok (KN-2): Kelompok kontrol negatif yang dipasang implan di femur dan diterminasi setelah 2 minggu
2. Kelompok (KN-4): Kelompok kontrol negatif yang dipasang implan di femur dan diterminasi setelah 4 minggu
3. Kelompok (KP2) : Kelompok kontrol positif yang dipasang implan di femur dan diberi LPS *P.gingivalis* diterminasi 2 minggu
4. Kelompok (KP4) : Kelompok kontrol positif yang dipasang implan di femur dan diberi LPS *P.gingivalis* diterminasi 4 minggu
5. Kelompok (KPA2): Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan *scaffold* HÁ-TCP dan diterminasi setelah 2 minggu
6. Kelompok (KPA4): Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan *scaffold* HÁ-TCP dan diterminasi setelah 4 minggu
7. Kelompok (KPU2): Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan hUCMSCs dan diterminasi 2 minggu
8. Kelompok (KPU4): Kelompok perlakuan *periimplantitis* yang diberi perlakuan hUCMSCs dan diterminasi 4 minggu
9. Kelompok (KPAU2): Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan hUCMSCs dan *scaffold* HÁ-TCP, diterminasi setelah 2 minggu
10. Kelompok (KPAU4): Kelompok *periimplantitis* yang diberi perlakuan hUCMSCs dan *scaffold* HÁ-TCP, diterminasi setelah 4 minggu

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada tikus *periimplantitis*

4.5.2 Variabel Tergantung

A. Variabel proses inflamasi

- a. Ekspresi LL-37 didalam hUCMSCs
- b. Ekspresi TNF- α didalam makrofag
- c. Ekspresi IL-1 β didalam makrofag

B. Variabel diferensiasi osteogenik

- d. Ekspresi Runx2 didalam matriks tulang
- e. Ekspresi COL-1 didalam matriks tulang
- f. Ekspresi jumlah hitung osteoblas pada matriks tulang
- g. Ekspresi jumlah hitung osteoklas pada matriks tulang
- h. Ekspresi jumlah luas permukaan *Bone Implant Contact* (BIC)

4.5.3 Variabel terkontrol

1. Jumlah sel hUCMSCs
2. Berat *scaffold* HA-TCP
3. Model implan untuk *periimplantitis*
4. Waktu evaluasi

5. Jumlah dosis LPS

4.6 Definisi Operasional Variabel

1. **Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell (hUCMSCs)** : Sel yang diisolasi dari *wharton's jelly* pada *umbilical cord* manusia, yang telah dilakukan proses isolasi dan kultur, kemudian diletakkan di *petridisk* dan diamati menggunakan mikroskop cahaya pembesaran 400x menunjukkan morfologi fibroblas berbentuk *spindle* dan mengekspresikan *marker* positif CD105, CD90 dan *marker* negatif CD34, CD45
2. **Scaffold HA-TCP** : suatu bentukan *bone graft* yang berasal dari cangkang *Anadara Granosa* yang menghasilkan bubuk hidroksiapatit dan diproses menggunakan metode hidrotermal selama 12 jam sehingga berbentuk tiga dimensi (silinder) kemudian dipotong-potong menjadi bentukan granula dengan berat 2 µg lalu *diseeded* dengan hUCMSCs.
3. **Ekspresi LL 37** : adalah jumlah protein LL-37 yang diekspresikan oleh sejumlah makrofag yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi monoklonal LL-37/Chatelicidine dengan pemeriksaan imunohistokimia yang memendarkan warna coklat yang diamati dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dalam 20 lapang pandang
4. **Ekspresi TNF-α** : adalah sitokin proinflamasi yang diekspresikan sejumlah makrofag yang bereaksi positif terhadap *antibody monoclonal* anti TNF-α yang diukur secara kuantitatif dengan teknik imunohistokimia dari spesimen dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x dalam 20 lapangan pandang

5. **Ekspresi IL-1 β** : adalah jumlah IL-1 β yang terekspresi pada sel makrofag yang memberikan reaksi positif terhadap anti IL-1 β monoklonal yang ditandai dengan warna coklat pada sitoplasma pada sediaan jaringan dan diamati menggunakan teknik immunohistokimia dengan pembesaran 1000x dengan 20 lapang pandang
6. **Ekspresi Runx2** : adalah gen transkripsi yang diekspresikan oleh sejumlah osteoblas jaringan tulang femur yang memendarkan warna kecoklatan pada sitoplasma setelah pengecatan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal anti-Runx2 yang dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dalam 20 lapang pandang
7. **Ekspresi COL-1** : protein yang diekspresikan oleh sejumlah osteoblas dan memberikan reaksi positif terhadap antibodi anti COLL-1 dengan kromogen DAB berwarna coklat dengan metode imunohistokimia dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dalam 20 lapang pandang.
8. **Osteoblas** : sel berinti satu, berbentuk bulat, berada pada permukaan tulang yang berwarna merah keunguan dengan pengecatan HE dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dalam 20 lapang pandang
9. **Osteoklas** : sel berinti banyak yang berbentuk besar, berada pada permukaan tulang yang berwarna merah keunguan dengan pengecatan HE dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dalam 20 lapang pandang
10. **Bone Implant Contact (BIC)**: jumlah ekspresi osteoblas yang tumbuh disekitar implan sampai ke dalam area *bone marrow*, dibagi jumlah area keseluruhan luas implan.

11. **Model *periimplantitis***: tikus yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dan dilakukan pemasangan implan di *femur* kemudian di injeksikan LPS *P. gingivalis* dengan dosis 1 µg/0,01 ml sebanyak 10 µl ke dalam jaringan *periimplant* sehingga tikus mengalami *bone loss* setelah 1 bulan paska pemberian, dibuktikan dengan pemeriksaan radiografi tampak adanya radiolusen di area sekitar implan (Lampiran 20).

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell (hUCMSCs) diisolasi dari tali pusat plasenta manusia, dikultur-ekspansi pada medium *in vitro*. MSC dari hUMSC yang telah di *seeded* dengan *scaffold* HA-TCP kemudian diinjeksikan pada daerah yang telah dipasang implan dan mengalami *periimplantitis* pada *femur* tikus *Wistar* jenis kelamin jantan.

1. Instrument untuk membuat *periimplantitis*

Implan berbentuk silinder dari bahan titanium ukuran ϕ 1 mm x 2mm (*Tohoku University* ®), ketamine 10%, xylasine, blade, scalpel, implant motor, paralel guide, mata bur *drilling*, benang jahit dan jarum, larutan PZ

2. Pembuatan inokulasi LPS *P. gingivalis*

LPS *P. gingivalis* (Invivo Gen LPS-PG Ultrapure®), PBS, Hamilton syringe, vortex, cairan mTSB (*modified Trypticase Soy Broth*) 5 ml, incubator

3. Instrumen yang dipersiapkan untuk pengecatan imunositokimia hingga dekalsifikasi

Medium penumbuh α -MEM, larutan PBS, gelas objek khusus, 3% *formaldehyde*, *Mouse monoclonal anti human – CD45 / Anti human CD 105*, 50% gliserin, microscope fluorescence

4. Instrumen yang dipersiapkan untuk pemeriksaan *flowcytometry*

Medium penumbuh α -MEM, larutan PBS, *formaldehyde* 10%, larutan *Bovine serum albumin (BSA)*, *Human MSC Analysis Kit*, antibodi primer *mouse anti human CD 73, CD 90, CD 105, negative cocktail CD 45, CD 34, CD 19, Fluorescent activated cell sorting (FACS) Calibur Flow cytometer*

5. Instrumen yang dipersiapkan untuk pemeriksaan dan pembacaan *Hematoxylin Eosin (HE)*

Gelas obyek, larutan xylol, ethanol absolut, ethanol 70%, larutan Meyer's *Hematoxylin Eosin*, larutan Eosin, cairan Perekat (DPX), *cover glass*, *microscope fluorescence*.

6. Instrumen yang dipersiapkan untuk pemeriksaan dan pewarnaan imunohistokimia

Larutan xylol, ethanol absolut, ethanol 70%, aquades, H₂O₂ 3%, larutan PBS, Trypsin 0,025%, Ultra V Block, Monoklonal, *Primary Antibody Enhancer*, *Horseradish Peroxidase (HRP)*

7. Bahan yang dipersiapkan dalam teknik *in vivo* antara lain:

Medium Penumbuh α –*minimum essential medium (MEM)*, Trypsin 0,25%, *Phosphate Buffer saline (PBS)*, Petridish 5cm, 10 cm, Tabung *disposable* 15 ml, 50 ml, Alkohol 70%, aquades steril, *Methylen blue*, tikus *wistar* jantan, LPS

P.gingivalis, Ethanol 70%, Ketamin (KTM 1000), Xylol, *GasPack CO₂ generating sachet*, *fetal bovine serum (FBS)*, *L-glutamin*, Polypropylene-EDTA, *L-ascorbic acid*, *β-glycerophosphate*, *dexamethasone*, minuman dan makanan standar tikus *wistar*, anti TNF- α *antibody monoclonal mouse* (ABIN3023860, antibodies-online.com®); Anti IL-1 β *antibody monoclonal mouse* (ABIN3201456, antibodies-online.com®); Runx2 *antibody monoclonal rat* (clone 4D5) LS-B4294 (LifeSpan BioScience, Inc®); COL-1A1, *antibody monoclonal rat* (clone 3C3) LS-C765684 (LifeSpan BioScience, Inc®); *Cathelicidin Polyclonal Antibody Rabbit*, (bs-4735R-HRP) (Bioss Antibodies®); Anti-rat CD 105-FITC; Anti-rat CD 45-FITC; *Trypan Blue*; *Filter disposable*; *Yellowtip* 0-20 μ l, *Blue tip* 1000 μ l, larutan *dimethyl sulfoxide*(DMSO)

4.8 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 3 tahun dari bulan Oktober 2018-Oktober 2021 di :

1. Laboratorium *Stem Cell, Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga.
2. Laboratorium Hewan Coba, *Institute of Tropical Disease (ITD)* Universitas Airlangga.
3. Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
4. Bagian Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
5. Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) RSU Dr. Soetomo Surabaya untuk pengambilan sampel tali pusat manusia.
6. Laboratorium Medis Terpadu Universitas Airlangga

4.9 Cara Kerja

4.9.1 Prosedur Isolasi dan Kultur Ekspansi hUCMSCs (Wang *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2013)

Tali pusat diambil dari plasenta bayi sehat aterm (cukup bulan) yang dilahirkan dengan operasi *Caesarean* dengan indikasi elektif tanpa penyulit medis di Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT) Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Soetomo Surabaya. Ibu yang melahirkan telah menandatangani *information for consent* dan *informed consent* yang telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Tali pusat dan plasenta yang didapatkan diletakkan dalam cawan steril, tali pusat dipotong sepanjang 10 cm, potongan tersebut diletakkan ke dalam tromol yang telah dilapisi dengan kain steril. Potongan tali pusat dicuci dengan larutan *Phosphate-Buffered Salin* (PBS) dalam 3 botol steril secara berurutan untuk membuang sisa darah yang menempel. Kemudian potongan tali pusat dicuci dalam cairan *Ringer Lactate* (RL) yang berisi 2,5 µg/ml Gentamycin dan 1000 U/ml Amphotericin selama 20 menit

Prosedur isolasi dikerjakan menggunakan protokol laboratorium stem sel, Institut Penyakit Tropis, Universitas Airlangga. Potongan tali pusat dipotong menjadi sekitar 1 cm, arteri, vena dan adventitia dipisahkan untuk mendapatkan *Wharton's Jelly* diiris dengan pisau sampai berukuran kira-kira 1 mm³ dan digunakan untuk mengisolasi dan kultur primer hUCMSCs.

Wharton's Jelly direndam dalam tabung Erlenmeyer yang berisi 0.25% trypsin pada suhu 37° C selama 40 menit. Dilakukan sentrifus, *supernatant* dipisahkan. Langkah ini diulang sampai 2x. Sampel tersebut direndam menggunakan PBS berisi 0.75 mg/ml collagenase IV (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, USA) dan 0.075 mg/mL Dnase I (Takara Bio, Shiga, Japan), diinkubasi pada suhu 37° C selama 60 menit. Diikuti dengan saringan menggunakan *cell strainer* dan pengumpulan pelletselama proses sentrifus selama 10 menit untuk mendapatkan sel. Untuk menghentikan aktifitas Collagenase, ditambahkan FBS 1 cc dan diaduk lagi selama 10 menit. Setelah itu dilakukan penyaringan dengan kasa steril pada Becker glass hingga didapatkan cairan. Cairan dipindahkan ke dalam *conical tube* lalu dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 1600 rpm hingga didapatkan cairan dan pellet. Setelah cairan dibuang, ke dalam pellet ditambahkan medium DMEM/F12 dan dilakukan resuspensi. Medium yang telah berisi *single cell* kemudian dipindahkan ke dalam piring petri dan diinkubasi pada suhu 37° C dan CO₂ 5%.

Sel yang didapat kemudian dikultur pada *collagen-coated dishes* menggunakan modifikasi alfa dari MEM Eagle (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), ditambahkan dengan *human leukemia inhibitory factor* (10 ng/mL) dan FBS (Gibco BRL). Pertumbuhan sel primer diobservasi menggunakan mikroskop. Waktu yang dibutuhkan hingga terjadi *cell confluence* dicatat. Medium diganti tiap 3 hari sekali, dengan cara membuang medium lama, dicuci dengan PBS lalu diganti dengan medium baru.

Pada hari ke tujuh, ketika sel telah mengalami *confluence* 80%, sel dipisahkan menggunakan trypsin, medium lama dibuang, ditambahkan trypsin 2 cc, trypsin lalu dibuang dan diganti dengan trypsin lagi sebanyak 2 cc kemudian diinkubasi selama 5 menit. Setengah sampai 2/3 dari sel kemudian di taruh kembali ke tempat yang baru pada medium yang sama. Setelah inkubasi ditambahkan medium penumbuh DMEM/F12 sebanyak 2 cc kemudian dilakukan resuspensi untuk

memisahkan sel yang rontok agar menjadi sel tunggal. Kemudian hasil resuspensi dipindahkan ke dalam tabung disposable 15 ml steril lalu dilakukan sentrifugasi.

Medium lama dibuang, untuk mencuci sampel ditambahkan 5 ml PBS, 2 ml tripsin, diinkubasi selama 5 menit, kemudian ditambahkan 2 ml medium penumbuh sebagai *stopper*, kemudian dilakukan resuspensi hingga sel terlepas dari *petridisk* menjadi sel tunggal. Suspensi sel tersebut kemudian dituang ke dalam *conical tube* 15 ml dan disentrifuge selama 5 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Setelah itu *supernatant* dibuang dan *pellet* yang ada dibuat homogen, ditambahkan 3 ml medium penumbuh dan diresuspensi. Hasil resuspensi dituang ke dalam *petridisk* dan ditambahkan medium hingga 10 ml, lalu dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37° C.

Saat sel mencapai passase ke 2 maka sel di lakukan karakterisasi fenotip MSc, sisanya *difreezing* untuk menghindari terjadinya kematian sel. *Thawed* sel dilakukan saat sel berada pada passase ke 2.

4.9.2 Karakterisasi hUCMSCs (Laboratorium stem cell, Institute of Tropical Disease, Universitas Airlangga, 2019)

Karakterisasi fenotip MSC pada kultur hUCMSCs dilakukan dengan dua macam metode *imunostaining* yaitu pengecatan imunositokimia dan *flowcytometry*.

4.9.3 Pemeriksaan Imunositokimia (Nugraha et al., 2018)

Sel *monolayer* dijadikan *single cell* melalui proses tripsinasi. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1600 rpm, selama 5 menit. Pelet ditambahkan medium penumbuh α MEM/F12 sebanyak 1 ml, diresuspensi dan

ditanam pada *cover slip* khusus sebanyak 20 μ l. Gelas obyek diletakkan di atas kertas basah di dalam suatu kotak, diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 1 jam. Selanjutnya, dilakukan fiksasi dengan 3% *formaldehyde* selama 15 menit pada suhu ruang, dicuci dengan PBS 4 kali dan dikeringkan. Pada masing-masing sampel ditambahkan *mouse monoclonal antibody anti human-CD45* atau *anti human CD105* yang telah berlabel FIT-C (Biolegend, CA, USA) lalu diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 45 menit. Setelah itu dicuci dengan PBS 4 kali, dikeringkan dengan air di sekitar *cover slip* dengan kertas tisu. Selanjutnya ditetaskan 50% glicerol di atas *cover slip*, langsung dilihat hasilnya dengan mikroskop fluoresen (pembesaran 40x), bila tempat berpendar berarti hasilnya positif, kalau tidak hasilnya negatif.

4.9.4 Pemeriksaan *flowcytometry* (Rammal, 2013)

Untuk pemeriksaan *flowcytometry*, dilakukan tripsinasi dan suspensi hUCMSCs dengan α MEM, setelah itu dicuci dengan PBS, dan difiksasi dalam larutan formaldehyde 10% selama 10 menit, dan akhirnya ditutup dengan larutan BSA selama 1 jam. Kemudian, sel-sel tersebut diinkubasi menggunakan *Human MSC Analysis Kit* (BD StemflowTM, BD Biosciences) dengan penambahan *primary antibodies mouse anti-human CD73, CD90, CD105*, dan *negative cocktail* berisi CD45, CD34, CD19 selama 40 menit. Antibodi yang tak terikat dibuang dengan cara mencuci menggunakan PBS. Antibodi primer yang terikat dilabel menggunakan *FITC-conjugated anti-mouse antibody* dengan menggunakan inkubasi selama 30 menit. Sel-sel tersebut kemudian dilihat dan dianalisis menggunakan *FACSCalibur flow cytometer* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA).

4.9.5 Uji perlekatan hUCMSCs pada *scaffold* HA-TCP secara *in vitro* (Tao *et al.*, 2014)

Alat yang digunakan incubator (Fisher Scientific 116885H CO₂ Incubator), pipet steril, plate M24 (Thermo Fisher Scientific), tabung *conical* (Falcom™ Conical Centrifuge Tube), cawan petri (Nuric™ Cell Culture Thermo Fisher Scientific), *Cover slip*, *Confocal Laser Scanning Machine* (Olympus FV 1000), *microscope inverted* cahaya (Olympus IX-71)

Bahan yang digunakan adalah *Ficol histopaque* 0,177 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Alpha-MEM, *fetal bovine serum* (FBS) 20% (Biowest), penisilin/streptomycin 100 U (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), dan amfoterisin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), tripsin 25%. *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *Bromodeoxyuridine* (BrdU) BrdU (A7) *Monoclonal Antibody*, FITC *Conjugated*, bsm-0917M-FITC, Bioss Antibodies®)

hUCMSCs pada passage 6 sebanyak 1×10^5 dalam 100 mikroliter dalam media alpha-MEM di seeded pada *scaffold* HA-TCP ditambahkan BrdU sebanyak 10 mikroliter lalu diinkubasi selama 24 jam dan 72 jam didalam incubator 37°, CO₂ 5%. Pengecatan dilakukan dengan cara menyiapkan pelarut anti-*BrdU* yang terdiri dari BSA 1% dalam PBS ($1/100 \times 8,4 \text{ ml} = 0,084 \text{ gr}$). Anti BrdU dilarutkan didalam BSA dan PBS dengan konsentrasi 1;150. Setelah inkubasi 24 jam dan 72 jam 24-wellplate berisi *scaffold* dan hUCMSCs dikeluarkan dari incubator, masing-masing well dicuci dengan PBS sebanyak 300 mikroliter/well.

Setelah dicuci PBS dimasukkan anti BrdU yang dilarutkan dalam BSA 1% sebanyak 300 mikroliter/well. Lalu diinkubasi ulang selama 1 jam dalam incubator

37°, CO₂ 5%. Setelah inkubasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP di cuci dengan PBS sebanyak 300 mikroliter/well. Lalu difiksasi menggunakan praformaldehid (PFA) 4% sebanyak 300 mikroliter/well selama 5 menit. Kemudian dicuci lagi dengan PBS yang sama sebanyak 2x. *Cover slip* dalam dasar *wellplate* diambil, diletakkan pada *coverslip* persegi panjang (24x60 mm) dan diamati dengan *confocal microscope* dengan pembesaran 400x

4.9.6 Uji *Viability* HUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP dengan *MTT-Assay* (Yu et al., 2013)

MTT colorimetric assay dilakukan untuk mengukur sitotoksitas dari *scaffold* HA-TCP terhadap sel punca. Dua grup sampel disiapkan: (1) hUCMSCs dengan *scaffold* HA-TCP; (2) grup kontrol. Tiap grup dipersiapkan ke dalam suatu *96-well plates* berisi volume akhir 100µl tiap *well*. Setelah inkubasi, 25µl dari reagen MTT ditambahkan ke tiap *well*. *Well* kemudian diinkubasi selama 2 – 4jam pada suhu 37°C. 100µl dari larutan *solubilization* ditambahkan ke masing-masing *well* dengan pencampuran untuk menjamin kelarutan yang sempurna. Sel-sel yang hidup akan mengubah MTT menjadi kristal formazan berwarna ungu. Jumlah dari formazan diukur dengan mengukur perubahan dengan Elisa Reader pada panjang gelombang 595 nm menggunakan *inverted microscope*.

4.9.7 Pembenihan (*seeded*) hUCMSCs pada *scaffold* HA-TCP (Kamadjaja, 2014)

Persiapkan *96-wellplate* lalu letakkan bentukan *scaffold* HA-TCP sebanyak 2 mikrogram ke dasar sumuran lalu campurkan medium yang berisi hUCMSCs

sebanyak 2×10^6 lalu diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37° C dan CO_2 5%, lalu dibiarkan selama 1x24 jam, suspensi siap diaplikasikan pada daerah defek yang terjadi pada hewan coba.

4.9.8 Pembuatan *bone loss* pada model *periimplantitis*

Hewan yang memenuhi kriteria inklusi diletakkan pada kandang tersendiri selama 1 minggu untuk proses aklimatisasi dengan makanan. Pada saat perlakuan tikus dilakukan anestesi menggunakan kombinasi *ketamine* 10% dan *xylazine* dengan perbandingan 50:10 yang diinjeksikan pada intramuskular di muskulus *semi tendonosus* sebagai induksi anestesi di *gluteus*. Bulu pada daerah *femur* yang akan dipasang implan dicukur dan dibersihkan alcohol 80%. Alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu di dalam *autoclave*. Dilakukan insisi sepanjang 10 mm pada daerah lateral *femur* sampai ke menembus permukaan tulang. Dilakukan *drilling sequence* sesuai dengan panjang dan diameter implan menggunakan irigasi saline dengan kecepatan tidak lebih dari 1500 rpm. Dilakukan *implant placement* pada daerah osteotomi permukaan lateral *femur* sampai didapatkan *primary stability* dari implan.

In vivo Gen LPS-PG Ultrapure 1 mg dengan sediaan yang sudah jadi digunakan sebagai bahan pembuat *periimplantitis*. Pembuatan cairan LPS didapat dengan cara mengencerkan 1 mg LPS dalam 1 ml pelarutnya sehingga menghasilkan dosis $1 \mu\text{g}/0,01$ ml. Kemudian LPS dikemas dalam mikrotube, untuk menghindari LPS terkontaminasi maka satu mikrotube untuk satu kali induksi. Mikrotube berisi LPS sebanyak 10 mikroliter diinduksikan menggunakan *Hamilton syringe* pada daerah *socket implant* sebelum implan dipasang. Setelah LPS

diinduksikan dilanjutkan dengan insersi implan lalu disuturing menggunakan 4-0 vicryl. Setelah perlakuan selesai tikus diletakkan dalam kandang, 1 ekor dalam 1 kandang terpisah, lalu ditunggu hingga 30 hari untuk memberi kesempatan terjadi peradangan.

4.9.9 Prosedur injeksi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pasca *seeded* pada *femur* tikus *bone loss*

Gelatin 2% (0,2 g dalam 10 ml) dilarutkan dalam NaCl 0,15 M dan 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes)buffer 25 mM pada pH 7.0, kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave*. Sediaan granul *scaffold* HA+TCP sebanyak 2 mikrogram *diseeded* dengan menggunakan hUCMSCs sebanyak 1×10^5 hingga bentukan berupa menjadi semi solid.

Hewan tikus dilakukan anestesi menggunakan kombinasi ketamine 10% dan Xylazine dengan perbandingan 50:10 yang diinjeksikan pada intramuskular di muskulus *semi tendonosus* sebagai induksi anestesi di *gluteus*. Pada daerah yang terdapat implan di *femur*, dilakukan insisi kembali untuk melihat posisi *bone loss* pada daerah peri implan. Sel hUCMSCs dengan konsentrasi sel 2×10^6 setara dengan 500.000 sel dalam 50 μ l α MEM yang telah di *seeded scaffold* HA+TCP diaplikasikan pada defek tulang tikus yang mengalami *bone loss* menggunakan mikropipet kemudian dilanjutkan penutupan luka kembali dengan jahitan dan ditunggu selama 14 hari dan 28 hari.

4.9.10 Terminasi hewan coba dan pengambilan spesimen penelitian (Gage, 2012)

Tikus diberi anestesi dengan ketamin 10% sebanyak 1 cc dan ditambahkan Xylaxine sebanyak 1cc lalu diinjeksikan di intramuscular pada muskulus semi

tendonosus sebagai induksi anestesi di gluteus. Kemudian dilakukan tehnik perfusi menggunakan cairan formalin *Para formal adehid* (PFA). Setelah tikus mati, dilakukan irisan pada kulit dan pembuangan jaringan lunak dan otot pada *femur* kanan. Spesimen yang diperiksa adalah potongan *femur* yang terdapat implan didalamnya, direndam di dalam larutan fiksasi *buffered formalin* 10% minimal selama 8 jam sebelum dilakukan proses dekalsifikasi.

Spesimen penelitian direndam dalam larutan *Ethylene Dianine Tetra Acetic Acid* (EDTA) 10% dengan volume sebanyak 50 kali volume bahan yang diperiksa. Kemudian diamati untuk memastikan adanya gelembung udara yang keluar, untuk memastikan bahwa proses dekalsifikasi berjalan dengan baik. Larutan EDTA diganti tiga hari sekali, supaya reaksi dekalsifikasinya sempurna. Apabila gelembung udara sudah tidak ada, maka kemungkinan spesimen telah menjadi lunak (dikonfirmasi dengan tusukan jarum). Setelah proses dekalsifikasi selesai, dilanjutkan dengan pemrosesan spesimen untuk pemeriksaan histopatologi dan imunohistokimia.

4.9.11 Pemrosesan dan pemeriksaan spesimen penelitian (Rahawy. A, 2021)

Spesimen penelitian kemudian dicuci dengan PBS 3-5 kali untuk membersihkan jaringan dari kontaminan dan difiksasi dengan larutan bufer formalin 10%. Selanjutnya dilakukan dehidrasi spesimen dengan alkohol konsentrasi bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 90% dan absolut) masing-masing selama 60 menit. Kemudian dilakukan prosedur *clearing* dengan larutan xylol 2x masing-masing selama 60 menit.

Kemudian dilakukan infiltrasi dengan paraffin lunak selama 60 menit. Dilanjutkan dengan *blocking* paraffin keras dalam cetakan dan didiamkan selama 24

jam. Tahapan selanjutnya adalah pemotongan blok paraffin menggunakan *microtome* dengan ketebalan 4-6 μm dan diletakkan pada gelas obyek. Untuk pengecatan dengan *Hematoxylin-Eosin* (HE), *mounting* dilakukan pada gelas obyek menggunakan gelatin 5% sedangkan untuk pengecatan imunohistokimia (IHC) dilakukan *mounting* dengan gelas obyek yang telah dilapisi dengan poly L-lisin.

Pemeriksaan spesimen penelitian menggunakan pewarnaan HE untuk pengamatan luas trabekula tulang dan jumlah osteoblas. Sedangkan pewarnaan imunohistokimia (IHC) dilakukan untuk pengamatan ekspresi TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1.

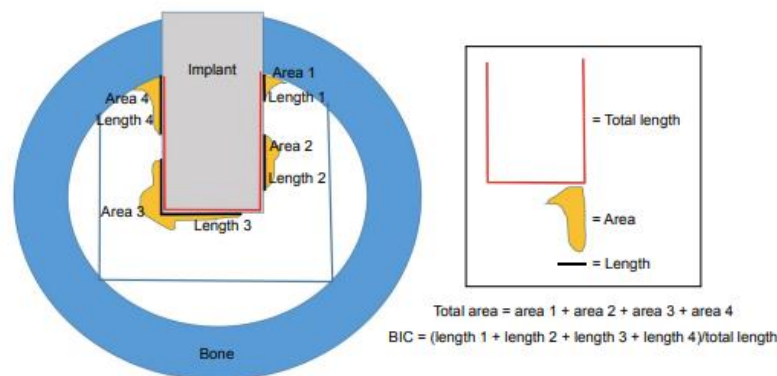
4.9.12 Pewarnaan dan Pembacaan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Sayatan pada gelas obyek dilakukan proses deparafinisasi untuk menghilangkan parafin dari dalam jaringan yang akan diperiksa dengan tahapan berikut. Dilakukan perendaman spesimen di dalam larutan *xylol* sebanyak 2 kali selama 3 menit, kemudian dilakukan perendaman beberapa kali dalam larutan ethanol dengan konsentrasi menurun sebagai berikut: larutan ethanol absolut sebanyak 2 kali selama 3 menit, kemudian larutan ethanol 70% sebanyak 2 kali selama 3 menit, dan kemudian dicuci dengan air mengalir selama 1 menit. Kemudian ditetesi larutan Meyer's hematoksilin selama 6-7 menit, dan dibilas dengan air mengalir selama 1 menit. Selanjutnya sayatan dimasukkan ke dalam larutan eosin selama 1-5menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Setelah itu, sayatan dimasukkan dalam larutan ethanol 70% sebanyak 10 celupan (2 kali), larutan ethanol absolute 10 celupan kemudian direndam ethanol absolute selama 1 menit, kemudian ditetesi larutan *xylol* (3 kali, masing-masing 3 menit). Preparat diangkat satu persatu dari larutan *xylol* dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan

perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pewarnaan dapat diamati dengan mikroskop cahaya.

Pemeriksaan HE terdiri atas pemeriksaan osteoblas, osteoklas dan BIC

1. **Jumlah sel osteoblas:** Merupakan jumlah total sel osteoblas (*surface* osteoblas dan *mesencymal* osteoblas) yang termati pada 20 lapangan pandang berbeda pada pembesaran 1000x.
2. **Jumlah sel osteoklas :** Merupakan penghitungan jumlah sel yang berperan dalam proses resorpsi, yang dibentuk oleh fusi progenitor *mononuclear* dari *monocyte macrophage lineage* dengan bentuk morfologi inti sel lebih dari 1 (Shintcovsk *et al*, 2014). Dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x dengan 20 lapang pandang.
3. **Pemeriksaan BIC (*Bone to-Implant Contact*) :** Merupakan perhitungan panjang dan area keseluruhan tulang baru disekitar implan dibagi dengan total panjang implan yang masuk diarea seluruh tulang. Perhitungannya menggunakan *software image raster* diukur dengan prosentase.



Gambar 4. 2 Perhitungan BIC (*Bone Implant Contact*) (J.M Han, 2016)

Seluruh pemeriksaan ini menggunakan foto sediaan yang di ambil menggunakan kamera digital Panasonic GX-8, kemudian dihitung sediaan tersebut

menggunakan mikroskop cahaya biasa merk Olympus BX-41, dengan pembesaran 1000x yang dilihat pada 20 lapang pandang dan *soft ware* pengolah gambar *Image Raster*.

4.9.13 Pewarnaan *Imunohistochemistry* (IHC) (Sudiana, 2005)

Dilakukan proses deparafinisasi untuk menghilangkan paraffin dari dalam jaringan yang akan diperiksa. Adapun proses deparafinisasi adalah sebagai berikut: sayatan pada gelas obyek dilakukan perendaman spesimen di dalam larutan xylol sebanyak 4 kali selama 3-5 menit yang bertujuan untuk membuang peroksidase endogen., kemudian dilakukan perendaman beberapa kali dalam larutan ethanol absolut dengan konsentrasi menurun sebagai berikut: larutan ethanol absolut sebanyak 3 kali selama 1-3 menit, kemudian larutan ethanol 70% sebanyak 2 kali selama 1-3 menit, dan kemudian dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 kali dengan menggunakan *aquabides*, lalu bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue*. Setelah itu, teteskan H₂O₂ 3% lalu inkubasi dalam suhu kamar selama 5 menit, kemudian cuci dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali dan bersihkan pinggir slide. Kemudian ditetaskan trypsin 0,025%, inkubasi dengan suhu 37°C selama 6 menit, lalu cuci dengan *aquabidest* sebanyak 3 kali, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue*. Selanjutnya, ditetaskan Ultra V Block, inkubasi dalam suhu kamar selama 5 menit, dan bersihkan pinggir *slide* (tidak perlu dicuci). Teteskan monoklonal yang sudah diencerkan (1:100), inkubasi dalam suhu kamar selama ± 25 – 30 menit lalu cuci dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali dan bersihkan pinggir *slide* menggunakan *tissue* pembersih.

Teteskan *Primary Antibody Enhancer* sesuai dengan pemeriksaan yang diinginkan selama 10 menit, inkubasi dalam suhu kamar. Kemudian cuci dengan

menggunakan PBS sebanyak 3 kali, setelah itu bersihkan pinggir slide dengan tissue. Teteskan *Horseradish Peroxidase* (HRP) polymer, inkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Cuci dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali, dan bersihkan pinggir slide dengan *tissue*.

Teteskan kromogen ($20\mu/1\text{ml}$ substrat) sesuai dengan pemeriksaan yang diinginkan, inkubasi pada suhu kamar (dark room), lalu cuci dengan aquabidest sebanyak 3 kali dan bersihkan setelahnya. Pengecatan dengan *Meyer Hematoxylin*, inkubasi pada suhu kamar selama 6 – 15 menit setelah itu cuci dengan air yang mengalir sebanyak tiga kali, dan pencucian terakhir direndam dalam air selama 10 menit. Selanjutnya keringkan dan letakkan di atas *glass objek*.

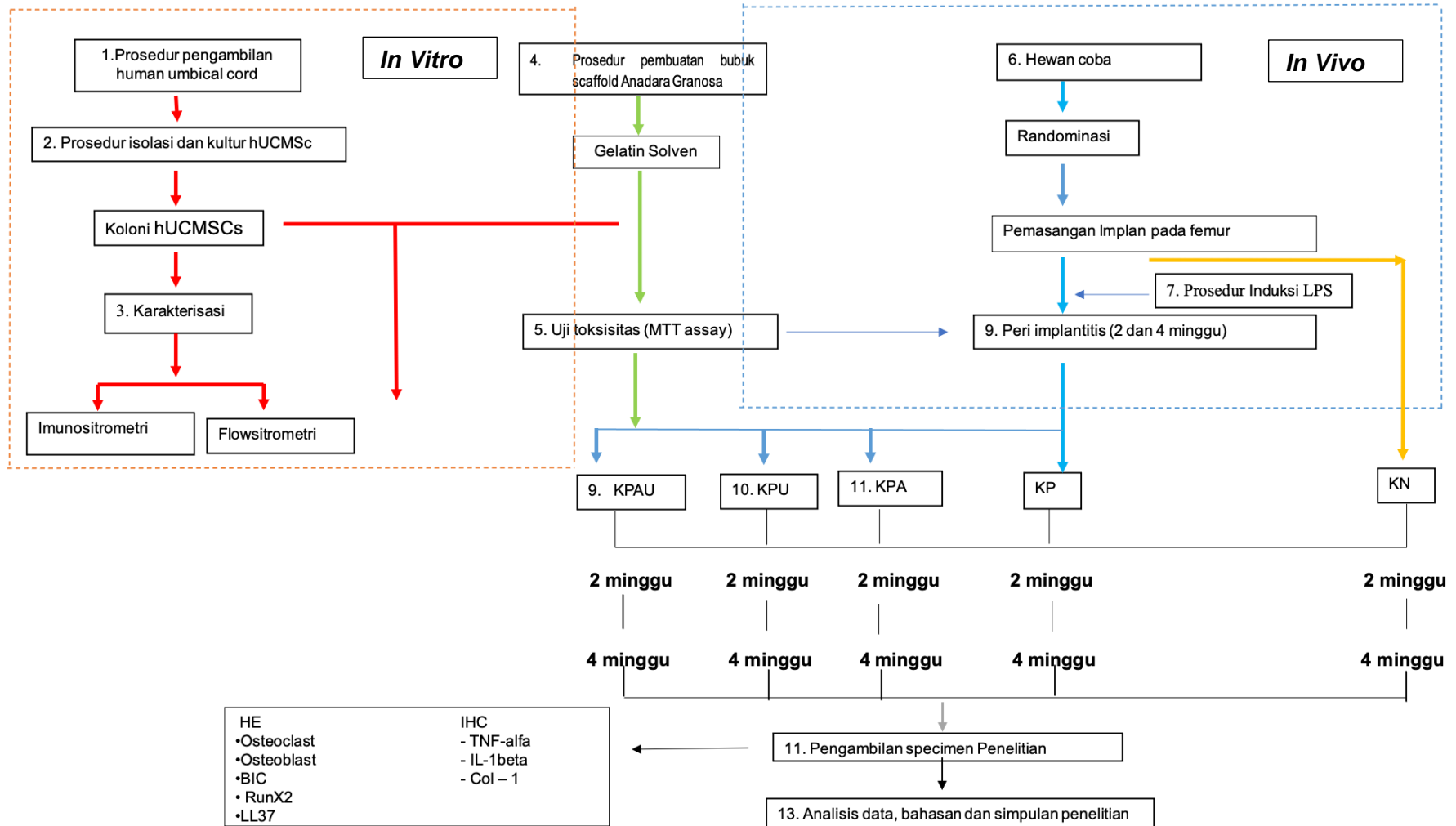
Pewarnaan imunohistokimia yang digunakan pada penelitian ini adalah untuk menentukan pemeriksaan TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, LL-37

1. **Pewarnaan TNF- α :** dilakukan pemberian anti TNF- α *antibody monoclonal mouse* (ABIN3023860, antibodies-online.com®)
2. **Pewarnaan IL-1 β :** dilakukan pemberian anti IL-1 β *antibody monoclonal mouse* (ABIN3201456, antibodies-online.com®)
3. **Pewarnaan Runx2:** dilakukan pemberian Runx2 *antibody monoclonal rat* (clone 4D5) LS-B4294 (LifeSpan BioScience, Inc®)
4. **Pewarnaan COL-1:** dilakukan pemberian COL-1A1, *antibody monoclonal rat* (clone 3C3) LS-C765684 (LifeSpan BioScience, Inc®)
5. **Pewarnaan LL37 :** dilakukan pemberian *Cathelicidin Polyclonal Antibody Rabbit*, (bs-4735R-HRP) (Bioss Antibodies®)

Seluruh pemeriksaan ini menggunakan foto sediaan yang di ambil menggunakan kamera digital Panasonic GX-8, kemudian dihitung sediaan tersebut

menggunakan mikroskop cahaya biasa merk Olympus BX-41, dengan pembesaran 1000x yang dilihat pada 20 lapang pandang dan *soft ware* pengolah gambar *Image Raster 4*

4.10 Alur Penelitian



4.3 Alur Penelitian

Keterangan:

1. (KN2): Kelompok kontrol negatif yang dipasang implan di *femur* dan diterminasi setelah 2 minggu
2. (KN4): Kelompok kontrol negatif yang dipasang implan di *femur* dan diterminasi setelah 4 minggu
3. (KP2) : Kelompok kontrol positif yang dipasang implan di *femur* dan diberi LPS diterminasi 2 minggu
4. (KP4): Kelompok kontrol positif yang dipasang implan di *femur* dan diberi LPS diterminasi 4 minggu
5. (KPA2) : Kelompok perlakuan *periimplantitis* yang diberi *scaffold* HÁ-TCP dan diterminasi setelah 2 minggu
6. (KPA4) : Kelompok perlakuan *periimplantitis* yang diberi *scaffold* HÁ-TCP dan diterminasi setelah 4 minggu
7. (KPU2) : Kelompok perlakuan *periimplantitis* yang diberi hUCMSCs dan diterminasi setelah 2 minggu
8. (KPU4) : Kelompok perlakuan *periimplantitis* yang diberi hUCMSCs dan diterminasi setelah 4 minggu
9. (KPAU2): Kelompok perlakuan *periimplantitis* yang diberi hUCMSCs dan *scaffold* HÁ-TCP, diterminasi setelah 2 minggu
10. (KPAU4): Kelompok perlakuan *periimplantitis* yang diberi hUCMSCs dan *scaffold* HÁ-TCP, diterminasi setelah 4 minggu
 - a. dilanjutkan dengan uji *Multiple Comparison LSD*

- b. Analisis jalur digunakan untuk menganalisis hubungan antara ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, COL-1, osteoblas, osteoklas, BIC pada daerah sekeliling implan
- c. Analisis jalur untuk mengetahui hubungan kausalistik antara hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP terhadap berbagai variabel regenerasi tulang.

4.11 Kelaikan Etik

Kelaikan etik untuk pengambilan sampel tali pusat di Instalasi Rawat Darurat dan Gedung Bedah Pusat Terpadu RSUD dr. Soetomo dan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

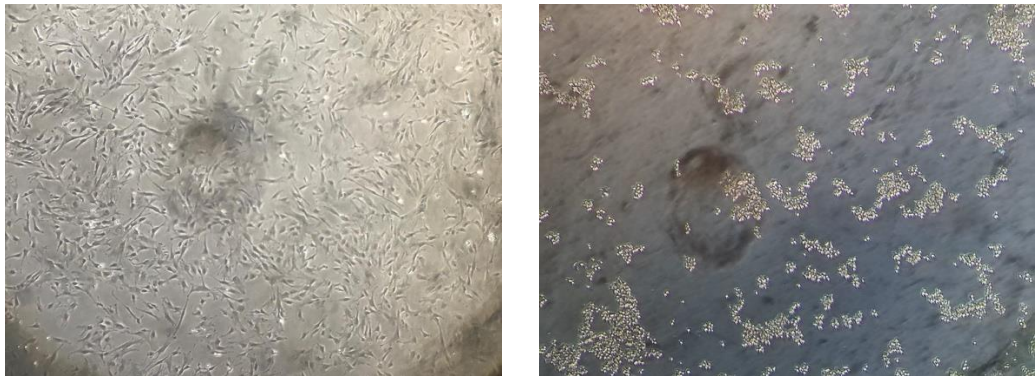
BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1. Deskripsi hasil penelitian *in vitro* (tahap I)

5.1.1 Isolasi dan Kultur hUCMSCs

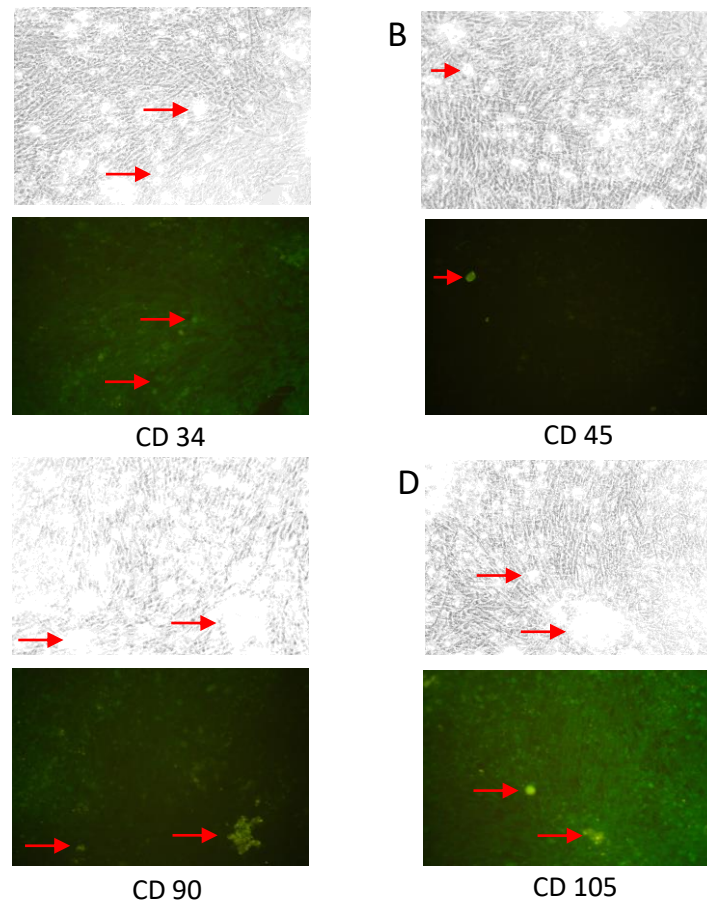
Pada penelitian ini dilakukan isolasi dan karakterisasi hUCMSCs dari plasenta bayi (*umbilical cord*) dilanjutkan dengan kultur hingga passage ke 4 (P4). Morfologi hUCMSCs pada passage keempat menunjukkan bentukan gelondongan (*spindle shape*) confluent 80% dan seperti fibroblast (*fibroblast like-cells*) yang melekat pada dasar kultur *plate*, dapat dilihat pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Morfologi hUCMSCs pada passage keempat berbentuk memanjang dan confluent 80% (*inverted microscope*, pembesaran 200x)

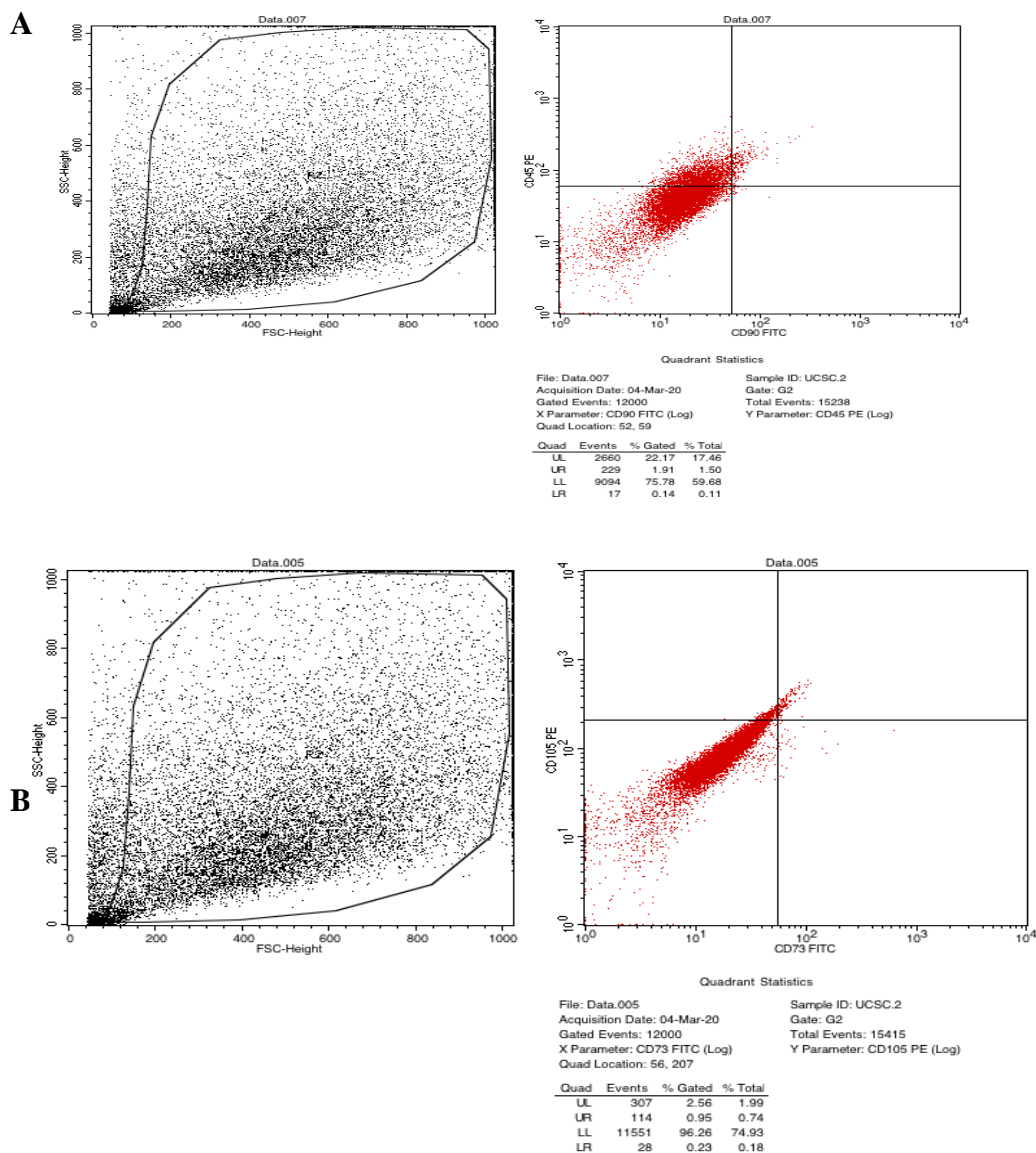
5.1.2 Karakterisasi hUCMSCs

Pemeriksaan dengan metode imunohistokimia (IHC) dengan pewarnaan imunofluoresensi berlabel FITC berwarna hijau pengamatan menggunakan mikroskop cahaya fluoresensi *inverted* dengan pembesaran 100x. Konfirmasi hUCMSCs yang dikultur adalah MSCs dilakukan dengan pengamatan pada positif CD34, ekspresi positif CD45, ekspresi positif CD90, dan ekspresi positif CD105 yang positif berpendar yang dapat dilihat pada gambar 5.2



Gambar 5.2 Morfologi hUCMSCs pada passase keempat menunjukkan bentukan gelondong (*spindle shape*) seperti fibroblast (fibroblast like cells) yang melekat pada dasar plate (tanda panah merah). Pemeriksaan menggunakan pewarnaan imunofluoresensi yang diamati menggunakan mikroskop cahaya fluorosensi inverted dengan pembesaran 100x. (A) Ekspresi CD34(+); (B) Ekspresi CD45(+); (C) Ekspresi CD90(+); (D) Ekspresi CD105(+) berpendar positif

Pemeriksaan *flowcytometry* dilakukan untuk karakterisasi hUCMSCs sebagai MSCs untuk memperkuat konfirmasi. Hasil pemeriksaan *flowcytometry* dijumpai bahwa hUCMSCs mengekspresikan CD34, tampak pada gambar 5.3

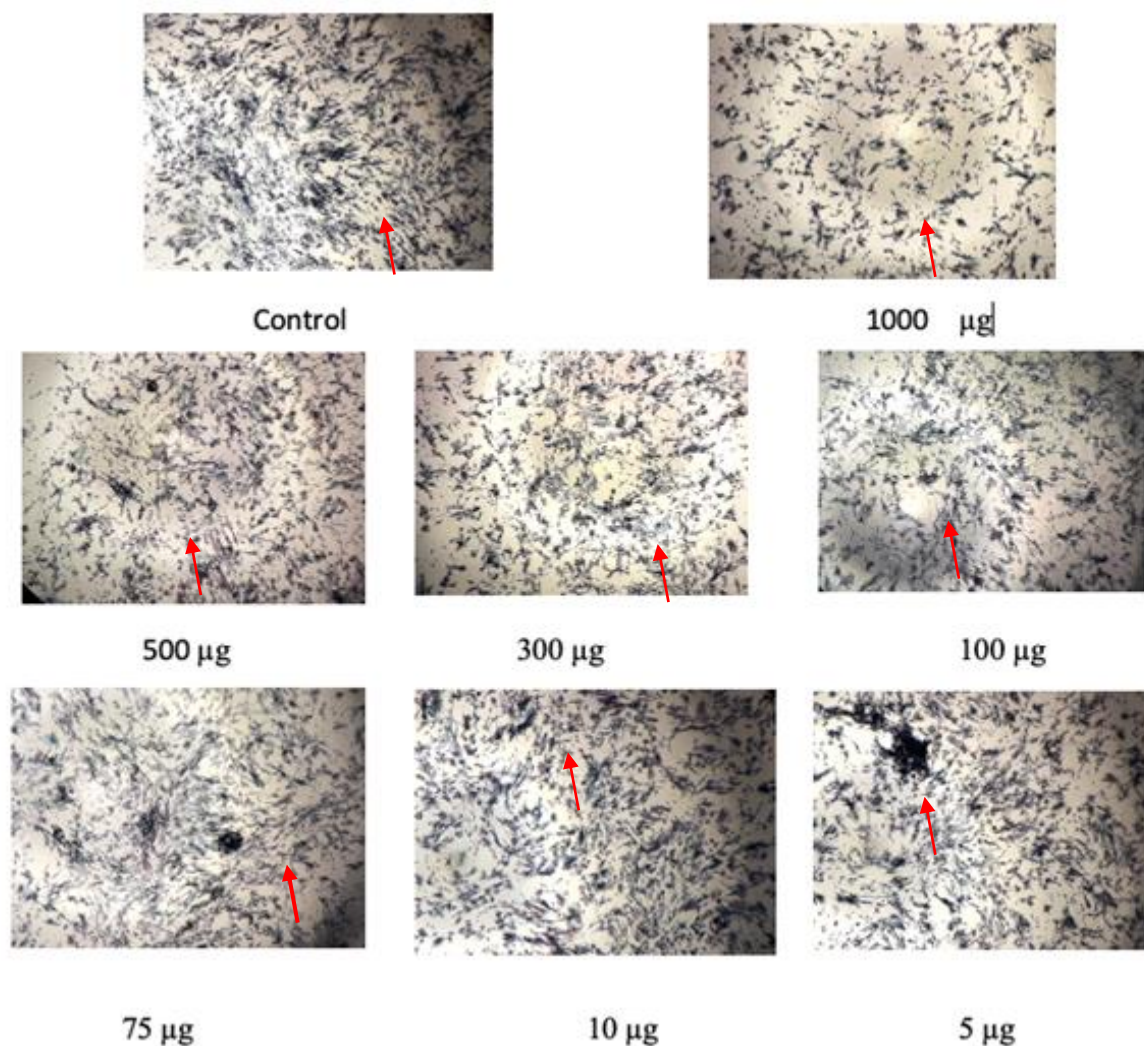


Gambar 5.3 Karakterisasi hUCMSCs passage keempat dengan pemeriksaan *flowcytometry*. A. hUCMSCs mengekspresikan (+) CD90 dan ekspresikan (+) CD 45; B. hUCMSCs mengekspresikan petanda MSCs yaitu (+)CD73, (+)CD105

5.1.3 Uji viabilitas hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP

Uji viabilitas hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP dilakukan dengan menggunakan MTT-Assay. Uji viabilitas ini dilakukan menggunakan hUCMSCs pada *passage* kelima. Sel hUCMSCs yang hidup akan memetabolisme MTT membentuk kristal formazan yang berwarna ungu (*crystal violet*). Variasi berat *scaffold* HA-TCP yang diujikan pada hUCMSCs adalah 5 μg , 10 μg , 50 μg , 75 μg , 100 μg , 300 μg , 500 μg , 1000 μg . Kristal formazan terbentuk pada hUCMSCs yang dipapar dengan variasi berat *scaffold* HA-TCP pada gambar 5.4.

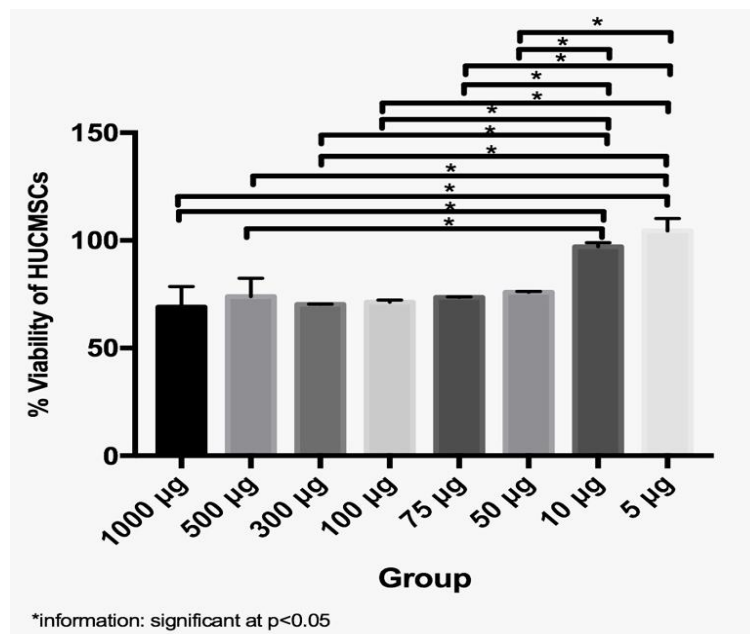
Persentase viabilitas hUCMSCs setelah dipapar dalam beberapa variasi berat *scaffold* HA-TCP menunjukkan data tidak terdistribusi normal dan homogen (Tabel 5.1). Persentase viabilitas hUCMSCs yang dipapar oleh variasi berat *scaffold* HA-TCP tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan uji MTT *assay* . Viabilitas hUCMSCs diatas 50% yang artinya *scaffold* HA-TCP dengan variasi berat yang diberikan kepada hUCMSCs bersifat tidak toksik.



Gambar 5.4 Bentuk kristal formazan berwarna biru keunguan (tanda panah merah) hasil reaksi MTT *assay* dijumpai pada hUCMSCs yang diberi *scaffold* HA-TCP dengan dosis 5 µg , 10 µg , 50µg, 75 µg, 100 µg, 300 µg, 500 µg, 1000 µg yang diamati dengan mikroskop cahaya *inverted* (Olympus, Tokyo, Jepang dengan pembesaran 400)x

Tabel 5.1 Deskripsi mean, simpang baku (SD) dan uji beda antar kelompok (Anova) hasil persentasi viabilitas hUCMSCs setelah diberi *scaffold* HA-TCP

Groups (Dose) (μg)	Viability Percentage (%) of HUCMSCs	Normality test	Homogeneity Test	ANOVA
Kontrol	0.47 ± 0.02		0.56	0.00
1000	69.11 ± 9.39	0.05		
500	73.93 ± 8.47	0.31		
300	70.31 ± 0.16	0.05		
100	71.33 ± 1.00	0.53		
75	73.56 ± 0.27	1.00		
50	75.88 ± 0.42	0.63		
10	97.12 ± 1.85	0.58		
5	104.45 ± 5.68	0.42		



Gambar 5.5 Diagram batang mean dan simpang baku (SD) persentase viabilitas hUCMSCs setelah diberi *scaffold* HA-TCP dianalisa dengan MTT assay

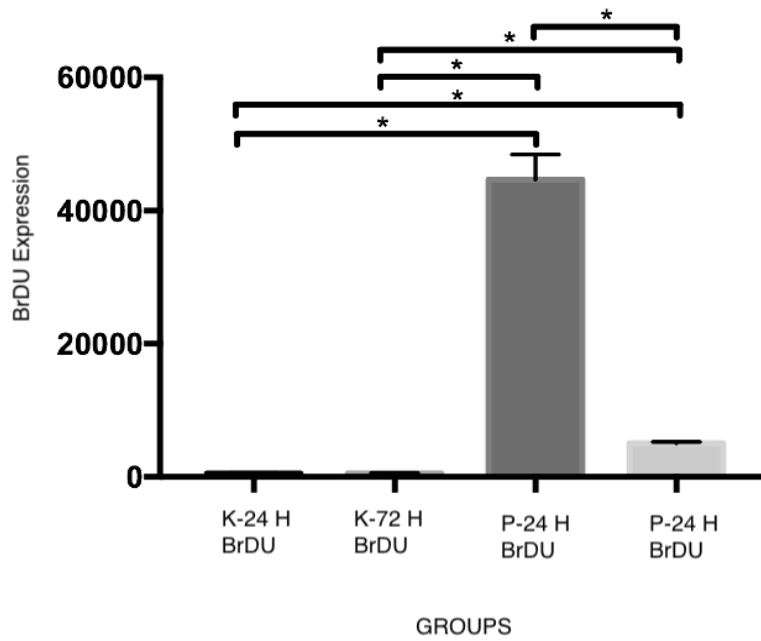
5.1.4 Uji perlekatan *scaffold* HA-TCP pada hUCMSCs menggunakan *BrDU* dengan pemeriksaan *confocal lightning scanning microscope* (CLSM)

Uji perlekatan hUCMSCs pada *scaffold* HA-TCP dilakukan selama 24 jam dan 72 jam secara *in vitro*. Sel hUCMSCs yang digunakan adalah pada *passage* keenam yang telah di *seeded* dengan *scaffold* HA-TCP sebanyak 1,5 μ g menggunakan BrDU selama 24 jam dan 72 jam Uji perlekatan dilakukan menggunakan pemeriksaan *confocal lightning scanning microscope* (CLSM) (Olympus FV1000, Tokyo, Japan) dengan pembesaran 400x, dihitung jumlah hUCMSCs yang melekat terhadap *scaffold* HA-TCP pada 24 jam dan 72 jam (Tabel 5.2). Hasil perlekatan terbanyak ditemukan pada waktu 24 jam setelah di *seeded* oleh *scaffold* HA-TCP (gambar 5.6). Ekspresi perlekatan hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP dapat diketahui dengan pendaran cahaya yang tampak paling kuat pada *seeded* ke 24 jam (gambar 5.7)

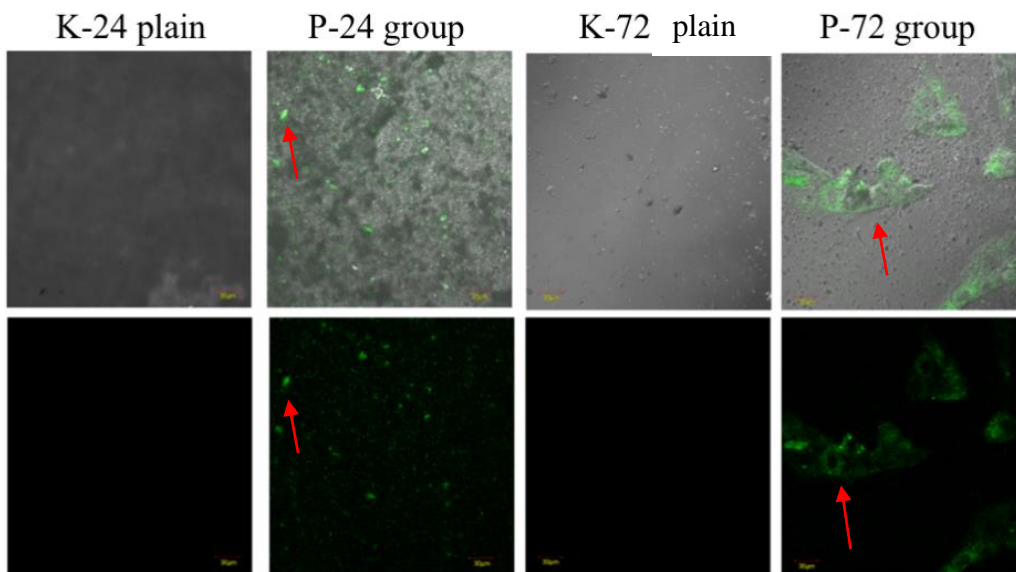
Tabel 5.2 Deskripsi rerata, standar deviasi (SD) dan uji *Mann-Whitney* pada perlekatan hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP setelah di *seeded* selama 24 jam and 72 jam.

Groups (Time)	Mean \pm SD	Normality Test (<i>Shapiro-Wilk</i>)	Homogeneity Test (Levene Test)	Mann-Whitney
K-24 H BrDU	499.75 \pm 51.4	0.942		0.019**
K-72 H BrDU	509.00 \pm 120.08	0.729		
P-24 H BrDU	44675.25 \pm 3740.54	0.865	0.0001*	
P-72 H BrDU	5069.50 \pm 213.15	0.913		

Information: *data was not homogenous revealed with Levene's test $p < 0.05$; **significant different between groups $p < 0.05$.



Gambar 5.6 Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) perlekatan hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP menggunakan BrDU pada 24 jam dan 72 jam. *informasi ada perbedaan signifikan antara perlekatan hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP dengan analisis *Kruskall Wallis*



Gambar 5.7 perlekatan hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP dengan variasi waktu 24 jam dan 72 jam (yang bertanda merah) dengan pembesaran 400x

5.2 Deskripsi hasil penelitian *in vivo* (tahap II)

Setelah melakukan penelitian *in vitro* hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP maka penelitian dilanjutkan secara *in vivo* untuk melakukan evaluasi pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada tikus yang telah dipasang implan dan dibuat peradangan dengan diinduksi LPS sehingga menghasilkan model *periimplantitis*. Penelitian dilakukan di laboratorium hewan coba ITD dan laboratorium Stem Cell. Penelitian *in vitro* maupun *in vivo* dimulai sejak Maret 2020 sampai Mei 2022. Seluruh hewan coba pada penelitian ini diperoleh dari pusat pemeliharaan hewan coba di Malang. Penelitian ini telah melalui uji kelaikan etik dari komisi etik penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga (lampiran 2)

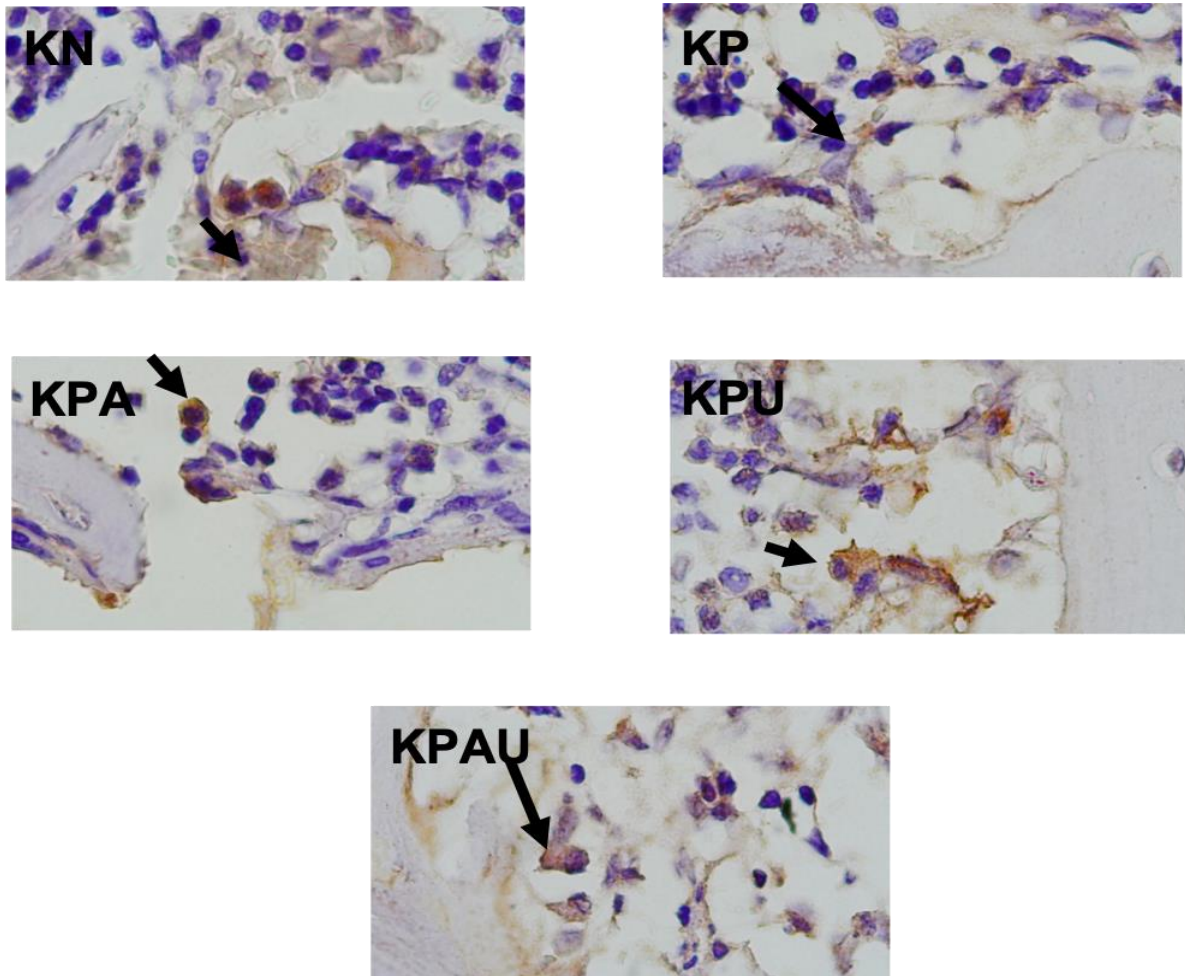
Dari 70 ekor tikus *Wistar* yang digunakan didapatkan dalam kondisi baik, terminasi dilakukan sesuai waktu yang ditentukan di minggu ke-2 dan minggu ke-4. Tujuh puluh tikus tersebut dibagi menjadi 14 ekor kelompok kontrol negatif (KN2 dan KN4), 14 ekor kelompok kontrol positif (KP2 dan KP4), 14 ekor kelompok perlakuan hUCMSCs (KPU2 dan KPU4), 14 ekor kelompok perlakuan *scaffold* HA-TCP (KPA2 dan KPA4), 14 ekor kelompok perlakuan kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP (KPAU 2 dan KPAU4).

Seluruh kelompok tikus mendapatkan pemberian makanan dan minuman yang sama, dalam sanitasi, temperatur dan kelembaban kandang yang sama. Semua tampak menjalani aktivitas normal dan tidak tampak adanya kelainan atau sakit sampai waktu terminasi ditentukan. Tikus diterminasi untuk dilakukan pengambilan *femur* sebelah kanan lalu dilakukan pewarnaan untuk melihat ekspresi LL-37, TNF- α , IL-1 β , Runx2, Kolagen tipe I, sel osteoblas, sel osteoklas dan BIC melalui pemeriksaan HE dan IHC yang selanjutnya dilakukan analisis data terhadap data-data tersebut.

5.2.1 Hasil pemeriksaan imunohistokimia (IHC) variabel inflamasi

5.2.1.1 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi LL-37

Pada hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi LL-37 pada semua kelompok (KN, KP, KPA, KPU, KPAU) ditandai dengan kromogen coklat pada makrofag yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x (gambar 5.8)

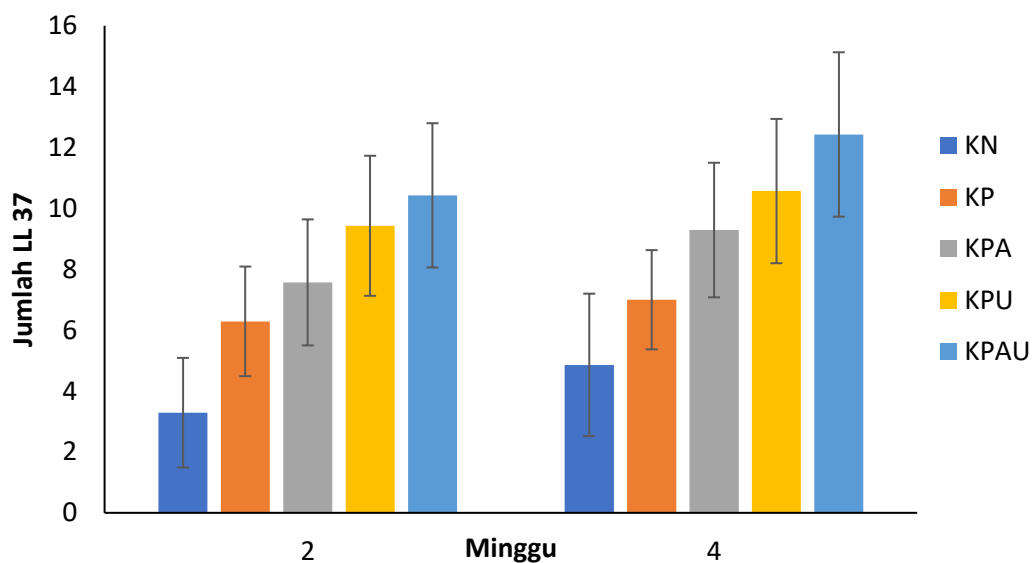


Gambar.5.8 Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia LL-37 pada daerah periimplan (diberi panah dengan pembesaran 1000x)

Tabel 5.3 Deskripsi mean, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas kelompok ekspresi LL37

Kelompok	Minggu		*p		**p
	2	4	2	4	
	Mean \pm SD				
KN	3,29 \pm 1,799	4,86 \pm 2,340	0,200	0,200	0,857
KP	6,29 \pm 1,799	7,00 \pm 1,633	0,200	0,200	
KPA	7,57 \pm 2,070	9,29 \pm 2,215	0,200	0,200	
KPU	9,43 \pm 2,299	10,57 \pm 2,370	0,200	0,200	
KPAU	10,43 \pm 2,370	12,43 \pm 2,699	0,200	0,124	

*informasi: signifikan normalitas tiap kelompok pada $p > 0,05$ pada antar kelompok
 Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data normal antar kelompok
 **informasi ; signifikan homogenitas antar kelompok, berdasarkan uji Levene test ($p > 0,05$)

Gambar 5.9 Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi LL-37 antar kelompok.*informasi; signifikan pada $p < 0,05$ pada antar kelompok

Tabel 5.4 Hasil Uji *Post-Hoc* LSD LL37

Kelompok	KN2	KN4	KP2	KP4	KPA2	KPA4	KPU2	KPU4	KPAU2	KPAU4
KN2 3,29 ± 1,799										
KN4 4,86 ± 2,340										
KP2 6,29 ± 1,799	*									
KP4 7,00 ± 1,633	*									
KPA2 7,57 ± 2,070	*	*								
KPA4 9,29 ± 2,215	*	*	*							
KPU2 9,43 ± 2,299	*	*	*							
KPU4 10,57 ± 2,370	*	*	*	*	*					
KPAU2 10,43 ± 2,370	*	*	*	*	*					
KPAU4 12,43 ± 2,699	*	*	*	*	*	*	*			

*Keterangan : mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

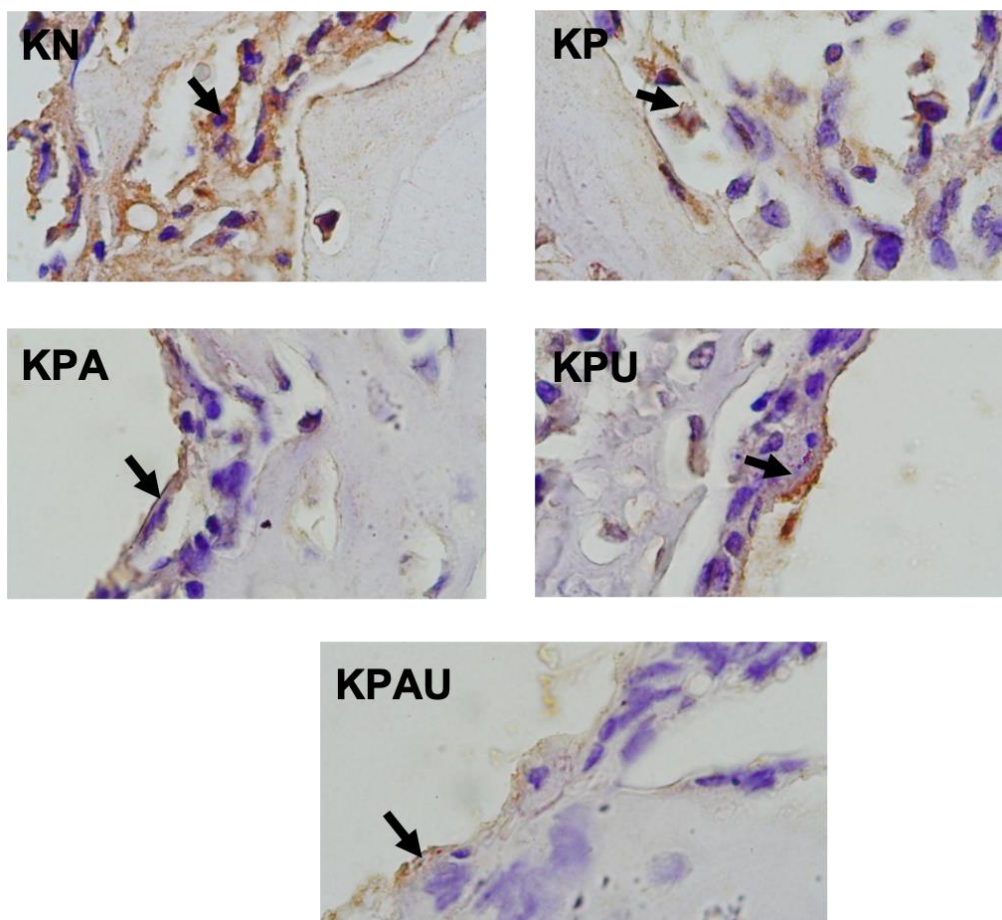
Hasil rerata dan simpang baku (SD) ekspresi LL-37 antar kelompok dapat dilihat pada tabel 5.3. Pada penelitian ini ekspresi LL-37 dijumpai paling tinggi pada kelompok KPAU 4 dan ekspresi paling rendah berada di kelompok KN2. Pada kelompok KN di minggu ke-2 dan minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi LL-37, begitu juga pada kelompok KP minggu ke-2 terhadap KP minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Ekspresi LL-37 pada kelompok KPA di minggu ke-2 dan minggu ke-4 juga tidak tampak perbedaan yang signifikan, hal ini juga tampak pada ekspresi LL-37 pada kelompok KPU2 terhadap KPU4. Pada kelompok KPAU2 terhadap KPAU4 juga tidak tampak adanya perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi LL-37.

Pada kelompok KP2 dan KP4 tidak tampak perbedaan yang signifikan pada ekspresi LL-37 terhadap kelompok KPA2 kecuali pada KPA4 tampak ada perbedaan yang signifikan

dimana $p < 0,05$, sedangkan pada kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok KPU2 maupun KPU4 serta terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$. Pada kelompok KPU minggu ke-2 maupun minggu ke-4 tampak tidak ada perbedaan yang signifikan pada ekspresi LL-37 terhadap kelompok KPAU2 maupun KPAU4, akan tetapi pada kelompok KPU2 nampak perbedaan yang signifikan terhadap kelompok KPAU4. Begitu juga dengan kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$.

5.2.1.2 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi TNF- α

Pada hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi TNF- α dijumpai pada semua kelompok (KN, KP, KPA, KPU, KPAU) ditandai dengan kromogen cokelat pada makrofag yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x (gambar 5.10).



Gambar 5.10 Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia TNF - α pada daerah perimplan (diberi panah dengan pembesaran 1000x)

Tabel 5.5 Deskripsi mean, simpang baku (SD), uji normalitas dan homogenitas antar kelompok ekspresi TNF- α

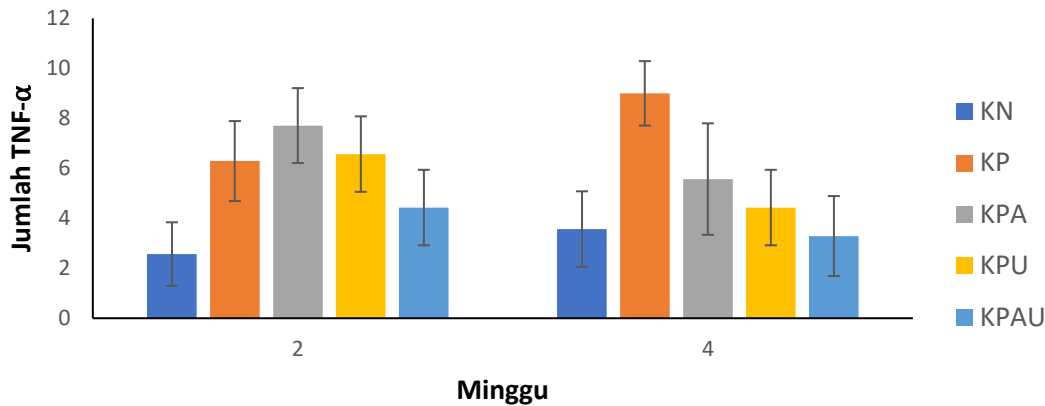
Kelompok	Minggu		p*		**p
	2	4	2	4	
	Mean \pm SD				
KN	2,57 \pm 1,272	3,57 \pm 1,52	0,200	0,200	0,707
KP	6,29 \pm 1,604	9,00 \pm 1,291	0,089	0,200	
KPA	7,71 \pm 1,496	5,57 \pm 2,225	0,200	0,200	
KPU	6,57 \pm 1,512	4,43 \pm 1,512	0,200	0,200	
KPAU	4,43 \pm 1,512	3,29 \pm 1,604	0,200	0,200	

*informasi: signifikan normalitas tiap kelompok pada $p > 0,05$ pada antar kelompok
 Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data normal antar kelompok
 **informasi ; signifikan homogenitas antar kelompok, berdasarkan uji Levene test ($p > 0,05$)

Tabel 5.6 Hasil Uji *Post-Hoc* LSD TNF- α

Kelompok	KN2	KN4	KP2	KP4	KPA2	KPA4	KPU2	KPU4	KPAU2	KPAU4
KN2 2,57 \pm 1,272										
KN4 3,57 \pm 1,52										
KP2 6,29 \pm 1,604	*	*								
KP4 9,00 \pm 1,291	*	*	*							
KPA2 7,71 \pm 1,496	*	*								
KPA4 5,57 \pm 2,225	*	*		*	*					
KPU2 6,57 \pm 1,512	*	*		*						
KPU4 4,43 \pm 1,512	*		*	*	*		*			
KPAU2 4,43 \pm 1,512	*		*	*	*		*			
KPAU4 3,29 \pm 1,604			*	*	*	*	*			

*Keterangan : mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)



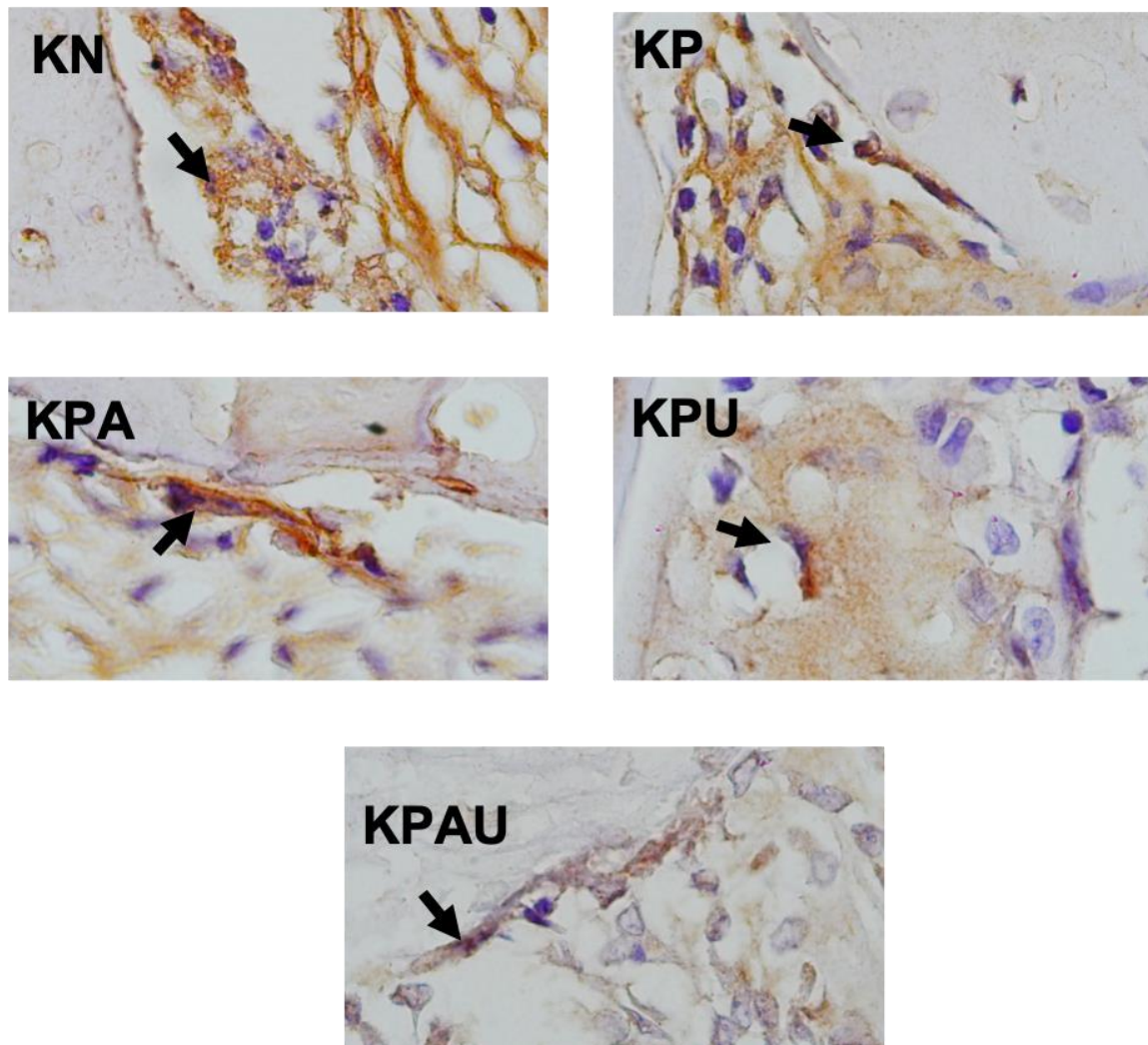
Gambar 5.11 Diagram batang mean dan simpang baku (SD) ekspresi TNF- α antar kelompok

Hasil rerata dan simpang baku (SD) ekspresi TNF- α antar kelompok dapat dilihat pada tabel 5.3 dan gambar 5.9. Penelitian ini menunjukkan ekspresi TNF- α dijumpai paling tinggi pada kelompok KP di minggu ke 4 dan ekspresi paling rendah berada di kelompok KN di minggu ke 4. Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok KN minggu ke 2 dengan seluruh kelompok kecuali pada kelompok KN dan KPAU minggu ke 4 (signifikansi $p < 0,05$). Ekspresi TNF- α pada kelompok KN minggu ke 4 terdapat perbedaan signifikan dengan KP2, KP4, KPA2, KPA4, KPU2 dengan nilai $p < 0,05$, tetapi kelompok KN minggu 4 ini tidak ada perbedaan signifikan dengan KPU4, KPAU2 dan KPAU4. Hal ini diasumsikan bahwa pada kelompok KN ekspresi TNF- α memiliki jumlah yang hampir sama dengan kelompok KPAU. Ekspresi TNF- α pada kelompok kontrol positif (KP) baik di minggu 2 dan minggu 4 memiliki perbedaan signifikan terhadap jumlah ekspresi TNF- α pada kelompok perlakuan kombinasi KPAU minggu 2 dan minggu ke 4, sedangkan dengan kelompok KPA2 dan KPU2 tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Pada kelompok KPA2 jika dibandingkan dengan KPA4 tampak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah ekspresi TNF- α ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok KPU2 jika dibandingkan dengan kelompok KPU4 juga memiliki perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi TNF- α . Pada kelompok kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP menunjukkan ekspresi TNF- α yang menurun di minggu ke-4 hal ini

kemungkinan disebabkan pada minggu ke-4 proses inflamasi sudah mulai menurun dan bahkan hilang sehingga digantikan dengan proses pembentukan tulang atau *bone remodelling*. Pada ekspresi TNF- α di minggu ke 2 dan minggu ke-4 pada kelompok KPAU tidak ada perbedaan yang bermakna.

5.2.1.3 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL-1 β

Pada hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL-1 β pada semua kelompok (KN, KP, KPA, KPU, KPAU) ditandai dengan kromogen coklat pada makrofag yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x (gambar 5.12)

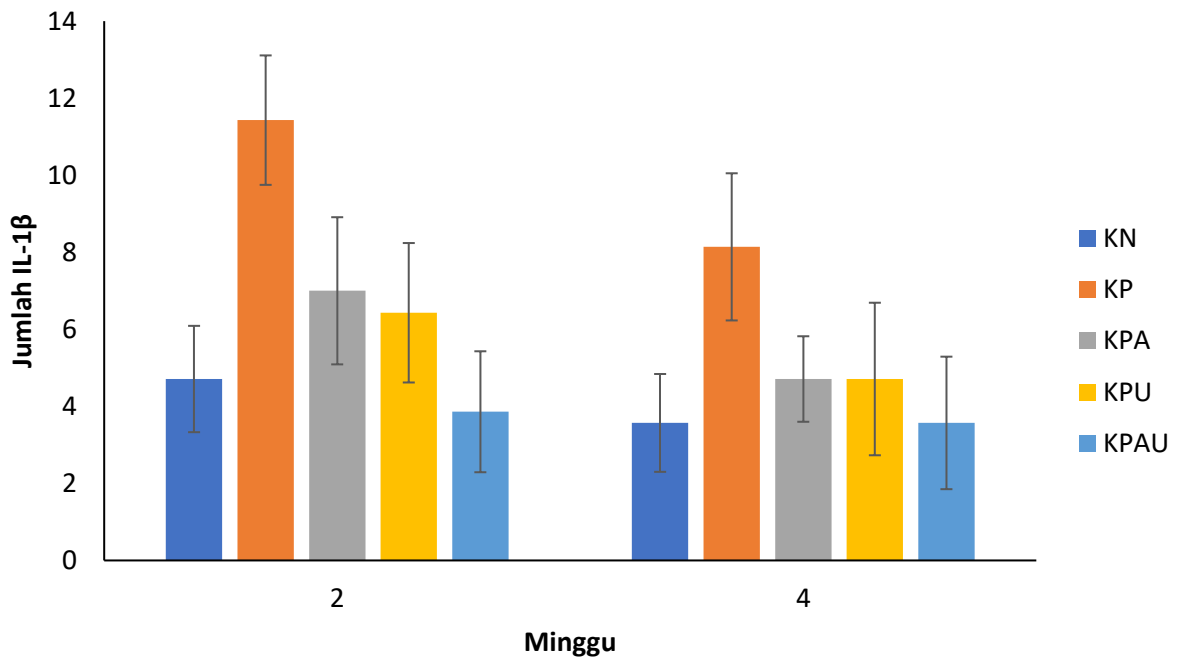


Gambar 5.12. Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia IL-1 BETHA pada daerah peri implan (diberi panah dengan pembesaran 1000x)

Tabel 5.7 Deskripsi mean, simpang baku (SD), uji normalitas dan homogenitas antar kelompok ekspresi IL-1 β

Kelompok	Minggu		p*		**p
	2	4	2	4	
	Mean \pm SD				
KN	4,71 \pm 1,380	3,57 \pm 1,27	0,063	0,200	0,921
KP	11,43 \pm 1,512	8,14 \pm 1,676	0,024	0,200	
KPA	7,00 \pm 1,915	4,71 \pm 1,113	0,200	0,200	
KPU	6,43 \pm 1,813	4,71 \pm 1,976	0,200	0,200	
KPAU	3,86 \pm 1,574	3,57 \pm 1,718	0,200	0,200	

*informasi: signifikan normalitas tiap kelompok pada $p > 0,05$ pada antar kelompok Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data normal antar kelompok
 **informasi ; signifikan homogenitas antar kelompok, berdasarkan uji Levene test ($p > 0,05$)



Gambar 5.13 Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi IL-1 β antar kelompok.
 *informasi; signifikan pada $p < 0,05$ pada antar kelompok

Tabel 5.8 Hasil Uji *Post-Hoc* LSD IL-1 β

Kelompok	KN2	KN4	KP2	KP4	KPA2	KPA4	KPU2	KPU4	KPAU2	KPAU4
KN2 4,71 \pm 1,380										
KN4 3,57 \pm 1,27										
KP2 11,43 \pm 1,512	*	*								
KP4 8,14 \pm 1,676	*	*	*							
KPA2 7,00 \pm 1,915		*	*							
KPA4 4,71 \pm 1,113			*	*						
KPU2 6,43 \pm 1,813		*	*							
KPU4 4,71 \pm 1,976			*	*						
KPAU2 3,86 \pm 1,574			*	*	*		*			
KPAU4 3,57 \pm 1,718			*	*	*		*			

*Keterangan : mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

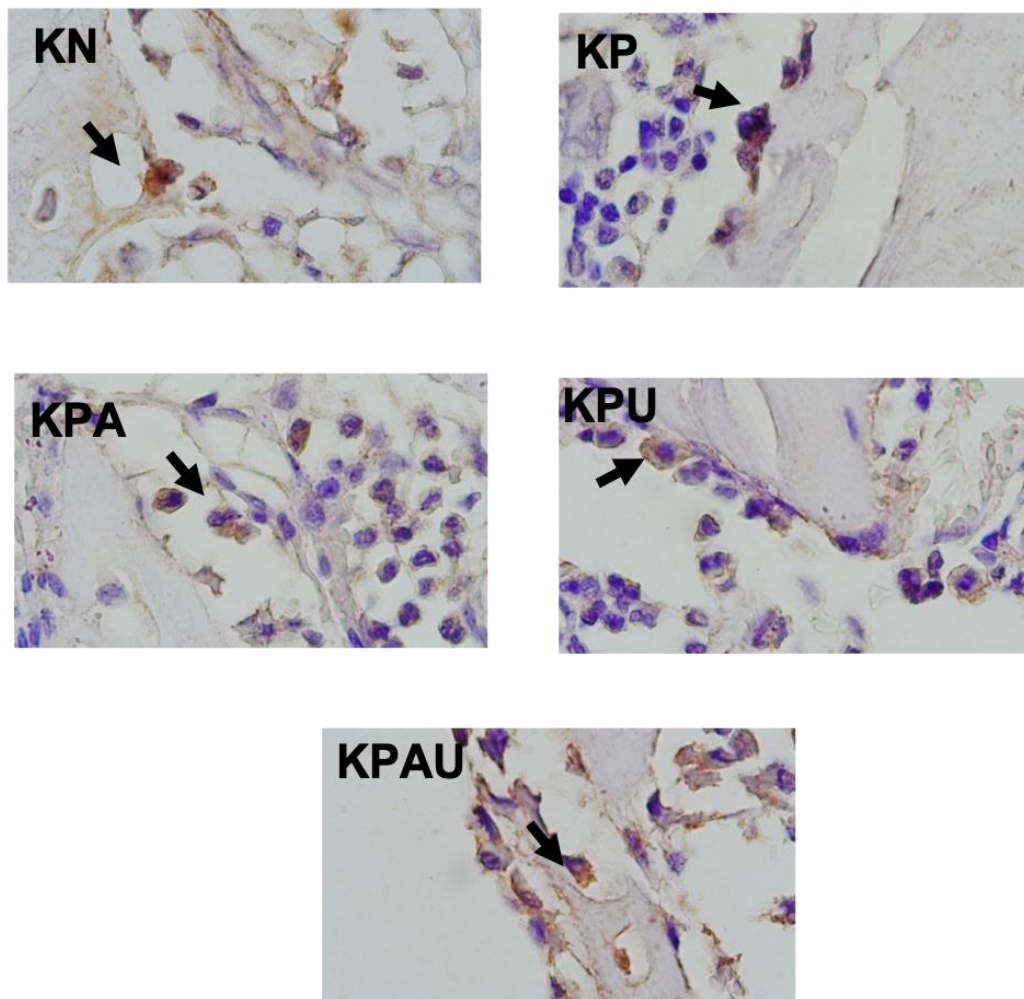
Hasil rerata dan simpang baku (SD) ekspresi IL-1 β antar kelompok dapat dilihat pada tabel 5.3. Penelitian ini ekspresi IL-1 β dijumpai paling tinggi pada kelompok KP di minggu ke-2 dan ekspresi paling rendah berada di kelompok KPAU di minggu ke 2 dan 4. Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok KN minggu ke 2 dengan kelompok KP2, KP4, begitu juga kelompok KN minggu ke 4 terdapat perbedaan signifikan dengan kelompok KP2 dan KP4 dengan $p < 0,05$. Ekspresi IL-1 β pada kelompok KP2 terdapat perbedaan signifikan pada seluruh kelompok, sedangkan pada kelompok KP4 terdapat perbedaan signifikan hanya pada kelompok KN, KPA4, KPU4 serta KPAU minggu ke 2 dan minggu ke 4. Kelompok dengan perlakuan KPA pada minggu ke-2 terhadap minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$), sedangkan pada kelompok KPU2 terhadap KPU4 juga tidak terdapat

perbedaan bermakna, begitu juga pada kelompok KPAU di minggu ke-2 terhadap KPAU minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan signifikan pada ekspresi IL-1 β . Pada kelompok KPA2 jika dibandingkan dengan KPA4 tampak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah ekspresi IL-1 β ($p < 0,05$), sedangkan pada kelompok KPU2 jika dibandingkan dengan kelompok KPU4 juga memiliki perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi IL-1 β . Tidak ada perbedaan yang terlalu bermakna pada kelompok KPAU di minggu ke 2 dan minggu ke 4. Jika ekspresi IL-1 β pada kelompok KP2 dibandingkan dengan kelompok KPA2, KPA4, KPU2, KPU4, KPAU2 dan KPAU4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Ekspresi IL-1 β pada kelompok KP4 terdapat perbedaan yang signifikan hanya pada kelompok KPA4, KPU4, KPAU2 dan KPAU4. Kelompok KPU di minggu ke 2 hanya tampak perbedaan yang signifikan terhadap kelompok KPAU 2 dan KPAU 4. Hal ini dikarena IL-1 β merupakan *marker* pro inflamasi dimana pada kondisi *periimplantitis marker* tersebut mengekspresikan inflamasi, hal ini juga terjadi pada kelompok KPA, KPU dan KPAU dengan jumlah yang lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok kontrol.

5.2.2 Hasil pemeriksaan IHC variabel *remodelling* tulang

5.2.2.1 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Runx2

Pada hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Runx2 pada semua kelompok (KN, KP, KPA, KPU, KPAU) ditandai dengan kromogen coklat pada osteoblas yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x (gambar 5.14)

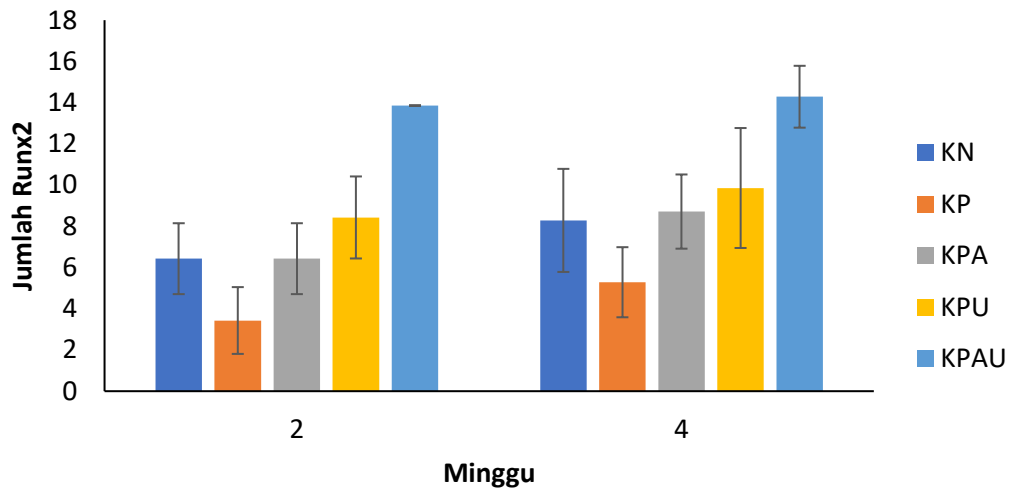


Gambar 5.14 Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia Runx2 pada daerah periimplan (diberi panah dengan pembesaran 1000x)

Tabel 5.9 Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji normalitas dan homogenitas antar kelompok ekspresi RunX2

Kelompok	Minggu		*p		**p
	2	4	2	4	
	Mean ± SD				
KN	6,43 ± 1,718	8,29 ± 2,498	0,200	0,200	0,861
KP	3,43 ± 1,618	5,29 ± 1,704	0,200	0,101	
KPA	6,43 ± 1,718	8,71 ± 1,799	0,200	0,200	
KPU	8,43 ± 1,988	9,86 ± 2,911	0,200	0,200	
KPAU	13,86 ± 2,410	14,29 ± 1,496	0,200	0,200	

*informasi: signifikan normalitas tiap kelompok pada $p > 0,05$ pada antar kelompok
 Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data normal antar kelompok
 **informasi ; signifikan homogenitas antar kelompok, berdasarkan uji Levene test ($p > 0,05$)



Gambar 5.15 Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi RunX2 antar kelompok.
*informasi; signifikan pada $p < 0,05$ pada antar kelompok

Tabel 5.10 Hasil Uji *Post-Hoc* LSD Runx2

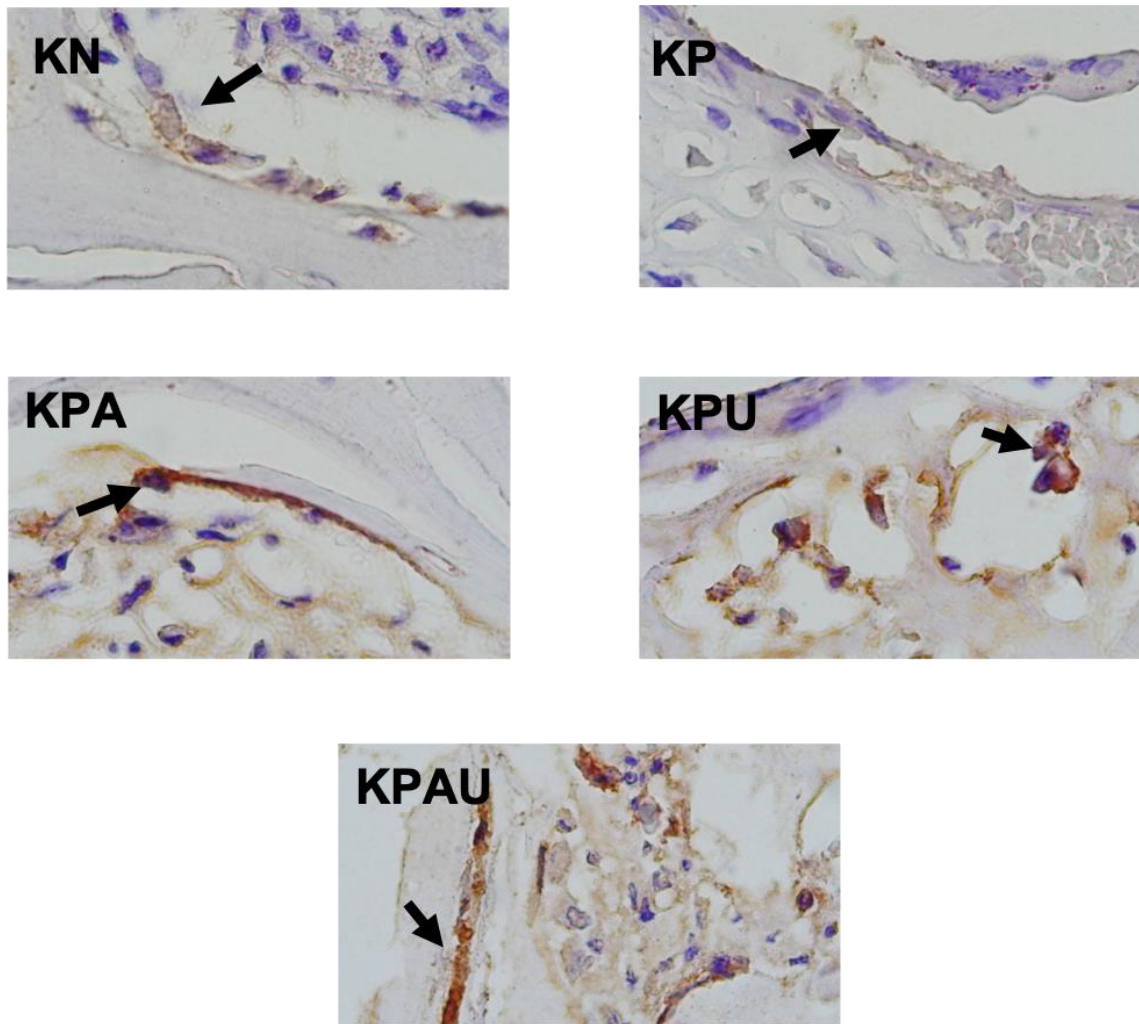
Kelompok	KN2	KN4	KP2	KP4	KPA2	KPA4	KPU2	KPU4	KPAU2	KPAU4
KN2 6,43 ± 1,718										
KN4 8,29 ± 2,498										
KP2 3,43 ± 1,618	*	*								
KP4 5,29 ± 1,704		*								
KPA2 6,43 ± 1,718			*							
KPA4 8,71 ± 1,799			*	*						
KPU2 8,43 ± 1,988			*	*						
KPU4 9,86 ± 2,911	*		*	*	*					
KPAU2 13,86 ± 2,410	*	*	*	*	*	*	*	*		
KPAU4 14,29 ± 1,496	*	*	*	*	*	*	*	*		

*Keterangan : mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

Hasil rerata dan simpang baku (SD) ekspresi Runx2 antar kelompok dapat dilihat pada tabel 5.7. Pada penelitian ini ekspresi Runx2 tampak paling tinggi pada kelompok KPAU di minggu ke-4 dan ekspresi paling rendah berada di kelompok KP di minggu ke-2. Kelompok KN di minggu ke-2 dan minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi Runx2, begitu juga pada kelompok KP minggu ke-2 terhadap KP minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Ekspresi Runx2 pada kelompok KPA di minggu ke-2 dan minggu ke-4 juga tidak ada perbedaan yang signifikan, hal ini juga tampak pada ekspresi Runx2 pada kelompok KPU2 terhadap KPU4, KPAU2 terhadap KPAU4 yang tidak berbeda signifikan. Kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan yang signifikan pada ekspresi Runx2 terhadap kelompok KPA2 maupun KPA4, sedangkan pada kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan yang signifikan juga terhadap kelompok KPU2 maupun KPU4 dan kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$. Pada kelompok KPU minggu ke-2 maupun minggu ke-4 tampak perbedaan yang signifikan pada ekspresi Runx2 terhadap kelompok KPAU2 maupun KPAU4. Begitu juga dengan kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$.

5.2.2.2 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Kolagen 1 (COL-1)

Pada hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Kolagen 1 pada semua kelompok (KN, KP, KPA, KPU, KPAU) ditandai dengan ketebalan serabut-serabut kolagen didalam matrik genesisosteoklas yang memendarkan warna kecoklatan yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x (gambar 5.16)

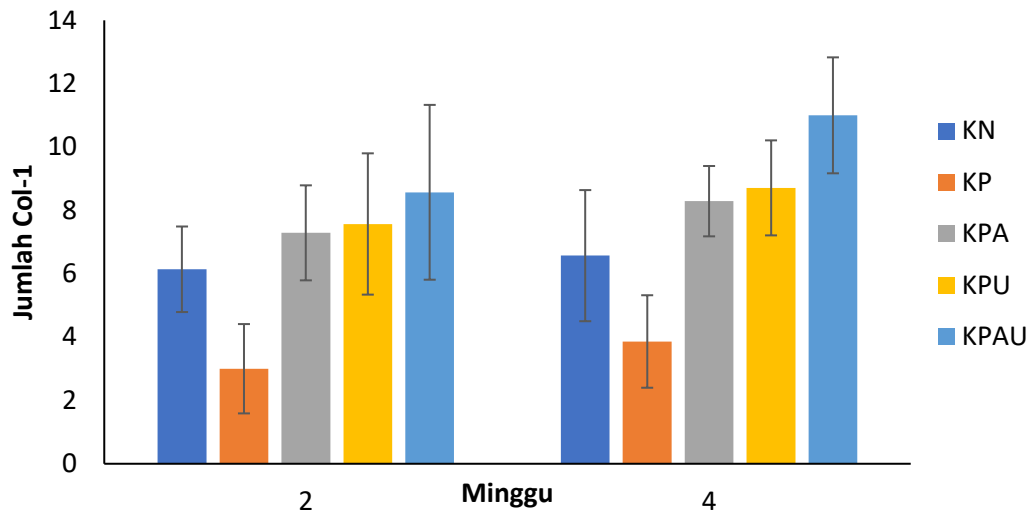


Gambar.5.16 Gambaran hasil pemeriksaan imunohistokimia kolagen 1 (Col1-A1) pada daerah periimplan (diberi panah dengan pembesaran 1000x)

Tabel 5.11 Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas antar kelompok ekspresi COL-1

Kelompok	Minggu		*p		**p
	2	4	2	4	
	Mean ± SD				
KN	6,14 ± 1,345	6,57 ± 2,070	0,200	0,200	0,230
KP	3,00 ± 1,414	3,86 ± 1,464	0,200	0,195	
KPA	7,29 ± 1,496	8,29 ± 1,113	0,200	0,200	
KPU	7,57 ± 2,225	8,71 ± 1,496	0,200	0,200	
KPAU	8,57 ± 2,760	11,00 ± 1,826	0,200	0,105	

*informasi: signifikan normalitas tiap kelompok pada $p > 0,05$ pada antar kelompok Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data normal antar kelompok
 **informasi ; signifikan homogenitas antar kelompok, berdasarkan uji Levene test ($p > 0,05$)



Gambar 5.17 Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi kolagen1(COL-1) antar kelompok.

*informasi; signifikan pada p<0,05 pada antar kelompok

Tabel 5.12 Hasil Uji *Post-Hoc* LSD COL-1

Kelompok	KN2	KN4	KP2	KP4	KPA2	KPA4	KPU2	KPU4	KPAU2	KPAU4
KN2 6,14 ± 1,345										
KN4 6,57 ± 2,070										
KP2 3,00 ± 1,414	*	*								
KP4 3,86 ± 1,464	*	*								
KPA2 7,29 ± 1,496			*	*						
KPA4 8,29 ± 1,113	*		*	*						
KPU2 7,57 ± 2,225			*	*						
KPU4 8,71 ± 1,496	*	*	*	*						
KPAU2 8,57 ± 2,760	*		*	*						
KPAU4 11,00 ± 1,826	*	*	*	*	*			*	*	

*Keterangan : mempunyai perbedaan yang bermakna (p < 0,05)

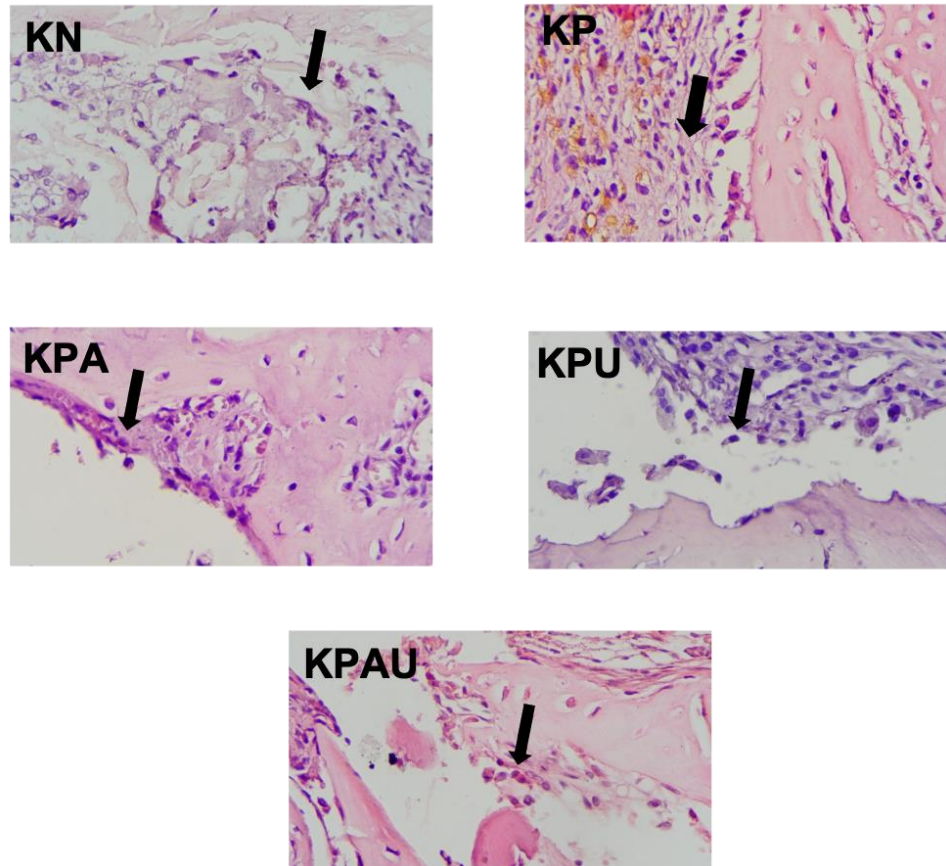
Hasil rerata dan simpang baku (SD) ekspresi COL-1 antar kelompok dapat dilihat pada tabel 5.3. Pada penelitian ini ekspresi COL-1 paling tinggi pada kelompok KPAU di minggu ke 4 dan ekspresi paling rendah berada di kelompok KP di minggu ke 2. Pada kelompok KN di minggu ke-2 dan minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi COL-1, begitu juga pada kelompok KP minggu ke-2 terhadap KP minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Ekspresi COL-1 pada kelompok KPA di minggu ke-2 dan minggu ke-4 juga tidak tampak ada perbedaan yang signifikan, hal ini juga tampak pada ekspresi COL-1 pada kelompok KPU2 terhadap KPU4. Pada kelompok KPAU2 terhadap KPAU4 tampak adanya perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi COL-1.

Pada kelompok KP2 dan KP4 tampak perbedaan yang tidak signifikan pada ekspresi COL-1 terhadap kelompok KPA2 maupun KPA4, sedangkan pada kelompok KP2 dan KP4 juga terdapat perbedaan yang tidak signifikan begitu juga kelompok KPU2 maupun KPU4 serta terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$. Pada kelompok KPU minggu ke-2 maupun minggu ke-4 tampak tidak ada perbedaan yang signifikan pada ekspresi COL-1 terhadap kelompok KPAU2 maupun KPAU4, akan tetapi pada kelompok KPU4 tampak perbedaan yang signifikan terhadap kelompok KPAU4. Begitu juga dengan kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$.

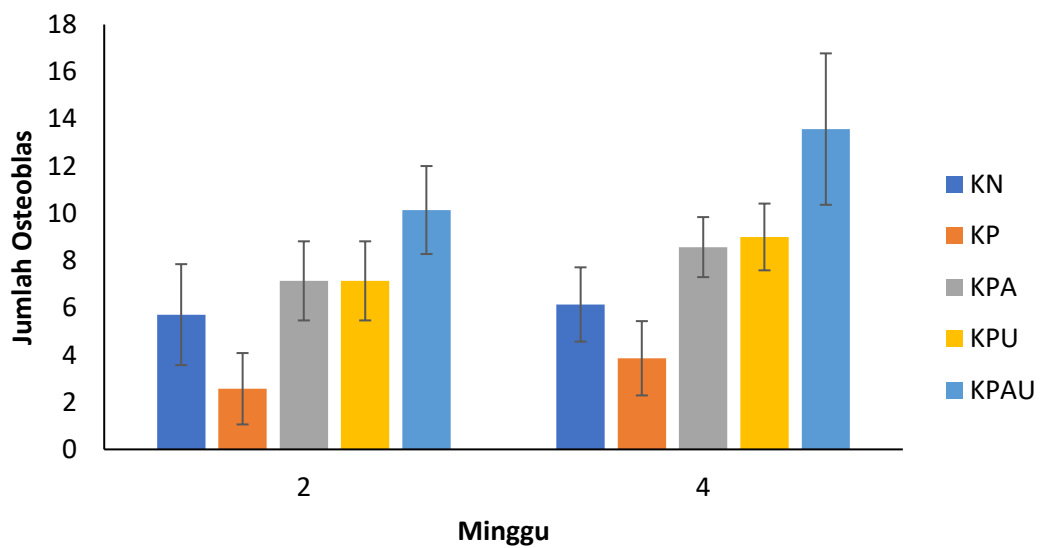
5.2.2.3 Hasil pemeriksaan HE jumlah hitung osteoblas

Pada hasil pemeriksaan *Hematoxylin Eosin* (HE), jumlah osteoblas tampak pada seluruh kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol. Morfologi sel osteoblas yaitu sel berinti tunggal, berbentuk bulat, terletak pada permukaan tulang alveolar yang berada disekeliling area implant mulai dari *cortical bone* hingga kearah bone marrow (tanda panah

hitam) yang diamati pada perbesaran 400x dengan mikroskop cahaya dengan 20 lapang pandang (gambar 5.18).



Gambar 5.18 Gambaran hasil pemeriksaan *Hematoxylin Eosin* (HE) Osteoblas pada daerah periimplan (diberi panah dengan pembesaran 400x)



Gambar 5.19. Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi osteoblas antar kelompok.
*informasi; signifikan pada $p < 0,05$ pada antar kelompok

Tabel 5.13. Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas kelompok jumlah hitung Osteoblas

Kelompok	Minggu		*p		**p
	2	4	2	4	
	Mean ± SD				
KN	3,29 ± 1,799	4,86 ± 2,340	0,200	0,200	0,119
KP	6,29 ± 1,799	7,00 ± 1,633	0,200	0,200	
KPA	7,57 ± 2,070	9,29 ± 2,215	0,142	0,200	
KPU	9,43 ± 2,299	10,57 ± 2,370	0,200	0,200	
KPAU	10,43 ± 2,370	12,43 ± 2,699	0,200	0,200	

*informasi: signifikan normalitas tiap kelompok pada $p > 0,05$ pada antar kelompok
 Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data normal antar kelompok
 **informasi ; signifikan homogenitas antar kelompok, berdasarkan uji Levene test ($p > 0,05$)

Tabel 5.14 Hasil Uji *Post-Hoc* LSD Osteoblas

Kelompok	KN2	KN4	KP2	KP4	KPA2	KPA4	KPU2	KPU4	KPAU2	KPAU4
KN2 3,29 ± 1,799										
KN4 4,86 ± 2,340										
KP2 6,29 ± 1,799	*	*								
KP4 7,00 ± 1,633		*								
KPA2 7,57 ± 2,070			*	*						
KPA4 9,29 ± 2,215	*	*	*	*						
KPU2 9,43 ± 2,299			*	*						
KPU4 10,57 ± 2,370	*	*	*	*						
KPAU2 10,43 ± 2,370	*	*	*	*	*		*			
KPAU4 12,43 ± 2,699	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

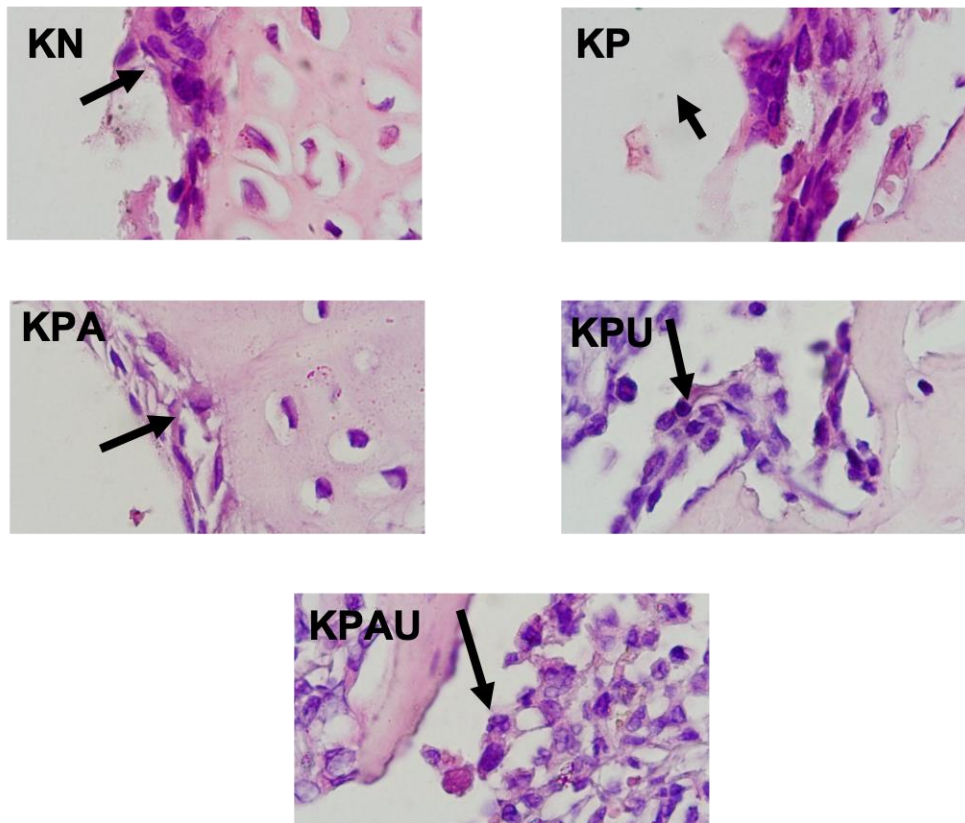
*Keterangan : mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

Hasil rerata dan simpang baku (SD) ekspresi osteoblas antar kelompok dapat dilihat pada tabel 5.3. Penelitian ini menunjukkan ekspresi osteoblas paling tinggi pada kelompok KPAU di minggu ke-4 dan ekspresi paling rendah berada di kelompok KN di minggu ke-2 dan KP minggu ke-2. Pada kelompok KN di minggu ke-2 dan minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi osteoblas, begitu juga pada kelompok KP minggu ke-2 terhadap KP minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Ekspresi osteoblas pada kelompok KPA di minggu ke-2 dan minggu ke-4 juga tidak ada perbedaan yang signifikan, hal ini juga tampak pada ekspresi osteoblas pada kelompok KPU2 terhadap KPU4. Pada kelompok KPAU2 terhadap KPAU4 tampak adanya perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi osteoklas.

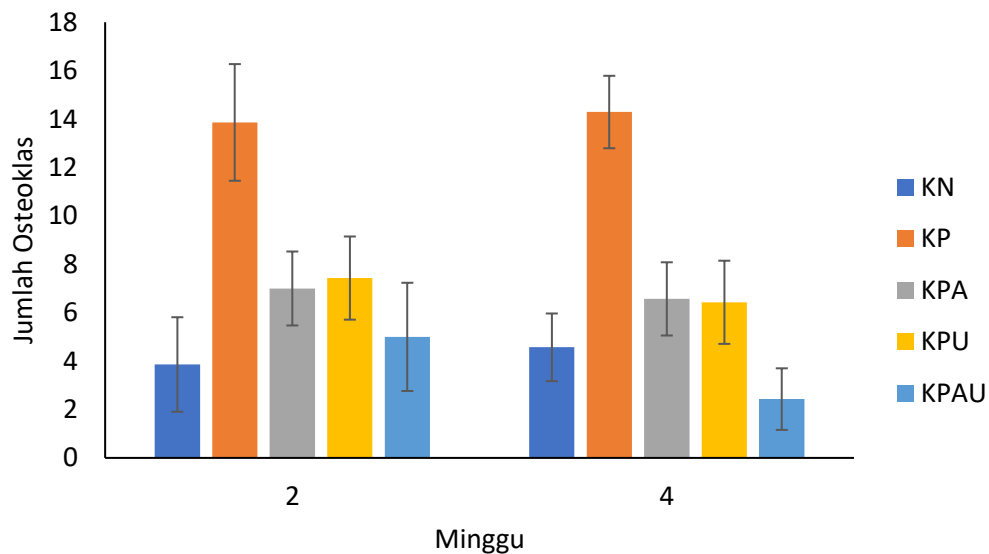
Pada kelompok KP2 dan KP4 ada perbedaan yang signifikan pada ekspresi osteoblas terhadap kelompok KPA2 dan KPA4 dimana $p < 0,05$, demikian juga pada kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok KPU2 maupun KPU4 serta terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$. Kelompok KPU minggu ke-2 tampak ada perbedaan yang signifikan ekspresi osteoblas terhadap kelompok KPAU2 maupun KPAU4, akan tetapi pada kelompok KPU4 nampak perbedaan yang signifikan hanya kelompok KPAU4. Kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$.

5.2.2.4 Hasil pemeriksaan HE jumlah hitung osteoklas

Pada hasil pemeriksaan histopatologi Hematoxylin Eosin (HE), osteoklas dijumpai pada semua kelompok (KN, KP., KPA, KPU, KPAU), Morfologi sel osteoklas yaitu sel berinti banyak, dan berukuran besar, terletak pada permukaan tulang disertai dengan daerah teresorpsi (tanda panah merah) yang diamati pada perbesaran 1000x dengan mikroskop cahaya (gambar 5.20)



Gambar 5.20 Gambaran hasil pemeriksaan *Hematocilin Eosin* (HE) jumlah hitung Osteoklas antar kelompok(diberi panah hitam dengan pembesaran 1000x)



Gambar 5.21. Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) ekspresi osteoklas antar kelompok.
*informasi; signifikan pada $p < 0,05$ pada antar kelompok

Tabel 5.15 Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas antar kelompok jumlah hitung Osteoklas

Kelompok	Minggu		*p		**p
	2	4	2	4	
	Rerata ± SD				
KN	3,86 ± 1,952	4,57 ± 1,397	0,200	0,200	0,119
KP	13,86 ± 2,410	14,29 ± 1,496	0,200	0,200	
KPA	7,00 ± 1,528	6,57 ± 1,512	0,142	0,200	
KPU	7,43 ± 1,718	6,43 ± 1,718	0,200	0,200	
KPAU	5,00 ± 2,236	2,43 ± 1,272	0,200	0,011	

*informasi: signifikan normalitas tiap kelompok pada $p > 0,05$ pada antar kelompok
 Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data normal antar kelompok
 **informasi ; signifikan homogenitas antar kelompok, berdasarkan uji Levene test ($p > 0,05$)

Tabel 5.16 Hasil Uji *Post-Hoc* LSD Osteoklas

Kelompok	KN2	KN4	KP2	KP4	KPA2	KPA4	KPU2	KPU4	KPAU2	KPAU4
KN2 3,86 ± 1,952										
KN4 4,57 ± 1,397										
KP2 13,86 ± 2,410	*	*								
KP4 14,29 ± 1,496	*	*								
KPA2 7,00 ± 1,528	*	*	*	*						
KPA4 6,57 ± 1,512	*	*	*	*						
KPU2 7,43 ± 1,718	*	*	*	*						
KPU4 6,43 ± 1,718	*		*	*						
KPAU2 5,00 ± 2,236			*	*	*		*			
KPAU4 2,34 ± 1,272		*	*	*	*	*	*	*	*	

*Keterangan : mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

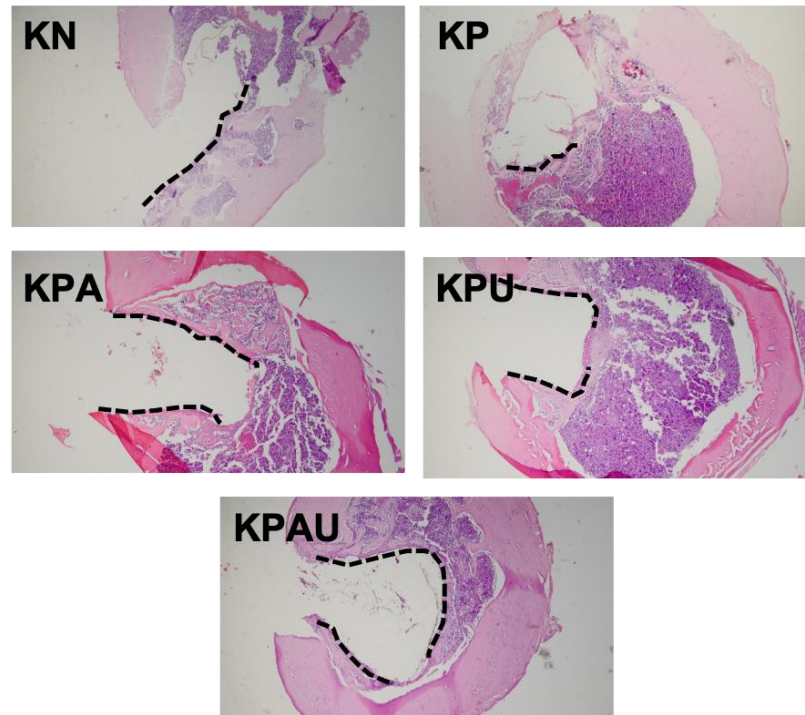
Hasil rerata dan simpang baku (SD) ekspresi osteoklas antar kelompok dapat dilihat pada tabel 5.15. Penelitian ini ekspresi osteoklas paling tinggi pada kelompok KP di minggu

ke 4 dan ekspresi paling rendah berada di kelompok KPAU di minggu ke-4. Pada kelompok KN di minggu ke-2 dan minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi osteoklas, begitu juga pada kelompok KP minggu ke-2 terhadap KP minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Ekspresi osteoblas pada kelompok KPA di minggu ke-2 dan minggu ke-4 juga tidak tampak ada perbedaan yang signifikan, hal ini juga tampak pada ekspresi osteoblas pada kelompok KPU2 terhadap KPU4. Pada kelompok KPAU2 terhadap KPAU4 tampak adanya perbedaan yang signifikan terhadap ekspresi osteoklas dengan nilai $p < 0,05$.

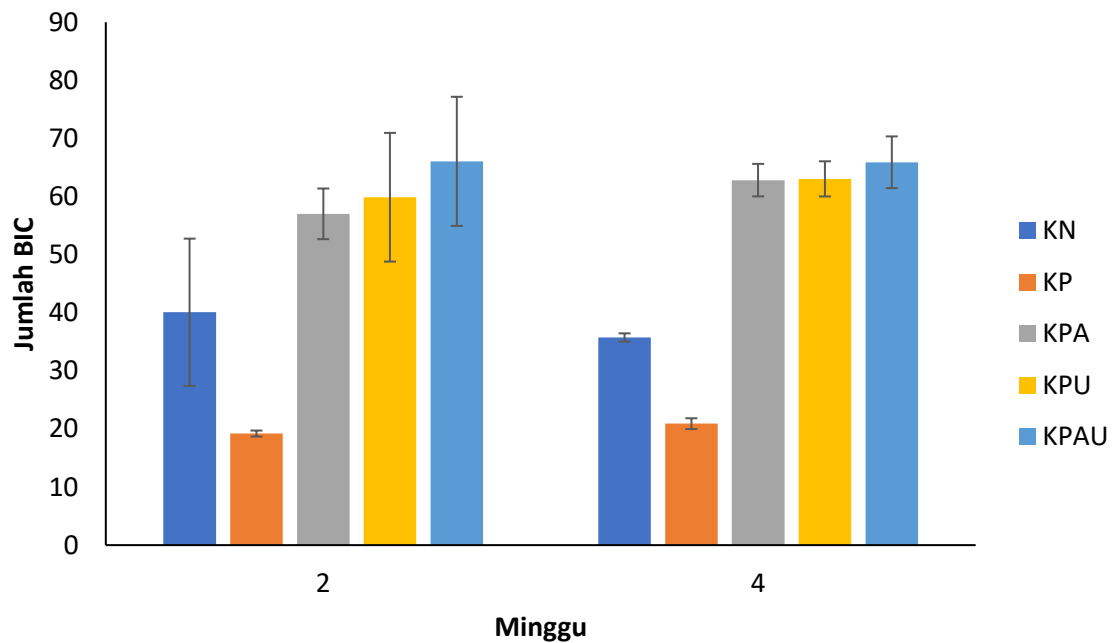
Pada kelompok KP2 dan KP4 tampak perbedaan yang signifikan pada ekspresi osteoklas terhadap kelompok KPA2 dan KPA4 dimana $p < 0,05$, demikian juga pada kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kelompok KPU2 maupun KPU4 serta terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$. Pada kelompok KPU minggu ke-2 tampak ada perbedaan yang signifikan pada ekspresi osteoklas terhadap kelompok KPAU2 maupun KPAU4, akan tetapi pada kelompok KPU4 nampak perbedaan yang signifikan hanya kelompok KPAU4. Pada kelompok KP2 dan KP4 terdapat perbedaan signifikan terhadap kelompok KPAU2 dan KPAU4 yang ditandai dengan nilai $p < 0,05$.

5.2.2.5 Hasil pemeriksaan HE jumlah luas *Bone Implant Contact* (BIC)

Pada hasil pemeriksaan perhitungan luas BIC pada semua kelompok (KN, KP., KPA, KPU, KPAU) merupakan perhitungan panjang dan area keseluruhan tulang baru disekitar implan dibagi dengan total panjang implan yang masuk di area seluruh tulang. (Gambar.5.22)



Gambar 5.22 Gambaran HPA dari hasil pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) terhadap luas area tulang yang terbentuk pada daerah disekeliling implan (BIC) (diberi garis hitam dengan pembesaran 400x)



Gambar 5.23 Diagram batang rerata dan simpang baku (SD) luas *bone implant contact* antar kelompok. *informasi; signifikan pada $p < 0,05$ pada antar kelompok

Tabel 5.17 Deskripsi rerata, simpang baku (SD), uji homogenitas, uji normalitas dan uji beda antar kelompok luas area BIC

Kelompok	Minggu		*p		**p
	2	4	2	4	
	Rerata ± SD				
KN	40,08 ± 12,67	35,74 ± 0,71	0,000	0,200	0,001
KP	19,21 ± 0,51	20,91 ± 0,93	0,200	0,200	
KPA	57,02 ± 4,36	62,82 ± 2,79	0,085	0,200	
KPU	59,87 ± 11,07	63,03 ± 3,02	0,016	0,168	
KPAU	66,05 ± 11,11	65,89 ± 4,44	0,200	0,200	

*informasi: signifikan normalitas tiap kelompok pada $p > 0,05$ pada antar kelompok
 Berdasarkan uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data normal antar kelompok
 **informasi ;signifikan homogenitas antar kelompok, berdasarkan uji Levene test ($p > 0,05$)

Tabel 5. 18 Hasil Uji *Post-Hoc Mann-Whitney U* BIC

Kelompok	KN2	KN4	KP2	KP4	KPA2	KPA4	KPU2	KPU4	KPAU2	KPAU4
KN2 40,08 ± 12,67										
KN4 35,74 ± 0,71										
KP2 19,21 ± 0,51	*	*								
KP4 20,91 ± 0,93	*	*								
KPA2 57,02 ± 4,36	*	*	*	*						
KPA4 62,82 ± 2,79	*	*	*	*	*					
KPU2 59,87 ± 11,07	*	*	*	*		*				
KPU4 63,03 ± 3,02	*	*	*	*	*		*			
KPAU2 66,05 ± 11,11	*	*	*	*						
KPAU4 65,89 ± 4,44	*	*	*	*	*	*	*		*	

*Keterangan : mempunyai perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$)

Hasil rerata dan simpang baku (SD) jumlah BIC antar kelompok dapat dilihat pada tabel 5.17. Pada penelitian ini jumlah BIC dijumpai paling banyak pada kelompok KPAU2

(66,05 ± 11,11) dan KPAU4 (65,89 ± 4,44). Pada kelompok KN diminggu ke-2 dan minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap jumlah BIC, begitu juga pada kelompok KP minggu ke-2 terhadap KP minggu ke-4 tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). Jumlah BIC pada kelompok KPA di minggu ke-2 dan minggu ke-4 tampak ada perbedaan yang signifikan dengan $p < 0,05$, hal serupa juga ditemui pada kelompok KPU2 terhadap KPU4 yang menunjukkan ada perbedaan signifikan terhadap jumlah BIC. Kelompok KPAU2 dan KPAU4 juga terlihat ada perbedaan signifikan terhadap jumlah BIC dengan $p < 0,05$.

Jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang berbeda di minggu yang sama maka KP2 terlihat ada perbedaan yang signifikan dengan kelompok KPA2, KPU2 dan KPAU2. Hal yang sama juga terlihat pada kelompok KP4 terhadap kelompok KPA4, KPU4 dan KPAU4 ada perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,05$.

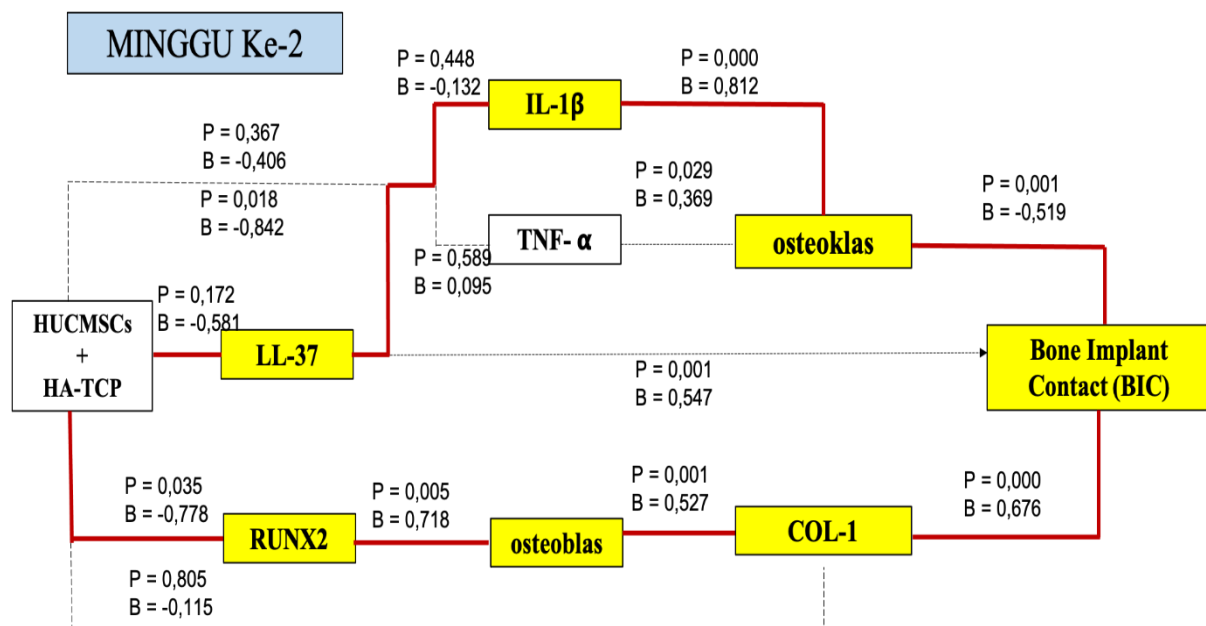
Hal yang berbeda ditunjukkan pada kelompok pemberian *scaffold* HA-TCP (KPA2) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok pemberian hUCMSCs (KPU2) serta pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP (KPAU2) dengan nilai $p > 0,05$. Di minggu ke-4 kelompok KPA4 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok KPU4 ($p > 0,05$), hal ini sama dengan kelompok pemberian hUCMSCs (KPU4) yang tidak berbeda signifikan dengan kelompok KPAU4. Hal yang berbeda terjadi pada kelompok KPA4 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan terapi kombinasi hUCMSCS dan *scaffold* HA-TCP (KPAU4).

5. 3. Hubungan kausalistik antar variabel yang diteliti

Analisis regresi dilakukan untuk mengetahui hubungan kausalistik antar variabel penelitian serta penyebab perubahan variabel penelitian. Penentuan variabel yang dilibatkan dalam analisis regresi menggunakan pertimbangan dari analisis multivariat variabel tergantung serta dasar teori yang melatar belakangi penelitian ini. Nilai positif, menunjukkan arti variabel tergantung juga mengalami peningkatan sebesar nilai b, sedangkan nilai negatif yaitu

variabel bebas mengalami perubahan peningkatan, maka variabel tergantung akan menurun sebesar nilai b . Pola hubungan kausalistik variabel dapat digambarkan pada model hipotesis analisa jalur awal pada minggu ke-2 dan minggu ke-4.

5.3.1 Analisis jalur kausalistik antar variabel kelompok minggu ke-2

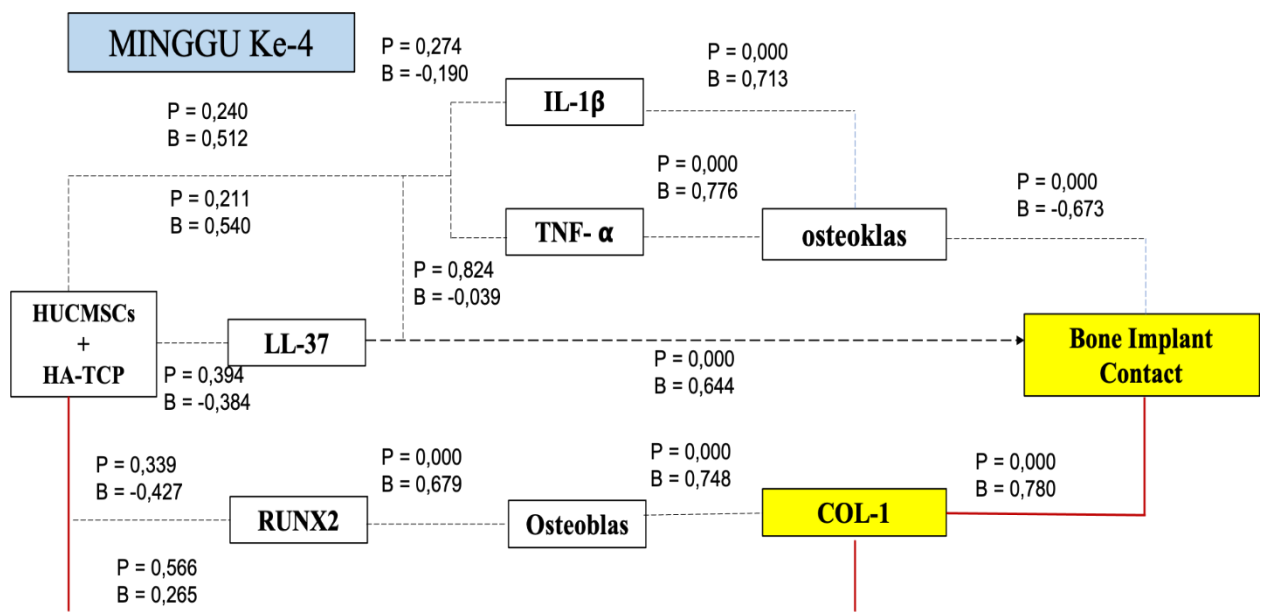


Gambar 5.24 Hasil analisis jalur mekanisme pembentukan BIC yang diberi *scaffold* HA-TCP dan hUCMSCs pada minggu ke-2

Hubungan kausalistik antar variabel penelitian yang diteliti diatas disusun lagi pada hubungan yang memiliki taraf kemaknaan ($p < 0,05$) menjadi analisis jalur akhir. Nilai positif menunjukkan arti bahwa apabila variabel bebas mengalami peningkatan maka variabel tergantung juga mengalami peningkatan, sedangkan nilai negatif menunjukkan arti apabila variabel bebas mengalami penurunan maka variabel tergantung juga mengalami penurunan. Analisis jalur akhir pada minggu ke-2 terdapat 2 analisa jalur yang signifikan yaitu jalur pertama pemberian hUCMSCs + *scaffold* HA-TCP memiliki hubungan terhadap LL-37 ($p = 0,172$; $B = 0,581$) sehingga mempengaruhi IL-1 β ($p = 0,448$; $B = 0,132$) yang berkorelasi terhadap osteoklas ($p = 0,000$; $B = 0,812$) dan *bone implant contact* (BIC) ($p = 0,001$; $B = 0,519$).

Jalur kedua pemberian hUCMSCs + HA-TCP dengan Runx2 ($p=0,035$; $B=-0,778$) dan berkorelasi dengan osteoblas ($p=0,005$; $B=0,718$) sehingga menghasilkan COL-1 ($p=0,001$; $B=0,527$). COL-1 yang terbentuk memiliki hubungan mampu meningkatkan *bone implant contact* (BIC) ($p=0,000$; $B=0,676$).

5.3.2 Analisis jalur kausalistik antar variabel kelompok minggu ke-4



Gambar 5.25 Hasil analisis jalur mekanisme pembentukan BIC yang diberi *scaffold* HA-TCP dan hUCMSCs pada minggu ke-4

Hubungan kausalistik antar variabel penelitian yang diteliti diatas disusun lagi pada hubungan yang memiliki taraf kemaknaan ($p<0.05$) menjadi analisis jalur akhir. Nilai positif menunjukkan arti bahwa apabila variabel bebas mengalami peningkatan maka variabel tergantung juga mengalami peningkatan, sedangkan nilai negatif menunjukkan arti apabila variabel bebas mengalami penurunan maka variabel tergantung juga mengalami penurunan. Analisis jalur akhir pada minggu ke-4 terdapat 1 jalur yang bermakna yaitu hUCMSCs + HA-TCP dengan COL-1 ($p=0,566$; $B=-0,265$) sehingga mampu meningkatkan *bone implant contact* (BIC) ($p=0,000$; $B=0,780$).

BAB 6

PEMBAHASAN

Seiring dengan kemajuan teknologi perawatan *dental implant* merupakan salah satu alternatif pilihan yang dilakukan untuk mengatasi *edentulous area* (Valente and Andreana, 2016). Keberhasilan perawatan implan dipengaruhi beberapa hal diantaranya pemeliharaan yang optimal, dan memahami terhadap indikasi implan. Beberapa pasien diketahui mengalami kegagalan dalam pemasangan implan, atau yang sering disebut dengan *periimplant disease*, yang secara umum disebut sebagai *periimplantitis* (Jepsen S, 2015). *Periimplantitis* adalah suatu kondisi adanya proses inflamasi yang menyerang jaringan disekitar implan yang sudah mengalami osseointegrasi sehingga menyebabkan kerusakan tulang (Newman *et al.*, 2018). *Periimplantitis* disebabkan karena infeksi bakteri yang dimulai dari adanya akumulasi bakteri (Mombelli, 2106). Bakteri penyebab *periimplantitis* yang terbanyak adalah bakteri plak anaerob *Gram negative* yaitu *P.gingivalis* dan *A. actinomycetemcomitans* (Valente and Andreana, 2016).

Saat terjadi *periimplantitis*, bakteri *gram negative* memiliki endotoksin pada dinding sel. Endotoksin pada bakteri *P. gingivalis* disebut dengan *lipopolysaccharide* (LPS) (Dixon and Darveau, 2005; Bainbridge *et al.*, 2008). Pada saat terjadi infeksi oleh LPS, LPS akan melepaskan sel-sel mati yang ditangkap oleh reseptor TLR4 sebagai sinyaling intraseluler yang selanjutnya mengaktifkan *mononuclear phagocytes* (monosit dan makrofag) untuk memproduksi dan melepaskan sitokin proinflamatori TNF- α dan IL-1 β ((Dobrovolskaia, 2002).

Penelitian ini menggunakan LPS *P.gingivalis* untuk membuat model *periimplantitis* pada tikus *Rattus norvegicus* yang diinduksikan saat pemasangan implan pada *femur* kanan. Satu bulan kemudian dilakukan pemeriksaan terjadinya *periimplantitis* dengan menggunakan foto radiografi. Hasil foto radiografi menunjukkan adanya gambaran radiolusen pada daerah disekeliling implan (lampiran 9). Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa LPS dapat menginduksi terjadinya resorpsi tulang (Suda K, 2002). LPS berperan penting dalam menginduksi sitokin proinflamatori IL-1 β , IL-1 α , mengaktifkan reseptor ligan (RANKL) atau TNF- α (Graves, Oates and Garlet, 2011).

Untuk mengatasi terjadinya resorpsi pada tulang maka digunakan teknik rekayasa jaringan menggunakan bahan untuk regenerasi tulang akibat defek yang ditimbulkan karena *periimplantitis* (Newman *et al.*, 2018). Penelitian terapi untuk regenerasi tulang akibat osteoporosis menggunakan *stem cell* yang berasal dari tali pusat (hUCMSCs) mampu meningkatkan jumlah sel osteoblas (Hendrijantini, 2018). Teknik *tissue engineering* dengan menggunakan *stemcells* disarankan dalam perbaikan tulang yang mengalami kerusakan (Liang *et al.*, 2014). hUCMSCs memiliki potensi sebagai terapi *tissue engineering* didalam proses *bone remodelling* yang ditandai dengan terekspresinya Runx2 dan ALP sebagai faktor transkripsi diferensiasi osteogenik. Proses mineralisasi terjadi pada 2 minggu setelah pemberian terapi hUCMSCs yang dibuktikan dengan pemeriksaan menggunakan medium osteogenik *Allizarin Red staining* (Wang, 2011). hUCMSCs secara *in vitro* memiliki kemampuan diferensiasi osteogenik ketika di *seeded* dengan *polycaprolactone-collagen-hydroxyapatite nano-fibrous scaffold* (K Gauthaman, 2010). Penelitian ini menggunakan waktu 2 minggu untuk melihat potensi kombinasi hUCMSCs dan

scaffold HA-TCP terhadap diferensiasi osteogenik, dan 4 minggu untuk melihat jumlah trabekula tulang yang terbentuk di daerah sekitar implan (BIC).

6.1 Isolasi dan Kultur hUCMSCs

Penelitian ini diawali dengan penelitian *in vitro* yaitu dimulai dengan isolasi, kultur, dan karakterisasi hUCMSCs yang berasal dari tali pusat (*human umbilical cord*) bayi pada persalinan perabdominan atau *cesarea* dibawah kondisi yang sangat aseptik. Hal ini bertujuan untuk mencegah terjadinya kontaminasi tali pusat secara efektif. Pengambilan tali pusat pada persalinan pervaginaan, meskipun mudah akan menyebabkan jaringan terkontaminasi terutama oleh jamur, sehingga pengambilan sampel dengan metode *cesarea* akan lebih menjamin sterilitas dari kondisi tali pusat tersebut. Studi Kamadjaja (2014) menunjukkan adanya kontaminasi jamur pada sampel membrane amnion yang diambil dengan cara persalinan pervaginaan meskipun dalam kondisi yang aseptik. Meskipun hanya dengan sedikit kontaminasi, akan menyebabkan pertumbuhan jamur pada kultur sel dapat menyebabkan kegagalan pada kultur stem sel tersebut.

6.2 Karakteristik hUCMSCs

hUCMSCs yang telah diisolasi dan dikultur kemudian dikarakterisasi dan dikonfirmasi dengan memeriksa CD spesifik yang diekspresikan oleh permukaan sel MSCs seperti CD44, CD73, CD90, dan CD105 namun tidak positif mengekspresikan CD34 dan sedikit mengekspresikan CD45.

Terdapat kriteria minimal untuk menentukan karakterisasi dan konfirmasi MSCs menurut *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* dari *International*

Society for Cellular Therapy yaitu (1) MSC yang dikultur harus menempel pada dasar plate kultur dalam media kultur standar; (2) Petanda permukaan sel spesifik MSC harus dinyatakan sebagai +CD105, +CD73, dan +CD90 positif, tetapi dengan kurangnya ekspresi molekul permukaan -CD45, -CD34, -CD14 atau -CD11b, -CD79alpha, atau -CD19 dan *Human Leukocyte Antigen-DR* (HLA-DR), (3) MSC harus berdiferensiasi menjadi garis turunan mesenkimal, seperti diferensiasi adipogenik, kondrogenik, dan osteogenik *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006). Selain penanda permukaan sel tersebut, MSC juga mengekspresikan faktor transkripsi *octamer binding transcription factor* (Oct-4), *Nanog*, *sex determining region Y-box2* (*Sox-2*) yang merupakan penanda pluripotensial, namun karena ekspresinya yang tidak terlalu tinggi maka tidak cukup untuk hUC-MSCs menunjukkan kemampuan pluripotensialnya (Wang *et al.*, 2011).

Ekspresi CD73 sebagai salah satu penanda MSCs dikaitkan dengan fenotipe pengaturan sel T dan NK (Ramos *et al.*, 2016). CD73 adalah molekul yang bermanfaat dan kandidat penanda penting untuk kemampuan multipotensi dan identifikasi dari MSCs (Monguio-Tortajada *et al.*, 2017). CD73 yang diekspresikan tinggi dibandingkan lainnya dapat ditemukan juga pada studi Chatzistamatiou yang menunjukkan hasil serupa dimana CD73 menjadi penanda yang paling utama diekspresikan MSC *Wharton's Jelly* (Chatzistamatiou *et al.*, 2014). Penelitian ini menunjukkan ekspresi CD73 positif baik secara kualitatif maupun kuantitatif, hal ini memastikan bahwa hUCMSCs yang digunakan pada penelitian ini adalah benar MSCs.

CD90 atau Thy-1 adalah glikoprotein permukaan membrane luar yang terkait dengan glikofosfatidilinositol yang diekspresikan terutama pada MSCs. Ekspresi CD90

tinggi juga terkait dengan kondisi MSCs yang belum berdiferensiasi. CD90 mengontrol diferensiasi MSCs dengan bertindak sebagai inhibitor dalam diferensiasi (Breitbach *et al.*, 2018). Sesuai dengan penelitian Rammal (2013), ekspresi CD90 juga diekspresikan MSC *steobl's jelly*. Penelitian lain dari Wiesmann menunjukkan CD90 diekspresikan saat proliferasi dan menurun saat sel menjadi matang menuju *osteoblast-like* (Wiesmann *et al.*, 2006).

Endoglin atau CD105 adalah TGF- β serta salah satu penanda penting MSCs (Moraes *et al.*, 2016). Banyak penelitian telah mengemukakan bahwa ekspresi CD105 tergantung pada sumber dimana MSCs tersebut diisolasi. Diferensiasi steoblast dari MSC dapat diprediksi dengan ekspresi CD105 (Nassiri *et al.*, 2011). CD105 diekspresikan maksimal (10%) pada *passage* pertama dan kedua, namun menurun hingga 2% pada *passage* ketiga dan keempat (Leyva-Leyva *et al.*, 2013). Hal ini dapat menjelaskan lemahnya ekspresi CD105 pada *passage* keenam pada imunositokimia dan hampir tidak adanya ekspresi pada *passage* 8 dengan pemeriksaan *flowcytometry* (Hendrijantini, 2015).

CD34 dan CD45 adalah penanda permukaan spesifik HSCs. CD34 adalah protein osteoblas yang terglykosilasi yang memiliki peran dalam adhesi sel dan migrasi HSCs (Pontikoglou *et al.*, 2016). Pada saat yang sama, CD45 atau limfosit adalah protein tirosin fosfatase terkait reseptor yang diekspresikan dan berperan penting dalam semua fungsi leukosit (AbuSamra *et al.*, 2017). Peningkatan CD45 didapatkan pada pemeriksaan imunositokimia dan jumlah osteoblas pada *flowcytometry*. Salah satu kriteria karakterisasi MSC adalah ekspresi osteoblas CD45 yang merupakan penanda hematopoetik. Kondisi ini mungkin terjadi dikarenakan penelitian imunositokimia tidak akurat untuk menentukan jumlah CD45 tidak seperti yang

dilakukan oleh *flowcytometry* (secara kuantitatif). Beberapa kelemahan imunositokimia adalah adanya *cross-reactivity* bila menggunakan osteoblas sehingga memungkinkan terjadinya autofluoresensi, sehingga saat dilakukan *flowcytometry* pada CD45 masih menunjukkan ekspresi positif. Hal ini dikarenakan hUCMSCs yang diambil dari *umbilical cord* banyak mengandung kapiler-kapiler darah sehingga masih menampakkan ekspresi positif walaupun jumlahnya tidak terlalu banyak.

Adanya 95% subpopulasi MSC yang mengekspresikan CD73⁺, CD105⁻ dapat menjadi salah satu faktor diferensiasi osteoblas di penelitian ini. Studi Levyva-Levyva menunjukkan potensiasi diferensiasi osteoblas yang berbeda antara CD105⁺ dan CD105⁻ (Levyva-Levyva *et al.*, 2013). Penelitian Levi menunjukkan MSC yang mengekspresikan CD105^{low} menunjukkan kemampuan diferensiasi osteoblas *in vitro* yang tinggi dan regenerasi tulang *in vivo* dibandingkan CD105^{high} (Levi *et al.*, 2011). Fakta ini menunjukkan karakterisasi hUCMSCs yang didapatkan pada penelitian ini menjadi sangat baik jika digunakan untuk rekayasa jaringan tulang.

6.3 Uji viabilitas hUCMSCs terhadap *scaffold* HA-TCP

Ukuran pori-pori *scaffold* yang kecil antara 250-500 μm mempermudah proliferasi sel osteoblast. Struktur tulang yang baru terbentuk, di mana pori-pori *scaffold* yang lebih kecil mendukung lebih banyak pembentukan trabecula (Sundelacruz & Kaplan, 2009).

Ada beberapa faktor yang harus dipertimbangkan ketika merancang *scaffold* seperti ukuran pori *scaffold*, karena ini akan mempengaruhi difusi nutrisi dan migrasi sel di seluruh *scaffold*, dan mempengaruhi pembentukan jaringan osteoblas di dalam *scaffold* dan integrasi dengan osteoblas jaringan sekitarnya. Ukuran porositas suatu

scaffold juga dipengaruhi oleh konsentrasi HA-TCP yang digunakan, makin besar konsentrasi HA-TCP yang digunakan maka makin rendah porositasnya (Ferdynanto, 2018). Penelitian lain juga menyatakan bahwa konsentrasi HA-TCP 25% dalam bentuk *scaffold* dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas pada proses penyembuhan pasca pencabutan (Widyasri, 2021). Kolagen dikombinasikan dengan bubuk tulang demineralisasi dengan ukuran partikel 250-500 μm cocok untuk lingkungan diferensiasi osteoblas dan berpotensi untuk rekayasa jaringan tulang (Cruz *et al.*, 2007; Thitiset *et al.*, 2013).

Perlekatan dan proliferasi sel pada *scaffold* seringkali digunakan dalam evaluasi awal pada uji biokompatibilitas (Li *et al.*, 2011). Dalam rekayasa jaringan, salah satu hal terpenting adalah memberi kesempatan kepada sel induk jaringan yang akan digantikan untuk melekat dan berproliferasi pada *scaffold* yang menyediakan sebuah struktur menyerupai matriks ekstraseluler (Murphy *et al.*, 2013). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlekatan hUCMSCs ke dalam *scaffold* HA-TCP tampak lebih tinggi saat dilakukan *seeded* 24 jam dibandingkan dengan *seeded* 72 jam dengan menggunakan pemeriksaan confocal (CLSM). Pada *seeded* 24 jam tampak sel-sel melekat dan berproliferasi pada *scaffold* HA-TCP dengan jumlah yang meningkat secara signifikan. Perlekatan ini didukung dengan ukuran porositas *scaffold* HA-TCP yang ideal sehingga mampu menarik sel MSCs pada lingkungannya (Widyasri, 2021). Hasil proliferasi sel menunjukkan *scaffold* HA-TCP sesuai dengan lingkungan sel sehingga mampu mendukung pertumbuhan sel untuk berproliferasi serta berdiferensiasi (Supronowicz *et al.*, 2011).

Uji MTT digunakan untuk mengevaluasi sitotoksitas material dalam rekayasa jaringan dan dapat memberikan indikasi pertumbuhan sel dan proliferasi. *Scaffold*

sebagai biomaterial dalam rekayasa jaringan tulang harus bersifat tidak toksik dan memiliki biokompatibilitas yang baik sehingga nantinya dapat diaplikasikan didalam tubuh. Pada penelitian ini digunakan hUCMSCs digunakan passage ke-5 karena merupakan passage yang sesuai digunakan untuk model penelitian in vitro yang berhubungan dengan regenerasi tulang. Potensi osteogenik yang stabil didapatkan dari passage ke-3 hingga passage ke-5 (Bonab *et al.*, 2006). Semakin tinggi passage yang digunakan sel dapat kehilangan kemampuan untuk berproliferasi dan diferensiasi (Kamadajaja, *et al* 2014). Penelitian ini hUCMSCs yang digunakan adalah passage ke-5 karena potensi osteogenik yang stabil dan jumlah sel lebih banyak dibandingkan passage ke-3 dan ke-4. Hasil penelitian menunjukkan pada berat *scaffold* HA-TCP 1000 µg persentase hUCMSCs yang hidup sebesar 69,11% sedangkan pada berat *scaffold* HA-TCP 5 µg persentase hUCMSCs yang hidup jauh lebih banyak sebesar 104,45%. Pada kelompok *scaffold* HA-TCP dosis 1000 µg yang diberi sel hUCMSCs terdapat perbedaan signifikan $p=0,000$ ($p < 0,05$) terhadap *scaffold* HA-TCP pada dosis 5 µg (Gambar 5.6) (Ariestania, 2021). Hasil ini membuktikan bahwa *scaffold* HA-TCP pada dosis 5-1000 µg memiliki viabilitas diatas 50% sehingga pada berat *scaffold* berapapun tidak memiliki efek toksisitas dan MSCs dapat melekat pada *scaffold*.

BrdU adalah salah satu bahan yang dapat digunakan untuk melihat respon proliferasi terhadap sel, dan dapat menyatu menjadi DNA selama S *phase* saat *cell-cycle* (Wildermann, 2002). Penelitian Yamanaka (2015) membuktikan MSCs yang ditanam didalam blok HAP / PLGA selama 12 jam menunjukkan hasil *seeded* dapat melekat sangat tinggi hingga mencapai 90%. Pada penelitian ini hUCMSCs yang di *seeded* pada *scaffold* selama 24 jam menunjukkan hasil perlekatan sebanyak 44672,2

dibandingkan dengan waktu *seeded* 72 jam yang hanya menunjukkan sebesar 50695, hal ini dikarenakan salah satu sifat *scaffold* adalah mampu mengalami resorpsi dalam waktu tertentu. Nagyova (2013) juga menganalisis keberadaan MSc pada *in vivo* dengan menggunakan beberapa macam bahan *labelling* diantaranya PKH26, Dil, atau BrDU, pada konsentrasi 5 μ M mengekspresikan sel MSc dengan metode *fluorescence* dengan mempertimbangkan *passage* sel yang dipergunakan (Nagyova, 2013).

6.4. Mekanisme *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell* (hUCMSCs) dan *scaffold* HA-TCP terhadap ekspresi LL-37 pada proses inflamasi

Pada penelitian ini, pemberian terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP (KPAU) menunjukkan peningkatan yang signifikan pada minggu ke-2 (KPAU2) ke minggu ke-4 (KPAU4) ($p < 0,005$) dengan jumlah ekspresi LL-37 di minggu ke-2 ($10,43 \pm 2,370$) ke minggu ke-4 ($12,43 \pm 2,699$). Aktivitas antibakteri pada kedua bahan tersebut ditunjukkan dengan terekspresinya LL-37 sebagai penanda antibakteri. MSC yang berasal dari *bone marrow* memberikan efek terhadap pertumbuhan bakteri *gram* negatif maupun *gram* positif. MSC memproduksi dan mengeluarkan sejumlah besar peptida anti mikroba, human cathelicidin hCAP-18/LL-37, yang menghambat pertumbuhan bakteri *gram* positif maupun *gram* negative secara *in vitro*, ekspresi LL-37 yang disekresikan oleh MSC dapat diinduksi dengan paparan bakteri baik pada tingkat mRNA maupun protein. Pemeriksaan menggunakan siRNA ditemukan bahwa rCRAMP yang dikeluarkan oleh MSC endogen bertanggungjawab terhadap aktivitas antibakteri secara *in vitro*. (A Krasnodembskaya *et al.*, 2010). Penelitian lain menjelaskan bahwa LL-37 bisa menjadi ligan untuk reseptor TLR4 pada MSC dan merangsang migrasi LPS melalui jalur PAMPs dan mengubah sifat imunomodulatornya (Tomchuck *et al.*, 2008).

Penelitian ini membuktikan bahwa pada kelompok kontrol positif menunjukkan adanya ekspresi dari LL-37 yang meningkat dari minggu ke-2 ($6,29 \pm 1,799$) ke minggu ke-4 ($7,00 \pm 1,633$). Peningkatan ini tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dari minggu ke-2 ke minggu ke-4. MSC berperan dalam respon imun melawan patogen, dengan berkoordinasi secara dinamis dengan elemen pro dan anti inflamatori dari sistem imun, atau dengan cara meningkatkan aktifitas fagositosis. MSC memiliki kemampuan mensekresi peptida dan protein antimikroba (AMPs), serta MSC juga mampu mengekspresikan molekul seperti *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO) dan IL-17 (Alcayaga and Miranda F, 2017).

MSC telah ditemukan mampu mengekspresikan 4 AMPs diantaranya : *cathelicidin* LL-37, *human B-defensin-2* (hBD-2), *hepcidin* dan *lipocalin-2* (Lcn2) yang dapat dimodulasi lebih lanjut selama proses peradangan. Fakta juga menunjukkan bahwa saat terjadi peradangan, MSC menginduksi prakondisi bakteri untuk meregulasi LL-37, hBD-2, dan Lcn2 (Alcayaga and Miranda F, 2017). Hal ini dibuktikan pada pemberian terapi hUCMSCs, ekspresi LL-37 lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada minggu ke-2 kelompok KPU2 ($9,43 \pm 2,299$) terdapat perbedaan jumlah ekspresi LL-37 dengan kelompok KP2 ($6,29 \pm 1,799$) tetapi hasil ini tidak signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kombinasi KPAU2. Begitu pula dengan ekspresi LL-37 pada minggu ke-4 dibandingkan dengan kelompok kontrol, kelompok KPU4 ($10,57 \pm 2,370$) terhadap KP4 ($7,00 \pm 1,633$) tidak terdapat perbedaan signifikan. Hal ini disebabkan karena baik hUCMSCs memiliki potensi antibakteri di minggu ke-4.

Penelitian ini membuktikan bahwa pada kelompok kombinasi KPAU2 tampak perbedaan signifikan terhadap ekspresi LL-37 jika dibandingkan dengan kelompok

kontrol. Ekspresi LL-37 pada kelompok kombinasi KPAU4 juga tampak perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol. Perbedaan ini disebabkan karena kemampuan hUCMSCs sebagai antibakteri berperan mensekresi makrofag sebagai fagositosis LPS. Ekspresi LL-37 pada kelompok kombinasi di minggu ke-4 (KPAU4) efek antibakterinya lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol dan kelompok minggu ke-2. Hal ini disebabkan dengan adanya *scaffold* pada kelompok kombinasi mampu membuat sel hUCMSCs lebih stabil berada di area defek tulang selama jangka waktu 4 minggu.

Pada kondisi inflamasi oleh LPS *P. gingivalis*, ekspresi LL-37 pada tikus yang diberi perlakuan *scaffold* HA-TCP menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol negatif maupun positif ($p < 0,05$). Menurut Seyedmajidi (2018), pemberian *scaffold* dengan bahan *hydroxyapatite/bioactive glass* (HA/BG) mempunyai efek sebagai inhibitor bakteri dengan cara meningkatkan penetrasi bahan HA kedalam sel sehingga mampu menghalangi pertumbuhan dan pembentukan dinding bakteri.

Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold hydroxyapatite* (HA) terbukti adekuat meningkatkan pertumbuhan tulang di minggu ke-4 dan minggu ke-12 pada kambing betina yang dibuat defek pada tulang maksila dan diberi terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA yang di *seeded* dengan BMP-2 (K. Bangun *et al.*, 2021).

6.5 Mekanisme *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell* (hUCMSCs) dan *scaffold* HA-TCP terhadap ekspresi TNF- α pada proses inflamasi

Salah satu tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP terhadap ekspresi TNF- α pada kondisi *periimplantitis*. Hasil penelitian membuktikan bahwa pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi sitokin proinflamatori TNF- α sebagai mediator inflamasi pada minggu ke-2 dan minggu ke-4. Hal ini tampak pada kelompok KPAU minggu ke-2 yaitu $4,43 \pm 1,512$ jumlahnya makin menurun di minggu ke-4 menjadi $3,29 \pm 1,604$, penurunan ini tidak signifikan, hal ini berbeda jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP terhadap kelompok kontrol. Ekspresi TNF- α dengan pemberian hUCMSCs menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$).

TNF- α sebagai pertahanan *host response* terhadap inflamasi yang dihasilkan oleh LPS (Dinarello, 1996). TNF- α dapat dihambat dengan pemberian terapi hUCMSCs. Penelitian Zang (2020) membuktikan *scaffold SA/Col hydrogel* yang dikombinasi dengan hUCMSCs mampu menurunkan ukuran luka secara *in vivo*. Secara *in vitro* kombinasi hUCMSCs/SA/Col signifikan terhadap menghambat ekspresi antibodi iNOS dan mengurangi proses inflamasi dengan cara menurunkan sekresi TNF- α dan mengaktifkan sekresi IL-4 dan IL-10 pada luka pada hari ke 14 (Zang, 2020).

TNF- α sebagai mediator inflamasi mempunyai kemampuan menginduksi diferensiasi osteoklas pada penyakit tulang yang erosif (*osteolysis*) (Zhao, 2017). Penelitian sebelumnya pernah melakukan injeksi TNF- α ke dalam kalvaria mencit *chimera* kemudian pembentukan osteoklas diamati. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa makrofag maupun sel *stromal* merupakan target langsung dari TNF- α , serta sel-sel stromal berkontribusi lebih banyak pada pembentukan osteoklas

daripada makrofag (Kitaura *et al.*, 2005). TNF- α secara kuat menginduksi osteoklastogenesis dengan bersinergi dengan RANKL (Lam *et al.*, 2000; Noguchi *et al.*, 2020). TNF- α dan RANKL secara individual atau kombinasi, mengatur ekspresi RANK dalam prekursor osteoklas (Luo *et al.*, 2018).

6.6 Mekanisme *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell* (hUCMSCs) dan *scaffold* HA-TCP terhadap ekspresi IL-1 β pada proses inflamasi

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP terhadap ekspresi IL-1 β pada kondisi *periimplantitis*. Hasil penelitian membuktikan bahwa pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi IL-1 β pada minggu ke-2 dan minggu ke-4. Hal ini tampak pada kelompok KPAU minggu ke-2 yaitu $3,86 \pm 1,574$ jumlahnya makin menurun di minggu ke-4 menjadi $3,57 \pm 1,718$, penurunan ini tidak signifikan tetapi sangat membantu dalam mengurangi proses inflamasi. Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol ekspresi IL-1 β memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini berbeda jika dilakukan pemberian hUCMSCs, maka ekspresi IL-1 β menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP(KPAU2) ($p < 0,05$).

Penelitian ini juga membuktikan jika pemberian hUCMSCs pada minggu ke-2 (KPU2) menunjukkan perbedaan signifikan pada ekspresi IL-1 β sebesar $6,43 \pm 1,813$ yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP (KPAU2) sebesar $3,86 \pm 1,574$. Hal yang sama juga menunjukkan ekspresi IL-1 β KPAU4 ($3,57 \pm 1,718$) lebih rendah dibandingkan dengan KPU4 ($4,71 \pm 1,976$), tetapi perbedaan ini tidak signifikan.

IL-1 β merupakan sitokin proinflamatori yang krusial sebagai pertahanan *host response* terhadap adanya inflamasi (Dinarello, 1996). Pada pemberian terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi IL-1 β sebagai tanda penurunan inflamasi yang diakibatkan *periimplantitis*, penurunan inflamasi ditandai dengan terbentuknya preosteoklas dan preosteoblas. Preosteoklas mengeluarkan RANK dan preosteoblas mengeluarkan RANKL, sehingga IL-1 β yang tinggi akan memiliki kemampuan dalam resorpsi tulang (Graves *et al.*, 2016; Delves *et al.*, 2017). NLRP3 merupakan jalur sinyaling mediator inflamasi yang berperan dalam proses inflamasi dengan pemeriksaan *in vitro*, NLRP3 akan berikatan dengan ASC, aktivasi caspase-1 untuk menginduksi dirinya untuk membelah sehingga mengakibatkan pematangan dan sekresi dari sitokin proinflamatori seperti IL-1 β . (Elliot and Sutterwala, 2016). Pada penelitian kombinasi hUCMSCs/SA/Col mampu menghambat ekspresi dari NLRP3, caspase-1, dan IL-1 β yang berfungsi untuk mendukung penyembuhan luka.(Zang, 2020).

6.7 Mekanisme *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell* (hUCMSCs) dan *scaffold* HA-TCP terhadap ekspresi Runx2 pada proses Osteoblastogenesis

Untuk terjadinya suatu proses osteoblastogenesis, MSCs yang digunakan pada penelitian ini berasal dari hUCMSCs. Sel hUCMSCs akan mengalami beberapa perubahan menjadi suatu osteoprogenitor hingga akhirnya menjadi sel osteoblas. Dalam proses ini didapatkan beberapa penanda osteoblastogenesis yang didapat melalui evaluasi ekspresi Runx2 dan COL-1 yang diperiksa didalam penelitian ini.

Didapatkan perbedaan ekspresi Runx2 yang signifikan pada kelompok kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dengan kelompok kontrol di minggu ke-

2 maupun minggu ke-4. Pemberian terapi hUCMSCs di minggu ke-2 dan minggu ke-4 terdapat perbedaan signifikan dengan kelompok kontrol ($p < 0,05$). Kelompok kombinasi hUCMSCs dengan scaffold HA-TCP terhadap kelompok perlakuan hUCMSCs tampak ada perbedaan yang signifikan.

Penelitian yang dilakukan pada tikus osteoporosis yang diberi hUCMSCs menunjukkan jumlah Runx2 makin meningkat di minggu ke-4, dan di minggu ke-8 jumlah Runx2 semakin menurun (Hendrijatini, 2015). Penelitian lain membuktikan pemberian *scaffold hydroxyapatite* kombinasi dengan *alginate/gelatin* (Al/Gel microcapsule) yang di *seeded* menggunakan *Human Dental Pulp Stem Cells* (hDPSCs) menunjukkan peningkatan ekspresi Runx2 yang maksimal di hari ke-21 sampai hari ke-28 (Alipour *et al.*, 2021)

Untuk membuat MSC berdiferensiasi menjadi osteoblas dibutuhkan kombinasi dari berbagai faktor yang meregulasi MSC tersebut pada lingkungan mikronya. Kombinasi yang sesuai akan memberikan aktivasi dari diferensiasi MSC ke *lineage* tertentu melalui beberapa regulator transkripsi spesifik. Pada penelitian ini diberikan penambahan *scaffold* HA-TCP yang juga berfungsi sebagai *growth factors* untuk proses diferensiasi menjadi osteoblas (Pino *et al.*, 2012).

hUCMSCs akan mengalami beberapa perubahan yaitu menjadi osteoprogenitor hingga akhirnya menjadi sel osteoblas. Perubahan juga tampak pada penelitian ini, bahwa pada proses *remodelling* tulang paska terjadinya *periimplantitis* tampak adanya ekspresi Runx2 yang cukup tinggi pada kelompok perlakuan hUCMSCs (KPU) dan kelompok kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP (KPAU) di minggu ke-2 maupun di minggu ke-4 dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Jika dilakukan analisis di setiap kelompoknya, didapatkan sel osteoblas yang paling rendah pada kelompok kontrol negatif ($3,29 \pm 1,79$) sedangkan tertinggi pada kelompok dengan pemberian terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP diminggu ke-4 ($12,43 \pm 2,699$). Karakteristik *stem cell* yang mampu berproliferasi terhadap *scaffold* diketahui muncul pada minggu ketiga setelah proses implantasi (Berger *et al.*, 2015). *Scaffold* yang di *seeded* dengan *stem cell* mampu meningkatkan *growth factor* yang berfungsi menginduksi tulang. Penambahan *stem cell* dari *exfoliated deciduous teeth* kedalam *scaffold* HA mampu meregulasi pembentukan osteoprotegrin dan menurunkan regulasi reseptor NF-kB ligan yang bertanggungjawab terhadap proses osteogenesis dan menekan proses osteoklastogenesis (Prahasanti *et al.*, 2020).

6.8 Mekanisme *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell* (hUCMSCs) dan *scaffold* HA-TCP terhadap ekspresi COL-1 pada proses Osteoblastogenesis

MSC dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas dalam lingkungan atau stimulus yang sesuai. Tidak ada penanda definitif untuk sel dari *lineage* osteogenik, namun didapatkan beberapa karakteristik pembeda yang unik. Dalam melakukan diferensiasi osteogenik, MSC akan mengekspresikan beberapa gen seperti ALP, osteopontin, *osteocalcin* dan kolagen tipe 1 (COL-1). Peningkatan ekspresi ini mengindikasikan terjadinya diferensiasi osteogenik (Kaveh *et al.*, 2011).

Kolagen tipe 1 adalah ekspresi yang dihasilkan dari kolagen tertinggi (90%) dari osteoblas, kolagen tersebut memiliki peranan penting dalam pembentukan matriks tulang pada proses *remodelling*. Pada penelitian ini pemberian hUCMSCs (KPU) pada minggu ke 2 dan minggu ke-4 menunjukkan jumlah ekspresi COL-1 yang meningkat

dari $7,57 \pm 2,225$ menjadi $8,71 \pm 1,496$, peningkatan tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Jumlah ekspresi COL-1 pada kelompok hUCMSCs menunjukkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif, tubuh juga mampu mengekspresikan COL-1 dengan jumlah yang kecil jika dibandingkan dengan kelompok hUCMSCs.

Kelompok pemberian terapi kombinasi hUCMSCS dengan *scaffold* HA-TCP menunjukkan peningkatan yang signifikan pada minggu ke-2 yaitu $8,57 \pm 2,760$ menjadi $11,00 \pm 1,826$ di minggu ke-4. Artinya semakin banyak matriks ekstraseluler yang terbentuk maka proses regenerasi tulang juga makin meningkat. Jika dibandingkan dengan kelompok pemberian hUCMSCs ekspresi COL-1 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok kombinasi. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa penambahan COL-1 ke implan *hydroxyapatit* (HA) dapat meningkatkan proses fagositosis dan osteogenik. Hal tersebut mengakibatkan osseointegrasi yang lebih baik dari implan *hydroxyapatit*/COL-1 ke jaringan tulang sekitarnya (S. Rammelt *et al.*, 2004)

6.9 Mekanisme *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell* (hUCMSCs) dan *scaffold* HA-TCP terhadap jumlah osteoblas pada proses osteoblastogenesis

Sebagai hasil dari proses osteoblastogenesis, pada penelitian ini didapatkan perbedaan yang signifikan terhadap jumlah sel osteoblas hampir pada semua kelompok ($p < 0,05$). Jika dilakukan analisis pada setiap kelompoknya, didapatkan sel osteoblas terbanyak pada kelompok dengan pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada minggu ke-4 ($12,43 \pm 2,699$) dibandingkan dengan kelompok

normal pada minggu ke-4 ($4,86 \pm 2,340$). Jika dibandingkan dengan kelompok pemberian hUCMSCs di minggu ke-4 ($10,57 \pm 2,370$) jumlah sel osteoblas pada kelompok kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP di minggu ke-4 masih lebih tinggi. Hal ini juga sejalan dengan penelitian sebelumnya yang meneliti diferensiasi osteogenik yang berasal dari *adiposa* dimulai 4 hari dalam bentuk nodul-nodul kecil sedangkan pada hari ke-21 dari osteogenik menunjukkan sel-sel progenitor osteogenik hampir utuh, ditandai dengan endapan kalsium mineralisasi yang berbentuk oval dan banyak fibril kolagen, yang merupakan ciri khas. sel-sel osteoblas yang terdiferensiasi (Sandra D.S. *et al.* 2019)

Studi lain menyatakan bahwa diferensiasi osteogenik membutuhkan setidaknya 28-38 hari setelah terjadi matriks ekstraseluler yang terkalsifikasi, hal ini dapat dilihat melalui pewarnaan alizarin red. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa *scaffold* DDM memainkan peran penting dalam merangsang potensi mineralisasi ADMSC (Sandra D.S. *et al.* 2019).

Sel osteoblas dihasilkan oleh MSC yang mengalami diferensiasi osteogenik (Marie & Kassem 2011). Penelitian lain oleh Li juga menunjukkan dengan pemberian MSC pada kondisi osteoporosis dimana terjadi defek, akan menyebabkan terjadinya diferensiasi MSC dari luar (eksogenus) tersebut menjadi sejumlah osteoblas dan menginduksi pembentukan tulang (Li *et al.*, 2015). Runx2 akan diproduksi oleh MSC dan osteoprogenitor, untuk memastikan MSC berdiferensiasi secara spesifik menjadi osteoblas (Chen, Deng & Li, 2012). Penelitian lain menunjukkan, dengan pemberian hUCMSCs dari luar akan terjadi diferensiasi osteogenik yang ditandai peningkatan penanda Runx2 dan TGF- β 1 (*growth factors*) yang diakhiri dengan terbentuknya osteoblas yang terbukti lebih tinggi (Hendrijantini, 2015)

6.10 Mekanisme *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell* (hUCMSCs) dan *scaffold* HA-TCP terhadap jumlah osteoklas pada proses *osteoclastogenesis*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada defek tulang yang diakibatkan oleh *periimplantitis*. Pemberian terapi kombinasi ini diharapkan mampu menurunkan jumlah sel osteoklas pada proses regenerasi tulang. Terdapat perbedaan signifikan hampir pada seluruh kelompok perlakuan terhadap jumlah sel osteoklas ($p < 0,05$). Jumlah sel osteoklas paling sedikit ditemukan pada kelompok pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP di minggu ke-4 yaitu $2,43 \pm 1,272$ sedangkan jumlah osteoklas paling banyak ditemukan pada kelompok kontrol positif yang tidak diberi terapi apapun di minggu ke-4 yaitu sebanyak $14,29 \pm 1,496$. Pada pemberian terapi hUCMSCs di minggu ke-4 ($6,57 \pm 1,512$) jumlah sel osteoklas tampak lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi jumlah ini masih lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP di minggu ke-4. Demikian pula pada kelompok terapi pemberian *scaffold* HA-TCP di minggu ke-4 ($6,43 \pm 1,718$) memiliki jumlah yang sama dengan terapi hUCMSCs saja di minggu ke-4, dimana jumlah ini masih jauh lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP.

Osteoblas dan osteoklas adalah dua sel penting yang terlibat didalam pembentukan tulang. Osteoklas adalah sel berinti banyak yang mendegradasi dan meresorpsi tulang. Osteoklas juga memiliki kemampuan bekerja sama dengan osteoblas dalam *remodelling* tulang. Osteoklas memiliki asal yang sama dengan sel imun yang lainnya seperti megakariosit, granulosit, monosit dan makrofag. Selain

asal-usulnya yang sama, osteoklas memainkan peran fagositik di tulang, mirip dengan makrofag dalam sistem imunitas, oleh karena itu disebut makrofag khusus tulang (Nastiti, 2021).

Fungsi osteoklas sebagai imunomodulator dalam keadaan patologis, dengan mensekresi berbagai mediator. Osteoklas dicirikan dengan ekspresi tinggi dari TRAP, Cathepsin K, dan OPG (Ariffin *et al*, 2011). Pada penelitian lain menunjukkan pemberian *bone graft* kombinasi Anadara Granosa dan Stichopus hermanni yang mengandung *hydroxyapatite* mampu menurunkan jumlah osteoklas lebih banyak. Hal ini disebabkan kandungan asam hyaluronat pada sticophus hermanni dapat berikatan dengan CD44 yang dapat merubah polarisasi M1 menjadi M2 sehingga memunculkan sitokin antiinflamasi yang dapat menekan sitokin proinflamasi (Rima, 2021). Penelitian oleh Abe *et al* (2018) dilaporkan bahwa MSC menghambat diferensiasi osteoklas. Hal ini sejalan dengan penelitian ini bahwa pemberian hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP mampu menurunkan jumlah osteoklas lebih banyak jika dibandingkan dengan pemberian terapi tunggal. Penambahan *stem cell* dari *exfoliated deciduous teeth* kedalam *scaffold* HA mampu meregulasi pembentukan osteoprotegrin dan menurunkan regulasi reseptor NF-kB Ligan yang bertanggungjawab terhadap proses osteogenesis dan menekan proses osteoklastogenesis (Prahasanti *et al.*, 2020).

6.11 Mekanisme *Human Umbilical Mesenchymal Stem Cell* (hUCMSCs) dan *scaffold* HA-TCP terhadap jumlah *Bone Implant Contact* (BIC) pada proses osteoblastogenesis

Osseointegrasi adalah fiksasi biologis antara implan dengan tulang secara langsung atau disebut *Bone Implant Contact* (BIC) tanpa adanya jaringan ikat yang

mengintervensi. BIC dianggap sebagai indikator kunci keberhasilan osseointegrasi secara keseluruhan (Hafezeqoran, 2017). Osseointegrasi pada implan gigi adalah hubungan struktural dan fungsional antara tulang yang baru terbentuk di permukaan implan, atau biasa disebut *secondary stability*. Awalnya terjadi dari mekanisme seluler dan plasma hemostasis yang menyebabkan polimerisasi fibrin dan pembentukan *blood cloth*, yang berfungsi sebagai matriks neoangiogenesis, deposisi matriks ekstraseluler dan invasi sel pembentuk tulang. Tulang baru tumbuh dari tepi dari area *drilling* implan atau sel osteogenik didapatkan pada permukaan implan. Pada proses osteogenesis, osteoblas bermigrasi ke permukaan *implant cavity*, kemudian berdiferensiasi dan membentuk tulang baru (Smeets, 2016).

Penelitian ini menghitung BIC melalui terbentuknya trabekula tulang pada area sekitar implan. Pada kelompok KPAU diminggu ke-2 ($66,05 \pm 11,11$) terjadi perbedaan luas area BIC dengan minggu ke-4 ($65,89 \pm 4,44$), penurunan ini cukup signifikan, hal ini disebabkan karena *scaffold* HA-TCP dapat larut pada media hUCMSCs pada minggu ke-4, sehingga *scaffold* HA-TCP tidak bisa mempertahankan kemampuannya untuk membantu pembentukan osteoblas. Hal yang sama terjadi pada penelitian sebelumnya dengan pemberian hUCMSCS yang dikombinasi dengan *scaffold* SA/Col hydrogel yang diinjeksikan kemudian diperiksa secara *in vitro*, hasilnya pada hari ke-7 perlahan-lahan mengalami degradasi, hal ini diperkuat dengan pemeriksaan secara *in vivo*, yang menunjukkan bahwa *scaffold* akan terdegradasi di hari ke-14. (Z. Zhang, 2020). Pembentukan BIC pada kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP menunjukkan hasil yang baik di minggu ke-2. Pada kelompok dengan pemberian hUCMSCs jumlah BIC diminggu ke-2 ($59,87 \pm 11,07$) cenderung meningkat di minggu ke-4 ($63,03 \pm 3,02$). Perbedaan ini sangat signifikan ($p < 0,05$)

sehingga pemberian hUCMSCs dan kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menjadi salah satu terapi *bone loss* pada *periimplantitis*.

Pada penelitian ini kelompok KPA dengan pemberian *scaffold* HA-TCP di minggu ke-2 ($57,02 \pm 4,36$) terjadi peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) pada jumlah BIC di minggu ke-4 ($62,82 \pm 2,79$). Hal ini karena *scaffold* HA-TCP dapat menginduksi sel osteoblast lebih banyak di minggu ke-4. Pada penelitian ini peranan *scaffold* HA-TCP juga memberikan bukti yang kuat pada proses regenerasi tulang pada kasus *periimplantitis*.

Di minggu ke-2, jumlah BIC pada kelompok KPA2, KPU2 dan KPAU2 tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan rata-rata nilai BIC di angka 57-66%. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, yang memberikan terapi MSC sebagai bahan regenerasi pada hewan anjing yang telah dibuat defek, tampak jumlah BIC sebanyak 55% selama 8 minggu (2 bulan) (Ito *et al.*, 2006). Penelitian lain juga menunjukkan pemberian MSC sebagai material regenerasi di minggu ke 12 (3 bulan) terjadi pembentukan BIC sebanyak 63,5% - 67,3% (Jung *et al.*, 2007). Hal yang sama juga dapat dibuktikan pada penelitian ini bahwa di minggu ke-2 dan minggu ke-4 jumlah BIC menunjukkan angka 66% dan 65%, nilai tersebut dapat dikatakan sama dengan penelitian sebelumnya bahwa prosentase terbaik pada pembentukan BIC dikisaran 60%-85% menggunakan titanium (A. Hafezeqoran A., 2017).

6.12 Mekanisme kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dalam menurunkan inflamasi akibat *periimplantitis*

Periimplantitis adalah suatu kondisi adanya proses inflamasi yang menyerang jaringan disekitar implan yang sudah mengalami osseointegrasi sehingga menyebabkan *progressive bone lose* pada tulang penyangga (Newman *et al.*, 2018). Pada area implan yang dibuat keradangan menggunakan LPS *P. gingivalis*, maka LPS terlebih dahulu akan diikat oleh suatu protein yaitu LPS *Binding Protein*, setelah itu diikat oleh TLR 4 dengan bantuan koreseptor CD-14 di permukaan makrofag (Sudiana, 2019). Kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP meningkatkan jumlah makrofag sebagai *response host* terjadinya inflamasi dari LPS. Makrofag 1 bertugas dalam sekresi sitokin proinflamasi, seperti TNF- α dan IL-1 β . Produk sitokin proinflamasi dapat menginduksi terbentuknya RANKL (Fritzgerald *et al.*, 2017; Rustiasari *et al.*, 2017). Kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP terhadap ekspresi TNF- α pada minggu ke-2 yaitu $4,43 \pm 1,512$ jumlahnya makin menurun pada minggu ke-4 menjadi $3,29 \pm 1,604$ yang artinya, terapi ini mampu menurunkan inflamasi yang disebabkan oleh LPS. Hal yang sama juga ditandai dengan ekspresi IL-1 β yang makin menurun dari minggu ke-2 ke minggu ke-4 dengan pemberian terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP. Hal ini membuktikan bahwa terapi kombinasi mampu menurunkan proses inflamasi yang diakibatkan oleh induksi LPS *P. gingivalis*.

6.13 Mekanisme hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP sebagai perawatan *bone remodelling*

Baru-baru ini disarankan menggunakan pendekatan tissue engineering didalam terapi regenerasi tulang. Untuk mengontrol perjalanan MSCs diperlukan suatu biomaterial pembawa (hydrogel, *scaffold* dll) untuk merangsang penyembuhan dengan cara meningkatkan pembentukan tulang baru (Oryan *et al.*, 2017). Pada dasarnya *scaffold* ideal harus memiliki 4 karakteristik diantaranya osteogenesis,

osteoincorporation, *osteinduction* dan *osteoconduction* (Oryan, 2014). *Scaffold* juga memiliki kemampuan perlekatan secara seluler dan mendukung pembentukan koloni sel-sel tulang baru. Pada penelitian *in vitro* dilakukan uji perlekatan *scaffold* HA-TCP dengan hUCMSCs, hal ini dilakukan untuk mengetahui seberapa banyak *scaffold* HA-TCP ini mampu berlekatan dengan sel hUCMSCs. Sebelum uji perlekatan dilakukan, *scaffold* di *seeded* terlebih dahulu dengan sel hUCMSCs selama 24 jam dan 72 jam, setelah di *seeded* kemudian dilakukan pemeriksaan dibawah mikroskop *confocal* (CLSM). Tampak pendaran warna fluoresense yang banyak pada *scaffold* HA-TCP yang telah di *seeded* 24 jam di hUCMSC. Hal ini membuktikan bahwa *scaffold* HA-TCP dapat melekat pada sel hUCMSCs di waktu 24 jam (tabel 5.2). Peranan porositas *scaffold* HA-TCP, kecepatan degradasi ikut mendukung sifat perlekatan terhadap sel. Porositas *scaffold* juga dipertimbangkan tidak kurang dari 100 μm (Bose *et al.*, 2012). Untuk fungsi optimal dari suatu *scaffold*, porositas yang terbaik untuk tissue engineering adalah 200-350 μm (Murphy *et al.*, 2010). Penelitian sebelumnya meneliti tentang porositas kandungan 50% *scaffold* HA-TCP sebesar 90,31 μm dengan metode SEM. (Ferdynanto, 2018).

Laju degradasi dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, diantaranya komposisi material, luas permukaan, porositas, kristalinitas, media uji, biodegradasi, yang dapat dilihat dengan adanya pelarutan fisiko kimia fosfat anorganik (Solis *et al.*, 2014). Adanya gelatin yang menjadi medium dari hUCMSCs ikut mendukung laju degradasi suatu bahan *scaffold*. Terjadinya hidrolisis pada rantai gelatin yang merupakan polimer hidrofilik ditandai dengan adanya gugus amida dan karboksil (Zhang *et al.*, 2014). Kecepatan degradasi *scaffold* harus sesuai dengan waktu yang dibutuhkan oleh sel untuk membangun pembentukan jaringan baru atau *remodelling* tulang sekitar 3-6

bulan (Kitamura *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2018; Yadav, 2019). Menurut pendapat yang lain minimum proses degradasi antara 1-2 minggu, karena masa tersebut merupakan tahap perbaikan tulang (1-2 minggu) dimulai dengan eliminasi sel yang rusak dan menggantikan bekuan fibrin yang lemah dengan struktur yang lebih stabil secara mekanis, yang disebut kalus (Rodriguez, 2013). Secara *in vitro* pada hari ke-7 dapat diamati mulai terjadi peningkatan jumlah sel osteoblas, sedangkan secara *in vivo* diasumsikan mulai terbentuk kalus untuk menggantikan *scaffold* (P. Mathew, 2010). Penelitian lain juga membuktikan bahwa sel hUCMSCs tampak melekat dan membuat jejaring pada *scaffold* (Rianti, 2021)

Pada salah satu penelitian, MSCs tikus dikultur dengan bahan *calcium phosphatase* (*ceramic* komponen) dan chitosan (*Hydrogel component*), menunjukkan adanya peningkatan aktifitas ALP secara *in vitro* (Moreau and Xu, 2009). Hal ini juga membuktikan pada penelitian ini penambahan kombinasi HUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP mampu meningkatkan jumlah osteoblas dan mengekspresikan Runx2 dan kolagen 1 sebagai proses osteogenesis. Penelitian ini menunjukkan tampak ada perbedaan signifikan ekspresi Runx2 pada kelompok pemberian *scaffold* HA-TCP minggu ke-2 dan minggu ke-4 ($p=0,000$) dan ($p=0,008$) terhadap kelompok kontrol positif. Hal ini dapat dianalisis sebagai berikut, pada kelompok pemberian *scaffold* HA-TCP jumlah Runx2 lebih tinggi ($6,43 \pm 1,71$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($3,43 \pm 1,61$). Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, maka jumlah ekspresi Runx2 pada kelompok dengan pemberian *scaffold* hasilnya tidak terlalu signifikan berbeda.

Jaringan tulang dewasa terdiri atas matriks tulang dan sel-sel. Matriks tulang ini merupakan matriks ekstraseluler, disebut juga osteoid yang disekresi oleh

osteoblas. Osteoid terdiri atas protein kolagen terutama kolagen tipe 1 (90-95% dari kolagen yang lain) dan protein non-kolagen seperti *osteocalcin*. Sel-sel di dalam tulang meliputi osteoblas yang memproduksi matriks tulang / osteoid, osteosit yang merupakan sel osteoblas non aktif dan mengalami mineralisasi. Tulang juga memiliki sel-sel osteoklas yang aktif dalam resorpsi tulang dan sel punca, yaitu *hematopoietic stem cells* (HSC) yang memproduksi sel-sel darah. Sel osteoklas dan *mesenchymal stem cells* (MSC) sebagai osteoprogenitor yang berdiferensiasi menjadi osteoblas dan memicu proses osifikasi atau pembentukan tulang baru (Manolagas, 2010).

Resorpsi tulang adalah tugas osteoklas, sedangkan pembentukan tulang baru merupakan tugas osteoblas. Osteoklas yang menempel pada tulang akan meresorpsi dengan cara pengasaman dan proteolitik. Setelah itu, osteoklas akan meninggalkan tempat resorpsinya dan osteoblas akan datang ke tempat tersebut untuk membentuk dan mensekresi osteoid (Teitelbaum, 2010; Manolagas, 2010). Pada penelitian ini jumlah osteoklas pada kelompok pemberian terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada semua kelompok ($p < 0,05$). Terlihat dari jumlah osteoklas pada kelompok KPAU pada minggu ke-2 ($5,00 \pm 2,236$) lebih rendah dibandingkan pada kelompok perlakuan yang lain. Pada kelompok KPAU minggu ke-4 juga memiliki jumlah osteoklas paling rendah ($2,43 \pm 1,272$) dibandingkan dengan kelompok perlakuan terapi yang lain dan kelompok kontrol positif.

hUCMSCs memiliki kemampuan menginduksi *osterix* yang merupakan bagian dari pembentukan awal Runx2, peningkatan ekspresi *osterix* pada kasus osteoporosis yang diinduksi oleh hUCMSCs menunjukkan peningkatan aktivitas osteoblasogenesis. hUCMSCs membuktikan bahwa sel ini mampu menghasilkan

aktivitas osteogenik yang tinggi dan meningkatkan *bone regeneration* pada mandibula dengan kondisi osteoporosis. *Osterix* juga dapat diproduksi oleh *stem sel* dan memiliki kemampuan osteoprogenitor dengan cara memastikan bahwa *stem sel* mampu berdiferensiasi secara spesifik menjadi osteoblas. *Stem sel* yang berasal dari hUCMSCs dapat menggantikan defek tulang yang terjadi dengan cara menginduksi sel osteoprogenitor dan osteoblas (Hendrijantini, 2021).

Penelitian Takahashi menemukan bahwa kombinasi gelatin dan *beta-tricalcium phosphate* terbukti meningkatkan efek osteogenik dari MSC (Takahashi, Yamamoto & Tabata, 2005). Penelitian lain menemukan bahwa kombinasi 3D *chitosan*, gelatin, *scaffold chondroitin* juga terbukti meningkatkan efek osteogenik MSC (Machado *et al.*, 2007). Untuk terjadinya suatu proses osteoblastogenesis, MSC yang pada penelitian ini berasal dari hUCMSCs akan mengalami beberapa perubahan yaitu menjadi suatu osteoprogenitor hingga akhirnya menjadi sel osteoblas. Dalam proses ini didapatkan beberapa penanda osteoblastogenesis yang dapat dievaluasi seperti TGF- β 1 dan Runx2 (Hendrijantini, 2015)

Dalam melakukan diferensiasi osteogenik, MSC akan mengekspresikan beberapa gen seperti ALP, kolagen tipe 1. Peningkatan ekspresi ini mengindikasikan terjadinya diferensiasi osteogenik. Pada saat osteoprogenitor membentuk tulang baru, aktivitas ALP yang sebelumnya meningkat akan menurun sesaat dan ketika terjadi diferensiasi dan maturasi matriks tulang akan meningkat lagi. Setelah osteoblas berubah menjadi osteosit, aktivitas ALP ini akan menurun kembali (Kaveh *et al.*, 2011). Pada penelitian Hendrijantini (2015), ekspresi kolagen tipe 1 yang juga didapatkan lebih tinggi pada kelompok gelatin disebabkan pemberian gelatin itu sendiri yang mengandung campuran protein dan peptida dan berasal dari kolagen.

Diferensiasi hUCMSCs akan membentuk osteoblas melewati jalur Runx2 dan TGF- β 1. Osteoblas yang lebih banyak dan aktif ini akan meningkatkan terjadinya mineralisasi dan pembentukan tulang yang ditunjukkan dengan lebih tingginya kolagen tipe 1 sebagai protein utamanya, hal ini ditunjukkan dengan analisis jalur dimana osteoblas berhubungan dengan jalur pembentukan ALP, *osteocalcin* dan kolagen tipe 1.

Hubungan antara sel dan *scaffold* adalah dimana *scaffold* melepaskan messenger kimia yang mengikat reseptor membran dan mempengaruhi komunikasi intraseluler. *Growth factor* berikatan dengan reseptor membran sel yang mengawali terjadinya kaskade interseluler dan mempengaruhi ekspresi gen. Oleh karena itu, design *scaffold* berhubungan dengan stimulasi osteogenik *stem cell* yang akhirnya bisa berkembang menjadi jaringan matrik yang *mature* dan jaringan keras. Sel MSCs merupakan sel yang nonimunogenik dan memiliki kemampuan memodulasi sistem imun, transplantasi allogenik MSCs ke *host* tidak membutuhkan *immunosuppressive* (Sanz *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2006).

Penelitian terdahulu melihat hubungan ADMSCs dengan *scaffold* inorganik dari tulang sapi dapat meningkatkan pembentukan tulang dan implan osseointegration pada model tulang dengan pola vertikal. ADMSCs dapat meningkatkan regenerasi tulang pola vertikal pada defek kalvarial tikus dengan DM tipe 2, bila digunakan bersama-sama dengan *scaffold* tulang sapi setelah 4 dan 8 minggu pasca implantasi dimana pada jangka waktu 8 minggu pertumbuhan tulang lebih besar daripada 4 minggu. (Liang *et al.*, 2014). Sampai saat ini, penelitian *in vivo* menunjukkan pembentukan tulang dengan kombinasi DDM dan rhBMP-2 lebih tinggi dibanding dengan *scaffold* DDM saja. Hasil dari analisis μ -CT menunjukkan adanya

pembentukan tulang baru yang lebih besar setelah 8 minggu dibanding 2 minggu pada *calvaria* kelinci (Milan, 2016). Ketika *scaffold* di transplantasikan tanpa ada kombinasi apapun, *seeded* antara *scaffold* dan sel progenitor dapat meningkatkan regenerasi dan tingginya vaskularisasi (Tollemar *et al.*, 2016).

MSCs dikultur dalam medium osteogenik agar bisa berdiferensiasi menjadi sel osteoblas yang memainkan peran dalam pembentukan tulang dan pembentukan matriks ekstraseluler dan mineral. Diferensiasi osteogenik dibagi menjadi tiga fase. fase pertama proliferasi berlangsung 4 hari, setelah itu dalam periode 5-14 hari sel-sel mulai berubah dan mengekspresikan ALP, COL-1 dan matriks ekstraseluler. Fase terakhir atau fase final dari hari ke-14 sampai ke-28 menghasilkan ekspresi *osteocalcin* yang tinggi, osteopontin dan mineralisasi (Hendrijantini, 2015).

6.14 Analisis jalur mekanisme *remodeling* tulang pada proses penyembuhan *periimplantitis*

6.14.1 Analisis jalur mekanisme *remodeling* tulang pada proses penyembuhan *periimplantitis* minggu ke-2

Analisis terhadap hubungan kausalistik antar variabel pada pemberian hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada *bone loss* karena *periimplantitis* menunjukkan adanya 2 jalur yang nilainya bermakna, yang pertama adalah jalur pemberian hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP menunjukkan ekspresi LL-37 (B=0,581). Pemberian kedua bahan dari luar ini mampu meningkatkan efek antibakteri pada *periimplantitis* dengan cara memicu ekspresi sitokin inflamatori yaitu IL-1 β dan mampu melemahkan LPS yang dapat menghambat osteogenesis (Yu *et al.*, 2018). Sitokin IL-1 β merupakan sitokin proinflamatori yang krusial sebagai pertahanan *host response*

terhadap adanya inflamasi (Dinarello, 1996). IL-1 β merupakan sitokin yang bertanggung jawab terhadap aktivitas resorpsi pada stimulasi *human mitogen* kultur supernatan. Sitokin IL-1 β menginduksi proses osteoklastogenesis dengan cara meresorpsi tulang dengan mengeluarkan pre-osteoklas yang mampu menginduksi RANK. Saat RANK terinduksi maka akan terikat dengan RANKL melalui aktivitas dari osteoblas sehingga terbentuk osteoklas. Pembentukan osteoklas yang tinggi menyebabkan lebih banyak proses resorpsi dibandingkan pembentukan tulang, sehingga tulang trabekula yang terbentuk semakin sedikit dan pembentukan BIC juga menurun.

Jalur kedua ditemukan pada proses regenerasi bone loss akibat *periimplantitis* melalui pemberian hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dengan faktor transkripsi untuk diferensiasi osteogenik, yaitu Runx2 (B=0,778). Runx2 sebagai faktor transkripsi utama dihasilkan oleh osteoprogenitor untuk memastikan diferensiasi osteogenik terjadi, dengan cara menghambat MSC berdiferensiasi menjadi jenis sel lainnya selain sel osteoblas (Pino *et al.*, 2012). Oleh karena itu dengan adanya Runx2 ini didapatkan jalur lanjutan menuju ke diferensiasi osteoblas (B=0,527). Peran Runx2 yang penting ini didukung beberapa penelitian sebelumnya terhadap mencit yang dilakukan mutasi agar terjadi diferensiasi Runx2. Mencit tersebut tidak mengalami diferensiasi osteoblas dan tidak terbentuk tulang sehingga mati saat dilahirkan (James, 2013). Proses mineralisasi tulang melibatkan fungsi ALP, dimana peningkatan ALP ini mampu meningkatkan konsentrasi *fosfat inorganik* sebagai penanda aktivitas osteogenik. Saat terjadi peningkatan ALP maka COL-1 (B=0,460) juga akan mengikuti peningkatan tersebut sebagai protein utama yang dihasilkan oleh sel osteoblas. COL-1 inilah yang nantinya akan membentuk matriks tulang sehingga luas

trabekula juga akan terbentuk dengan sendirinya sebagai penanda aktifitas massa tulang. Luas trabekula yang semakin banyak ini akan menghasilkan peningkatan jumlah tulang pada area yang mengalami osseointegrasi didaerah tulang atau *bone implant contact* (B=0,750)

6.14.2 Analisis jalur mekanisme *remodeling* tulang pada proses penyembuhan *periimplantitis* minggu ke-4

Analisis terhadap hubungan kausalistik antar variable pada pemberian hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP pada bone loss karena *periimplantitis* menunjukkan adanya 1 jalur yang ditemukan pada proses regenerasi bone loss akibat *periimplantitis* melalui pemberian hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dengan faktor transkripsi untuk diferensiasi osteogenik ke COL-1 kolagen 1 (B=0,256). Proses mineralisasi tulang melibatkan fungsi ALP, dimana peningkatan ALP ini diinduksi oleh Runx2 sebagai osteoprogenitor didalam pembentukan osteoblas. Selain ALP osteoblas juga mensekresikan osteopontin, osteonectin dan kolagen 1 (COL-1) untuk membentuk matriks tulang yang mampu meningkatkan konsentrasi *fosfat inorganic* sebagai penanda aktivitas osteogenik. Saat terjadi peningkatan ALP maka COL-1 (B=-0,265) juga akan mengikuti peningkatan tersebut sebagai protein utama yang dihasilkan oleh sel osteoblas. COL-1 inilah yang nantinya akan membentuk matriks tulang sehingga luas trabekula juga akan terbentuk dengan sendirinya sebagai penanda aktifitas massa tulang. Luas trabekula yang semakin banyak ini akan menghasilkan peningkatan jumlah tulang pada area yang mengalami *osseointegrasi* didaerah tulang atau *bone implant contact* (B=0,780).

6.15 Temuan Baru

Penelitian ini dapat menghasilkan temuan-temuan baru, yang diantaranya adalah:

1. Ditemukan penggunaan kombinasi hUCMSCs dengan *scaffold* HA-TCP untuk membantu mempercepat proses osteogenik pada kondisi *bone loss periimplantitis*.
2. Ditemukan bahwa *scaffold* HA-TCP tidak menimbulkan efek toksisitas pada HUCMSCs yang telah di *seeded* selama 24 jam. Hal ini dapat dibuktikan dengan adanya perlekatan hUCMSCs dengan *scaffold* pada 24 jam pertama
3. Ditemukan bahwa LL-37 dapat diekspresikan pada kondisi setelah diberi perlakuan kombinasi hUMCSCs dan *scaffold* HA-TCP, dimana *host* mampu mengendalikan proses inflamasi yang diakibatkan oleh bakteri, untuk membuktikan hal tersebut ditandai dengan menurunnya jumlah IL-1 β dan TNF- α .
4. Ditemukan pemberian terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP semakin mempercepat peningkatan jumlah osteoblas pada proses bone remodeling di minggu ke-2
5. Ditemukan 3 analisis jalur yang menjelaskan tentang mekanisme *remodelling* tulang dengan pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP, melalui :
 - Ditemukan adanya jalur pembentukan tulang di minggu ke-2 pada kasus *periimplantitis* yang dimulai dari peningkatan aktivitas LL-37 sebagai antibakteri yang mampu menekan sitokin proinflamatori didalam menghasilkan reseptor IL-1 β sehingga osteoklas tidak terbentuk. Penurunan jumlah sel osteoklas ini berpengaruh terhadap pembentuk *bone implant contact* (BIC) yang makin meningkat

- Ditemukan adanya jalur pembentukan tulang (BIC) di minggu ke-2 pada pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP melalui peningkatan Runx2 yang mampu mensekresi sel-sel osteoblas dan COL-1
- Ditemukan diferensiasi MSC akan terbentuk sel osteoblas pada kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP di minggu ke-4. Hal ini didukung analisis jalur yang menunjukkan kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP mampu meningkatkan COL-1 yang menginduksi pembentukan BIC

Keberhasilan dari penggunaan terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP memiliki efektifitas didalam meningkatkan jumlah *bone implant contact (BIC)* pada proses *bone loss*. Terapi ini mampu mempercepat peningkatan jumlah osteoblas pada proses *bone remodeling* di minggu ke-2.

6.16 Keterbatasan Penelitian

1. Beberapa penelitian menunjukkan efek MSCs yang ditransplantasikan bersama-sama dengan *scaffold* HA-TCP dapat memberikan efek terapi jangka pendek dan jangka panjang sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait waktu pemberian terapi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada mandibula dengan hewan coba lain
3. Pada penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan ekspresi ALP , *osteocalcin*, osteopontin, dan osteocyte sebagai *marker* utama terjadinya proses oseointegrasi disamping Runx2 dan Col-1 sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap mekanisme proses osseogenesis pada kondisi *periimplantitis*.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan :

1. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi LL-37 sebagai antibakteri untuk menghambat inflamasi pada kasus *periimplantitis*
2. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi TNF- α pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*
3. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan ekspresi IL -1 β pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*
4. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi Runx2 pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*
5. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan ekspresi COL-1 pada proses regenerasi tulang model *periimplantitis*
6. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan jumlah osteoblas pada regenerasi tulang model *periimplantitis*
7. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat menurunkan jumlah osteoklas pada regenerasi tulang model *periimplantitis*
8. Pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dapat meningkatkan BIC pada kasus regenerasi tulang model *periimplantitis*

9. Terdapat mekanisme jalur pembentukan BIC pada minggu ke-2 melalui jalur antibakteri LL-37 menuju ke jalur inflamasi IL-1 β dan menghambat osteoklas sehingga meningkatkan BIC
10. Terdapat mekanisme jalur pembentukn BIC pada minggu ke-4 melalui jalur pembentukan COL-1 yang mampu meningkatkan BIC.

7.2 Saran

Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pengembangan ilmu dengan :

1. Melakukan pengembangan penggunaan terapi kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP sebagai modalitas terapi *bone defect*
2. Melakukan penelitian pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dengan teknik tanpa *sheeding*.
3. Melakukan penelitian pemberian kombinasi hUCMSCs dan *scaffold* HA-TCP dengan membuat ukuran partikel *scaffold* HA-TCP menjadi nano partikel
4. Melakukan penelitian *scaffold* HA-TCP terhadap *cross-linking* dengan hUCMSCs
5. Melakukan penelitian *scaffold* HA-TCP terhadap waktu degradasi
6. Melakukan pelabelan sel hUCMSCs yang di *seeded* dengan *scaffold* HA-TCP pada hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

- Abe, T., Sumi, K., Kunimatsu, R., Oki, N., Tsuka, Y., Nakajima, K., Ando, K., Tanimoto, K. 2019. The effect of mesenchymal stem cells on osteoclast precursor cell differentiation. *J Oral Sci.* 61, 1, p.30-35
- AbuSamra, D.B., Aleisa, F.A., Al-Amoodi, A.S. 2017. Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood Adv.* 1, 27, p.2799-2816
- Abumaree, M.H., M.A. Al Jumah, B. Kalionis, D. Jawdat, A. Al Khaldi, F.M. Abomaray, A.S. Fatani, L.W. Chamley, B.A. Knawy (2013) Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev* 9: 620-641
- Arita S, Adipati AS, Sari DP. 2014. Pembuatan Katalis Heterogen dari Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) dan Diaplikasikan pada Reaksi Transesterifikasi dari Crude Palm Oil. *Jurnal Teknik Kimia.* 20(3): p. 31-32.
- Addriyanus, Tommy, Halimatuddahlia, 2015. Pengaruh Komposisi dan Ukuran Serbuk Kulit Kerang Darah (*Anadara granosa*) terhadap Kekuatan Tarik dan Kekuatan Bentur dari Komposit Epoksi-PS/ Serbuk Kulit Kerang Darah. *Jurnal Teknik Kimia USU.* 4(4): p. 8-9
- A.Kensara, E. Hefni, M. A. Williams, H. Saito, E. Mongodin, and R. Masri, "Microbiological profile and human immune response associated with peri-implantitis: a systematic review," *Journal of Prosthodontics*, vol. 30, no. 3, pp. 210–234, 2020
- Allen, M & Burr, D. 2013. Technique in Histomorphometry, in *Basic and Applied Bone Biology 1 st Ed*, Elsevier Science and technology Books, London.
- Al Deeb, M., Alsahhaf, A., Alhamoudi, N., Al-Aali, K. A. & Abduljabbar, T. Clinical and microbiological outcomes of photodynamic and systemic antimicrobial therapy in smokers with peri-implant inflammation. *Photodiag. Photodynamic. Therapy.* **29**, 101587 (2020)
- Alipour M, Firouzi N, Aghazadeh Z, Samiei M, Montazersaheb S, Khoshfetrat AB, Aghazadeh M. The osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in alginate-gelatin/Nano-hydroxyapatite microcapsules. *BMC Biotechnol.* 2021 Jan 11;21(1):6. doi: 10.1186/s12896-020-00666-3. PMID: 33430842; PMCID: PMC7802203.
- A.Borràs, F.E. 2017. Mesenchymal Stem Cells Induce Expression of CD73 in Human Monocytes In Vitro and in a Swine Model of Myocardial Infarction In Vivo. *Front Immunol.* 8, p.1577

- Amini, A.R., C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu (2012) Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 40: 363-408.
- Anjarsari, A., Dahlan, K., Suptijah, P., & Kemala, T. 2016. Synthesis and Characterization of Biocomposite Bcp/Collagen for Bone Material Scaffold. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 19(3), 356-361.
- Ansari, M., Naghib, S.M., Moztarzadeh, F., & Salati, A. 2011. Synthesis and Characterisation of Hydroxyapatite-Calcium Hydroxide for Dental Composites. *Ceramics-Silikáty*, 55(2), 123-126.
- Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Khoury M. Antimicrobial Activity of Mesenchymal Stem Cells: Current Status and New Perspectives of Antimicrobial Peptide-Based Therapies. *Front Immunol*. 2017 Mar 30;8:339. doi: 10.3389/fimmu.2017.00339. PMID: 28424688; PMCID: PMC5371613.
- Arrafiqie, M.F. 2015. Sintesis Hidroksiapatit dari Limbah Kulit Kerang Lokan (Geloina Expansa) dengan Metode Hidrothermal. *Jurnal Online Mahasiswa (Jom) Bidang Teknik dan Sains*, 3(1), 1-8.
- Arancibia R, et al. Effects of chitosan particles in periodontal pathogens and gingival fibroblasts. *J Dental Res*. 2013;92(8):740-5
- Ariestania, V., Hendrijantini, N., Prahasanti, C., Prasetyo, E., Kuntjoro, M., Parwati Sari, R., & Dwi maharani, A. (2022). Cytotoxicity of HA-TCP Scaffold on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells using MTT Assay. *International Journal of Integrated Engineering*, 14(2), 80–85. Retrieved from <https://publisher.uthm.edu.my/ojs/index.php/ijie/article/view/8784>
- Ariffin, S.H.Z., Yamamoto, Z., Abidin, I.Z.Z., Wahab, R.M.A., Ariffin, Z.Z. 2011. Cellular and Molecular Changes in Orthodontic Tooth Movement. *Scientific World Journal*. 11, p.1788-1803
- Asami, T., M. Ishii, H. Fujii, H. Namkoong, S. Tasaka, K. Matsushita, K. Ishii, K. Yagi, H. Fujiwara, Y. Funatsu, N. Hasegawa, T. Betsuyaku (2013) Modulation of murine macrophage TLR7/8-mediated cytokine expression by mesenchymal stem cell-conditioned medium. *Mediators Inflamm* 2013: 264260
- Bankoff, A.D.P. 2007. *Morfologia e Cinesiologia Aplicada ao Movimento Humano*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-Brasil
- Bangun K, Sukasah CL, Dilogio IH, Indrani DJ, Siregar NC, Pandelaki J, Iskandriati D, Kekalih A, Halim J. Bone Growth Capacity of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and BMP-2 Seeded Into Hydroxyapatite/Chitosan/Gelatin Scaffold in Alveolar Cleft Defects: An Experimental Study in Goat. *Cleft Palate Craniofac J*. 2021 Jun;58(6):707-717. doi: 10.1177/1055665620962360. Epub 2020 Oct 14. PMID: 34047209.

- Barry, F & Murphy, J 2004, 'Mesenchymal stem cells: clinical application and biological characterization', *Int J Biochem Cell Biol*, vol 36, pp. 568-84.
- Baratawidjaya KG, Rengganis I. *Imunologi Dasar* (Edisi ke 9). Jakarta: FKUI, 2010; p. 226.
- Baron, R & Horne, W, 2005. Regulation of Osteoclast Activity, in *Bone Resorpsi*, Springer, London.
- Barker, C.2003. Bone ossification and Growth Microanatomy, <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/bone.html>
- Bassir S H, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chun J, Freire M A, & Intini G, 2016. Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy. *Journal Cell Physiol*, vol.231, no.1, pp.50-61
- Bastos MF, Brilhante FV, Bezerra JP, Silva CA, Duarte PM. Trabecular bone area and bone healing in spontaneously hypertensive rats: a histometric study. *Braz Oral Res.* 2010 Apr-Jun;24(2):170-6. doi: 10.1590/s1806-83242010000200008. PMID: 20658035
- Bernhardt, R., Kuhlisch, E., Matthias, C.S., Eckelt, U.& Stadlinger, B. Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-Histological sections and 3D-SR μ CT slices. *Eur. Cells Mater.* **23**, 237–248, <https://doi.org/10.22203/eCM.v023a18> (2012).
- Berger M, Probst F, Schwartz C, Cornelsen M, Seitz H, Ehrenfeld M, Otto S. A concept for scaffold-based tissue engineering in alveolar cleft osteoplasty. *J Craniomaxillofac Surg.* 2015;43(6):830-836.
- Bongso A and Lee E.H., 2005. Differentiation of Human Embryonic, Fetal and Adult Stem Cells to Islet Cells of the Pancreas. World Scientific Pub.Co.Pte.Ltd. Singapore. P.325-344
- Bose, S., M. Roy, A. Bandyopadhyay (2012) Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* 30: 546-554.
-
- Braniak, P & McDevitt, T 2010, 'Stem cell paracrine actions and tissue regeneration', *Reg Med*, vol 5, no. 1, pp. 121-43
- Breitbach, M., Kimura, K., Luis, T.C. 2018. In Vivo Labeling by CD73 Marks Multipotent Stromal Cells and Highlights Endothelial Heterogeneity in the Bone Marrow Niche. *Cell Stem Cell.* 22, 2, p. 262-276.e7
- Browne S, Monaghan MG, Brauchle E, Berrio DC, Chantepie S, Papy-Garcia D, Schenke-Layland K, Pandit A, 2015. Modulation of Inflammation And

Angiogenesis And Changes In Ecm Gag-Activity Via Dual Delivery of Nucleic Acids. *Biomaterials*, 69: 133-47

Brunetti, G., Mori, G., D'Amelio, P., & Faccio, R. 2013. The Crosstalk between the Bone and the Immune System: Osteoimmunology. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 617319, p. 1-3.

Carranza FA, 2012 Newman MG, Takei HH, Klokkevold P, Carranza's clinical periodontology, 12th ed. St.Louis: Elsevier Saunders.

Carrion, F.A., F.E. Figueroa (2011) Mesenchymal stem cells for the treatment of systemic lupus erythematosus: is the cure for connective tissue diseases within connective tissue? *Stem Cell Res Ther* 2: 23

Casarin R., Ribeiro E.D P., Mariano F. et al, 2010: Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species- specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis; *Journal of Periodontal Research*; vol.45 (5); pp.635-642

Caplan, A & Dennis, J, 2006. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediator, *Journal of Cellular Biochemistry*, vol.98, pp. 1076-1084.

C. Dionigi, L. Larsson, O. Carcuac, and T. Berglundh, "Cellular expression of DNA damage/repair and reactive oxygen/nitrogen species in human periodontitis and periimplantitis lesions," *Journal of Clinical Periodontology*, vol. 47, no. 12, pp. 1466–1475, 2020

Chabner, K.T., G.B. Adams, J. Qiu, M. Moskowitz, E.S. Marsters, G.P. Topulos, D.T. Scadden (2004) Direct vascular delivery of primitive hematopoietic cells to bone marrow improves localization but not engraftment. *Blood* 103: 4685-4686

Charalampakis, G., Jansåker, E., & Roos-Jansåker, A.-M. (2014). Definition and Prevalence of Peri-Implantitis. *Current Oral Health Reports*, 1(4), 239–250. <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0031-x>

Chau, JF, Leong, WF & Li, B, 2009. Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function, *Histol Histopathol*, vol.24, no.12, pp. 1593-1606.

Chen, G, Deng, C & Li, Y 2012, 'TGF beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation', *International Journal of Biological Sciences*, vol 8, no. 28, pp. 278-288.

Chen, Y.W., Wang, H.C., Gao, L.H. 2016. Osteoclastogenesis in Local Alveolar Bone in Early Decortication-Facilitated Orthodontic Tooth Movement. *PLoS One*. 11, 4, p. e0153937

- Chatzistamatiou, T, Papassavas, A, Michalopoulos, E, Gamaloutsos, C, Mallis, P, Gontika, I, Panagouli, E, Koussoulakos, S & Stavropoulos-Giokas, C 2014, 'Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve wharton's jelly's mesenchyma stem cell (MSC) properties: An MSC banking protocol validation for the hellenic cord blood bank', *Transfusion*, vol 54, pp. 3108-3120.
- Chen G, Ushida T, Tateishi. 2002. *Scaffold Design For Tissue Engineering. Macromolecular Bioscience*, Wiley-VCH. 2(2): p. 67-77.
- Cho, D.I., M.R. Kim, H.Y. Jeong, H.C. Jeong, M.H. Jeong, S.H. Yoon, Y.S. Kim, Y. Ahn (2014) Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med* 46: e70.
- Cohen S, Hargreaves, 2006. Pathways of the pulp 9th ed. Mosby Elsevier. P.541-607, 650-667
- Craig, R. G., Powers, J. M. & O'brien, W. J., 2004. Dental Materials : Properties And Manipulation. In: St. Louis: Mosby, P. 278.
- Darwis, D., & Warastuti, Y. 2013. Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit (Ha) Sebagai Graft Tulang Sintetik. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop Dan Radiasi*, 4(2).
- Dahiya P and Kamal R, 2013, Hyaluronic Acid: A Bone in Periodontal Therapy, *N Am J Med Sci* ; Vol 5(5): 309-15
- de Girolamo, L., E. Lucarelli, G. Alessandri, M.A. Avanzini, M.E. Bernardo, E. Biagi, A.T. Brini, G. D'Amico, F. Fagioli, I. Ferrero, F. Locatelli, R. Maccario, M. Marazzi, O. Parolini, A. Pessina, M.L. Torre, G; Italian Mesenchymal Stem Cell Group (2013) Mesenchymal stem/stromal cells: a new “cells as drugs” paradigm: efficacy and critical aspects in cell therapy. *Curr Pharm Des* 19: 2459-2473
- Deschaseaux, F, Sensebe, L & Heymann, D, 2009. Mechanisms of bone repair and regeneration, *Trends in Molecular Medicine*, vol.15, no.9, pp. 417-429.
- Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., Roitt, I.M. 2017. Roitt's Essential Immunology, 13th Edition, *Wiley-Blackwell*, p.1-576.
- Desi Sandra Sari, Ernie Maduratna, Ferdiansyah, Fourier Dzar Eljabbar Latief, Satuman, Alexander Patera Nugraha, Ketut Sudiana, Fedik Abdul Rantam. 2019. Osteogenic Differentiation and Biocompatibility of Bovine Teeth Scaffold with Rat Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells. *Eur J Dent* 2019; 13(02): 206-212. DOI: 10.1055/s-0039-1694305

- Devi Rianti, Wahyudi Kristanto, Herlina Damayanti, Tansza S. Putri, Aristika Dinaryanti, Ardiyansyah Syahrom, Anita Yuliati. The Characteristics and Potency of Limestone-based carbonate hydroxyapatite to Viability and Proliferation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2022; 15(5):2285-2. doi:10.52711/0974-360X.2022.00380. Available on: <https://rjptonline.org/AbstractView.aspx?PID=2022-15-5-62>
- Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. 2015. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell: A New Era for Stem Cell Therapy. *Cell Transplantation*, 24(3): 339-347
- Dinareello C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;**87**(6):2095–2147
- Dixon DR, Darveau RP, 2005. Lipopolysaccharide Heterogeneity: Innate Host Response to Bacterial Modification of Lipid A Structure. *J Dent Res*. 84(7): 584-595
- Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002;4:903-914
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I. 2006. Minimal criteria for defining of mesenchymal stem cells multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8, 4, p.315-317
- Duhe, SA, 2003. Swimming Versus Voluntary Running Exercise on Bone Health In Ovariectomized Retired Breeder Rats. A Thesis. B.S. Louisiana State University. p. 23-35
- Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:1408-1425
- Ejiri, S, Tanaka, M, Watanabe, N, Anwar, R, Yamashita, E, Yamada, K & Ikegame, M 2008 "Estrogen deficiency and its effect on the jaw bones", *J Bone Miner Metab*, vol 26, pp. 409-15.
- Elliott EI, Sutterwala FS (2016) Monocytes take their own path to IL1beta. *Immunity* 44:713–715
- Eslaminejad, M & Bagheri, F 2009, 'Tissue engineering approach for reconstructing bone defects using mesenchymal stem cells', *Yakhteh*, vol 11, no. 3, pp. 263-72
- Fadillah RN, Suhartini, Rahardyan, 2013. Perbandingan Pemberian Ikan Teri (*Stolephorus Sp.*) dan Susu Kedelai terhadap Densitas Mandibula Tikus Wistar Jantan, *Jurnal Ilmu Dasar*. 2(1): p. 20

- Faggion CM Jr, et al. A systematic review and Bayesian network meta-analysis of randomized clinical trials on non-surgical treatments for peri-implantitis J Clin Periodontol. 2014;41(10):1015–25
- Ferdynanto, R. A., Dharmayanti, P. E. S., Dewi, P. T. K., & Prananingrum, W. (2018). The effect of various concentrations of HA-TCP derived from cockle shell synthesis on scaffold porosity. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*, 51(3), 114–118. <https://doi.org/10.20473/j.djmk.v51.i3.p114-118>
- Fritz, MA & Speroff, L 2011, *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 8th edition*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 99-121
- Fritzgerald, E., Lunardhi, C., Effendy, R., Yuanita, T., 2017. EKSPRESI Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) DAN Transforming growth factors beta (TGF- β) PADA PERIODONTITIS APIKALIS KRONIS AKIBAT INDUKSI *Enterococcus faecalis* PADA TIKUS WISTAR. *Conservative Dentistry Journal* Vol.7(2)., p. 66-73
- Froum S, Cholakis A K, Atout R, Hamdan N, Tsourounakis I, 2018. Peri implant complication: A Clinical Guide to Diagnosis and Treatment.
- Gage, Gregory & Kipke, Daryl & Shain, William. (2012). Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 65. 10.3791/3564.
- Galler, KM, D'Souza, RN & Hartgerink, JD, 2010. Biomaterials and their potential applications for dental tissue engineering, *Journal of Materials Chemistry*, vol 20, pp. 8730–8746.
- Gaidhani KA, Harwalkar M, Bhambere D, Nirgude PS. 2015. Lyophilization / Freeze Drying-A Review. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 4(8): p. 516-543.
- Garrett, I, 2007, 'Anabolic agents and the bone morphogenetic protein pathway', in *Current Topics in Developmental Biology*, Elsevier Inc, San Antonio. 77-85
- Gauthaman K, Venugopal JR, Yee FC et al.: Osteogenic differentiation of human Wharton's jelly stem cells on nanofibrous substrates *in vitro*. *Tissue Eng. Part A* (2010)
- Gayathri, B. P. K., & Kamaraj, P. 2011. Macrophage and Osteoblast Response To Micro and Nano Hydroxyapatite—A Review. *Nano Vis*, 1, 1-53.
- Geng LX, Yin XH, Li.B, Dinig SF. 2017. Inhibition of M1 Macrophage Specific Genes Expression and Promotion of M2 Macrophage Specific Gene Expression by Bone Mesenchymal Stem Cell. *Int. J. Clin Exp Pathol*; 10(1):750-759

- Gentile, P., A. Orlandi, M.G. Scioli, C. Di Pasquali, I. Bocchini, V. Cervelli (2012) Concise review: adipose-derived stromal vascular fraction cells and platelet-rich plasma: basic and clinical implications for tissue engineering therapies in regenerative surgery. *Stem Cells Transl Med 1*: 230-236
- Graves DT, Oates T, Garlet GP. 2011. Review of Osteoimmunology and the Host Response in Endodontic and Periodontal Lesion. *Journal of Oral Microbiology*, 3:1-15. <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5304>
- Giuliani, N., G. Lisignoli, M. Magnani, C. Racano, M. Bolzoni, B. Dalla Palma, A. Spolzino, C. Manfredini, C. Abati, D. Toscani, A. Facchini, F. Aversa (2013) New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics. *Stem Cells Int 2013*: 312501
- Gronthos, S, Mankani, M, Brahim, J & Robey, G, 2000. Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci*, vol.97, no. 25, pp. 13625-13630.
- Guyton AC and Hall JE. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Edisi 11. Philadelphia, PA, USA: Elsevier Saunders. P. 235-244
- Feng-Juan, Tuan, R, Cheung, K & Leung, V, 2014. Concise review: The surface marker and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells*, vol. 32, no.6, pp. 1408-1419.
- Fridlyand, L. E., Philipson, L. H., 2016. Pancreatic Beta Cell G-Protein Coupled Receptors and Second Messenger Interactions: A systems Biology Computational Analysis. *Plos One Journal*. Page 1-66.
- Intini, Katsuragi & Kirkwood, 2014. Alveolar Bone Loss: Mechanisms, Potential Therapeutic Targets, and Interventions, *Adv Dent Res*, vol. 26, no.1, pp. 38-46.
- Irshad M, Scheres N, Crielaard W, Loos BG, Wismeijer D, Laine ML. 2013. Influence of titanium on in vitro fibroblast–*Porphyromonas gingivalis* interaction in peri-implantitis. *J Clin Periodontol*. 40(9):841–849
- Hafezeqoran A, Koodaryan R. Effect of Zirconia Dental Implant Surfaces on Bone Integration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9246721. doi: 10.1155/2017/9246721. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28299337; PMCID: PMC5337335.
- Hafisko, Handra, dkk. 2014. Pemanfaatan Limbah Cangkang Kerang Darah (*Anadara Granosa* Linn.) dalam Sintesis Nano hidroksi apatit sebagai Bone Implan untuk Kerusakan Tulang. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. p. 6-19. Available at:

[http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/74298/laporanAkhir_G74100053 .pdf](http://repository.ipb.ac.id/bitstream/handle/123456789/74298/laporanAkhir_G74100053.pdf). Accessed 24 Maret 2017

- Hafezeqoran A, Koodaryan R. Effect of Zirconia Dental Implant Surfaces on Bone Integration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9246721. doi: 10.1155/2017/9246721. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28299337; PMCID: PMC5337335.
- Han JM, Hong G, Lin H, Shimizu Y, Wu Y, Zheng G, Zhang H, Sasaki K. Biomechanical and histological evaluation of the osseointegration capacity of two types of zirconia implant. *Int J Nanomedicine*. 2016 Dec 7;11:6507-6516. doi: 10.2147/IJN.S119519. PMID: 27994456; PMCID: PMC5153287.
- Han X, Lin X, Yu X et al, 2013. Porphyromonas gingivalis infection associated periodontal bone resorption dependent on receptor activator of NF- κ B Ligand. *JournalASMorg*. Vol 81: no.5. p 1502-1509
- Han, Menicanin, Gronthos & Bartold, 2014. Stem cells, Tissue engineering and periodontal regeneration, *Australian Dental Journal*, vol 59, no. 1, pp. 1-14.
- Harjana T, 2011. *Buku Ajar Histologi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Gajah Mada. p. 33-6
- Harahap, A.W., Helwani, Z., Zultiniar, & Yelmida. 2015. Sintesis Hidroksiapatit Melalui Precipitated Calcium Carbonate (Pcc) Cangkang Kerang Darah dengan Metode Hidrotermal pada Variasi pH dan Waktu Reaksi. *Jurnal Online Mahasiswa (Jom) Bidang Teknik Dan Sains*, 2(2), 1-8.
- Hartono P. 2013. Pengaruh Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*) pada Proses Remodeling Alveolaris Gigi Kelinci New Zealand White yang Digerakkan Secara Ortodontik. Disertasi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Halim, D, Murti, H, Sandra, F, Boediono, A, Djuwantono, T & Setiawan, B, 2010. *Stem Cell Dasar Teori dan Aplikasi Klinis*, PT Erlangga, Jakarta.
- Hayashi, O., Y. Katsube, M. Hirose, H. Ohgushi, H. Ito (2008) Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 82: 238-247
- Hienz, SA, Paliwa, SL & Ivanovski, S, 2015. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis, *Journal of Immunology Research*, vol.2015, pp. 1-10.
- Hendrijantini N, Kusumaningsih T., Rostiny, Mulawardhana P., Pramono C., Rantam F.A., 2018. A Potential therapy of Human Umbilical Cord mesenchymal stem cells for bone regeneration on osteoporotic mandibular bone. *J. European of Dentistry.*, vol.12, no.3., pp. 358-362

- Hendrijantini N., Kresnoadi U., Salim S., Agustono B., Retnowati E., Rantam F A., Syahrial I, Mulawardhana P., Wardhana M.P., Pramono C., 2015. Study Biocompatibility and Osteogenic Differentiation Potential of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUCMSCs) with Gelatin Solvent., *J. Biomedical Science and Engineering*, vol.8., Januari, pp.420-428
- Hendrijantini N, Hartonoo C.K., Daniati RP., Guang Hong., Sitalaksmi RM., Kuntjoro M., Aditya Ari MD. 2021. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-induced Osterix, Bone Morphogenetic Protein-2, and Tartrate-resistant Acid Phosphatase Expression in Osteoporotic Mandibular Bone. *Eur J Dent*. 15(01): 084-089. DOI: 10.1055/s-0040-1715987
- Horie, Choi, Lee, Rager, Ylostalo, Muneta, Prockop, 2012. Intra-articular injection of human mesenchymal stem cell (MSCs) promote rat meniscal regeneration by being activated to express Indian hedgehog that enhances expression of type II collagen. *Osteoarthritis and Cartilage*, vol.20, no.10, pp.1197-1207
- Hu, F., Zhao, Y., Hui, Z., Xing, F., Yang, J., Lee, I., Zhang, X., Xu, J., 2019. Regulation of intracellular Ca²⁺/CaMKII signaling by TRPV4 membrane translocation during osteoblastic differentiation. *Biophysics Reports*. Vol5(5-6), p. 254-63.
- Huang, S., L. Xu, Y. Zhang, Y. Sun, G. Li (2015) Systemic and local administration of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells promotes fracture healing in rats. *Cell Transplant* 24: 2643-2655
- Hui, P., Meena, S.L., Singh, G., Agarawal, R.D., Prakash, S. 2010. Synthesis of Hydroxyapatite Bio-Ceramic Powder by Hydrothermal Method. *Journal of Minerals & Material Characterization & Engineering*, 9(8), 683-692. India
- Hughes, F, Turner, W, Belibasakis, G & Martuscelli, G, 2006. Effect of Growth factor and cytokines on osteoblast differentiation', *Periodontology* 2000, vol. 41, pp. 46-72.
- Ilancheran, S, Michalska, A, Peh, G, Wallace, E, Pera, M & Manuelpillai, U 2007, 'Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential', *Biol Reprod*, vol 77, pp.577-88.
- Isaka & Kobayashi, 2008. Participation of Dental Pulp Stem Cells with Regeneration Alveolar Bone, *Journal Periodontol*, pp. 314-323.
- Ishartadiati K. 2009. Peranan TNF, IL-1, dan IL- 6 pada respon imun terhadap protozoa. Surabaya: FK Universitas Wijaya Kusuma.
- Ito K, Yamada Y, Naiki T, Ueda M. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin

- glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *Clin Oral Implants Research* 2006;17:579–86.
- Jacobs, S.A., V.D. Roobrouck, C.M. Verfaillie, S.W. van Gool (2013) Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells. *Immunol Cell Biol* 91: 32-39
- Jandinski JJ. Osteoclast activating factor is now interleukin-1 beta: historical perspective and biological implications. *J Oral Pathol.* 1988 Apr;17(4):145-52. doi: 10.1111/j.1600-0714.1988.tb01515.x. PMID: 3139850
- Jangid, M.R., Rakhewar, P.S., Nayyar, A.S., Cholepatil, A., & Chhabra, M.P. 2016. Bone Grafts and Bone Graft Substitutes In Periodontal Regeneration: A Review. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci*, 2(8), 1-7.
- James, A. 2013. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation, Scientifica
- J. C. Wohlfahrt, B. J. Evensen , B. Zeza , H. Jansson , A. Pilloni , A. M. Roos-Jansåker, G. L. Di Tanna , A. M. Aass, M. Klepp and O. C. Koldslund. 2017. A novel non-surgical method for mild periimplantitis- a multicenter consecutive case series. *International Journal of Implant Dentistry* 3: 38.p.1-8. DOI 10.1186/s40729-017-0098-y
- Jepsen S, et al. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol.* 2015;42(Suppl 16):S152–7.
- Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, Figuero E, Giovannoli JL, Goldstein M, Lambert F, Ortiz-Vigon A, Polyzois I, Salvi GE, Schwarz F, Serino G, Tomasi C, Zitzmann NU. Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol.* 2015 Apr;42 Suppl 16:S152-7. doi: 10.1111/jcpe.12369. PMID: 25626479.
- J. F. Cox and G. A. Zarb, “The longitudinal clinical efficacy of osseointegrated dental implants: a 3-year report,” *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, vol. 2, no. 2, pp. 91–100, 1987
- Johansson CB, Hansson HA, Albrektsson T (1990) Qualitative interfacial study between bone and tantalum, niobium or commercially pure titanium. *Biomaterials* 11: 277-280.
- Jung RE, Cochran L, Domken O, Seibl R, Jones AA, Buser D, et al. The effect of matrix bound parathyroid hormone on bone regeneration. *Clin Oral Implant Research* 2007;18:319–25.
- J. S. Guindy, C. E. Besimo, R. Besimo, H. Schiel, and J. Meyer, “Bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained implant-borne crowns in vitro,” *Journal of Oral Rehabilitation*, vol. 25, no. 6, pp. 403–408, 1998

- Kahlenberg J.M, Kaplan M.J. 2013. Little Peptide, big effect: The Role of LL-37 in Inflammation And Autoimmune Disease. *Immunological Journal*. 191(10): doi:10.4049/jimmunol.1302005
- Kamadjaja D, Purwanti, Rantam F, Ferdiansyah, & Pramono D, 2015. Healing Mechanism and Osteogenic Capacity of Bovine Mineral-Human Amniotic Mesenchymal Stem Cell And Autogenous Bone Graft in Critiation & EngeecalSize Mandibular Defect. *Journal Biomedical Science and Engineering*, vol.8, pp 733-746
- Kamadjaja D, Purwanti, Rantam F & Ferdiansyah PC, 2014. The Osteogenic capacity of human amniotic membrane, mesenchymal stem cell (hAMSC) and potential application in maxillofacial bone reconstruction in vitro study, *Journal of Biomedical Science and Engineering*, Vol 7. Pp.497-503
- Kamba, A.S., & Zakaria, Z.A.B. 2014. Osteoblasts Growth Behaviour on Bio-Based Calcium Carbonate Aragonite Nanocrystal. *BioMed Research International*, 2014.
- Kaveh, K, Ibrahim, R, Bakar, M & Ibrahim, T 2011, 'Mesenchymal Stem Cells, Osteogenic Lineage and Bone Tissue Engineering: A Review', *Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol 10, no. 17, pp. 2317-2330
- Kawai, G, Ohno, T, Kawaguchi, T, Nagano, A, Mitsuru, S, Takigami, I, Matsushashi, A, Yamada, K, Hosono, K, Tezuka, K, Kunisada, T, Hara, A & Shimizu, K, 2013. Human Dental Pulp Facilitates Bone Reneration in Rat Bone Defect Model, *Bone and Tissue Regeneration Insights*, vol.4, pp. 1-10.
- Keen, R 2008, *Pathophysiology of Osteoporosis, in Osteoporosis*, Oxford University Press, Oxford. 101-106
- Kean, T.J., P. Lin, A.I. Caplan, J.E. Dennis (2013) MSCs: delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. *Stem Cells Int* 2013: 732742
- Kim JE, Kim BJ, Jeong MS, Seo SJ, Kim MN, Hong CK, Ro BI. 2005. Expression and modulation of LL-37 in normal human keratinocytes, HaCaT cells, and inflammatory skin diseases. *J Korean Med Sci*. 2005;20:649-654
- Kini, U & Nandeesh, B 2012, *Physiology of bone formation, remodeling and metabolism*, 14th edn, Springer, Bangalore. 108-115
- Kitaura, H., Sands, M.S., Aya, K., Zhou, P., Hirayama, T., Uthgenannt, B., Teitelbaum, S.L. 2004. Marrow stromal cells and osteoclast precursors differentially contribute to TNF-alpha-induced osteoclastogenesis in vivo. *J Immunol*. 173, 8, p. 4838-4846.

- Khaerallah, Almeshaly, 2016. Bone Graft Substitutes for Bone Defect Regeneration. A Collective Review., International Journal of Dentistry and Oral Science (IJDOS)., vol.3, no.5, pp 247-257
- K. Suda, J. Woo, M. Takami et al., “Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF- α , IL-1, and RANKL,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 190, no. 1, pp. 101–108, 2002
- Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, Matthay MA. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells*. 2010 Dec;28(12):2229-38. doi: 10.1002/stem.544. PMID: 20945332; PMCID: PMC3293245.
- Langdahl, B, Carstens, M, Stenkjær, L & Eriksen, E 2003, 'Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene and osteoporosis', *Bone*, pp. 297-310.
- Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide- binding protein. *Infect Immun*. 1995;63:1291-1297.
- Lasserre, J. F., Brex, M. C. & Toma, S. Oral microbes, biofilms and their role in periodontal and peri-implant diseases. *Materials*. **11**, 1802 (2018)
- Laurencin CT, Nair LS. 2008. *Nanotechnology and Tissue Engineering: The Scaffold*. Boca Raton: CRC Press. p. 16-18.
- L. C. Hofbauer, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg, B. L. Riggs, and S. Khosla, “Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells,” *Bone*, vol. 25, no. 3, pp. 255–259, 1999
- L.F. Zhuang, R. M. Watt, N. Mattheos, M.-S. Si, H.-C. Lai, and N. P. Lang, “Periodontal and peri-implant microbiota in patients with healthy and inflamed periodontal and periimplant tissues,” *Clinical Oral Implants Research*, vol. 27, no. 1, pp. 13–21, 2016
- Liang H, Li X, Shimer AL, Balian G, Shen FH. A novel strategy of spine defect repair with a degradable bioactive scaffold preloaded with adipose-derived stromal cells. *Spine J*. 2014 Mar 1;14(3):445-54. doi: 10.1016/j.spinee.2013.09.045. Epub 2013 Oct 25. PMID: 24360747.
- Lidenmair, A, Hatlapatka, T, Kollwig, G, Hennerbichler, S, Gabriel, C, Wolbank, S, Redl, H & Kasper, C 2012, 'Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications', *Cells*, vol 1, no. 4, pp. 1061-1088.

- Li, H., K. Dai, T. Tang, X. Zhang, M. Yan, J. Lou (2007) Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun* 356: 836-842.
- Li, J., Sun, H. Sun, D., Yao, Y., Yao, F., & Yao, K. (2011). Biomimetic multicomponent polysaccharide/nano hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 85(4), 885-894. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.04.015>
- Li, C, Wei, G, Gu, Q, Wang, Q, Tao, S & Xu, L 2015, 'Proliferation and Differentiation of Rat Osteoporosis Mesenchymal Stem Cells (MSCs) after Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Transfection', *Medical Science Monitor*, vol 21, pp. 845-854
- Lin, N, Gronthos, S & Bartold, P, 2008, Stem Cells and Periodontal regeneration, *Austalian Dental Journal*, vol.53, pp. 108-121.
- Lin L & Du L, 2018. The Role Of Secreted Factors in Stem Cells-Mediated Immune Regulation. *Celluler Immunology*, Vol.326, pp.24-32
- Lindhe J, Meyle J. 2008. Peri-implant diseases: consensus report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 35 (8Suppl):282–285
- Linder L, Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Ivarsson B, Jonsson U, Lundstrom I (1983) Electron microscopic analysis of the bone-titanium interface. *Acta Orthop Scand* 54: 45-52.
- Leitman, DC, Paruthiyil, S & Vivar, OI 2010, 'Regulation of Specific Target Genes and Biological Responses by Estrogen Receptor Subtype Agonists', *Curr Opin Pharmacol*, vol 10, no. 6, pp. 629-636.
- Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P., 2004. Importance of bacterial Endotoxin (LPS) in endodontics. *J. Appl Oral Sci*; 12(2); 93-8
- Lemeshow, S, Hosmer Jr, D, Klar, J & Lwanga, S 1990, *Adequacy of sample size in health studies*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Levi, B, Wan, D, Glotzbach, J, Hyun, J, Januszyk, M, Montoro, D, Sorkin, M, James, A, Nelson, E, Li, S, Quarto, N, Lee, M, Gurtner, G & Longaker, M 2011, 'CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor B1(TGF-B1) signaling', *The Journal of Biological Chemistry*, vol 286, pp. 39497-39509.
- Leyva-Leyva, M, Barrera, L, Lopez-Camarillo, C, Arriaga-Pizano, L, Orozco-Hoyuela, G, Carrillo-Casas, E, Calderon-Perez, J, Lopez-Díaz, A, Hernandez-Aguilar, F, Gonzalez-Ramirez, R, Kawa, S, Chimal-Monroy, J & Fuentes-Mera, L 2013, 'Characterization of mesenchymal stem cell

subpopulation from human amniotic membrane with dissimilar osteoblastic potential', *Stem Cells and Development*, vol 22, pp. 1275-1287.

Machado, C, Ventura, J, Lemos, A, Ferreira, J, Leite, M & Goes, A 2007, '3D chitosan–gelatin–chondroitin porous scaffold improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells', *Biomedical Materials*, vol 2, no. 2, p. 124.

Maló P, Nobre MA, Lopes A, Gonçalves I, Nunes M. Seven mm long dental implants in posterior jaws: 3-year report of an ongoing prospective single cohort study. *Eur J Oral Implantol*. 2017;10(1):85-93. PMID: 28327697.

Marie, P & Kaseem, M.2011. Osteoblast in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *European Journal of Endocrinology*, vol 165, pp.1-10

Mariggio MA, Cassano A, Vinella A, Vincenti A, Fumarulo R, Muzio LLO, Maiorano E, Ribatti D, Favia G, 2009. Enhancement of fibroblast Proliferation Collagen Biosynthesis and Production Of Growth Factors As A Result of Combining Sodium Hyaluronate and Amino Acids. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 22(2): 485-492

Mao K, Zhou F, Cui F, Li J, Hou X, Li p, Du M, Liang M, Wang Y, 2013. Preparation And Properties of A-Calcium Sulphate Hemihydrate And B-Tricalcium Phosphate Bone Substitute. *Biomed Mater Eng*. Vol. 23 (3);p.197-210

Manolagas, S 2010, 'Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanism and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis', *Endocr Rev*, vol 21, no. 2, pp. 115-37.

Mahmudati N. 2015. *Kajian Biologi Molekuler Peran Estrogen/ Fitoestrogen pada Metabolisme Tulang Usia Menopause*. Seminar Nasional VIII Pendidikan Biologi.p.424-426.
<http://jurnal.fkip.uns.ac.id/index.php/prosbio/article/view/984>

M. Doblare., J.M. Garcia., dan M.J. Gomez. 2004. Modelling Bone Tissue Fracture and Healing : A. Review. *Engineering Fracture Mechanics* 71: 1809-1840

Mellado-Valero A, et al. Decontamination of dental implant surface in peri-implantitis treatment: a literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(6):e869–76

Monmaturapoj, N & Yatonchai, C.2010. Effect of Sintering on Microstructure and Properties of Hydroxyapatite Produced by Different Synthesizing Methods, 20(2), 53-61

- Mescher AL, 2010. *Histologi dasar Junquiera : teks & atlas ed 12, Frans (penerjemah)*. Jakarta: EGC, 2011. p. 118-128.
- Miloro, M., Ghali, G.E., Larsen, P.E., Waite P.D. 2004. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery 2nd ed*. Hamilton: BC Decker Inc. p. 5-6.
- Milan PB, Lotfibakhshaiesh N, Joghataie MT, Ai J, Pazouki A, Kaplan DL, Kargozar S, Amini N, Hamblin MR, Mozafari M, Samadikuchaksaraei A. Accelerated wound healing in a diabetic rat model using decellularized dermal matrix and human umbilical cord perivascular cells. *Acta Biomater*. 2016 Nov;45:234-246. doi: 10.1016/j.actbio.2016.08.053. Epub 2016 Aug 31. PMID: 27591919; PMCID: PMC5069185.
- Minguell, J, Erices, A & Conget 2001, 'Mesenchymal stem cells', *Exp Biol Med*, vol 226, no. 6, pp.507 – 520
- Misch, C 2008, *Contemporary implant dentistry, 3rd edn, Mosby inc, St Louis, Canada*.
- Mishler O., Shiau H., 2014, Management of peri implant disease a current appraisal. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*. Vol.14., pp. 53-59
- Mombelli A, Muller N, Cionca N. 2012. The Epidemiologi of Peri implantitis.: *Clin.Oral Implants Res*. 23(Suppl.6), p.67-76
- Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol*. 2006;176:2455-2464
- Monguió-Tortajada, M., Roura, S., Gálvez-Montón, C., Franquesa, M., Bayes-Genis, VEGF and extracellular matrix proteins in human periodontal ligament Militi, A., Cutroneo, G., Favaloro, A., 2019. An immunofluorescence study on during tooth movement. 5, 10, e02572, p. 1-10.
- Moraes, D.A., Sibov, T.T., Pavon, L.F. 2016. A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther*. 7, p. 97
- Moreau, J.L., H.H. Xu (2009) Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectable calcium phosphate-chitosan composite scaffold. *Biomaterials* 30: 2675-2682
- Moshiri, A., A. Oryan, A. Meimandi-Parizi (2015) Synthesis, development, characterization and effectiveness of bovine pure platelet gel-collagen-polydioxanone bioactive graft on tendon healing. *J Cell Mol Med* 19: 1308-1332

- M. Quirynen, C. M. Bollen, H. Eyssen, and D. van Steenberghe, "Microbial penetration along the implant components of the Brånemark system. An in vitro study," *Clinical Oral Implants Research*, vol. 5, no. 4, pp. 239–244, 1994
- Murphy, C.M., M.G. Haugh, F.J. O'Brien (2010) The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31: 461-466
- Murphy, C.M.C., O'Brien, F.J., Little, D. D. G., Schindeler, A.(2013). Cell scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European Cells and Materials*, 26, 120-132. <https://doi.org/10.22203/eCM.v026a09>
- Nahar, U.K., Shovon, B., Chandra, R.D., Shukanta, B., & Chandra, S.P. 2017. Characterization of Beta-Tricalcium Phosphate (B-Tcp) Produced At Different Process Conditions. *J Bioengineer & Biomedical Sci*, 7(221), 2.
- Nakamura, H, 2007. Morphology, Function, and Differentiation of Bone Cells, *Journal of Hard Tissue Biology*, vol. 16, no.1, pp. 15-22.
- Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Tanaka S, Heumann D. Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:972-982.
- Nagyova M, Slovinska L., Blasko J., Grulova I., Kuricova M., et al, 2014. A comparative. Study of PKH67 and BrdU labeling technique for tracing rat mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal*. 50:656–663
- Nisa, Zulifah Izzatin. 2014. Sintesis nanohidroksiapatit Dari Tulang Sotong (Sepia Sp.) Dengan Metode Milling dan Karakterisasi Secara In Vitro Sebagai Bahan Implan Tulang (*Bone Repair*). Fakultas Sains dan Teknologi. Skripsi. Surabaya: Universitas Airlangga
- Nassiri, F., Cusimano, M.D., Scheithauer, B.W. 2011. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*. 31, 6, p. 2283-2290.
- Nastiti Faradilla Ramadhani, Alexander P. Nugraha, Igo S. Ihsan, Yoni A. Agung, Fedik A. Rantam, Diah S. Ernawati, Rini D. Ridwan, Ida B. Narmada, Arif N. M. Ansori, Suhaila Hayaza, Tengku N.E.B.T.A. Noor. Gingival Medicinal Signaling Cells Conditioned Medium effect on the Osteoclast and Osteoblast number in Lipopolysaccharide-induced Calvaria Bone Resorption in Wistar Rats' (*Rattus novergicus*). *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2021; 14(10):5232-7. doi: 10.52711/0974-360X.2021.00911

- Nell MJ, Tjabringa GS, Vonk MJ, Hiemstra PS, Grote JJ. Bacterial products increase expression of the human cathelicidin hCAP-18/LL-37 in cultured human sinus epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004;42:225-231
- Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA . 2018. *Carranza's Clinical Periodontology*, 11th edition, California: WB saunders Company. p.144-205.
- Nobuhara, W, Carnes, D & Gilles, J 1993, 'Antiinflammatory effects if dexamethasone on tissues following endodontic overinstrumentation', *Journal of Endodontics*, vol 19, pp. 501-507
- Noviyanti, A. R., 2017. Cangkang Telur Ayam sebagai Sumber Kalsium dalam Pembuatan Hidroksiapatit untuk Aplikasi Graft Tulang. *Chimica et Natura Acta.* Vol 5(3)., p.107-11.
- Nugraha, A.P., Narmada, I.B., Ernawati, D.S., Widodo, A.D.W., Lestari, P., Rantam, F.A. 2018. Gingival Mesenchymal Stem Cells from Wistar Rat's Gingiva (*Rattus Novergicus*) Isolation and Characterization (In Vitro Study). *J Int Dent Med Res.* 11, 1, 694-9
- N. Udagawa, N. Takahashi, T. Akatsu et al., "Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 18, pp. 7260–7264, 1990
- Oyonarte R, Pilliar RM, Deporter D, Woodside DG (2005) Peri-implant bone response to orthodontic loading: Part 1. A histomorphometric study of the effects of implant surface design. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 128: 173-181.
- Oryan A., Kamali A, Moshiri A, Baghaban Eslaminejad M, 2017. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine : What is the evidence?. *Cells Tissue Organs*, 204: 59-83. DOI: 10.1159/000469704
- Oryan, A., S. Alidadi, A. Moshiri, A. Bigham- Sadegh (2014a) Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *Biofactors* 40: 459-481.
- Otsuru, S., K. Tamai, T. Yamazaki, H. Yoshikawa, Y. Kaneda (2007) Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 453-458
- Pandit, N, Malik, R & Philips, D, 2011. Tissue engineering: A new vista in periodontal regeneration, *Journal of Indian Society of Periodontology*, vol. 15, no. 4, pp. 328-337.

- Papachroni K, Karatzas D, Papavassiliou, K. Efthimia & Athanasions 2009. Mechanotransduction in osteoblast Regulation And Bone Disease. *Trends in Molecular Medicine*, vol. 15, no.5, pp.208-213
- Park, Y.S., Yi, K.Y., Lee, I.S.& Jung, Y.C. Correlation between microtomography and histomorphometry for assessment of implant osseointegration. *Clin. Oral. Implants Res.* **16**, 156–160, <https://doi-org.rproxy.tau.ac.il/10.1111/j.1600-0501.2004.01083.x> (2005).
-
- Patil, AS, Merchant, Y & Nagarajan, P, 2013. Tissue Engineering of Craniofacial Tissues-A Review, *Regen Med Tissue Eng* , vol. 2, no. 6, pp. 1-19.
- Mathew Peter, N.S. Binulal, S.V. Nair, N. Selvamurugan, H. Tamura, R. Jayakumar, (2010), Novel biodegradable chitosan–gelatin/nano-bioactive glass ceramic composite scaffolds for alveolar bone tissue engineering., *Chemical Engineering Journal* 158 (2010) 353–361. Doi: 10.1016/j.cej.2010.02.003
- Pino, A, Rosen, C & Rodriguez, J 2012, 'In Osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis', *Biological Research*, vol 45, pp. 279-287
- Pitchford, S.C., R.C. Furze, C.P. Jones, A.M. Wengner, S.M. Rankin (2009) Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell* 4: 62-72.
- Pittet, M.J., M. Nahrendorf, F.K. Swirski (2014) The journey from stem cell to macrophage. *Ann NY Acad Sci* 1319: 1-18.
- Penga, Yohana Maria. 2013. Pengaruh Proses Sintering Terhadap Karakteristik Hidroksiapatit Dari Tulang Sotong (Sepia Sp.). Fakultas Sains and Teknologi. Skripsi. Surabaya: Universitas Airlangga
- Pontikoglou, C., Langonné, A., Ba, M.A. 2016. CD200 expression in human cultured bone marrow mesenchymal stem cells is induced by pro-osteogenic and pro-inflammatory cues. *J Cell Mol Med.* 20, 4, p.655-665
- Pratama, A.F. 2017. Karakteristik Hidroksiapatit Hasil Sintesis Cangkang Kerang Darah (*Anadara Granosa*) Menggunakan Metode Hydrothermal Dengan Variasi Waktu Sintering. Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah, Surabaya.
- Prananingrum dan Revianti S, 2017. Pengembangan Produk Xenograft Dari Cangkang Kerang Darah Dan Teripang Emas (Biota Laut) Pada Proses Bone Remodeling. *Laporan Akhir Tahun 2*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Hang Tuah Surabaya

- Prall, WC, Haasters, F, Heggebö, J, Polzer, H, Schwarz, C, Gassner, C, Grote, S, Anz, D, Jäger, M, Mutschler, W & Schieker, M 2013, 'Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients feature impaired signal transduction but sustained osteoinduction in response to BMP-2 stimulation', *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- Prathapachandran J., Suresh N., 2012: Management of peri implantitis. *Dental Research Journal*; 9(5): 516-521
- Pratama, A. F. 2017. Karakteristik Hidroksiapatite Hasil Sintesis Cangkang Kerang Darah (Anadara Granosa) Menggunakan Metode Hydrotermal Dengan Variasi Waktu Sintering. Fakultas Kedokteran Gigi. Skripsi. Surabaya: Universitas Hang Tuah
- Pratama, T., Fadli, A., & Helwani, Z. 2016. Pembuatan Keramik Berpori Berbahan Baku Tricalcium Phosphate Dengan Metode Protein Foaming-Starch Consolidation. *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Teknik dan Sains*, 3(2), 1-7
- Prahasanti C, Krismariono A, Takanamita R., et al. DS. Enhancement of Osteogenesis Using a Combination of Hydroxyapatite and Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *J Int Dent Med Res*. 2020; 13(2): 508-512.
- P. Sahrman, F. Gilli, D. B. Wiedemeier, T. Attin, P. R. Schmidlin, and L. Karygianni, "(e microbiome of periimplantitis: a systematic review and meta-analysis," *Microorganisms*, vol. 8, no. 5, 2020.
- Polo-Corales L. Latorre-Esteves M. Ramirez-Vick JE, 2014. Scaffold Design For Bone Regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* ;14(1): 15-56
- Purwiandono, G., Julita, H., & Saputra, D.A. 2018. Pengaruh Variasi Ha-Tcp (Hydroxy Apatit-Tricalcium Pospat) Terhadap Biokomposit (Ha: Tcp)-Gelatin-Cmc Sebagai Injectable Bone Substitute (Ibs). *Ijcr (Indonesian Journal Of Chemical Research)*, 4(1), 24-30.
- Qian Y, Zhou X, Zhang F, Diekwisch TGH, Luan X, Yang J. Triple PLGA/PCL Scaffold Modification Including Silver Impregnation, Collagen Coating, and Electrospinning Significantly Improve Biocompatibility, Antimicrobial, and Osteogenic Properties for Orofacial Tissue Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2019 Oct 16;11(41):37381-37396. doi: 10.1021/acsami.9b07053. Epub 2019 Oct 7. PMID: 31517483; PMCID: PMC7220812.
- Rahawy, A & Al-Mahmood, Saevan & Basim, Hadeel & Rahawi, Aseel Mohammed & Al-Sabaawy, Hadil. (2021). Standard techniques for formalin-fixed paraffin-embedded tissue: A Pathologist's perspective. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 35. 10.33899/ijvs.2021.131918.2023.
- Ramesh A., Jayaprakash D, 2015. Periimplant disease: Etiopathogenesis and progression. *Journal of International Clinical Dental Research Organization*. Vol.7, pp.55-64

- Ramanauskaite A., Juodzbaly G., 2016. *Jornal of Oral and Maxillofacial Research*. Vol.7, no.3. pp. 1-15
- Rantam FA, Ferdiansyah, Purwati. 2014. *Stem Cell Mesenchymal, Hematopoetik dan model Aplikasi*. Edisi Kedua. Airlangga University Pres. Surabaya. H.1-90, 181-190
- Rammal, H, Beroud, J, Gentils, M, Labrude, P, Menu, P, Kerdjoudj, H & Velot, E 2013, 'Reversing charges or how to improve wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films', *Biomedical Materials and Engineering*, vol 23, pp. 299-309.
- Rammelt, S., Schulze, E., Witt, M., Petsch, E., Biewener, A., Pompe, W., Zwipp, H. 2004. Collagen Type I Increases Bone Remodelling around Hydroxyapatite Implants in the Rat Tibia. *Cells Tissues Organs*, 178, 3, p. 146-157
- Ramos, L.T., Sánchez-Abarca, L.I., Muntión, S. 2016. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal*.14, p.2
- Rasyid, A., Fadli, A., Akbar, F., Jurusan, M., Kimia, T., Jurusan, D., & Kimia, T. (2016). PEMBUATAN TRIKALSIUM FOSFAT BERPORI MENGGUNAKAN METODE PROTEIN FOAMING-CONSOLIDATION. *Jom FTEKNIK*, 3, 1–7.
- Raynaud, C.M., A. Rafii (2013) The necessity of a systematic approach for the use of MSCs in the clinical setting. *Stem Cells Int* 2013: 892340
- Reddi AH. 2007, Morphogenesis and Tissue engineering. In Lanza R, Langer R, Vacanti J. *Principles of tissue engineering* 3rd ed. Elsevier Academic Press. Burlington, MA. P.117
- Resaldi, M.F. 2018. Karakteristik CaCO₃ dari Hasil Sintesis Cangkang Kerang Darah (Anadara Granosa) pada Variasi Suhu Kalsinasi. Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hang Tuah, Surabaya.
- Ramos R, Domingues Lucilia, Gama Miguel, 2011. LL37, a huan antimicrobial peptide with immunomodulatory properties. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances A. mendez-Vilas (Ed.) Portugal, pp. 915-925
- R. Adell, U. Lekholm, B. Rockler, and P. I. Brånemark, "A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw," *International Journal of Oral Surgery*, vol. 10, no. 6, pp. 387–416, 1981.

- Rodriguez, I. (2013). Tissue engineering composite biomimetic, gelatin sponges for bone regeneration. Thesis. Virginia Commonwealth University: Virginia.
- Rosenfeld Y, Papo N, Shai Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J Biol Chem.* 2006;281:1636-1643
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. 2006. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodelling. *Annu Rev Biomed Eng*; 8: 455-498. <http://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721>
- Rogers, J, Li, F, Coatney, D, Rossa, C, Bronson, P, Krieder, J, Giannobile, W & Kirkwood, K, 2007 Actinobacillus actinomycetemcomitans Lipopolysaccharide-mediated Experimental Bone Loss Model for Aggressive Periodontitis, *J Periodontol*, pp. 550-558.
- Rima Parwati Sari, Syamsulina Revianti, Dwi Andriani, Widyasri Prananingrum, Retno Pudji Rahayu, Sri Agus Sudjarwo. 2021. The Effect of *Anadara granosa* Shell's-*Stichopus hermanni* Scaffold on CD44 and IL-10 Expression to Decrease Osteoclasts in Socket Healing. *Eur J Dent* 2021; 15(02): 228-235, DOI: 10.1055/s-0040-1719215
- R.Tao, T.J. Sun, Y.Q. Han, G.Xu, J.Liu, Y.F.Han. 2014. Optimizing in vitro cell labelling methods for human umbilical cord derived mesenchymal stem cells. *European Review for medical and Pharmacological Science.*, 18., 1127-1134
- Sanz, A, Carri, F & Chaparro, A, 2015. Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering, *Periodontology* 2000, vol 67, pp. 251–267.
- Sari RP dan Sularsih, 2015. Kajian Metode Ekstraksi dan Biomaterial Gel Teripang Emas. *Laporan Akhir 2*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Hang Tuah Surabaya
- Sari DS, Maduratna E; Ferdiansyah, Latief FDE; Satuman, Nugraha AP, Sudiana K, Rantam FA. Osteogenic Differentiation and Biocompatibility of Bovine Teeth Scaffold with Rat Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells. *Eur J Dent.* 2019 May;13(2):206-212. doi: 10.1055/s-0039-1694305. Epub 2019 Sep 16. PMID: 31525778; PMCID: PMC6777160.
- Syedmajidi S, Rajabnia R, Syedmajidi M. Evaluation of antibacterial properties of hydroxyapatite/bioactive glass and fluorapatite/bioactive glass nanocomposite foams as a cellular scaffold of bone tissue. *J Lab Physicians.* 2018 Jul-Sep;10(3):265-270. doi: 10.4103/JLP.JLP_167_17. PMID: 30078960; PMCID: PMC6052815.

- Schorge, JO, Schaffer, JI, Halvorson, LM, Hoffman, L, Bradshaw, KD & Cunningham, FG 2008, *Williams Gynecology*, McGraw-Hill Companies. 132-139
- S. Dibart, M. Warbington, F. S. Ming, and Z. Skobe, "In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system," *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, vol. 20, no. 5, pp. 732–737, 2005
- Sheikh, Z., Hamdan, N., Ikeda, Y., Grynepas, M., Ganss, B., & Glogauer, M. 2017. Natural Graft Tissues and Synthetic Biomaterials For Periodontal And Alveolar Bone Reconstructive Applications: A Review. *Biomaterials Research*, 21(1), 9.
- Sfeir, C, Ho, L, Doll, B, Azari, K & Hollinger, J, 2005. Fracture Repair, in *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Application*, Humana Press, New Jersey.
- Singh, P. K., & Kumari, A. (2017). Prevalence and Distribution of Different Types of Bone Defects in Chronic Periodontitis In Bagalkot Subjects - A Clinical Study, 5(3), 284–289. <https://doi.org/10.17354/ijss/2017/314>
- Smeets R, Heningsen A, Jung O, Heiland M, Hammacher C, Stein J., 2014. Definition, etiology, prevention and treatment of peri- implantitis a review. *Journal Head and Face Medicine*. vol 10, no.1, pp.1-13
- Smerke D, Rozman P, Veselko M, Gubina B, 2013. Regenerative Medicine and Tissue Engineering, Treatment of Bone Defect-Allogenic Platelet Gel and Autologous Bone Technique. Editor : *Andreas JA Publisher; InTech*. p 325-340
- Sennerby L, Wennerberg A, Pasop F (2001) A new microtomographic technique for non-invasive evaluation of the bone structure around implants. *Clin Oral Implants Res* 12: 91-94.
- Sohni, A & Verfaillie, C 2013, Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking, *Stem Cells International*, vol.2013, pp. 1-8.
- Sollazzo V. Tricalcium phosphate stimulates adipose tissue- derived stem cells toward osteoblasts differentiation. *European Journal of Inflammation*. 2011; 9(Suppl 1): 51-6.
- Soeroso A. Sitokin. *Oftalmologi Indonesia*. 2007;5:171-80.
- Sudiana I.K, 2017 . Hantaran Sinyal pada proses inflamasi. Airlangga University Press 1st ed. p.54-55
- Sudiana, K, 2005. *Teknologi Ilmu Jaringan dan Imunohistokimia*, Sagung Seto, Surabaya

- Sulaiman, S.B., Keong, T.K., Cheng, C.H., Saim, A.B., & Idrus, R.B.H. 2013. Tricalcium Phosphate/Hydroxyapatite (TcP-Ha) Bone Scaffold As Potential Candidate For The Formation Of Tissue Engineered Bone. *The Indian Journal Of Medical Research*, 137(6), 1093.
- Supronowicz P, Gill E, Trujillo A, Thula T, Zhukauskas R, Ramos T, Cobb RR. Human adipose-derived side population stem cells cultured on demineralized bone matrix for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2011 Mar;17(5-6):789-98. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0357. Epub 2010 Dec 6. PMID: 20964579.
- Tatsuya, Y, Fumio, T & Kazuhiro, O, 2010. A Cell Line with Characteristics of The Dental Pulp Stem Cell For Mineralized and RUNX-2/Cb1/Os2 activity by Bone Morphogenetic Protein-2, *Journal Stem Cell Rev Res*, pp. 4191-4200.
- Takahashi, Y, Yamamoto, M & Tabata, Y 2005, 'Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and β -tricalcium phosphate', *Biomaterials*, vol 26, no. 17, pp. 3587-3596.
- Teitelbaum, S 2010, 'Stem cells and osteoporosis therapy', *Cell Stem Cell*, vol 7. 40-43
- T. Turajane. T. Thitiset., S.Honsawek., U.Chaveewanakorn. J.Aojanepong., K.I.Papadopoulos., 2013., Assesment of chondrogenic differentiation potential of autologous activated peripheral blood stem cells on human early osteoarthritic cancellous tibial bone scaffold. Article in *Musculoskeletal Surgery.*, November. DOI 10.1007/s12306-013-0303-y
- Tontowi AE, Dewo P, Wahyuni ET, Triyono Joko, 2012. Scaffold dari Bovine Hydroxyapatite dengan Polyvynialcohol Coating, *Jurnal TeknoSains*, Vol.1, no.2, p.71-143
- Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, et al. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*. 2008; 26:99–107
- Tollemar V, Collier ZJ, Mohammed MK, Lee MJ, Ameer GA, Reid RR. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes Dis*. 2016 Mar;3(1):56-71. doi: 10.1016/j.gendis.2015.09.004. Epub 2015 Oct 17. PMID: 27239485; PMCID: PMC4880030.
- Valente NA, Andreana S. Peri-implant disease: what we know and what we need to know. *J Periodontal Implant Sci*. 2016 Jun;46(3):136-51. doi: 10.5051/jpis.2016.46.3.136. Epub 2016 Jun 29. PMID: 27382503; PMCID: PMC4928203.

- Varma, AS, Bholaa, S, Gangavatia, R, Shirlalb, S & Belgaumi, U, 2012. Tissue Engineering in Periodontics -A Novel Therapy, *Annals of Dental Research*, vol 2, no. 1, pp. 1-7.
- Vizioso F J, Eiro N, Cid S, Schneider J, & Perez Fernandez R, 2017. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal Molecular Science*. Vol.18, no.1852, pp.1-24.
- Volonte C, Apolloni S, Skaper S.D, Burnstock G. 2012. P2X7 Receptor: Channels, Pores And More. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*. Bentham Science Publisher. Vol.11, No.6. p.705-720.
- Wang. L, Ott. L, Seshareddy. K, Weiss. M & Dretamore. M. 2011. Musculoskeletal tissue engineering with human umbilical cord mesenchymal stromal cells, *Regenerative Medicine*, vol 6, no. 1, pp. 95 -109
- Wang. Z, Goh. J, De. SD, Ge. Z, Ouyang. H, Chong. J, Low. S & Lee. E 2006, 'Efficacy of bone marrow derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model', *Tissue Eng*, vol 12, no. 7, pp.1753-61.
- Wang, Z., H. Song, H. Deng, J. Chen, L. Zhang, Y. Li (2009) Causes and treatment of long bone fracture nonunion after allogeneic bone grafting surgery (in Chinese). *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 23: 534-537
- Wahl DA and Czernuszka JT, 2006. Collagen-Hydroxyapatite Composite For Hard Tissue Repair. *European Cells And Materials* Vol.11: p.43-56
- Waterman, R.S., S.L. Tomchuck, S.L. Henkle, A.M. Betancourt (2010) A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5: e10088
- Wibowo 2004, *Indonesia's elderly: Problem and potential*, Oxford Institute of Aging, Oxford
- Widyastuti, 2018. Potensi Cangkang Anadara Granosa Sebagai Bahan Graft Pada Proses Osteogenesis Mandibula, *Buku Ringkasan Desertasi*, p.1-5
- Widyasri Prananingrum, Meinar Nur Ashrin, Syamsulina Revianti, Rima Parwati Sari (2021). Osteoblast on Porous HA-TCP Scaffold Derived from Blood Cockle Shells Synthesis: in vivo study. *Journal of International Dental and Medical Research. Ectodermal Dysplasia Group-Turkey.*, Vol.14(2)., p.613-617. http://www.jidmr.com/journal/wp-content/uploads/2021/07/28-D21_1411_Widyasri_Prananingrum_Indonesia-1.pdf.
- Wildermann B, schmidmaier G, Ordell S, Stange R., Haas N.P, Raschke M, 2002. Proliferation an Differentiation During Fracture Healing Are Influenced by

Locally Applied IGF-I and TGF-B1: Comparison of Proliferation Markers, PCNA and BrdU. *Journals of Biomedical Materials Research*; 65(B)1, 150-156

Williams, P.L., 1995. *Gray's Anatomy* 38th ed. Churchill Livingstone

Wirjokusumo, S. 2003. *Bone graft dalam Perawatan Kedokteran Gigi dalam Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar dalam bidang Ilmu Bedah Mulut*, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Surabaya. P. 5

Wiesmann, A, Buhring, H, Mentrup, C & Weismann, H 2006, 'Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation', *Head and Face Medicine*, vol 2, p. 8.

Zhang Z, Li Z, Li Y, Wang Y, Yao M, Zhang K, Chen Z, Yue H, Shi J, Guan F, Ma S. Sodium alginate/collagen hydrogel loaded with human umbilical cord mesenchymal stem cells promotes wound healing and skin remodeling. *Cell Tissue Res*. 2021 Feb;383(2):809-821. doi: 10.1007/s00441-020-03321-7. Epub 2020 Nov 7. PMID: 33159581.

Zarrabi M, Mousavi SH, Abroun S, Sadeghi B. 2014. Potential Uses for Cord Blood Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal*, 15(4), 274-281

Zhou, S, Turgeman, G, Harris, S, Leitman, D, Komm, B, Bodine, P & Gazit, D 2003, 'Estrogen Activate Bone Morphogenetic Protein-2 Gene Transcription in Mouse Mesenchymal Stem Cells', *Mol Endocrinol*, vol 17, no. 1, pp. 56-66.

Zhao, B. 2017. TNF and Bone Remodeling. *Curr Osteoporos Rep*. 15, 3, p.126–13

Zhang W, Zhu C, Wu Y, et al. VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation. *Eur Cell Mater*. 2014;27:1-12. Published 2014 Jan 15. doi:10.22203/ecm.v027a01

Xu, Q.C., Wang, Z.G., Ji, Q.X. 2014. Systemically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells contributing to bone tissue regeneration. *Int. J. Clin. Exp. Pathol*. 7, 8, p. 4922- 4929.

Yadav N, Srivastava P. In vitro studies on gelatin/hydroxyapatite composite modified with osteoblast for bone bioengineering. *Heliyon*. 2019;5(5):e01633. Published 2019 May 9. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e01633

- Yaimara Solis, Natalia Davidenko, Raul G. Carrodeguas, Jeny Cruz. Andy Hernández, Miriela Tomas, Ruth E. Cameron, Carlos Peniche (2012). Preparation, characterization, and in vitro evaluation of nanostructured chitosan/apatite and chitosan/Si-doped apatite composites. *Journal of Materials Science* 48(2):841–849 DOI 10.1007/s10853-012-6804-5
- Yang. J, Zhang. L, Yu. C, et al, 2014. Monocyte And Macrophage Differentiation: Circulation Inflammatory Monocyte As Biomarker For Inflammatory Disease. *J. ListBiomark Resv.*, vol.2, no.1
- Yani L, Ilhamjaya P, Gatot SL, Wijaya A, Suryani A. Korelasi antara adiponektin dengan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF-a) pada pria Indonesia obes non-diabetes. *MKI*. 2011;6;1.
- Yonatasya, F. D., Prananingrum, W., & Ashrin, M. N., 2019. Pengaruh Bone Graft Senyawa Kalsium Hasil Sintesis Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*) dengan Variasi Waktu Sintering terhadap Proliferasi Sel Fibroblas pada Proses Socket Healing. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi*, 13, 35.
- Yu X, Quan J, Chen H, Wang R, Guo J, Lin X, Mai S, 2018. LL37 Inhibits LPS-induced inflammation And Stimulate The Osteogenic Differentiation of BMSCs Via P2X7 Receptor And MAPK Signaling Pathway. *Experimental Cell Research Journal*. Vol.372. Issue.2. Pp.178-187
- Yuko Ujiie, Reynaldo Todescan, John E. Davies. 2012. Peri-Implant Crestal Bone Loss: A Putative Mechanism. *International Journal of Dentistry*. Volume 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/742439>
- Yu, M., Ge, S., Wang, F., Wen, Y., Yan, X., Zeng, Q., Pei, X. 2013. The role of systemically delivered bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the regeneration of periodontal tissues. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 28, p. e503–511
- Yusuf, D. A. P., 2019. Uji Sitotoksitas Dan Biodegradasi *Scaffold* Kombinasi Teripang Emas (*Stichopus hermanni*) Dan Variasi Ukuran Partikel HA- TCP Hasil Sintesis Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*). Skripsi. Surabaya: Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah

Lampiran 1

Penelitian *in vitro*

INTERNATIONAL JOURNAL OF INTEGRATED ENGINEERING VOL. 14 No. 2 (2022) 80-85



© Universiti Tun Hussein Onn Malaysia Publisher's Office

IJIE

Journal homepage: <http://penerbit.uthm.edu.my/ojs/index.php/ijie>

ISSN : 2229-838X e-ISSN : 2600-7916

The International
Journal of
Integrated
Engineering

Cytotoxicity of HA-TCP Scaffold on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells using MTT Assay

Vivin Ariestania^{1*}, Nike Hendrijantini², Chiquita Prahasanti², Eric Prasetyo²
Mefina Kuntjoro², Rima Parwati Sari¹, Aulia Dwi Maharani¹

¹Faculty of Dental Medicine,
Hang Tuah University, Jl. Arief Rahman Hakim, No.150, Surabaya, 60111, INDONESIA

²Faculty of Dental Medicine,
Airlangga University, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No.47, Surabaya, 60132, INDONESIA

*Corresponding Author

DOI: <https://doi.org/10.30880/ijie.2022.14.012>

Received 30 April 2021; Accepted 30 September 2021; Available online 02 June 2022

Abstract: Hydroxyapatite-tricalcium phosphate (HA-TCP) scaffold is a three-dimensional structure used to support bone regeneration. Ideally, the scaffold should be biocompatible, biodegradable, and non-toxic. The tissue engineering technique uses a combined stem cell and scaffold to repair the bone defect. To prove the non-toxic properties of the scaffold, a cytotoxicity test is needed for the human umbilical cord mesenchymal stem cell (HUCMSCs). In this study, 27 samples were divided into eight groups with a variant of scaffold HA-TCP doses ranging from 5–1000 µg. Each treatment group of scaffolds was covered in HUCMSCs. The samples were added by methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) colorimetric assay, counted using an optical density (OD) formula, and observed by a microplate reader. The viability of the cells was observed by an inverted TMS microscope with 100x magnification. The MTT assay's test shows that the HUCMSCs cell viability shed each variant of HA-TCP scaffold dose, did not show any toxic effect. The higher the OD value, the higher the viability. It has been found that there is no significant difference between the variable scaffold doses to the percentage viability of umbilical cord cells.

Keywords: Scaffold, hydroxyapatite tricalcium phosphate, umbilical cord mesenchymal stem cells, methyl-thiazol-tetrazolium assay, cytotoxicity

1. Introduction

A bone defect is a pathological process resulting from bone component destruction [1]. In dentistry, 90% of bone defects are caused by tooth extraction, trauma, and jaw disease such as a cyst or jaw tumor, especially those with no further treatment [2]. In some bone defect cases, such as bone cancer, periodontitis, and dental implants, a bone graft is needed to replace a bone defect [3]. A bone graft is part of tissue engineering, whose function is to induce new bone formation and wound healing [4].

A scaffold is a three-dimensional structure used as framework material to support bone regeneration and new bone formation. The scaffold should have a biocompatible feature to ensure interaction with the host without rejection [5]. Ideally, biomaterial scaffold material is already biocompatible, biodegradable, and non-toxic materials [6].

Scaffold HA-TCP material is a combination of hydroxyapatite (HA) and tricalcium phosphate (TCP). Hydroxyapatite with the chemical formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ is a compound of calcium phosphate that poses as the main inorganic material of bone formation [7]. Hydroxyapatite has features such as biocompatibility, is osteoconductive, and can bond with bone easily [8]. HA is an apatite mineral compound that has similarities with monoclinic and hexagonal crystal structure minerals in the bone. The utilization of HA in the medical field, especially in dentistry, keeps being

*Corresponding author: vivin.ariestania@hangtuah.ac.id

2022 UTHM Publisher. All rights reserved.
penerbit.uthm.edu.my/ojs/index.php/ijie

80



ORIGINAL ARTICLE

Lipopolysaccharide's Cytotoxicity on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

Mefina Kuntjoro^{1,2}, Eric Priyo Prasetyo³, Febriastuti Cahyani³, Michael Josef Kridanto Kamadjaja², Nike Hendrijantini², Harry Laksono², Primanda Nur Rahmania², Vivin Ariestania⁴, Alexander Patera Nugraha^{1,5}, Igo Syaiful Ihsan⁶, Aristika Dinaryanti⁶, Fedik Abdul Rantam^{6,7}

¹Doctoral Program, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

²Department of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

³Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

⁴Doctoral Program, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

⁵Department of Orthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

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

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

Author to whom correspondence should be addressed: Michael Josef Kridanto Kamadjaja, Department of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof Dr Moestopo 47, Surabaya, Indonesia. Phone: +62 315030255. E-mail: Michael-j-k-k@fkg.unair.ac.id.

Academic Editor: Yuri Wanderley Cavalcanti

Received: 10 March 2020 / Accepted: 28 May 2020 / Published: 03 August 2020

How to cite this article: Kuntjoro M, Prasetyo EP, Cahyani F, Kamadjaja MJK, Hendrijantini N, Laksono H, et al. Lipopolysaccharide's cytotoxicity on human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.* 2020; 20:e0048. <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.153>

Abstract

Objective: To show the cytotoxicity of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) on human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs) to better understand the characteristics for its application in regenerative procedures under periodontopathogen LPS influence. **Material and Methods:** Ultrapure *Porphyromonas gingivalis* LPS was used in this study. This research used a frozen stock HUCMSCs, previously confirmed by flow cytometry. The biological characteristics, such as cell morphology, proliferation, and protein expression, were screened. To check the cytotoxicity, HUCMSCs were cultured and divided into two groups, the control group and LPS group with various concentrations from 25 to 0.39 µg/mL. MTT assay was done and the cells were observed and counted. The significance level was set at 5%. **Results:** The percentage of living HUCMSCs on LPS group were not significantly different among concentrations ($p > 0.05$) from 25 to 0.39 µg/mL, even though there were slight mean decrease between groups, but they were not significant. The duration of 24 hours of exposure of LPS does not significantly lower HUCMSCs viability. **Conclusion:** LPS does not affect the viability of HUCMSCs. The lower the concentration of LPS, the higher the viability of HUCMSCs.

Keywords: Lipopolysaccharide; Viability; Umbilical cord; Mesenchymal stem cells; Cytotoxicity.





Lampiran 3

Uji Kelaikan Etik



Lampiran 4

F.LITB.003

**KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN
RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
(" ETHICAL CLEARANCE ")**

547 / Panke.KKE/ IX / 2017

KOMITE ETIK RSUD Dr. SOETOMO SURABAYA TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN JUDUL :

" Uji In-Vitro Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUCMSCs) dan Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells (hAMSCs) dalam Larutan Gelatin dan Alginat "

PENELITI UTAMA : Dr. Nike Hendrijantini, drg., M.Kes., S.Pros (K)

PENELITI LAIN :

1. Rostiny, drg., M.Kes., Sp.Pros (K)
2. Hanoem Eka Hidajati, drg., MS., Sp.Pros (K)
3. Soekobagiono, drg., MS., Sp.Pros (K)
4. Adi Subianto, drg., MS., Sp.Pros (K)
5. Harry Laksono, drg., M.Kes., Sp.Pros
6. Agus Dahlan, drg., M.Kes., Sp.Pros
7. Bambang Agustono, drg., M.Kes., Sp.Pros
8. Maretaningtyas Dwi Ariani, drg., M.Kes., PhD
9. Manggala Pasca Wardhana, dr., Sp.OG


UNIT/ LEMBAGA/ TEMPAT PENELITIAN : RSUD Dr. Soetomo Surabaya

DINYATAKAN LAIK ETIK

Berlaku dari : 25 SEP 2017 s.d 25 SEP 2018

SURABAYA, 25 SEP 2017

a.n Ketua Komite Etik Penelitian Kesehatan
Wakil Ketua II Komite Etik Penelitian Kesehatan



(Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG (K))
NIP. 19610817 198802 1 002

Lampiran 5

Lembar Persetujuan Pasien (*Informed Consent*)

INFORMASI SEBELUM PERNYATAAN PERSETUJUAN PENGAMBILAN DONOR UMBILICAL CORD (TALI PUSAT)

Berkaitan dengan penelitian yang berjudul : **Mekanisme Regenerasi Tulang Mandibula Osteoporosis Dengan Pemberian Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells**, saya sebagai calon pendonor Umbilical Cord (Tali Pusat) yang bertanda tangan di bawah ini, menyatakan telah mendapatkan penjelasan dari peneliti/petugas tentang prosedur pengambilan donor Tali Pusat sebagai berikut :

Tujuan Penelitian

Menjelaskan mekanisme regenerasi tulang mandibula osteoporosis setelah pemberian hUCMSc

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini dapat memberikan kontribusi ilmiah tentang mekanisme regenerasi tulang mandibula osteoporosis setelah pemberian hUCMScs

Cara pengambilan selaput ari-ari

1. Diberi penjelasan dan menandatangani lembar persetujuan
2. Setelah proses persalinan dengan operasi, Pada plasenta akan dilakukan pemotongan tali pusat sepanjang 5 cm, kemudian dicuci lalu dimasukkan ke dalam tabung yang berisi *buffer saline*
3. Tabung yang berisi tali pusat tersebut akan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pemrosesan .

Resiko terhadap pendonor

Tidak ada risiko medis pada tindakan yang peneliti lakukan karena hanya mengambil tali pusat yang dilakukan setelah operasi dilakukan dan bayi dilahirkan. Umbilical cord (Tali Pusat) yang secara normal dibuang/dikubur, diambil 5 cm, dan sisanya dapat diambil kembali oleh pasien

Manfaat bagi pendonor

Hasil penelitian ini dapat memberi kontribusi ilmiah tentang mekanisme regenerasi tulang mandibula osteoporosis setelah pemberian hUCMScs

Kesukarelaan ;

Keikutsertaan ibu dalam penelitian ini bersifat sukarela disertai tanggung jawab sampai selesainya penelitian ini, ibu bebas menolak ikut dalam penelitian ini tanpa menyebabkan berubahnya kualitas pelayanan dokter bila dalam keadaan sakit

Kerahasiaan data :

Selama ibu ikut dalam penelitian ini, setiap informasi dan data penelitian ini akan diperlakukan secara rahasia sehingga tidak memungkinkan untuk diketahui oleh orang lain

Penyulit dan Kompensasi :

Semua biaya pemeriksaan laboratorium yang terkait dengan penelitian ini akan ditanggung oleh peneliti

Demikian penjelasan yang diperlukan berkaitan dengan prosedur pengambilan donor tali pusat. Kesiediaan untuk mendonorkan tali pusat merupakan hak calon pendonor tanpa ada unsur pemaksaan, karena itu calon pendonor berhak menolak apabila tidak setuju mendonorkan tali pusatnya.

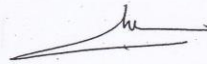
Surabaya,



tanda tangan /cap ibu jari calon pendonor

SRI KURNIATI

Nama jelas calon pendonor



tanda tangan peneliti/petugas yang menjelaskan

Nike Hendrijantini, drg.

nama jelas peneliti/petugas yang menjelaskan

Untuk komunikasi lebih lanjut mohon menghubungi Ketua Peneliti :
drg.Nike HendrijantiniSp.Prof (0811341610)

Lampiran 6

Uji Statistik Analisis Viability hUCMSCs dengan MTT-Assay

Tests of Normality							
	Dosis	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MTT	KM	.385	3	.	.750	3	.055
	Ksel	.262	3	.	.956	3	.598
	1000	.380	3	.	.763	3	.058
	500	.324	3	.	.877	3	.315
	300	.385	3	.	.750	3	.050
	100	.328	3	.	.871	3	.298
	75	.175	3	.	1.000	3	1.000
	50	.253	3	.	.964	3	.637
	10	.265	3	.	.953	3	.583
	5	.301	3	.	.912	3	.424

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives					
	Dosis		Statistic	Std. Error	
MTT	KM	Mean	.074667	.0003333	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.073232	
			Upper Bound	.076101	
		5% Trimmed Mean	.		
		Median	.075000		
		Variance	.000		
		Std. Deviation	.0005774		
		Minimum	.0740		
		Maximum	.0750		
		Range	.0010		
		Interquartile Range	.		
		Skewness	-1.732	1.225	
		Kurtosis	.	.	
Ksel	Mean		.434000	.0215484	
		Lower Bound	.341285		

	95% Confidence Interval for Mean	Upper Bound	.526715	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.425000	
	Variance		.001	
	Std. Deviation		.0373229	
	Minimum		.4020	
	Maximum		.4750	
	Range		.0730	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.022	1.225
	Kurtosis		.	.
1000	Mean		.323000	.0195021
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.239089	
		Upper Bound	.406911	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.304000	
	Variance		.001	
	Std. Deviation		.0337787	
	Minimum		.3030	
	Maximum		.3620	
	Range		.0590	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.730	1.225
	Kurtosis		.	.
500	Mean		.340333	.0175721
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.264727	
		Upper Bound	.415940	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.328000	
	Variance		.001	
	Std. Deviation		.0304357	
	Minimum		.3180	
	Maximum		.3750	
	Range		.0570	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.524	1.225
	Kurtosis		.	.
300	Mean		.327333	.0003333
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.325899	
		Upper Bound	.328768	

	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.327000	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.0005774	
	Minimum		.3270	
	Maximum		.3280	
	Range		.0010	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.732	1.225
	Kurtosis		.	.
100	Mean		.331333	.0018559
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.323348	
	Mean	Upper Bound	.339319	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.330000	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.0032146	
	Minimum		.3290	
	Maximum		.3350	
	Range		.0060	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.545	1.225
	Kurtosis		.	.
75	Mean		.339000	.0005774
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.336516	
	Mean	Upper Bound	.341484	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.339000	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.0010000	
	Minimum		.3380	
	Maximum		.3400	
	Range		.0020	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.000	1.225
	Kurtosis		.	.
50	Mean		.347333	.0008819
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.343539	
	Mean	Upper Bound	.351128	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.347000	

	Variance		.000	
	Std. Deviation		.0015275	
	Minimum		.3460	
	Maximum		.3490	
	Range		.0030	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		.935	1.225
	Kurtosis		.	.
10	Mean		.423667	.0038442
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.407126	
	Mean	Upper Bound	.440207	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.422000	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.0066583	
	Minimum		.4180	
	Maximum		.4310	
	Range		.0130	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.056	1.225
	Kurtosis		.	.
5	Mean		.450000	.0117898
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	.399272	
	Mean	Upper Bound	.500728	
	5% Trimmed Mean		.	
	Median		.443000	
	Variance		.000	
	Std. Deviation		.0204206	
	Minimum		.4340	
	Maximum		.4730	
	Range		.0390	
	Interquartile Range		.	
	Skewness		1.361	1.225
	Kurtosis		.	.

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
MTT	Based on Median	1.044	9	20	.442
	Based on Median and with adjusted df	1.044	9	6.669	.492

ANOVA

MTT					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.297	9	.033	83.764	.000
Within Groups	.008	20	.000		
Total	.305	29			

Post Hoc LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MTT

LSD

(I) Dosis	(J) Dosis	Mean Difference (I-J)			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
KM	Ksel	-.3593333*	.0161988	.000	-.393123	-.325543
	1000	-.2483333*	.0161988	.000	-.282123	-.214543
	500	-.2656667*	.0161988	.000	-.299457	-.231877
	300	-.2526667*	.0161988	.000	-.286457	-.218877
	100	-.2566667*	.0161988	.000	-.290457	-.222877
	75	-.2643333*	.0161988	.000	-.298123	-.230543
	50	-.2726667*	.0161988	.000	-.306457	-.238877
	10	-.3490000*	.0161988	.000	-.382790	-.315210
	5	-.3753333*	.0161988	.000	-.409123	-.341543
Ksel	KM	.3593333*	.0161988	.000	.325543	.393123
	1000	.1110000*	.0161988	.000	.077210	.144790
	500	.0936667*	.0161988	.000	.059877	.127457
	300	.1066667*	.0161988	.000	.072877	.140457
	100	.1026667*	.0161988	.000	.068877	.136457
	75	.0950000*	.0161988	.000	.061210	.128790
	50	.0866667*	.0161988	.000	.052877	.120457
	10	.0103333	.0161988	.531	-.023457	.044123
	5	-.0160000	.0161988	.335	-.049790	.017790
1000	KM	.2483333*	.0161988	.000	.214543	.282123

	Ksel	-.1110000*	.0161988	.000	-.144790	-.077210
	500	-.0173333	.0161988	.297	-.051123	.016457
	300	-.0043333	.0161988	.792	-.038123	.029457
	100	-.0083333	.0161988	.613	-.042123	.025457
	75	-.0160000	.0161988	.335	-.049790	.017790
	50	-.0243333	.0161988	.149	-.058123	.009457
	10	-.1006667*	.0161988	.000	-.134457	-.066877
	5	-.1270000*	.0161988	.000	-.160790	-.093210
500	KM	.2656667*	.0161988	.000	.231877	.299457
	Ksel	-.0936667*	.0161988	.000	-.127457	-.059877
	1000	.0173333	.0161988	.297	-.016457	.051123
	300	.0130000	.0161988	.432	-.020790	.046790
	100	.0090000	.0161988	.585	-.024790	.042790
	75	.0013333	.0161988	.935	-.032457	.035123
	50	-.0070000	.0161988	.670	-.040790	.026790
	10	-.0833333*	.0161988	.000	-.117123	-.049543
	5	-.1096667*	.0161988	.000	-.143457	-.075877
300	KM	.2526667*	.0161988	.000	.218877	.286457
	Ksel	-.1066667*	.0161988	.000	-.140457	-.072877
	1000	.0043333	.0161988	.792	-.029457	.038123
	500	-.0130000	.0161988	.432	-.046790	.020790
	100	-.0040000	.0161988	.807	-.037790	.029790
	75	-.0116667	.0161988	.480	-.045457	.022123
	50	-.0200000	.0161988	.231	-.053790	.013790
	10	-.0963333*	.0161988	.000	-.130123	-.062543
	5	-.1226667*	.0161988	.000	-.156457	-.088877
100	KM	.2566667*	.0161988	.000	.222877	.290457
	Ksel	-.1026667*	.0161988	.000	-.136457	-.068877
	1000	.0083333	.0161988	.613	-.025457	.042123
	500	-.0090000	.0161988	.585	-.042790	.024790
	300	.0040000	.0161988	.807	-.029790	.037790
	75	-.0076667	.0161988	.641	-.041457	.026123
	50	-.0160000	.0161988	.335	-.049790	.017790
	10	-.0923333*	.0161988	.000	-.126123	-.058543
	5	-.1186667*	.0161988	.000	-.152457	-.084877
75	KM	.2643333*	.0161988	.000	.230543	.298123
	Ksel	-.0950000*	.0161988	.000	-.128790	-.061210
	1000	.0160000	.0161988	.335	-.017790	.049790
	500	-.0013333	.0161988	.935	-.035123	.032457
	300	.0116667	.0161988	.480	-.022123	.045457
	100	.0076667	.0161988	.641	-.026123	.041457

	50	-.0083333	.0161988	.613	-.042123	.025457
	10	-.0846667*	.0161988	.000	-.118457	-.050877
	5	-.1110000*	.0161988	.000	-.144790	-.077210
50	KM	.2726667*	.0161988	.000	.238877	.306457
	Ksel	-.0866667*	.0161988	.000	-.120457	-.052877
	1000	.0243333	.0161988	.149	-.009457	.058123
	500	.0070000	.0161988	.670	-.026790	.040790
	300	.0200000	.0161988	.231	-.013790	.053790
	100	.0160000	.0161988	.335	-.017790	.049790
	75	.0083333	.0161988	.613	-.025457	.042123
	10	-.0763333*	.0161988	.000	-.110123	-.042543
	5	-.1026667*	.0161988	.000	-.136457	-.068877
	10	KM	.3490000*	.0161988	.000	.315210
Ksel		-.0103333	.0161988	.531	-.044123	.023457
1000		.1006667*	.0161988	.000	.066877	.134457
500		.0833333*	.0161988	.000	.049543	.117123
300		.0963333*	.0161988	.000	.062543	.130123
100		.0923333*	.0161988	.000	.058543	.126123
75		.0846667*	.0161988	.000	.050877	.118457
50		.0763333*	.0161988	.000	.042543	.110123
5		-.0263333	.0161988	.120	-.060123	.007457
5		KM	.3753333*	.0161988	.000	.341543
	Ksel	.0160000	.0161988	.335	-.017790	.049790
	1000	.1270000*	.0161988	.000	.093210	.160790
	500	.1096667*	.0161988	.000	.075877	.143457
	300	.1226667*	.0161988	.000	.088877	.156457
	100	.1186667*	.0161988	.000	.084877	.152457
	75	.1110000*	.0161988	.000	.077210	.144790
	50	.1026667*	.0161988	.000	.068877	.136457
	10	.0263333	.0161988	.120	-.007457	.060123

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 7**Uji Statistik Analisis Perlekatan scaffold HA-TCP Terhadap hUCMSCs Dengan Metode Confocal**

Tests of Normality			
Kelompok	Statistic	Shapiro-Wilk	
		df	Sig.
	.868	16	.025

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	40.280	3	12	.000
	Based on Median	29.255	3	12	.000
	Based on Median and with adjusted df	29.255	3	3.030	.010
	Based on trimmed mean	40.094	3	12	.000

Statistics

		K-24 BrDU - FIT C 400x	K-72 BrDU - FIT C 400x	P-24 BrDU - FIT C 400x	P-72 BrDU - FIT C 400x
N	Valid	4	4	4	4
	Missing	0	0	0	0
Mean		499.75	509.00	44675.25	5069.50
Median		489.00	509.00	44168.50	5043.50
Mode		451 ^a	405 ^a	41399 ^a	4869 ^a
Std. Deviation		51.429	120.089	3740.542	213.158
Minimum		451	405	41399	4869
Maximum		570	613	48965	5322

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Tests of Normality			
	Statistic	Shapiro-Wilk	
		df	Sig.
K-24 BrDU - FIT C 400x	.942	4	.665
K-72 BrDU - FIT C 400x	.729	4	.024
P-24 BrDU - FIT C 400x	.865	4	.279
P-72 BrDU - FIT C 400x	.913	4	.498

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Komparatif (*Kruskal-Wallis*)

		Ranks	
	Kelompok	N	Mean Rank
Hasil	K-24 BrDU - FIT C 400x	4	4.50
	K-72 BrDU - FIT C 400x	4	4.50
	P-24 BrDU - FIT C 400x	4	14.50
	P-72 BrDU - FIT C 400x	4	10.50
	Total	16	

Test Statistics^{a,b}

		Hasil
Kruskal-Wallis H		12.743
df		3
Asymp. Sig.		.005

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: 4 Kelompok

Uji Man-Whitney

		Ranks		
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	K-24	4	2.50	10.00
	P-24	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^a

		Hasil
Mann-Whitney U		.000
Wilcoxon W		10.000
Z		-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)		.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.029 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

		Ranks		
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	K-72	4	2.50	10.00
	P-72	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^a

		Hasil
Mann-Whitney U		.000
Wilcoxon W		10.000
Z		-2.337
Asymp. Sig. (2-tailed)		.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.029 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	K-24	4	4.50	18.00
	K-72	4	4.50	18.00
	Total	8		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	P-24	4	6.50	26.00
	P-72	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

Ranks			
	Kelompok	N	Mean R
Hasil	K-24	4	
	P-72	4	
	Total	8	

Test Statistics^a

Mann-Whitney U
Wilcoxon W
Z
Asymp. Sig. (2-tailed)
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]

a. Grouping Variable: Kelomp

b. Not corrected for ties.

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	K-72	4	2.50	10.00
	P-24	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.337
Asymp. Sig. (2-tailed)	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

LAMPIRAN 8**Uji Statistik Imunohistochemistry TNF- α** **1. Analisa Deskriptif**

		Statistics									
		KN 2	KN 4	KP 2	KP 4	KPA 2	KPA 4	KPU 2	KPU 4	KPAU 2	KPAU 4
		Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu
N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		2.57	3.57	6.29	9.00	7.71	5.57	6.57	4.43	4.43	3.29
Median		2.00	3.00	6.00	9.00	8.00	5.00	6.00	5.00	5.00	4.00
Mode		2	2 ^a	5	9	9	4	5 ^a	5 ^a	5 ^a	2 ^a
Std. Deviation		1.272	1.512	1.604	1.291	1.496	2.225	1.512	1.512	1.512	1.604
Minimum		1	2	5	7	5	3	5	2	2	1
Maximum		5	6	9	11	9	9	9	6	6	5

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

2. Uji Normalitas

Berdasarkan uji normalitas didapatkan distribusi data normal.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.245	7	.200*	.888	7	.263
KN 4 Minggu	.219	7	.200*	.915	7	.432
KP 2 Minggu	.285	7	.089	.813	7	.055
KP 4 Minggu	.214	7	.200*	.960	7	.819
KPA 2 Minggu	.234	7	.200*	.851	7	.126
KPA 4 Minggu	.189	7	.200*	.922	7	.482
KPU 2 Minggu	.219	7	.200*	.915	7	.432
KPU 4 Minggu	.219	7	.200*	.915	7	.432
KPAU 2 Minggu	.219	7	.200*	.915	7	.432
KPAU 4 Minggu	.243	7	.200*	.880	7	.224

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

		Statistic	Std. Error
KN 2 Minggu	Mean	2.57	.481
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.39
		Upper Bound	3.75
	5% Trimmed Mean	2.52	

	Median		2.00	
	Variance		1.619	
	Std. Deviation		1.272	
	Minimum		1	
	Maximum		5	
	Range		4	
	Interquartile Range		1	
	Skewness		1.137	.794
	Kurtosis		1.947	1.587
KN 4 Minggu	Mean		3.57	.571
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	2.17	
	Mean	Upper Bound	4.97	
	5% Trimmed Mean		3.52	
	Median		3.00	
	Variance		2.286	
	Std. Deviation		1.512	
	Minimum		2	
	Maximum		6	
	Range		4	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		.620	.794
	Kurtosis		-.809	1.587
KP 2 Minggu	Mean		6.29	.606
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	4.80	
	Mean	Upper Bound	7.77	
	5% Trimmed Mean		6.21	
	Median		6.00	
	Variance		2.571	
	Std. Deviation		1.604	
	Minimum		5	
	Maximum		9	
	Range		4	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		1.053	.794
	Kurtosis		-.380	1.587
KP 4 Minggu	Mean		9.00	.488
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	7.81	
	Mean	Upper Bound	10.19	
	5% Trimmed Mean		9.00	
	Median		9.00	
	Variance		1.667	

	Std. Deviation		1.291	
	Minimum		7	
	Maximum		11	
	Range		4	
	Interquartile Range		2	
	Skewness		.000	.794
	Kurtosis		.312	1.587
KPA 2 Minggu	Mean		7.71	.565
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	6.33	
	Mean	Upper Bound	9.10	
	5% Trimmed Mean		7.79	
	Median		8.00	
	Variance		2.238	
	Std. Deviation		1.496	
	Minimum		5	
	Maximum		9	
	Range		4	
	Interquartile Range		2	
	Skewness		-.998	.794
	Kurtosis		.470	1.587
	KPA 4 Minggu	Mean		5.57
95% Confidence Interval for		Lower Bound	3.51	
Mean		Upper Bound	7.63	
5% Trimmed Mean			5.52	
Median			5.00	
Variance			4.952	
Std. Deviation			2.225	
Minimum			3	
Maximum			9	
Range			6	
Interquartile Range			4	
Skewness			.630	.794
Kurtosis			-1.042	1.587
KPU 2 Minggu		Mean		6.57
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	5.17	
	Mean	Upper Bound	7.97	
	5% Trimmed Mean		6.52	
	Median		6.00	
	Variance		2.286	
	Std. Deviation		1.512	
	Minimum		5	

	Maximum		9		
	Range		4		
	Interquartile Range		3		
	Skewness		.620	.794	
	Kurtosis		-.809	1.587	
KPU 4 Minggu	Mean		4.43	.571	
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	3.03		
	Mean	Upper Bound	5.83		
	5% Trimmed Mean		4.48		
	Median		5.00		
	Variance		2.286		
	Std. Deviation		1.512		
	Minimum		2		
	Maximum		6		
	Range		4		
	Interquartile Range		3		
	Skewness		-.620	.794	
	Kurtosis		-.809	1.587	
	KPAU 2 Minggu	Mean		4.43	.571
		95% Confidence Interval for	Lower Bound	3.03	
Mean		Upper Bound	5.83		
5% Trimmed Mean			4.48		
Median			5.00		
Variance			2.286		
Std. Deviation			1.512		
Minimum			2		
Maximum			6		
Range			4		
Interquartile Range			3		
Skewness			-.620	.794	
Kurtosis			-.809	1.587	
KPAU 4 Minggu		Mean		3.29	.606
		95% Confidence Interval for	Lower Bound	1.80	
	Mean	Upper Bound	4.77		
	5% Trimmed Mean		3.32		
	Median		4.00		
	Variance		2.571		
	Std. Deviation		1.604		
	Minimum		1		
	Maximum		5		
	Range		4		

Interquartile Range	3	
Skewness	-.305	.794
Kurtosis	-1.832	1.587

3. Uji Homogenitas

Berdasarkan uji homogenitas didapatkan distribusi data homogen.

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	.699	9	60	.707
	Based on Median	.340	9	60	.958
	Based on Median and with adjusted df	.340	9	56.611	.958
	Based on trimmed mean	.662	9	60	.739

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	267.200	9	29.689	11.990	.000
Within Groups	148.571	60	2.476		
Total	415.771	69			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
KN2	KN4	-1.000	.841	.239	-2.68	.68
	KP2	-3.714*	.841	.000	-5.40	-2.03
	KP4	-6.429*	.841	.000	-8.11	-4.75
	KPA2	-5.143*	.841	.000	-6.83	-3.46
	KPA4	-3.000*	.841	.001	-4.68	-1.32
	KPU2	-4.000*	.841	.000	-5.68	-2.32
	KPU4	-1.857*	.841	.031	-3.54	-.17
	KPAU2	-1.857*	.841	.031	-3.54	-.17
	KPAU4	-.714	.841	.399	-2.40	.97
KN4	KN2	1.000	.841	.239	-.68	2.68
	KP2	-2.714*	.841	.002	-4.40	-1.03
	KP4	-5.429*	.841	.000	-7.11	-3.75
	KPA2	-4.143*	.841	.000	-5.83	-2.46
	KPA4	-2.000*	.841	.021	-3.68	-.32
	KPU2	-3.000*	.841	.001	-4.68	-1.32

	KPU4	-.857	.841	.312	-2.54	.83
	KPAU2	-.857	.841	.312	-2.54	.83
	KPAU4	.286	.841	.735	-1.40	1.97
KP2	KN2	3.714*	.841	.000	2.03	5.40
	KN4	2.714*	.841	.002	1.03	4.40
	KP4	-2.714*	.841	.002	-4.40	-1.03
	KPA2	-1.429	.841	.095	-3.11	.25
	KPA4	.714	.841	.399	-.97	2.40
	KPU2	-.286	.841	.735	-1.97	1.40
	KPU4	1.857*	.841	.031	.17	3.54
	KPAU2	1.857*	.841	.031	.17	3.54
	KPAU4	3.000*	.841	.001	1.32	4.68
	KP4	KN2	6.429*	.841	.000	4.75
KN4		5.429*	.841	.000	3.75	7.11
KP2		2.714*	.841	.002	1.03	4.40
KPA2		1.286	.841	.132	-.40	2.97
KPA4		3.429*	.841	.000	1.75	5.11
KPU2		2.429*	.841	.005	.75	4.11
KPU4		4.571*	.841	.000	2.89	6.25
KPAU2		4.571*	.841	.000	2.89	6.25
KPAU4		5.714*	.841	.000	4.03	7.40
KPA2		KN2	5.143*	.841	.000	3.46
	KN4	4.143*	.841	.000	2.46	5.83
	KP2	1.429	.841	.095	-.25	3.11
	KP4	-1.286	.841	.132	-2.97	.40
	KPA4	2.143*	.841	.013	.46	3.83
	KPU2	1.143	.841	.179	-.54	2.83
	KPU4	3.286*	.841	.000	1.60	4.97
	KPAU2	3.286*	.841	.000	1.60	4.97
	KPAU4	4.429*	.841	.000	2.75	6.11
	KPA4	KN2	3.000*	.841	.001	1.32
KN4		2.000*	.841	.021	.32	3.68
KP2		-.714	.841	.399	-2.40	.97
KP4		-3.429*	.841	.000	-5.11	-1.75
KPA2		-2.143*	.841	.013	-3.83	-.46
KPU2		-1.000	.841	.239	-2.68	.68
KPU4		1.143	.841	.179	-.54	2.83
KPAU2		1.143	.841	.179	-.54	2.83
KPAU4		2.286*	.841	.009	.60	3.97
KPU2		KN2	4.000*	.841	.000	2.32
	KN4	3.000*	.841	.001	1.32	4.68

	KP2	.286	.841	.735	-1.40	1.97
	KP4	-2.429*	.841	.005	-4.11	-.75
	KPA2	-1.143	.841	.179	-2.83	.54
	KPA4	1.000	.841	.239	-.68	2.68
	KPU4	2.143*	.841	.013	.46	3.83
	KPAU2	2.143*	.841	.013	.46	3.83
	KPAU4	3.286*	.841	.000	1.60	4.97
KPU4	KN2	1.857*	.841	.031	.17	3.54
	KN4	.857	.841	.312	-.83	2.54
	KP2	-1.857*	.841	.031	-3.54	-.17
	KP4	-4.571*	.841	.000	-6.25	-2.89
	KPA2	-3.286*	.841	.000	-4.97	-1.60
	KPA4	-1.143	.841	.179	-2.83	.54
	KPU2	-2.143*	.841	.013	-3.83	-.46
	KPAU2	.000	.841	1.000	-1.68	1.68
	KPAU4	1.143	.841	.179	-.54	2.83
KPAU2	KN2	1.857*	.841	.031	.17	3.54
	KN4	.857	.841	.312	-.83	2.54
	KP2	-1.857*	.841	.031	-3.54	-.17
	KP4	-4.571*	.841	.000	-6.25	-2.89
	KPA2	-3.286*	.841	.000	-4.97	-1.60
	KPA4	-1.143	.841	.179	-2.83	.54
	KPU2	-2.143*	.841	.013	-3.83	-.46
	KPU4	.000	.841	1.000	-1.68	1.68
	KPAU4	1.143	.841	.179	-.54	2.83
KPAU4	KN2	.714	.841	.399	-.97	2.40
	KN4	-.286	.841	.735	-1.97	1.40
	KP2	-3.000*	.841	.001	-4.68	-1.32
	KP4	-5.714*	.841	.000	-7.40	-4.03
	KPA2	-4.429*	.841	.000	-6.11	-2.75
	KPA4	-2.286*	.841	.009	-3.97	-.60
	KPU2	-3.286*	.841	.000	-4.97	-1.60
	KPU4	-1.143	.841	.179	-2.83	.54
	KPAU2	-1.143	.841	.179	-2.83	.54

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 9

Uji Statistik Imunohistochemistry IL-1 β

1. Analisa Deskriptif

		Statistics									
		KN 2	KN 4	KP 2	KP 4	KPA 2	KPA 4	KPU 2	KPU 4	KPAU 2	KPAU 4
		Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu
N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		4.71	3.57	11.43	8.14	7.00	4.71	6.43	4.71	3.86	3.57
Median		5.00	4.00	11.00	8.00	7.00	5.00	7.00	5.00	4.00	4.00
Mode		5	2 ^a	11	7 ^a	7 ^a	4 ^a	5 ^a	5	2 ^a	4
Std. Deviation		1.380	1.272	1.512	1.676	1.915	1.113	1.813	1.976	1.574	1.718
Minimum		2	2	10	6	4	3	4	2	2	1
Maximum		6	5	14	11	9	6	9	8	6	6

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
KN 2 Minggu	Mean	4.71	.522	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.44	
		Upper Bound	5.99	
	5% Trimmed Mean	4.79		
	Median	5.00		
	Variance	1.905		
	Std. Deviation	1.380		
	Minimum	2		
	Maximum	6		
	Range	4		
	Interquartile Range	2		
	Skewness	-1.424	.794	
	Kurtosis	2.320	1.587	
	KN 4 Minggu	Mean	3.57	.481
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	2.39	
		Upper Bound	4.75	
5% Trimmed Mean		3.58		
Median		4.00		
Variance		1.619		
Std. Deviation		1.272		

	Minimum		2	
	Maximum		5	
	Range		3	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		-.222	.794
	Kurtosis		-1.715	1.587
KP 2 Minggu	Mean		11.43	.571
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	10.03	
	Mean	Upper Bound	12.83	
	5% Trimmed Mean		11.37	
	Median		11.00	
	Variance		2.286	
	Std. Deviation		1.512	
	Minimum		10	
	Maximum		14	
	Range		4	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		1.000	.794
	Kurtosis		-.197	1.587
	KP 4 Minggu	Mean		8.14
95% Confidence Interval for		Lower Bound	6.59	
Mean		Upper Bound	9.69	
5% Trimmed Mean			8.10	
Median			8.00	
Variance			2.810	
Std. Deviation			1.676	
Minimum			6	
Maximum			11	
Range			5	
Interquartile Range			2	
Skewness			.582	.794
Kurtosis			.052	1.587
KPA 2 Minggu		Mean		7.00
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	5.23	
	Mean	Upper Bound	8.77	
	5% Trimmed Mean		7.06	
	Median		7.00	
	Variance		3.667	
	Std. Deviation		1.915	
	Minimum		4	
	Maximum		9	

	Range		5	
	Interquartile Range		4	
	Skewness		-.598	.794
	Kurtosis		-.888	1.587
KPA 4 Minggu	Mean		4.71	.421
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.69	
		Upper Bound	5.74	
	5% Trimmed Mean		4.74	
	Median		5.00	
	Variance		1.238	
	Std. Deviation		1.113	
	Minimum		3	
	Maximum		6	
	Range		3	
	Interquartile Range		2	
	Skewness		-.249	.794
	Kurtosis		-.944	1.587
	KPU 2 Minggu	Mean		6.43
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	4.75	
		Upper Bound	8.10	
5% Trimmed Mean			6.42	
Median			7.00	
Variance			3.286	
Std. Deviation			1.813	
Minimum			4	
Maximum			9	
Range			5	
Interquartile Range			3	
Skewness			.043	.794
Kurtosis			-1.374	1.587
KPU 4 Minggu		Mean		4.71
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.89	
		Upper Bound	6.54	
	5% Trimmed Mean		4.68	
	Median		5.00	
	Variance		3.905	
	Std. Deviation		1.976	
	Minimum		2	
	Maximum		8	
	Range		6	
	Interquartile Range		3	

	Skewness		.370	.794
	Kurtosis		.185	1.587
KPAU 2 Minggu	Mean		3.86	.595
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	2.40	
	Mean	Upper Bound	5.31	
	5% Trimmed Mean		3.84	
	Median		4.00	
	Variance		2.476	
	Std. Deviation		1.574	
	Minimum		2	
	Maximum		6	
	Range		4	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		-.037	.794
	Kurtosis		-1.684	1.587
	KPAU 4 Minggu	Mean		3.57
95% Confidence Interval for		Lower Bound	1.98	
Mean		Upper Bound	5.16	
5% Trimmed Mean			3.58	
Median			4.00	
Variance			2.952	
Std. Deviation			1.718	
Minimum			1	
Maximum			6	
Range			5	
Interquartile Range			3	
Skewness			-.169	.794
Kurtosis			-.638	1.587

Descriptives

KN 2 Minggu	Mean	
	95% Confidence Interval for	Lower Bound
	Mean	Upper Bound
	5% Trimmed Mean	
	Median	
	Variance	
	Std. Deviation	
	Minimum	
	Maximum	

	Range	
	Interquartile Range	
	Skewness	
	Kurtosis	
KN 4 Minggu	Mean	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound
		Upper Bound
	5% Trimmed Mean	
	Median	
	Variance	
	Std. Deviation	
	Minimum	
	Maximum	
	Range	
	Interquartile Range	
	Skewness	
	Kurtosis	
	KP 2 Minggu	Mean
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound
		Upper Bound
5% Trimmed Mean		
Median		
Variance		
Std. Deviation		
Minimum		
Maximum		
Range		
Interquartile Range		
Skewness		
Kurtosis		
KP 4 Minggu		Mean
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound
		Upper Bound
	5% Trimmed Mean	
	Median	
	Variance	
	Std. Deviation	
	Minimum	
	Maximum	
	Range	
	Interquartile Range	

	Skewness
	Kurtosis
KPA 2 Minggu	Mean
	95% Confidence Interval for Mean
	Lower Bound
	Upper Bound
	5% Trimmed Mean
	Median
	Variance
	Std. Deviation
	Minimum
	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis
KPA 4 Minggu	Mean
	95% Confidence Interval for Mean
	Lower Bound
	Upper Bound
	5% Trimmed Mean
	Median
	Variance
	Std. Deviation
	Minimum
	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis
KPU 2 Minggu	Mean
	95% Confidence Interval for Mean
	Lower Bound
	Upper Bound
	5% Trimmed Mean
	Median
	Variance
	Std. Deviation
	Minimum
	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis

KPU 4 Minggu	Mean		
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	Upper Bound
	5% Trimmed Mean		
	Median		
	Variance		
	Std. Deviation		
	Minimum		
	Maximum		
	Range		
	Interquartile Range		
	Skewness		
	Kurtosis		
	KPAU 2 Minggu	Mean	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound
5% Trimmed Mean			
Median			
Variance			
Std. Deviation			
Minimum			
Maximum			
Range			
Interquartile Range			
Skewness			
Kurtosis			
KPAU 4 Minggu		Mean	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound
	5% Trimmed Mean		
	Median		
	Variance		
	Std. Deviation		
	Minimum		
	Maximum		
	Range		
	Interquartile Range		
	Skewness		
	Kurtosis		

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.296	7	.063
KN 4 Minggu	.203	7	.200 [*]
KP 2 Minggu	.326	7	.024
KP 4 Minggu	.181	7	.200 [*]
KPA 2 Minggu	.214	7	.200 [*]
KPA 4 Minggu	.173	7	.200 [*]
KPU 2 Minggu	.213	7	.200 [*]
KPU 4 Minggu	.157	7	.200 [*]
KPAU 2 Minggu	.195	7	.200 [*]
KPAU 4 Minggu	.170	7	.200 [*]

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Berdasarkan uji homogenitas didapatkan distribusi data homogen.

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	.417	9	60	.921
	Based on Median	.363	9	60	.948
	Based on Median and with adjusted df	.363	9	53.760	.947
	Based on trimmed mean	.440	9	60	.908

Uji Komparatif

Uji komparatif yang digunakan adalah Oneway Anova karena didapatkan distribusi data normal dan homogen. Hasil uji komparatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada kelompok variable secara signifikan.

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	393.729	9	43.748	16.734	.000
Within Groups	156.857	60	2.614		
Total	550.586	69			

Post Hoc LSD

Berikut tabel multiple komparatif antar kelompok variable:

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		(I-J)			Lower Bound	Upper Bound
KN2	KN4	1.143	.864	.191	-.59	2.87
	KP2	-6.714*	.864	.000	-8.44	-4.99
	KP4	-3.429*	.864	.000	-5.16	-1.70
	KPA2	-2.286*	.864	.010	-4.01	-.56
	KPA4	.000	.864	1.000	-1.73	1.73
	KPU2	-1.714	.864	.052	-3.44	.01
	KPU4	.000	.864	1.000	-1.73	1.73
	KPAU2	.857	.864	.325	-.87	2.59
	KPAU4	1.143	.864	.191	-.59	2.87
	KN4	KN2	-1.143	.864	.191	-2.87
KP2		-7.857*	.864	.000	-9.59	-6.13
KP4		-4.571*	.864	.000	-6.30	-2.84
KPA2		-3.429*	.864	.000	-5.16	-1.70
KPA4		-1.143	.864	.191	-2.87	.59
KPU2		-2.857*	.864	.002	-4.59	-1.13
KPU4		-1.143	.864	.191	-2.87	.59
KPAU2		-.286	.864	.742	-2.01	1.44
KPAU4		.000	.864	1.000	-1.73	1.73
KP2		KN2	6.714*	.864	.000	4.99
	KN4	7.857*	.864	.000	6.13	9.59
	KP4	3.286*	.864	.000	1.56	5.01
	KPA2	4.429*	.864	.000	2.70	6.16
	KPA4	6.714*	.864	.000	4.99	8.44
	KPU2	5.000*	.864	.000	3.27	6.73
	KPU4	6.714*	.864	.000	4.99	8.44
	KPAU2	7.571*	.864	.000	5.84	9.30
	KPAU4	7.857*	.864	.000	6.13	9.59
	KP4	KN2	3.429*	.864	.000	1.70
KN4		4.571*	.864	.000	2.84	6.30
KP2		-3.286*	.864	.000	-5.01	-1.56
KPA2		1.143	.864	.191	-.59	2.87
KPA4		3.429*	.864	.000	1.70	5.16
KPU2		1.714	.864	.052	-.01	3.44
KPU4		3.429*	.864	.000	1.70	5.16

	KPAU2	4.286*	.864	.000	2.56	6.01
	KPAU4	4.571*	.864	.000	2.84	6.30
KPA2	KN2	2.286*	.864	.010	.56	4.01
	KN4	3.429*	.864	.000	1.70	5.16
	KP2	-4.429*	.864	.000	-6.16	-2.70
	KP4	-1.143	.864	.191	-2.87	.59
	KPA4	2.286*	.864	.010	.56	4.01
	KPU2	.571	.864	.511	-1.16	2.30
	KPU4	2.286*	.864	.010	.56	4.01
	KPAU2	3.143*	.864	.001	1.41	4.87
	KPAU4	3.429*	.864	.000	1.70	5.16
	KPA4	KN2	.000	.864	1.000	-1.73
KN4		1.143	.864	.191	-.59	2.87
KP2		-6.714*	.864	.000	-8.44	-4.99
KP4		-3.429*	.864	.000	-5.16	-1.70
KPA2		-2.286*	.864	.010	-4.01	-.56
KPU2		-1.714	.864	.052	-3.44	.01
KPU4		.000	.864	1.000	-1.73	1.73
KPAU2		.857	.864	.325	-.87	2.59
KPAU4		1.143	.864	.191	-.59	2.87
KPU2		KN2	1.714	.864	.052	-.01
	KN4	2.857*	.864	.002	1.13	4.59
	KP2	-5.000*	.864	.000	-6.73	-3.27
	KP4	-1.714	.864	.052	-3.44	.01
	KPA2	-.571	.864	.511	-2.30	1.16
	KPA4	1.714	.864	.052	-.01	3.44
	KPU4	1.714	.864	.052	-.01	3.44
	KPAU2	2.571*	.864	.004	.84	4.30
	KPAU4	2.857*	.864	.002	1.13	4.59
	KPU4	KN2	.000	.864	1.000	-1.73
KN4		1.143	.864	.191	-.59	2.87
KP2		-6.714*	.864	.000	-8.44	-4.99
KP4		-3.429*	.864	.000	-5.16	-1.70
KPA2		-2.286*	.864	.010	-4.01	-.56
KPA4		.000	.864	1.000	-1.73	1.73
KPU2		-1.714	.864	.052	-3.44	.01
KPAU2		.857	.864	.325	-.87	2.59
KPAU4		1.143	.864	.191	-.59	2.87
KPAU2		KN2	-.857	.864	.325	-2.59
	KN4	.286	.864	.742	-1.44	2.01
	KP2	-7.571*	.864	.000	-9.30	-5.84

	KP4	-4.286*	.864	.000	-6.01	-2.56
	KPA2	-3.143*	.864	.001	-4.87	-1.41
	KPA4	-.857	.864	.325	-2.59	.87
	KPU2	-2.571*	.864	.004	-4.30	-.84
	KPU4	-.857	.864	.325	-2.59	.87
	KPAU4	.286	.864	.742	-1.44	2.01
KPAU4	KN2	-1.143	.864	.191	-2.87	.59
	KN4	.000	.864	1.000	-1.73	1.73
	KP2	-7.857*	.864	.000	-9.59	-6.13
	KP4	-4.571*	.864	.000	-6.30	-2.84
	KPA2	-3.429*	.864	.000	-5.16	-1.70
	KPA4	-1.143	.864	.191	-2.87	.59
	KPU2	-2.857*	.864	.002	-4.59	-1.13
	KPU4	-1.143	.864	.191	-2.87	.59
	KPAU2	-.286	.864	.742	-2.01	1.44

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 10**Uji Statistik Imunohistochemistry Runx2****Analisa Deskriptif****Statistics**

		KN 2	KN 4	KP 2	KP 4	KPA 2	KPA 4	KPU 2	KPU 4	KPAU 2	KPAU 4
		Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu
N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		6.43	8.29	3.43	5.29	6.43	8.71	8.43	9.86	13.86	14.29
Median		6.00	8.00	3.00	5.00	6.00	9.00	9.00	10.00	14.00	14.00
Mode		6	8	2	5	6	10	9	10	10 ^a	13
Std. Deviation		1.718	2.498	1.618	1.704	1.718	1.799	1.988	2.911	2.410	1.496
Minimum		4	4	2	3	4	6	5	6	10	13
Maximum		9	12	6	8	9	11	11	14	17	17

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
KN 2 Minggu	Mean	6.43	.649	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.84	
		Upper Bound	8.02	
	5% Trimmed Mean	6.42		
	Median	6.00		
	Variance	2.952		
	Std. Deviation	1.718		
	Minimum	4		
	Maximum	9		
	Range	5		
	Interquartile Range	3		
	Skewness	.169	.794	
	Kurtosis	-.638	1.587	
	KN 4 Minggu	Mean	8.29	.944
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	5.98	
		Upper Bound	10.60	
5% Trimmed Mean		8.32		
Median		8.00		
Variance		6.238		
Std. Deviation		2.498		

	Minimum	4	
	Maximum	12	
	Range	8	
	Interquartile Range	3	
	Skewness	-.363	.794
	Kurtosis	1.068	1.587
KP 2 Minggu	Mean	3.43	.612
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	1.93
	Mean	Upper Bound	4.93
	5% Trimmed Mean	3.37	
	Median	3.00	
	Variance	2.619	
	Std. Deviation	1.618	
	Minimum	2	
	Maximum	6	
	Range	4	
	Interquartile Range	3	
	Skewness	.674	.794
	Kurtosis	-1.151	1.587
	KP 4 Minggu	Mean	5.29
95% Confidence Interval for		Lower Bound	3.71
Mean		Upper Bound	6.86
5% Trimmed Mean		5.26	
Median		5.00	
Variance		2.905	
Std. Deviation		1.704	
Minimum		3	
Maximum		8	
Range		5	
Interquartile Range		3	
Skewness		.514	.794
Kurtosis		-.258	1.587
KPA 2 Minggu		Mean	6.43
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	4.84
	Mean	Upper Bound	8.02
	5% Trimmed Mean	6.42	
	Median	6.00	
	Variance	2.952	
	Std. Deviation	1.718	
	Minimum	4	
	Maximum	9	

	Range		5	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		.169	.794
	Kurtosis		-.638	1.587
KPA 4 Minggu	Mean		8.71	.680
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	7.05	
		Upper Bound	10.38	
	5% Trimmed Mean		8.74	
	Median		9.00	
	Variance		3.238	
	Std. Deviation		1.799	
	Minimum		6	
	Maximum		11	
	Range		5	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		-.368	.794
	Kurtosis		-1.130	1.587
	KPU 2 Minggu	Mean		8.43
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	6.59	
		Upper Bound	10.27	
5% Trimmed Mean			8.48	
Median			9.00	
Variance			3.952	
Std. Deviation			1.988	
Minimum			5	
Maximum			11	
Range			6	
Interquartile Range			3	
Skewness			-.655	.794
Kurtosis			.348	1.587
KPU 4 Minggu		Mean		9.86
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	7.16	
		Upper Bound	12.55	
	5% Trimmed Mean		9.84	
	Median		10.00	
	Variance		8.476	
	Std. Deviation		2.911	
	Minimum		6	
	Maximum		14	
	Range		8	
	Interquartile Range		6	

	Skewness		.197	.794
	Kurtosis		-.979	1.587
KPAU 2 Minggu	Mean		13.86	.911
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	11.63	
		Upper Bound	16.09	
	5% Trimmed Mean		13.90	
	Median		14.00	
	Variance		5.810	
	Std. Deviation		2.410	
	Minimum		10	
	Maximum		17	
	Range		7	
	Interquartile Range		4	
	Skewness		-.367	.794
	Kurtosis		-.503	1.587
	KPAU 4 Minggu	Mean		14.29
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	12.90	
		Upper Bound	15.67	
5% Trimmed Mean			14.21	
Median			14.00	
Variance			2.238	
Std. Deviation			1.496	
Minimum			13	
Maximum			17	
Range			4	
Interquartile Range			2	
Skewness			.998	.794
Kurtosis			.470	1.587

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.170	7	.200 [*]
KN 4 Minggu	.169	7	.200 [*]
KP 2 Minggu	.240	7	.200 [*]
KP 4 Minggu	.281	7	.101
KPA 2 Minggu	.170	7	.200 [*]
KPA 4 Minggu	.191	7	.200 [*]
KPU 2 Minggu	.185	7	.200 [*]
KPU 4 Minggu	.195	7	.200 [*]

KPAU 2 Minggu	.111	7	.200*
KPAU 4 Minggu	.234	7	.200*

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Berdasarkan uji homogenitas didapatkan distribusi data homogen.

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	.512	9	60	.861
	Based on Median	.465	9	60	.892
	Based on Median and with adjusted df	.465	9	49.032	.891
	Based on trimmed mean	.517	9	60	.857

Uji Komparatif

Uji komparatif yang digunakan adalah Oneway Anova karena didapatkan distribusi data normal dan homogen. Hasil uji komparatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada kelompok variable secara signifikan.

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	761.214	9	84.579	20.439	.000
Within Groups	248.286	60	4.138		
Total	1009.500	69			

Post Hoc LSD

Berikut tabel multiple komparatif antar kelompok variable:

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference		Sig.	95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
KN2	KN4	-1.857	1.087	.093	-4.03	.32
	KP2	3.000*	1.087	.008	.82	5.18
	KP4	1.143	1.087	.297	-1.03	3.32
	KPA2	.000	1.087	1.000	-2.18	2.18
	KPA4	-2.286*	1.087	.040	-4.46	-.11
	KPU2	-2.000	1.087	.071	-4.18	.18
	KPU4	-3.429*	1.087	.003	-5.60	-1.25
	KPAU2	-7.429*	1.087	.000	-9.60	-5.25
	KPAU4	-7.857*	1.087	.000	-10.03	-5.68

KN4	KN2	1.857	1.087	.093	-.32	4.03
	KP2	4.857*	1.087	.000	2.68	7.03
	KP4	3.000*	1.087	.008	.82	5.18
	KPA2	1.857	1.087	.093	-.32	4.03
	KPA4	-.429	1.087	.695	-2.60	1.75
	KPU2	-.143	1.087	.896	-2.32	2.03
	KPU4	-1.571	1.087	.154	-3.75	.60
	KPAU2	-5.571*	1.087	.000	-7.75	-3.40
	KPAU4	-6.000*	1.087	.000	-8.18	-3.82
KP2	KN2	-3.000*	1.087	.008	-5.18	-.82
	KN4	-4.857*	1.087	.000	-7.03	-2.68
	KP4	-1.857	1.087	.093	-4.03	.32
	KPA2	-3.000*	1.087	.008	-5.18	-.82
	KPA4	-5.286*	1.087	.000	-7.46	-3.11
	KPU2	-5.000*	1.087	.000	-7.18	-2.82
	KPU4	-6.429*	1.087	.000	-8.60	-4.25
	KPAU2	-10.429*	1.087	.000	-12.60	-8.25
	KPAU4	-10.857*	1.087	.000	-13.03	-8.68
KP4	KN2	-1.143	1.087	.297	-3.32	1.03
	KN4	-3.000*	1.087	.008	-5.18	-.82
	KP2	1.857	1.087	.093	-.32	4.03
	KPA2	-1.143	1.087	.297	-3.32	1.03
	KPA4	-3.429*	1.087	.003	-5.60	-1.25
	KPU2	-3.143*	1.087	.005	-5.32	-.97
	KPU4	-4.571*	1.087	.000	-6.75	-2.40
	KPAU2	-8.571*	1.087	.000	-10.75	-6.40
	KPAU4	-9.000*	1.087	.000	-11.18	-6.82
KPA2	KN2	.000	1.087	1.000	-2.18	2.18
	KN4	-1.857	1.087	.093	-4.03	.32
	KP2	3.000*	1.087	.008	.82	5.18
	KP4	1.143	1.087	.297	-1.03	3.32
	KPA4	-2.286*	1.087	.040	-4.46	-.11
	KPU2	-2.000	1.087	.071	-4.18	.18
	KPU4	-3.429*	1.087	.003	-5.60	-1.25
	KPAU2	-7.429*	1.087	.000	-9.60	-5.25
	KPAU4	-7.857*	1.087	.000	-10.03	-5.68
KPA4	KN2	2.286*	1.087	.040	.11	4.46
	KN4	.429	1.087	.695	-1.75	2.60
	KP2	5.286*	1.087	.000	3.11	7.46
	KP4	3.429*	1.087	.003	1.25	5.60
	KPA2	2.286*	1.087	.040	.11	4.46

	KPU2	.286	1.087	.794	-1.89	2.46
	KPU4	-1.143	1.087	.297	-3.32	1.03
	KPAU2	-5.143*	1.087	.000	-7.32	-2.97
	KPAU4	-5.571*	1.087	.000	-7.75	-3.40
KPU2	KN2	2.000	1.087	.071	-.18	4.18
	KN4	.143	1.087	.896	-2.03	2.32
	KP2	5.000*	1.087	.000	2.82	7.18
	KP4	3.143*	1.087	.005	.97	5.32
	KPA2	2.000	1.087	.071	-.18	4.18
	KPA4	-.286	1.087	.794	-2.46	1.89
	KPU4	-1.429	1.087	.194	-3.60	.75
	KPAU2	-5.429*	1.087	.000	-7.60	-3.25
	KPAU4	-5.857*	1.087	.000	-8.03	-3.68
	KPU4	KN2	3.429*	1.087	.003	1.25
KN4		1.571	1.087	.154	-.60	3.75
KP2		6.429*	1.087	.000	4.25	8.60
KP4		4.571*	1.087	.000	2.40	6.75
KPA2		3.429*	1.087	.003	1.25	5.60
KPA4		1.143	1.087	.297	-1.03	3.32
KPU2		1.429	1.087	.194	-.75	3.60
KPAU2		-4.000*	1.087	.001	-6.18	-1.82
KPAU4		-4.429*	1.087	.000	-6.60	-2.25
KPAU2		KN2	7.429*	1.087	.000	5.25
	KN4	5.571*	1.087	.000	3.40	7.75
	KP2	10.429*	1.087	.000	8.25	12.60
	KP4	8.571*	1.087	.000	6.40	10.75
	KPA2	7.429*	1.087	.000	5.25	9.60
	KPA4	5.143*	1.087	.000	2.97	7.32
	KPU2	5.429*	1.087	.000	3.25	7.60
	KPU4	4.000*	1.087	.001	1.82	6.18
	KPAU4	-.429	1.087	.695	-2.60	1.75
	KPAU4	KN2	7.857*	1.087	.000	5.68
KN4		6.000*	1.087	.000	3.82	8.18
KP2		10.857*	1.087	.000	8.68	13.03
KP4		9.000*	1.087	.000	6.82	11.18
KPA2		7.857*	1.087	.000	5.68	10.03
KPA4		5.571*	1.087	.000	3.40	7.75
KPU2		5.857*	1.087	.000	3.68	8.03
KPU4		4.429*	1.087	.000	2.25	6.60
KPAU2		.429	1.087	.695	-1.75	2.60

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 11

Uji Statistik Imunohistochemistry COL-1

1. Analisa Deskriptif

		Statistics									
		KN 2	KN 4	KP 2	KP 4	KPA 2	KPA 4	KPU 2	KPU 4	KPAU 2	KPAU 4
		Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu
N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		6.14	6.57	3.00	3.86	7.29	8.29	7.57	8.71	8.57	11.00
Median		6.00	6.00	3.00	4.00	7.00	8.00	8.00	9.00	9.00	10.00
Mode		6 ^a	5 ^a	2 ^a	4	7 ^a	7 ^a	8	7 ^a	10	10
Std. Deviation		1.345	2.070	1.414	1.464	1.496	1.113	2.225	1.496	2.760	1.826
Minimum		4	4	1	2	5	7	4	7	5	9
Maximum		8	9	5	6	9	10	11	11	13	14

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
KN 2 Minggu	Mean	6.14	.508	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.90	
		Upper Bound	7.39	
	5% Trimmed Mean	6.16		
	Median	6.00		
	Variance	1.810		
	Std. Deviation	1.345		
	Minimum	4		
	Maximum	8		
	Range	4		
	Interquartile Range	2		
	Skewness	-.352	.794	
	Kurtosis	-.302	1.587	
	KN 4 Minggu	Mean	6.57	.782
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	4.66	
		Upper Bound	8.49	
5% Trimmed Mean		6.58		
Median		6.00		
Variance		4.286		
Std. Deviation		2.070		

	Minimum	4	
	Maximum	9	
	Range	5	
	Interquartile Range	4	
	Skewness	.174	.794
	Kurtosis	-2.103	1.587
KP 2 Minggu	Mean	3.00	.535
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	1.69
	Mean	Upper Bound	4.31
	5% Trimmed Mean	3.00	
	Median	3.00	
	Variance	2.000	
	Std. Deviation	1.414	
	Minimum	1	
	Maximum	5	
	Range	4	
	Interquartile Range	2	
	Skewness	.000	.794
	Kurtosis	-1.200	1.587
	KP 4 Minggu	Mean	3.86
95% Confidence Interval for		Lower Bound	2.50
Mean		Upper Bound	5.21
5% Trimmed Mean		3.84	
Median		4.00	
Variance		2.143	
Std. Deviation		1.464	
Minimum		2	
Maximum		6	
Range		4	
Interquartile Range		3	
Skewness		-.109	.794
Kurtosis		-.666	1.587
KPA 2 Minggu		Mean	7.29
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	5.90
	Mean	Upper Bound	8.67
	5% Trimmed Mean	7.32	
	Median	7.00	
	Variance	2.238	
	Std. Deviation	1.496	
	Minimum	5	
	Maximum	9	

	Range		4	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		-.256	.794
	Kurtosis		-.968	1.587
KPA 4 Minggu	Mean		8.29	.421
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	7.26	
		Upper Bound	9.31	
	5% Trimmed Mean		8.26	
	Median		8.00	
	Variance		1.238	
	Std. Deviation		1.113	
	Minimum		7	
	Maximum		10	
	Range		3	
	Interquartile Range		2	
	Skewness		.249	.794
	Kurtosis		-.944	1.587
	KPU 2 Minggu	Mean		7.57
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	5.51	
		Upper Bound	9.63	
5% Trimmed Mean			7.58	
Median			8.00	
Variance			4.952	
Std. Deviation			2.225	
Minimum			4	
Maximum			11	
Range			7	
Interquartile Range			3	
Skewness			-.132	.794
Kurtosis			.523	1.587
KPU 4 Minggu		Mean		8.71
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	7.33	
		Upper Bound	10.10	
	5% Trimmed Mean		8.68	
	Median		9.00	
	Variance		2.238	
	Std. Deviation		1.496	
	Minimum		7	
	Maximum		11	
	Range		4	
	Interquartile Range		3	

	Skewness		.256	.794
	Kurtosis		-.968	1.587
KPAU 2 Minggu	Mean		8.57	1.043
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6.02	
		Upper Bound	11.12	
	5% Trimmed Mean		8.52	
	Median		9.00	
	Variance		7.619	
	Std. Deviation		2.760	
	Minimum		5	
	Maximum		13	
	Range		8	
	Interquartile Range		4	
	Skewness		.292	.794
	Kurtosis		-.532	1.587
	KPAU 4 Minggu	Mean		11.00
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	9.31	
		Upper Bound	12.69	
5% Trimmed Mean			10.94	
Median			10.00	
Variance			3.333	
Std. Deviation			1.826	
Minimum			9	
Maximum			14	
Range			5	
Interquartile Range			3	
Skewness			.920	.794
Kurtosis			-.528	1.587

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.172	7	.200 [*]
KN 4 Minggu	.205	7	.200 [*]
KP 2 Minggu	.189	7	.200 [*]
KP 4 Minggu	.253	7	.195
KPA 2 Minggu	.160	7	.200 [*]
KPA 4 Minggu	.173	7	.200 [*]
KPU 2 Minggu	.148	7	.200 [*]
KPU 4 Minggu	.160	7	.200 [*]

KPAU 2 Minggu	.160	7	.200*
KPAU 4 Minggu	.279	7	.105

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Berdasarkan uji homogenitas didapatkan distribusi data homogen.

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	1.353	9	60	.230
	Based on Median	.854	9	60	.571
	Based on Median and with adjusted df	.854	9	43.352	.572
	Based on trimmed mean	1.364	9	60	.225

Uji Komparatif

Uji komparatif yang digunakan adalah Oneway Anova karena didapatkan distribusi data normal dan homogen. Hasil uji komparatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada kelompok variable secara signifikan.

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	351.157	9	39.017	12.248	.000
Within Groups	191.143	60	3.186		
Total	542.300	69			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
KN2	KN4	-.429	.954	.655	-2.34	1.48
	KP2	3.143*	.954	.002	1.23	5.05
	KP4	2.286*	.954	.020	.38	4.19
	KPA2	-1.143	.954	.236	-3.05	.77
	KPA4	-2.143*	.954	.028	-4.05	-.23
	KPU2	-1.429	.954	.140	-3.34	.48
	KPU4	-2.571*	.954	.009	-4.48	-.66
	KPAU2	-2.429*	.954	.013	-4.34	-.52
	KPAU4	-4.857*	.954	.000	-6.77	-2.95
KN4	KN2	.429	.954	.655	-1.48	2.34

	KP2	3.571*	.954	.000	1.66	5.48
	KP4	2.714*	.954	.006	.81	4.62
	KPA2	-.714	.954	.457	-2.62	1.19
	KPA4	-1.714	.954	.077	-3.62	.19
	KPU2	-1.000	.954	.299	-2.91	.91
	KPU4	-2.143*	.954	.028	-4.05	-.23
	KPAU2	-2.000*	.954	.040	-3.91	-.09
	KPAU4	-4.429*	.954	.000	-6.34	-2.52
KP2	KN2	-3.143*	.954	.002	-5.05	-1.23
	KN4	-3.571*	.954	.000	-5.48	-1.66
	KP4	-.857	.954	.373	-2.77	1.05
	KPA2	-4.286*	.954	.000	-6.19	-2.38
	KPA4	-5.286*	.954	.000	-7.19	-3.38
	KPU2	-4.571*	.954	.000	-6.48	-2.66
	KPU4	-5.714*	.954	.000	-7.62	-3.81
	KPAU2	-5.571*	.954	.000	-7.48	-3.66
	KPAU4	-8.000*	.954	.000	-9.91	-6.09
KP4	KN2	-2.286*	.954	.020	-4.19	-.38
	KN4	-2.714*	.954	.006	-4.62	-.81
	KP2	.857	.954	.373	-1.05	2.77
	KPA2	-3.429*	.954	.001	-5.34	-1.52
	KPA4	-4.429*	.954	.000	-6.34	-2.52
	KPU2	-3.714*	.954	.000	-5.62	-1.81
	KPU4	-4.857*	.954	.000	-6.77	-2.95
	KPAU2	-4.714*	.954	.000	-6.62	-2.81
	KPAU4	-7.143*	.954	.000	-9.05	-5.23
KPA2	KN2	1.143	.954	.236	-.77	3.05
	KN4	.714	.954	.457	-1.19	2.62
	KP2	4.286*	.954	.000	2.38	6.19
	KP4	3.429*	.954	.001	1.52	5.34
	KPA4	-1.000	.954	.299	-2.91	.91
	KPU2	-.286	.954	.766	-2.19	1.62
	KPU4	-1.429	.954	.140	-3.34	.48
	KPAU2	-1.286	.954	.183	-3.19	.62
	KPAU4	-3.714*	.954	.000	-5.62	-1.81
KPA4	KN2	2.143*	.954	.028	.23	4.05
	KN4	1.714	.954	.077	-.19	3.62
	KP2	5.286*	.954	.000	3.38	7.19
	KP4	4.429*	.954	.000	2.52	6.34
	KPA2	1.000	.954	.299	-.91	2.91
	KPU2	.714	.954	.457	-1.19	2.62

	KPU4	-.429	.954	.655	-2.34	1.48
	KPAU2	-.286	.954	.766	-2.19	1.62
	KPAU4	-2.714*	.954	.006	-4.62	-.81
KPU2	KN2	1.429	.954	.140	-.48	3.34
	KN4	1.000	.954	.299	-.91	2.91
	KP2	4.571*	.954	.000	2.66	6.48
	KP4	3.714*	.954	.000	1.81	5.62
	KPA2	.286	.954	.766	-1.62	2.19
	KPA4	-.714	.954	.457	-2.62	1.19
	KPU4	-1.143	.954	.236	-3.05	.77
	KPAU2	-1.000	.954	.299	-2.91	.91
	KPAU4	-3.429*	.954	.001	-5.34	-1.52
	KPU4	KN2	2.571*	.954	.009	.66
KN4		2.143*	.954	.028	.23	4.05
KP2		5.714*	.954	.000	3.81	7.62
KP4		4.857*	.954	.000	2.95	6.77
KPA2		1.429	.954	.140	-.48	3.34
KPA4		.429	.954	.655	-1.48	2.34
KPU2		1.143	.954	.236	-.77	3.05
KPAU2		.143	.954	.881	-1.77	2.05
KPAU4		-2.286*	.954	.020	-4.19	-.38
KPAU2		KN2	2.429*	.954	.013	.52
	KN4	2.000*	.954	.040	.09	3.91
	KP2	5.571*	.954	.000	3.66	7.48
	KP4	4.714*	.954	.000	2.81	6.62
	KPA2	1.286	.954	.183	-.62	3.19
	KPA4	.286	.954	.766	-1.62	2.19
	KPU2	1.000	.954	.299	-.91	2.91
	KPU4	-.143	.954	.881	-2.05	1.77
	KPAU4	-2.429*	.954	.013	-4.34	-.52
	KPAU4	KN2	4.857*	.954	.000	2.95
KN4		4.429*	.954	.000	2.52	6.34
KP2		8.000*	.954	.000	6.09	9.91
KP4		7.143*	.954	.000	5.23	9.05
KPA2		3.714*	.954	.000	1.81	5.62
KPA4		2.714*	.954	.006	.81	4.62
KPU2		3.429*	.954	.001	1.52	5.34
KPU4		2.286*	.954	.020	.38	4.19
	KPAU2	2.429*	.954	.013	.52	4.34

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 12

Uji Statistik Imunohistochemistry LL-37

Analisa Deskriptif

		Statistics									
		KN 2	KN 4	KP 2	KP 4	KPA 2	KPA 4	KPU 2	KPU 4	KPAU 2	KPAU 4
		Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu
N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		3.29	4.86	6.29	7.00	7.57	9.29	9.43	10.57	10.43	12.43
Median		3.00	5.00	6.00	7.00	8.00	9.00	9.00	10.00	10.00	11.00
Mode		2	2	5	7 ^a	9	7	7 ^a	10	8	10 ^a
Std. Deviation		1.799	2.340	1.799	1.633	2.070	2.215	2.299	2.370	2.370	2.699
Minimum		1	2	4	4	4	7	7	7	8	10
Maximum		6	8	9	9	10	13	13	14	14	17

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Descriptives

	Statistic	Std. Error
Mean	3.29	.680
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.62
	Upper Bound	4.95
5% Trimmed Mean	3.26	
Median	3.00	
Variance	3.238	
Std. Deviation	1.799	
Minimum	1	
Maximum	6	
Range	5	
Interquartile Range	3	
Skewness	.368	.794
Kurtosis	-1.130	1.587
Mean	4.86	.884
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.69
	Upper Bound	7.02
5% Trimmed Mean	4.84	
Median	5.00	
Variance	5.476	
Std. Deviation	2.340	
Minimum	2	

Maximum		8	
Range		6	
Interquartile Range		5	
Skewness		-.089	.794
Kurtosis		-1.445	1.587
Mean		6.29	.680
95% Confidence Interval for	Lower Bound	4.62	
Mean	Upper Bound	7.95	
5% Trimmed Mean		6.26	
Median		6.00	
Variance		3.238	
Std. Deviation		1.799	
Minimum		4	
Maximum		9	
Range		5	
Interquartile Range		3	
Skewness		.368	.794
Kurtosis		-1.130	1.587
Mean		7.00	.617
95% Confidence Interval for	Lower Bound	5.49	
Mean	Upper Bound	8.51	
5% Trimmed Mean		7.06	
Median		7.00	
Variance		2.667	
Std. Deviation		1.633	
Minimum		4	
Maximum		9	
Range		5	
Interquartile Range		2	
Skewness		-.964	.794
Kurtosis		1.162	1.587
Mean		7.57	.782
95% Confidence Interval for	Lower Bound	5.66	
Mean	Upper Bound	9.49	
5% Trimmed Mean		7.63	
Median		8.00	
Variance		4.286	
Std. Deviation		2.070	
Minimum		4	
Maximum		10	
Range		6	

Interquartile Range	3	
Skewness	-.773	.794
Kurtosis	-.012	1.587
Mean	9.29	.837
95% Confidence Interval for	Lower Bound	7.24
Mean	Upper Bound	11.33
5% Trimmed Mean	9.21	
Median	9.00	
Variance	4.905	
Std. Deviation	2.215	
Minimum	7	
Maximum	13	
Range	6	
Interquartile Range	4	
Skewness	.658	.794
Kurtosis	-.423	1.587
Mean	9.43	.869
95% Confidence Interval for	Lower Bound	7.30
Mean	Upper Bound	11.55
5% Trimmed Mean	9.37	
Median	9.00	
Variance	5.286	
Std. Deviation	2.299	
Minimum	7	
Maximum	13	
Range	6	
Interquartile Range	4	
Skewness	.416	.794
Kurtosis	-1.247	1.587
Mean	10.57	.896
95% Confidence Interval for	Lower Bound	8.38
Mean	Upper Bound	12.76
5% Trimmed Mean	10.58	
Median	10.00	
Variance	5.619	
Std. Deviation	2.370	
Minimum	7	
Maximum	14	
Range	7	
Interquartile Range	4	
Skewness	.086	.794

Kurtosis		- .345	1.587
Mean		10.43	.896
95% Confidence Interval for	Lower Bound	8.24	
Mean	Upper Bound	12.62	
5% Trimmed Mean		10.37	
Median		10.00	
Variance		5.619	
Std. Deviation		2.370	
Minimum		8	
Maximum		14	
Range		6	
Interquartile Range		5	
Skewness		.545	.794
Kurtosis		-1.257	1.587
Mean		12.43	1.020
95% Confidence Interval for	Lower Bound	9.93	
Mean	Upper Bound	14.92	
5% Trimmed Mean		12.31	
Median		11.00	
Variance		7.286	
Std. Deviation		2.699	
Minimum		10	
Maximum		17	
Range		7	
Interquartile Range		5	
Skewness		.928	.794
Kurtosis		-.490	1.587

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.191	7	.200*
KN 4 Minggu	.175	7	.200*
KP 2 Minggu	.191	7	.200*
KP 4 Minggu	.214	7	.200*
KPA 2 Minggu	.183	7	.200*
KPA 4 Minggu	.151	7	.200*
KPU 2 Minggu	.181	7	.200*
KPU 4 Minggu	.167	7	.200*
KPAU 2 Minggu	.155	7	.200*
KPAU 4 Minggu	.273	7	.124

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Uji Homogenitas

Berdasarkan uji homogenitas didapatkan distribusi data homogen.

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	.516	9	60	.857
	Based on Median	.260	9	60	.983
	Based on Median and with adjusted df	.260	9	43.607	.982
	Based on trimmed mean	.488	9	60	.877

Uji Komparatif

Uji komparatif yang digunakan adalah Oneway Anova karena didapatkan distribusi data normal dan homogen. Hasil uji komparatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada kelompok variable secara signifikan.

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	503.371	9	55.930	11.745	.000
Within Groups	285.714	60	4.762		
Total	789.086	69			

Post Hoc LSD

Berikut tabel multiple komparatif antar kelompok variable:

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
KN2	KN4	-1.571	1.166	.183	-3.90	.76
	KP2	-3.000*	1.166	.013	-5.33	-.67
	KP4	-3.714*	1.166	.002	-6.05	-1.38
	KPA2	-4.286*	1.166	.001	-6.62	-1.95
	KPA4	-6.000*	1.166	.000	-8.33	-3.67
	KPU2	-6.143*	1.166	.000	-8.48	-3.81
	KPU4	-7.286*	1.166	.000	-9.62	-4.95
	KPAU2	-7.143*	1.166	.000	-9.48	-4.81
	KPAU4	-9.143*	1.166	.000	-11.48	-6.81

KN4	KN2	1.571	1.166	.183	- .76	3.90
	KP2	-1.429	1.166	.225	-3.76	.90
	KP4	-2.143	1.166	.071	-4.48	.19
	KPA2	-2.714*	1.166	.023	-5.05	-.38
	KPA4	-4.429*	1.166	.000	-6.76	-2.10
	KPU2	-4.571*	1.166	.000	-6.90	-2.24
	KPU4	-5.714*	1.166	.000	-8.05	-3.38
	KPAU2	-5.571*	1.166	.000	-7.90	-3.24
	KPAU4	-7.571*	1.166	.000	-9.90	-5.24
KP2	KN2	3.000*	1.166	.013	.67	5.33
	KN4	1.429	1.166	.225	-.90	3.76
	KP4	-.714	1.166	.543	-3.05	1.62
	KPA2	-1.286	1.166	.275	-3.62	1.05
	KPA4	-3.000*	1.166	.013	-5.33	-.67
	KPU2	-3.143*	1.166	.009	-5.48	-.81
	KPU4	-4.286*	1.166	.001	-6.62	-1.95
	KPAU2	-4.143*	1.166	.001	-6.48	-1.81
	KPAU4	-6.143*	1.166	.000	-8.48	-3.81
KP4	KN2	3.714*	1.166	.002	1.38	6.05
	KN4	2.143	1.166	.071	-.19	4.48
	KP2	.714	1.166	.543	-1.62	3.05
	KPA2	-.571	1.166	.626	-2.90	1.76
	KPA4	-2.286	1.166	.055	-4.62	.05
	KPU2	-2.429*	1.166	.042	-4.76	-.10
	KPU4	-3.571*	1.166	.003	-5.90	-1.24
	KPAU2	-3.429*	1.166	.005	-5.76	-1.10
	KPAU4	-5.429*	1.166	.000	-7.76	-3.10
KPA2	KN2	4.286*	1.166	.001	1.95	6.62
	KN4	2.714*	1.166	.023	.38	5.05
	KP2	1.286	1.166	.275	-1.05	3.62
	KP4	.571	1.166	.626	-1.76	2.90
	KPA4	-1.714	1.166	.147	-4.05	.62
	KPU2	-1.857	1.166	.117	-4.19	.48
	KPU4	-3.000*	1.166	.013	-5.33	-.67
	KPAU2	-2.857*	1.166	.017	-5.19	-.52
	KPAU4	-4.857*	1.166	.000	-7.19	-2.52
KPA4	KN2	6.000*	1.166	.000	3.67	8.33
	KN4	4.429*	1.166	.000	2.10	6.76
	KP2	3.000*	1.166	.013	.67	5.33
	KP4	2.286	1.166	.055	-.05	4.62
	KPA2	1.714	1.166	.147	-.62	4.05

	KPU2	- .143	1.166	.903	-2.48	2.19
	KPU4	-1.286	1.166	.275	-3.62	1.05
	KPAU2	-1.143	1.166	.331	-3.48	1.19
	KPAU4	-3.143*	1.166	.009	-5.48	-.81
KPU2	KN2	6.143*	1.166	.000	3.81	8.48
	KN4	4.571*	1.166	.000	2.24	6.90
	KP2	3.143*	1.166	.009	.81	5.48
	KP4	2.429*	1.166	.042	.10	4.76
	KPA2	1.857	1.166	.117	-.48	4.19
	KPA4	.143	1.166	.903	-2.19	2.48
	KPU4	-1.143	1.166	.331	-3.48	1.19
	KPAU2	-1.000	1.166	.395	-3.33	1.33
	KPAU4	-3.000*	1.166	.013	-5.33	-.67
	KPU4	KN2	7.286*	1.166	.000	4.95
KN4		5.714*	1.166	.000	3.38	8.05
KP2		4.286*	1.166	.001	1.95	6.62
KP4		3.571*	1.166	.003	1.24	5.90
KPA2		3.000*	1.166	.013	.67	5.33
KPA4		1.286	1.166	.275	-1.05	3.62
KPU2		1.143	1.166	.331	-1.19	3.48
KPAU2		.143	1.166	.903	-2.19	2.48
KPAU4		-1.857	1.166	.117	-4.19	.48
KPAU2		KN2	7.143*	1.166	.000	4.81
	KN4	5.571*	1.166	.000	3.24	7.90
	KP2	4.143*	1.166	.001	1.81	6.48
	KP4	3.429*	1.166	.005	1.10	5.76
	KPA2	2.857*	1.166	.017	.52	5.19
	KPA4	1.143	1.166	.331	-1.19	3.48
	KPU2	1.000	1.166	.395	-1.33	3.33
	KPU4	-.143	1.166	.903	-2.48	2.19
	KPAU4	-2.000	1.166	.092	-4.33	.33
	KPAU4	KN2	9.143*	1.166	.000	6.81
KN4		7.571*	1.166	.000	5.24	9.90
KP2		6.143*	1.166	.000	3.81	8.48
KP4		5.429*	1.166	.000	3.10	7.76
KPA2		4.857*	1.166	.000	2.52	7.19
KPA4		3.143*	1.166	.009	.81	5.48
KPU2		3.000*	1.166	.013	.67	5.33
KPU4		1.857	1.166	.117	-.48	4.19
KPAU2		2.000	1.166	.092	-.33	4.33

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 13**Uji Statistik Hematoxylin Eosin Osteoblas****1. Analisa Deskriptif**

		Statistics									
		KN 2	KN 4	KP 2	KP 4	KPA 2	KPA 4	KPU 2	KPU 4	KPAU 2	KPAU 4
		Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu
N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		5.71	6.14	2.57	3.86	7.14	8.57	7.14	9.00	10.14	13.57
Median		5.00	6.00	2.00	4.00	8.00	9.00	7.00	9.00	10.00	13.00
Mode		5	5 ^a	1 ^a	2 ^a	8	7 ^a	5 ^a	8 ^a	10 ^a	10
Std. Deviation		2.138	1.574	1.512	1.574	1.676	1.272	1.676	1.414	1.864	3.207
Minimum		3	4	1	2	4	7	5	7	7	10
Maximum		9	8	5	6	9	10	9	11	13	18

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
KN 2 Minggu	Mean	5.71	.808	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.74	
		Upper Bound	7.69	
	5% Trimmed Mean	5.68		
	Median	5.00		
	Variance	4.571		
	Std. Deviation	2.138		
	Minimum	3		
	Maximum	9		
	Range	6		
	Interquartile Range	4		
	Skewness	.517	.794	
	Kurtosis	-.771	1.587	
KN 4 Minggu	Mean	6.14	.595	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.69	
		Upper Bound	7.60	
	5% Trimmed Mean	6.16		
	Median	6.00		
	Variance	2.476		
	Std. Deviation	1.574		
	Minimum	4		
	Maximum	8		
	Range	4		
	Interquartile Range	3		
	Skewness	.037	.794	
	Kurtosis	-1.684	1.587	

KP 2 Minggu	Mean		2.57	.571
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1.17	
		Upper Bound	3.97	
	5% Trimmed Mean		2.52	
	Median		2.00	
	Variance		2.286	
	Std. Deviation		1.512	
	Minimum		1	
	Maximum		5	
	Range		4	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		.620	.794
	Kurtosis		-.809	1.587
	KP 4 Minggu	Mean		3.86
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	2.40	
		Upper Bound	5.31	
5% Trimmed Mean			3.84	
Median			4.00	
Variance			2.476	
Std. Deviation			1.574	
Minimum			2	
Maximum			6	
Range			4	
Interquartile Range			3	
Skewness			-.037	.794
Kurtosis			-1.684	1.587
KPA 2 Minggu		Mean		7.14
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5.59	
		Upper Bound	8.69	
	5% Trimmed Mean		7.21	
	Median		8.00	
	Variance		2.810	
	Std. Deviation		1.676	
	Minimum		4	
	Maximum		9	
	Range		5	
	Interquartile Range		2	
	Skewness		-1.201	.794
	Kurtosis		1.268	1.587
	KPA 4 Minggu	Mean		8.57
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	7.39	
		Upper Bound	9.75	
5% Trimmed Mean			8.58	
Median			9.00	
Variance			1.619	
Std. Deviation			1.272	
Minimum			7	
Maximum			10	
Range			3	

	Interquartile Range		3	
	Skewness		-.222	.794
	Kurtosis		-1.715	1.587
KPU 2 Minggu	Mean		7.14	.634
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5.59	
		Upper Bound	8.69	
	5% Trimmed Mean		7.16	
	Median		7.00	
	Variance		2.810	
	Std. Deviation		1.676	
	Minimum		5	
	Maximum		9	
	Range		4	
	Interquartile Range		4	
	Skewness		-.309	.794
	Kurtosis		-1.468	1.587
	KPU 4 Minggu	Mean		9.00
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	7.69	
		Upper Bound	10.31	
5% Trimmed Mean			9.00	
Median			9.00	
Variance			2.000	
Std. Deviation			1.414	
Minimum			7	
Maximum			11	
Range			4	
Interquartile Range			2	
Skewness			.000	.794
Kurtosis			-1.200	1.587
KPAU 2 Minggu		Mean		10.14
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	8.42	
		Upper Bound	11.87	
	5% Trimmed Mean		10.16	
	Median		10.00	
	Variance		3.476	
	Std. Deviation		1.864	
	Minimum		7	
	Maximum		13	
	Range		6	
	Interquartile Range		2	
	Skewness		-.287	.794
	Kurtosis		1.049	1.587
	KPAU 4 Minggu	Mean		13.57
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	10.61	
		Upper Bound	16.54	
5% Trimmed Mean			13.52	
Median			13.00	
Variance			10.286	
Std. Deviation			3.207	

Minimum	10	
Maximum	18	
Range	8	
Interquartile Range	7	
Skewness	.247	.794
Kurtosis	-1.613	1.587

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.202	7	.200*
KN 4 Minggu	.195	7	.200*
KP 2 Minggu	.219	7	.200*
KP 4 Minggu	.195	7	.200*
KPA 2 Minggu	.267	7	.142
KPA 4 Minggu	.203	7	.200*
KPU 2 Minggu	.185	7	.200*
KPU 4 Minggu	.189	7	.200*
KPAU 2 Minggu	.184	7	.200*
KPAU 4 Minggu	.153	7	.200*

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	1.661	9	60	.119
	Based on Median	1.056	9	60	.408
	Based on Median and with adjusted df	1.056	9	43.313	.413
	Based on trimmed mean	1.631	9	60	.127

Uji Komparatif

Uji komparatif yang digunakan adalah Oneway Anova karena didapatkan distribusi data normal dan homogen. Hasil uji komparatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada kelompok variable secara signifikan.

ANOVA

Hasil

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	629.729	9	69.970	20.101	.000
Within Groups	208.857	60	3.481		
Total	838.586	69			

Post Hoc LSD

Berikut tabel multiple komparatif antar kelompok variable:

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference		Sig.	95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
KN2	KN4	-.429	.997	.669	-2.42	1.57
	KP2	3.143*	.997	.003	1.15	5.14
	KP4	1.857	.997	.067	-.14	3.85
	KPA2	-1.429	.997	.157	-3.42	.57
	KPA4	-2.857*	.997	.006	-4.85	-.86
	KPU2	-1.429	.997	.157	-3.42	.57
	KPU4	-3.286*	.997	.002	-5.28	-1.29
	KPAU2	-4.429*	.997	.000	-6.42	-2.43
	KPAU4	-7.857*	.997	.000	-9.85	-5.86
KN4	KN2	.429	.997	.669	-1.57	2.42
	KP2	3.571*	.997	.001	1.58	5.57
	KP4	2.286*	.997	.025	.29	4.28
	KPA2	-1.000	.997	.320	-2.99	.99
	KPA4	-2.429*	.997	.018	-4.42	-.43
	KPU2	-1.000	.997	.320	-2.99	.99
	KPU4	-2.857*	.997	.006	-4.85	-.86
	KPAU2	-4.000*	.997	.000	-5.99	-2.01
	KPAU4	-7.429*	.997	.000	-9.42	-5.43
KP2	KN2	-3.143*	.997	.003	-5.14	-1.15
	KN4	-3.571*	.997	.001	-5.57	-1.58
	KP4	-1.286	.997	.202	-3.28	.71
	KPA2	-4.571*	.997	.000	-6.57	-2.58
	KPA4	-6.000*	.997	.000	-7.99	-4.01
	KPU2	-4.571*	.997	.000	-6.57	-2.58
	KPU4	-6.429*	.997	.000	-8.42	-4.43
	KPAU2	-7.571*	.997	.000	-9.57	-5.58
	KPAU4	-11.000*	.997	.000	-12.99	-9.01
KP4	KN2	-1.857	.997	.067	-3.85	.14
	KN4	-2.286*	.997	.025	-4.28	-.29
	KP2	1.286	.997	.202	-.71	3.28
	KPA2	-3.286*	.997	.002	-5.28	-1.29
	KPA4	-4.714*	.997	.000	-6.71	-2.72
	KPU2	-3.286*	.997	.002	-5.28	-1.29

	KPU4	-5.143*	.997	.000	-7.14	-3.15
	KPAU2	-6.286*	.997	.000	-8.28	-4.29
	KPAU4	-9.714*	.997	.000	-11.71	-7.72
KPA2	KN2	1.429	.997	.157	-.57	3.42
	KN4	1.000	.997	.320	-.99	2.99
	KP2	4.571*	.997	.000	2.58	6.57
	KP4	3.286*	.997	.002	1.29	5.28
	KPA4	-1.429	.997	.157	-3.42	.57
	KPU2	.000	.997	1.000	-1.99	1.99
	KPU4	-1.857	.997	.067	-3.85	.14
	KPAU2	-3.000*	.997	.004	-4.99	-1.01
	KPAU4	-6.429*	.997	.000	-8.42	-4.43
	KPA4	KN2	2.857*	.997	.006	.86
KN4		2.429*	.997	.018	.43	4.42
KP2		6.000*	.997	.000	4.01	7.99
KP4		4.714*	.997	.000	2.72	6.71
KPA2		1.429	.997	.157	-.57	3.42
KPU2		1.429	.997	.157	-.57	3.42
KPU4		-.429	.997	.669	-2.42	1.57
KPAU2		-1.571	.997	.120	-3.57	.42
KPAU4		-5.000*	.997	.000	-6.99	-3.01
KPU2		KN2	1.429	.997	.157	-.57
	KN4	1.000	.997	.320	-.99	2.99
	KP2	4.571*	.997	.000	2.58	6.57
	KP4	3.286*	.997	.002	1.29	5.28
	KPA2	.000	.997	1.000	-1.99	1.99
	KPA4	-1.429	.997	.157	-3.42	.57
	KPU4	-1.857	.997	.067	-3.85	.14
	KPAU2	-3.000*	.997	.004	-4.99	-1.01
	KPAU4	-6.429*	.997	.000	-8.42	-4.43
	KPU4	KN2	3.286*	.997	.002	1.29
KN4		2.857*	.997	.006	.86	4.85
KP2		6.429*	.997	.000	4.43	8.42
KP4		5.143*	.997	.000	3.15	7.14
KPA2		1.857	.997	.067	-.14	3.85
KPA4		.429	.997	.669	-1.57	2.42
KPU2		1.857	.997	.067	-.14	3.85
KPAU2		-1.143	.997	.256	-3.14	.85
KPAU4		-4.571*	.997	.000	-6.57	-2.58
KPAU2		KN2	4.429*	.997	.000	2.43
	KN4	4.000*	.997	.000	2.01	5.99

	KP2	7.571*	.997	.000	5.58	9.57
	KP4	6.286*	.997	.000	4.29	8.28
	KPA2	3.000*	.997	.004	1.01	4.99
	KPA4	1.571	.997	.120	-.42	3.57
	KPU2	3.000*	.997	.004	1.01	4.99
	KPU4	1.143	.997	.256	-.85	3.14
	KPAU4	-3.429*	.997	.001	-5.42	-1.43
KPAU4	KN2	7.857*	.997	.000	5.86	9.85
	KN4	7.429*	.997	.000	5.43	9.42
	KP2	11.000*	.997	.000	9.01	12.99
	KP4	9.714*	.997	.000	7.72	11.71
	KPA2	6.429*	.997	.000	4.43	8.42
	KPA4	5.000*	.997	.000	3.01	6.99
	KPU2	6.429*	.997	.000	4.43	8.42
	KPU4	4.571*	.997	.000	2.58	6.57
	KPAU2	3.429*	.997	.001	1.43	5.42

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 14**Uji Statistik Hematoxylin Eosin Osteoklas****Analisa Deskriptif****Statistics**

		KN 2	KN 4	KP 2	KP 4	KPA 2	KPA 4	KPU 2	KPU 4	KPAU 2	KPAU 4
		Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu	Minggu
N	Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean		3.86	4.57	13.86	14.29	7.00	6.57	7.43	6.43	5.00	2.43
Median		3.00	5.00	14.00	14.00	7.00	6.00	8.00	6.00	5.00	2.00
Mode		2 ^a	4 ^a	10 ^a	13	6 ^a	5 ^a	9	6	5	2
Std. Deviation		1.952	1.397	2.410	1.496	1.528	1.512	1.718	1.718	2.236	1.272
Minimum		2	2	10	13	5	5	5	4	2	1
Maximum		7	6	17	17	9	9	9	9	9	5

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
KN 2 Minggu	Mean	3.86	.738	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.05	
		Upper Bound	5.66	
	5% Trimmed Mean	3.79		
	Median	3.00		
	Variance	3.810		
	Std. Deviation	1.952		
	Minimum	2		
	Maximum	7		
	Range	5		
	Interquartile Range	4		
	Skewness	.842	.794	
	Kurtosis	-.785	1.587	
	KN 4 Minggu	Mean	4.57	.528
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	3.28	
		Upper Bound	5.86	
5% Trimmed Mean		4.63		
Median		5.00		
Variance		1.952		
Std. Deviation		1.397		

	Minimum	2	
	Maximum	6	
	Range	4	
	Interquartile Range	2	
	Skewness	-.974	.794
	Kurtosis	1.007	1.587
KP 2 Minggu	Mean	13.86	.911
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	11.63
	Mean	Upper Bound	16.09
	5% Trimmed Mean	13.90	
	Median	14.00	
	Variance	5.810	
	Std. Deviation	2.410	
	Minimum	10	
	Maximum	17	
	Range	7	
	Interquartile Range	4	
	Skewness	-.367	.794
	Kurtosis	-.503	1.587
	KP 4 Minggu	Mean	14.29
95% Confidence Interval for		Lower Bound	12.90
Mean		Upper Bound	15.67
5% Trimmed Mean		14.21	
Median		14.00	
Variance		2.238	
Std. Deviation		1.496	
Minimum		13	
Maximum		17	
Range		4	
Interquartile Range		2	
Skewness		.998	.794
Kurtosis		.470	1.587
KPA 2 Minggu		Mean	7.00
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	5.59
	Mean	Upper Bound	8.41
	5% Trimmed Mean	7.00	
	Median	7.00	
	Variance	2.333	
	Std. Deviation	1.528	
	Minimum	5	
	Maximum	9	

	Range		4	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		.393	.794
	Kurtosis		-1.114	1.587
KPA 4 Minggu	Mean		6.57	.571
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5.17	
		Upper Bound	7.97	
	5% Trimmed Mean		6.52	
	Median		6.00	
	Variance		2.286	
	Std. Deviation		1.512	
	Minimum		5	
	Maximum		9	
	Range		4	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		.620	.794
	Kurtosis		-.809	1.587
	KPU 2 Minggu	Mean		7.43
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	5.84	
		Upper Bound	9.02	
5% Trimmed Mean			7.48	
Median			8.00	
Variance			2.952	
Std. Deviation			1.718	
Minimum			5	
Maximum			9	
Range			4	
Interquartile Range			3	
Skewness			-.383	.794
Kurtosis			-2.107	1.587
KPU 4 Minggu		Mean		6.43
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4.84	
		Upper Bound	8.02	
	5% Trimmed Mean		6.42	
	Median		6.00	
	Variance		2.952	
	Std. Deviation		1.718	
	Minimum		4	
	Maximum		9	
	Range		5	
	Interquartile Range		3	

	Skewness		.169	.794
	Kurtosis		-.638	1.587
KPAU 2 Minggu	Mean		5.00	.845
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.93	
		Upper Bound	7.07	
	5% Trimmed Mean		4.94	
	Median		5.00	
	Variance		5.000	
	Std. Deviation		2.236	
	Minimum		2	
	Maximum		9	
	Range		7	
	Interquartile Range		3	
	Skewness		.626	.794
	Kurtosis		1.208	1.587
	KPAU 4 Minggu	Mean		2.43
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	1.25	
		Upper Bound	3.61	
5% Trimmed Mean			2.37	
Median			2.00	
Variance			1.619	
Std. Deviation			1.272	
Minimum			1	
Maximum			5	
Range			4	
Interquartile Range			1	
Skewness			1.581	.794
Kurtosis			3.168	1.587

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.241	7	.200 [*]
KN 4 Minggu	.198	7	.200 [*]
KP 2 Minggu	.111	7	.200 [*]
KP 4 Minggu	.234	7	.200 [*]
KPA 2 Minggu	.214	7	.200 [*]
KPA 4 Minggu	.219	7	.200 [*]
KPU 2 Minggu	.248	7	.200 [*]
KPU 4 Minggu	.170	7	.200 [*]
KPAU 2 Minggu	.214	7	.200 [*]

KPAU 4 Minggu	.346	7	.011
---------------	------	---	------

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	.574	9	60	.813
	Based on Median	.475	9	60	.886
	Based on Median and with adjusted df	.475	9	50.552	.885
	Based on trimmed mean	.584	9	60	.805

Uji Komparatif

Uji komparatif yang digunakan adalah Oneway Anova karena didapatkan distribusi data normal dan homogen. Hasil uji komparatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada kelompok variable secara signifikan.

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	988.857	9	109.873	35.497	.000
Within Groups	185.714	60	3.095		
Total	1174.571	69			

Post Hoc LSD

Berikut tabel multiple komparatif antar kelompok variable:

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Hasil

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference			95% Confidence Interval	
		(I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
KN2	KN4	-.714	.940	.450	-2.60	1.17
	KP2	-10.000*	.940	.000	-11.88	-8.12
	KP4	-10.429*	.940	.000	-12.31	-8.55
	KPA2	-3.143*	.940	.001	-5.02	-1.26
	KPA4	-2.714*	.940	.005	-4.60	-.83
	KPU2	-3.571*	.940	.000	-5.45	-1.69
	KPU4	-2.571*	.940	.008	-4.45	-.69
	KPAU2	-1.143	.940	.229	-3.02	.74
	KPAU4	1.429	.940	.134	-.45	3.31
KN4	KN2	.714	.940	.450	-1.17	2.60
	KP2	-9.286*	.940	.000	-11.17	-7.40
	KP4	-9.714*	.940	.000	-11.60	-7.83

	KPA2	-2.429*	.940	.012	-4.31	-55
	KPA4	-2.000*	.940	.038	-3.88	-12
	KPU2	-2.857*	.940	.004	-4.74	-98
	KPU4	-1.857	.940	.053	-3.74	.02
	KPAU2	-.429	.940	.650	-2.31	1.45
	KPAU4	2.143*	.940	.026	.26	4.02
KP2	KN2	10.000*	.940	.000	8.12	11.88
	KN4	9.286*	.940	.000	7.40	11.17
	KP4	-.429	.940	.650	-2.31	1.45
	KPA2	6.857*	.940	.000	4.98	8.74
	KPA4	7.286*	.940	.000	5.40	9.17
	KPU2	6.429*	.940	.000	4.55	8.31
	KPU4	7.429*	.940	.000	5.55	9.31
	KPAU2	8.857*	.940	.000	6.98	10.74
	KPAU4	11.429*	.940	.000	9.55	13.31
KP4	KN2	10.429*	.940	.000	8.55	12.31
	KN4	9.714*	.940	.000	7.83	11.60
	KP2	.429	.940	.650	-1.45	2.31
	KPA2	7.286*	.940	.000	5.40	9.17
	KPA4	7.714*	.940	.000	5.83	9.60
	KPU2	6.857*	.940	.000	4.98	8.74
	KPU4	7.857*	.940	.000	5.98	9.74
	KPAU2	9.286*	.940	.000	7.40	11.17
	KPAU4	11.857*	.940	.000	9.98	13.74
KPA2	KN2	3.143*	.940	.001	1.26	5.02
	KN4	2.429*	.940	.012	.55	4.31
	KP2	-6.857*	.940	.000	-8.74	-4.98
	KP4	-7.286*	.940	.000	-9.17	-5.40
	KPA4	.429	.940	.650	-1.45	2.31
	KPU2	-.429	.940	.650	-2.31	1.45
	KPU4	.571	.940	.546	-1.31	2.45
	KPAU2	2.000*	.940	.038	.12	3.88
	KPAU4	4.571*	.940	.000	2.69	6.45
KPA4	KN2	2.714*	.940	.005	.83	4.60
	KN4	2.000*	.940	.038	.12	3.88
	KP2	-7.286*	.940	.000	-9.17	-5.40
	KP4	-7.714*	.940	.000	-9.60	-5.83
	KPA2	-.429	.940	.650	-2.31	1.45
	KPU2	-.857	.940	.366	-2.74	1.02
	KPU4	.143	.940	.880	-1.74	2.02
	KPAU2	1.571	.940	.100	-.31	3.45

	KPAU4	4.143*	.940	.000	2.26	6.02
KPU2	KN2	3.571*	.940	.000	1.69	5.45
	KN4	2.857*	.940	.004	.98	4.74
	KP2	-6.429*	.940	.000	-8.31	-4.55
	KP4	-6.857*	.940	.000	-8.74	-4.98
	KPA2	.429	.940	.650	-1.45	2.31
	KPA4	.857	.940	.366	-1.02	2.74
	KPU4	1.000	.940	.292	-.88	2.88
	KPAU2	2.429*	.940	.012	.55	4.31
	KPAU4	5.000*	.940	.000	3.12	6.88
	KPU4	KN2	2.571*	.940	.008	.69
KN4		1.857	.940	.053	-.02	3.74
KP2		-7.429*	.940	.000	-9.31	-5.55
KP4		-7.857*	.940	.000	-9.74	-5.98
KPA2		-.571	.940	.546	-2.45	1.31
KPA4		-.143	.940	.880	-2.02	1.74
KPU2		-1.000	.940	.292	-2.88	.88
KPAU2		1.429	.940	.134	-.45	3.31
KPAU4		4.000*	.940	.000	2.12	5.88
KPAU2		KN2	1.143	.940	.229	-.74
	KN4	.429	.940	.650	-1.45	2.31
	KP2	-8.857*	.940	.000	-10.74	-6.98
	KP4	-9.286*	.940	.000	-11.17	-7.40
	KPA2	-2.000*	.940	.038	-3.88	-.12
	KPA4	-1.571	.940	.100	-3.45	.31
	KPU2	-2.429*	.940	.012	-4.31	-.55
	KPU4	-1.429	.940	.134	-3.31	.45
	KPAU4	2.571*	.940	.008	.69	4.45
	KPAU4	KN2	-1.429	.940	.134	-3.31
KN4		-2.143*	.940	.026	-4.02	-.26
KP2		-11.429*	.940	.000	-13.31	-9.55
KP4		-11.857*	.940	.000	-13.74	-9.98
KPA2		-4.571*	.940	.000	-6.45	-2.69
KPA4		-4.143*	.940	.000	-6.02	-2.26
KPU2		-5.000*	.940	.000	-6.88	-3.12
KPU4		-4.000*	.940	.000	-5.88	-2.12
KPAU2		-2.571*	.940	.008	-4.45	-.69

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

LAMPIRAN 15**Uji Statistik Hematoxylin Eosin BIC****1. Analisa Deskriptif**

	Statistics									
	KN 2 Minggu	KN 4 Minggu	KP 2 Minggu	KP 4 Minggu	KPA 2 Minggu	KPA 4 Minggu	KPU 2 Minggu	KPU 4 Minggu	KPAU 2 Minggu	KPAU 4 Minggu
N Valid	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
Missing	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mean	79.5029	79.1700	44.0514	46.7071	136.1271	141.3586	136.2943	143.2829	137.3443	148.2586
Median	82.5300	78.8700	43.8100	46.2900	135.4700	142.1700	135.7000	143.6500	136.6300	148.4200
Mode	67.34 ^a	76.52 ^a	42.19 ^a	45.32 ^a	133.35 ^a	135.32 ^a	134.18 ^a	140.64 ^a	135.41 ^a	135.15 ^a
Std. Deviation	5.98646	2.08304	1.66483	1.32598	3.49276	3.42208	1.76794	1.27509	1.81326	7.18959
Minimum	67.34	76.52	42.19	45.32	133.35	135.32	134.18	140.64	135.41	135.15
Maximum	83.62	82.71	46.39	49.03	143.48	144.99	139.54	144.31	139.54	159.45

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

Descriptives

KN 2 Minggu	Mean	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound
		Upper Bound
	5% Trimmed Mean	
	Median	
	Variance	
	Std. Deviation	
	Minimum	
	Maximum	
	Range	
	Interquartile Range	
	Skewness	
	Kurtosis	
	KN 4 Minggu	Mean
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound
		Upper Bound
5% Trimmed Mean		

	Median	
	Variance	
	Std. Deviation	
	Minimum	
	Maximum	
	Range	
	Interquartile Range	
	Skewness	
	Kurtosis	
KP 2 Minggu	Mean	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound
		Upper Bound
	5% Trimmed Mean	
	Median	
	Variance	
	Std. Deviation	
	Minimum	
	Maximum	
	Range	
	Interquartile Range	
	Skewness	
	Kurtosis	
KP 4 Minggu	Mean	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound
		Upper Bound
	5% Trimmed Mean	
	Median	
	Variance	
	Std. Deviation	
	Minimum	
	Maximum	
	Range	
	Interquartile Range	
	Skewness	
	Kurtosis	
KPA 2 Minggu	Mean	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound
		Upper Bound
	5% Trimmed Mean	
	Median	
Variance		

	Std. Deviation
	Minimum
	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis
KPA 4 Minggu	Mean
	95% Confidence Interval for Mean
	Lower Bound
	Upper Bound
	5% Trimmed Mean
	Median
	Variance
	Std. Deviation
	Minimum
	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis
KPU 2 Minggu	Mean
	95% Confidence Interval for Mean
	Lower Bound
	Upper Bound
	5% Trimmed Mean
	Median
	Variance
	Std. Deviation
	Minimum
	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis
KPU 4 Minggu	Mean
	95% Confidence Interval for Mean
	Lower Bound
	Upper Bound
	5% Trimmed Mean
	Median
	Variance
	Std. Deviation
	Minimum

	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis
KPAU 2 Minggu	Mean
	95% Confidence Interval for Mean
	Lower Bound
	Upper Bound
	5% Trimmed Mean
	Median
	Variance
	Std. Deviation
	Minimum
	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis
KPAU 4 Minggu	Mean
	95% Confidence Interval for Mean
	Lower Bound
	Upper Bound
	5% Trimmed Mean
	Median
	Variance
	Std. Deviation
	Minimum
	Maximum
	Range
	Interquartile Range
	Skewness
	Kurtosis

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.357	7	.007
KN 4 Minggu	.129	7	.200*
KP 2 Minggu	.152	7	.200*
KP 4 Minggu	.195	7	.200*
KPA 2 Minggu	.300	7	.057

KPA 4 Minggu	.191	7	.200*
KPU 2 Minggu	.203	7	.200*
KPU 4 Minggu	.270	7	.134
KPAU 2 Minggu	.252	7	.199
KPAU 4 Minggu	.282	7	.097

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Descriptives

		Statistic	Std. Error	
KN 2 Minggu	Mean	79.5029	2.26267	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	73.9663	
		Upper Bound	85.0394	
	5% Trimmed Mean	79.9498		
	Median	82.5300		
	Variance	35.838		
	Std. Deviation	5.98646		
	Minimum	67.34		
	Maximum	83.62		
	Range	16.28		
	Interquartile Range	7.21		
	Skewness	-1.820	.794	
	Kurtosis	2.857	1.587	
KN 4 Minggu	Mean	79.1700	.78732	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	77.2435	
		Upper Bound	81.0965	
	5% Trimmed Mean	79.1206		
	Median	78.8700		
	Variance	4.339		
	Std. Deviation	2.08304		
	Minimum	76.52		
	Maximum	82.71		
	Range	6.19		
	Interquartile Range	3.17		
	Skewness	.566	.794	
	Kurtosis	.089	1.587	
KP 2 Minggu	Mean	44.0514	.62925	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	42.5117	
		Upper Bound	45.5911	
	5% Trimmed Mean	44.0249		

	Median	43.8100	
	Variance	2.772	
	Std. Deviation	1.66483	
	Minimum	42.19	
	Maximum	46.39	
	Range	4.20	
	Interquartile Range	3.61	
	Skewness	.336	.794
	Kurtosis	-1.515	1.587
KP 4 Minggu	Mean	46.7071	.50117
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	45.4808
	Mean	Upper Bound	47.9335
	5% Trimmed Mean	46.6552	
	Median	46.2900	
	Variance	1.758	
	Std. Deviation	1.32598	
	Minimum	45.32	
	Maximum	49.03	
	Range	3.71	
	Interquartile Range	2.32	
	Skewness	.872	.794
	Kurtosis	.151	1.587
KPA 2 Minggu	Mean	136.1271	1.32014
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	132.8969
	Mean	Upper Bound	139.3574
	5% Trimmed Mean	135.8729	
	Median	135.4700	
	Variance	12.199	
	Std. Deviation	3.49276	
	Minimum	133.35	
	Maximum	143.48	
	Range	10.13	
	Interquartile Range	2.84	
	Skewness	1.923	.794
	Kurtosis	4.132	1.587
KPA 4 Minggu	Mean	141.3586	1.29343
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	138.1937
	Mean	Upper Bound	144.5235
	5% Trimmed Mean	141.4923	
	Median	142.1700	
	Variance	11.711	

	Std. Deviation	3.42208	
	Minimum	135.32	
	Maximum	144.99	
	Range	9.67	
	Interquartile Range	6.02	
	Skewness	-.908	.794
	Kurtosis	.309	1.587
KPU 2 Minggu	Mean	136.2943	.66822
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	134.6592
	Mean	Upper Bound	137.9294
	5% Trimmed Mean	136.2314	
	Median	135.7000	
	Variance	3.126	
	Std. Deviation	1.76794	
	Minimum	134.18	
	Maximum	139.54	
	Range	5.36	
	Interquartile Range	2.20	
	Skewness	.997	.794
	Kurtosis	1.034	1.587
	KPU 4 Minggu	Mean	143.2829
95% Confidence Interval for		Lower Bound	142.1036
Mean		Upper Bound	144.4621
5% Trimmed Mean		143.3726	
Median		143.6500	
Variance		1.626	
Std. Deviation		1.27509	
Minimum		140.64	
Maximum		144.31	
Range		3.67	
Interquartile Range		1.43	
Skewness		-1.844	.794
Kurtosis		3.585	1.587
KPAU 2 Minggu		Mean	137.3443
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	135.6673
	Mean	Upper Bound	139.0213
	5% Trimmed Mean	137.3298	
	Median	136.6300	
	Variance	3.288	
	Std. Deviation	1.81326	
	Minimum	135.41	

	Maximum	139.54	
	Range	4.13	
	Interquartile Range	3.48	
	Skewness	.246	.794
	Kurtosis	-2.505	1.587
KPAU 4 Minggu	Mean	148.2586	2.71741
	95% Confidence Interval for	Lower Bound	141.6093
	Mean	Upper Bound	154.9078
	5% Trimmed Mean	148.3651	
	Median	148.4200	
	Variance	51.690	
	Std. Deviation	7.18959	
	Minimum	135.15	
	Maximum	159.45	
	Range	24.30	
	Interquartile Range	4.07	
	Skewness	-.522	.794
	Kurtosis	2.508	1.587

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a		
	Statistic	df	Sig.
KN 2 Minggu	.357	7	.007
KN 4 Minggu	.129	7	.200*
KP 2 Minggu	.152	7	.200*
KP 4 Minggu	.195	7	.200*
KPA 2 Minggu	.300	7	.057
KPA 4 Minggu	.191	7	.200*
KPU 2 Minggu	.203	7	.200*
KPU 4 Minggu	.270	7	.134
KPAU 2 Minggu	.252	7	.199
KPAU 4 Minggu	.282	7	.097

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Hasil	Based on Mean	2.287	9	60	.028
	Based on Median	1.195	9	60	.315
	Based on Median and with adjusted df	1.195	9	19.948	.351
	Based on trimmed mean	2.056	9	60	.048

Uji Komparatif

Uji komparatif yang digunakan adalah Kruskal-Wallis karena didapatkan distribusi data tidak normal dan tidak homogen. Hasil uji komparatif menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada kelompok variable secara signifikan.

Kruskal-Wallis Test

		Ranks	
	Kelompok	N	Mean Rank
Hasil	KN2	7	22.57
	KN4	7	20.43
	KP2	7	4.86
	KP4	7	10.14
	KPA2	7	38.79
	KPA4	7	53.00
	KPU2	7	40.50
	KPU4	7	58.14
	KPAU2	7	43.93
	KPAU4	7	62.64
	Total	70	

Test Statistics^{a,b}

		Hasil
Kruskal-Wallis H		61.505
df		9
Asymp. Sig.		.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

4. Post Hoc Mann-Whitney U

Berikut tabel multiple komparatif antar kelompok variable:

1) KN 2 minggu dengan KN 4 minggu

		Ranks		
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	8.57	60.00
	KN4	7	6.43	45.00
	Total	14		

Test Statistics^a	
	Hasil
Mann-Whitney U	17.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-.958
Asymp. Sig. (2-tailed)	.338
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.383 ^b
a. Grouping Variable: Kelompok	
b. Not corrected for ties.	

KN 2 minggu dengan KP 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	11.00	77.00
	KP2	7	4.00	28.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

2) KN 2 minggu dengan KP 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	11.00	77.00
	KP4	7	4.00	28.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

3) KN 2 minggu dengan KPA 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	4.00	28.00
	KPA2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

4) KN 2 minggu dengan KPA 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	4.00	28.00
	KPA4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

5) KN 2 minggu dengan KPU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	4.00	28.00
	KPU2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

6) KN 2 minggu dengan KPU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	4.00	28.00
	KPU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

7) KN 2 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	4.00	28.00
	KPAU2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

8) KN 2 minggu dengan KPAU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN2	7	4.00	28.00
	KPAU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

9) KN 4 minggu dengan KP 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN4	7	11.00	77.00
	KP2	7	4.00	28.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

10) KN 4 minggu dengan KP 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN4	7	11.00	77.00
	KP4	7	4.00	28.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

11) KN 4 minggu dengan KPA 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN4	7	4.00	28.00
	KPA2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

12) KN 4 minggu dengan KPA 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN4	7	4.00	28.00
	KPA4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

13) KN 4 minggu dengan KPU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN4	7	4.00	28.00
	KPU2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

14) KN 4 minggu dengan KPU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN4	7	4.00	28.00
	KPU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130

Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

15) KN 4 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN4	7	4.00	28.00
	KPAU2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

16) KN 4 minggu dengan KPAU4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KN4	7	4.00	28.00
	KPAU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

17) KP 2 minggu dengan KP 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP2	7	4.86	34.00
	KP4	7	10.14	71.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-2.364
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.017 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

18) KP 2 minggu dengan KPA 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP2	7	4.00	28.00
	KPA2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

19) KP 2 minggu dengan KPA 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP2	7	4.00	28.00
	KPA4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

20) KP 2 minggu dengan KPU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP2	7	4.00	28.00
	KPU2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

21) KP 2 minggu dengan KPU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP2	7	4.00	28.00
	KPU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

22) KP 2 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP2	7	4.00	28.00
	KPAU2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

23) KP 2 minggu dengan KPAU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP2	7	4.00	28.00
	KPAU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

24) KP 4 minggu dengan KPA 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP4	7	4.00	28.00
	KPA2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

25) KP 4 minggu dengan KPA 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP4	7	4.00	28.00
	KPA4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

26) KP 4 minggu dengan KPU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP4	7	4.00	28.00
	KPU2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

27) KP 4 minggu dengan KPU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP4	7	4.00	28.00
	KPU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

28) KP 4 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP4	7	4.00	28.00
	KPAU2	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

29) KP 4 minggu dengan KPAU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KP4	7	4.00	28.00
	KPAU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

30) KPA 2 minggu dengan KPA 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA2	7	5.14	36.00
	KPA4	7	9.86	69.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	36.000
Z	-2.108
Asymp. Sig. (2-tailed)	.035

Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] .038^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

31) KPA 2 minggu dengan KPU 2 minggu

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA2	7	6.57	46.00
	KPU2	7	8.43	59.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	18.000
Wilcoxon W	46.000
Z	-.831
Asymp. Sig. (2-tailed)	.406
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.456 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

32) KPA 2 minggu dengan KPU 4 minggu

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA2	7	4.43	31.00
	KPU4	7	10.57	74.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	31.000
Z	-2.747
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

33) KPA 2 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA2	7	6.07	42.50
	KPAU2	7	8.93	62.50
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	14.500
Wilcoxon W	42.500
Z	-1.279
Asymp. Sig. (2-tailed)	.201
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.209 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

34) KPA 2 minggu dengan KPAU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA2	7	4.57	32.00
	KPAU4	7	10.43	73.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	32.000
Z	-2.619
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

35) KPA 4 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA4	7	10.14	71.00
	KPAU2	7	4.86	34.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	34.000
Z	-2.364
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.017 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

36) KPA 4 minggu dengan KPU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA4	7	6.43	45.00
	KPU4	7	8.57	60.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	17.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-.958
Asymp. Sig. (2-tailed)	.338
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.383 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

37) KPA 4 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA4	7	9.57	67.00
	KPAU2	7	5.43	38.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	38.000
Z	-1.853

Asymp. Sig. (2-tailed)	.064
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.073 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

38) KPA 4 minggu dengan KPAU 4 minggu

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPA4	7	5.00	35.00
	KPAU4	7	10.00	70.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	35.000
Z	-2.236
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

39) KPU 2 minggu dengan KPU 4 minggu

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPU2	7	4.00	28.00
	KPU4	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

40) KPU 2 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPU2	7	6.43	45.00
	KPAU2	7	8.57	60.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	17.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-.960
Asymp. Sig. (2-tailed)	.337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.383 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

41) KPU 2 minggu dengan KPAU 4 minggu

Ranks				
	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPU2	7	4.79	33.50
	KPAU4	7	10.21	71.50
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	5.500
Wilcoxon W	33.500
Z	-2.430
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.011 ^b

- a. Grouping Variable: Kelompok
b. Not corrected for ties.

42) KPU 4 minggu dengan KPAU 2 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPU4	7	11.00	77.00
	KPAU2	7	4.00	28.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Hasil	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.130
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

43) KPU 4 minggu dengan KPAU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPU4	7	5.00	35.00
	KPAU4	7	10.00	70.00
	Total	14		

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPU4	7	5.00	35.00
	KPAU4	7	10.00	70.00
	Total	14		

44) KPAU 2 minggu dengan KPAU 4 minggu

Ranks

	Kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Hasil	KPAU2	7	5.00	35.00
	KPAU4	7	10.00	70.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Hasil
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	35.000
Z	-2.236
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

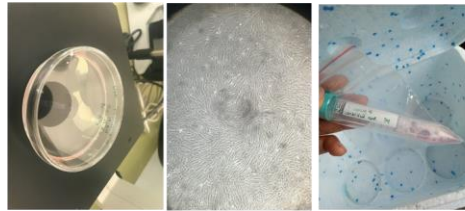
Lampiran 16

Gambar Penelitian

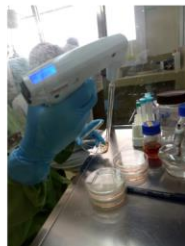
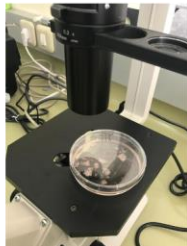
ISOLASI DAN KULTUR CELLS

Cells Culture

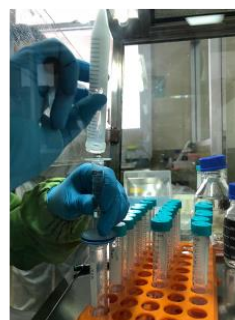
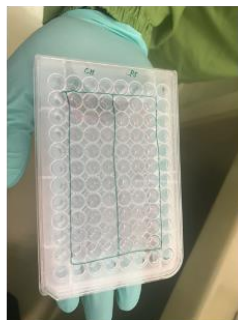
1. Cell culture
2. MTT Assay:
 - a. hUMCSc with LPS
P.Gingivalis
 - b. hUMCSCs with Scaffold



Cells Culture



MTT Assay

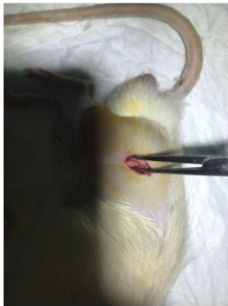


Lampiran 17

PEMBUATAN SCAFFOLD HA+TCP



Proses pembuatan Scaffold
HA+TCP

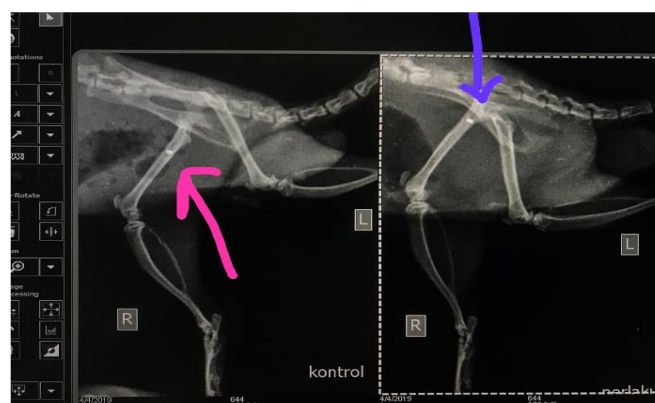


Membuat lubang pada femur dengan diameter 1,5 dan Panjang
2 mm menggunakan implan drilling

Lampiran 18. Pembuatan Model Sample Perimplatititis**INDUKSI LPS**

Setelah implant dimasukkan kemudian di induksi dengan LPS pada daerah soket tulangnya lalu ditunggu selama 4 minggu untuk diberi perlakuan/terapi

Hasil Radiografi kelompok Normal dan Perlakuan

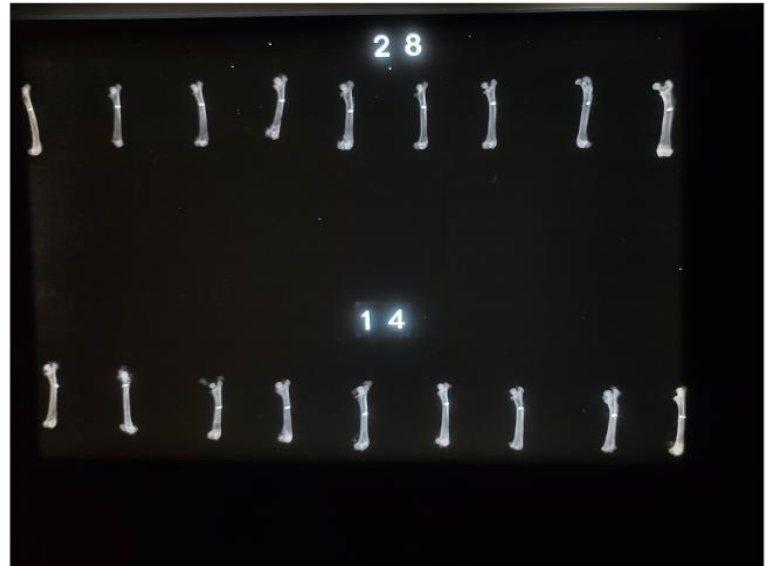


Lampiran 19. Aplikasi pemberian hUCMSCs dan Scaffold H-TCP**INDUKSI hUCMSCs dan
HA+TCP**

Induksi stem cell dan
HA+TCP dilakukan 2 dan
4 minggu paska
pemasangan implant

Lampiran 20. Gambaran Radiologis Kelompok KP dan KPAU

**KP2 (14) dan KP4
(28)**



**KPAU2 (14) dan KPAU4
(28)**



LEMBAR PENGESAHAN

MEKANISME KOMBINASI *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (hUCMSCs) DAN SCAFFOLD HA-TCP UNTUK REGENERASI BONE LOSS PADA MODEL PERIIMPLANTITIS
(Penelitian eksperimental pada Rattus Norvegicus)

DISERTASI

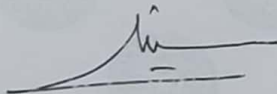
Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan Pendidikan Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya

Oleh :

VIVIN ARIESTANIA
NIM 021810173008

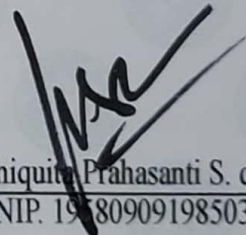
Menyetujui,

Promotor



Prof. Dr. Nike Hendriyentini., drg., M.Kes., Sp. Pros(K)
NIP. 195910061986012001

Ko Promotor



Prof. Dr. Chiquita Prahasanti S. drg., Sp. Pros(K)
NIP. 197809091985032001

Koordinator Program Studi
Doktor Ilmu Kedokteran Gigi



Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp. Ort (K)
NIP. 195601071981031003



BERITA ACARA UJIAN DISERTASI TERTUTUP

Pada hari Selasa, tanggal dua puluh tiga bulan agustus tahun dua ribu dua puluh dua, staf pengajar Universitas Airlangga dan Universitas Brawijaya yang tercantum dalam susunan kepanitiaan seperti tersebut dibawah ini :

No	Nama Penguji	Pangkat/Jabatan	Kedudukan dalam Panitia	Tanda tangan
1.	Prof. Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes.	Pembina Utama Muda (IV/c) / Guru Besar	Ketua Penguji	1.
2.	Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg., M.Kes., Sp.Pros.(K)	Pembina (IV/a) / Guru Besar	Anggota / Promotor	2.
3.	Prof. Dr. Chiquita Prahasanti S., drg., Sp.Perio(K)	Pembina Utama Madya (IV/d) / Guru Besar	Anggota / Ko Promotor	3.
4.	Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.	Pembina Utama (IV/e) / Guru Besar	Anggota	4.
5.	Prof. Dr. R. Darmawan Setijanto., drg., M.Kes.	Pembina Utama Muda (IV/c) / Guru Besar	Anggota	5.
6.	Dr. Eha Renwi Astuti, drg., M.Kes., Sp.RKG (K)	Pembina (IV/a) / Lektor Kepala	Anggota	6.
7.	Dr. Michael Josef K. drg., M.Kes., Sp.Pros (K)	Pembina (IV/a) / Lektor Kepala	Anggota	7.

Telah menguji ujian Disertasi Tertutup, Calon Doktor atas nama :

Nama : Vivin Ariestania, drg., Sp.Pros.

NIM : 021810173008

Judul : "Mekanisme Kombinasi *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (hUCMSCs) Dan Scaffold *HA+TCP* Untuk Regenerasi Bone Loss Pada Model *Peri Implantitis* (Penelitian Eksperimental Pada *Rattus Norvegicus*)".

Hasil : diterima:----- dengan *)
 dengan *)
 perbaikan
 Tanpa *)

Demikian berita acara ini dibuat dengan sebenarnya untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Calon Doktor yang diuji,

Surabaya, 23 Agustus 2022

Ketua Penguji,

Vivin Ariestania, drg., Sp.Pros.
 NIM 021810173008

Prof. Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes.
 NIP 196412161990022001

Mengetahui,
 KPS Doktor Ilmu Kedokteran Gigi

Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort.(K)
 NIP 195601071981031003

- Coret yang tidak perlu