



KEMENTERIAN PENDIDIKAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131
Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

Nomor : 4216 /UN3.1.1/DL/2021

2 Juli 2021

Lamp : Tiga Berkas

Hal : Mohon Kesediaan untuk menjadi Panitia Penguji Disertasi (Ujian Tertutup)

Yth.

1. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si (Ketua)
2. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh
3. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh.,DES
5. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr.,Sp.OT(K)
6. Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K)
7. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes
8. Dr. Michael Josef Kridanto Kamadjaja, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)

Dengan hormat,

Sehubungan dengan selesainya penulisan disertasi peserta Program Doktor angkatan tahun 2016/2017,

Nama : Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K)

ELPT : 553

NIM : 011617017324

Judul : PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP REMODELING TULANG LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS

Promotor : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh

Ko-Promotor : Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)

Ujian Disertasi rencananya diselenggarakan :

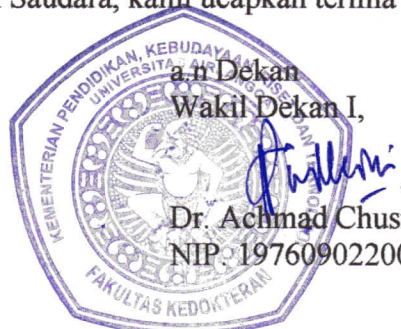
Hari, Tanggal : Rabu, 14 Juli 2021

Pukul : 13.00 – 16.00 WIB

Tempat : Menguji secara daring menggunakan aplikasi zoom

Maka dengan ini mohon kesediaan Saudara untuk menjadi Ketua / Anggota panitia Penguji Disertasi tersebut, terlampir kami sampaikan pernyataan kesediaan untuk diisi dan dilampirkan pada kami dalam waktu yang tidak terlalu lama guna diproses lebih lanjut.

Demikian atas perhatian Saudara, kami ucapkan terima kasih.



Tindasan :

- Kepala Sub. Bagian Keuangan



KEMENTERIAN PENDIDIKAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131
Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :

NIP :

Pangkat/Golongan :

Tenaga tetap di :

Dengan ini menyatakan bahwa pada hari dan jam tersebut dibawah ini saya **tidak sedang bertugas di tempat lain** sehingga **bersedia / tidak bersedia ***) untuk menjadi ketua / anggota Penguji Disertasi Program Doktor atas nama Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K) yang akan diselenggarakan pada :

Hari, Tanggal : Rabu, 14 Juli 2021

Pukul : 13.00 – 16.00 WIB

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya,

Yang membuat,

NIP.-----

*) coret yang tidak perlu



KEMENTERIAN PENDIDIKAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131
Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

SURAT TUGAS

Nomor : 4217/UN3.1.1/DL/2021

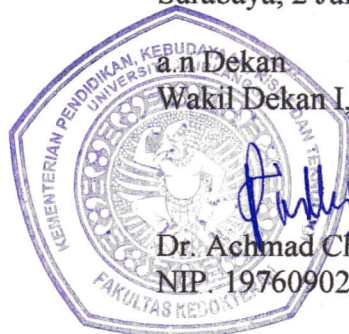
Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dengan ini menugaskan :

- | | |
|---|---------|
| 1. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si | Ketua |
| 2. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh | Anggota |
| 3. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K) | Anggota |
| 4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh.,DES | Anggota |
| 5. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr.,Sp.OT(K) | Anggota |
| 6. Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K) | Anggota |
| 7. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes | Anggota |
| 8. Dr. Michael Josef Kridanto Kamadjaja, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K) | Anggota |

Sebagai Ketua / Anggota Panitia Ujian Tahap Pertama (Tertutup) Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas nama Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K) peserta Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran angkatan tahun 2016/2017 yang diselenggarakan pada tanggal 14 Juli 2021.

Surat tugas ini diterbitkan sementara untuk menunggu keluarnya Surat Keputusan dari Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Surabaya, 2 Juli 2021



Wakil Dekan I,

Dr. Achmad Chusnu Romdhoni, dr., Sp. THT-KL(K), FICS
NIP. 197609022008011009



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131 Telp. (031)5020251, 5030253, Fax 031-5022472
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

Nomor : 3560 /UN3.1.1/DL/2021

Lamp : 1 Lembar

7 Juni 2021

Hal : Mohon Kesediaan untuk menjadi Tim penilaian Naskah Disertasi

Yth.

1. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh (Ketua)
2. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)
3. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si
4. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr.,Sp.OT(K)
5. Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K)
6. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes
7. Dr. Michael Josef Kridanto Kamadjaja, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)

Dengan hormat,

Sehubungan dengan selesainya penulisan penilaian naskah disertasi peserta Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga angkatan tahun 2016/2017,

Nama : Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K)

ELPT : 553

NIM : 011617017324

Judul : PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELL* TERHADAP REMODELING TULANG LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS

Promotor : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh

Ko-Promotor : Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)

Penilaian naskah untuk disertasi diselenggarakan :

Hari, Tanggal : Rabu, 23 Juni 2021

Pukul : 13.00 – 15.00 Wib

Tempat : Menguji secara daring menggunakan aplikasi *Zoom*

Maka dengan ini mohon kesediaan Saudara untuk menjadi Ketua / Anggota panitia penilaian naskah untuk disertasi tersebut, terlampir kami sampaikan pernyataan kesediaan untuk diisi dan dilampirkan pada kami dalam waktu yang tidak terlalu lama guna diproses lebih lanjut.

Demikian atas perhatian Saudara, kami ucapkan terima kasih.



An. Dekan

Wakil Dekan I

Dr. Achmad Chusfu Romdhoni, dr., Sp. THT-KL(K), FICS

NIP. 197609022008011009

Tindakan :

- Kepala Sub. Bagian Keuangan



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131 Telp. (031)5020251, 5030253, Fax 031-5022472
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :
NIP :
Pangkat/Golongan :
Tenaga tetap di :

Dengan ini menyatakan bahwa pada hari dan jam tersebut dibawah ini saya **tidak sedang bertugas di tempat lain** sehingga **bersedia / tidak bersedia** *) untuk menjadi ketua / anggota panitia penilaian naskah untuk disertasi Program Doktor atas nama Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K) yang akan diselenggarakan pada :

Hari, Tanggal : Rabu, 23 Juni 2021
Pukul : 13.00 – 15.00 Wib

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya,
Yang membuat,

NIP.-----

*) coret yang tidak perlu



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131 Telp. (031)5020251, 5030253, Fax 031-5022472
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

SURAT TUGAS

Nomor : 3561 /UN3.1.1/DL/2021

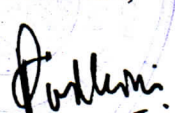
Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dengan ini menugaskan :

1. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh (Ketua)
2. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K) (Anggota)
3. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si (Anggota)
4. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr.,Sp.OT(K) (Anggota)
5. Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K) (Anggota)
6. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes (Anggota)
7. Dr. Michael Josef Kridanto Kamadjaja, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K) (Anggota)

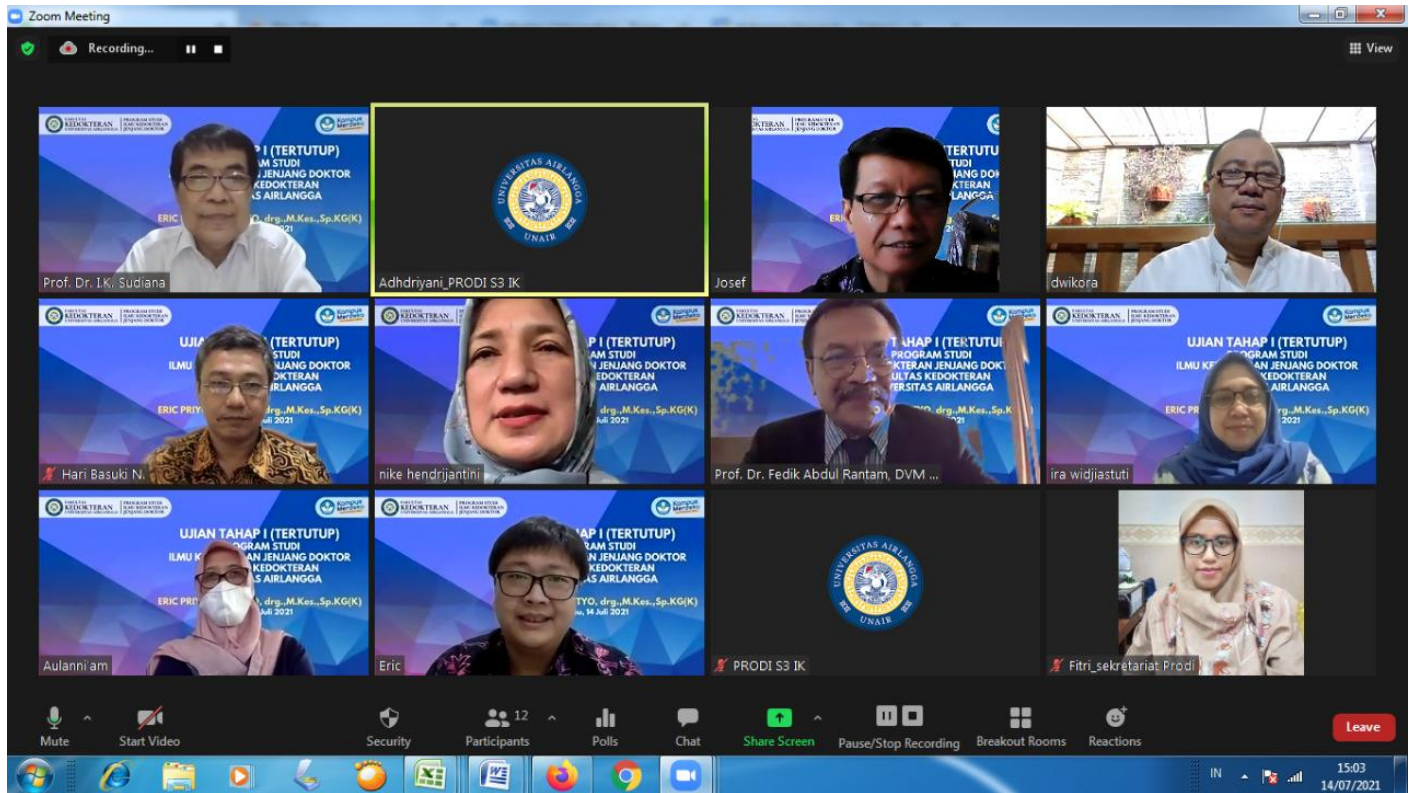
Sebagai Ketua /Anggota Panitia Penilai Ujian penilaian naskah disertasi Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas nama Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K) Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor angkatan tahun 2016/2017 yang diselenggarakan pada tanggal 23 Juni 2021.

Surat tugas ini diterbitkan sementara untuk menunggu keluarnya Surat Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Surabaya, 7 Juni 2021
An. Dekan
Wakil Dekan I,


Dr. Achmad Chusnu Romdhoni, dr., Sp. THT-KL(K), FICS
NIP. 197609022008011009

BUKTI KEHADIRAN UJIAN TERTUTUP
ERIC PRIYO PRASETYO., drg., M.Kes., SPKG(K)
Tanggal 14 JULI 2021





KEMENTERIAN PENDIDIKAN KEBUDAYAAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131

Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472

Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

BERITA ACARA UJIAN AKHIR TAHAP PERTAMA (TERTUTUP)

PENDIDIKAN DOKTOR

Pada hari ini **Rabu** tanggal **Empat Belas** , Bulan **Juli** tahun **Dua Ribu Dua Puluh Satu** mulai pukul **13.00 – 16.00** WIB di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga diselenggarakan Ujian Akhir Tahap Pertama (Tertutup) yang disusun oleh :

Nama : Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K)

NIM : 011617017324

Judul :PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP REMODELING TULANG LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS

Panitia penguji disertasi terdiri dari

1.	Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si	Ketua	1.	
2.	Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh	Anggota		2.
3.	Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)	Anggota	3.	
4.	Prof. Dr. Aulanni'am, drh.,DES	Anggota		4.
5.	Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr.,Sp.OT(K)	Anggota	5.	
6.	Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K)	Anggota		6.
7.	Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes	Anggota	7.	
8.	Dr. Michael Josef Kridanto Kamadjaja, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)	Anggota		8.

Memutuskan bahwa ujian akhir tahap pertama (tertutup) pendidikan doktor tersebut :

- Lulus / Tidak Lulus *) dengan nilai :
- Masih harus di uji kembali pada tanggal :

Ketua panitia penguji disertasi ,

Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si
NIP. _____

Catatan : Penelitian dibimbing oleh :

Promotor : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh

Ko-Promotor : Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)

Catatan : *) coret yang tidak perlu



KEMENTERIAN PENDIDIKAN KEBUDAYAAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131

Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472

Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :

NIP :

Pangkat/Golongan :

Tenaga tetap di :

Dengan ini menyatakan bahwa pada hari dan jam tersebut dibawah ini saya **tidak sedang bertugas di tempat lain** sehingga **bersedia / tidak bersedia** *) untuk menjadi ketua / anggota Penguji Disertasi Program Doktor atas nama Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K) yang akan diselenggarakan pada :

Hari, Tanggal : Rabu, 14 Juli 2021

Pukul : 13.00 – 16.00 WIB

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya,

Yang membuat,

NIP.-----

*) coret yang tidak perlu

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)



ERIC PRIYO PRASETYO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)



**ERIC PRIYO PRASETYO
011617017324**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga**

Hari: Jumat

Tanggal: 13 Agustus 2021

Pukul: 13.00

Oleh:

ERIC PRIYO PRASETYO

011617017324

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 14 JULI 2021

Oleh

Promotor



**Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
NIP. 195910031987011001**

Kopromotor



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

**Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai
oleh Panitia Penguji Ujian Akhir Tahap 1 (Tertutup)
pada tanggal 14 Juli 2021**

Panitia Penguji:

- Ketua : 1. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si.
Anggota : 2. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
3. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg., M.Kes., Sp.Pros. (K).
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.
5. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., Sp.OT. (K).
6. Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG. (K).
7. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes.
8. Dr. M. Josef Kridanto Kamadjaja, drg., M.Kes., Sp.Pros. (K).

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor: 393/UN3.1.1/HK/2021
Tanggal: 14 Juli 2021

ABSTRAK

PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP REMODELING TULANG LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS

Eric Priyo Prasetyo

Latar Belakang: Pada penderita diabetes mellitus, kegagalan perawatan saluran akar sering terjadi. Keadaan klinis yang sering ditemukan berupa lesi periapikal persisten, kegoyangan hingga terlepasnya gigi dari soketnya. Penelitian eksperimental menggunakan *human umbilical cord mesenchymal stem cells* (hUCMSCs) banyak dikembangkan, tetapi pengaruh dan efektivitasnya terhadap lesi periapikal pada kasus diabetes mellitus belum dapat dijelaskan. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan membuktikan pengaruh hUCMSCs dan menjelaskan mekanisme regenerasi lesi periapikal pada kasus diabetes mellitus dengan pemberian hUCMSCs. **Material dan Metode:** Penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *post-test only control group design* menggunakan 50 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok 10 ekor, yaitu kelompok kontrol lesi periapikal diabetes mellitus (K0), kelompok kontrol 2 minggu (K1), kelompok kontrol 4 minggu (K2), kelompok perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1), dan kelompok perlakuan hUCMSCs 4 minggu (P2). Semua tikus dikorbankan untuk pemeriksaan histologi dan imunohistokimia. Pemeriksaan IL-1, IL-1ra, MDA, Runx2, Osterix, dan remodeling tulang dilakukan dan dianalisa pada tiap kelompok. **Hasil:** Terdapat perbedaan bermakna pada ekspresi IL-1, IL-1ra, Runx2, Osterix, dan remodeling tulang antara kelompok kontrol dan perlakuan hUCMSCs, tidak terdapat perbedaan jumlah metabolit MDA. **Kesimpulan:** Pemberian hUCMSCs dapat menurunkan inflamasi, meningkatkan osteoblastogenesis, dan meningkatkan remodeling tulang lesi periapikal gigi model diabetes mellitus.

Kata kunci: tali pusat manusia, sel punca mesenkimal, diabetes mellitus, lesi periapikal, perawatan saluran akar.

ABSTRACT

THE EFFECT OF HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS APPLICATION ON DENTAL PERIAPICAL LESION BONE REMODELING IN CASE OF DIABETES MELLITUS

Eric Priyo Prasetyo

Background: *In patients with diabetes mellitus, root canal treatment failures often happen. Clinical symptoms often found are persistent periapical lesions, tooth luxation and tooth loss from the socket. Experimental researches using human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) are in trend, but the influence and effectivity on periapical lesion especially in diabetes mellitus case is not yet explained.* **Purpose:** *This research aimed to prove the effect of hUCMSCs and explain the mechanism of periapical lesion regeneration in case of diabetes mellitus by the application of hUCMSCs.* **Material and Methods:** *This research is a true experimental with post-test only control group design using 50 male Wistar rats were divided into 5 groups, each group consists of 10 rats, they are group of periapical lesions with diabetes mellitus control (K0), group of 2 weeks observation control (K1), group of 4 weeks observation control (K2), group of hUCMSCs treatment 2 weeks observation (P1), and group of hUCMSCs treatment 4 weeks observation (P2). All rats were sacrificed for histological and immunohistochemical examination. IL-1, IL-1ra, MDA, Runx2, Osterix, and bone remodeling were done and analyzed on every group.* **Results:** *Significant differences were found on IL-1, IL-1ra, Runx2, Osterix expressions and bone remodeling between control and hUCMSCs treatment groups, no significant difference on MDA metabolite.* **Conclusion:** *the application of hUCMSCs can decrease inflammation, increase osteoblastogenesis, and maintain homeostasis of bone remodeling on periapical lesion in diabetes mellitus case.*

Keywords: *human umbilical cord, mesenchymal stem cells, diabetes mellitus, periapical lesion, root canal treatment.*

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)



ERIC PRIYO PRASETYO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)



ERIC PRIYO PRASETYO
011617017324

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)

ERIC PRIYO PRASETYO

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021**

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)

DISERTASI
Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Hari: Jumat
Tanggal: 13 Agustus 2021
Pukul: 13.00

Oleh:

ERIC PRIYO PRASETYO
011617017324

PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2021

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELLS TERHADAP REMODELING TULANG
LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

(Penelitian eksperimental pada hewan coba *Rattus norvegicus strain Wistar*)

TELAH DISETUJUI

PADA TANGGAL 14 JULI 2021

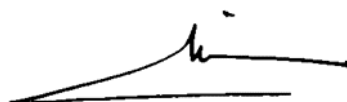
Oleh

Promotor



**Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
NIP. 195910031987011001**

Kopromotor



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

**Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai
oleh Panitia Penguji Ujian Akhir Tahap 1 (Tertutup)
pada tanggal 14 Juli 2021**

Panitia Penguji:

- Ketua : 1. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si.
Anggota : 2. Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.
3. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg., M.Kes., Sp.Pros. (K).
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.
5. Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., Sp.OT. (K).
6. Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG. (K).
7. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes.
8. Dr. M. Josef Kridanto Kamadjaja, drg., M.Kes., Sp.Pros. (K).

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor: 393/UN3.1.1/HK/2021
Tanggal: 14 Juli 2021

PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan dibawah ini saya :

Nama : Eric Priyo Prasetyo

NIM : 011617017324

Program Studi : Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor

Judul Disertasi : Pengaruh Pemberian *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* terhadap Remodeling Tulang Lesi Periapikal Gigi pada Kasus Diabetes Mellitus

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 sesuai peraturan perundang-undangan yang berlaku terhadap keaslian karya saya ini.

Surabaya, 14 Juli 2021

Yang membuat pernyataan,

A handwritten signature in black ink is written over a yellow 10,000 Rupiah stamp. The stamp features the Garuda Pancasila emblem and the text 'REPUBLIK INDONESIA', '10000', and 'METERAI TEMPEL'. A unique identification number 'DA84FAJX105378887' is printed at the bottom of the stamp.

Eric Priyo Prasetyo

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan penyertaan Nya sehingga penelitian dan disertasi ini dapat terselesaikan. Penelitian dan disertasi ini dapat dilaksanakan dan diselesaikan atas jasa, bimbingan, arahan perbaikan, dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu perkenankan saya untuk mengucapkan terima kasih yang tulus dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh. sebagai Promotor, penguji dan guru saya yang memahami kelemahan dan kekuatan akademik saya, mendorong saya dengan penuh pengertian dan kesabaran. Di tengah kesibukannya, beliau selalu memantau, memberikan bimbingan, dukungan, solusi, semangat positif dan teladan selama saya menempuh pendidikan ini, terutama dalam melakukan penelitian, publikasi penelitian dan penulisan disertasi.

Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg., M.Kes., Sp.Pros. (K). sebagai Ko-Promotor, penguji dan guru saya yang di tengah kesibukannya selalu sigap memantau, mendorong, memberikan dukungan, arahan, solusi, bimbingan, kesempatan untuk mengembangkan penelitian sel punca tali pusat manusia terutama dalam melakukan penelitian, publikasi penelitian dan penulisan disertasi.

Pemerintah Republik Indonesia, melalui Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi dan Kementerian Keuangan yang telah memberikan Beasiswa Unggulan Dosen Indonesia Dalam Negeri (BUDI-DN) sehingga saya dapat menempuh pendidikan ilmu kedokteran jenjang doktor.

Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT., Ak., CMA. yang telah memberikan kesempatan, ijin dan fasilitas untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan doktor pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG (K)., selaku mantan Wakil Dekan II Fakultas Kedokteran pada periode sebelumnya, Wakil Dekan I, Dr. Achmad Chusnu R., dr., Sp.THT-KL (K)., FICS., Wakil Dekan II, Dr. Hanik Badriyah Hidayati, dr., Sp.S (K)., dan Wakil Dekan III,

Dr. Sulistiawati, dr., M.Kes., dan segenap jajarannya yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan doktor.

Mantan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U., mantan Wakil Dekan I, Prof. Dr. David S. Perdanakusuma, dr., Sp.BP-RE (K), mantan Wakil Dekan III, Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK (K) dan segenap jajarannya yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor, Prof. Dr. H. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG. (K), yang telah memberikan bantuan dan dukungan kepada saya untuk menjalankan tahap-tahap ujian dalam menyelesaikan program doktor.

Mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor, Prof. Dr. H. Joewono Soeroso, dr., MSc., Sp.PD-KR. yang telah memberikan banyak dukungan untuk melaksanakan pendidikan, penelitian, dan tahap-tahap ujian yang telah saya tempuh.

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi, Dr. Agung Sosiawan, drg., M.H., M.Kes., selaku mantan Wakil Dekan II pada periode sebelumnya, Wakil Dekan I, Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg., M.Kes., Sp.KG (K), selaku mantan Ketua Departemen Ilmu Konservasi Gigi yang telah memberikan kesempatan dan dukungan kepada saya untuk mengikuti pendidikan jenjang doktor dan arahan-arahan yang diberikan sebagai penguji, Wakil Dekan II, Dr. Muhammad Luthfi, drg., M.Kes., Wakil Dekan III, Andra Rizqiawan, drg., Ph.D., Sp.BM., dan segenap jajarannya yang telah memberikan kesempatan dan dukungan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan doktor.

Mantan Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Prof. Dr. R. Darmawan Setijanto, drg., M.Kes., mantan Wakil Dekan I, Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes., mantan Wakil Dekan III, Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes., dan segenap jajarannya yang telah memberikan ijin dan dukungan untuk menempuh pendidikan doktor.

Ketua Departemen Ilmu Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Dr. Widya Saraswati, drg., M.Kes., Sp.KG (K), yang telah memberikan dukungan dan dorongan untuk menyelesaikan pendidikan doktor.

Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., M.Si. selaku ketua penguji dan penguji yang telah bersedia memberikan bimbingan, masukan, pengarahan dan menyediakan waktu untuk konsultasi ditengah kesibukan beliau.

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES., selaku penguji eksternal yang telah bersedia menjadi penguji ditengah kesibukan beliau atas masukan dan bimbingannya dalam disertasi ini.

Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., Sp.OT. (K). selaku penguji yang telah bersedia memberikan masukan, pencerahan dan menyediakan waktu untuk konsultasi ditengah kesibukan beliau.

Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes. selaku penguji yang telah bersedia menyediakan waktu, memberikan bimbingan, pengarahan, masukan dan konsultasi statistik yang sangat berharga ditengah kesibukan beliau.

Dr. Michael Josef Kridanto Kamadjaja, drg., Sp.Pros.(K)., selaku penguji yang telah bersedia memberikan arahan dan masukan yang sangat bermanfaat.

Prof. Dr. Latief Mooduto, drg., MS., Sp.KG. (K). almarhum selaku Penasehat Akademik, beserta istri, Prof. Dr. Jenny Sunariani, drg., MS. almarhumah yang telah memberikan motivasi dan mendorong saya pada tahap awal pendidikan jenjang doktor.

Dr. Dian Agustin Wahjuningrum, drg., Sp.KG. (K). atas masukan dan saran yang diberikan dalam penelitian dan penulisan disertasi pada tahap awal.

Dr. Djoko Legowo, drh., M.Kes., di Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Bapak Jumawan, Balqis, drh., dan tim atas bantuan dan waktu yang diberikan dalam menyelesaikan penelitian ini.

Widodo Jatim Pudjirahardjo, dr., MS., M.PH., Dr.PH., atas masukan dan pengetahuan yang sangat berguna dalam penelitian dan penulisan disertasi.

Komite Kelaikan Etik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas masukan dan ijin yang diberikan sehingga penelitian ini dapat dilaksanakan.

Ketua Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca Universitas Airlangga, Dr. Purwati, dr., Sp.PD-K, FINASIM. atas ijin penelitian dan fasilitas yang diberikan untuk melakukan penelitian.

Seluruh Staf Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca Universitas Airlangga, terutama Helen Susilowati, S.KM., M.Si, Eryk Hendrianto, S.Si., M.Si.,

Aristika Dinaryanti, drh., M.Si., Nora Ertanti, drh., M.Si., Deya Karsari, drh., M.Si., Igo Syaiful Ihsan, drh. dan seluruh tim yang banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian in-vitro hingga hewan coba.

Mario Tjondro, drg., Sp.KG., Dr. Vivin Ariestania, drg., Sp.Pro., dan Residen PPDGS Prostodonsia yang banyak membantu saya dalam penelitian hewan coba yaitu Jonathan, drg., Rizko, drg., dan kawan-kawan.

Dr. Fourier Dzar Eljabbar Latief, S.Si., M.Si. dari Institut Teknologi Bandung yang banyak memberikan masukan untuk pengembangan penelitian.

Dr. Satuman, S.Si., M.Kes. dari Universitas Brawijaya, atas bantuan dan kerjasamanya dalam menyediakan bahan-bahan yang diperlukan selama penelitian.

Dr. Desi Sandra Sari, drg., Sp.Perio. dari Universitas Jember yang telah banyak memberikan masukan dan saran yang berharga.

Diatri Nari Ratih, drg., M.Kes., Ph.D., Sp.KG. (K). dari Universitas Gadjah Mada yang banyak memberikan pencerahan untuk pendidikan jenjang doktoral.

Bapak Ary Wahyudiono dan Ibu Endah Sujani dari Laboratorium Medis Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, atas bantuan dan panduannya dalam pemrosesan preparat penelitian.

Seluruh Staf Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, terutama Dr. Soetopo, drg., MSc., Sp.KG. (K)., ibu Adhri, ibu Asmunah, ibu Fitri, bapak Oki, dan ibu Mita bersama tim yang tidak dapat disebutkan satu persatu, atas bantuan dan dukungan yang diberikan kepada saya selama saya menempuh pendidikan doktoral.

Seluruh Staf Pengajar di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, terutama Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS., Prof. Dr. Zainuddin, Apt., Prof. R.M. Coen Pramono Danudiningrat, drg., SU., Sp.BM (K), FICS., , Dr. F. Sustini, dr., MS., dan para staf pengajar lainnya yang telah memberikan ilmu pengetahuan dan membuka wawasan yang sangat berharga.

Keluarga besar Departemen Ilmu Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, para guru dan sejawat saya, yang selalu mendukung dan memotivasi saya untuk mendalami dan mengembangkan Ilmu Konservasi Gigi. Khususnya kepada guru-guru saya Prof. Moetmainah, drg. almarhumah., Prof.

Soejatmi Iskandar, drg. almarhumah, Prof. Dr. Ruslan Effendy, drg., MS., Sp.KG.(K)., Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., MS., Sp.KG.(K)., Prof. Dr. Adioro Soetojo, drg., MS., Sp.KG. (K)., Prof. Dr. Sri Kunarti, drg., MS., Sp.KG. (K)., Prof. Dr. Tamara Yuanita, drg., M.Kes., Sp.KG. (K)., Prof. Dr. Kun Ismiyatin, drg., M.Kes., Sp.KG. (K)., Mohamad Roelianto, drg., MS., Sp.KG. (K)., Sudarjani Gunawan, drg., MS., Sp.KG. (K)., Cecilia Gerda Juliani Lunardhi, drg., MS., Sp.KG. (K)., Karlina Samadi, drg., MS., Sp.KG. (K)., Achmad Sudirman, drg., MS., Sp.KG. (K)., Bambang Soenarko, drg., MS., Sp.KG.(K) almarhum, Ananta Tantri Budi, drg., MS., Sp.KG. (K) almarhum, Ari Subianto, drg., M.Kes., Sp.KG. (K)., Dr. Sukaton, drg., M.Kes., Sp.KG.(K)., Nanik Zubaidah, drg., M.Kes., Sp.KG.(K)., Laksmiari Setyowati, drg., M.Kes., Sp.KG.(K)., Nirawati Pribadi, drg., M.Kes., Sp.KG.(K). dan Ketut Suardita, drg., Sp.KG. (K)., PhD., yang selalu memotivasi saya untuk melanjutkan pendidikan ke jenjang doktor. Kepada Dr. Galih Sampoerna, drg., M.Kes., Sp.KG. (K)., Setyabudi Goeharto, drg., M.Kes., Sp.KG. (K)., Dr. Devi Eka Juniarti, drg., M.Kes., Sp.KG. (K)., dan Karina Erda Sanninggar, drg., yang selalu memberikan dorongan semangat dan membantu menggantikan tugas-tugas saya. Kepada Tri Ernawati almarhumah, Lisbet Francina, Etik Susilowati, Endang Amir Hamzah, Rosalia, Paul, Anik, Niswatin, Tyas, Rizki dan Residen PPDGS Ilmu Konservasi Gigi yang bersedia membantu.

Seluruh teman seperjuangan angkatan 2016 yang saling memotivasi, mengingatkan, dan memberi masukan, tanpa mengurangi rasa hormat untuk menyebutkan satu persatu, saya sampaikan terima kasih atas segala kekompakan dan keakraban yang terjalin selama ini. Khususnya kepada Mefina Kuntjoro, drg., M.Kes., Sp.Pros. (K)., Febriastuti Cahyani, drg., M.Kes., Sp.KG. (K)., Erwina Restiwulan Winoto, drg., M.Kes., Sp.Ort. (K)., Dr. Prawati Nuraini, drg., M.Kes., Sp.KGA.(K)., dan Dr. Sianiwati Goeharto, drg., M.Kes. yang selalu kompak bahu membahu saling membantu dan memotivasi.

Para senior saya dan rekan-rekan Fakultas Kedokteran Gigi yang telah memotivasi dan memberi masukan, tanpa mengurangi rasa hormat untuk menyebutkan satu persatu, saya sampaikan banyak terima kasih. Khususnya kepada Prof. Dr. Mohamad Rubianto, drg., MS., Sp.Perio.(K), Prof. Dr. Chiquita Prahasanti, drg., M.Kes., Sp.Perio (K)., Prof. Dr. Ernie Maduratna Setiawatie, drg.,

M.Kes., Sp.Perio.(K)., Prof. Dr. Diah Savitri Ernawati, drg., M.Kes., Sp.PM (K)., Prof. Dr. Retno Pudji Rahayu, drg., M.Kes., Prof. Dr. David Buntoro Kamadjaja, drg., MDS, Sp.BMM.(K)., Prof. Dr. Retno Indrawati Ridwan, drg., M.Kes., Prof. Dr. Ida Bagus Narmada, drg., Sp.Ort (K)., Prof. Dr. Theresia Indah Budhy, drg., M.Kes., Sp.PMM., Prof. Dr. Titiek Berniyanti, drg., M.Kes., Dr. Indah Listiana Kriswandini, drg., M.Kes., Dr. Pratiwi Susilowati, drg., M.Kes., Dr. Ira Arundina, drg., M.Kes., Dr. Yuliati, drg., M.Kes., Dr. Hendrik Setia Budi, drg., M.Kes., Dr. Agung Krismariono, drg., M.Kes. Sp.Perio.(K)., Dr. Daniel Oetomo, drg., M.Kes., Sp.Ort., Dr. Desiana Radithia, drg., Sp.PM.(K)., Dr. Ni Putu Mira Sumarta, drg., Sp.BMM.(K)., Dr. Safira Kurnia, drg., Sp.Perio.(K)., Dr. Eka Fitria Agustina, drg., M.Kes., Sp.Perio.(K)., Ninuk Haryani, drg., MS., PhD., Dr. Annisaa Chusida, drg., M.Kes., Udijanto Tedjosasongko, drg., Sp.KGA.(K)., PhD., Irma Josephina Savitri, drg., Sp.Perio.(K)., Ph.D., Dr. Sindy Cornelia Nelwan, drg., Sp.KGA.(K)., Tania Saskianti, drg., Sp.KGA.(K)., Ph.D., Maretaningtyas Dwi Aryani, drg., Sp.Pros.(K)., Ph.D., Lambang Bargowo, drg., M.Kes., Sp.Perio.(K)., Dr. Deny Saputra, drg., Sp.RKG.(K)., M.Kes., Alida, drg., M.Kes., Sp.Ort.(K)., Dr. Taufan Bramantoro, drg., M.Kes., Ratri Maya Sitalaksmi, drg., Sp.Pros.(K), Ph.D., Mega Moeharyono Puteri, drg., Sp.KGA.(K)., Ph.D., Ardianti Maartina Dewi, drg., M.Kes., Sp.KGA.(K)., Indra Mulyawan, drg., Sp.BMM., Fatma Yasmin Mahdani, drg., Sp.PM.(K)., M.Kes., Betadion Rizki Sinaredi, drg., Sp.KGA.(K)., M.Kes., Saka Winias, drg., Sp.PM, Dimas Prasetyanto Wicaksono, drg., M.Kes., Ph.D., Ananda Firman Putranto, drg., M.Kes., Sp.Ort.(K)., Dr. Alexander Patera Nugraha, drg., M.Imun., Muhammad Dimas Aditya Ari, drg., M.Kes., Sisca Meida Wati, drg., M.Kes., Ph.D., dan I Komang Evan Wijaksana, drg., Sp.Perio.

Para Lurah BUDI-DN Universitas Airlangga, saudara Wandu Abbas, S.IP., M.Hub.Int., Dr. Moch. Ali Mashuri, S.Sos., M.Si., dan M.R. Rizki, yang selalu mendukung, mendampingi, mengingatkan, dan memberi masukan untuk kelancaran pembiayaan dalam perjalanan studi saya.

Seluruh guru, dosen dan pembimbing saya mulai dari awal hingga jenjang Universitas yang telah mengajarkan banyak ilmu bermanfaat dan membuka wawasan.

Kedua orang tua saya, ayahanda Edy Prasetyo dan ibunda Tio Lulu Ugo yang telah mengasuh, mendidik, serta memberi tauladan yang baik, dengan penuh kasih sayang senantiasa mendukung saya tidak ada habisnya.

Kedua mertua saya, ayahanda Soesanto dan ibunda Mimi Kurniawan yang senantiasa memberi semangat dan dorongan.

Seluruh kerabat dan keluarga besar saya, terima kasih atas semua kebaikan, doa, dorongan semangat dan kasih sayang yang telah diberikan.

Istri terkasih, Lily Soesanti Kurniawan, dr., yang selalu mendampingi saya, terima kasih atas pengertian, dorongan semangat dan dukungannya.

Adik saya tersayang, Irma Putri Prasetyo, B.A., saudara ipar saya Riyo Sandjaja, S.E., M.A., dan keponakan saya Oliver Noah Sandjaja, terima kasih atas inspirasi, dukungan dan dorongan semangat yang tiada henti.

Semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah berkontribusi membantu, memotivasi dan ikut mendoakan baik secara langsung maupun tidak langsung hingga terselesaikannya disertasi ini.

Semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi kemajuan Ilmu Kedokteran dan Kedokteran Gigi, terutama dalam bidang Ilmu Konservasi Gigi khususnya Endodontik. Semoga Tuhan senantiasa memberkati, Amin.

Surabaya, 14 Juli 2021

Penulis

RINGKASAN

Perawatan saluran akar merupakan perawatan dalam bidang ilmu konservasi gigi yang bertujuan untuk mempertahankan gigi selama mungkin didalam rongga mulut, baik untuk tujuan estetik maupun fungsional. Pada penderita dengan kondisi kelainan sistemik, terutama kasus diabetes mellitus, kegagalan perawatan saluran akar sangat tinggi, walaupun perawatan telah dilakukan dengan baik dan telah dilakukan pengisian saluran akar. Beberapa pengobatan untuk mengendalikan kadar gula darah telah dilakukan, tetapi memiliki efek samping yang tidak ringan, selain itu juga tidak terlalu berpengaruh terhadap keberhasilan perawatan, gigi pada akhirnya lepas, walaupun perawatan saluran akar telah dilakukan secara adekuat.

Beberapa penelitian eksperimental terbaru dengan rekayasa jaringan menggunakan sel punca mulai banyak dikembangkan. Penelitian eksperimental untuk regenerasi luka pada penderita diabetes mellitus telah dilakukan dengan hasil memuaskan, akan tetapi bagaimana pengaruh pemberian *human umbilical cord mesenchymal stem cells* (hUCMSCs) pada proses regenerasi tulang lesi periapikal gigi masih belum pernah dilakukan dan belum diketahui mekanismenya.

Selama ini sumber sel punca yang banyak digunakan adalah *bone marrow-derived mesenchymal stem cells* (BMMSCs). BMMSCs banyak digunakan untuk potensi regenerasi, akan tetapi sumber ini memiliki beberapa kekurangan, antara lain yaitu prosedur pengambilan yang invasive, menimbulkan morbiditas penderita, serta keterbatasan jumlah dan kualitas dari sel punca yang dipengaruhi oleh kondisi sistemik dan usia penderita.

Sumber MSC dari tali pusat bayi (hUCMSCs) yang bersifat multipotent mulai banyak dikembangkan dan dipilih untuk disimpan sebagai alternatif terapi untuk berbagai terapi penyakit atau kelainan. Sel punca ini mulai banyak diteliti dan penelitian pada tulang mandibula osteoporosis telah memberikan hasil yang memuaskan, namun penelitian hUCMSCs untuk aplikasi rekayasa jaringan pada lesi periapikal gigi masih belum pernah dilakukan.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan keberhasilan dan menjelaskan mekanisme regenerasi melalui remodeling tulang lesi periapikal gigi pada kasus

diabetes mellitus dengan pemberian hUCMSCs. Penelitian ini adalah *true experimental*, dengan rancangan *post-test only control group design*. Sebanyak 50 ekor tikus Wistar jantan yang telah diinduksi *multiple low-dose streptozotocin* dan dibuat lesi periapikal dengan induksi lipopolisakarida, dibagi kedalam 5 kelompok, (masing-masing kelompok mendapatkan 10 ekor) yaitu kelompok kontrol lesi periapikal diabetes mellitus (K0), kelompok kontrol 2 minggu (K1), kelompok kontrol 4 minggu (K2), kelompok perlakuan pemberian hUCMSCs 2 minggu (P1), dan kelompok perlakuan pemberian hUCMSCs 4 minggu (P2). Variabel tergantung yang digunakan berupa penanda peradangan yaitu IL-1 dan IL-1ra, metabolit stres oksidatif yaitu MDA, dan penanda osteoblastogenesis yaitu Runx2, Osterix, dan penanda remodeling tulang berupa luas area osifikasi.

Gigi tikus model diabetes yang telah dilakukan induksi lipopolisakarida menunjukkan terjadinya kerusakan dan lesi pada daerah periapikal gigi. Hal ini menunjukkan model tikus lesi periapikal yang digunakan pada penelitian ini dapat mewakili kondisi lesi periapikal.

Pemberian hUCMSCs menurunkan peradangan pada lesi periapikal model diabetes mellitus, ditunjukkan dengan ekspresi IL-1 dan IL-1ra yang lebih rendah secara signifikan ($p < 0.05$). Pemberian hUCMSCs tidak mempengaruhi stres oksidatif pada lesi periapikal model diabetes mellitus, ditunjukkan dengan jumlah metabolit MDA yang tidak berbeda signifikan ($p < 0.05$). Pemberian hUCMSCs meningkatkan terjadinya osteoblastogenesis yang lebih tinggi pada lesi periapikal gigi model diabetes mellitus, ditunjukkan dengan peningkatan secara signifikan ekspresi faktor transkripsi Runx2 dan Osterix ($p < 0.05$). Pada penelitian ini didapatkan perbedaan remodeling tulang pada lesi periapikal gigi model diabetes mellitus. Remodeling merupakan mekanisme yang terus menerus terjadi dan merupakan suatu homeostasis. Pemberian hUCMSCs secara mikroskopis memberikan pengaruh signifikan pada struktur jaringan periapikal, yaitu tampak jaringan yang lebih teratur dan rapat dengan area osifikasi yang lebih luas.

Dapat disimpulkan hUCMSCs merupakan salah satu sumber MSC yang dapat menurunkan peradangan, meningkatkan osteoblastogenesis dan remodeling tulang pada lesi periapikal gigi model diabetes mellitus pada hewan coba.

SUMMARY

Root canal treatment is one of many conservative dental treatment with core purpose to retain the tooth inside the oral cavity as long as possible, esthetically and functionally. In patients with systemic conditions, especially diabetes mellitus, root canal treatment failures increases significantly, even though endodontic treatment was done appropriately and root canal obturations have been performed. Several pharmacological treatment to control blood glucose level have been developed, but there are side effects, and they are not very effective on the success of endodontic treatment, at the end the tooth will lose and separated from the sockets, even though root canal treatment has been done adequately.

There are new experiments in tissue engineering using stem cells being developed. Experimental research for wound regeneration on diabetic patients has been done with favorable results, but how the application of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) effect periapical lesion bone regeneration has not been performed and the mechanism is still unknown.

Previously, bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) are widely used as stem cells resource. BMMSCs are used for their regeneration potential, but this source has many disadvantages, such as invasive harvesting procedure, increased morbidity, and the limitation of cells and quality which are influenced by systemic condition and age of the donor.

Multipotent MSC source from umbilical cord of neonates (hUCMSCs) is currently being developed and chosen for storage as an alternative therapy for various diseases and abnormality. These cells are being researched, and research of these cells on osteoporotic mandible give positive results, but research on hUCMSCs for tissue engineering application in periapical lesion has not been performed.

This research was done to proof the success and explain the regeneration mechanism through periapical lesion bone remodeling in diabetes mellitus cases through application of hUCMSCs. This is a true experimental research with post-test only control group design. Fifty male Wistar rats was taken and induced with multiple low-dose streptozotocin and induced periapical lesion with

lipopolysaccharide induction, distributed into 5 groups (each group consists of 10 rats) there are periapical lesion diabetes mellitus control group (K0), two weeks control group (K1), four weeks control group (K2), treatment of hUCMSCs 2 weeks (P1) and treatment of hUCMSCs 4 weeks (P2). The dependent variables are inflammatory markers of IL-1 and IL-1ra, stress oxidative metabolite of MDA, and osteoblastogenesis markers of Runx2, Osterix, and bone remodeling marker of ossification area width from microscopic observation.

Diabetic rat model with tooth induced by lipopolysaccharide showed a destruction site and lesion on periapical area of the induced tooth. This showed that periapical lesion model for the diabetic rat done in this research can represent the condition of periapical lesion.

The treatment of hUCMSCs lower inflammation on periapical lesion in diabetes mellitus model, showed by the lower expression of IL-1 and IL-1ra significantly ($p < 0.05$). The treatment of hUCMSCs has no effect on stress oksidative on periapical lesion in diabetes mellitus model, showed by no significance of MDA metabolite ($p < 0.05$). The treatment of hUCMSCs increase osteoblastogenesis on periapical lesion in diabetes mellitus model, showed by the higher expression of transcription factor Runx2 and Osterix ($p < 0.05$). In this research there was significant difference on bone remodeling of periapical lesion in diabetes mellitus model. Remodeling is a continuous mechanism and form a homeostasis. The treatment of hUCMSCs microscopically give different structure of periapical lesion healing, showing regular and denser pattern with a wider ossification area.

In conclusion, hUCMSCs is one of many stem cell source or MSC which can lower inflammation, increase osteoblastogenesis and remodeling on periapical lesion of animal tooth model with diabetes mellitus.

ABSTRAK**PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP REMODELING TULANG LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS**

Eric Priyo Prasetyo

Latar Belakang: Pada penderita diabetes mellitus, kegagalan perawatan saluran akar sering terjadi. Keadaan klinis yang sering ditemukan berupa lesi periapikal persisten, kegoyangan hingga terlepasnya gigi dari soketnya. Penelitian eksperimental menggunakan *human umbilical cord mesenchymal stem cells* (hUCMSCs) banyak dikembangkan, tetapi pengaruh dan efektivitasnya terhadap lesi periapikal pada kasus diabetes mellitus belum dapat dijelaskan. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan membuktikan pengaruh hUCMSCs dan menjelaskan mekanisme regenerasi lesi periapikal pada kasus diabetes mellitus dengan pemberian hUCMSCs. **Material dan Metode:** Penelitian ini adalah *true experimental* dengan rancangan *post-test only control group design* menggunakan 50 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok 10 ekor, yaitu kelompok kontrol lesi periapikal diabetes mellitus (K0), kelompok kontrol 2 minggu (K1), kelompok kontrol 4 minggu (K2), kelompok perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1), dan kelompok perlakuan hUCMSCs 4 minggu (P2). Semua tikus dikorbankan untuk pemeriksaan histologi dan imunohistokimia. Pemeriksaan IL-1, IL-1ra, MDA, Runx2, Osterix, dan remodeling tulang dilakukan dan dianalisa pada tiap kelompok. **Hasil:** Terdapat perbedaan bermakna pada ekspresi IL-1, IL-1ra, Runx2, Osterix, dan remodeling tulang antara kelompok kontrol dan perlakuan hUCMSCs, tidak terdapat perbedaan jumlah metabolit MDA. **Kesimpulan:** Pemberian hUCMSCs dapat menurunkan inflamasi, meningkatkan osteoblastogenesis, dan meningkatkan remodeling tulang lesi periapikal gigi model diabetes mellitus.

Kata kunci: tali pusat manusia, sel punca mesenkimal, diabetes mellitus, lesi periapikal, perawatan saluran akar.

ABSTRACT**THE EFFECT OF HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS APPLICATION ON DENTAL PERIAPICAL LESION BONE REMODELING IN CASE OF DIABETES MELLITUS**

Eric Priyo Prasetyo

Background: In patients with diabetes mellitus, root canal treatment failures often happen. Clinical symptoms oftenly found are persistent periapical lesions, tooth luxation and tooth loss from the socket. Experimental researches using human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) are in trend, but the influence and effectivity on periapical lesion especially in diabetes mellitus case is not yet explained. **Purpose:** This research aimed to prove the effect of hUCMSCs and explain the mechanism of periapical lesion regeneration in case of diabetes mellitus by the application of hUCMSCs. **Material and Methods:** This research is a true experimental with post-test only control group design using 50 male Wistar rats were divided into 5 groups, each group consists of 10 rats, they are group of periapical lesion with diabetes mellitus control (K0), group of 2 weeks observation control (K1), group of 4 weeks observation control (K2), group of hUCMSCs treatment 2 weeks observation (P1), and group of hUCMSCs treatment 4 weeks observation (P2). All rats were sacrificed for histological and immunohistochemical examination. IL-1, IL-1ra, MDA, Runx2, Osterix, and bone remodeling were done and analyzed on every group. **Results:** Significant differences were found on IL-1, IL-1ra, Runx2, Osterix expressions and bone remodeling between control and hUCMSCs treatment groups, no significant difference on MDA metabolite. **Conclusion:** the application of hUCMSCs can decrease inflammation, increase osteoblastogenesis, and maintain homeostasis of bone remodeling on periapical lesion in diabetes mellitus case.

Keywords: human umbilical cord, mesenchymal stem cells, diabetes mellitus, periapical lesion, root canal treatment.

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN.....	i
SAMPUL DALAM.....	ii
HALAMAN AWAL DISERTASI.....	iii
HALAMAN PRASYARAT GELAR.....	iv
LEMBAR PENGESAHAN.....	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
RINGKASAN.....	xiv
<i>SUMMARY</i>	xvi
ABSTRAK.....	xviii
<i>ABSTRACT</i>	xix
DAFTAR ISI.....	xx
DAFTAR TABEL.....	xxiii
DAFTAR GAMBAR.....	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxv
DAFTAR SINGKATAN.....	xxvi
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	7
1.3 Tujuan.....	8
1.3.1 Tujuan Umum.....	8
1.3.2 Tujuan Khusus.....	8
1.4 Manfaat.....	9
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	9
1.4.2 Manfaat Praktis.....	9
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	10
2.1 Perawatan Endodontik dan Lesi Periapikal.....	10
2.2 Diabetes Mellitus dan Keberhasilan Perawatan Endodontik.....	13
2.3 Keadaan Tulang pada Lesi Periapikal.....	17
2.4. Stem Cell dan Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells	

(hUCMSCs).....	23
2.5 Potensi Aplikasi hUCMSCs untuk Lesi Periapikal.....	25
2.6 Remodeling dan Kualitas Tulang.....	29
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN..	32
3.1 Kerangka Konseptual.....	32
3.2 Hipotesis.....	36
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	37
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	37
4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi.....	38
4.2.1 Unit Eksperimen.....	38
4.2.2 Replikasi.....	39
4.2.3 Pembagian Kelompok Sampel.....	40
4.3 Variabel Penelitian dan Klasifikasi Variabel.....	41
4.3.1 Variabel Bebas.....	41
4.3.2 Variabel Tergantung.....	41
4.3.3 Variabel Antara (Penghubung).....	41
4.3.4 Variabel Terkendali.....	42
4.4 Definisi Operasional Variabel.....	42
4.5 Materi Penelitian dan Instrumen Penelitian.....	44
4.5.1 Materi Penelitian.....	44
4.5.2 Instrumen Penelitian.....	45
4.6 Waktu dan Lokasi Penelitian.....	46
4.7 Prosedur Isolasi, Kultur, dan Karakterisasi hUCMSCs.....	47
4.7.1 Prosedur Isolasi dan Kultur Ekspansi hUCMSCs.....	47
4.7.2 Karakterisasi hUCMSCs.....	50
4.7.3 Pemeriksaan <i>Flow Cytometry</i>	50
4.8 Prosedur Aplikasi hUCMSCs untuk Evaluasi Regenerasi Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Kasus Diabetes Mellitus	51
4.8.1 Pembuatan Tikus Model Diabetes Mellitus.....	51
4.8.2 Pembuatan Lesi Periapikal pada Tikus Model Diabetes Mellitus..	52
4.8.3 Prosedur Persiapan Aplikasi hUCMSCs dengan Pelarut Gelatin..	53
4.8.4 Prosedur Aplikasi hUCMSCs dan Pelarut Gelatin pada Saluran	

Akar Gigi Tikus Diabetes Mellitus (Hiperglikemia).....	54
4.8.5 Terminasi Hewan Coba dan Pengambilan Spesimen Penelitian...55	
4.8.6 Pemrosesan dan Pemeriksaan Spesimen Penelitian.....56	
4.8.7 Pewarnaan dan Pembacaan Hematoxylin Eosin (HE).....57	
4.8.8 Pewarnaan Imunohistokimia.....59	
4.9 Cara Pengelolaan dan Analisis Data.....61	
4.10 Kelaikan Etik.....62	
4.11 Alur Penelitian.....62	
4.12 Model Analisis Jalur hUCMSCs pada Lesi Periapikal Kasus Diabetes.63	
BAB 5 HASIL PENELITIAN.....64	
5.1 Isolasi, Kultur, dan Karakterisasi hUCMSCs64	
5.1.1 Isolasi dan Kultur hUCMSCs.....64	
5.1.2 Karakterisasi hUCMSCs.....65	
5.2 Pengumpulan Data dan Karakteristik Sampel.....65	
5.3 Perbandingan Ekspresi IL-1, IL-1ra, Runx2, Osterix, Hasil Metabolit MDA, dan Remodeling Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus terhadap Pemberian hUCMSCs dengan Waktu Pengamatan 2 Minggu dan 4 Minggu.....66	
5.3.1 Ekspresi IL-1.....66	
5.3.2 Ekspresi IL-1ra.....68	
5.3.3 Hasil Metabolit MDA.....70	
5.3.4 Ekspresi Runx2.....72	
5.3.5 Ekspresi Osterix.....74	
5.3.6 Remodeling Tulang.....76	
5.4 Hasil Analisis Jalur Regenerasi Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus.....79	
BAB 6 PEMBAHASAN.....81	
6.1 Isolasi, Kultur, dan Karakterisasi hUCMSCs83	
6.2 Pemilihan Subjek Penelitian dan Pembuatan Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus84	
6.3 Pemberian hUCMSCs secara Lokal pada Saluran Akar Gigi untuk Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus.....85	

6.3.1 Pemberian hUCMSCs terhadap Inflamasi pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus.....	89
6.3.2 Pemberian hUCMSCs terhadap Stres Oksidatif pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus.....	91
6.3.3 Pemberian hUCMSCs terhadap Osteoblastogenesis, Mineralisasi dan Regenerasi Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus.....	93
6.3.4 Pemberian hUCMSCs terhadap Remodeling Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus.....	96
6.4 Analisis Jalur Mekanisme Regenerasi Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus.....	99
6.5 Keterbaruan Penelitian.....	102
6.6 Keterbatasan Penelitian.....	103
BAB 7 PENUTUP.....	106
7.1 Kesimpulan.....	106
7.2 Saran.....	107
DAFTAR PUSTAKA.....	108
DAFTAR LAMPIRAN.....	125

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Perbandingan ekspresi IL-1 antara kelompok penelitian.....	68
Tabel 5.2 Perbandingan ekspresi IL-1ra antara kelompok penelitian.....	70
Tabel 5.3 Perbandingan hasil metabolit MDA antara kelompok penelitian.....	72
Tabel 5.4 Perbandingan ekspresi Runx2 antara kelompok penelitian.....	74
Tabel 5.5 Perbandingan ekspresi Osterix antara kelompok penelitian.....	76
Tabel 5.6 Perbandingan remodeling tulang antara kelompok penelitian.....	78

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Regulasi sitokin, degradasi matriks dan resorpsi tulang pada jaringan periapikal dan periodontal (Graves, Oates & Garlet, 2011).....	12
Gambar 2.2 Struktur gigi dan periodontal tikus Wistar (Araujo <i>et al.</i> , 2017).....	18
Gambar 2.3 Bagian-bagian tali pusat manusia (Li <i>et al.</i> , 2015).....	25
Gambar 2.4 <i>Extracellular vesicle</i> (EV), <i>Exosomes</i> dan <i>Microvesicle</i> pada MSC MSC (Nooshabadi <i>et al.</i> , 2018).....	29
Gambar 2.5 Aktivitas osteoklas dan osteoblast (Robling, Castillo & Turner, 2006)	31
Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian.....	32
Gambar 4.1 Rancangan penelitian.....	37
Gambar 4.2 Prosedur pembuatan lesi periapikal.....	53
Gambar 4.3 Lesi periapikal yang terbentuk dari induksi LPS pada tikus model diabetes mellitus.....	53
Gambar 4.4 Prosedur aplikasi hUCMSCs dalam saluran akar gigi.....	55
Gambar 4.5 Daerah pengamatan lesi periapikal.....	58
Gambar 4.6 Cara pengambilan data remodeling tulang.....	59
Gambar 4.7 Alur penelitian	63
Gambar 4.8 Analisis jalur hUCMSCS pada lesi periapikal kasus diabetes.....	63
Gambar 5.1 Kultur hUCMSCs, dengan bentuk <i>spindle</i> atau <i>fibroblast-like</i> (Mikroskop inverted, pembesaran 200x).....	64
Gambar 5.2 Pemeriksaan <i>flow cytometry</i> menunjukkan mayoritas subpopulasi mengekspresikan CD73, CD90, CD105, dan negatif PE.....	65
Gambar 5.3 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL-1.....	67
Gambar 5.4 Perbandingan rerata ekspresi IL-1 antar kelompok penelitian.....	68
Gambar 5.5 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL-1ra	69
Gambar 5.6 Perbandingan rerata ekspresi IL-1ra antara kelompok penelitian....	70
Gambar 5.7 Hasil pemeriksaan imunohistokimia hasil metabolit MDA	71
Gambar 5.8 Perbandingan rerata hasil metabolit MDA antara kelompok penelitian.....	72

Gambar 5.9 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Runx2	73
Gambar 5.10 Perbandingan rerata ekspresi Runx2 antara kelompok penelitian...	74
Gambar 5.11 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Osterix	75
Gambar 5.12 Perbandingan rerata ekspresi Osterix antara kelompok penelitian..	76
Gambar 5.13 Hasil pemeriksaan HE pembesaran 40x.....	77
Gambar 5.14 Perbandingan rerata remodeling tulang antara kelompok penelitian.....	78
Gambar 5.15 Mekanisme remodeling tulang lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus dengan perlakuan hUCMSCs 2 minggu.....	79
Gambar 5.16 Mekanisme remodeling tulang lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus dengan perlakuan hUCMSCs 4 minggu.....	80

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Publikasi Penelitian.....	125
Lampiran 2 Uji Kelaikan Etik.....	128
Lampiran 3 Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien (<i>Informed Consent</i>)....	129
Lampiran 4 Statistik Penelitian.....	130
Lampiran 5 Gambar Penelitian.....	153

DAFTAR SINGKATAN

AGE	: <i>Advanced glycation end-product</i>
ALP	: <i>Alkaline phosphatase</i>
ASC	: <i>Adult stem cell</i>
BMMSC	: <i>Bone marrow mesenchymal stem cells</i>
BMP	: <i>Bone morphogenetic protein</i>
CD	: <i>Cluster of differentiation</i>
COL1A1	: <i>Collagen type I alpha 1</i>
COX	: <i>Cyclooxygenase</i>
DAMPs	: <i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DMEM-LG	: <i>Dulbecco's modified Eagle's medium – Low Glucose</i>
DMSO	: <i>Dimethylsulfoxide</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ECGF	: <i>Epithelial cell growth factor</i>
ECM	: <i>Extracellular Matrix</i>
EGF	: <i>Epidermal growth factor</i>
ESC	: <i>Embryonic stem cell</i>
EV	: <i>Extracellular vesicles</i>
FBS	: <i>Fetal bovine serum</i>
FGF	: <i>Fibroblast growth factor</i>
GF	: <i>Growth factor</i>
GIC	: <i>Glass Ionomer Cement</i>
HE	: <i>Hematoxylin eosin</i>
HGF	: <i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF1a	: <i>Hypoxia Inducible Factor 1 alpha</i>
HLA	: <i>Human leucocyte antigen</i>
HPA	: <i>Histopatologi anatomi</i>
HSCs	: <i>Hematopoietic Stem Cells</i>
hUCMSCs	: <i>Human umbilical cord mesenchymal stem cells</i>
IGF	: <i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	: <i>Interleukin</i>

ITD	: <i>Institute of Tropical Disease</i>
JAK	: <i>Janus Kinase</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
M1	: <i>Macrophage 1 (pro inflammatory macrophage)</i>
M2	: <i>Macrophage 2 (anti inflammatory macrophage)</i>
MCSF	: <i>Monocyte Colony Stimulating Factor</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MiRNA	: <i>Micro RNA</i>
MLD	: <i>Multiple Low Dose</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
MSC	: <i>Mesenchymal stem cell</i>
MT1-MMP	: <i>Membrane type 1 matrix metalloproteinase</i>
MYD88	: <i>Myeloid differentiation response protein 88</i>
NFκB	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
OCN	: <i>Osteocalcin</i>
OPG	: <i>Osteoprotegerin</i>
OSX	: <i>Osterix</i>
PAMPs	: <i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	: <i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	: <i>Platelet derived growth factor</i>
RAGE	: <i>Receptor of advanced glycation end-product</i>
RANK	: <i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
RANKL	: <i>Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>
RDC	: <i>Research diagnostic criteria</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
RSUD	: <i>Rumah Sakit Umum Daerah</i>
Runx-2	: <i>Runt-related transcription factor 2</i>
SCRDC	: <i>Stem Cell Research and Development Center</i>
SDF-1	: <i>Stromal Cell Derived Factor 1</i>
SOD	: <i>Superoxide dismutase</i>
STAT	: <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STZ	: <i>Streptozotocin</i>

TIMP	: <i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TGF	: <i>Transforming growth factor</i>
TLR	: <i>Toll like receptor</i>
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>
TRAP	: <i>Tartrate resistant acid phosphatase</i>
UC	: <i>Umbilical cord</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kerusakan yang terjadi pada jaringan keras gigi (enamel, dentin, atau cementum) apabila tidak dirawat sering berlanjut pada daerah periapikal gigi. Proses kerusakan ini berlanjut melalui jaringan pulpa pada saluran akar gigi menuju jaringan periapikal. WHO menyatakan bahwa angka kejadian penyakit gigi dan mulut diseluruh dunia mencapai 36% populasi atau sekitar 2.43 milyar orang mengalami karies pada gigi permanen. Data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan 25.9% dari total penduduk di Indonesia menderita penyakit gigi dan mulut dan sebanyak 68.9% tidak dirawat (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018). Penyakit gigi yang tidak dirawat akan menimbulkan kerusakan pada jaringan periapikal berupa lesi. Lesi periapikal ini secara radiografis berupa penurunan densitas tulang karena tulang pada daerah periapikal tersebut rusak.

Kerusakan gigi yang meluas hingga melibatkan jaringan pulpa dan periapikal memerlukan perawatan endodontik. Perawatan endodontik akan gagal apabila kerusakan terus berlanjut, terjadi resorpsi dan gangguan pada proses remodeling tulang. Angka kegagalan perawatan endodontik berhubungan dengan peradangan pada daerah periapikal. Mikroorganisma aerob dan fakultatif anaerob pada awalnya merupakan mikroorganisma dominan, kadar oksigen dalam saluran akar gigi yang rendah mengakibatkan mikroorganisma anaerob menjadi dominan. Pemeriksaan identifikasi dan kultur

mikrobiologi menunjukkan bahwa mikroorganisma dominan di dalam saluran akar pada gigi yang mengalami nekrosis dengan peradangan periapikal disebabkan terutama oleh bakteri Gram-negatif (Leonardo *et al.*, 2004). Gram negatif khususnya *dark (black) pigmented bacteria (Porphyromonas)* mendapatkan perhatian khusus karena memiliki faktor virulensi dan produk yang bersifat toksik terhadap jaringan pulpa dan periapikal gigi (Cohen & Hargreaves, 2006). Bakteri Gram negatif memiliki endotoksin pada dinding sel. Komposisi endotoksin terdiri dari *polysaccharides (polymerized sugars)*, lipid (*complexes containing fatty acids*) dan protein (Leonardo *et al.*, 2004). Endotoksin disebut juga *lipopolysaccharide (LPS)* berdasarkan struktur kimianya. Beberapa macam LPS dengan berbagai gugus acyl menentukan heterogenitas lipid A. Lipid A merupakan komponen LPS yang paling bioaktif (Dixon & Darveau, 2005; Bainbridge *et al.*, 2008). LPS akan menstimulasi sel makrofag sehingga melepas mediator sitokin osteogenik yang berhubungan dengan resorpsi tulang antara lain IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, dan TNF- α (Sudiana, 2014; Newman, Takei & Carranza, 2002).

Di bidang endodontik, terjadinya diabetes mellitus sering menyebabkan kegagalan perawatan endodontik karena kondisi sistemik ini mengganggu sistim imun tubuh sehingga menghambat proses penyembuhan (Pratha & Jayalakshmi, 2016). Diabetes mellitus dapat meningkatkan prevalensi lesi periapikal, memperluas lesi osteolitik, meningkatkan infeksi asimtomatik (Segura-Egea *et al.*, 2012; Lopez-Lopez *et al.*, 2011). Secara molekuler, hiperglikemia merupakan stimulus resorpsi tulang, menghambat diferensiasi osteoblast dan menurunkan penyembuhan tulang (Marotta *et al.*, 2012),

sehingga penderita diabetes mempunyai kecenderungan untuk kehilangan gigi lebih banyak dibandingkan dengan yang penderita dengan kondisi gula darah normal. Penderita dengan diabetes mellitus akan mengalami peradangan jaringan periodontal dan resorpsi tulang alveolar (Tiburcio-Machado *et al.*, 2017) menimbulkan lesi periapikal persisten (Sanz *et al.*, 2018) dan gigi akan goyang hingga terlepas dari soketnya walaupun telah dilakukan perawatan endodontik (Cabanillas-Balsera *et al.*, 2019). Gigi dan jaringan periapikal yang bermasalah akan menyebabkan gangguan pada sistem pengunyahan sehingga penderita sulit mendapatkan nutrisi yang dibutuhkan untuk menjaga kadar gula dalam darah. Kondisi jaringan periapikal yang sehat sangat penting untuk menunjang keberhasilan perawatan endodontik, terutama pada jaringan tulang yang ditandai dengan remodeling melalui aktivitas osteoblas, osteoklas dan osteosit (Lecka-Czernik, 2017).

Penyakit sistemik yang paling umum dan berhubungan dengan jaringan periapikal adalah diabetes mellitus. Diabetes mellitus merupakan kelainan metabolik dengan karakteristik defisiensi insulin secara relatif atau absolut yang memiliki karakter hiperglikemia. Jumlah penderita diabetes di seluruh dunia diperkirakan meningkat dari 382 juta orang pada tahun 2013 menjadi 592 juta orang pada tahun 2035 (Guariguata *et al.*, 2014).

Indonesia adalah negara dengan jumlah penduduk terbesar keempat di dunia dengan jumlah penderita diabetes yang menempati peringkat ketujuh dunia (Soewondo *et al.*, 2013). Jumlah penderita diabetes di Indonesia diperkirakan akan terus meningkat dari 8,554 juta pada tahun 2013 menjadi 14,152 juta pada tahun 2035 (Guariguata *et al.*, 2014). Pada tahun 2013 proporsi penduduk

Indonesia usia 15 tahun ke atas yang menderita diabetes sebesar 6,9% dan pada tahun 2020 diperkirakan terus meningkat karena manifestasinya mulai terlihat pada usia yang semakin muda (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018). Secara molekuler, hiperglikemia merupakan stimulus resorpsi tulang, menghambat diferensiasi osteoblast dan menurunkan penyembuhan tulang (Marotta *et al.*, 2012). Terapi utama diabetes adalah dengan medikamentosa, termasuk insulin, namun terapi ini hanya bersifat memperlambat untuk menunda komplikasi yang lebih parah, karena itu beberapa penelitian mulai dilakukan dengan memanfaatkan terapi sel menggunakan sel punca untuk regenerasi sel (Stolzinger *et al.*, 2010; Nauth & Schemitsch, 2012).

Stem cell atau sel punca adalah sel yang mempunyai sifat *self renewal* dan plastisitas yang dapat berdiferensiasi serta memperbanyak diri menjadi berbagai macam sel untuk membentuk individu, dapat dieksplorasi dari embryonal maupun dari individu dewasa (*adult stem cell*) yang sudah terlahir (Rantam, Ferdiansyah & Purwati, 2014). Selain mampu melakukan proliferasi, sel punca juga berpotensi menjadi berbagai progenitor yang bisa berdiferensiasi (Minguell, Erices & Conget, 2001). Tubuh manusia memiliki sel punca endogen yang berfungsi untuk meregenerasi dan memperbaiki jaringan, tetapi bila defek yang terjadi luas maka jumlah sel punca endogen tidak cukup untuk meregenerasi jaringan, sehingga diperlukan rekayasa jaringan dengan pemberian sel punca dari luar (Braniak & McDevitt, 2010).

Salah satu sumber *mesenchymal stem cell* (MSC) selain *bone marrow* (BM-MSC) adalah *human umbilical cord mesenchymal stem cell* (hUC-MSC) yang berasal dari jaringan tali pusat yang mengelilingi pembuluh darah. Keunggulan

hUCMSC selain mudah didapatkan, jumlahnya banyak, mudah diperbanyak dengan cepat (Wang *et al.*, 2011) dan memiliki imunokompatibilitas baik, sumber sel punca 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-MS, hUC-MS 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).

Qin *et al.* (2016) melakukan terapi pada ulcer kaki penderita diabetes menggunakan *human umbilical cord mesenchymal stem cells* (hUCMSCs) menunjukkan hasil yang signifikan, aman dan efektif untuk memperbaiki suplai darah dan mempercepat penyembuhan luka, karena pada penderita diabetes umumnya didapatkan jumlah stem cell yang rendah dengan kemampuan proliferasi dan angiogenesis yang rendah sehingga diperlukan MSC dari luar. Penelitian pada tikus yang dilakukan oleh Sun *et al.* (2012) menunjukkan hUCMSCs secara signifikan dapat memperbaiki retinopati diabetikum karena hUCMSCs memiliki efek anti apoptosis dan anti angiogenesis *growth factor* yang dimediasi oleh *growth factor* pro-inflamasi seperti sitokin, kemokin dan VEGF. Penelitian Hendrijantini *et al.* (2015) menunjukkan bahwa hUCMSCs memiliki potensi diferensiasi osteogenik yang baik untuk meningkatkan densitas tulang rahang.

Lesi patologis pada daerah periapikal merupakan peradangan yang sering terjadi dan melibatkan berbagai biomarker (Braz-Silva *et al.*, 2019). Lesi

periapikal pada subyek diabetes mellitus terjadi karena reaksi inflamasi yang disertai resorpsi tulang karena pengaruh sitokin proinflamasi IL-1, baik IL-1a maupun IL-1b sebagai akibat dari aktivasi makrofag (Marton & Kiss, 2014). Pada penderita diabetes, ekspresi IL-1b lebih banyak berpengaruh (Ndip *et al.*, 2016) dan dominan pada lesi periapikal manusia (Cheng *et al.*, 2020). Pada keadaan homeostasis, ekspresi IL-1b yang meningkat akan diseimbangkan oleh IL-1ra. IL-1ra memiliki fungsi sebagai reseptor antagonis kompetitif yang menghambat aktivitas dari IL-1a dan IL-1b (Luz-Crawford *et al.*, 2016).

Diabetes mellitus menyebabkan keadaan stress oksidatif yang tinggi dan diperparah dengan kadar reactive oxygen species (ROS) intraseluler yang tinggi berupa produk akhir malondialdehyde (MDA) yang dapat digunakan sebagai indikator pembentukan lipid peroksidase (Gumasta *et al.*, 2019). MDA secara signifikan meningkat pada penderita diabetes mellitus (Weinberg *et al.*, 2014).

Pada individu normal maupun diabetes mellitus MSC akan melakukan diferensiasi osteogenik sehingga mempengaruhi remodeling tulang, tetapi kualitas MSC endogen pada penderita diabetes mellitus rendah sehingga jarang dipergunakan untuk terapi secara autolog (Mishra *et al.*, 2020). Diferensiasi osteogenik diregulasi oleh faktor transkripsi runt-related transcription factor 2 (Runx2) dan Osterix sehingga terjadi keseimbangan pada remodeling tulang (Perez-Campo *et al.*, 2016). Remodeling tulang membutuhkan keseimbangan yang tepat antara osteoklas dan osteoblast karena ketidakseimbangan yang terjadi menyebabkan kehilangan tulang berlebihan (Rios-Arce *et al.*, 2020).

Pemanfaatan hUCMSCs untuk memperbaiki lesi periapikal gigi akibat induksi LPS pada subyek diabetes mellitus, bagaimana pengaruh dan

mekanismenya masih belum diketahui dan diungkap. Hal ini penting agar perbaikan lesi periapikal pada subyek diabetes mellitus dapat diatasi sehingga kegagalan perawatan endodontik pada kondisi diabetes mellitus dapat ditekan bahkan dihilangkan.

Gambaran terjadinya proses peradangan periapikal dapat diketahui dan diukur melalui indikator ekspresi IL-1, dan IL-1ra sedangkan gambaran osteogenesis dapat diketahui dan diukur melalui beberapa indikator ekspresi Runx2, Osterix, dan remodeling tulang pada daerah periapikal. Gambaran terjadinya stres oksidatif dapat diketahui dan diukur melalui indikator hasil metabolit MDA. Berdasarkan latar belakang tersebut, ditemukan permasalahan yang dapat dirumuskan sebagai berikut.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian hUCMSCs berpengaruh dan bagaimana mekanismenya terhadap remodeling tulang lesi periapikal gigi tikus pada kasus diabetes mellitus dapat diuraikan sebagai berikut:

1. Apakah hUCMSCs dapat menurunkan ekspresi IL-1 pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes?
2. Apakah hUCMSCs dapat menurunkan ekspresi IL-1ra pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes?
3. Apakah hUCMSCs dapat menurunkan hasil metabolit MDA pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes?
4. Apakah hUCMSCs dapat meningkatkan ekspresi Runx2 pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes?

5. Apakah hUCMSCs dapat meningkatkan ekspresi Osterix pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes?
6. Apakah hUCMSCs dapat meningkatkan remodeling tulang pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Menjelaskan pengaruh dan mekanisme perbaikan tulang lesi periapikal gigi pada tikus model diabetes mellitus setelah pemberian hUCMSCs.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan pemberian hUCMSCs dapat menurunkan ekspresi IL-1 pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes
2. Membuktikan pemberian hUCMSCs dapat menurunkan ekspresi IL-1ra pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes
3. Membuktikan pemberian hUCMSCs dapat menurunkan hasil metabolit MDA pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes
4. Membuktikan pemberian hUCMSCs dapat meningkatkan ekspresi Runx2 pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes
5. Membuktikan pemberian hUCMSCs dapat meningkatkan ekspresi Osterix pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes
6. Membuktikan pemberian hUCMSCs dapat meningkatkan remodeling tulang pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian yang didapatkan dari penelitian ini bermanfaat:

1. Memberikan kontribusi ilmiah potensi osteogenik hUCMSCs terhadap lesi periapikal gigi pada kasus diabetes mellitus.
2. Memberikan kontribusi ilmiah mengenai mekanisme regenerasi lesi periapikal gigi pada subyek diabetes akibat induksi LPS setelah pemberian hUCMSCs.
3. Sebagai dasar pengembangan ilmu terhadap penggunaan hUCMSCs pada perawatan endodontik untuk subyek diabetes.
4. Sebagai dasar pengembangan ilmu terhadap penggunaan potensi osteogenik dari hUCMSCs sebagai suatu sumber sel punca dan kemungkinannya untuk kasus diabetes maupun kasus sistemik lainnya.

1.4.2 Manfaat praktis

Hasil penelitian yang didapatkan dari penelitian ini bermanfaat:

1. Sebagai sumber rekayasa jaringan baru melalui potensi osteogenik hUCMSCs.
2. Sebagai dasar pengembangan terapi rekayasa jaringan melalui hUCMSCs pada lesi periapikal gigi subyek diabetes.
3. Sebagai salah satu penunjang terapi endodontik pada subyek diabetes.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perawatan Endodontik dan Lesi Periapikal

Tujuan perawatan dalam bidang endodontik adalah untuk mempertahankan gigi selama mungkin didalam rongga mulut. Secara ideal gigi dalam keadaan utuh dan vital akan tetapi dalam fungsinya dapat mengalami kerusakan pada enamel, dentin, sementum dan pulpa. Kerusakan yang meluas akan berlanjut pada daerah periapikal gigi dan melibatkan jaringan periodontal dan tulang pada daerah periapikal. WHO menyatakan bahwa angka kejadian penyakit gigi dan mulut diseluruh dunia mencapai 36% populasi atau sekitar 2.43 milyar orang mengalami karies pada gigi permanen. Data Kementerian Kesehatan Republik Indonesia menunjukkan 25.9% dari total penduduk di Indonesia menderita penyakit gigi dan mulut dan sebanyak 68.9% tidak dirawat (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018).

Kerusakan gigi dapat disebabkan oleh berbagai hal, salah satunya adalah mikroorganisme. Mikroorganisme dapat menyebabkan iritasi jaringan pulpa dan periapikal. Bila mikroorganisme atau produknya berjalan terus atau intensitasnya meningkat maka akan terjadi inflamasi pulpa yang parah yang kemudian dapat menyebabkan kematian jaringan pulpa dan berlanjut pada peradangan di daerah periapikal (Torabinejad & Walton, 2012). Proses infeksi saluran akar yang berlanjut pada daerah periapikal akan menghasilkan inflamasi lokal, resorpsi jaringan tulang serta kerusakan jaringan periapikal dan akhirnya menyebabkan kelainan pada jaringan periapikal (Nair, 2004). Kerusakan gigi yang meluas hingga melibatkan

jaringan pulpa dan periapikal memerlukan perawatan endodontik. Perawatan endodontik akan gagal apabila kerusakan terus berlanjut, terjadi resorpsi dan gangguan pada proses remodeling tulang.

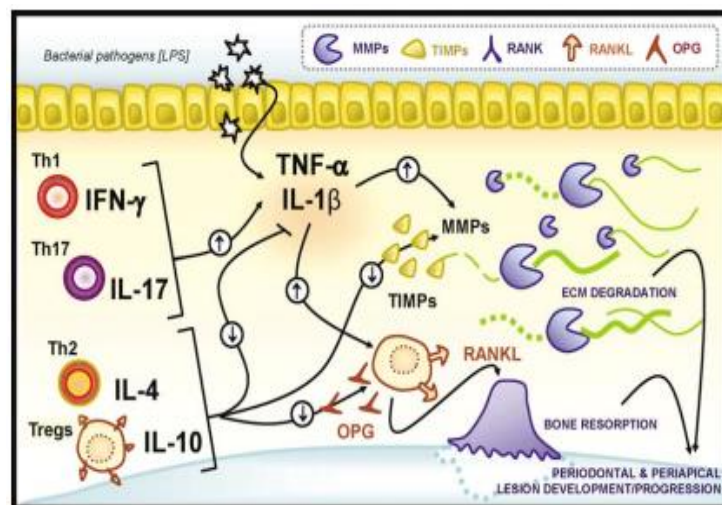
Perawatan saluran akar merupakan salah satu jenis perawatan endodontik, yaitu perawatan pada gigi yang mengalami infeksi atau nekrosis pada jaringan pulpanya agar dapat tetap berfungsi didalam lengkung gigi (Ingle *et al.*, 2008). Perawatan saluran akar secara garis besar dapat dibagi menjadi tiga tahapan yaitu tahap preparasi biomekanik, disinfeksi dan obturasi saluran akar (Grossman *et al.*, 1995). Bidang endodontik telah banyak mengalami perkembangan dalam hal ilmu maupun teknologi.

Angka kegagalan perawatan endodontik berhubungan dengan peradangan pada daerah periapikal. Mikroorganisma aerob dan fakultatif anaerob pada awalnya merupakan mikroorganisma dominan, kadar oksigen dalam saluran akar gigi yang rendah mengakibatkan mikroorganisma anaerob menjadi dominan. Pemeriksaan identifikasi dan kultur mikrobiologi menunjukkan bahwa mikroorganisma dominan di dalam saluran akar pada gigi yang mengalami nekrosis dengan peradangan periapikal disebabkan terutama oleh bakteri Gram-negatif (Leonardo *et al.*, 2004).

Gram negatif khususnya *dark (black) pigmented bacteria* (Porphyromonas) mendapatkan perhatian khusus karena memiliki faktor virulensi dan produk yang bersifat toksik terhadap jaringan pulpa dan periapikal gigi (Cohen & Hargreaves, 2006). Bakteri Gram negatif memiliki endotoksin pada dinding sel. Komposisi endotoksin terdiri dari polisakarida (*polymerized sugars*), lipid (*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 bioaktif (Dixon & Darveau, 2005; Bainbridge *et al.*, 2008). LPS dikenal oleh respon imun innate sebagai salah satu *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs), dan diikat oleh TLR-4 (Hargreaves *et al.*, 2016).

LPS merupakan salah satu inducer makrofag tipe M1 dalam reaksi inflamasi dan respon imun (Geng *et al.*, 2017). LPS akan menstimulasi sel makrofag sehingga melepaskan mediator sitokin osteogenik. Sitokin tersebut berhubungan dengan proses resorpsi tulang melalui mekanisme RANK-RANKL (Graves, Oates & Garlet, 2011) seperti pada gambar 2.1.



Gambar 2.1 Regulasi sitokin, degradasi matriks dan resorpsi tulang pada jaringan periapikal dan periodontal (Graves, Oates & Garlet, 2011).

Toll Like Receptors (TLR) akan terstimulasi oleh LPS, salah satunya yaitu IL-1, baik IL-1a maupun IL-1b (Braz-Silva *et al.*, 2019). Pada penderita diabetes, ekspresi IL-1b banyak berpengaruh (Ndip *et al.*, 2016) dan dominan pada lesi periapikal gigi manusia (Cheng *et al.*, 2020). Ekspresi tersebut dijumpai pada

makrofag (Marton & Kiss, 2014) sebagai respon dari adanya LPS (Park *et al.*, 2016). Makrofag memiliki peranan yang penting dalam regulasi inflamasi dan anti-inflamasi karena makrofag memiliki dua polarisasi fenotip, yaitu makrofag M1 yang pro-inflamasi dan makrofag M2 yang anti-inflamasi (Li *et al.*, 2018).

Sistem imun periapikal terdiri dari jaringan kompleks interaksi antar sel dan molekul regulator, dan sistem ini akan terganggu sehingga jaringan menjadi rusak. Kerusakan ini antara lain disebabkan oleh pelepasan IL-1, TNF, dan Prostaglandin E2 dari monosit, makrofag dan PMN akibat paparan LPS (Newman, Takei & Carranza, 2002). Mediator-mediator host ini memiliki potensi merangsang resorpsi tulang dan mengaktifkan atau menghambat sel-sel imun host yang lain. Kerusakan jaringan periapikal yang banyak atau rekonstruksi yang sedikit akan mengakibatkan timbulnya lesi periapikal.

2.2 Diabetes Mellitus dan Keberhasilan Perawatan Endodontik

Penyakit sistemik yang paling umum dan berhubungan dengan jaringan periapikal adalah diabetes mellitus (DM). Diabetes mellitus merupakan kelainan metabolik dengan karakteristik defisiensi insulin secara relatif atau absolut yang memiliki karakter hiperglikemia. Jumlah penderita diabetes di seluruh dunia diperkirakan meningkat dari 382 juta orang pada tahun 2013 menjadi 592 juta orang pada tahun 2035 (Guariguata *et al.*, 2014).

Indonesia adalah negara dengan jumlah penduduk terbesar keempat di dunia dengan jumlah penderita diabetes yang menempati peringkat ketujuh dunia (Soewondo *et al.*, 2013). Jumlah penderita diabetes di Indonesia diperkirakan akan terus meningkat dari 8,554 juta pada tahun 2013 menjadi 14,152 juta pada tahun

2035 (Guariguata *et al.*, 2014). Pada tahun 2013 proporsi penduduk Indonesia usia 15 tahun keatas yang menderita diabetes sebesar 6,9% dan pada tahun 2020 diperkirakan terus meningkat karena manifestasinya mulai terlihat pada usia yang semakin muda (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018).

Di bidang Endodontik, *evidence base* terjadinya diabetes mellitus sering menyebabkan kegagalan perawatan endodontik karena kondisi sistemik ini mengganggu sistim imun tubuh sehingga menghambat proses penyembuhan (Pratha & Jayalakshmi, 2016). Diabetes mellitus dapat meningkatkan prevalensi lesi periapikal, memperluas lesi osteolitik, meningkatkan infeksi asimptomatik (Segura-Egea *et al.*, 2012). Secara molekuler, hiperglikemia merupakan stimulus resorpsi tulang, menghambat diferensiasi osteoblast dan menurunkan penyembuhan tulang (Marotta *et al.*, 2012), selain itu kualitas tulang yang rendah sering menjadi kendala pada penderita diabetes mellitus, baik tipe 1 maupun tipe 2.

Kualitas vaskularisasi tulang, *niche* dan *stem cell* endogen yang buruk pada area yang terlibat maupun pada sumsum tulang belakang penderita diabetes menyebabkan penyembuhan tulang tertunda dan tidak sempurna (Lecka-Czernik, 2017; Mishra *et al.*, 2020), sehingga penderita diabetes mempunyai kecenderungan untuk kehilangan gigi lebih banyak dibandingkan dengan yang penderita dengan kondisi gula darah normal (Sanz *et al.*, 2018) walaupun telah dilakukan perawatan saluran akar (Cabanillas-Balsera *et al.*, 2019). Gigi dan jaringan periapikal yang bermasalah akan menyebabkan gangguan pada sistem pengunyahan sehingga penderita sulit mendapatkan nutrisi yang dibutuhkan untuk menjaga kadar gula darah. Kondisi jaringan periapikal yang sehat sangat penting untuk menunjang keberhasilan perawatan endodontik.

Diabetes mellitus merupakan penyakit sistemik yang ditandai oleh kondisi hiperglikemia atau tingginya kadar gula darah, yang dikelompokkan menjadi dua macam yaitu diabetes mellitus tipe 1 dan tipe 2 (Jameson, 2013; Molina, 2013). Diabetes mellitus tipe 1 timbul sebagai akibat ketidakseimbangan sekresi insulin karena kerusakan sel beta pada pancreas dan menduduki 5%-10% dari seluruh kasus diabetes, sedangkan diabetes mellitus tipe 2 timbul sebagai akibat resistensi insulin karena ekspresi glukosa transporter 2 yang tidak mencukupi dan menduduki 85%-90% dari seluruh kasus diabetes (Mealey & Oates, 2006). Kedua tipe diabetes ini memiliki peran sama dalam hubungan sebagai penanda inflamasi sistemik dan kerentanan terhadap infeksi (Marotta *et al.*, 2012). Pada kondisi diabetes mellitus terjadi resorpsi tulang berlebihan, penurunan jumlah dan fungsi osteoblast, ekspresi *bone morphogenetic protein* dan *fibroblast growth factor* yang rendah sehingga pembentukan tulang terganggu (Catalfarno *et al.*, 2013).

Pada penderita yang mengalami hiperglikemia terus menerus akan terbentuk *advanced glycation end-product* (AGE) yang merupakan protein dengan kandungan karbohidrat yang stabil. AGE dapat terbentuk pada kolagen, komponen utama matriks ekstraseluler pada seluruh tubuh. Pada pembuluh darah, AGE menumpuk dan menyebabkan penebalan dinding pembuluh darah, menyempitkan lumen pembuluh darah, dan mengganggu homeostasis. Pada tulang, AGE yang menumpuk akan mempengaruhi kolagen tipe I karena proses cross-linking kimia yang terjadi karena kadar gula “*free floating*” dalam serum yang tinggi menyebabkan kolagen termodifikasi, sehingga struktur tulang menjadi terganggu, karena akumulasi AGE dalam tulang dan pembentukan intra dan inter *cross-link*

dalam serabut-serabut kolagen menurunkan kualitas biomekanis tulang (Lecka-Czernik, 2017).

AGE memiliki pengaruh signifikan pada level seluler dan memiliki reseptor *advanced glycation end-product* (RAGE) pada permukaan sel otot halus, endotel, neuron, monosit dan makrofag. Interaksi AGE dan RAGE pada permukaan sel monosit akan meningkatkan stress oksidatif seluler dan mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor kappa B* (NFkB), sehingga mempengaruhi fenotipe monosit / makrofag dan meningkatkan produksi sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti interleukin-1 (IL-1 β) dan tumor necrosis factor (TNF α) (Mealey & Ocampo, 2007).

Pada penderita diabetes juga terjadi peningkatan *tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP) yang merupakan indikator aktivitas osteoklas, selain itu terjadi penurunan aktivitas *alkaline phosphatase* (ALP) sehingga tulang baru sulit terbentuk. (Wu, Xiao, & Graves, 2015). Kadar AGE yang tinggi pada kondisi diabetes meningkatkan stres oksidatif pada sel. Stres oksidatif terjadi apabila rasio Reactive Oxygen Species (ROS) lebih besar dari anti ROS. Peningkatan stress oksidatif dan AGE mengakibatkan kondisi inflamasi yang terus menerus pada sel-sel dalam jaringan terlibat, makrofag dan PMN, sehingga reaksi inflamasi akan menjadi lebih parah dan berlebihan (Cintra *et al.*, 2014).

Reactive Oxygen Species (ROS) didalam sel jika berlebihan akan bereaksi dengan sistem membran membentuk suatu bahan yang toksik salah satunya yaitu malondialdehyde (MDA), sehingga sel akan mengalami kerusakan atau lisis (Sudiana, 2017). Debris sel-sel yang rusak, dikenal sebagai *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs), akan memicu inflamasi dan seterusnya sehingga

proses inflamasi berjalan terus menerus. Pada penderita diabetes mellitus ditemukan metabolit MDA yang meningkat signifikan (Weinberg *et al.*, 2014) dan metabolit MDA yang meningkat pada sel menandakan adanya peningkatan degenerasi pada sel tersebut (Gumasta *et al.*, 2019).

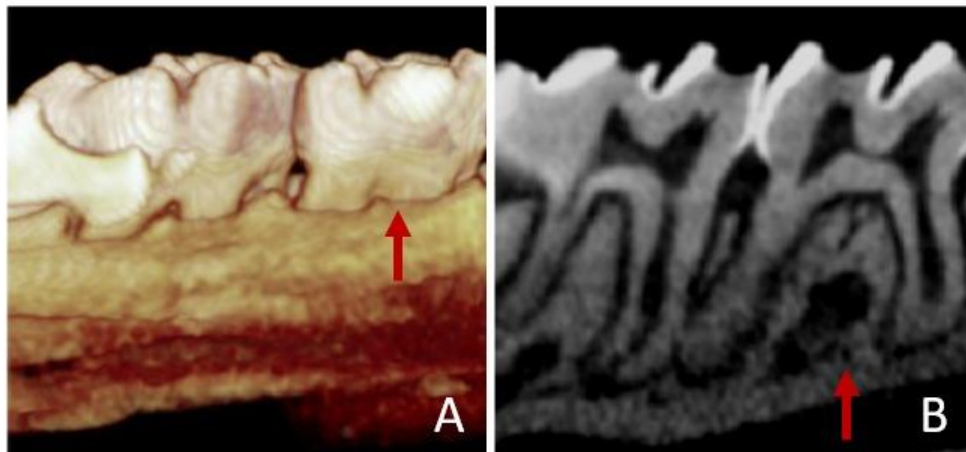
Hewan coba tikus telah banyak dipakai untuk model preklinis, dan merupakan hewan coba pilihan untuk mempelajari mekanisme diabetes secara *in vivo* karena tikus model diabetes dapat menyajikan keadaan hiperglikemia, karakteristik dan komplikasi yang serupa dengan diabetes yang terjadi pada manusia (Epstein *et al.*, 2016). Hal utama dalam hewan coba diabetes yaitu dapat menggambarkan patologi diabetes mellitus, baik Diabetes tipe 1 maupun tipe 2. Diabetes tipe 1 maupun tipe 2 dapat dibuat pada tikus dengan cara diinduksi secara farmakologis, hasilnya dapat menggambarkan kehilangan tulang seperti pada manusia, misalnya dengan *streptozotocin* (Purwanto & Liben, 2014). Gigi dan rahang tikus sering dipergunakan untuk penelitian karena memiliki struktur anatomi jaringan pulpa dan periapikal yang menyerupai manusia (Prieto *et al.*, 2017) dan dapat memberikan gambaran klinis terjadinya kerusakan pada daerah periapikal (Wolle *et al.*, 2013).

2.3 Keadaan Tulang pada Lesi Periapikal

Inflamasi pada jaringan periapikal terjadi paling awal 3 hari setelah invasi bakteri pada jaringan pulpa dan terjadi sebelum keseluruhan jaringan pulpa mengalami nekrosis. Inflamasi ini melibatkan influx PMN dan monosit. Respon periapikal ini merupakan respon imun untuk membendung infeksi dan memiliki ciri seluler yang mirip dengan infeksi pada jaringan pulpa seperti makrofag, PMN,

limfosit T, limfosit B, eosinophil, sel mast, sel NK dan sel plasma. Sel-sel non inflamatori juga terdapat pada lesi periapikal seperti fibroblas, osteoblas, osteoklas, epitel dan endotel vaskuler (Cohen & Hargreaves, 2006).

Model hewan coba tikus telah banyak digunakan untuk mereplikasi infeksi periapikal pada manusia, untuk mempelajari kinetika respon seluler dan imunopatologi inflamasi lesi periapikal manusia (Allahem, 2016). Struktur gigi dan jaringan periodontal tikus Wistar ditunjukkan pada gambar 2.2. Nekrosis pulpa akan mulai terjadi pada hari ke 2 diikuti destruksi tulang parah pada daerah periapikal antara hari ke 7 dan 20 (fase aktif) setelah itu resorpsi tulang akan stabil (fase kronis). Resorpsi tulang pada lesi periapikal dapat dipicu oleh lipopolisakarida (LPS), akan tetapi aktivitas resorpsi tulang lebih banyak disebabkan oleh faktor aktivitas sitokin (Allahem, 2016).



Gambar 2.2 Struktur gigi dan periodontal tikus Wistar (Araujo *et al.*, 2017). Bentuk anatomi mahkota gigi dan tulang mandibula tikus (A), Gambaran radiografis gigi, pulpa dan jaringan periodontal tikus (B), Gigi molar pertama rahang bawah kanan ditunjukkan oleh tanda panah.

Pada hewan coba tikus, resorpsi tulang lesi periapikal berhubungan dengan peningkatan ekspresi RANKL pada perkembangan lesi, menunjukkan peran RANKL pada diferensiasi osteoklas, selain itu peningkatan sitokin-sitokin IL-1a, IL-1b, dan TNF-a merangsang pembentukan dan fungsi osteoklas, sehingga menimbulkan efek sinergistik dengan RANKL (Graves, Oates & Garlet, 2011). Sitokin Interleukin-6 (IL-6) merupakan modulator imunitas dan sitokin proinflamasi, diproduksi dalam oleh tulang melalui stimulasi IL-1 dan TNF, akan tetapi IL-6 ini memiliki efek feedback negative terhadap IL-1 pada daerah periapikal (Allahem, 2016). Keseimbangan antara IL-1 dan IL-1ra memiliki peran penting dalam kalsifikasi dan remodeling tulang. IL-1ra akan menghambat resorpsi yang dipicu oleh IL-1 (Arend, 2002). IL-1ra memiliki fungsi sebagai reseptor antagonis kompetitif yang menghambat aktivitas dari IL-1a dan IL-1b (Luz-Crawford *et al.*, 2016).

Matrix Metalloproteinase (MMP) merupakan kelompok endopeptidase yang aktivitasnya tergantung pada zinc dan degradasi matriks protein ekstraseluler. MMP merupakan salah satu faktor kunci pada kerusakan jaringan yang tidak terkendali pada beberapa penyakit inflamasi, salah satunya yaitu pada periodontitis. MMP diklasifikasikan menjadi beberapa sub grup berdasarkan spesifisitas substratnya. Kolagenase (MMP-1 dan MMP-8) dan gelatinase (MMP-2 dan MMP-9) berpengaruh penting dalam proses penyembuhan. Makrofag dan PMN mengeluarkan beberapa MMP antara lain kolagenase (MMP-1, MMP-8 dan MMP-13) dan gelatinase (MMP-2 dan MMP-9) (Franco *et al.*, 2017).

Aktivitas MMP dihambat oleh *Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases* (TIMPs), terdapat 4 macam TIMP, semuanya dapat

menghambat MMP, namun TIMP-1 memiliki afinitas yang lebih tinggi untuk MMP-1 dan MMP-9, dan TIMP-2 untuk MMP-2 dan MMP-8. Pada proses penyembuhan normal kadar MMP akan menurun, tetapi pada peradangan kronis kadar proteinase dan sitokin pro-inflamasi (TNF α dan IL-1) meningkat secara signifikan, kadar *growth factor* menurun, aktivitas kolagenase dan gelatinase meningkat dan kadar TIMP-1 menurun (Muller *et al.*, 2007).

MMP-8 banyak didapatkan pada lesi periapikal, sedangkan MMP-9 banyak didapatkan pada peradangan pulpa (Tjaderhane *et al.*, 2007). Pada keadaan peradangan periodontal MMP-8 dapat diekspresikan oleh epitel, fibroblas, odontoblas, monosit/makrofag dan plasma sel, sedangkan MMP-9 diekspresikan oleh keratinosit, osteoklas, neutrofil, eosinofil dan makrofag (Sorsa *et al.*, 2006).

Ekspresi dan aktivitas MMP pada jaringan dewasa pada umumnya rendah tetapi akan meningkat signifikan jika terjadi proses patologis destruktif seperti inflamasi dan lesi-lesi kerusakan tulang. MMP-1 (collagenase-1), MMP-8 (collagenase-2) dan MMP-13 (collagenase-3) merupakan subfamily kolagenase yang dapat mendegradasi kolagen fibril tipe I, II, III, V, IX. MMP-1 merupakan yang paling efisien merusak kolagen tipe III pada remodeling jaringan, disintesa dan disekresi oleh fibroblas dan makrofag, selain itu juga diproduksi oleh sel-sel lain seperti osteoblas dan odontoklas (Jain & Bahuguna, 2015).

MMP-8 paling efektif dalam mengawali degradasi degradasi kolagen tipe I. Sumber dari MMP-8 adalah dari sel PMN, sehingga memiliki peran kunci dalam kerusakan jaringan pada penyakit inflamasi. MMP-13 terekspresi pada kondisi patologis yang berhubungan dengan degradasi berlebihan matriks ekstraseluler selama proses inflamasi kronis. Pada kondisi normal degradasi dan sintesis

komponen matriks ekstraseluler dalam keadaan seimbang, sehingga MMP ini diekspresi pada kadar yang sangat rendah. Ketika diperlukan remodeling jaringan, produksi dan aktivasi MMP akan meningkat tajam. MMP memiliki peran penting dalam pembentukan lesi periapikal karena penghambatan MMP akan memperluas lesi secara signifikan. MMP terlibat dalam reaksi pertahanan terhadap mikroba yang ada di dalam pulpa atau daerah periapikal dan peningkatan lesi menunjukkan infeksi yang lebih parah (Tjaderhane *et al.*, 2007).

Infeksi bakteri pada sistem saluran akar merupakan salah satu proses yang menunjukkan peran MMP pada degradasi kolagen periodontitis apikal. Pada kasus periodontitis apikal, mikroorganisme persisten pasca perawatan saluran akar berhubungan dengan timbulnya kerusakan jaringan parah dan peningkatan MMP pada daerah periapikal. Ekspresi MMP pada periodontitis apikal telah dibuktikan oleh banyak penelitian. Kolagenase interstitial (MMP-1) merupakan enzim kunci pada inisiasi resorpsi tulang pada lesi periapikal. MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 dan MMP-13 merupakan matrix metalloproteinase lain yang ditemukan pada lesi periapikal (Jain & Bahuguna, 2015).

Pada periodontitis apikal kronis MMP-8 dapat dideteksi secara imunohistokimia pada netrofil polymorphonuclear, makrofag dan sel plasma. Reaksi pada lesi periapikal memiliki proses yang kompleks, melibatkan bakteri dan produknya, immunoglobulin, sitokin proinflamasi, dan mediator inflamasi lain yang saling mempengaruhi satu dengan yang lain. PMN sebagai barrier seluler pertama terhadap invasi bakteri, selain menghancurkan bakteri juga menghancurkan jaringan disekitarnya dengan mensekresikan MMP terutama MMP-8. Sel plasma yang masuk ke dalam jaringan inflamasi setelah PMN, akan

mensekresikan immunoglobulin dan mengekspresikan MMP-8 dan MMP-13. Makrofag sebagai sel inflamasi utama pada periodontitis apikal kronis, berpartisipasi dalam aktivasi PMN dan limfosit. Makrofag merupakan sumber utama IL-1 dan TNF (Franco *et al.*, 2017).

Reaktivitas MMP-1, MMP-2, dan MMP-3 terdapat pada sel plasma, limfosit dan makrofag yang terdapat pada lesi periapikal. Monosit / makrofag mengekspresikan MMP-8 dan MMP-13, kedua MMP ini bekerja pada proses intraseluler (proses fagositik) dan ekstraseluler (proses kerusakan jaringan). Osteoklas memiliki kecenderungan menghilangkan tulang pada tepi lesi periapikal, sebagian karena MMP, terutama MMP-9 yang disekresi oleh osteoklas. MMP yang disekresi oleh sel lain selain osteoklas pada periodontitis apikal kronis bertanggungjawab terhadap degradasi matriks ekstraseluler dan produk buangan yang timbul setelah disolusi tulang oleh osteoklas selama pembentukan lesi periapikal (Jain & Bahuguna, 2015).

Proses inflamasi dan destruksi jaringan pada lesi periapikal menggambarkan fenomena yang terjadi pada periodontitis yang disebabkan oleh bakteri. Bakteri merangsang pelepasan dan aktivasi MMP oleh sel PMN. Sebagai tambahan dari mekanisme kerusakan tulang lain yaitu MMP mengeluarkan peran destruksi pada periodontitis apikal kronis. Tujuan perawatan saluran akar adalah menghilangkan bakteri, faktor virulensi dan toksin, bersama reaksi inflamasi pada daerah periapikal. Jika bakteri dan produknya telah hilang proses inflamasi dan sel-sel inflamasi hilang (Hargreaves, Berman & Rotstein, 2016).

2.4 Stem Cell dan Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUCMSCs)

Stem cell atau sel punca adalah sel yang mempunyai sifat *self renewal* dan plastisitas yang dapat berdiferensiasi serta memperbanyak diri menjadi berbagai macam sel untuk membentuk individu, dapat dieksplorasi dari embryonal maupun dari individu dewasa (*adult stem cell*) yang sudah terlahir (Rantam, Ferdiansyah & Purwati, 2014). Sel punca dapat berasal dari autogenous maupun allogenuous.

Selain mampu melakukan proliferasi, sel punca juga berpotensi menjadi berbagai progenitor yang bisa berdiferensiasi (Minguell, Erices & Conget, 2001). Tubuh manusia memiliki sel punca endogen yang berfungsi untuk meregenerasi dan memperbaiki jaringan, tetapi bila defek yang terjadi luas maka jumlah sel punca endogen tidak cukup untuk meregenerasi jaringan, sehingga diperlukan rekayasa jaringan dengan pemberian sel punca dari luar (Braniak & McDevitt, 2010).

MSC memiliki keunggulan yaitu tidak terpengaruh (resisten) terhadap efek toksik dari kadar glukosa tinggi. Pada penelitian *in vitro* yang dilakukan hingga 4 minggu, MSC resisten terhadap konsentrasi glukosa hingga 40mM, pada kondisi ini tidak terjadi apoptosis dan sebaliknya lebih meningkatkan proliferasi dan diferensiasi osteogenik (Li *et al.*, 2007).

Pada proses osteoblastogenesis, MSC akan berdiferensiasi menjadi osteoblas. Diferensiasi ini diregulasi oleh faktor transkripsi runt-related transcription factor 2 (Runx2) dan Osterix (Perez-Campo *et al.*, 2016). Diferensiasi osteoblast memiliki peran yang penting dalam pembentukan tulang dan menjaga homeostasis remodeling tulang (Hou *et al.*, 2019). Runx2 merupakan faktor transkripsi yang penting dalam meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam

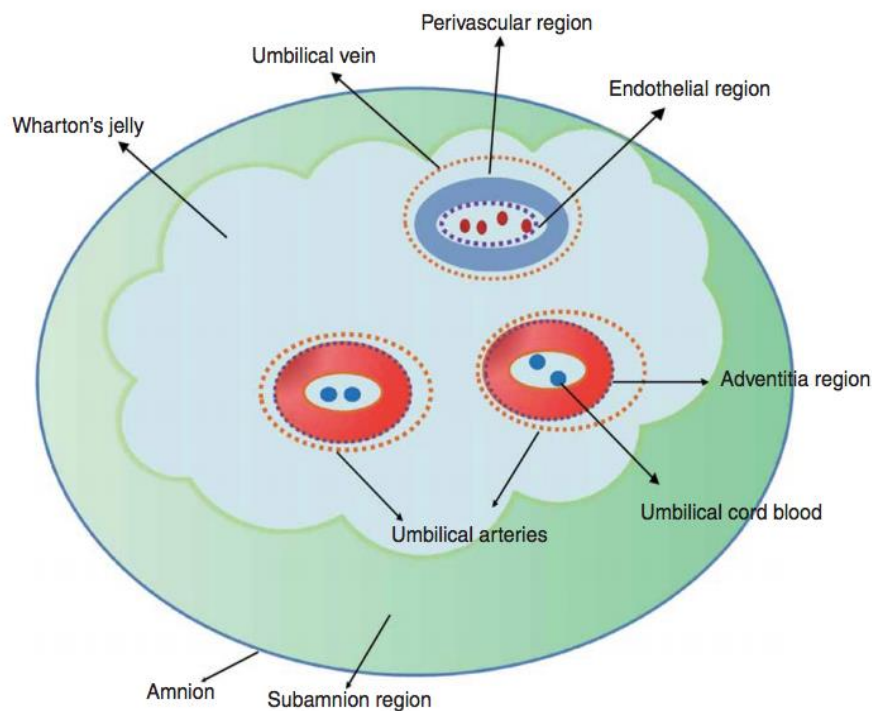
diferensiasi seluler maupun siklus sel yang menginduksi MSC menjadi jalur osteogenic (Artigas *et al.*, 2014).

Osterix merupakan faktor transkripsi spesifik dari osteoblas yang dibutuhkan untuk menginduksi diferensiasi preosteoblas supaya berdiferensiasi menjadi osteoblas fungsional yang matur (Kim *et al.*, 2015). Pada penderita diabetes mellitus ekspresi osterix ditemukan sangat rendah (Miranda *et al.*, 2016) sedangkan pada individu normal, osterix diekspresikan tinggi pada sel-sel osteogenik pada daerah periapikal tulang alveolar (Takimoto *et al.*, 2015).

Salah satu sumber *mesenchymal stem cell* (MSC) selain *bone marrow* (BM-MSC) adalah *human umbilical cord mesenchymal stem cell* (hUCMSC) yang berasal dari jaringan tali pusat yang mengelilingi pembuluh darah. Sumber hUCMSCs ini menjadi pilihan dibandingkan BM-MSC karena proses pengambilan MSC dari *bone marrow* yang sangat kompleks, menimbulkan nyeri dan invasif (Ding *et al.*, 2015). Keunggulan hUCMSC selain mudah didapatkan, jumlahnya banyak, mudah diperbanyak dengan cepat (Wang *et al.*, 2011) dan memiliki imunokompatibilitas baik, sumber sel punca ini merupakan limbah biologis yang dibuang atau tidak terpakai sehingga tidak menimbulkan masalah etik (Lindenmair *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2016). Bagian-bagian tali pusat manusia dapat dilihat pada gambar 2.3.

Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) memiliki morfologi yang serupa dengan fibroblast dan bersifat multipoten, dapat berproliferasi cepat dan memiliki doubling time lebih banyak dibandingkan sel punca dewasa, sehingga sel punca tersebut dapat diperbanyak dalam waktu singkat (Tan *et al.*, 2015). Sel punca ini memiliki penanda imunofenotipe positif

mesenkimal (CD 73, CD90, CD105), positif marker matrix (CD44), positif marker makrofag (CD68), positif marker integrin (CD29, CD51), positif faktor transkripsi stem sel embrionik Oct-4, Nanog, Sox-2, positif CD106, positif HLA-G, dan penanda negatif pada marker hematopoietik (CD14, CD133, CD45, CD34), negatif pada marker sel endotel (CD31), negative pada HLA-DR (Li *et al.*, 2015).



Gambar 2.3 Bagian-bagian tali pusat manusia (Li *et al.*, 2015).

2.5 Potensi Aplikasi hUCMSCs untuk Lesi Periapikal

Qin *et al.* (2016) melakukan terapi pada ulcer kaki penderita diabetes menggunakan *human umbilical cord mesenchymal stem cells* (hUCMSCs) menunjukkan hasil yang signifikan, aman dan efektif untuk memperbaiki suplai darah dan mempercepat penyembuhan luka, walaupun pada penderita diabetes umumnya didapatkan jumlah stem cell yang rendah dengan kemampuan proliferasi

dan angiogenesis yang rendah. Penelitian pada tikus yang dilakukan oleh Sun *et al.* (2012) menunjukkan hUCMSCs secara signifikan dapat memperbaiki retinopati diabetikum karena hUCMSCs memiliki efek anti apoptosis dan anti angiogenesis *growth factor* yang dimediasi oleh *growth factor* pro-inflamasi seperti sitokin, kemokin dan VEGF. Bila dibandingkan dengan BM-MS, hUC-MS 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).

Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUCMSCs), sebagai salah satu sumber MSC, merupakan sumber stem cell yang diambil dari tali pusat, dapat berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel jalur mesenkimal, seperti tulang, kartilago, adipose, otot dan tendon. Selain itu dapat berdiferensiasi menjadi sel-sel mesodermal, endodermal, dan ektodermal secara *in vitro*.

Stem cell ini dapat bergerak menuju area inflamasi atau jaringan yang rusak kemudian berdiferensiasi untuk menggantikan sel-sel yang rusak. Selain itu *stem cell* juga mensekresikan faktor-faktor bioaktif seperti berbagai *growth factor* dan sitokin, dapat melakukan regulasi parakrin, termasuk mengaktifkan stem sel endogen, apoptosis, stimulasi vaskuler dan menghambat inflamasi (Bunnell, Betancourt & Sullivan, 2010).

Berdasarkan penelitian Geng *et al.* (2017), MSC memiliki potensi untuk menghambat aktivitas makrofag M1, juga menginduksi polarisasi fenotip makrofag M1 sehingga menjadi makrofag fenotip M2, untuk kemudian mengaktifkan fungsi makrofag M2 sehingga dapat mengontrol reaksi inflamasi. MSC juga memiliki

fungsi restoratif dan immunosupresif baik melalui kontak antar sel maupun secara parakrin melalui faktor-faktor yang disekresinya, seperti molekul-molekul dan sitokin-sitokin immunosupresif antara lain seperti adenosin, NO, PGE-2, IL-10, TGF β , dan *extracellular vesicles* (Monguio-Tortajada *et al.*, 2017).

Inflamasi pada jaringan periapikal menyebabkan hUCMSC migrasi ke daerah radang melewati berbagai membran basal sehingga secara kontinyu mengekspresikan MMP-2, *Membran Type 1 Matrix Metalloproteinase* (MT1-MMP) dan Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 2 (TIMP-2), sedangkan kemokin *Stromal cell derived factor 1* (SDF-1) akan mendorong potensi kemoatraktif dan menginduksi perjalanan sel MSC melewati berbagai *barrier* matriks ekstraseluler dengan meningkatkan regulasi MMP-2, MT1-MMP dan menghambatnya dengan TIMP-2. TIMP-2 dan MT1-MMP akan membentuk *trimolecular complex* dengan pre MMP-2 sehingga menghasilkan MMP-2 yang aktif (Ries *et al.*, 2007).

Pada regenerasi jaringan periodontal, diferensiasi MSC memerlukan perantara signal seperti *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *transforming growth factor* β 1 (TGF- β 1), dan *hepatocyte growth factor* (HGF) untuk menurunkan inflamasi dan merangsang regenerasi. TNF α tidak memiliki efek langsung terhadap proliferasi atau siklus sel MSC, tetapi dapat meningkatkan mineralisasi matriks ekstraseluler dan meningkatkan ekspresi mineralization related genes seperti *bone morphogenic protein 2* (BMP2), *alkaline phosphatase* (ALP), *runt-related transcription factor 2* (Runx2), dan *collagen I* (COL-1) melalui jalur NF κ B selama proses diferensiasi osteogenik (Hernandez-Monjaraz *et al.*, 2018).

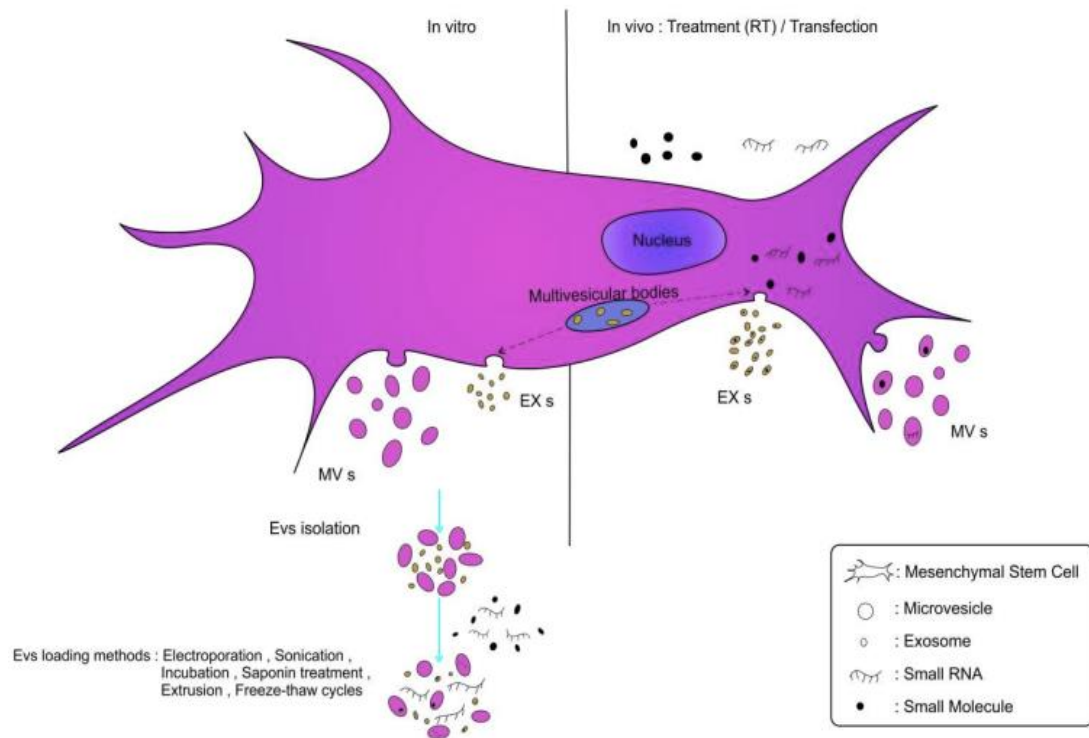
IGF-1 akan merangsang sintesis kolagen pada fibroblas dan diferensiasi osteoblas melalui jalur mTOR dan menstimulasi Runx2 dan produksi osteocalcin. Osteocalcin juga distimulasi oleh IL-6, dengan adanya osteocalcin maka akan merangsang produksi ligand-ligand BMP2 dan Runx2 agar osteoblas mensintesis matriks ekstraseluler, selain itu ada faktor lain yang penting dalam regenerasi periodontal yaitu MMP dan inhibitorynya (TIMP).

Pemberian MSC akan menurunkan ekspresi MMP-1 dan MMP-8 tetapi akan meningkatkan TIMP-2 dan TIMP-4 sehingga terjadi remodeling optimal. IL-6 akan menginduksi diferensiasi MSC menjadi preosteoblas karena IL-6 berhubungan dengan produksi ALP yang diperlukan dalam pembentukan nodul-nodul osteogenik, meningkatkan mineralisasi matriks ekstraseluler, dan meningkatkan ekspresi gen-gen yang berhubungan dengan osteogenesis menggunakan jalur signaling JAK3/STAT3 (Hernandez-Monjaraz *et al.*, 2018).

hUCMSCs, seperti MSC yang lain, memiliki *Extracellular Vesicles* (EV) yang berperan penting dalam regenerasi jaringan, imunomodulasi dan terapi. EV merupakan vesikel membran yang secara alami disekresi dalam bentuk *exosomes*, *microvesicle* dan *apoptotic bodies* (Nooshabadi *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2017). *Extracellular Vesicles* memiliki kapasitas untuk transfer protein, lipid dan asam nukleat, dapat mempengaruhi berbagai fungsi fisiologis dan patologis sel. *Exosomes* merupakan *carrier* berbagai macam micro-RNA (miRNA) dan berguna untuk target molekuler (Samanta *et al.*, 2017). Ilustrasi *Extracellular vesicles*, *Microvesicles* dan *Exosomes* dapat dilihat pada gambar 2.4.

Penelitian terbaru dari Chile berhasil membuktikan terapi sel alogenik dengan pemanfaatan hUCMSCs dan scaffold platelet poor plasma untuk

menghidupkan kembali pulpa gigi pada manusia (Cordero *et al.*, 2021). Kelompok peneliti ini telah berhasil melakukan penelitian klinis terapi tersebut pada 36 penderita menggunakan hUCMSCs (Brizuela *et al.*, 2021). Pesatnya penelitian dari seluruh dunia menciptakan kompetisi yang tinggi dalam pengembangan sel punca.



Gambar 2.4 *Extracellular vesicle (EV), Exosomes dan Microvesicle* pada MSC (Nooshabadi *et al.*, 2018).

2.6 Remodeling dan Kualitas Tulang

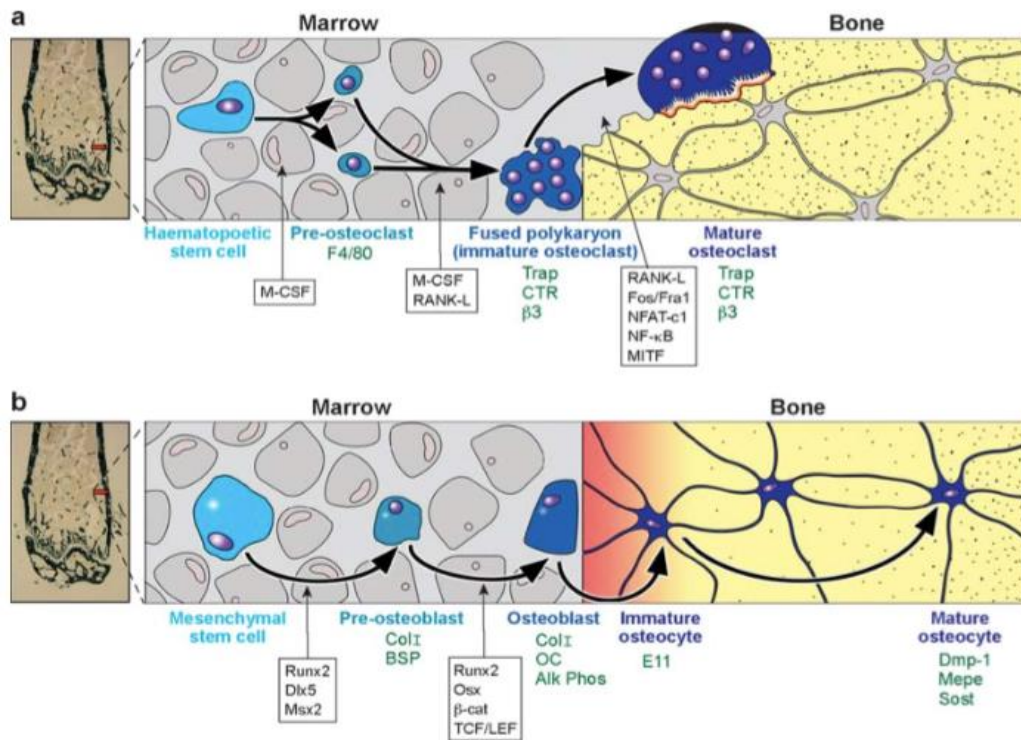
Remodeling tulang merupakan proses yang terus menerus terjadi, berupa penggantian tulang yang lama atau rusak digantikan dengan tulang yang baru, dan terjadi secara kontinyu melibatkan osteoklas dan osteoblas (Cavalla *et al.*, 2021). Proses ini diperlukan untuk menjaga kekuatan dan homeostasis mineral tulang.

Remodeling tulang ditentukan oleh osteoklas dan osteoblas (Robling, Castillo & Turner, 2006), dan dipengaruhi oleh beberapa mediator seperti RANK, Osteoprotegerin, dan Parakrin (Kini & Nandesh, 2012).

Perkembangan tulang dan remodeling tulang bergantung pada aktivitas osteoblas yang berasal dari MSC. Maturasi osteochondroprogenitor dan perubahan preosteoblas menjadi osteoblas yang matur dikendalikan oleh kompleks faktor-faktor transkripsi yang diaktifkan oleh signal-signal osteogenik spesifik. Runx2 dan Osterix (Osx) merupakan dua faktor transkripsi yang memiliki peran utama dalam osteogenesis. Kedua faktor ini harus ada untuk menghasilkan osteoblas yang matur dan membentuk tulang.

Runx2 mengatur ekspresi berbagai gen osteoblastik seperti *Osx*, *Alpl* (alkaline phosphatase), *Col1a1* (kolagen tipe 1), *Spp1* (osteopontin), *Ibsp* (bone sialoprotein), *MMP13* (matrix metalloproteinase 13), dan *Bglap* (osteocalcin). Hampir semua gen promoter ini juga diregulasi oleh *Osx*, dan *Osx* dapat mengatur ekspresinya sendiri (Artigas *et al.*, 2014).

Kualitas tulang berhubungan dengan jumlah tulang kortikal dan cancellous pada tulang alveolar. Secara klinis penyembuhan tulang dapat dilihat dengan membandingkan luas area penulangan (osifikasi). Remodeling dan kualitas tulang merupakan faktor penting yang mengakibatkan terjadi lesi periapikal yang ditandai dengan adanya resorpsi tulang yang besar dan proses penyembuhan (*bone formation*) yang kurang. Aktivitas osteoklas dan osteoblas dapat dilihat pada gambar 2.5.

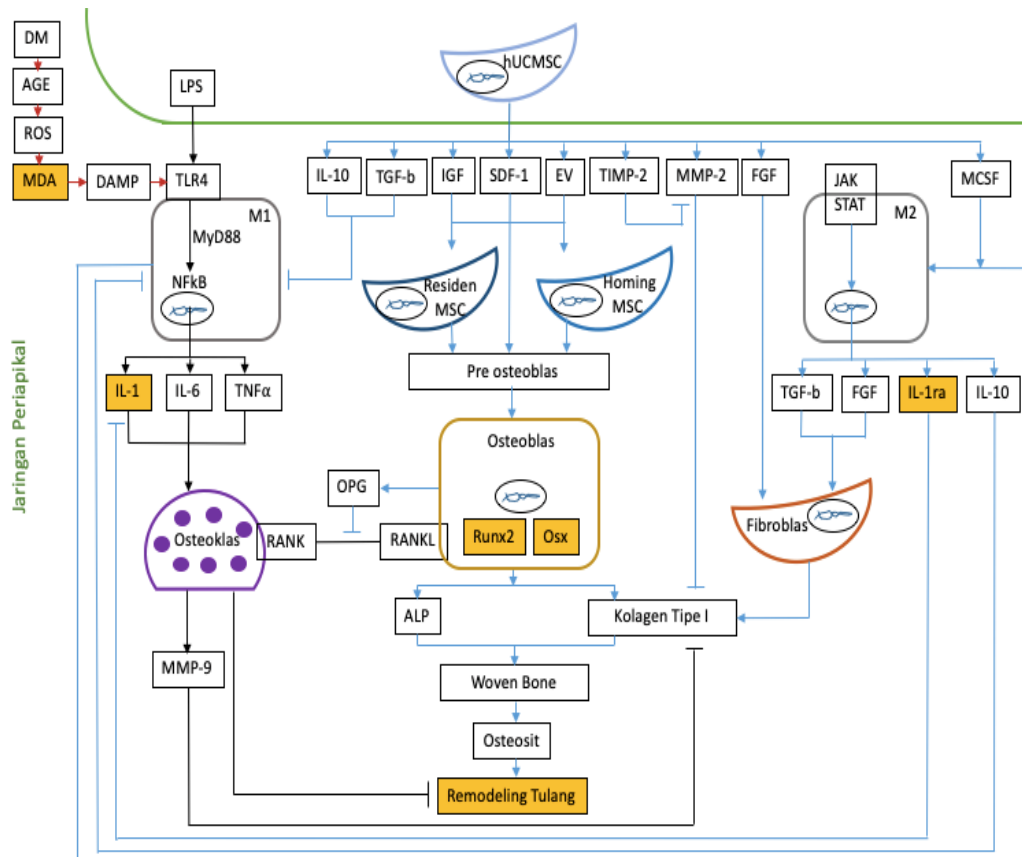


Gambar 2.5 Aktivitas Osteoklas dan Osteoblas (Robling, Castillo & Turner, 2006).
 (a) Osteoklas yang berasal dari prekursor hematopoietik, (b) Osteoblas yang berasal dari *mesenchymal stem cells*.

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Keterangan:

- : Variabel yang terlibat dalam mekanisme remodeling
- : Variabel yang terlibat dan diukur
- : Jalur hantaran sinyal
- ⊥ : Jalur hambatan sinyal
- : Jalur sinyal LPS
- : Jalur sinyal AGE
- : Jalur sinyal hUCMSCs

Gambar 3.1 Kerangka konseptual penelitian.

Keterangan Kerangka Konseptual:

Diabetes mellitus (DM) menyebabkan kondisi hiperglikemia yang terus menerus sehingga terjadi reaksi glikasi, menghasilkan produk berupa Advanced Glycation End Products (AGE). Kadar AGE yang tinggi pada kondisi diabetes meningkatkan stres oksidatif pada sel. Stres oksidatif terjadi apabila rasio Reactive Oxygen Species (ROS) lebih besar dari anti ROS. Peningkatan stress oksidatif dan AGE mengakibatkan kondisi inflamasi yang terus menerus pada sel-sel dalam jaringan terlibat (makrofag, osteoblas, fibroblas, osteoklas, MSC endogen) sehingga reaksi inflamasi akan menjadi lebih parah dan berlebihan.

Reactive Oxygen Species (ROS) didalam sel jika berlebihan akan bereaksi dengan sistem membran membentuk suatu bahan yang toksik yaitu malondialdehyde (MDA), sehingga sel akan mengalami kerusakan dan kematian. Debris sel-sel yang rusak akan memicu inflamasi dan seterusnya sehingga proses inflamasi berjalan terus menerus. Hal ini menyebabkan lesi periapikal yang terjadi pada penderita diabetes mellitus pada umumnya sulit sembuh.

Adanya *Lipopolysaccharide* (LPS) atau endotoksin bakteri akan terikat melalui TLR-4 pada makrofag, menyebabkan makrofag memproduksi mediator-mediator proinflamasi IL-1, IL-6, IL-8 dan *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF α) sehingga timbul inflamasi. IL-8 akan menarik lebih banyak PMN untuk mengeluarkan MMP-8. IL-1, IL-6 dan TNF α akan menyebabkan aktivasi, proliferasi, dan diferensiasi osteoklas sehingga terjadi resorpsi tulang. Osteoklas akan mengeluarkan MMP-9

sehingga terjadi degradasi molekul matriks ekstraseluler dan menyebabkan kerusakan jaringan ikat (kolagen, gelatin, elastin). Peningkatan aktivitas osteoklas dan kerusakan matriks ekstraseluler ini menyebabkan terjadinya lesi periapikal, dan menghambat remodeling tulang.

Inflamasi yang terjadi pada lesi periapikal akan memicu sel punca residen untuk bergerak kearah lesi, dengan adanya pemberian MSC eksogen maka akan memberi efek parakrin sehingga memicu sel punca residen dan hUCMSCs untuk berdiferensiasi menjadi preosteoblas, osteoblas, dan osteosit. Selain osteoblas, kolagen juga dihasilkan oleh fibroblas yang dirangsang oleh *Transforming Growth Factor* β (TGF- β). ALP akan membantu mineralisasi kolagen sehingga membentuk woven bone yang kemudian akan maturasi menjadi matriks tulang.

Pemberian MSC eksogen dari *human umbilical cord mesenchymal stem cells* (hUCMSCs) melalui regulasi *monocyte colony stimulating factor* (MCSF) akan memperbaiki inflamasi dengan mengubah polarisasi makrofag 1 (M1) yang pro inflamasi menjadi makrofag 2 (M2) yaitu regulator anti inflamasi sehingga akan memperbaiki *micro environment* (*niche*) di daerah lesi. Makrofag 2 akan mengeluarkan *interleukin-1 receptor antagonis* (IL-1ra), *Transforming Growth Factor* β (TGF- β) dan *Fibroblas Growth Factor* (FGF). TGF- β akan memacu proliferasi dan diferensiasi preosteoblas, fibroblas dan kolagen tipe I. Pembentukan dan aktivasi osteoklas akan terhambat dengan aktivasi osteoblas. Peningkatan aktivitas osteoblast dan jaringan ikat menyebabkan remodeling tulang meningkat.

Pemberian hUCMSC diharapkan dapat mempengaruhi regulasi gula extrapankreas pada sel osteoprogenitor, melalui produksi sekretom, baik melalui regulasi *extracellular vesicle*, *exosome*, *small molecule*, RNA dan *microvesicle*. Gula yang teregulasi akan memicu perkembangan sel-sel prekursor dari MSC endogen maupun eksogen untuk berkembang hingga maturasi menjadi tulang baru. Osteoblas yang terkena ROS dan timbul metabolit MDA akan rusak dan mengalami kematian sel, sedangkan osteoblas yang teregulasi akan berdiferensiasi dengan matur menjadi osteosit.

Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) dengan kemampuan parakrin, autokrin dan kemokin dan sekresi beberapa growth factor seperti *hepatosit growth factor*, *stromal cell derived factor 1* (SDF-1), *insulin-like growth factor* (IGF), *extracellular vesicles* baik berupa *microvesicle* maupun *exosome* akan menarik MSC dari *bone marrow* untuk homing ke daerah lesi dan merangsang MSC residen didaerah sekitar lesi untuk proliferasi dan diferensiasi menjadi tulang. Pergerakan ini dapat terjadi karena hUCMSCs memiliki MMP-2, MT1-MMP dan TIMP-2 untuk migrasi dan menembus berbagai barrier dalam perjalanannya menuju lokasi peradangan. IL-10 dan TGF- β yang dihasilkan oleh hUCMSCs akan menghambat NF κ B sehingga mediator proinflamatori menurun.

Selain itu, hUMSCS juga mengeluarkan *fibroblast growth factor* (FGF), untuk merangsang proliferasi fibroblas untuk memproduksi kolagen tipe I. Sel-sel hUCMSCs akan adhesi dengan sel-sel disekitar lesi periapikal dan mengganti sel-sel yang rusak termasuk perubahan menjadi

preosteoblas, osteoblas hingga osteosit, sehingga terjadi healing pada lesi periapikal dan remodeling tulang pada lesi periapikal meningkat.

3.2 Hipotesis

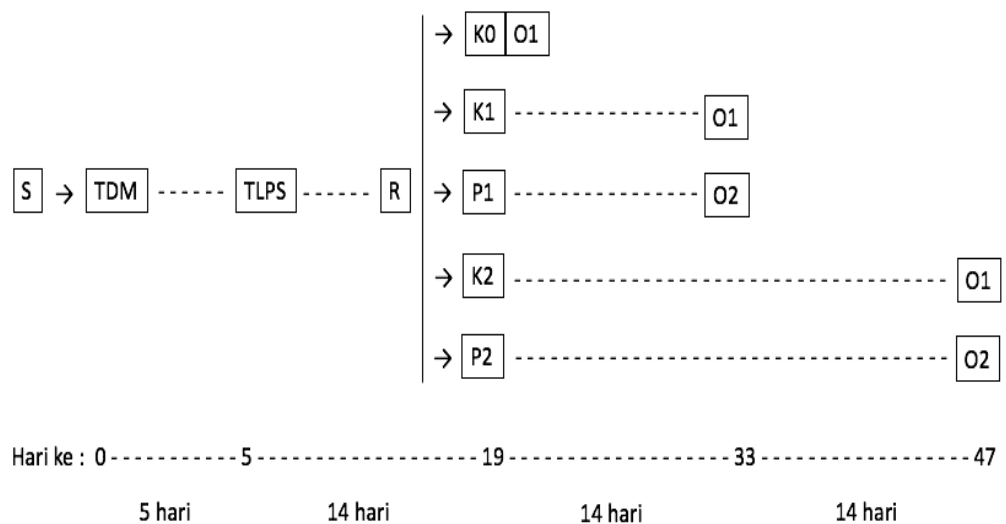
1. Pemberian hUCMSCs menurunkan ekspresi IL-1 pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus
2. Pemberian hUCMSCs menurunkan ekspresi IL-1ra pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus
3. Pemberian hUCMSCs menurunkan hasil metabolit MDA pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus
4. Pemberian hUCMSCs meningkatkan ekspresi Runx2 pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus
5. Pemberian hUCMSCs meningkatkan ekspresi Osterix pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus
6. Pemberian hUCMSCs meningkatkan remodeling tulang pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik pada hewan coba tikus model diabetes mellitus dengan rancangan penelitian *randomized post test only control group design*. Penelitian dilakukan dengan randomisasi, perlakuan, kontrol, replikasi, dan variabel dikendalikan sehomogen mungkin.



Keterangan:

- S : Unit Eksperimen
- TDM : Pembuatan Model Diabetes Mellitus dengan STZ
- TLPS : Pembuatan Model Lesi Periapikal dengan LPS
- R : Randomisasi
- K0, K1, K2 : Kelompok Kontrol (tanpa diberi hUCMSCs)
- P1, P2 : Kelompok Perlakuan (diberi hUCMSCs)
- O1 : Pengamatan Kelompok Kontrol
- O2 : Pengamatan Kelompok Perlakuan

Gambar 4.1 Rancangan penelitian.

4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi

4.2.1 Unit Eksperimen

Unit eksperimen yang digunakan adalah hewan coba tikus model diabetes mellitus dengan lesi periapikal. Hewan coba tikus jenis *Rattus norvegicus strain* Wistar diperoleh dari Pusat Penelitian Sel Punca Universitas Airlangga, yang memenuhi kriteria inklusi meliputi jenis kelamin jantan dewasa sehat umur 20 minggu dengan rerata berat badan 300-350 gram, sehat, gigi molar rahang bawah tumbuh sempurna, memiliki kadar glukosa darah normal dalam rentang 80-120 mg/dL. Kriteria eksklusi meliputi *Rattus norvegicus strain* Wistar yang cacat, sakit, agresif menyerang hewan coba lain, atau pernah dipakai sebagai hewan coba penelitian lain. Kriteria putus uji sampel penelitian yaitu sampel dikeluarkan dari penelitian ini bila hewan coba mati selama diteliti atau tidak memenuhi syarat untuk dilakukan prosedur penelitian lebih lanjut.

Rattus norvegicus strain Wistar yang telah memenuhi kriteria dibuat model diabetes mellitus dengan induksi STZ, setelah model diabetes mellitus terbentuk, dibuat model lesi peripikal dengan induksi LPS pada gigi molar pertama rahang bawah tikus selama 14 hari. Setelah didapatkan model lesi periapikal pada diabetes mellitus, dilakukan pembagian 5 kelompok secara acak dengan menggunakan bilangan random. Setiap anggota unit eksperimen mempunyai kesempatan yang sama untuk mendapatkan perlakuan,

sehingga probabilitas setiap anggota unit eksperimen untuk terpilih menjadi anggota kelompok perlakuan maupun kontrol adalah sama.

4.2.2 Replikasi

Penentuan jumlah replikasi pada setiap kelompok dihitung dengan menggunakan rumus Lemeshow (Lemeshow *et al.*, 1990) sebagai berikut:

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

$$n \geq \frac{2 \times 1.05^2 (1.96 + 1.28)^2}{(4.49 - 2.57)^2}$$

$$n \geq 7$$

Keterangan:

n : jumlah replikasi setiap kelompok
 $Z_{1-\alpha/2}$: 1,96 nilai pada tabel normal bila $\alpha = 0.05$
 Z_{β} : 1.28 nilai pada table normal untuk $\beta = 0.10$
 σ : standar deviasi dari kelompok kontrol = 1,05
 $(\mu_1 - \mu_2)$: selisih rerata antara kelompok kontrol dengan perlakuan pada penelitian terdahulu (2.57-4.49)

Bila diperhitungkan dengan faktor koreksi (f) 30%, maka jumlah replikasi yang didapat adalah:

$$\frac{1}{1-f} \times n = \frac{1}{1-0.3} \times 7 = 10$$

Jadi jumlah replikasi dalam tiap kelompok (n) adalah 7 ekor. Karena adanya kemungkinan 30% hewan coba di tiap kelompok mengalami putus uji maka diputuskan untuk mengambil jumlah replikasi

sebanyak 10 ekor per kelompok, sehingga jumlah keseluruhan hewan coba dalam penelitian ini adalah 50 ekor tikus.

4.2.3 Pembagian Kelompok Sampel

Sebelum menjadi subyek penelitian, 50 ekor tikus yang sesuai dengan kriteria dievaluasi secara klinis dan ditempatkan pada lingkungan yang sesuai selama 7x24 jam. Dalam masa adaptasi, seluruh tikus mendapatkan pakan dasar dan pemeliharaan standar sehingga memenuhi syarat untuk digunakan dalam penelitian ini.

Setelah didapatkan sampel yang homogen melalui kriteria inklusi dan eksklusi dilakukan pembagian kelompok sampel secara random sehingga setiap subyek penelitian mempunyai kesempatan yang sama untuk menempati kelompok kontrol dan perlakuan.

Selanjutnya diambil 50 ekor tikus dengan teknik *random sampling* kemudian dibagi menjadi 5 kelompok yaitu:

1. Kelompok Kontrol 0 (K0): Dilakukan injeksi Streptozotocin (STZ) ditunggu 5 hari, dilakukan induksi Lipopolisakarida (LPS) selama 2 minggu kemudian diterminasi.
2. Kelompok Kontrol 1 (K1): Dilakukan injeksi Streptozotocin (STZ) ditunggu 5 hari, dilakukan induksi Lipopolisakarida (LPS) selama 2 minggu, dilanjutkan pemberian injeksi gelatin kemudian diterminasi setelah 2 minggu.
3. Kelompok Kontrol 2 (K2): Dilakukan injeksi Streptozotocin (STZ) ditunggu 5 hari, dilakukan induksi Lipopolisakarida

(LPS) selama 2 minggu, dilanjutkan pemberian injeksi gelatin kemudian diterminasi setelah 4 minggu.

4. Kelompok Perlakuan 1 (P1): Dilakukan injeksi Streptozotocin (STZ) ditunggu 5 hari, dilakukan induksi Lipopolisakarida (LPS) selama 2 minggu, dilanjutkan pemberian injeksi hUCMSCs dan diterminasi setelah 2 minggu.
5. Kelompok Perlakuan 2 (P2): Dilakukan injeksi Streptozotocin (STZ) ditunggu 5 hari, dilakukan induksi Lipopolisakarida (LPS) selama 2 minggu, dilanjutkan pemberian injeksi hUCMSCs dan diterminasi setelah 4 minggu.

4.3 Variabel Penelitian dan Klasifikasi Variabel

4.3.1 Variabel Bebas

Pemberian hUCMSCs

Waktu

4.3.2 Variabel Tergantung

Remodeling tulang di daerah lesi periapikal

4.3.3 Variabel Antara (Penghubung)

- a. Ekspresi IL-1 di daerah lesi periapikal
- b. Ekspresi IL-1ra di daerah lesi periapikal
- c. Hasil Metabolit MDA di daerah lesi periapikal
- d. Ekspresi Runx2 di daerah lesi periapikal
- e. Ekspresi Osterix di daerah lesi periapikal

4.3.4 Variabel Terkendali

- a. Metode pemeriksaan
- b. Waktu evaluasi
- c. Teknik perawatan endodontik
- d. Tatalaksana pemeliharaan hewan coba, suhu, pakan dan minum
- e. Jenis hewan coba, umur, berat badan hewan coba
- f. Jumlah dosis hUCMSCs dalam gelatin 2%
- g. Jumlah dosis Streptozotocin (STZ)
- h. Jumlah dosis Lipopolisakarida (LPS)
- i. Cara fiksasi sampel
- j. Cara penyimpanan sampel

4.4 Definisi Operasional Variabel

1. Tikus model diabetes mellitus adalah tikus yang mengalami diabetes mellitus setelah dilakukan injeksi Streptozotocin (STZ) yang dilarutkan dalam buffer sitrat pH 4,5 dengan dosis 35 mg/kg dengan cara injeksi peritoneal. Dengan injeksi STZ, sel pancreas tikus rusak sehingga tikus mengalami diabetes mellitus dengan kadar glukosa darah > 300 mg/dL setelah diperiksa dengan glukometer.
2. Lesi periapikal adalah lesi pada tulang di daerah periapikal gigi tikus yang terbentuk setelah dilakukan induksi Lipopolisakarida (LPS). Induksi Lipopolisakarida (LPS) dilakukan dengan aplikasi bahan LPS (Invivogen) dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* sebanyak 30 μ L dan konsentrasi 1 mg/mL dengan Hamilton *microliter syringe* pada saluran

akar gigi molar tikus yang sebelumnya dibur hingga mencapai pulpa dan dilakukan ekstirpasi jaringan pulpa. Setelah aplikasi LPS gigi ditutup dengan tambalan lalu ditunggu selama 2 minggu agar terbentuk lesi periapikal. Lesi periapikal dapat dilihat secara histologis dengan pengecatan HE.

3. *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (hUCMSCs) adalah sel yang diisolasi dari *Wharton's jelly* pada *umbilical cord* manusia yang pada piring petri menunjukkan morfologi fibroblas berbentuk *spindle* dan mengekspresikan marker positif CD73, CD90, CD105 dan marker negatif CD45.
4. Ekspresi IL-1 adalah jumlah sel makrofag pada jaringan periapikal yang bereaksi positif terhadap antibody monoclonal anti IL-1 beta menggunakan metode imunohistokimia yang terlihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali dalam 5 lapang pandang (metode *immune reactive index*).
5. Ekspresi IL-1ra adalah jumlah sel makrofag pada jaringan periapikal yang bereaksi positif terhadap antibody monoclonal anti IL-1ra menggunakan metode imunohistokimia yang terlihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali dalam 5 lapang pandang (metode *immune reactive index*).
6. Hasil metabolit MDA adalah jumlah osteoblas pada jaringan periapikal yang membran selnya positif terdapat kumpulan bintik berwarna coklat setelah penambahan kromogen DAB menggunakan metode

imunohistokimia yang terlihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali dalam 5 lapang pandang (metode *immune reactive index*).

7. Ekspresi Runx2 adalah jumlah osteoblas pada jaringan periapikal yang bereaksi positif terhadap antibody monoclonal anti Runx2 menggunakan metode imunohistokimia (warna kecoklatan) yang terlihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali dalam 5 lapang pandang (metode *immune reactive index*).
8. Ekspresi Osterix adalah jumlah osteoblas pada jaringan periapikal yang bereaksi positif terhadap antibody monoclonal anti Osterix menggunakan metode imunohistokimia (warna kecoklatan) yang terlihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali dalam 5 lapang pandang (metode *immune reactive index*).
9. Remodeling tulang adalah regenerasi tulang yang dinilai secara histologis dengan melihat luas area penulangan (osifikasi) pada daerah periapikal dan diukur dengan pemeriksaan Hematoxylin Eosin (HE).

4.5 Materi Penelitian dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Materi Penelitian

Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUCMSCs) diisolasi dari tali pusat plasenta manusia, dikultur-ekspansi pada medium in vitro. MSC dari hUCMSCs kemudian diinjeksikan pada daerah periapikal melalui saluran akar gigi tikus Wistar jenis kelamin jantan yang hiperglikemi dengan menggunakan pelarut gelatin 2%.

Gelatin yang digunakan telah dilakukan uji toksisitas pada penelitian sebelumnya. Metode pembuatan gelatin mengacu pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Hendrijantini (2015).

4.5.2 Instrumen Penelitian

1. Instrumen yang dipersiapkan untuk induksi LPS yaitu mata bur bulat no ¼, *handpiece* elektrik portabel, jarum suntik, larutan saline, LPS *Porphyromonas gingivalis* (Invivogen, USA), tambalan sementara.
2. Instrumen yang dipersiapkan untuk preparasi saluran akar gigi yaitu *handpiece* elektrik portabel, jarum ekstirpasi, apex locator (Propex, Dentsply USA), jarum file K no 10, syringe irigasi, larutan saline.
3. Instrumen yang dipersiapkan untuk isolasi dan kultur sel yaitu medium penumbuh α -*minimum essential medium* (MEM), *Fetal Bovine Serum* (FBS), Trypsin 0,25%, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Penicillin 100 IU, Fungizone / Amphotericin, petridish 5 cm dan 10 cm, tabung disposabel 15 mL dan 50 mL, alkohol 70%, aquabidestilata steril, *Methylene Blue*, *Trypan Blue*, filter disposabel, *yellow tip* 0-20 uL, *blue tip* 1000 uL, larutan dimethyl sulfoxide (DMSO).
4. Instrumen yang dipersiapkan untuk pengecatan imunositokimia yaitu medium penumbuh α -*minimum essential medium* (MEM), larutan PBS, gelas objek khusus, Formaldehyde 3%, *Mouse monoclonal anti-human CD45 / Anti human CD105*, Gliserin 50%, Mikroskop fluoresens.

5. Instrumen yang dipersiapkan untuk pemeriksaan *flow cytometry* yaitu medium penumbuh *α-minimum essential medium* (MEM), larutan PBS, *Formaldehyde* 10%, larutan *Bovine Serum Albumin* (BSA), *human MSC analysis kit*, antibodi primer *mouse anti human* CD73, CD90, CD105, *Negative cocktail* CD45, CD34, CD19, *Fluorescent activated cell sorting* (FACS) *Calibur Flow Cytometer*.
6. Instrumen yang dipersiapkan untuk pemeriksaan Hematoxylin Eosin (HE) yaitu gelas objek, larutan xylol, ethanol absolut, ethanol 70%, larutan Meyer's Hematoxylin Eosin, larutan Eosin, cairan perekat (DPX), kaca penutup, mikroskop cahaya.
7. Instrumen yang dipersiapkan untuk pewarnaan imunohistokimia yaitu larutan xylol, ethanol absolut, ethanol 70%, aquabidestilata, H₂O₂ 3%, larutan PBS, Trypsin 0,025%, Ultra V Block, Monoklonal, *Primary Antibody Enhancer*, *Horse Radish Peroxidase* (HRP).

4.6 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama 28 bulan dari bulan November 2018 sampai dengan Maret 2021, terhenti selama 12 bulan karena pandemi.

Penelitian ini dilakukan di:

1. Laboratorium Sel Punca, Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca, Universitas Airlangga, Surabaya.
2. Laboratorium Hewan Coba, Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca, Universitas Airlangga, Surabaya.

3. Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.
4. Laboratorium Patologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya.
5. Bagian Patologi Klinik, RSUD Dr Soetomo, Surabaya.
6. Gedung Bedah Pusat Terpadu (GBPT), RSUD Dr. Soetomo, Surabaya untuk pengambilan sampel tali pusat manusia.
7. Laboratorium Medis Terpadu, Universitas Airlangga, Surabaya.

4.7 Prosedur Isolasi, Kultur, dan Karakterisasi hUCMSCs

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

Tali pusat diambil dari plasenta bayi sehat cukup bulan (aterm) 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. Tali pusat dan plasenta yang didapatkan diletakkan dalam cawan steril, tali pusat dipotong sepanjang 10 cm, potongan tersebut diletakkan kedalam tromol yang telah dilapisi dengan kain steril.

Potongan tali pusat dicuci dengan larutan *Phosphate-Buffered Saline* (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 melalui protokol Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca, Universitas Airlangga. Potongan tali pusat dipotong menjadi sekitar 1 cm, arteri, vena dan adventitia dipisahkan untuk mendapatkan Wharton's Jelly. Kemudian 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 pellet selama 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 diletakkan 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.

4.7.2 Karakterisasi hUCMSCs

Karakterisasi fenotip MSC pada kultur hUCMSCs dilakukan dengan metode *flow cytometry*.

4.7.3 Pemeriksaan *Flow Cytometry*

Pada pemeriksaan *flow cytometry*, 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 Stemflow™, BD Biosciences) dengan penambahan *primary antibodies mouse anti-human* CD73, CD90, CD105, dan *negative cocktail* berisi CD45, CD34, CD19 selama 40 menit.

Antibodi yang tidak 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).

4.8 Prosedur Aplikasi hUCMSCs untuk Evaluasi Regenerasi Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Kasus Diabetes Mellitus

4.8.1 Pembuatan Tikus Model Diabetes Mellitus (Purwanto dan Liben, 2014; Gheibi, Kashfi dan Ghasemi, 2017; Suryani *et al.*, 2013)

Tikus galur Wistar jantan yang berusia 20 minggu dengan berat 300 gr - 350 gr akan dikelompokkan secara random menjadi 5 kelompok yang terbagi menjadi 3 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. Pertama-tama dilakukan pengukuran kadar glukosa darah dengan cara mengambil darah pada ekor tikus sebanyak 0,05 mL dan diukur dengan menggunakan glukometer hingga didapatkan hasil 80-120 mg/dL. Pada hari pemberian injeksi STZ hewan dipuasakan 6-8 jam dan diberi minum air. Tikus diinduksi STZ dengan metode Multiple Low Dose Streptozotocin (MLD-STZ). Kelompok perlakuan dilakukan induksi STZ dengan cara menyuntikkan secara intraperitoneal STZ pada tikus dimana STZ telah dilarutkan terlebih dahulu dalam larutan buffer sitrat 0,05 M steril, pH 4,5 dengan dosis 20 mg/kg berat badan, selama 5 hari berturut-turut secara intraperitoneal kemudian ditunggu selama 5 hari, sedangkan pada kelompok kontrol hanya disuntikkan larutan buffer sitrat saja secara intraperitoneal kemudian ditunggu selama 5 hari.

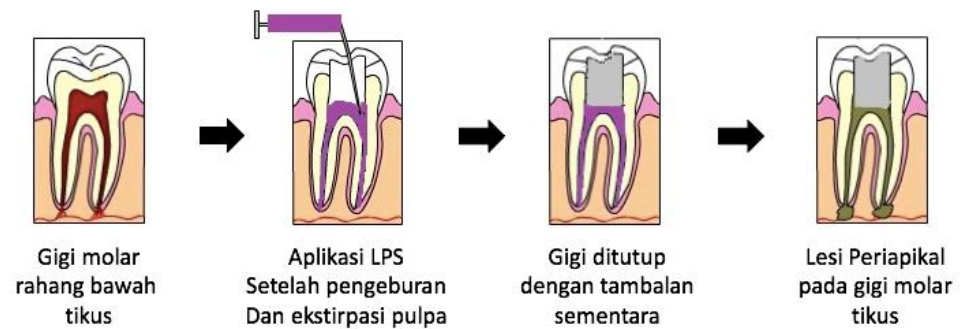
Pemeriksaan kadar glukosa darah dilakukan setelah injeksi STZ dengan cara mengambil darah pada ekor tikus sebanyak 0,05 mL dan diukur dengan menggunakan glukometer. Pemeriksaan ini dilakukan untuk memastikan kadar glukosa darah sebesar >300 mg/dL. Penetapan standar ini mengacu pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya

oleh Suryani *et al.* (2013). Apabila pada hari ke-5 kadar glukosa darah <300 mg/dL, dilakukan induksi STZ lagi dengan dosis 20 mg/kg BB selama 2 hari berturut-turut hingga kadar glukosa darah sebesar >300 mg/dL, diulangi lagi pada hari berikutnya. Apabila pada hari ke-7 kadar glukosa darah masih <300 mg/dL, tikus dikeluarkan dari kelompoknya.

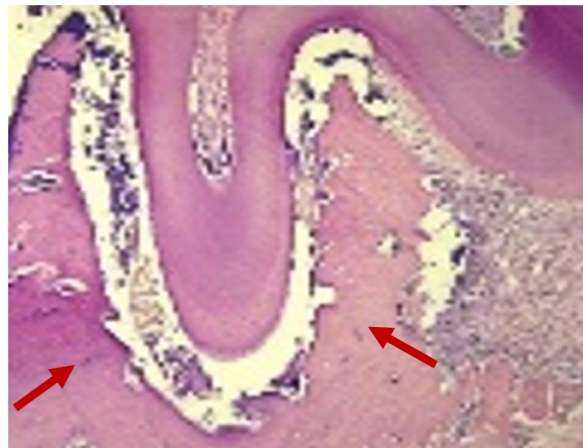
4.8.2 Pembuatan Lesi Periapikal pada Tikus Model Diabetes Mellitus

Injeksi LPS dilakukan intrapulpa pada gigi molar pertama rahang bawah kanan tikus. Sebelumnya dilakukan tindakan anestesi via intraperitoneal dengan injeksi ketamine (80 mg/kg) dan xylazine (10 mg/kg) dalam PBS steril. Tikus difiksasi pada papan retraksi rahang kemudian dilakukan tindakan perforasi atap pulpa gigi molar pertama rahang bawah kanan dengan mata bur bulat no ¼. Ukuran eksposur equivalen dengan ukuran diameter bur. Ruang pulpa gigi tikus dibuka hingga saluran akar gigi tikus terlihat dan ditelusuri dengan file no 10 dan dipreparasi menggunakan file tersebut. Penentuan panjang kerja dilakukan dengan bantuan alat *apex locator*.

Induksi Lipopolisakarida (LPS) dilakukan dengan aplikasi bahan LPS dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* sebanyak 30 µL dan konsentrasi 1 mg/mL dengan Hamilton *microliter syringe* pada saluran akar gigi molar tikus yang sebelumnya telah dibur hingga mencapai pulpa dan dilakukan ekstirpasi jaringan pulpa. Setelah aplikasi LPS, gigi ditutup dengan tambalan *Glass Ionomer Cement* tipe IX (GC, Japan) lalu ditunggu selama 2 minggu agar terbentuk lesi periapikal.



Gambar 4.2 Prosedur pembuatan lesi periapikal.



Gambar 4.3 Lesi periapikal yang terbentuk dari induksi LPS pada tikus model diabetes mellitus. Pewarnaan HE, pembesaran 40x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel.

4.8.3 Prosedur Persiapan Aplikasi hUCMSCs dengan Pelarut Gelatin (Hendrijantini, 2015).

Penggunaan gelatin mengikuti prosedur yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Hendrijantini (2015) yang telah terbukti aman dan tidak toksik terhadap hUCMSCs. 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 dilakukan sterilisasi menggunakan *autoclave*. Sel monolayer ditripsinasi dan diresuspensi di dalam larutan gelatin steril, larutan tersebut dimasukkan ke dalam 10 mL *syringe* dengan jarum 22 G, diteteskan ke dalam 1 mL dari 100 mM larutan gelatin, dan didiamkan selama 10 menit pada suhu ruangan sebelum implantasi. Selama kontak dengan larutan gelatin, gelatin pada larutan akan mempolimerisasi dan menyelubungi sel kultur pada larutan.

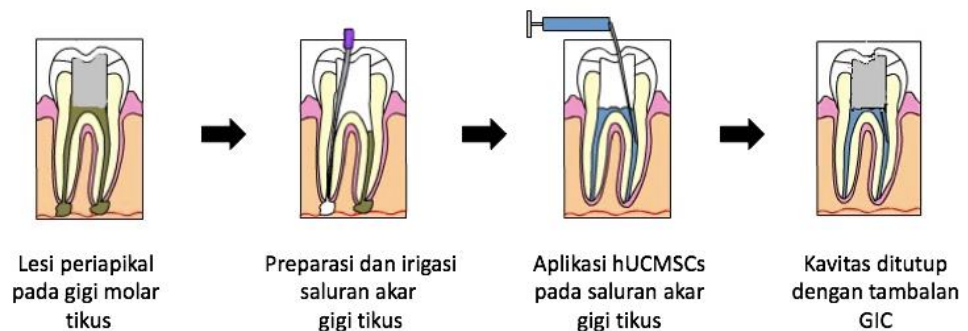
Sejumlah 2×10^6 hUCMSCs per kg berat badan yang telah dikultur, dicampur dengan larutan gelatin. Dosis hUCMSCs per satu ekor tikus adalah 500.000 sel dalam 30 μ L pelarut yang terdiri dari *Sodium Chloride*, *Hepes buffer* dan larutan gelatin. Masing-masing tikus pada kelompok perlakuan akan mendapatkan injeksi 500.000 sel di dalam 30 μ L pelarut yang akan diinjeksikan menggunakan *Hamilton microliter syringe*. Pada kelompok tanpa hUCMSCs, hanya akan mendapatkan 30 μ L pelarut gelatin yang diinjeksikan menggunakan *Hamilton microliter syringe*.

4.8.4 Prosedur Aplikasi hUCMSCs dan Pelarut Gelatin pada Saluran Akar Gigi Tikus Diabetes Mellitus (Hiperglikemia)

Sebelumnya dilakukan tindakan anestesi via intraperitoneal dengan injeksi ketamine (80 mg/kg) dan xylazine (10 mg/kg) dalam PBS steril. Tikus difiksasi pada papan retraksi rahang kemudian dilakukan tindakan perforasi atap pulpa pada gigi molar pertama rahang bawah kanan dengan mata bur bulat no ¼. Ukuran eksposur equivalen dengan ukuran atap ruang pulpa, semua saluran akar terlihat. Dilakukan irigasi ruang

pulpa dan saluran akar gigi tikus dengan saline sebanyak 2 mL, lalu dengan bantuan apex locator dilakukan preparasi saluran akar, lalu dilakukan irigasi lagi menggunakan saline sebanyak 2 mL.

Ruang pulpa dan saluran akar gigi tikus dikeringkan dengan paper point steril. Setelah itu hUCMSCs dengan pelarut gelatin (pada kelompok perlakuan) atau pelarut gelatin saja (pada kelompok kontrol) didalam Hamilton *microliter syringe* diinjeksikan kedalam ruang pulpa dan saluran akar gigi tersebut. Setelah itu dilakukan penutupan kavitas dengan *Glass Ionomer Cement* tipe IX (GC, Japan) untuk mencegah kontaminasi dengan mikroorganisma rongga mulut.



Gambar 4.4 Prosedur aplikasi hUCMSCs dalam saluran akar gigi.

4.8.5 Terminasi Hewan Coba dan Pengambilan Spesimen Penelitian

Tikus dikorbankan dengan cara memasukkan tikus ke dalam kotak berisi chloroform. Setelah tikus mati, dilakukan irisan pada kulit dan pembuangan jaringan lunak dan otot mandibular untuk memaparkan seluruh daerah mandibula, kemudian mandibula dipisahkan dari rahang tikus (mulai dari garis tengah rahang sampai ke ramus mandibular posterior).

Mandibula kanan kemudian dipotong pada titik insisivus sampai ke daerah posterior. Spesimen yang diperiksa adalah potongan mandibular sisi medial, direndam di dalam larutan fiksasi buffered formalin 10% minimal selama 8 jam sebelum dilakukan proses dekalsifikasi.

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

4.8.6 Pemrosesan dan Pemeriksaan Spesimen Penelitian

Spesimen penelitian dicuci dengan PBS 3-5 kali untuk membersihkan jaringan dari kontaminan dan difiksasi dengan larutan buffer formalin 10%. Selanjutnya dilakukan dehidrasi specimen dengan alcohol konsentrasi bertingkat (30%, 50%, 70%, 80%, 90% dan absolut) masing-masing selama 60 menit, kemudian dilakukan clearing dengan larutan xylol 2X masing-masing selama 60 menit.

Setelah itu dilakukan infiltrasi dengan paraffin lunak selama 60 menit, dilanjutkan dengan blocking paraffin keras dalam cetakan dan didiamkan selama 24 jam. Tahapan selajutnya yaitu pemotongan blok

parafin menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4-6 μm dan diletakkan pada gelas obyek. Pada pengecatan dengan Hematoxylin-Eosin (HE), mounting dilakukan pada gelas obyek menggunakan gelatin 5% sedangkan pada pengecatan imunohistokimia (IHC) dilakukan mounting pada gelas obyek yang telah dilapisi poly L-lisin.

Pemeriksaan spesimen penelitian menggunakan pewarnaan HE untuk pengamatan remodeling, sedangkan pewarnaan imunohistokimia (IHC) dilakukan untuk pengamatan ekspresi IL-1, IL-1ra, Runx2 Osterix, dan hasil metabolit MDA.

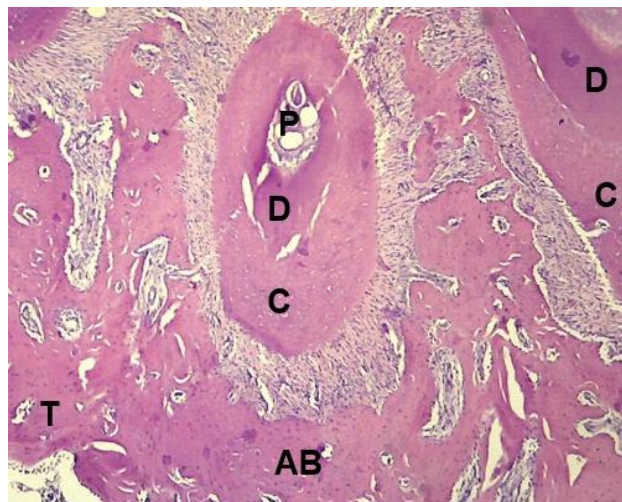
4.8.7 Pewarnaan dan Pembacaan Hematoxylin Eosin (HE)

Pertama dilakukan deparafinisasi sayatan pada gelas obyek untuk menghilangkan paraffin dari jaringan yang akan diperiksa dengan tahapan berikut: Dilakukan perendaman specimen 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, dibilas dengan air mengalir selama 1 menit.

Selanjutnya sayatan dimasukkan ke dalam larutan eosin selama 1-5 menit, kemudian dibilas dengan air mengalir. Setelah itu sayatan dimasukkan dalam larutan ethanol 70% sebanyak 10 celupan (2 kali), larutan ethanol absolut 10 celupan kemudian direndam ethanol absolut

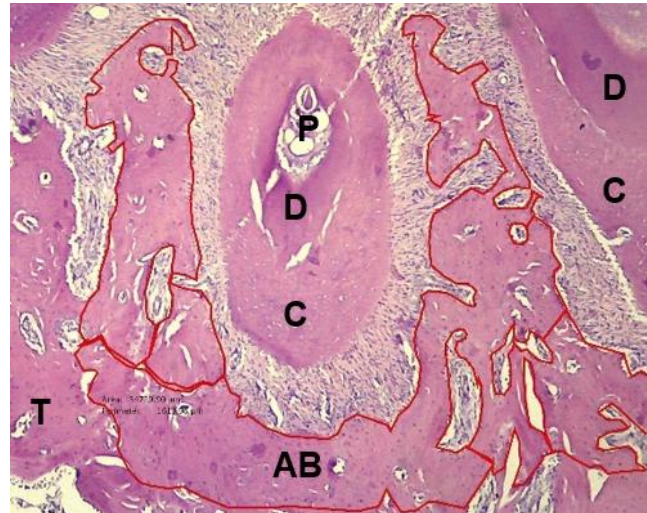
selama 1 menit, kemudian ditetesi larutan xylol (3 kali, masing-masing 3 menit). Preparat diangkat satu persatu dari larutan xylol dalam keadaan basah, diberi satu tetes cairan perekat (DPX) dan selanjutnya ditutup dengan kaca penutup. Hasil pengamatan dapat diamati dengan mikroskop cahaya.

Pemeriksaan HE terdiri atas pemeriksaan luas area penulangan (osifikasi) pada daerah lesi periapikal gigi molar pertama rahang bawah kanan. Remodeling tulang ditentukan dengan cara membandingkan luas area penulangan (osifikasi) pada daerah periapikal gigi yang teramati pada area lesi periapikal (tulang alveolar). Tulang yang diukur adalah tulang alveolar dan *bone island* yang terbentuk paska fase absortif selama tahap peradangan. Data luas area penulangan baru (μm^2) diukur menggunakan micrometer yang telah dikalibrasi pada pembesaran 40x.



Gambar 4.5 Daerah pengamatan lesi periapikal. Daerah yang diukur merupakan tulang alveolar (*alveolar bone*) dan pulau tulang (*bone island*) yang terdapat pada periapikal (AB=*alveolar bone*; C=cementum; D=dentin; P=pulpa; T=tulang mandibula) (pewarnaan HE, pembesaran 40x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel).

Pemeriksaan HE ini dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya merek Nikon H600L yang dilengkapi dengan kamera digital tipe DS Fi2 300 megapixel dan *software* pengolah gambar Nikon *Image System*.



Gambar 4.6 Cara pengambilan data remodeling tulang. Daerah pada periapikal gigi yang dibatasi oleh garis merah merupakan area tulang yang diukur (AB=*alveolar bone*; C=*cementum*; D=*dentin*; P=*pulpa*; T=*tulang mandibula*) (pewarnaan HE, pembesaran 40x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel).

4.8.8 Pewarnaan Imunohistokimia

Sebelum pewarnaan, dilakukan proses deparafinisasi dengan tahap berikut: sayatan dimasukkan kedalam larutan xylol sebanyak 4x selama 3-5 menit untuk membuang peroksidase endogen, kemudian dimasukkan secara berturut-turut kedalam etanol absolut sebanyak 3x selama 1-3 menit, kemudian direndam dalam larutan etanol 70% sebanyak 2x selama 1-3 menit. Pencucian dilakukan sebanyak 3x dengan aquabidest, lalu pinggir slide dibersihkan dengan tissue, setelah

itu H₂O₂ 3% ditetaskan lalu diinkubasi dalam suhu kamar selama 5 menit, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3x dan pinggir slide dibersihkan (tidak perlu dicuci). Kemudian trypsin 0,025% ditetaskan lalu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 6 menit, setelah itu dicuci dengan aquabidest sebanyak 3x, pinggir slide dibersihkan dengan tissue.

Selanjutnya ditetaskan Ultra V Block lalu diinkubasi dalam suhu kamar selama 5 menit, pinggir slide dibersihkan (tidak perlu dicuci). Monoklonal yang sudah diencerkan (1:100) ditetaskan, lalu diinkubasi dalam suhu kamar selama kurang lebih 25-30 menit lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3x dan pinggir slide dibersihkan dengan tissue.

Primary Antibody Enhancer ditetaskan sesuai dengan pemeriksaan yang diinginkan selama 10 menit dan diinkubasi dalam suhu kamar, kemudian dicuci dengan PBS sebanyak 3x, setelah itu pinggir slide dibersihkan dengan tissue. Horseradish Peroksidase (HRP) Polymer ditetaskan, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit, lalu dicuci dengan PBS sebanyak 3x dan pinggir slide dibersihkan dengan tissue.

Kromogen (20µg/1mL substrat) ditetaskan sesuai dengan pemeriksaan yang diinginkan, lalu diinkubasi pada suhu kamar selama 5-15 menit (dark room), lalu dicuci dengan aquabidest sebanyak 3x dan dibersihkan setelahnya. Pengecatan dengan Meyer Hematoxylin, inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 6-15 menit setelah itu dicuci dengan air mengalir sebanyak 3x, dan pencucian terakhir direndam dalam air selama 10 menit, lalu dikeringkan dan diletakkan diatas objek kaca.

Pewarnaan imunohistokimia yang digunakan pada penelitian ini adalah untuk menentukan pemeriksaan IL-1, IL-1ra, MDA, Runx2, dan Osterix:

1. Pewaranaan IL-1: dilakukan pemberian anti IL-1 beta monoclonal antibody (SC 52012, Santa Cruz Biotechnology, USA).
2. Pewaranaan IL-1ra: dilakukan pemberian anti IL-1ra monoclonal antibody (ABIN 6334413, Antibodies Online, USA).
3. Pewaranaan MDA: dilakukan pemberian anti MDA monoclonal antibody (ABIN 920670, Antibodies Online, USA).
4. Pewarnaan Runx2: dilakukan pemberian Runx2 monoclonal antibody (SC101145, Santa Cruz Biotechnology, USA).
5. Pewarnaan Osterix: dilakukan pemberian Osterix monoclonal antibody ([EPR21034] ab209484, Abcam, USA).

Seluruh pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya merek Nikon H600L yang dilengkapi dengan kamera digital DS Fi 300 megapixel dan *software* pengolah gambar Nikon *Image System*.

4.9 Cara Pengelolaan dan Analisis Data

Data yang terkumpul dari semua pemeriksaan selanjutnya dilakukan analisis statistik menggunakan bantuan program komputer SPSS dengan tahapan analisis data sebagai berikut:

1. Uji Normalitas digunakan untuk mengetahui distribusi data hasil penelitian. Digunakan uji Shapiro Wilk. Jika data berdistribusi normal maka analisis data dilanjutkan dengan statistik parametrik, dan jika

data berdistribusi tidak normal maka analisis data dilanjutkan dengan statistik non parametric.

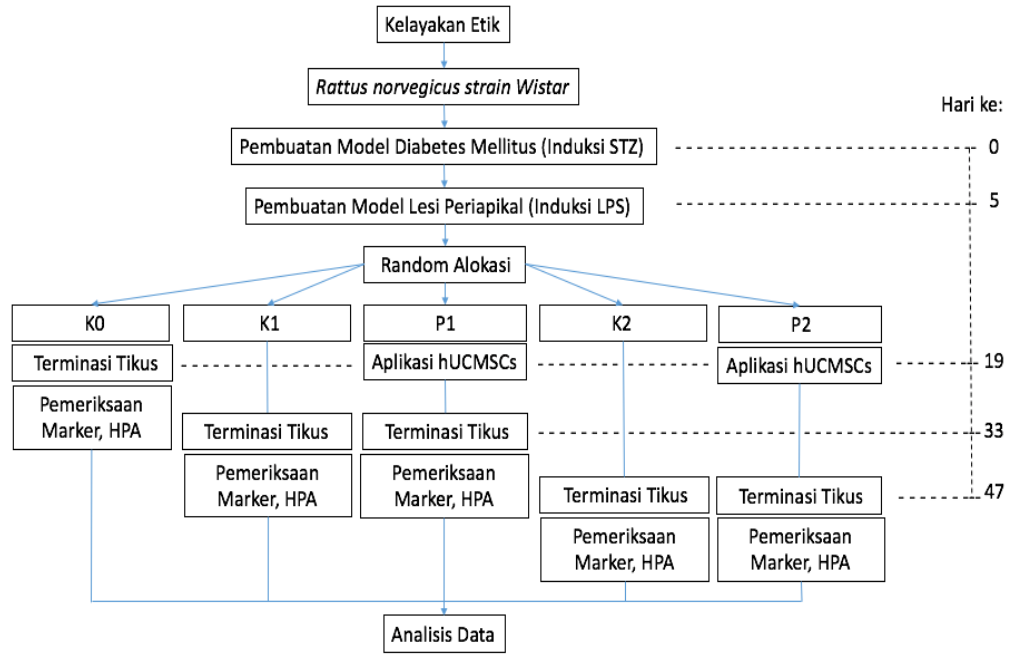
2. Uji Homogenitas pada penelitian ini menggunakan Levene Test dengan tingkat kemaknaan sebesar 0,05, bila $p \geq 0,05$ berarti varians homogen dan bila $p < 0,05$ berarti varians tidak homogen.
3. Uji Komparasi untuk membedakan kemaknaan variabel antar kelompok penelitian.
4. Analisis jalur untuk mengetahui hubungan kausalistik antara hUCMSCs dengan berbagai variabel regenerasi tulang.

4.10 Kelaikan Etik

Kelaikan etik untuk pengambilan sampel tali pusat di Instalasi Rawat Darurat dan Gedung Bedah Pusat Terpadu RSUD Dr. Soetomo diajukan kepada Komite Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Kelaikan etik untuk penelitian dengan hewan coba diajukan kepada Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

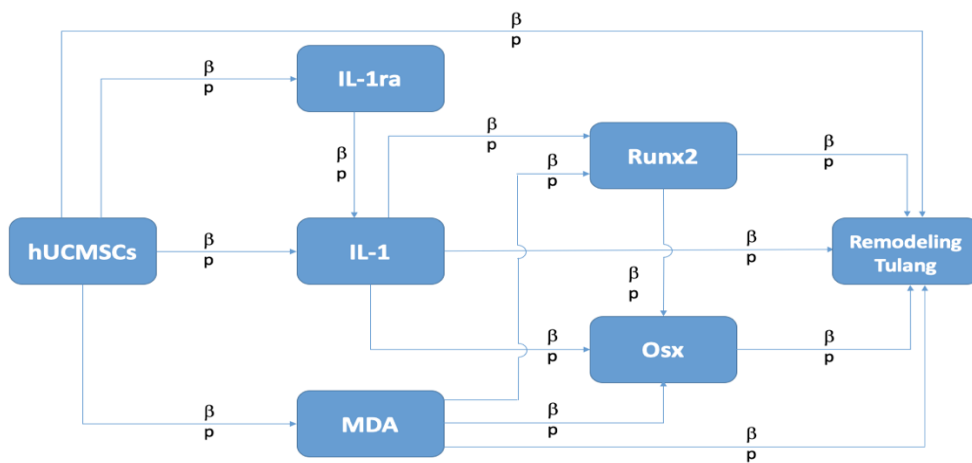
4.11 Alur Penelitian

Tahap awal merupakan persiapan untuk melakukan isolasi, kultur, dan karakterisasi hUCMSCs. Setelah konfirmasi hUCMSCs, dilanjutkan penelitian berupa pemberian hUCMSCs dan pelarut gelatin pada hewan coba tikus model diabetes mellitus (hiperglikemia) untuk mengevaluasi regenerasi tulang pada lesi periapikal akibat induksi LPS.



Gambar 4.7 Alur penelitian.

4.12 Model Analisis Jalur hUCMSCs pada Lesi Periapikal Kasus Diabetes



Keterangan:

β : Koefisien jalur

— : Jalur bermakna

----- : Jalur tidak bermakna

Gambar 4.8 Analisis jalur hUCMSCs pada lesi periapikal kasus diabetes.

BAB 5

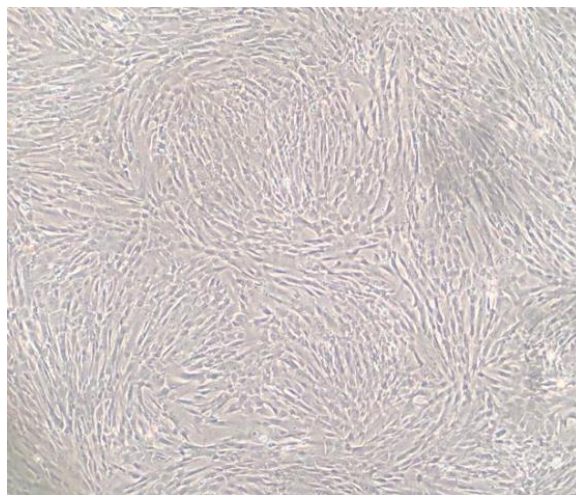
HASIL PENELITIAN

5.1 Isolasi, Kultur, dan Karakterisasi hUCMSCs

Penelitian tahap awal dilakukan secara *in vitro* untuk mendapatkan sampel hUCMSCs dari tali pusat, dilakukan isolasi, kultur dan karakterisasi. Penelitian ini dilakukan di GBPT RSUD Dr Soetomo Surabaya untuk pengambilan sampel hUCMSCs, kemudian diproses di Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca Universitas Airlangga.

5.1.1 Isolasi dan Kultur hUCMSCs

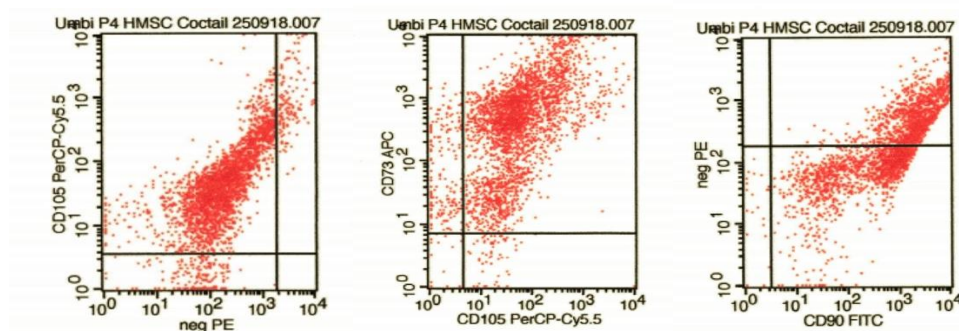
Setelah mendapatkan sampel tali pusat, dilakukan pemrosesan isolasi dan kultur hUCMSCs. Pada pengamatan 24 jam pertumbuhan awal hampir semua sel dalam bentuk oval, 24 jam setelahnya sel melekat di plate dan menjadi bentuk *spindle* atau *fibroblast-like*. Setelah 3 hari sel ini tumbuh hingga mencapai 90% *confluent* dengan susunan teratur seperti pusaran (Gambar 5.1). Dilakukan passage 6 hingga 8 kali sebelum dilakukan karakterisasi.



Gambar 5.1 Kultur hUCMSCs, dengan bentuk *spindle* atau *fibroblast-like* (Mikroskop inverted, pembesaran 200x).

5.1.2 Karakterisasi hUCMSCs

Karakterisasi dilakukan pada hUCMSCs dengan melihat ekspresi antigen permukaan menggunakan *flow cytometry*. Karakterisasi hUCMSCs dilakukan pada passage ke-4, menunjukkan ekspresi positif CD105, CD90, CD73 dan negatif untuk NegPE. Subpopulasi CD105 adalah 90,28% dan kontrolnya 21,16% yang menunjukkan bahwa sel tersebut positif mengekspresikan CD105. Subpopulasi CD90 adalah 53% dan kontrolnya 22,63% yang menunjukkan bahwa sel positif mengekspresikan CD90. Subpopulasi CD73 diekspresikan lebih sedikit yaitu 6,08%, dan kontrolnya 3,83%. Penanda negatif PE hasilnya adalah 0 dan kontrolnya 22,63% yang menunjukkan negatif. Hasil pemeriksaan *flow cytometry* menunjukkan bahwa sel-sel tersebut adalah *mesenchymal stem cells* (Gambar 5.2).



Gambar 5.2 Pemeriksaan *flow cytometry* menunjukkan mayoritas subpopulasi mengekspresikan CD73, CD90, CD105, dan negatif PE.

5.2 Pengumpulan Data dan Karakteristik Sampel

Setelah penelitian *in vitro*, penelitian dilanjutkan secara *in vivo* untuk melakukan evaluasi pemberian hUCMSCs pada gigi tikus model diabetes mellitus. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca Universitas Airlangga dan Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Keseluruhan penelitian *in vivo* dan *in vitro* dimulai sejak bulan Maret 2018 Sampai dengan bulan April 2021. Penelitian ini telah melalui uji kelaikan etik dari komisi etik penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (Lampiran 2).

Pada penelitian ini didapatkan 15 ekor tikus mati (tiga tikus pada tiap kelompok) dari 50 ekor tikus Wistar yang digunakan. Terminasi hewan coba dilakukan sesuai waktu yang telah ditentukan terhadap 35 ekor tikus, yaitu 7 ekor

kelompok Kontrol (K0), 7 ekor kelompok Kontrol 2 minggu (K1), 7 ekor kelompok Kontrol 4 minggu (K2), 7 ekor kelompok Perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1), dan 7 ekor kelompok Perlakuan hUCMSCs 4 minggu (P2).

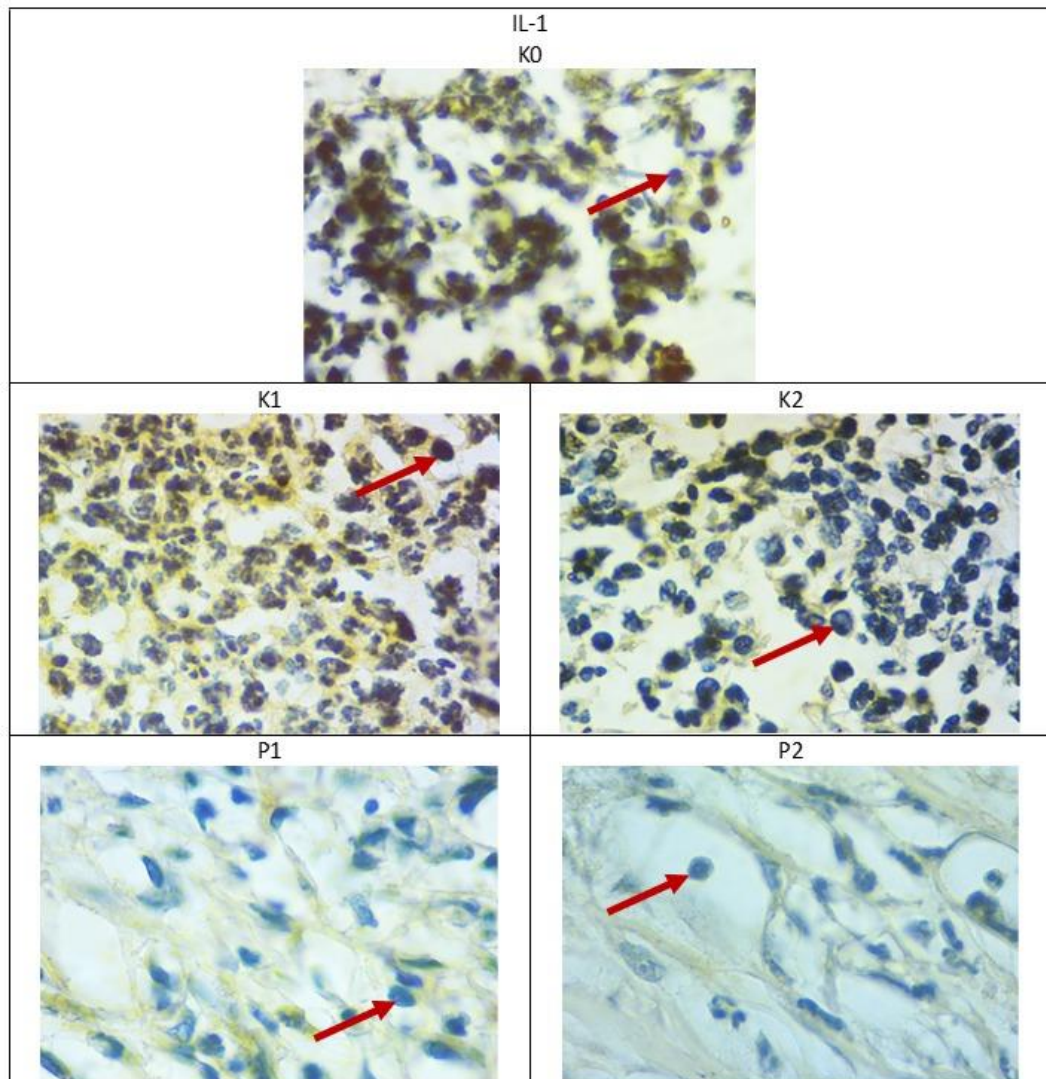
Seluruh kelompok tikus mendapatkan pemberian makanan dan minuman yang sama, dalam sanitasi, temperatur dan kelembaban kandang yang sama dan semuanya tampak menjalani aktivitas normal dan tidak sakit sampai terminasi dilakukan. Tikus diterminasi untuk diambil mandibulanya untuk dievaluasi ekspresi IL1b, IL1ra, Runx2, Osterix, hasil metabolit MDA, dan remodeling tulang melalui pemeriksaan histopatologi kemudian dilakukan analisis terhadap data-data tersebut.

5.3 Perbandingan Ekspresi IL-1, IL-1ra, Runx2, Osterix, Hasil Metabolit MDA, dan Remodeling Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus terhadap Pemberian hUCMSCs dengan Waktu Pengamatan 2 Minggu dan 4 Minggu

Analisis dilakukan pada data hasil perlakuan dan kontrol pada tikus model diabetes mellitus dengan lesi periapikal antara kelompok yang diberi perlakuan hUCMSCs dan tidak, dalam waktu 2 minggu dan 4 minggu. Uji normalitas yang dilakukan menunjukkan distribusi yang normal pada seluruh variabel yang diteliti, sehingga dilakukan analisis pada variabel IL-1, IL-1ra, Runx2, Osterix, MDA, dan remodeling tulang.

5.3.1 Ekspresi IL-1

Ekspresi IL-1 pada berbagai kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.3. Pada Tabel 5.1 didapatkan perbedaan ekspresi IL-1 signifikan ($p=0,000$) antar kelompok penelitian. Perbandingan rerata dapat dilihat pada gambar 5.4. Bila dibandingkan antar dua kelompok, pemberian hUCMSCs 2 minggu dan 4 minggu mengekspresikan IL-1 lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol tanpa hUCMSCs ($p<0.05$).



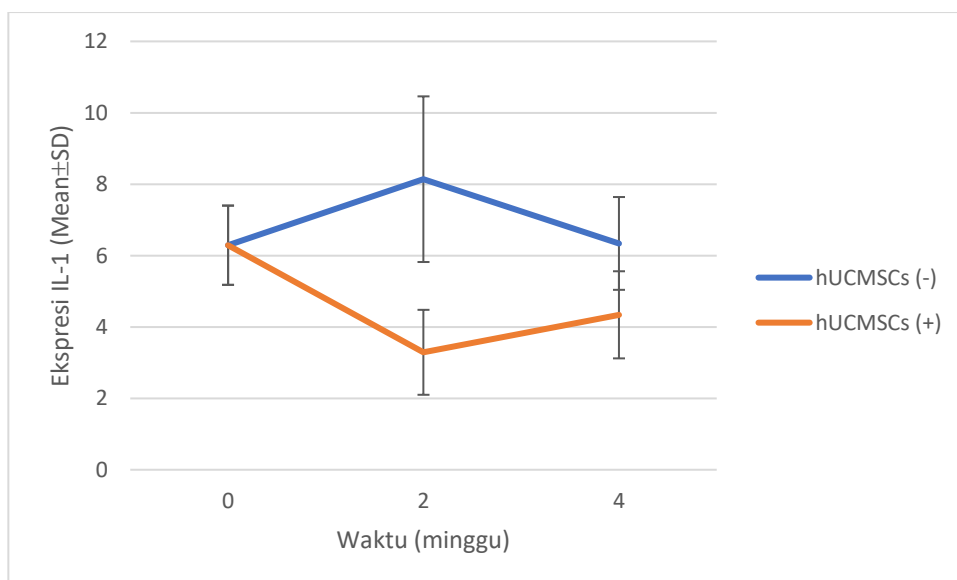
Gambar 5.3 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL-1. Tampak perbedaan ekspresi IL-1 pada sel-sel makrofag diantara kelompok lesi periapikal DM (K0), lesi periapikal DM 2 minggu (K1) dan 4 minggu (K2), lesi periapikal DM dengan perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1) dan 4 minggu (P2) (Pewarnaan IHC, pembesaran 400x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel).

Tabel 5.1 Perbandingan ekspresi IL-1 antara kelompok penelitian

Kelompok	n	Ekspresi IL-1		p
		$\bar{X} \pm SD$	Min-Maks	
Lesi Periapikal DM (K0)	7	6,29 ± 1,11 ^b	4,0 – 7,2	0,000*
Lesi Periapikal DM 2 minggu (K1)	7	8,14 ± 2,32 ^c	4,0 – 11,4	
Lesi Periapikal DM 4 minggu (K2)	7	6,34 ± 1,30 ^b	4,4 – 7,8	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 2 minggu (P1)	7	3,29 ± 1,19 ^a	2,0 – 5,4	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 4 minggu (P2)	7	4,34 ± 1,22 ^a	2,8 – 5,8	

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$ (Oneway Anova)

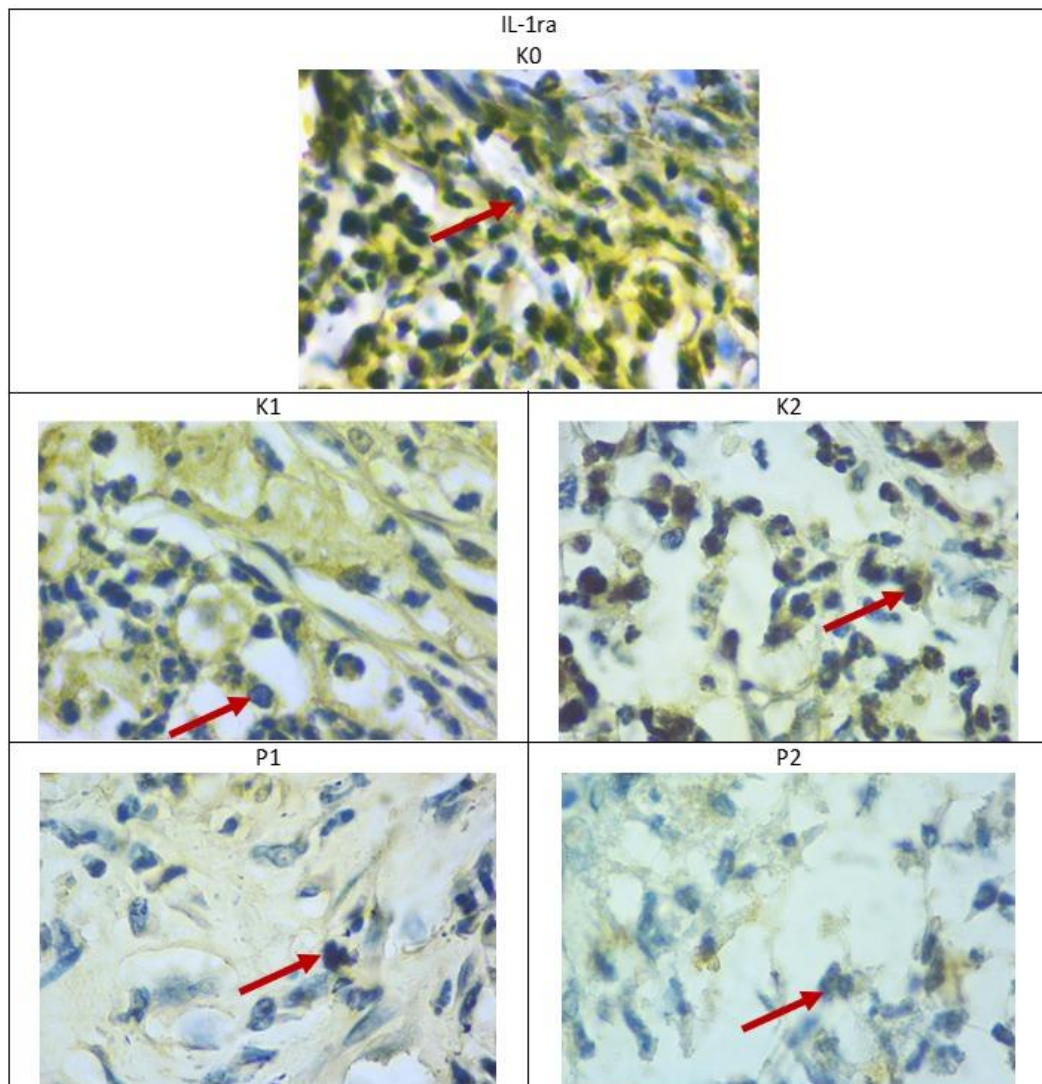
^{abc} superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan adanya antar kelompok (multiple comparisons LSD)



Gambar 5.4 Perbandingan rerata ekspresi IL-1 antar kelompok penelitian.

5.3.2 Ekspresi IL-1ra

Ekspresi IL-1ra pada berbagai kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.5. Pada Tabel 5.2 didapatkan perbedaan ekspresi IL-1ra signifikan ($p=0,000$) antar kelompok penelitian. Perbandingan rerata dapat dilihat pada gambar 5.6. Bila dibandingkan antar dua kelompok, pemberian hUCMSCs 2 minggu dan 4 minggu mengekspresikan IL-1ra lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol tanpa hUCMSCs ($p<0,05$).



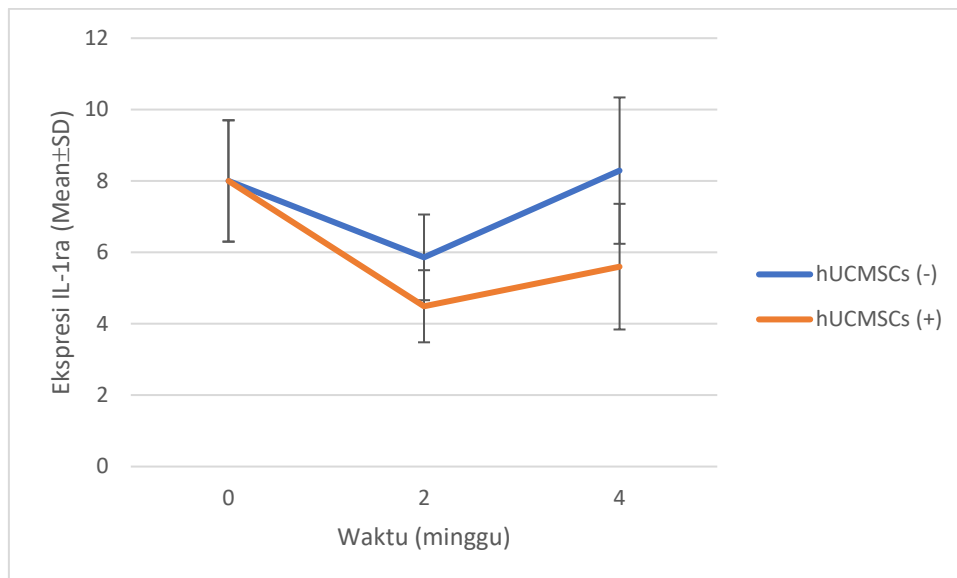
Gambar 5.5 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi IL-1ra. Tampak perbedaan ekspresi IL-1ra pada sel-sel makrofag diantara kelompok lesi periapikal DM (K0), lesi periapikal DM 2 minggu (K1) dan 4 minggu (K2), lesi periapikal DM dengan perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1) dan 4 minggu (P2) (Pewarnaan IHC, pembesaran 400x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel).

Tabel 5.2 Perbandingan ekspresi IL-1ra antara kelompok penelitian

Kelompok	n	Ekspresi IL-1ra		p
		$\bar{X} \pm SD$	Min-Maks	
Lesi Periapikal DM (K0)	7	8,00 \pm 1,70 ^b	5,2 – 10,0	0,000*
Lesi Periapikal DM 2 minggu (K1)	7	5,86 \pm 1,20 ^a	4,2 – 7,4	
Lesi Periapikal DM 4 minggu (K2)	7	8,29 \pm 2,05 ^b	4,6 – 10,2	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 2 minggu (P1)	7	4,49 \pm 1,01 ^a	3,6 – 6,4	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 4 minggu (P2)	7	5,60 \pm 1,76 ^a	3,0 – 7,8	

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$ (Oneway Anova)

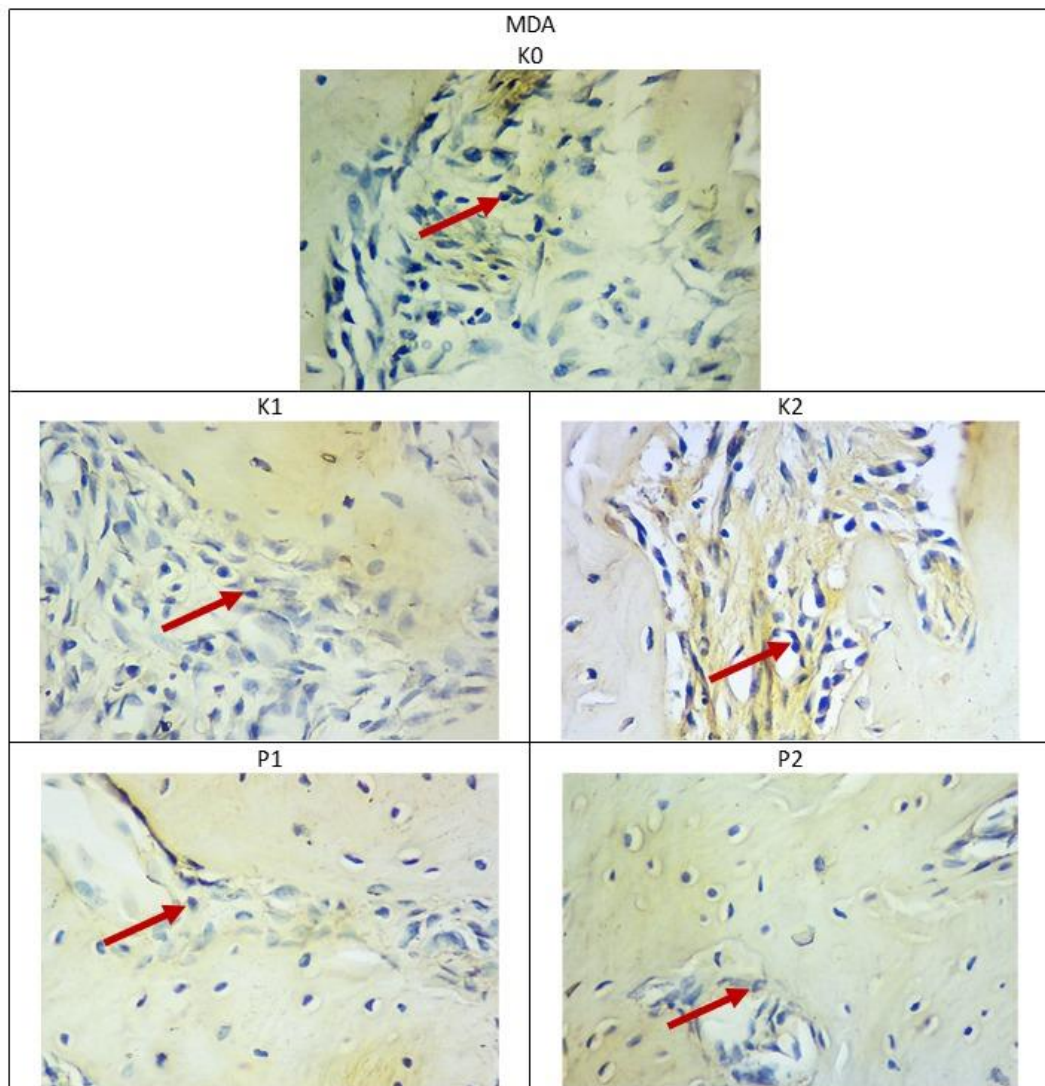
^{ab} superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan adanya antar kelompok (multiple comparisons LSD)



Gambar 5.6 Perbandingan rerata ekspresi IL-1ra antara kelompok penelitian.

5.3.3 Hasil Metabolit MDA

Hasil metabolit MDA pada berbagai kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.7. Pada Tabel 5.3 didapatkan perbedaan hasil metabolit MDA signifikan ($p=0,009$) antar kelompok penelitian. Perbandingan rerata dapat dilihat pada gambar 5.8. Bila dibandingkan antar dua kelompok, pemberian hUCMSCs 2 minggu dan 4 minggu didapatkan metabolit MDA lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol tanpa hUCMSCs ($p<0,05$).



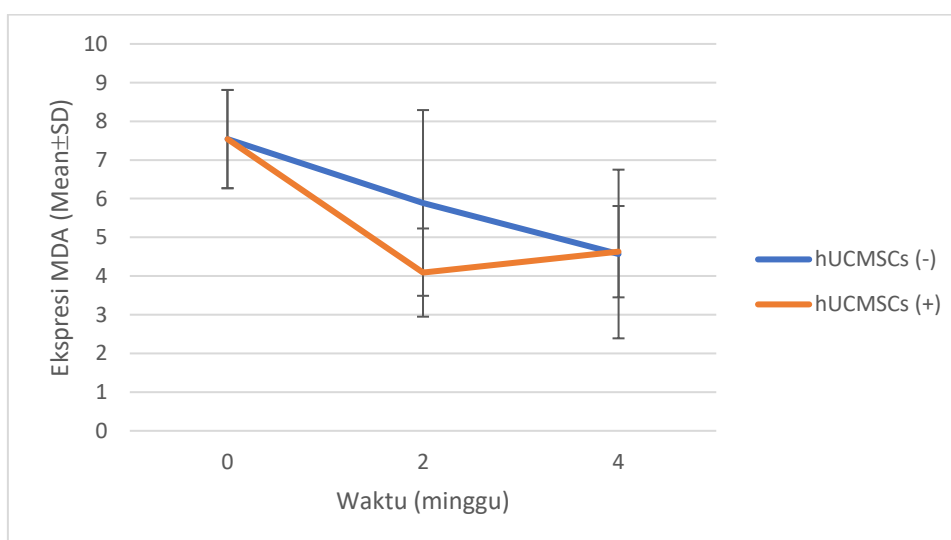
Gambar 5.7 Hasil pemeriksaan imunohistokimia hasil metabolit MDA. Tampak perbedaan pada sel-sel osteoblas diantara kelompok lesi periapikal DM (K0), lesi periapikal DM 2 minggu (K1) dan 4 minggu (K2), lesi periapikal DM dengan perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1) dan 4 minggu (P2) (Pewarnaan IHC, pembesaran 400x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel).

Tabel 5.3 Perbandingan hasil metabolit MDA antara kelompok penelitian

Kelompok	n	Hasil Metabolit MDA			p
		$\bar{X} \pm SD$	Median	Min-Maks	
Lesi Periapikal DM (K0)	7	7,54 ± 1,27	8,0 ^b	5,2 – 8,8	0,009*
Lesi Periapikal DM 2 minggu (K1)	7	5,89 ± 2,40	6,2 ^{ab}	2,0 – 9,6	
Lesi Periapikal DM 4 minggu (K2)	7	4,57 ± 2,18	5,2 ^a	1,8 – 7,8	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 2 minggu (P1)	7	4,09 ± 1,14	3,8 ^a	2,8 – 5,8	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 4 minggu (P2)	7	4,63 ± 1,18	4,4 ^a	3,6 – 7,2	

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test)

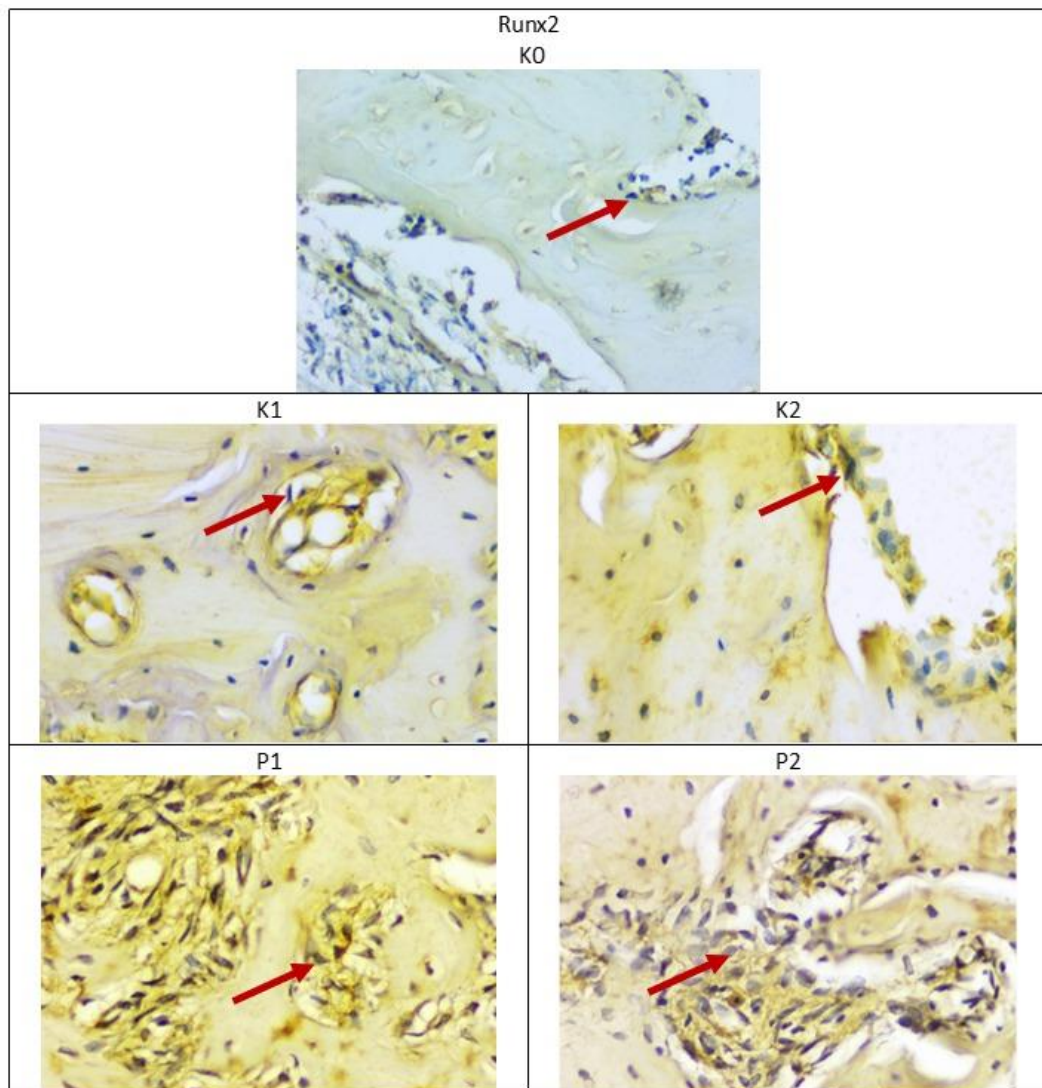
^{ab} superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan adanya antar kelompok (Mann-Whitney test)



Gambar 5.8 Perbandingan rerata hasil metabolit MDA antar kelompok penelitian.

5.3.4 Ekspresi Runx2

Ekspresi Runx2 pada berbagai kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.9. Pada Tabel 5.4 didapatkan perbedaan ekspresi Runx2 signifikan ($p=0,001$) antar kelompok penelitian. Perbandingan rerata dapat dilihat pada Gambar 5.10. Bila dibandingkan antar dua kelompok, pemberian hUCMSCs 2 minggu dan 4 minggu mengekspresikan Runx2 lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol tanpa hUCMSCs ($p<0,05$).



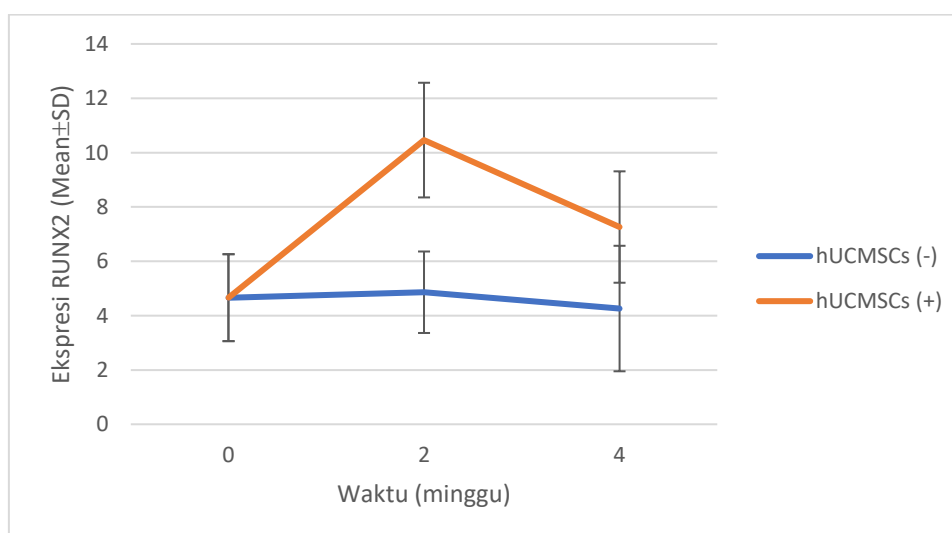
Gambar 5.9 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Runx2. Tampak perbedaan ekspresi Runx2 pada sel-sel osteoblas diantara kelompok lesi periapikal DM (K0), lesi periapikal DM 2 minggu (K1) dan 4 minggu (K2), lesi periapikal DM dengan perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1) dan 4 minggu (P2) (Pewarnaan IHC, pembesaran 400x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel).

Tabel 5.4 Perbandingan ekspresi Runx2 antara kelompok penelitian

Kelompok	n	Ekspresi Runx2			p
		$\bar{X} \pm SD$	Median	Min-Maks	
Lesi Periapikal DM (K0)	7	4,66 ± 1,60	3,8 ^a	3,4 – 7,8	0,001*
Lesi Periapikal DM 2 minggu (K1)	7	4,86 ± 1,50	4,2 ^a	3,0 – 6,8	
Lesi Periapikal DM 4 minggu (K2)	7	4,26 ± 2,31	3,6 ^a	2,4 – 8,6	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 2 minggu (P1)	7	10,46 ± 2,11	11,4 ^b	6,8 – 12,0	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 4 minggu (P2)	7	7,26 ± 2,05	7,0 ^b	4,8 – 10,2	

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test)

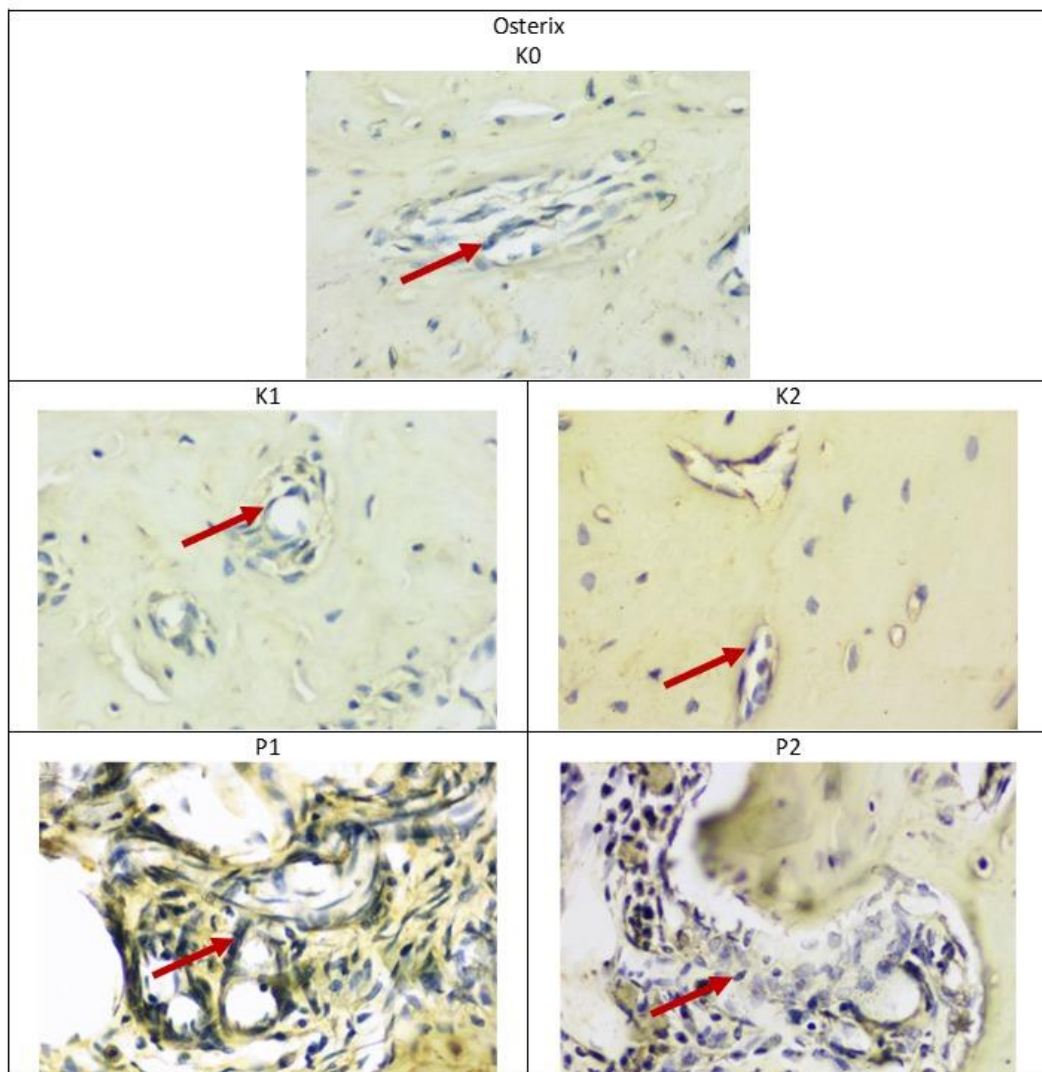
^{abc} superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan adanya antar kelompok (Mann-Whitney test)



Gambar 5.10 Perbandingan rerata ekspresi Runx2 antara kelompok penelitian.

5.3.5 Ekspresi Osterix

Ekspresi Osterix pada berbagai kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.11. Pada Tabel 5.5 didapatkan perbedaan ekspresi Osterix signifikan ($p=0,000$) antar kelompok penelitian. Perbandingan rerata dapat dilihat pada Gambar 5.12. Bila dibandingkan antar dua kelompok, pemberian hUCMSCs 2 minggu dan 4 minggu mengekspresikan Osterix lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol tanpa hUCMSCs ($p<0,05$).



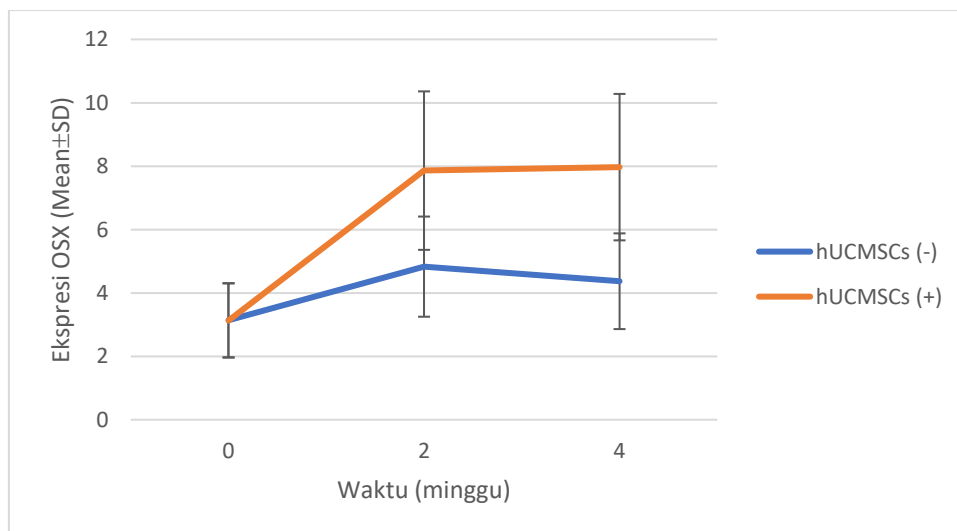
Gambar 5.11 Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Osterix. Tampak perbedaan ekspresi Osterix pada sel-sel osteoblas diantara kelompok lesi periapikal DM (K0), lesi periapikal DM 2 minggu (K1) dan 4 minggu (K2), lesi periapikal DM dengan perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1) dan 4 minggu (P2) (Pewarnaan IHC, pembesaran 400x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel).

Tabel 5.5 Perbandingan ekspresi Osterix antara kelompok penelitian

Kelompok	n	Ekspresi Osterix		p
		$\bar{X} \pm SD$	Min-Maks	
Lesi Periapikal DM (K0)	7	3,14 ± 1,17 ^a	1,6 – 4,8	0,000*
Lesi Periapikal DM 2 minggu (K1)	7	4,83 ± 1,58 ^a	3,2 – 7,4	
Lesi Periapikal DM 4 minggu (K2)	7	4,37 ± 1,51 ^a	2,6 – 7,0	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 2 minggu (P1)	7	7,86 ± 2,50 ^b	4,6 – 10,8	
Lesi Periapikal DM + hUCMSCs 4 minggu (P2)	7	7,97 ± 2,31 ^b	4,0 – 11,4	

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$ (Oneway Anova)

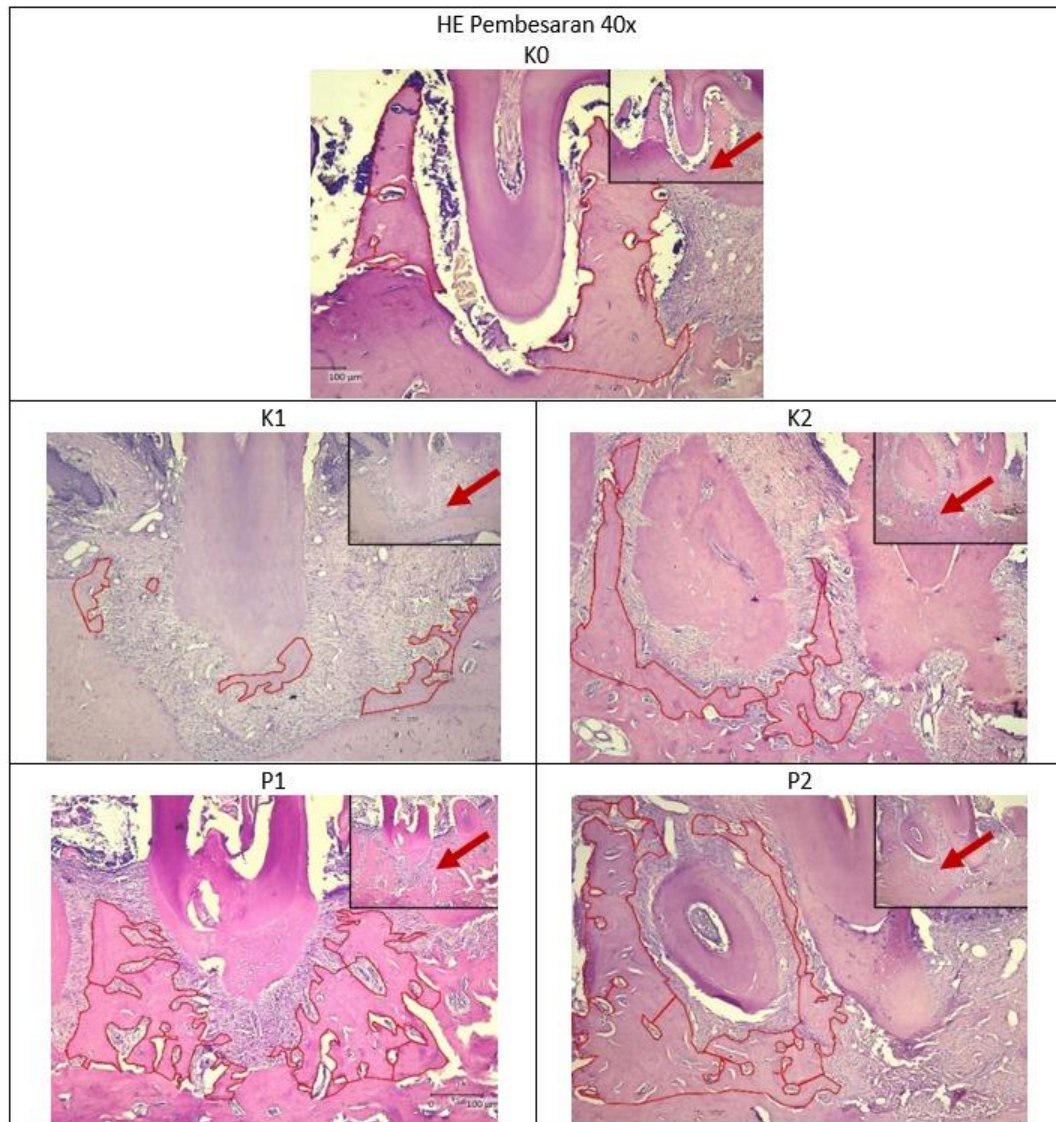
^{ab} superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan adanya antar kelompok (multiple comparisons LSD)



Gambar 5.12 Perbandingan rerata ekspresi Osterix antara kelompok penelitian.

5.3.6 Remodeling Tulang

Remodeling tulang pada berbagai kelompok dapat dilihat pada Gambar 5.13. Pada tabel 5.6 didapatkan remodeling tulang yang signifikan ($p=0,000$) antar kelompok penelitian. Perbandingan rerata remodeling tulang dapat dilihat pada Gambar 5.14. Pemberian hUCMSCs 2 minggu dan 4 minggu memberikan dampak yang signifikan terhadap remodeling tulang ($p>0,05$).



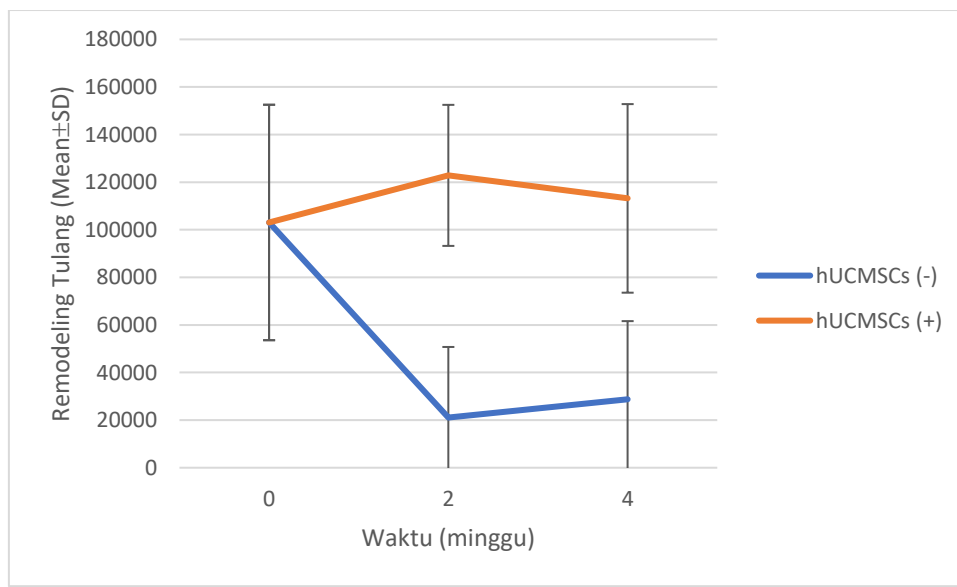
Gambar 5.13 Hasil pemeriksaan HE pembesaran 40x. Tampak remodeling tulang diantara kelompok lesi periapikal DM (K0), lesi periapikal DM 2 minggu (K1) dan 4 minggu (K2), lesi periapikal DM dengan perlakuan hUCMSCs 2 minggu (P1) dan 4 minggu (P2) (*Pewarnaan HE, pembesaran 40x, mikroskop Nikon H600L, kamera DS Fi2 300 megapixel*).

Tabel 5.6 Perbandingan remodeling tulang antara kelompok penelitian

Kelompok	n	Remodeling Tulang (μm^2)			p
		$\bar{X} \pm \text{SD}$	Median	Min-Maks	
Lesi Periapikal DM (K0)	7	103052,91 \pm 49479,71	101742,00 ^b	24433,17 – 165758,91	0,000*
Lesi Periapikal DM 2 minggu (K1)	7	21087,07 \pm 29633,55	0,00 ^a	0,00 – 68269,82	
Lesi Periapikal DM 4 minggu (K2)	7	28812,81 \pm 39618,70	0,00 ^a	0,00 – 99375,59	
Lesi Periapikal DM+hUCMSCs 2 minggu (P1)	7	122846,95 \pm 29659,11	123705,38 ^b	82530,59 – 166974,55	
Lesi Periapikal DM+hUCMSCs 4 minggu (P2)	7	113171,48 \pm 32793,36	126002,37 ^b	71019,93 – 152117,68	

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$ (Kruskal-Wallis test)

^{ab} superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan adanya antar kelompok (Mann-Whitney test)



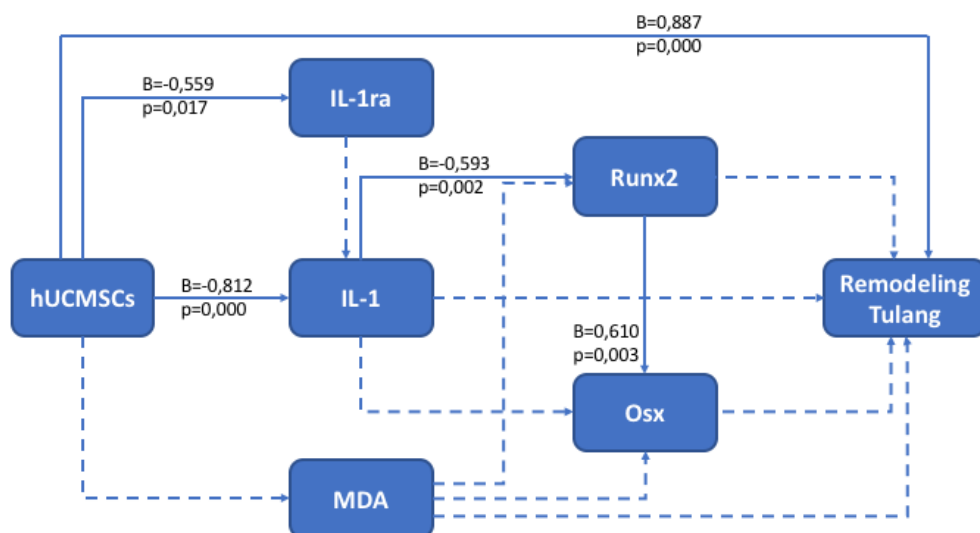
Gambar 5.14 Perbandingan rerata remodeling tulang antara kelompok penelitian.

5.4 Hasil Analisis Jalur Regenerasi Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus

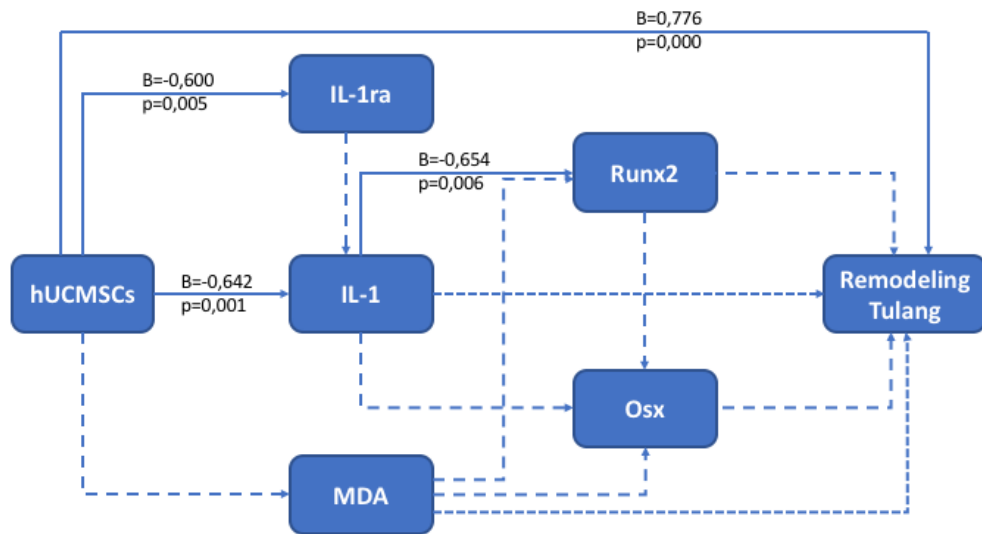
Hubungan kausalistik antar variabel diketahui dengan melakukan pengujian regresi dengan model analisis jalur yang didasarkan pada teori yang mendasari penelitian ini. Hasil analisis jalur dan kekuatan hubungan secara lengkap dapat dilihat pada Gambar 5.16 dan 5.17.

Pada analisis jalur pemberian hUCMSCs selama 2 minggu terdapat lima jalur bermakna. Jalur bermakna terjadi antara hUCMSCs dengan IL-1 ($p=0,000$; $B=-0,812$), antara hUCMSCs dengan IL-1ra ($p=0,017$; $B=-0,559$), antara hUCMSCs dengan remodeling tulang ($p=0,000$; $B=0,887$), kemudian antara antara IL-1 dengan Runx2 ($p=0,002$; $B=-0,593$), dan antara Runx2 dengan Osterix ($p=0,003$; $B=0,610$).

Pada analisis jalur pemberian hUCMSCs selama 4 minggu terdapat empat jalur bermakna. Jalur bermakna terjadi antara hUCMSCs dengan IL-1 ($p=0,001$; $B=-0,642$), antara hUCMSCs dengan IL-1ra ($p=0,005$; $B=-0,600$), antara IL-1 dengan Runx2 ($p=0,006$; $B=-0,654$), kemudian antara hUCMSCs dengan remodeling tulang ($p=0,000$; $B=0,776$).



Gambar 5.15 Mekanisme remodeling tulang lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus dengan perlakuan hUCMSCs 2 minggu.



Gambar 5.16 Mekanisme remodeling tulang lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus dengan perlakuan hUCMSCs 4 minggu.

BAB 6

PEMBAHASAN

Gangguan kesehatan yang terjadi pada setiap individu dengan penyakit sistemik khususnya diabetes mellitus dan segala komplikasinya akan mempengaruhi keadaan tulang dan proses penyembuhan dari infeksi yang terjadi. Kondisi hiperglikemia dan peningkatan advanced glycation end product (AGE) pada penderita diabetes mellitus menyebabkan gangguan pada mesenchymal stem cells, yaitu sel punca yang menjadi sumber osteoprogenitor dan osteoblast pada jaringan tulang (Weinberg *et al.*, 2014).

Pada penderita diabetes mellitus, MSC mengalami penurunan dalam pertumbuhan dan diferensiasi secara osteogenic (Prieto *et al.*, 2017). Defek pada MSC ini menurunkan proliferasi dan diferensiasi osteoblastik sehingga akhirnya menurunkan densitas tulang. Beberapa penelitian menunjukkan MSC yang diambil dari sumsum tulang dan dikulturkan secara *in vitro* dapat mengembalikan keseimbangan yang baik pada tulang yang mengalami osteopenia (Gasser, 2003).

Penurunan kualitas tulang secara sistemik pada penderita diabetes mellitus juga terjadi pada tulang alveolar dan dapat menyebabkan lepasnya sejumlah gigi. Hal ini menyebabkan masalah besar dalam bidang konservasi gigi, terutama dalam hal kegagalan perawatan endodontik.

Penelitian ini memberikan kontribusi keilmuan dalam bidang rekayasa jaringan dan ilmu kedokteran gigi khususnya ilmu konservasi gigi dan endodontik. Pertama, hasil penelitian ini mengungkapkan sumber sel punca hUCMSCs dan potensi osteogenic *in vitro* yang dihasilkan. Kedua, hasil penelitian ini dapat

mengungkapkan mekanisme regenerasi tulang pasca pemberian sel punca pada gigi dengan lesi periapical. Ketiga, hasil penelitian ini bertujuan untuk meneliti potensi aplikasi klinis hUCMSCs dalam prosedur rekayasa jaringan untuk mendapatkan regenerasi tulang pada daerah lesi periapikal gigi.

Sampai saat ini penelitian rekayasa jaringan dengan hewan coba untuk penyembuhan defek tulang lesi periapikal maupun regenerasi tulang lebih sering dilakukan pada defek tulang panjang dan menggunakan sel punca yang berasal dari BMMSC. Autologous BMMSC memiliki kekurangan yaitu morbiditas akibat prosedur invasif dengan melakukan aspirasi sumsum tulang pada penderita dan kualitas MSC yang berasal dari BMMSC dipengaruhi oleh kondisi sistemik dan usia penderita (Ilancheran *et al.*, 2007). Penelitian sebelumnya dengan hUCMSCs pada tikus model osteoporosis menunjukkan hasil yang baik (Hendrijantini, 2015). Dengan pertimbangan ini, timbul pemikiran untuk menggunakan sel dari sumber hUCMSCs karena tidak dipengaruhi kondisi sistemik dan usia penderita.

Jenis MSC alogenik yang menjadi pilihan adalah *human umbilical cord mesenchymal stem cells* (hUCMSCs). Sel punca ini (hUCMSCs) memiliki beberapa kelebihan, yaitu teknik pengambilan yang tidak invasif, mudah didapatkan, merupakan bahan yang tidak terpakai, dan dapat disimpan dalam jangka waktu lama untuk terapi sel punca dan terbukti dapat dimanfaatkan sebagai terapi berbagai macam penyakit. Sel punca jenis ini juga mempunyai sifat anti inflamasi, memiliki imunogenisitas yang rendah sehingga dapat menghindari rejeksi jaringan dan sistem imun. Selain itu hUCMSCs juga memiliki kemampuan ekspansi tinggi dan *doubling time* yang pendek bila dibandingkan dengan sel punca dewasa (Wang *et al.*, 2011; Ilancheran *et al.*, 2007).

6.1 Isolasi, Kultur dan Karakterisasi hUCMSCs

Pada penelitian ini tali pusat diambil pada saat persalinan perabdominam atau *cesarean section* di bawah kondisi aseptik. Hal ini bertujuan untuk mencegah terjadinya kontaminasi tali pusat sehingga pengambilan sampel lebih terjamin. Pengambilan tali pusat pada persalinan pervaginam akan menyebabkan jaringan terkontaminasi terutama jamur, kontaminasi ini menyebabkan pertumbuhan jamur pada kultur sel dan menyebabkan kegagalan kultur sel punca tersebut.

Isolasi dan kultur dilakukan sesuai dengan prosedur yang telah diterapkan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca Universitas Airlangga dan telah terbukti efektif terhadap hUCMSCs sehingga menghasilkan bentukan karakteristik MSC spindle atau seperti sel fibroblas. Metode tersebut direkomendasikan dan telah digunakan pada penelitian terdahulu (Hendrijantini, 2015). Kemudian dilakukan pemeriksaan *flowcytometry* terhadap hUCMSCs hasil isolasi dan kultur tersebut.

Pemeriksaan *flowcytometry* menunjukkan CD73 yang tinggi dibandingkan dengan yang lainnya, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yaitu CD73 merupakan penanda utama yang diekspresikan oleh MSC Wharton's jelly (Chatzistamatiou *et al.*, 2014). Ekspresi CD90 juga didapatkan pada pemeriksaan *flowcytometry*. Hal ini sesuai dengan penelitian Rammal (2013). CD90 ini diekspresikan pada saat proliferasi dan akan menurun saat sel matang menjadi osteoblast-like (Wiesmann *et al.*, 2006). Hanya sebagian kecil subpopulasi hUCMSC yang mengekspresikan CD105. Hal ini terjadi seperti penelitian Levi (2011) yang menunjukkan ekspresi CD105 yang rendah menyebabkan MSC dari

adipose menjadi bersifat osteogenesis. CD105 diekspresikan maksimal pada awal passage dan menurun hingga 2% pada passage ketiga dan keempat (Leyva-Levy *et al.*, 2013). Ekspresi negatif CD 45 didapatkan pada pemeriksaan *flowcytometry*. Hal ini sesuai dengan karakter MSC, karena CD45 merupakan penanda hematopoetik.

6.2 Pemilihan Subjek Penelitian dan Pembuatan Lesi Periapikal Gigi Tikus

Model Diabetes Mellitus

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus *Rattus norvegicus strain Wistar*. Tikus ini dapat dijadikan model eksperimental klinik karena mudah perawatannya dan memiliki waktu regenerasi yang cepat. Selain itu, penelitian ini secara etik tidak dapat dilakukan pada manusia, karena harus dilakukan ekstraksi mandibula untuk melakukan evaluasi secara histopatologis.

Transplantasi MSC alogenik atau transplantasi yang dilakukan sesama manusia akan menghadapi kendala etik jika dilakukan pada penelitian ini, sedangkan jika dilakukan pada sesama hewan akan menghadapi kendala teknis dalam pengambilan tali pusat hewan coba, sehingga pada penelitian ini dilakukan transplantasi MSC xenogenik yaitu deponir hUCMSCs pada saluran akar gigi tikus dengan lesi periapikal. Permasalahan utama pada transplantasi sel punca xenogenik adalah aspek imunologik yaitu terjadinya penolakan sel donor oleh sistem imun jaringan penerima dikarenakan adanya inkompatibilitas imun. Salah satu keunggulan dalam penggunaan hUCMSCs yaitu memiliki sifat imunogenisitas yang rendah (Guo *et al.*, 2011), sehingga prosedur transplantasi MSC xenogenik

tidak berpotensi menimbulkan reaksi penolakan yang dapat mempengaruhi proses regenerasi tulang pada lesi periapikal.

Tikus merupakan hewan coba yang sering digunakan untuk model diabetes mellitus (Fajardo *et al.*, 2014). Model diabetes ini diperoleh dengan injeksi streptozotocin untuk menghasilkan metabolisme yang menyerupai kondisi diabetes mellitus pada manusia (Gheibi *et al.*, 2017; Cintra *et al.*, 2013). Tikus Wistar memiliki struktur anatomi jaringan pulpa dan periapikal yang menyerupai manusia (Prieto *et al.*, 2017).

Tikus yang dilakukan induksi lipopolisakarida untuk menghasilkan lesi periapikal adalah model hewan coba preklinik yang baik dan dapat memberikan gambaran klinis terjadinya kerusakan pada daerah periapikal (Wolle *et al.*, 2013). Respon inflamasi periapikal memberikan model yang sesuai untuk mempelajari berbagai aspek pathogenesis, respon imun dan regulasinya pada jaringan, terutama tulang alveolar (Cintra *et al.*, 2013). Pada penelitian ini kadar glukosa hewan coba diperiksa secara berkala setelah induksi streptozotocin *multiple low dose* hingga proses terminasi hewan coba dengan kadar ≥ 300 mg/dl (Suryani *et al.*, 2013; American Diabetes Association, 2015; Kerner & Bruckel, 2014).

6.3 Pemberian hUCMSCs secara Lokal pada Saluran Akar Gigi untuk Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus

Belum ada penelitian yang melakukan metode seperti pada penelitian ini, dimana dilakukan deponir secara langsung pada saluran akar gigi secara lokal pada gigi tikus model diabetes mellitus dengan lesi periapikal. Pada penelitian sebelumnya, pemberian MSC secara injeksi pada tulang alveolar mandibula

memberikan hasil yang bagus (Hendrijantini, 2015) selain itu injeksi MSC pada femur juga menghasilkan peningkatan ketebalan tulang trabekula (Wang *et al.*, 2006). Metode deponir MSC ke dalam saluran akar gigi diharapkan akan memudahkan dalam aplikasi hUCMSCs.

Beberapa penelitian menunjukkan pemberian terapi lokal akan memberikan respon lokal yang kuat. Pemberian hUCMSCs eksogen kedalam saluran akar gigi ditujukan sebagai tambahan MSC host yang tidak cukup potensial untuk mempercepat penyembuhan pada kondisi diabetes mellitus. Kualitas MSC host dengan diabetes mengalami penurunan secara permanen, dari segi jumlah, kualitas pertumbuhan, diferensiasi dan tingkat apoptosis yang tinggi (Stolzing *et al.*, 2010). Penelitian ini menunjukkan kemampuan migrasi hUCMSCs secara lokal dari saluran akar gigi ke jaringan tulang terutama pada daerah lesi periapikal. Menarik untuk diteliti lebih lanjut seberapa jauh kemampuan migrasi hUCMSCs dari saluran akar, dengan melabel sel punca.

Pada individu normal, progenitor dari osteoblast yaitu MSC terdapat dalam jumlah sedikit di sumsum tulang. Pada populasi dengan diabetes mellitus MSC akan semakin berkurang sehingga signifikan mengurangi pembentukan tulang yang menyebabkan remodeling tulang terganggu (Stolzing *et al.*, 2010). Keadaan hiperglikemia dengan advanced glycation end-products (AGE) yang tinggi secara terus menerus menyebabkan gangguan proliferasi dan diferensiasi MSC host untuk membentuk tulang (Sui *et al.*, 2017). Pembentukan tulang tergantung pada jumlah dan fungsi MSC host yang tersedia sehingga hal ini menjadi inspirasi peneliti untuk memberi MSC eksogen terhadap tikus model diabetes mellitus.

Keadaan tulang dan jaringan periodontal mempengaruhi keberhasilan perawatan bidang konservasi gigi terutama endodontik. Tulang alveolar sebagai bagian dari jaringan periodontal mengelilingi dan mendukung gigi untuk tetap berada dalam rongga mulut, memberi dukungan, stabilisasi dan mendukung fungsi pengunyahan.

Diabetes mellitus berhubungan erat dengan prognosis perawatan saluran akar dan dapat digolongkan sebagai faktor prognosis preoperatif. Hingga saat ini terapi utama diabetes mellitus adalah dengan pemberian hormone insulin dan obat-obatan pengendali glukosa darah. Terapi ini efektif menurunkan kadar glukosa darah, namun pengaruhnya terhadap keadaan jaringan periodontal dan tulang pada lesi periapikal perlu penelitian klinis lebih dalam (Nagendrababu *et al.*, 2020). Terapi obat-obatan sistemik memerlukan penelitian klinis lebih lanjut untuk melihat efeknya terhadap penderita diabetes, misalnya obat golongan statin justru dapat meningkatkan glikemia (Maki *et al.*, 2016).

Metformin, obat antihiperlikemik golongan biguanide merupakan obat pilihan monoterapi untuk diabetes mellitus yang harus dikonsumsi terus menerus untuk mengendalikan kadar gula darah (Siavash *et al.*, 2017). Metformin dikatakan memiliki efek positif terhadap lesi periapikal pada hewan coba (Wang *et al.*, 2020; Lai *et al.*, 2018), namun obat ini bersifat immunosupresif (Cheng *et al.*, 2020) dan memiliki efek samping serius gastrointestinal pada manusia berupa diare, muntah, dan muntah (Siavash *et al.*, 2017) dan menyebabkan dysbiosis mikrobiota usus (Elbere *et al.*, 2018; Rena *et al.*, 2017).

Metformin juga dapat menyebabkan asidosis laktat, dan merangsang timbulnya mimpi buruk yang abnormal pada manusia (Yanto *et al.*, 2018). Terapi

untuk diabetes lain yaitu dengan injeksi insulin. Meskipun insulin dapat mengontrol kadar glukosa darah tetapi secara klinis insulin dikatakan tidak memperbaiki metabolisme, neuropati, vaskularisasi perifer dan tidak mempengaruhi penyembuhan tulang (La Fontaine *et al.*, 2016).

Pada umumnya penderita dengan diabetes mellitus akan mengalami peradangan jaringan periodontal dan resorpsi tulang alveolar, bahkan cenderung menimbulkan lesi-lesi periapikal yang lebih banyak (Tiburcio-Machado *et al.*, 2017) dan persisten (Sanz *et al.*, 2018). Keadaan ini pada akhirnya mengarah pada kegoyangan gigi dan gigi akan terlepas, walaupun telah dilakukan perawatan endodontik (Cabanillas-Balsera *et al.*, 2019). Sehingga diperlukan suatu temuan yang inovatif yang dapat mendukung terjadinya regenerasi tulang pada kondisi diabetes mellitus.

Beberapa penelitian memanfaatkan rekayasa jaringan menggunakan sel punca untuk regenerasi tulang pada kasus osteoporosis menggunakan hUCMSCs menunjukkan hasil yang baik (Hendrijantini, 2015). Pengaruh hUCMSCs terhadap lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus masih belum dapat dijelaskan secara pasti dan belum diteliti sebelumnya, sehingga penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi hUCMSCs dalam regenerasi tulang alveolar pada lesi periapikal tikus model diabetes mellitus. Hal ini sangat penting untuk diketahui sebagai sumber terapi baru dalam bidang ilmu kedokteran gigi khususnya ilmu konservasi gigi endodontik agar dapat melakukan perbaikan lesi periapikal penderita diabetes mellitus sehingga dapat mendukung dan mempertahankan gigi tersebut didalam rongga mulut selama mungkin.

6.3.1 Pemberian hUCMSCs terhadap Inflamasi pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus

Lesi patologis yang terbentuk pada daerah periapikal merupakan bentuk peradangan yang paling sering terjadi dan melibatkan berbagai macam biomarker (Braz-Silva *et al.*, 2019). Lesi periapikal pada subyek diabetes mellitus terjadi karena adanya respon inflamasi. Inflamasi ini disertai dengan aktivitas resorpsi tulang. Aktivitas resorpsi ini salah satunya sangat dipengaruhi oleh IL-1, baik IL-1a maupun IL-1b.

Pada penelitian ini digunakan ekspresi IL-1b karena banyak berpengaruh pada penderita diabetes (Ndip *et al.*, 2016) dan dominan pada lesi periapikal manusia (Cheng *et al.*, 2020). Ekspresi tersebut ditemukan pada makrofag (Marton dan Kiss, 2014), sebagai respon dari adanya lipopolisakarida (Park *et al.*, 2016). Lipopolisakarida merupakan endotoksin bakteri Gram negatif yang akan mengaktifkan sitokin-sitokin pro-inflamasi (Blufstein *et al.*, 2018; Keong *et al.*, 2020) terutama IL-1 beta, IL-6, dan IL-8 yang merangsang resorpsi tulang alveolar dan menghancurkan jaringan periodontal (Cheng *et al.*, 2020; Kato *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2004).

Lesi periapikal terdiri atas komponen sel-sel inflamasi dan non-inflamasi. Sel-sel inflamasi antara lain terdiri atas makrofag, sel plasma dan eosinophil sedangkan komponen sel-sel non-inflamasi antara lain terdiri atas fibroblast, endotel, osteosit, osteoblas, dan osteoklas. Pada penelitian ini pengamatan difokuskan pada ekspresi makrofag karena makrofag memegang peranan penting dan memiliki dua polarisasi dalam regulasi inflamasi di area lesi, yaitu terdiri atas makrofag M1 dan makrofag M2 (Li *et al.*, 2018).

Makrofag menjadi poin penting karena banyak ditemukan pada lesi periapikal (Hasegawa *et al.*, 2021). Makrofag M1 yang teraktivasi memiliki fungsi pro-inflamasi dan menghasilkan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1b, IL-6, dan TNF-a sedangkan makrofag M2 memiliki fungsi anti-inflamasi dan menghasilkan sitokin seperti IL-1ra (Luz-Crawford *et al.*, 2016), IL-10, VEGF dan TGF-b (Park *et al.*, 2016). Mediator-mediator ini berperan dalam menentukan progresifitas lesi, kerusakan tulang, dan remodeling lesi periapikal (Diniz *et al.*, 2021).

Interleukin-1b yang dihasilkan oleh makrofag berperan dalam fase inflamasi dan penyembuhan lesi, termasuk pembentukan eksudat dan ukuran lesi (Marton dan Kiss, 2014). IL-1b berperan penting dalam perkembangan lesi periapikal karena mempengaruhi inflamasi, regulasi respon imun, dan resorpsi tulang (Cheng *et al.*, 2020). IL-1b ditemukan meningkat pada lesi periapikal sesuai dengan keparahan inflamasinya (Yang *et al.*, 2018) dan pada keadaan normal akan menurun setelah dilakukan perawatan endodontik (Diniz *et al.*, 2021). Ekspresi IL-1b yang tinggi akibat aktivasi makrofag pada kondisi diabetes mellitus berhubungan erat dengan terjadinya abses periapikal simptomatik sehingga menyebabkan kegagalan perawatan saluran akar (Marton dan Kiss, 2014).

Pada kondisi homeostasis, ekspresi IL-1b yang meningkat akan diseimbangkan oleh IL-1ra. IL-1ra memiliki fungsi sebagai reseptor antagonis kompetitif yang menghambat aktivitas dari IL-1a dan IL-1b (Luz-Crawford *et al.*, 2016). Keseimbangan antara ekspresi IL-1 khususnya IL-1b dan IL-1ra mempengaruhi fisiologi dan patofisiologi jaringan (Arend, 2002) dalam hal ini yaitu lesi periapikal. Pada kondisi ekspresi IL-1b yang meningkat diperlukan peningkatan ekspresi IL-1ra untuk mengimbangi dan menurunkan inflamasi yang

terjadi pada jaringan tersebut. Pada kondisi diabetes mellitus terjadi ekspresi berlebihan IL-1b atau ekspresi IL-1ra yang terlalu rendah sehingga diperlukan terapi untuk meningkatkan ekspresi IL-1ra tersebut untuk mencegah kerusakan jaringan yang berkepanjangan (Arend, 2002).

Berdasarkan hasil penelitian ini, hUCMSCs berhasil menyeimbangkan ekspresi IL-1b dan IL-1ra, yaitu pada keadaan awal terbentuknya lesi periapikal, ekspresi IL-1b tinggi, di saat yang sama ekspresi IL-1ra juga tinggi dan ekspresi keduanya sama-sama menurun secara signifikan pada minggu kedua ($p=0,000$) dan minggu keempat ($p=0,000$). Pada kelompok kontrol ekspresi IL-1b dan IL-1ra pada minggu keempat kembali seperti keadaan awal dengan ekspresi IL-1b dan IL-1ra yang tinggi, hal ini menunjukkan reaksi inflamasi yang berkepanjangan.

Reaksi inflamasi pada jaringan lesi periapikal merupakan respon dari infeksi saluran akar, dalam hal ini endotoksin bakteri lipopolisakarida. Perubahan yang terjadi merupakan suatu proses pro dan anti-inflamasi yang selalu berubah dan merupakan keseimbangan antara kerusakan jaringan dan regenerasi, proteksi terhadap jejas dan proses perbaikan yang terus berubah sejalan dengan waktu.

6.3.2 Pemberian hUCMSCs terhadap Stres Oksidatif pada Lesi Periapikal

Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus

Kondisi diabetes mellitus pada manusia dan hewan coba menunjukkan massa tulang dan penyembuhan yang rendah karena tidak terjadi pembentukan tulang, hal ini disebabkan karena rendahnya jumlah sel-sel osteoprogenitor pada sumsum tulang akibat apoptosis karena kadar advanced glycation end products (AGEs) yang tinggi (Weinberg *et al.*, 2014). Berkurangnya jumlah osteoprogenitor

endogen pada sumsum tulang subyek diabetes mellitus dan menyebabkan kekurangan jumlah osteoblas yang diperlukan untuk remodeling dan penyembuhan tulang (Thraikill *et al.*, 2005).

Keadaan stress oksidatif ini diperparah dengan kadar *reactive oxygen species* (ROS) intraseluler yang tinggi, berupa produk akhir malondialdehide (MDA). Hasil metabolit MDA dapat digunakan sebagai indikator penting terjadinya lipid peroksidase baik secara in-vitro maupun in-vivo (Gumasta *et al.*, 2019). MDA merupakan produk akhir yang utama dari reaksi rantai klasik radikal hidroksil (Araujo *et al.*, 2017). MDA secara signifikan meningkat pada subyek diabetes (Weinberg *et al.*, 2014). Hasil metabolit MDA yang meningkat pada sel menandakan terjadinya peningkatan degenerasi sel tersebut (Gumasta *et al.*, 2019).

Pada penelitian ini didapatkan hasil metabolit MDA yang berbeda signifikan antara kelompok kontrol awal dengan kelompok pemberian hUCMSCs pengamatan 2 dan 4 minggu. Perbedaan signifikan tidak ditemukan antara kelompok kontrol 2 dan 4 minggu dengan perlakuan hUCMSCs 2 dan 4 minggu. Hal ini menunjukkan bahwa hUCMSCs potensial untuk menurunkan hasil metabolit MDA pada osteoblas, Temuan ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol 2 dan 4 minggu terdapat faktor atau mekanisme lain yang ikut mempengaruhi hasil metabolit MDA sehingga pada pengamatan 2 dan 4 minggu jumlahnya dapat menurun setara dengan hasil metabolit MDA setelah pemberian hUCMSCs dan memerlukan penelitian lebih dalam.

Hasil metabolit MDA menggambarkan adanya ketidakseimbangan oksidasi atau stress oksidatif pada lesi periapikal, baik karena banyaknya ROS atau rendahnya pertahanan antioksidan di area tersebut. ROS pada konsentrasi tinggi

akan menekan pembentukan tulang alveolar dengan cara menghambat diferensiasi osteoblas, namun pada konsentrasi rendah dan paparan yang terus menerus sebaliknya akan merangsang diferensiasi osteoblas, dengan didukung oleh faktor transkripsi Runx2 dan Osterix untuk membentuk tulang (Hernandez-Rios *et al.*, 2017).

Hasil metabolit MDA yang tidak signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan hUCMSCs 2 dan 4 minggu dapat menggambarkan keadaan diabetes mellitus hewan coba, hal ini ditunjang pada pemeriksaan glukosa darah tikus yang kadarnya > 300 mg/dl pada semua kelompok penelitian, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan hUCMSCs. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk melihat pengaruh pemberian hUCMSCs yang dilakukan lebih dari satu kali atau dengan metode pemberian yang berbeda.

6.3.3 Pemberian hUCMSCs terhadap Osteoblastogenesis, Mineralisasi dan Regenerasi Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus

Pada proses osteoblastogenesis, MSC yang pada penelitian ini berasal dari hUCMSCs akan menjalankan fungsi parakrin, autokrin, dan akan mengalami beberapa perubahan yaitu menjadi osteoprogenitor hingga akhirnya menjadi osteoblast. Osteoblas akan terbentuk dari MSC yang melakukan diferensiasi osteogenik (Marie dan Kassem, 2011). Diferensiasi osteogenik diregulasi oleh faktor transkripsi runt-related transcription factor 2 (Runx2) dan Osterix (Osx) (Perez-Campo *et al.*, 2016; Nakashima *et al.*, 2002). Dalam proses ini didapatkan penanda osteoblastogenesis yang dapat dievaluasi yaitu faktor transkripsi Runx2 dan Osterix yang ekspresinya diperiksa dalam penelitian ini.

Diferensiasi osteoblas memiliki peranan penting dalam pembentukan tulang dan menjaga keseimbangan pada remodeling tulang. Runx2 merupakan faktor transkripsi sentral yang meregulasi diferensiasi osteoblast dan meningkatkan mineralisasi tulang (Hou *et al.*, 2019). Ekspresi Runx2 menjadi perhatian dalam penelitian ini karena Runx2 memiliki hubungan langsung dengan peradangan periapikal yang persisten, dan berperan dalam regenerasi tulang setelah perawatan saluran akar (Kuchler *et al.*, 2020)

Didapatkan perbedaan ekspresi Runx2 yang signifikan pada seluruh kelompok penelitian ($p=0,000$). Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok kontrol awal (K0), kontrol 2 minggu (K1) dan 4 minggu (K2). Hasil ekspresi Osterix didapatkan hasil yang hampir sama dengan ekspresi Runx2 yaitu didapatkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Supaya MSC berdiferensiasi menjadi osteoblast diperlukan kombinasi dari berbagai faktor yang meregulasi MSC pada lingkungan mikronya. Kombinasi yang adekuat memberikan aktivasi diferensiasi MSC menuju lineage tertentu melalui beberapa regulator transkripsi spesifik, dalam hal ini ekspresi faktor transkripsi Runx2 dan Osterix (Takahashi *et al.*, 2017).

Runx2 merupakan anggota penting dari golongan faktor transkripsi Runt-related yang meregulasi ekspresi gen yang terlibat dalam diferensiasi seluler maupun progresifitas siklus sel dan merupakan faktor transkripsi sentral yang menginduksi MSC menjadi jalur osteogenik (Artigas *et al.*, 2014) hingga maturasi menjadi osteosit (Gomathi *et al.*, 2020). Runx2 juga berpartisipasi dalam mineralisasi tulang melalui interaksi dengan faktor lain seperti alkaline phosphatase (ALP), Osterix (Osx) dan osteocalcin (Ocn) dengan jalan mengendalikan

diferensiasi osteoblast, produksi matriks, dan mineralisasi selama pembentukan tulang (Hou *et al.*, 2019). Penurunan ekspresi Runx2 erat kaitannya dengan perkembangan tulang abnormal dan pathogenesis osteoporosis (Komori, 2011).

Osterix merupakan faktor transkripsi spesifik dari osteoblas yang diperlukan untuk menginduksi diferensiasi preosteoblas agar berdiferensiasi menjadi osteoblast fungsional yang matang (Nakashima *et al.*, 2002). Osterix merupakan downstream dari Runx2. Runx2 diperlukan untuk diferensiasi progenitor sel menjadi preosteoblas, sedangkan Osterix diperlukan pada tahap lanjut maturasi preosteoblas menjadi osteoblast yang fungsional (Kim *et al.*, 2015). Apabila osterix menurun maka pembentukan tulang akan minimal (Sinha & Zhou, 2013). Pengamatan ekspresi osterix osteoblas pada penderita diabetes menunjukkan ekspresi yang sangat rendah (Miranda *et al.*, 2016). Osterix terekspresi tinggi pada sel-sel osteogenik di daerah periapikal tulang alveolar (Takimoto *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan ekspresi osterix yang meningkat signifikan dibandingkan kelompok kontrol baik pada pengamatan 2 minggu ($p=0,000$) dan 4 minggu ($p=0,000$) setelah pemberian hUCMSCs. Tidak terdapat perbedaan signifikan diantara kelompok kontrol, menunjukkan ekspresi osterix yang tidak membaik. Hal ini menunjukkan bahwa hUCMSCs dapat memperbaiki ekspresi Osterix yang tertekan pada kondisi hiperglikemia akibat diabetes mellitus.

Faktor transkripsi Osterix diperlukan osteoblas untuk maturasi menjadi osteosit dan penting karena faktor ini menginduksi ekspresi osteoblas matur seperti collagen type-1 a1 (Col1a1), Osteonectin, Osteopontin, Osteocalcin, dan Bone sialoprotein (Bsp) yang semuanya diperlukan oleh osteoblas dalam proses pembentukan dan pengendalian massa tulang (Liu *et al.*, 2020).

6.3.4 Pemberian hUCMSCs terhadap Remodeling Tulang pada Lesi Periapikal Gigi Tikus Model Diabetes Mellitus

Remodeling tulang adalah proses yang melibatkan proliferasi sel progenitor pluripotent yang berdiferensiasi menjadi osteoblas. Remodeling tulang pada penderita diabetes akan terhambat karena kondisi hiperglikemia sistemik sebagai akibat gangguan metabolisme dan respon inflamasi sehingga sering menyebabkan komplikasi pada tulang berupa osteoporosis dan resiko fraktur tulang yang meningkat (Weber & Schwartz, 2016; Shah *et al.*, 2015). Remodeling tulang membutuhkan keseimbangan yang tepat antara osteoklas dan osteoblas karena ketidakseimbangan yang terjadi akan mengakibatkan kehilangan tulang berlebihan (Rios-Arce *et al.*, 2020) seperti yang terjadi pada beberapa penyakit metabolik (Hou *et al.*, 2019).

Pada individu normal, progenitor dari osteoblas yaitu MSC terdapat dalam jumlah sedikit di sumsum tulang. Defek jumlah osteoblas dan fungsinya dapat disebabkan oleh defek sel punca secara kuantitatif dan kualitatif (Hendrijantini, 2015). Remodeling tulang melibatkan peran osteoklas dan osteoblas (Lemaire *et al.*, 2004).

Sel punca mesenkimal memiliki peran penting dalam mempengaruhi polarisasi makrofag, dalam hal ini M2 yang berfungsi anti-inflamasi. Penelitian terhadap bone mesenchymal stem cells (BMSC) menunjukkan perubahan polarisasi makrofag dari M1 ke M2 pada penelitian in-vitro (Geng *et al.*, 2017). Makrofag melakukan regulasi diferensiasi osteoklas melalui *macrophage colony-stimulating factor* (M-

CSF), selain itu *receptor activator of nuclear factor kappa B ligand* (RANK-L) juga memiliki peran dalam diferensiasi osteoklas (Catalfamo *et al.*, 2013).

Osteoklas merupakan sel-sel primer yang berperan dalam resorpsi tulang terutama dalam patogenesis penyakit endodontik dan periodontal. Osteoklas berfungsi untuk menghilangkan komponen mineral tulang dengan cara asidifikasi ekstraseluler, kemudian dilanjutkan dengan degradasi matriks protein tulang oleh berbagai protease (Ma *et al.*, 2013). Tulang pada subyek diabetes mellitus memiliki jumlah osteoblast yang lebih rendah dan kehilangan tulang yang tinggi akibat penurunan pembentukan tulang dan peningkatan resorpsi tulang (Lima *et al.*, 2013).

Hiperglikemia pada subyek diabetes mellitus memiliki peran penting dalam diferensiasi osteoklas sehingga mendorong kapasitas resorpsi tulang. Selain hiperglikemia, lipopolisakarida juga ikut berperan dalam mendorong peningkatan resorpsi tulang (Catalfamo *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan remodeling tulang yang signifikan pada seluruh kelompok baik kontrol dan perlakuan hUCMSCs. Hal ini dapat dikarenakan remodeling merupakan proses resorpsi dan pembentukan tulang yang terus terjadi dalam menjaga keadaan yang homeostasis (Niedzwiedzki & Filipowska, 2015). Proses remodeling berlangsung secara kontinyu untuk menjamin perbaikan kerusakan pada arsitektur tulang, melibatkan osteoblast sebagai pembentuk tulang yang akan matur menjadi osteosit dan osteoklas sebagai peresorpsi tulang (Cavalla *et al.*, 2021).

Resorpsi dan pembentukan tulang baru terjadi secara konstan pada kurun waktu yang sama, melalui quiescence, aktivasi, resorpsi, pembentukan, mineralisasi, kembali ke quiescence dan berjalan seterusnya membentuk suatu

siklus (Bayliss, Mahoney, & Monk, 2011). Remodeling akan terganggu bila terjadi peningkatan aktivitas osteoklas atau penurunan aktivitas osteoblas.

Pada penelitian ini didapatkan perbedaan signifikan remodeling tulang yang dilihat dari luas area penulangan (osifikasi) pada daerah periapikal tulang alveolar, secara mikroskopis tampak bentukan tulang yang lebih luas pada area lesi periapikal dengan susunan yang lebih teratur dan padat pada kelompok dengan pemberian hUCMSCs dibandingkan kelompok kontrolnya. Remodeling tulang dapat dilihat secara histologis pada jaringan periodontal secara keseluruhan tetapi diperlukan standar yang baku dan akurat sehingga dapat dipakai sebagai prediktor remodeling tulang (Wagner *et al.*, 2018).

Pemberian hUCMSCs terbukti dapat meningkatkan remodeling tulang pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus. Hal ini dapat didukung oleh efek parakrin dari hUCMSCs, dimana sel punca endogen pada kasus diabetes mellitus jumlahnya sedikit dan kualitasnya inferior, sehingga hUCMSCs akan berfungsi memberikan efek parakrin pada area periapikal secara kontinyu.

Kemungkinan terdapat penanda lain yang berpengaruh dan berperan terhadap komposisi dan struktur lesi periapikal yang terbentuk dan berpengaruh terhadap remodeling tulang, antara lain pengaruh ekspresi, signaling dan stimulasi gen-gen tertentu pada lesi periapikal, atau pengaruh dari mediator tertentu seperti IL-10, OPG, TRAP, kemokin CCL3, CXCR3, CXCL10, sel T (Paula-Silva *et al.*, 2020), dan adanya polimorfisme genetik (Mazzi-Chaves *et al.*, 2018). Selain itu, keadaan tulang pada lesi periapikal dapat dipengaruhi oleh *intercellular adhesion molecule 1* atau ICAM-1 (DeRossi *et al.*, 2020), Nod-like receptor 12 atau NLRP12 (Taira *et al.*, 2019), *growth factor*, *neurotransmitter*, hormon regulasi tulang, sclerostin, dan

serotonin (Niedzwiedzki & Filipowska, 2015), disamping itu juga terdapat pengaruh dari MMP dan TIMP yang saling berkaitan dalam regenerasi jaringan lesi periapikal (Jain & Bahuguna, 2015). Sitokin pro-inflamasi dan anti-inflamasi dapat mempengaruhi langsung progresifitas lesi periapikal, selain itu juga dipengaruhi oleh Th1, Th17, sel B, Th2 dan Treg, dan sel dendritik (Cavalla *et al.*, 2021).

6.4 Analisis Jalur Mekanisme Regenerasi Lesi Periapikal Gigi Tikus Model

Diabetes Mellitus

Analisis terhadap hubungan kausalistik antar variabel pada pemberian hUCMSCs pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus pada penelitian ini dibedakan menjadi dua bagian yaitu pada tahap pengamatan 2 minggu dan 4 minggu. Pada pengamatan 2 minggu didapatkan adanya lima jalur yang nilainya bermakna, yang pertama adalah jalur pemberian hUCMSCs dengan ekspresi IL-1 (B=-0,812). Pemberian hUCMSCs dari luar akan memperbaiki kondisi inflamasi berupa penurunan ekspresi IL-1b pada makrofag.

Jalur kedua adalah jalur pemberian hUCMSCs dengan ekspresi IL-1ra (B=-0,559). IL-1ra sebagai anti inflamasi yang diekspresikan oleh makrofag dipengaruhi oleh hUCMSCs. Pemberian hUCMSCs menurunkan ekspresi IL-1ra, dalam hal ini IL-1ra berfungsi untuk mengimbangi ekspresi IL-1b yang ada agar terjadi homeostasis.

Jalur ketiga adalah jalur ekspresi IL-1 dengan faktor transkripsi osteogenik yaitu Runx2 (B=-0,593). Runx2 sebagai faktor transkripsi utama akan dihasilkan osteoprogenitor untuk memastikan terjadinya diferensiasi osteogenik, dengan menghambat MSC berdiferensiasi menjadi jenis sel yang lain (Pino *et al.*, 2012).

Selanjutnya dengan adanya Runx2 ini didapatkan jalur keempat menuju Osterix (B=0,610). Peran Runx2 ini adalah sebagai faktor transkripsi utama dalam proses diferensiasi pre-osteoblas menjadi osteoblast yang matur. Jalur keempat ini adalah jalur faktor transkripsi Runx2 dengan ekspresi Osterix (B=0,610). Osterix merupakan down regulator dari Runx2, yang berfungsi untuk terjadinya maturasi osteoblas. Peran faktor transkripsi Osterix dipengaruhi oleh Runx2, dan keduanya saling terkait dalam proses diferensiasi dan maturasi osteoblas.

Runx2 berfungsi meningkatkan regulasi ekspresi Osterix dengan jalan mengikat regio promotor Osterix dan mengatur aktivitasnya (Liu *et al.*, 2020). Pada minggu ke 4 jalur pengaruh Runx2 menuju Osterix menjadi tidak bermakna. Hal ini dapat terjadi karena Osterix dapat mengontrol balik ekspresi Runx2, melalui kolaborasi dengan Dlx5 dan Mef2 sehingga dapat memberikan umpan balik terhadap ekspresi Runx2. Osterix juga memiliki kemampuan autoregulasi, disamping itu ekspresinya dapat ditekan oleh signaling *Wingless-related integration site* (Wnt/b-catenin), microRNA (miRNAs) dan *long non-coding RNA* (lncRNAs) (Liu *et al.*, 2020).

Jalur kelima merupakan jalur hUCMSCs dengan remodeling tulang. Peran hUCMSCs terhadap peningkatan remodeling tulang tampak dari luas area penulangan (osifikasi) yang terbentuk pada pengamatan histopatologi. Kemungkinan terdapat faktor-faktor ekspresi lain yang mempengaruhi terjadinya remodeling tulang dari hUCMSCs menuju ke remodeling tulang, hal ini dapat berhubungan dengan fungsi parakrin dan secretome yang dihasilkan oleh hUCMSCs.

Tidak didapatkan jalur bermakna antara pemberian hUCMSCs terhadap hasil metabolit Malondialdehyde (MDA). Hal ini dapat terjadi karena pada kondisi diabetes mellitus, dengan kondisi hiperglikemia yang berkepanjangan menyebabkan stres oksidatif meningkat, sehingga pemberian hUCMSCs kemungkinan memiliki fungsi proteksi yang lain untuk menjaga homeostasis, karena ekspresi ROS yang berlangsung lama dan dalam kadar rendah juga diperlukan untuk kelangsungan diferensiasi osteoblast. Keadaan ini tampak pada pengamatan 4 minggu dimana MDA mempengaruhi terjadinya remodeling tulang.

Pada pengamatan 4 minggu didapatkan empat jalur yang nilainya bermakna, yang pertama yaitu jalur pemberian hUCMSCs dengan ekspresi IL-1 ($B=-0,642$). Pemberian hUCMSCs dari luar akan memperbaiki kondisi inflamasi berupa penurunan ekspresi IL-1b pada makrofag.

Jalur kedua adalah jalur pemberian hUCMSCs dengan ekspresi IL-1ra ($B=-0,600$). IL-1ra sebagai anti inflamasi yang diekspresikan oleh makrofag dipengaruhi oleh hUCMSCs. Pemberian hUCMSCs menurunkan ekspresi IL-1ra, dalam hal ini IL-1ra berfungsi untuk mengimbangi ekspresi IL-1b yang ada agar terjadi homeostasis.

Jalur ketiga adalah jalur ekspresi IL-1 dengan faktor transkripsi osteogenik yaitu Runx2 ($B=-0,654$). Runx2 sebagai faktor transkripsi utama akan dihasilkan osteoprogenitor untuk memastikan terjadinya diferensiasi osteogenik, dengan menghambat MSC berdiferensiasi menjadi jenis sel yang lain (Pino *et al.*, 2012).

Jalur keempat adalah jalur hUCMSCs dengan remodeling tulang ($B=0,776$). Pemberian hUCMSCs terbukti meningkatkan luas area penulangan (osifikasi). Kemungkinan terdapat faktor-faktor ekspresi lain yang mempengaruhi terjadinya

remodeling tulang dari hUCMSCs menuju ke remodeling tulang, hal ini dapat berhubungan dengan fungsi parakrin dan secretome yang dihasilkan oleh hUCMSCs..

Terdapat jalur bermakna antara pemberian hUCMSCs dan remodeling tulang melalui hUCMSCs. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat mekanisme remodeling tulang yang disebabkan oleh pemberian hUCMSCs secara intrapulpa, dengan kekuatan jalur sebesar 0,887 pada pemberian hUCMSCs 2 minggu dan 0,776 pada pemberian hUCMSCs 4 minggu. Hubungan ini terbukti secara mikroskopis pada pemeriksaan preparat histopatologi berupa bentukan struktur jaringan lesi periapikal yang mengalami penyembuhan dengan luas area penulangan (osifikasi) pada daerah lesi periapikal yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol pada rentang waktu yang sama.

6.5 Keterbaruan Penelitian

Penelitian ini adalah yang pertama kali menggunakan hUCMSCs yang ditransplantasikan secara lokal melalui deponir pada ruang pulpa dan saluran akar gigi. Penelitian ini juga yang pertama kali melihat pengaruh hUCMSCs pada lesi periapikal yang disebabkan oleh induksi LPS dan dalam kondisi hiperglikemia pada kasus diabetes mellitus.

Penelitian ini menunjukkan peran hUCMSCs sebagai sumber efek parakrin. Adanya hUCMSCs akan memberikan efek parakrin secara terus menerus pada area periapikal, dimana pada kasus diabetes mellitus jumlah MSC endogen sedikit dan kualitasnya inferior. Penelitian ini menunjukkan kemampuan hUCMSCs dalam regulasi inflamasi pada lesi periapikal, berupa penurunan inflamasi.

Penelitian ini juga menunjukkan peran hUCMSCs dalam regulasi glukosa secara lokal pada daerah periapikal untuk menunjang regenerasi dan remodeling pada lesi periapikal, sehingga preosteoblas bisa berdiferensiasi dengan baik. Pada penelitian ini deponir hUCMSCs terbukti dapat meningkatkan diferensiasi osteogenik secara *in vivo* yang ditunjukkan dengan peningkatan penanda diferensiasi osteogenik seperti Runx2 dan Osterix.

Hasil akhir dari diferensiasi MSC ini akan terbentuk osteoblas yang didapatkan lebih tinggi pada penelitian ini. Hasil ini didukung analisis jalur yang menunjukkan jalur yang bermakna antara hUCMSCs dengan Runx2 dan Osterix. Osteoblas yang lebih banyak dan aktif akan meningkatkan terjadinya mineralisasi dan pembentukan tulang yang ditunjukkan dengan lebih tingginya Osterix sebagai protein utamanya yang ditunjukkan dengan analisis jalur dimana osteoblas berhubungan dengan jalur pembentukan Osterix.

Penelitian ini menunjukkan mekanisme perbaikan tulang lesi periapikal gigi pada tikus model diabetes mellitus setelah pemberian hUCMSCs berdasarkan variabel-variabel yang diteliti. Hasil akhir dari deponir hUCMSCs ini ditunjukkan dengan regenerasi tulang alveolar pada lesi periapikal yang lebih tinggi secara histologis dilihat melalui luas area penulangan (osifikasi) yang terbentuk setelah terjadinya peradangan pada jaringan periapikal.

6.6 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan pengamatan 2 minggu dan 4 minggu, dan tidak didapatkan perbedaan yang signifikan pada remodeling tulang antara kelompok kontrol dan perlakuan pemberian hUCMSCs. Kemungkinan diperlukan

pengamatan pada rentang waktu yang lebih singkat untuk mengamati terjadinya remodeling tulang atau diperlukan pengamatan terhadap marker maturasi tulang, untuk lebih menggambarkan keadaan tulang secara komprehensif karena pada pengamatan 2 minggu hasilnya sudah bagus dan pada pengamatan 4 minggu sudah tidak signifikan hasilnya.

Pada penelitian ini tidak dilakukan pengamatan terhadap waktu yang lama karena pertimbangan ketahanan hewan coba dalam kondisi diabetes mellitus untuk menilai kapan didapatkan penurunan kembali massa tulang secara signifikan. Pada penelitian lain pada penyakit-penyakit degeneratif lainnya, pemberian MSC memberi efek terapeutik namun sering disertai penurunan jumlah MSC yang cepat sehingga memberikan efek lokal jangka pendek. Hal ini perlu untuk dilakukan evaluasi pengulangan pemberian hUCMSCs atau modifikasi hUCMSCs agar memiliki proliferasi lebih tinggi dalam waktu lama, dilakukan pemberian dosis berulang dalam jangka waktu tertentu untuk mendorong percepatan regenerasi tulang pada kasus diabetes mellitus. Perlu pengkondisian hUCMSCs pada keadaan hipoksia untuk menyesuaikan dengan keadaan pada jaringan, selain itu juga melakukan pelabelan hUCMSCs.

Pada penelitian ini tidak dilakukan pemberian obat dressing saluran akar pada saluran akar gigi, hanya dilakukan irigasi saline dan pengeringan saluran akar menggunakan paper point, kemudian dilakukan deponir hUCMSCs secara intrakanal. Pemberian dressing saluran akar dapat memiliki pengaruh terhadap regenerasi tulang tetapi membutuhkan penelitian lebih mendalam. Remodeling tulang pada penelitian ini dievaluasi secara histometrik dengan mengukur secara kuantitatif luas area penulangan (osifikasi) pada daerah periapikal gigi yang

mengharuskan dilakukan terminasi pada hewan coba tikus, berbeda jika dilakukan evaluasi dengan pemeriksaan melalui teknologi *micro computed tomography* (microCT) sehingga dapat mengetahui defek tulang dan lesi periapikal secara tiga dimensi pada beberapa tahapan waktu tanpa harus melakukan terminasi hewan coba, pemeriksaan ini dapat dilakukan untuk proyeksi penelitian lanjutan berikutnya, begitu pula untuk pemeriksaan tambahan lain yang berhubungan dengan patogenesis lesi periapikal (Shen *et al.*, 2021) untuk target terapi tambahan disamping perawatan saluran akar konvensional (Shen & Silva, 2021).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Pemberian hUCMSCs menurunkan ekspresi IL-1 pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus.
2. Pemberian hUCMSCs menurunkan ekspresi IL-1ra pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus.
3. Pemberian hUCMSCs tidak menurunkan hasil metabolit MDA pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus.
4. Pemberian hUCMSCs meningkatkan ekspresi Runx2 pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus.
5. Pemberian hUCMSCs meningkatkan ekspresi Osterix pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus.
6. Pemberian hUCMSCs meningkatkan remodeling tulang pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus.

Pada penelitian ini juga didapatkan mekanisme regenerasi tulang pada lesi periapikal gigi tikus model diabetes mellitus yang diberikan hUCMSC dari luar. Keberhasilan penggunaan hUCMSCs dalam meningkatkan remodeling tulang melalui pemberian secara intrapulpa dan intrakanal, dapat menurunkan inflamasi dan meningkatkan remodeling tulang berupa peningkatan luas area penulangan (osifikasi) pada daerah lesi periapikal gigi pada kasus diabetes mellitus dimana sel punca endogen kualitasnya inferior dan jumlahnya sedikit.

7.2 Saran

Penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar pengembangan ilmu dengan:

1. Melakukan pengembangan penggunaan hUCMSCs sebagai modalitas terapi dalam bidang konservasi gigi khususnya endodontik regeneratif.
2. Melakukan penelitian dengan pemberian hUCMSCs secara bertahap.
3. Melakukan penelitian untuk meningkatkan kemampuan hUCMSCs agar memiliki proliferasi dan viabilitas lebih tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Allahem Z. 2016. Evaluation of α Lphav Integrin Role in Mouse Model Induced Periapical Periodontitis. Doctoral Dissertation, Harvard School of Dental Medicine. pp. 8-13.
- American Diabetes Association. 2015. Classification and diagnosis of diabetes, section 2, in standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*, 38(suppl1), pp. S8-S16. <https://doi.org/10.2337/dc15-S005>.
- Araujo AA, Pereira ASBF, Medeiros CACX, Brito GAC, Leitao RFC, Araujo LS, Guedes PMM, Hiyari S, Pirih FQ, Junior RFA. 2017. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. *PloS One*, 12(8): e0183506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183506>.
- Arend WP. 2002. The Balance between IL-1 and IL-1ra in Disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 13, pp. 323-340.
- Artigas N, Urena C, Rodrigues-Carballo E, Rosa JL, Ventura F. 2014. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Regulated Interactions between Osterix and Runx2 are Critical for the Transcriptional Osteogenic Program. *The Journal of Biological Chemistry*; 289(39), pp. 27105-27117. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.576793>.
- Bainbridge BW, Karimi-Nasser L, Robert RR, Blethen F, Ernst RK, Darveau RP. 2008. Acyl Chain Specificity of the Acyltransferase LpxA and LpxD and Substrate Availability Contribute to Lipid A Fatty Acid Heterogeneity in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 190(13), pp. 4549-58. <https://doi.org/10.1128/jb.00234-08>.
- Baumgartner JC. 2004. Microbiologic Aspects of Endodontic Infections. *Journal of the California Dental Association Journal.* 32(6), pp. 459-468. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2004.00061.x>.
- Bayliss L, Mahoney DJ, Monk P. 2011. Normal bone physiology, remodeling and its hormonal regulation. *Surgery*, 30(2), pp. 47-53.
- Blufstein A, Behm C, Nguyen PQ, Rausch-Fan X, Andrukhov O. 2018. Human periodontal ligament cells inhibit no endotoxin tolerance upon stimulation

- with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Periodont Res*, 53, pp. 589-597. <https://doi.org/10.1111/jre.12549>.
- Braniak PR, McDevitt TC. 2010. Stem Cell Paracrine Actions and Tissue Regeneration. *Regen Med*. 5(1), pp. 121-143. <https://doi.org/10.2217/rme.09.74>.
- Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, Rosa CSD, Haseus B, Jonasson P. 2019. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontologica Scandinavica*, 77(3), pp. 173-180. <https://doi.org/10.1080/00016357.2018.1521005>.
- Brizuela C, Meza G, Urrejola D, Quezada MA, Concha G, Ramirez V, Angelopoulos I, Cadiz MI, Tapia-Limonchi R, Khoury M. 2020. Cell-based regenerative endodontics for treatment of periapical lesions: a randomized, controlled phase I/II clinical trial. *Journal of Dental Research*, 99(5), pp. 523-529. <https://doi.org/10.1177/0022034520913242>.
- Brunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. 2010. New Concepts on the Immune Modulation Mediated by Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1, p. 34. <https://doi.org/10.1186/scrt34>.
- Cabanillas-Balsera D, Martin-Gonzales J, Montero-Miralles P, Sanchez-Domingues B, Jimenez-Sanchez MC, Segura-Egea JJ. 2019. Association between diabetes and nonretention of root filled teeth: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal*, 52(3), pp. 297-306. <https://doi.org/10.1111/iej.13011>.
- Catalfamo DL, Britten TM, Storch DI, Calderon NL, Sorenson HL, Wallet SM. 2013. Hyperglycaemia Induced and Intrinsic Alterations in Type 2 Diabetes-Derived Osteoclast Function. *Oral Dis*. 19(3), pp. 303-312. <https://doi.org/10.1111/odi.12002>.
- Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. 2021. Determinants of periodontal and periapical lesion stability and progression. *Journal of Dental Research*, 100(1), pp. 29-36. <https://doi.org/10.1177/0022034520952341>.
- 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 mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation for the Hellenic cord blood bank. *Transfusion*; 54, pp. 3108-3120.
- Chen B, Li Q, Zhao B, Wang Y. 2017. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as a Novel Potential Therapeutic Tool for Tissue Repair. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(9), pp. 1753-1758. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0477>.
- Cheng R, Wu Z, Li M, Shao M, Hu T. 2020. Interleukin-1b is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *International Journal of Oral Science*, 12, p. 2. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0068-8>.
- Cintra LTA, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, Lima VMF, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. 2014. Apical Periodontitis and Periodontal Disease increase serum IL-17 Levels in Normoglycemic and Diabetic Rats. *Clinical Oral Investigations* 18(9), pp. 2123-2128. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1192-7>.
- Cohen S, Hargreaves KM. 2006. *Pathways of the pulp* 9th ed. Mosby Elsevier. pp. 541-607, 650-667.
- Cordero CB, Santander GM, Gonzalez DU, Quezada A, Silva CI, Vasquez C, Jara R, Jara D, Khoury M. 2020. Allogenic cellular therapy in a mature tooth with apical periodontitis and accidental root perforation: a case report. *J Endod*, 46(2), pp. 1920-1927. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.04.007>.
- DeRossi A, Lucisano MP, DeRossi M, Nelson-Filho P, Silva RAB, Silva LAB, Saraiva MCP, Fukada SY. 2020. *International Endodontic Journal*, 53(3), pp. 354-365. <https://doi.org/10.1111/iej.13228>.
- Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. 2015. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. *Cell Transplantation*, 24(3), pp. 339-347.
- Diniz JMB, Espaladori MC, Silva MES, Brito LCN, Vieira LQ, Sobrinho APR. 2021. Immunological profile of periapical endodontic infection in patients undergoing haematopoietic transplantation. *Clinical Oral Investigations*, 25, pp. 1403-1410. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03448-5>.

- Dixon DR, Darveau RP. 2005. Lipopolysaccharide Heterogeneity: Innate House Responses to Bacterial Modification of Lipid A Structure. *Journal of Dental Research*. 84(7), pp. 584-595. <https://doi.org/10.1177/154405910508400702>.
- Elbere I, Kalnina I, Silamikelis I, Konrade I, Zaharenko L, Sekace K, Radovica-Spalvina I, Fridmanis D, Gudra D, Pirags V, Klovins J. 2018. Association of metformin administration with gut microbiome dysbiosis in healthy volunteers. *PloS ONE*, 13(9), p. e0204317. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204317>.
- Epstein S, Defeudis G, Manfrini S, Napoli N, Pozzilli P. 2016. Diabetes and Disordered Bone Metabolism (Diabetic Osteodystrophy): Time for Recognition. *Osteoporos International*, 27, pp. 1931-1951. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3454-x>
- Fajardo RJ, Karim L, Calley VI, Bouxsein ML. 2014. A review of rodent models of type 2 diabetic skeletal fragility. *Journal of Bone and Mineral Research*, 29(5), pp. 1025-1040. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2210>.
- Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. 2017. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *Int J of Mol Sci*; 18, p. 440. <https://doi.org/10.3390/ijms18020440>.
- Gasser J. 2003. Stem cells in the treatment of osteoporosis. *European Cell Mater*; 6(2), p. 21.
- Geng LX, Yin XH, Li B, Dinig SF. 2017. Inhibition of M1 Macrophage Specific Gene Expression and Promotion of M2 Macrophage Specific Gene Expression by Bone Mesenchymal Stem Cells. *Int J Clin Exp Pathol*; 10(1), pp. 750-759.
- Gheibi S, Kashfi K, Ghasemi A. 2017. A Practical Guide for induction of Type-2 Diabetes in Rat: Incorporating a High-fat Diet and Streptozotocin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*; 95, pp. 605-613. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.098>.
- Gomathi K, Akshaya N, Srinaath N, Moorthi A, Selvamurugan N. 2020. Regulation of Runx2 by post-translational modifications in osteoblast differentiation. *Life Sciences*, 245, p. 117389. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117389>.

- Graves DT, Oates T, Garlet GP. 2011. Review of Osteoimmunology and the Host Response in Endodontic and Periodontal Lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 3, pp. 1-15. <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5304>.
- Grossman LI. 1995. Ilmu Endodontik dalam Praktek. 11th ed. Jakarta, Penerbit Buku Kedokteran EGC. h. 380-381.
- Guariguata L, Whiting DR, Hambleton I, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. 2014. Global Estimates of Diabetes Prevalence for 2013 and Projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*.103(2), pp. 137-149. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>.
- Gumasta P, Dubey A, Swamy M, Sahni YP, Anil A. 2019. Immunohistochemical expression of oxidative stress markers in bovine tissues correlated to cadmium concentration. *Journal of Animal Research*, 9(5), pp. 721-726. <https://doi.org/10.30954/2277-940X.05.2019.14>.
- Guo J, Yang J, Cao G, Fan H, Guo C, Ma Y, Qian Y, Chen L, Li X, Chang C. 2011. Xenogenic immunosuppression of human umbilical cord mesenchymal stem cells in a major histocompatibility complex-mismatched allogeneic acute graft-versus-host disease murine model. *European Journal of Haematology*; 87(3), pp. 235-243.
- Han YF, Tao R, Sun TJ, Chai JK, Xu G, Liu J. 2013. Optimization of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Isolation and Culture Methods. *Cytotechnology*,65(5), pp. 819-827. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9528-0>.
- Hargreaves KM, Berman LH, Rotstein I. 2016. Cohen's Pathways of the Pulp. 11th ed. St Louis. Elsevier. pp. 630-655.
- Hasegawa T, Suresh VV, Yahata Y, Nakano M, Suzuki S, Suzuki S, Yamada S, Kitaura H, Mizoguchi I, Noiri Y, Handa K, Saito M. 2021. Inhibition of the CXCL9-CXCR3 axis suppresses the progression of experimental apical periodontitis by blocking macrophage migration and activation. *Scientific Reports*, 11, p. 2613. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82167-7>.
- Hendrijantini N, Kresnoadi U, Salim S, Agustono B, Retnowati E, Syahril I, Mulawardhana P, Wardhana MP, Pramono C, Rantam FA. 2015. Study Biocompatibility and Osteogenic Differentiation Potential of Human

- Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (hUCMSCs) with Gelatin Solvent. *Journal of Biomedical Science and Engineering*. 8, pp. 420-428. <https://doi.org/10.4236/jbise.2015.87039>.
- Hendrijantini N. 2015. Mekanisme Regenerasi Tulang Mandibula Osteoporosis dengan Pemberian Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells (Penelitian Eksperimental pada Tikus Model Osteoporosis). Disertasi. Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. h: 42-66.
- Hernandez-Rios P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernandez M. 2017. Oxidative stress in the local and systemic events of apical periodontitis. *Frontiers in Physiology*, 8, p. 869. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00869>.
- Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, Chen CS, Lin LD, Wang JS. 2004. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption or periapical lesion. *J Oral Pathol Med*, 33, pp. 162-9.
- Hou Z, Wang Z, Tao Y, Bai J, Yu B, Shen J, Sun H, Xiao L, Xu Y, Zhou J, Wang Z, Geng D. 2019. KLF2 regulates osteoblast differentiation by targeting of Runx2. *Nature: Laboratory Investigation*, 99, pp. 271-280. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0149-x>.
- Ilancheran S, Michalska A, Peh G, Wallace E, Pera M, Manuelpillai U. 2007. Stem cell derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential. *Biol Reprod*; 77, pp. 577-588.
- Ingle JJ, Bakland LK, Baumgartner J. 2008. *Endodontics*. 6th ed. McGraw-Hill. Shelton, USA. pp. 221-308, 494-519.
- Jain A, Bahuguna R. 2015. Role of Matrix Metalloproteinases in Dental Caries, Pulp and periapical inflammation: An Overview. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*; 5, pp. 212-218. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.06.015>.
- Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. 2014. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Archives of Oral Biology*, 59, pp. 167-175. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.11.008>.

- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. Laporan Nasional Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. <https://www.depkes.go.id/resources/download/info-terkini/hasil-riskesdas-2018.pdf>.
- Keong JY, Low LW, Chong JM, Ong YY, Pulikkotil SJ, Singh G, Nagendrababu V, Banavar SR, Khoo SP. 2020. Effect of lipopolysaccharide on cell proliferation and vascular endothelial growth factor secretion of periodontal ligament stem cells. *Saudi Dental Journal*, 32(3), pp. 148-154.
- Kerner W, Bruckel J. 2014. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 122, pp. 384-386. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1366278>.
- Kim TH, Bae CH, Lee JC, Kim JE, Yang X, Crombrughe B, Cho ES. 2015. Osterix regulates tooth root formation in a site-specific manner. *Journal of Dental Research*, 94(3), pp. 430-438. <https://doi.org/10.1177/0022034514565647>.
- Komori T. 2011. Signaling networks in Runx2-dependent bone development. *J Cell Biochem*, 112, pp. 750-755. <https://doi.org/10.1002/jcb.22994>.
- Kucher EC, Hannegraf ND, Lara RM, Reis CLB, Oliveira DSB, Chaves JFM, Andrades KMR, Lima LF, Salles AG, Antunes LAA, Sousa-Neto MD, Antunes LS, Baratto-Filho F. 2021. Investigation of genetic polymorphisms in BMP2, BMP4, SMAD6, and Runx2 and persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 47, pp. 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.11.014>.
- La Fontaine J, Chen C, Hunt N, Jude E, Lavery L. 2016. Type 2 diabetes and metformin influence on fracture healing in an experimental rat model. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 55(5), pp. 955-960. <https://doi.org/10.1053/j.jfas.2016.04.012>.
- Lai EHH, Yang CN, Lin SK, Wang HW, Kok SH, Hong CY, Su IH, Yang H, Chang JZC. 2018. Metformin ameliorates periapical lesions through suppression of hypoxia-induced apoptosis of osteoblasts. *Journal of Endodontics*, 44(12), pp. 1817-1825. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.08.002>.

- Lecka-Czernik B. 2017. Diabetes, Bone and Glucose-Lowering Agents: Basic Biology. *Diabetologia*, 60, pp. 1163-1169. <http://doi.org/10.1007/s00125-017-4269-4>.
- Lemaire V, Tobin FL, Greller LD, Cho CR, Suva LJ. 2004. Modelling the interactions between osteoblast and osteoclast activities in bone remodeling. *Journal of theoretical biology*; 229, pp. 293-309. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.03.023>.
- Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK. 1990. Adequacy of Sample Size in Health Studies. John Wiley & Sons Ltd. Colchester, England. pp. 36-40.
- Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. 2004. Importance of Bacterial Endotoxin (LPS) in Endodontics. *J Appl Oral Sci*; 12(2), pp. 93-8.
- 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*; 286, pp. 39497-39509.
- Leyva-Leyva M, Barrera L, Lopez-Camarillo C, Arriaga-Pizano L, Orozco-Hoyuela G, Carillo-Casas E, Calderon-Perez J, Lopez-Diaz 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*; 22, pp. 1275-1287.
- Li J, Li Y, Gao B, Qin C, He Y, Xu F, Yang H, Lin M. 2018. Engineering mechanical microenvironment of macrophage and its biomedical applications. *Nanomedicine*, 13(5), pp. 555-576. <https://doi.org/10.2217/nmm-2017-0324>.
- Li T, Xia M, Gao Y, Chen Y, Xu Y. 2015. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: an Overview of their Potential in Cell Based Therapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*; 15(8), pp. 1293-1306. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1051528>.
- Li YM, Schilling T, Benisch P, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, Limbert C, Seufert J, Kassem M, Schutze N, Jakob F, Ebert R. 2007. Effects of High

- Glucose on Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 363, pp. 209-215. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.161>.
- Lima SMF, Grisi DC, Kogawa EM, Franco OL, Peixoto VC, Goncalves-Junior JF, Arruda MP, Rezende TMB. 2013. Diabetes mellitus and inflammatory pulpal and periapical disease: a review. *International Endodontic Journal*, 46, pp. 700-709. <https://doi.org/10.1111/iej.12072>.
- Lindenmair 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*, 2012 Dec 1(4), pp. 1061-1088. <https://doi.org/10.3390/cells1041061>.
- Liu Q, Li M, Wang S, Xiao Z, Xiong Y, Wang G. 2020. Recent advances of osterix transcription factor in osteoblast differentiation and bone formation. *Front Cell Dev Biol*, 8: 601224. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.601224>.
- Lopez-Lopez J, Jane-Salas E, Estrugo-Devesa A, Velasco-Ortega E, Martin-Gonzalez J, Segura-Egea JJ. 2011. Periapical and endodontic status of type 2 diabetic patients in Catalonia, Spain: a cross sectional study. *Journal of Endodontics*, 2011; 37(5), pp. 598-601. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.002>.
- Luz-Crawford P, Djouad F, Toupet K, Bony C, Franquesa M, Hoogduijn MJ, Jorgensen C, Noel D. 2016. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-1 receptor antagonist promotes macrophage polarization and inhibits B cell differentiation. *Stem Cells*, 34, pp. 483-492. <https://doi.org/10.1002/stem.2254>.
- Ma J, Chen W, Zhang L, Tucker B, Zhu G, Sasaki H, Hao L, Wang L, Ci H, Jiang H, Stashenko P, Li YP. 2013. RNA interference-mediated silencing of *Atp6i* prevents both periapical bone erosion and inflammation in the mouse model of endodontic disease. *Infection and Immunity*, 81(4), pp. 1021-1030. <https://doi.org/10.1128/IAI.00756-12>.
- Maki KC, Dicklin MR, Baum SJ. 2016. Statins and diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 45, pp. 87-100.

- Marie P, Kassem M. 2011. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *European Journal of Endocrinology*; 165, pp. 1-10.
- Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rocas IN, Siqueira JF. 2012. Type 2 Diabetes Mellitus and the Prevalence of Apical Periodontitis and Endodontic Treatment in an Adult Brazilian Population. *Journal of Endodontics*, 38(3), pp. 297-300. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.11.001>.
- Marton IJ, Kiss C. 2014. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 40(2), pp. 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.10.036>.
- Mazzi-Chaves JF, Petean IBF, Soares IMV, Salles AG, Antunes LAA, Segato RAB, Silva LAB, Kuchler EC, Antunes LS, Sousa-Neto MD. 2018. Influence of genetic polymorphisms in genes of bone remodeling and angiogenesis process in the apical periodontitis. *Brazilian Dental Journal*, 29(2), pp. 179-183. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201802260>.
- Mealey BL, Oates TW. 2006. Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *J of Periodontol*, 77(8), pp. 1289-303. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050459>.
- Mealey BL, Ocampo GL. 2007. Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *Periodontology 2000*, 44(1), pp. 127-153. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00193.x>.
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. 2001. Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine*. Vol 226 Issue 6, pp. 507-520.
- Miranda C, Giner M, Montoya MJ, Vasquez MA, Miranda MJ, Perez-Cano R. 2016. Influence of high glucose and advanced glycation end-products (ages) levels in human osteoblast-like cell gene expression. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17, p. 377. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1228-z>.
- Mishra VK, Shih HH, Parveen F, Lenzen D, Ito E, Chan TF, Ke LY. 2020. Identifying the therapeutic significance of mesenchymal stem cells. *Cells*, 2020(9), p. 1145. <https://doi.org/10.3390/cells9051145>.
- Monguio-Tortajada M, Roura S, Galvez-Monton C, Pujal JM, Aran G, Sanjurjo L, Franquesa M, Sarrias MR, Bayes-Genis A, Borrás FE. 2017. Nanosized UCMSC-Derived Extracellular Vesicles But Not Conditioned Medium Exclusively Inhibit the Inflammatory Response of Stimulated T Cells:

- Implications for Nanomedicine. *Theranostics*: 7(2), pp. 270-284. <https://doi.org/10.7150/thno.16154>.
- Mooduto L. 2012. Respons Imun pada Inflamasi Jaringan Pulpa. PT Revka Petra Media. h :85-100.
- Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. 2008. Matrix Metalloproteinases and Diabetic Foot Ulcers: The Ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a Predictor of Wound Healing. *Diabetic Medicine*; 25, pp. 419-426. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2008.02414.x>.
- Nagendrababu V, Segura-Egea JJ, Fouad AF, Pulikkotil SJ, Dummer PMH. 2020. Association between diabetes and the outcome of root canal treatment in adults: an umbrella review. *International Endodontic Journal*, 53, pp. 455-466. <https://doi.org/10.1111/iej.13253>.
- Nair PNR. 2004. Pathogenesis of Apical Periodontitis and the Cause of Endodontic Failure. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, pp. 348-51.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, Crombrugge BD. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, pp. 17-29.
- Nauth A, Schemitsch EH. 2012. Stem Cells for the Repair and Regeneration of Bone. *Indian Journal of Orthopaedics*, 46(1), pp. 19-21. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.91630>.
- Ndip A, Jude EB, Boulton AJM. 2016. Inflammation in type 2 diabetes. *Frontiers in Inflammation*, 1, pp. 164-179.
- Newman MG, Takei HH, Carranza FA. 2002. Carranza's Clinical Periodontology 9th ed. Elsevier, pp. 133-148.
- Niedzwiedzki T, Filipowska J. 2015. Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *Journal of Molecular Endocrinology*, 55, pp. R23-R36. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0067>.
- Nooshabadi VT, Mardpour S, Yousefi-Ahmadipour A, Allahverdi A, Izadpanah M, Daneshimehr F, Ai J, Banafshe HR, Ebrahimi-Barough S. 2018. The Extracellular Vesicles-Derived from Mesenchymal Stromal Cells: A New

- Therapeutic Option in Regenerative Medicine. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(10), pp. 8048-8073. <https://doi.org/10.1002/jcb.26726>.
- Park HC, Quan H, Zhu T, Kim Y, Kim B, Yang HC. 2016. The effect of M1 and M2 macrophages on odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*, 43(4), pp. 596-601. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.11.003>.
- Paula-Silva FWG, Arnez MFM, Petean IBF, Almeida-Junior LA, Silva RAB, Silva LAB, Faccioli LH. 2020. Effects of 5-lipoxygenase gene disruption on inflammation, osteoclastogenesis and bone resorption in polymicrobial apical periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 112, p. 104670. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104670>.
- Perez-Campo FM, Santurtun A, Garcia-Ibarbia C, Pascual MA, Valero C, Garces C, Sanudo C, Zarrabeitia MT, Riancho JA. 2016. Osterix and Runx2 are transcriptional regulators of Sclerostin in human bone. *Calcified Tissue International*, 99(3), pp. 302-309. <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0144-4>.
- Pino A, Rosen C, Rodrigues J. 2012. In osteoporosis, differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) improves bone marrow adipogenesis. *Biological Research*, 45, pp. 279-287.
- Pratha, A. A., & Jayalakshmi, S. (2016). Relationship between Diabetes Mellitus and Pulpal Infection & Periapical Diseases. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(8), pp. 794–796.
- Prieto AKC, Gomes-Filho JE, Azuma MM, Sivieri-Araujo G, Narciso LG, Souza JC, Ciarlini PC, Cintra LTA. 2017. Influence of apical periodontitis on stress oxidative parameters in diabetic rats. *Journal of Endodontics*, 43(10), pp. 1651-1656. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.05.014>.
- Purwanto B, Liben P. 2014. Model Hewan Coba untuk Penelitian Diabetes. *Seri Protokol Penelitian Hewan Coba*. PT Revka Petra Media. h :11-14.
- Qin HL, Zhu XH, Zhang B, Zhou L, Wang WY, Anhui A, Hospital E. 2016. Clinical Evaluation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation After Angioplasty for Diabetic Foot. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 124, pp. 497-503. <https://doi.org/10.1055/s-0042-103684>.
- 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*; 23(4), pp. 299-309. <https://doi.org/10.3233/BME-130754>.
- Rantam FA, Ferdiansyah, Purwati. 2014. *Stem Cell Mesenchymal, Hematopoetik, dan Model Aplikasi*. Edisi Kedua. Airlangga University Press. Surabaya. h 1-90, 181-190.
- Rena G, Hardie DG, Pearson ER. 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60, pp. 1577-1585. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>.
- Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are Essential for the Invasive Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells: Differential Regulation by Inflammatory Cytokines. *Blood*; 109(9), pp. 4055-4063. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-051060>.
- Rios-Arce N, Dagenais A, Feenstra D, Coughlin B, Kang HJ, Mohr S, McCabe LR, Parameswaran N. 2020. Loss of interleukin-10 exacerbates early type-1 diabetes-induced bone loss. *J Cell Physiol*, 235(3), pp. 2350-2365. <https://doi.org/10.1002/jcp.29141>.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. 2006. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*; 8, pp. 455-498. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721>.
- Samanta S, Rajasingh S, Drosos N, Zhou Z, Dawn B, Rajasingh J. 2017. Exosomes: New Molecular Targets of Diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*: pp. 1-12. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.162>.
- Sanz M, Ceriello A, Buysschaert M, Chapple I, Demmer RT, Graziani F, Herrera D, Jepsen S, Lione L, Madianos P, Mathur M, Montanya E, Shapira L, Tonetti M, Vegh D. 2018. Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 45, pp.138-49. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2017.12.001>.
- Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, Lopez-Lopez J, Martin-Gonzalez J, Velasco-Ortega E, Lopez-Firaz FJ. 2012. Diabetes Mellitus, Periapical Inflammation and Endodontic Treatment Outcome. *Medicina Oral*,

- Patologia Oral Y Cirurgia Bucal, 17(2), pp. 356-361.
<https://doi.org/10.4317/medoral.17452>.
- Shah VN, Shah CS, Snell-Bergeon JK. 2015. Type 1 diabetes and risk of fracture: meta-analysis and review of the literature. *Diabetic Medicine*, 32, pp. 1134-1142. <https://doi.org/10.1111/dme.12734>.
- Shen Z, Wichnieski C, Carneiro E, Garlet GP, Letra A, Silva RM. 2021. Expression profiling and functional characterization of microRNAs in apical periodontitis. *J Endod*, 47(2), pp. 263-271. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.11.016>.
- Shen Z, Silva RM. 2021. MicroRNAs: emerging players in apical periodontitis. *Journal of Applied Oral Science*, 29:e20201058. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2020-1058>.
- Siavash M, Tabbakhian M, Sabzghabae AM, Razavi N. 2017. Severity of gastrointestinal side effects of metformin tablet compared to metformin capsule in type 2 diabetes mellitus patients. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, 6(2), pp. 73-76. https://doi.org/10.4103/jrpp.JRPP_17_2.
- Sinha KM, Zhou X. 2013. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114, pp. 975-984. <https://doi.org/10.1002/jcb.24439>.
- Soewondo P, Ferrario A, Tahapary DL. 2013. Challenges in Diabetes Management in Indonesia: A Literature Review. *Globalization and Health*, 9, pp. 63-80. <https://doi.org/10.1186/1744-8603-9-63>.
- Sorsa T, Tjaderhane L, Kontinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, Golub LM, Brown DL, Mantyla P. 2006. Matrix Metalloproteinases: A Contribution to Pathogenesis, Diagnosis and Treatment of Periodontal Inflammation. *Annals of Medicine*; 38, pp. 306-321. <https://doi.org/10.1080/07853890600800103>.
- Stolzing A, Sellers D, Llewelyn O, Scutt A. 2010. Diabetes Induced Changes in Rat Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs*; 191, pp. 453-465. <https://doi.org/10.1159/000281826>.
- Sudiana IK. 2014. *Imunopatobiologi Molekuler*. Airlangga University Press. Surabaya., h. 47-49.
- Sudiana IK. 2017. *Hantaran Sinyal pada Proses Inflamasi*. Airlangga University Press. Surabaya., h. 35-45.

- Sui BD, Hu CH, Zheng CX, Shuai Y, He XN, Gao PP, Zhao P, Li M, Zhang XY, He T, Xuan K, Jin Y. 2017. Recipient glyceemic micro-environments govern therapeutic effects of mesenchymal stem cell infusion on osteopenia. *Theranostics*, 7(5), pp. 1225-1244. <https://doi.org/10.7150/thno.18181>.
- Suryani N, Endang T, Aulanni'am A. 2013. Effect of methanolic swetenia mahagoni seed extract in increasing insulin level, decreasing TNF- α expression and repairing pancreatic tissue damage on diabetic rat. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27(3), pp. 137-145.
- Taira TM, Lima V, Prado DS, Silva TA, Issa JPM, Silva LAB, Zamboni DS, Cunha FQ, Fukada SY. 2019. NLRP12 attenuates inflammatory bone loss in experimental apical periodontitis. *Journal of Dental Research*, 98(4), pp. 476-484. <https://doi.org/10.1177/0022034518820289>.
- Takahashi A, Ono N, Ono W. 2017. The fate of osterix-expressing mesenchymal cells in dental root formation and maintenance. *Orthod Craniofac Res*, 20(Suppl.1), pp. 39-43. <https://doi.org/10.1111/ocr.12167>.
- Takimoto A, Kawatsu M, Yoshimoto Y, Kawamoto T, Seiryu M, Takano-Yamamoto T, Hiraki Y, Shukunami C. 2015. Scleraxis and osterix antagonistically regulate tensile force-responsive remodeling of the periodontal ligament and alveolar bone. *Development*, 142, pp. 787-796. <https://doi.org/10.1242/dev.116228>.
- Thraillkill KM, Liu L, Wahl EC, Bunn RC, Perrien DS, Cockrell GE, Skinner RA, Hogue WR, Carver AA, Fowlkes JL, Aronson J, Lumpkin CK. 2005. Bone formation is impaired in a model of type 1 diabetes. *Diabetes*, 54, pp. 2875-2881. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.10.2875>.
- Tiburcio-Machado CDS, Bello MDC, Maier J, Wolle CFB, Bier CAS. 2017. Influence of diabetes in the development of apical periodontitis: a critical literature review of human studies. *Journal of Endodontics*, 43, pp. 370-376. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.11.012>.
- Tjaderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonen M, Salo T. 2007. The Effect of Chemical Inhibition of Matrix Metalloproteinases on the Size of Experimentally Induced Apical Periodontitis. *International Endodontic Journal*; 40, pp. 282-289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01223.x>.

- Torabinejad M, Walton RE. 2012. *Endodontics Principles and Practice*, 4th ed. St. Louis, Missouri. Saunders Elsevier Inc., pp. 38-48.
- Wagner D, Hafci HE, Bensidhoum M, Petite H, Bolender Y, Remond Y, George D. 2018. Periodontal ligament histology for orthodontic bone remodeling: first quantification. *Journal of Cellular Immunotherapy*, 4(1), pp. 41-43. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2018.09.010>.
- Wahjuningrum DA. 2011. *Patogenesis Molekular Resorpsi Tulang Alveolaris pada Periodontitis Apikalis Akibat Induksi LPS dalam Saluran Akar Gigi Tikus Wistar*. Disertasi. Universitas Airlangga. h: 30-41.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. 2004. Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*, 22(7), pp. 1330-1337. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0013>.
- Wang HW, Lai EHH, Yang CN, Lin SK, Hong CY, Yang H, Chang JZC, Kok SH. 2020. Intracanal metformin promotes healing of apical periodontitis via suppressing inducible nitric oxide synthase expression and monocyte recruitment. *Journal of Endodontics*, 46(1), pp. 65-73. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.10.001>.
- Wang L, Ott L, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. 2011. Musculoskeletal Tissue Engineering with Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells. *Regen Med*. 6(1), pp. 95-109.
- Wang Z, Goh J, De S, 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 Engineering*; 12(7), pp. 1753-1761.
- Weber DR, Schwartz G. 2016. Epidemiology of skeletal health in type 1 diabetes. *Curr Osteoporos Rep*, 14, pp. 327-336. <https://doi.org/10.1007/s11914-016-0333-0>.
- Weinberg E, Maymon T, Weinreb M. 2014. AGEs induce caspase-mediated apoptosis of rat BMSCs via TNF α production and oxidative stress. *Journal of Molecular Endocrinology*, 52, pp. 67-76. <https://doi.org/10.1530/JME-13-0229>.
- 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*; 2, p. 8.

- Wolle CFB, Zollmann LA, Bairros PO, Etges A, Leite CE, Morrone FB, Campos MM. 2013. Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy. *Journal of Endodontics*, 39(5), pp. 643-647. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.12.030>.
- Wu YY, Xiao E, Graves DT. 2015. Diabetes Mellitus Related Bone Metabolism and Periodontal Disease. *International Journal of Oral Science*, 7(2), pp. 63-72. <https://doi.org/10.1038/ijos.2015.2>.
- Yanto TAY, Huang I, Kosasih FN, Lugito NPH. 2018. Nightmare and abnormal dreams: rare side effects of Metformin?. *Case Reports in Endocrinology*, 2018: 7809305. <https://doi.org/10.1155/2018/7809305>.
- Yang NY, Zhou Y, Zhao HY, Liu XY, Sun Z, Shang JJ. 2018. Increased interleukin 1a and interleukin 1b expression is involved in the progression of periapical lesions in primary teeth. *BMC Oral Health*, 18, p. 124. <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0586-3>.
- Zarrabi M, Mousavi SH, Abroun S, Sadeghi B. 2014. Potential Uses for Cord Blood Mesenchymal Stem Cells. *Cell Journal*, 15(4), pp. 274–281.

Lampiran 1 Publikasi Penelitian

Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry

Dovepress

open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

Calcium Hydroxide Increases Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Expressions of Apoptotic Protease-Activating Factor-1, Caspase-3 and Caspase-9

This article was published in the following Dove Press journal:
Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry

Eric Priyo Prasetyo^{1,2}
Mefina Kuntjoro^{1,3}
Setyabudi Goenhartha²
Devi Eka Juniarti²
Febriastuti Cahyani²
Nike Hendrijantini³
Alexander Patera Nugraha⁴
Ninuk Hariyani⁵
Fedik Abdul Rantam^{6,7}

¹Doctoral Program, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ²Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ³Department of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ⁴Department of Orthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ⁵Department of Dental Public Health, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ⁶Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia; ⁷Laboratory of Virology, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

Correspondence: Eric Priyo Prasetyo
Department of Conservative Dentistry,
Faculty of Dental Medicine, Universitas
Airlangga, Jalan Mayjend Prof.
Dr. Moestopo 47, Surabaya, Indonesia
Tel/Fax +62 31 5030255
Email eric-p-p@fkg.unair.ac.id

Purpose: Calcium hydroxide is a gold standard dental material generally used for pulpal and periapical therapy including regenerative endodontic procedures because of its positive properties. However, evaluation about this material on stem cells is limited. Human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs) are potential to be used in regenerative therapy. Regenerative therapy needs a sustainable cell supply to maintain its regenerative capacity. The aim of this study was to ascertain the apoptosis result of calcium hydroxide on HUCMSCs through the expression of apoptotic protease-activating factor-1 (APAF-1), caspase-3, and caspase-9.

Materials and Methods: This study used a thawed frozen stock of passage 5 HUCMSCs, grown in minimum essential medium (MEM) alpha containing calcium hydroxide at concentration of 0.1 microgram/mL for 1, 3 and 7 days. Polyclonal antibody with fluorescence isothiocyanate (FITC) label was used to evaluate the expressions. APAF-1, caspase-3, and caspase-9 expressions were recorded and compared on every observation day using fluorescence microscope. Analysis of variance was performed to analyze the significance among the results of treatment groups. The results were concluded significant if $p < 0.05$.

Results: The addition of calcium hydroxide in MEM alpha medium increases HUCMSCs expression of APAF-1, caspase-3 and caspase-9 significantly, compared to the control group without calcium hydroxide ($p < 0.05$) in all the times. Day 1 showed the lowest increase followed by higher expressions on day 3 and day 7.

Conclusion: HUCMSCs express increased APAF-1, caspase-3 and caspase-9 after in-vitro calcium hydroxide exposure. This study shows HUCMSCs for regenerative procedure.
Keywords: apoptosis, calcium hydroxide

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC) therapy. These cells can easily be immune regulatory, self-renewal; osteocyte, neurons, adipocyte and neural stem cells (HUCMSCs) are may be an appealing contender for bone regeneration.¹ With regard to

Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry

Q2 Dentistry (miscellaneous) best quartile

SJR 2020

0.52



powered by scimagojr.com

Submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress
https://doi.org/10.21956/cicid.v1i1.10000

Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry
© 2021 Prasetyo et al. This work is published and licensed under the Creative Commons Attribution License which permits unrestricted use of the work in any journal provided the original work is properly cited.

ISSN 0975-2366
DOI: <https://doi.org/10.31838/ijpr2021.13.01.023>

Research Article

Calcium Hydroxide Upregulates Interleukin-10 Expression in Time Dependent Exposure and Induces Osteogenic Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

ERIC PRIYO PRASETYO^{1,2*}, MEFINA KUNTJORO^{1,3}, FEBRIASTUTI CAHYANI², SETYABUDI GOENHARTO², WIDYA SARASWATI², DEVI EKA JUNIARTI², NIKE HENDRIJANTINI², NINUK HARIYANI⁴, ALEXANDER PATERA NUGRAHA⁵, FEDIK ABDUL RANTAM^{6,7}

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

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

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

⁴Department of Dental Public Health, 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, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

*Corresponding Author

Email ID: eric-p-p@fkg.unair.ac.id

Received: 06.08.20, Revised: 08.09.20, Accepted: 04.10.20

ABSTRACT

Background: Human umbilical cord mesenchymal stem cells (HUCMSCs) as one of mesenchymal stem cells source, have a promising potential for regenerative dentistry. Calcium hydroxide, a widely administered medicament for endodontic therapy, is used for its numerous benefits. The presence of calcium hydroxide is expected to bring a positive outcome on HUCMSCs.

Purposes: This study aims to evaluate the anti-inflammatory effect through Interleukin-10 expression and osteogenic differentiation of calcium hydroxide on HUCMSCs.

Methods: This study is an experimental laboratory research with controlled group design. HUCMSCs were grown in Minimum Essential Medium (MEM) Alpha containing 0.1 µg/ml of calcium hydroxide. Observation of interleukin-10 expression were conducted in 24 hours, 72 hours, and 168 hours. Osteogenic differentiation was observed with Alizarin Red S staining. Obtained data were analyzed with analysis of variance (ANOVA). The level of significance was set at 0.05.

Results: Calcium hydroxide increases Interleukin-10 expression of HUCMSCs (P 0.000). Exposure time of 24 hours, 72 hours, and 168 hours exhibit increased expression. Exposure of 168 hours displayed the highest increase, followed by 72 hours and 24 hours as the lowest. Calcium hydroxide also induce HUCMSCs.

Conclusions:

Calcium hydroxide increases the expression of Interleukin-10 in time dependent exp differentiation of HUCMSCs. The longer the exposure of calcium hydroxide to expression of interleukin-10. These findings support the use of calcium hydroxide in periapical tissue regeneration.

Keywords: calcium hydroxide, differentiation, immunoregulation, mesenchymal stem c

INTRODUCTION

Calcium hydroxide, a white and odorless powder, is chemically classified as a strong base [1]. The mineralizing action of calcium hydroxide is

influenced by its high pH considered to be the most provides an alkaline environment for repair and active calcific

140 | International Journal of Pharmaceutical Research | Jan - Mar 2021 | Vol 13 | Issue 1





Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada 2020; 20:e0044
<https://doi.org/10.1590/pboci.2020.141>
 ISSN 1519-0501 / eISSN 1988-4632



ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxicity of Calcium Hydroxide on Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells

Eric Priyo Prasetyo^{1,2}, Ira Widjiastuti³, Febristuti Cahyani⁴, Mefina Kuntjoro⁵, Nike Hendrijantini⁶, Ninuk Hariyani⁷, Ervina Restiwulan Winoto⁸, Alexander Patera Nugraha^{1,2}, Sianiwati Goenharto⁹, Helen Susilowati¹⁰, Eryk Hendrianto¹¹, Fedik Abdul Rantam^{1,2}

¹Doctoral Program, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
²Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
³Department of Prosthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
⁴Department of Dental Public Health, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
⁵Department of Orthodontics, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
⁶Department of Health, Faculty of Vocational Studies, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
⁷Stem Cell Research and Development Center, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.
⁸Laboratory of Virology and Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia.

Author to whom correspondence should be addressed: Eric Priyo Prasetyo, Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof Dr. Moestopo 47, Surabaya, Indonesia. Phone: +62 315030255. E-mail: eric-p-p@fkg.unair.ac.id

Academic Editor: Yuri Wanderley Cavalcanti

Received: 09 March 2020 / Accepted: 14 May 2020 / Published: 20 July 2020

How to cite this article: Prasetyo EP, Widjiastuti I, Cahyani F, Kuntjoro M, Hendrijantini N, Hariyani N, et al. Cytotoxicity of calcium hydroxide on human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr*. 2020; 20:e0044. <https://doi.org/10.1590/pboci.2020.141>

Abstract

Objective: To examine the cytotoxicity of calcium hydroxide on huc cells (HUCMSC) to understand the characteristics for use in regenerative endodontics. **Material and Methods:** HUCMSC was in cytometry. The biological characteristics, such as cell morphology were screened. To check the cytotoxicity, HUCMSC was cultured a group (cultured in minimum essential medium (MEM) alpha and MEM alpha and calcium hydroxide). Methyl-thiazole-tetrazolium concentrations of calcium hydroxide (0.39 to 25 µg/mL) and the cel ANOVA test was used with a significance level set at 5%. **Result** positive of CD73, CD90, CD105, negative of CD45 and CD34. A s the concentration of 6.25 and 3.125 µg/mL (p=0.004). There was no and 25 µg/mL concentrations. There was also no significant differ µg/mL concentrations. **Conclusion:** Even though calcium hydroxide endodontics, it decreases the viability of HUCMSC. The lower the higher the viability of HUCMSC.

Keywords: Dentistry; Stem Cell Research; Umbilical Cord; Cell Sur

Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica...

Q3

Pediatrics,
Perinatology and
Child Health

best quartile

SJR 2020

0.19



powered by scimagojr.com

Lampiran 2 Uji Kelaikan Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
" ETHICAL CLEARANCE "**

No : 2.KE.151.09.2018

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

PENELITIAN BERJUDUL : Pengaruh Pemberian *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* Terhadap Remodelling Tulang Lesi Preapikal Gigi Pada Kasus Diabetes Mellitus

PENELITI UTAMA : Eric Priyo Prasetyo

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Surabaya, 13 September 2018



Mengetahui,
Dekan FKH-Upair



Prof. Dr. Pudji Srianto, M.Kes.,Drh.
NIP. 195601051986011001



Ketua,

Dr. Nurdianto Triakoso, M.P.,Drh.
NIP. 196805051997021001

Lampiran 3 Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien (*Informed Consent*)**INFORMASI SEBELUM TINDAKAN DAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PENGAMBILAN DONOR UMBILICAL CORD (TALI PUSAT)**

Berkaitan dengan penelitian yang berjudul: **Pengaruh human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) pada angiogenesis dan osteogenesis untuk osteointegrasi implan gigi model diabetes mellitus dan Pengaruh pemberian human umbilical cord mesenchymal stem cells terhadap remodeling tulang lesi periapikal gigi pada kasus diabetes mellitus**, 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 pengaruh pemberian hUCMSCs terhadap angiogenesis dan osteogenesis untuk osteointegrasi implan gigi dan remodeling tulang lesi periapikal gigi pada kasus diabetes mellitus.

Manfaat Penelitian: Hasil penelitian ini dapat memberikan kontribusi ilmiah tentang pemberian hUCMSCs pada osteointegrasi implan gigi dan remodeling tulang lesi periapikal pada kasus diabetes mellitus.

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 sebanyak 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 pengaruh hUCMSCs terhadap osteointegrasi implan gigi dan remodeling lesi periapikal gigi pada kasus diabetes mellitus.

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 & Kompensasi: Semua biaya pemeriksaan laboratorium terkait penelitian ini ditanggung peneliti.

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

Surabaya, 24 September 2018



Tanda tangan /cap ibu jari calon pendonor

Karina Mundiratri, drg., Sp.Prof.

Nama jelas calon pendonor



Tanda tangan peneliti/petugas yang menjelaskan

Mefina Kuntjoro, drg, M.Kes, Sp.Prof (K) dan
Eric Priyo Prasetyo, drg, MKes, Sp.KG (K)

Nama jelas peneliti/petugas yang menjelaskan

Untuk komunikasi lebih lanjut mohon menghubungi peneliti: Mefina Kuntjoro, drg., M.Kes., Sp.Prof (K) (0816536523) atau Eric Priyo Prasetyo, drg., M.Kes., Sp.KG (K) (083831116090).

Lampiran 4 Statistik Penelitian

Tests of Normality

Klp	Statistic	Shapiro-Wilk		Sig.
		df		
RUNX2	Lesi Periapikal DM	.791	7	.034
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	.889	7	.270
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	.839	7	.097
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	.782	7	.027
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	.941	7	.648
Osterix	Lesi Periapikal DM	.955	7	.777
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	.872	7	.194
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	.954	7	.763
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	.906	7	.372
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	.979	7	.955
IL1RA	Lesi Periapikal DM	.930	7	.551
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	.898	7	.319
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	.897	7	.313
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	.868	7	.178
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	.942	7	.658
IL1B	Lesi Periapikal DM	.812	7	.053
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	.889	7	.272
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	.902	7	.342
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	.884	7	.244
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	.912	7	.409
MDA	Lesi Periapikal DM	.822	7	.067
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	.978	7	.949
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	.919	7	.465
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	.918	7	.456
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	.720	7	.006

Oneway

		Descriptives							
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Osterix	Lesi Periapikal DM	7	3.143	1.1703	.4423	2.061	4.225	1.6	4.8
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	4.829	1.5766	.5959	3.370	6.287	3.2	7.4
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	4.371	1.5074	.5698	2.977	5.766	2.6	7.0
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	7.857	2.4999	.9449	5.545	10.169	4.6	10.8
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	7.971	2.3106	.8733	5.834	10.108	4.0	11.4
	Total	35	5.634	2.6473	.4475	4.725	6.544	1.6	11.4
IL1RA	Lesi Periapikal DM	7	8.000	1.6971	.6414	6.430	9.570	5.2	10.0
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	5.857	1.1984	.4530	4.749	6.965	4.2	7.4
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	8.286	2.0457	.7732	6.394	10.178	4.6	10.2
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	4.486	1.0123	.3826	3.549	5.422	3.6	6.4

	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	5.600	1.7626	.6662	3.970	7.230	3.0	7.8
	Total	35	6.446	2.1055	.3559	5.722	7.169	3.0	10.2
IL1B	Lesi Periapikal DM	7	6.286	1.1067	.4183	5.262	7.309	4.0	7.2
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	8.143	2.3230	.8780	5.994	10.291	4.0	11.4
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	6.343	1.2998	.4913	5.141	7.545	4.4	7.8
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	3.286	1.1936	.4512	2.182	4.390	2.0	5.4
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	4.343	1.2205	.4613	3.214	5.472	2.8	5.8
	Total	35	5.680	2.2235	.3758	4.916	6.444	2.0	11.4

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Osterix	1.488	4	30	.231
IL1RA	1.234	4	30	.318
IL1B	.630	4	30	.645

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Osterix	Between Groups	131.982	4	32.995	9.312	.000
	Within Groups	106.297	30	3.543		
	Total	238.279	34			
IL1RA	Between Groups	74.933	4	18.733	7.415	.000
	Within Groups	75.794	30	2.526		
	Total	150.727	34			
IL1B	Between Groups	100.747	4	25.187	11.219	.000
	Within Groups	67.349	30	2.245		
	Total	168.096	34			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Klp	(J) Klp	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Osterix	Lesi Periapikal DM	Lesi Periapikal DM 2 minggu	-1.6857	1.0062	.104	-3.741	.369
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	-1.2286	1.0062	.232	-3.283	.826
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	-4.7143*	1.0062	.000	-6.769	-2.659
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	-4.8286*	1.0062	.000	-6.883	-2.774
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	Lesi Periapikal DM	1.6857	1.0062	.104	-.369	3.741
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	.4571	1.0062	.653	-1.598	2.512
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	-3.0286*	1.0062	.005	-5.083	-.974
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	-3.1429*	1.0062	.004	-5.198	-1.088
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	Lesi Periapikal DM	1.2286	1.0062	.232	-.826	3.283
		Lesi Periapikal DM 2 minggu	-.4571	1.0062	.653	-2.512	1.598
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	-3.4857*	1.0062	.002	-5.541	-1.431
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu					

		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	-3.6000*	1.0062	.001	-5.655	-1.545
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	Lesi Periapikal DM	4.7143*	1.0062	.000	2.659	6.769
		Lesi Periapikal DM 2 minggu	3.0286*	1.0062	.005	.974	5.083
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	3.4857*	1.0062	.002	1.431	5.541
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	-.1143	1.0062	.910	-2.169	1.941
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	Lesi Periapikal DM	4.8286*	1.0062	.000	2.774	6.883
		Lesi Periapikal DM 2 minggu	3.1429*	1.0062	.004	1.088	5.198
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	3.6000*	1.0062	.001	1.545	5.655
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	.1143	1.0062	.910	-1.941	2.169
IL1RA	Lesi Periapikal DM 2 minggu	Lesi Periapikal DM 2 minggu	2.1429*	.8496	.017	.408	3.878
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	-.2857	.8496	.739	-2.021	1.449
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	3.5143*	.8496	.000	1.779	5.249
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	2.4000*	.8496	.008	.665	4.135
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	Lesi Periapikal DM	-2.1429*	.8496	.017	-3.878	-4.408
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	-2.4286*	.8496	.008	-4.164	-6.93
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	1.3714	.8496	.117	-.364	3.107
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	.2571	.8496	.764	-1.478	1.992
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	Lesi Periapikal DM	.2857	.8496	.739	-1.449	2.021
		Lesi Periapikal DM 2 minggu	2.4286*	.8496	.008	.693	4.164
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	3.8000*	.8496	.000	2.065	5.535
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	2.6857*	.8496	.004	.951	4.421
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	Lesi Periapikal DM	-3.5143*	.8496	.000	-5.249	-1.779
		Lesi Periapikal DM 2 minggu	-1.3714	.8496	.117	-3.107	.364
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	-3.8000*	.8496	.000	-5.535	-2.065
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	-1.1143	.8496	.200	-2.849	.621
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	Lesi Periapikal DM	-2.4000*	.8496	.008	-4.135	-.665
		Lesi Periapikal DM 2 minggu	-.2571	.8496	.764	-1.992	1.478
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	-2.6857*	.8496	.004	-4.421	-.951
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	1.1143	.8496	.200	-.621	2.849
IL1B	Lesi Periapikal DM	Lesi Periapikal DM 2 minggu	-1.8571*	.8009	.027	-3.493	-.222
		Lesi Periapikal DM 4 minggu	-.0571	.8009	.944	-1.693	1.578
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	3.0000*	.8009	.001	1.364	4.636
		Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	1.9429*	.8009	.021	.307	3.578

Lesi Periapikal DM 2 minggu	Lesi Periapikal DM	1.8571*	.8009	.027	.222	3.493
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	1.8000*	.8009	.032	.164	3.436
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	4.8571*	.8009	.000	3.222	6.493
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	3.8000*	.8009	.000	2.164	5.436
Lesi Periapikal DM 4 minggu	Lesi Periapikal DM	.0571	.8009	.944	-1.578	1.693
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	-1.8000*	.8009	.032	-3.436	-.164
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	3.0571*	.8009	.001	1.422	4.693
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	2.0000*	.8009	.018	.364	3.636
Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	Lesi Periapikal DM	-3.0000*	.8009	.001	-4.636	-1.364
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	-4.8571*	.8009	.000	-6.493	-3.222
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	-3.0571*	.8009	.001	-4.693	-1.422
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	-1.0571	.8009	.197	-2.693	.578
Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	Lesi Periapikal DM	-1.9429*	.8009	.021	-3.578	-.307
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	-3.8000*	.8009	.000	-5.436	-2.164
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	-2.0000*	.8009	.018	-3.636	-.364
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	1.0571	.8009	.197	-.578	2.693

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

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

		Ranks	
	Klp	N	Mean Rank
RUNX2	Lesi Periapikal DM	7	12.43
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	13.93
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	10.29
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	30.57
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	22.79
	Total	35	
MDA	Lesi Periapikal DM	7	29.07
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	20.86
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	14.93
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	11.07
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	14.07
	Total	35	

Test Statistics ^{a,b}		
	RUNX2	MDA
Chi-Square	19.248	13.605
df	4	4
Asymp. Sig.	.001	.009

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Klp

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM	7	7.00	49.00
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	8.00	56.00
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM	7	9.29	65.00
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	5.71	40.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	21.000	12.000
Wilcoxon W	49.000	40.000
Z	-.450	-1.602
Asymp. Sig. (2-tailed)	.653	.109
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.710 ^b	.128 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM	7	8.36	58.50
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	6.64	46.50
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM	7	10.36	72.50
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	4.64	32.50
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	18.500	4.500
Wilcoxon W	46.500	32.500
Z	-.769	-2.567
Asymp. Sig. (2-tailed)	.442	.010
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.456 ^b	.007 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM	7	4.14	29.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	10.86	76.00
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM	7	10.71	75.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	4.29	30.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	1.000	2.000
Wilcoxon W	29.000	30.000
Z	-3.019	-2.881
Asymp. Sig. (2-tailed)	.003	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b	.002 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

RUNX2	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM	7	4.93	34.50
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	10.07	70.50
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM	7	10.71	75.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	4.29	30.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	6.500	2.000
Wilcoxon W	34.500	30.000
Z	-2.305	-2.884
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.017 ^b	.002 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

RUNX2	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	8.64	60.50
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	6.36	44.50
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	8.71	61.00
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	6.29	44.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	16.500	16.000
Wilcoxon W	44.500	44.000
Z	-1.026	-1.088
Asymp. Sig. (2-tailed)	.305	.276
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.318 ^b	.318 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

RUNX2	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	4.14	29.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	10.86	76.00
	Total	14		

MDA	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	9.43	66.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	5.57	39.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	1.000	11.000
Wilcoxon W	29.000	39.000
Z	-3.029	-1.727
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002	.084
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b	.097 ^b

a. Grouping Variable: Klp
 b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	5.14	36.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	9.86	69.00
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	9.00	63.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	6.00	42.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	8.000	14.000
Wilcoxon W	36.000	42.000
Z	-2.111	-1.349
Asymp. Sig. (2-tailed)	.035	.177
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.038 ^b	.209 ^b

a. Grouping Variable: Klp
 b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	4.29	30.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	10.71	75.00
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	8.07	56.50
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	6.93	48.50
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	2.000	20.500
Wilcoxon W	30.000	48.500
Z	-2.891	-.513
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.608
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b	.620 ^b

a. Grouping Variable: Klp
 b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	5.00	35.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	10.00	70.00
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	7.93	55.50
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	7.07	49.50
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	7.000	21.500
Wilcoxon W	35.000	49.500
Z	-2.239	-.385
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025	.701
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 ^b	.710 ^b

a. Grouping Variable: Klp
 b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
RUNX2	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	10.14	71.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	4.86	34.00
	Total	14		
MDA	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	6.29	44.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	8.71	61.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	RUNX2	MDA
Mann-Whitney U	6.000	16.000
Wilcoxon W	34.000	44.000
Z	-2.374	-1.090
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018	.276
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.017 ^b	.318 ^b

a. Grouping Variable: Klp
 b. Not corrected for ties.

Tests of Normality

Klp	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM	7	.200 [*]	.944	7	.674
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	.018	.751	7	.013
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	.015	.783	7	.028
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	.200 [*]	.984	7	.976
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	.200 [*]	.898	7	.318

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

NPar Tests

Kruskal-Wallis Test

	Ranks		N	Mean Rank
	Klp			
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM		7	22.86
	Lesi Periapikal DM 2 minggu		7	7.57
	Lesi Periapikal DM 4 minggu		7	9.14
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu		7	26.29
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu		7	24.14
	Total		35	

Test Statistics^{a,b}

Luas area osifikasi Um2

Chi-Square	21.397
df	4
Asymp. Sig.	.000

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Klp

NPar Tests

Mann-Whitney Test

	Ranks			Sum of Ranks
	Klp	N	Mean Rank	
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM	7	10.71	75.00
	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	4.29	30.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Luas area osifikasi Um2

Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	30.000
Z	-2.907
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

- a. Grouping Variable: Klp
- b. Not corrected for ties.

NPar Tests

Mann-Whitney Test

	Ranks			Sum of Ranks
	Klp	N	Mean Rank	
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM	7	10.29	72.00
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	4.71	33.00
	Total	14		

Test Statistics^a

Luas area osifikasi Um2

Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	33.000
Z	-2.519
Asymp. Sig. (2-tailed)	.012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.011 ^b

- a. Grouping Variable: Klp
- b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM	7	6.57	46.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	8.43	59.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Luas area osifikasi Um2
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: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM	7	7.29	51.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	7.71	54.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Luas area osifikasi Um2
Mann-Whitney U	23.000
Wilcoxon W	51.000
Z	-.192
Asymp. Sig. (2-tailed)	.848
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.902 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	7.29	51.00
	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	7.71	54.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Luas area osifikasi Um2
Mann-Whitney U	23.000
Wilcoxon W	51.000
Z	-.212
Asymp. Sig. (2-tailed)	.832
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.902 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	4.00	28.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Luas area osifikasi Um2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.165
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

- a. Grouping Variable: Klp
b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM 2 minggu	7	4.00	28.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	11.00	77.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Luas area osifikasi Um2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	28.000
Z	-3.165
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

- a. Grouping Variable: Klp
b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	4.29	30.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	10.71	75.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Luas area osifikasi Um2
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	30.000
Z	-2.907
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

- a. Grouping Variable: Klp
b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM 4 minggu	7	4.43	31.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	10.57	74.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Luas area osifikasi Um2
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	31.000
Z	-2.778
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

NPar Tests**Mann-Whitney Test**

	Klp	Ranks		
		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Remodeling (Luas area osifikasi Um2)	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 2 minggu	7	8.14	57.00
	Lesi Periapikal DM + hUCMSC 4 minggu	7	6.86	48.00
	Total	14		

Test Statistics^a

	Luas area osifikasi Um2
Mann-Whitney U	20.000
Wilcoxon W	48.000
Z	-.575
Asymp. Sig. (2-tailed)	.565
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.620 ^b

a. Grouping Variable: Klp

b. Not corrected for ties.

MEKANISME EFEK hUCMSCs 2 minggu

Regression

Variables Entered/Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Klp ^b	.	Enter

- a. Dependent Variable: IL1RA
- b. All requested variables entered.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.555 ^a	.308	.251	1.1093

- a. Predictors: (Constant), Klp

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	6.583	1	6.583	5.350	.039 ^b
	Residual	14.766	12	1.230		
	Total	21.349	13			

- a. Dependent Variable: IL1RA
- b. Predictors: (Constant), Klp

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error			
1	(Constant)	7.229	.938		7.710	.000
	Klp	-.686	.296	-.555	-2.313	.039

- a. Dependent Variable: IL1RA

Regression

Variables Entered/Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Klp ^b	.	Enter

- a. Dependent Variable: MDA
- b. All requested variables entered.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.460 ^a	.211	.146	1.8774

- a. Predictors: (Constant), Klp

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	11.340	1	11.340	3.217	.098 ^b
	Residual	42.297	12	3.525		
	Total	53.637	13			

- a. Dependent Variable: MDA
- b. Predictors: (Constant), Klp

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error			
1	(Constant)	7.686	1.587		4.844	.000
	Klp	-.900	.502	-.460	-1.794	.098

- a. Dependent Variable: MDA

Regression

Variables Entered/Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	IL1RA, Klp ^b	.	Enter
2	.	IL1RA	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).

- a. Dependent Variable: IL1B
- b. All requested variables entered.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.819 ^a	.670	.610	1.9248
2	.818 ^b	.669	.641	1.8467

- a. Predictors: (Constant), IL1RA, Klp
- b. Predictors: (Constant), Klp

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	82.742	2	41.371	11.166	.002 ^b
	Residual	40.755	11	3.705		
	Total	123.497	13			
2	Regression	82.571	1	82.571	24.211	.000 ^c
	Residual	40.926	12	3.410		
	Total	123.497	13			

- a. Dependent Variable: IL1B
- b. Predictors: (Constant), IL1RA, Klp
- c. Predictors: (Constant), Klp

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	13.778	3.970		3.471	.005
	Klp	-2.502	.619	-.843	-4.045	.002
	IL1RA	-.108	.501	-.045	-.215	.834
2	(Constant)	13.000	1.561		8.329	.000
	Klp	-2.429	.494	-.818	-4.920	.000

- a. Dependent Variable: IL1B

Excluded Variables ^a						
Model		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics Tolerance
2	IL1RA	-.045 ^b	-.215	.834	-.065	.692

- a. Dependent Variable: IL1B
- b. Predictors in the Model: (Constant), Klp

Regression

Model	Variables Entered/Removed ^a		Method
	Variables Entered	Variables Removed	
1	MDA, IL1B ^b	.	Enter
2	.	MDA	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).

- a. Dependent Variable: RUNX2
b. All requested variables entered.

Model	Model Summary			
	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.604 ^a	.365	.249	2.9433
2	.603 ^b	.364	.311	2.8194

- a. Predictors: (Constant), MDA, IL1B
b. Predictors: (Constant), IL1B

Model	ANOVA ^a					
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	54.663	2	27.331	3.155	.083 ^b
	Residual	95.291	11	8.663		
	Total	149.954	13			
2	Regression	54.568	1	54.568	6.865	.022 ^c
	Residual	95.386	12	7.949		
	Total	149.954	13			

- a. Dependent Variable: RUNX2
b. Predictors: (Constant), MDA, IL1B
c. Predictors: (Constant), IL1B

Model	Coefficients ^a					
		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	11.285	2.357		4.788	.001
	IL1B	-.673	.277	-.611	-2.427	.034
	MDA	.044	.421	.026	.105	.919
2	(Constant)	11.456	1.634		7.011	.000
	IL1B	-.665	.254	-.603	-2.620	.022

- a. Dependent Variable: RUNX2

Model	Excluded Variables ^a					
		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics Tolerance
2	MDA	.026 ^b	.105	.919	.032	.911

- a. Dependent Variable: RUNX2
b. Predictors in the Model: (Constant), IL1B

Regression

Model	Variables Entered/Removed ^a		Method
	Variables Entered	Variables Removed	
1	RUNX2, MDA, IL1B ^b	.	Enter
2	.	MDA	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).
3	.	IL1B	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).

- a. Dependent Variable: Osterix
b. All requested variables entered.

Model	Model Summary			Std. Error of the Estimate
	R	R Square	Adjusted R Square	
1	.632 ^a	.399	.219	2.2530
2	.624 ^b	.389	.278	2.1661
3	.588 ^c	.346	.291	2.1464

- a. Predictors: (Constant), RUNX2, MDA, IL1B
b. Predictors: (Constant), RUNX2, IL1B
c. Predictors: (Constant), RUNX2

Model	ANOVA ^a					
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	33.755	3	11.252	2.217	.149 ^b
	Residual	50.759	10	5.076		
	Total	84.514	13			
2	Regression	32.902	2	16.451	3.506	.066 ^c
	Residual	51.612	11	4.692		
	Total	84.514	13			
3	Regression	29.230	1	29.230	6.345	.027 ^d
	Residual	55.284	12	4.607		
	Total	84.514	13			

- a. Dependent Variable: Osterix
b. Predictors: (Constant), RUNX2, MDA, IL1B
c. Predictors: (Constant), RUNX2, IL1B
d. Predictors: (Constant), RUNX2

Model	Coefficients ^a					
		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients Beta	t	Sig.
		B	Std. Error			
1	(Constant)	4.627	3.169		1.460	.175
	IL1B	-.244	.263	-.295	-.928	.375
	MDA	.132	.322	.105	.410	.691
	RUNX2	.320	.231	.426	1.387	.196
2	(Constant)	5.104	2.834		1.801	.099
	IL1B	-.216	.244	-.261	-.885	.395
	RUNX2	.323	.222	.430	1.457	.173
3	(Constant)	2.962	1.460		2.029	.065
	RUNX2	.442	.175	.588	2.519	.027

- a. Dependent Variable: Osterix

Model	Excluded Variables ^a					
	Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics Tolerance	
2	MDA	.105 ^b	.410	.691	.129	.911
3	MDA	.044 ^c	.177	.863	.053	.976
	IL1B	-.261 ^c	-.885	.395	-.258	.636

- a. Dependent Variable: Osterix
b. Predictors in the Model: (Constant), RUNX2, IL1B
c. Predictors in the Model: (Constant), RUNX2

Regression

Model	Variables Entered/Removed ^a		Method
	Variables Entered	Variables Removed	
1	Osterix, MDA, IL1B, RUNX2, Klp ^b	.	Enter
2	.	MDA	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).
3	.	Klp	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).
4	.	IL1B	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).
5	.	Osterix	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).
6	.	RUNX2	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).

a. Dependent Variable: Remodeling
 b. All requested variables entered.

Model	Model Summary				Std. Error of the Estimate
	R	R Square	Adjusted R Square		
1	.559 ^a	.312	-.117		.45739
2	.559 ^b	.312	.007		.43124
3	.522 ^c	.273	.055		.42072
4	.487 ^d	.237	.099		.41084
5	.406 ^e	.165	.095		.41161
6	.000 ^f	.000	.000		.43273

a. Predictors: (Constant), Osterix, MDA, IL1B, RUNX2, Klp
 b. Predictors: (Constant), Osterix, IL1B, RUNX2, Klp
 c. Predictors: (Constant), Osterix, IL1B, RUNX2
 d. Predictors: (Constant), Osterix, RUNX2
 e. Predictors: (Constant), RUNX2
 f. Predictor: (constant)

Model	ANOVA ^a					
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.761	5	.152	.727	.622 ^b
	Residual	1.674	8	.209		
	Total	2.434	13			
2	Regression	.761	4	.190	1.023	.446 ^c
	Residual	1.674	9	.186		
	Total	2.434	13			
3	Regression	.664	3	.221	1.251	.343 ^d
	Residual	1.770	10	.177		
	Total	2.434	13			
4	Regression	.578	2	.289	1.711	.225 ^e
	Residual	1.857	11	.169		
	Total	2.434	13			
5	Regression	.401	1	.401	2.368	.150 ^f
	Residual	2.033	12	.169		
	Total	2.434	13			
6	Regression	.000	0	.000	.	.9
	Residual	2.434	13	.187		
	Total	2.434	13			

a. Dependent Variable: Remodeling
 b. Predictors: (Constant), Osterix, MDA, IL1B, RUNX2, Klp
 c. Predictors: (Constant), Osterix, IL1B, RUNX2, Klp
 d. Predictors: (Constant), Osterix, IL1B, RUNX2
 e. Predictors: (Constant), Osterix, RUNX2
 f. Predictors: (Constant), RUNX2
 g. Predictor: (constant)

Model		Coefficients ^a				t	Sig.
		Unstandardized Coefficients B	Std. Error	Standardized Coefficients Beta			
1	(Constant)	-.252	1.582			-.159	.878
	Klp	.236	.494	.565		.477	.646
	IL1B	.071	.082	.505		.861	.414
	MDA	.000	.094	-.001		-.003	.998
	RUNX2	-.102	.096	-.799		-1.061	.320
	Osterix	.062	.067	.363		.919	.385
2	(Constant)	-.255	1.033			-.246	.811
	Klp	.236	.328	.567		.720	.490
	IL1B	.071	.072	.505		.992	.347
	RUNX2	-.102	.073	-.800		-1.397	.196
	Osterix	.062	.060	.363		1.019	.335
3	(Constant)	.328	.626			.523	.612
	IL1B	.034	.049	.245		.699	.500
	RUNX2	-.063	.047	-.491		-1.329	.213
	Osterix	.067	.059	.395		1.145	.279
4	(Constant)	.699	.324			2.160	.054
	RUNX2	-.077	.041	-.602		-1.848	.092
	Osterix	.056	.055	.333		1.022	.329
5	(Constant)	.867	.280			3.097	.009
	RUNX2	-.052	.034	-.406		-1.539	.150
6	(Constant)	.471	.116			4.070	.001

a. Dependent Variable: Remodeling

Model		Excluded Variables ^a				Collinearity Statistics	
		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Tolerance	
2	MDA	-.001 ^b	-.003	.998	-.001	.445	
3	MDA	-.150 ^c	-.505	.625	-.166	.895	
	Klp	.567 ^c	.720	.490	.233	.123	
4	MDA	-.084 ^d	-.301	.770	-.095	.973	
	Klp	.012 ^d	.022	.983	.007	.248	
	IL1B	.245 ^d	.699	.500	.216	.594	
5	MDA	-.069 ^e	-.248	.809	-.075	.976	
	Klp	.152 ^e	.286	.780	.086	.268	
	IL1B	.141 ^e	.413	.688	.123	.636	
	Osterix	.333 ^e	1.022	.329	.295	.654	
6	MDA	-.004 ^f	-.015	.989	-.004	1.000	
	Klp	-.307 ^f	-1.116	.286	-.307	1.000	
	IL1B	.335 ^f	1.231	.242	.335	1.000	
	Osterix	-.021 ^f	-.073	.943	-.021	1.000	
	RUNX2	-.406 ^f	-1.539	.150	-.406	1.000	

a. Dependent Variable: Remodeling

b. Predictors in the Model: (Constant), Osterix, IL1B, RUNX2, Klp

c. Predictors in the Model: (Constant), Osterix, IL1B, RUNX2

d. Predictors in the Model: (Constant), Osterix, RUNX2

e. Predictors in the Model: (Constant), RUNX2

f. Predictor: (constant)

MEKANISME EFEK hUCMSCs 4 minggu

Regression

Variables Entered/Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Klp ^b	.	Enter

- a. Dependent Variable: IL1RA
- b. All requested variables entered.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.605 ^a	.366	.313	1.9094

- a. Predictors: (Constant), Klp

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	25.246	1	25.246	6.925	.022 ^b
	Residual	43.749	12	3.646		
	Total	68.994	13			

- a. Dependent Variable: IL1RA
- b. Predictors: (Constant), Klp

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	12.314	2.104		5.853	.000
	Klp	-1.343	.510	-.605	-2.631	.022

- a. Dependent Variable: IL1RA

Regression

Variables Entered/Removed ^a			
Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Klp ^b	.	Enter

- a. Dependent Variable: MDA
- b. All requested variables entered.

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.018 ^a	.000	-.083	1.7528

- a. Predictors: (Constant), Klp

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.011	1	.011	.004	.952 ^b
	Residual	36.869	12	3.072		
	Total	36.880	13			

- a. Dependent Variable: MDA
- b. Predictors: (Constant), Klp

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	4.486	1.932		2.322	.039
	Klp	.029	.468	.018	.061	.952

- a. Dependent Variable: MDA

Regression

Model	Variables Entered/Removed ^a		Method
	Variables Entered	Variables Removed	
1	IL1RA, Klp ^b	.	Enter
2	.	IL1RA	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).

- a. Dependent Variable: IL1B
 b. All requested variables entered.

Model	Model Summary			Std. Error of the Estimate
	R	R Square	Adjusted R Square	
1	.693 ^a	.480	.385	1.2506
2	.651 ^b	.423	.375	1.2608

- a. Predictors: (Constant), IL1RA, Klp
 b. Predictors: (Constant), Klp

Model	ANOVA ^a					
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	15.870	2	7.935	5.074	.027 ^b
	Residual	17.204	11	1.564		
	Total	33.074	13			
2	Regression	14.000	1	14.000	8.808	.012 ^c
	Residual	19.074	12	1.590		
	Total	33.074	13			

- a. Dependent Variable: IL1B
 b. Predictors: (Constant), IL1RA, Klp
 c. Predictors: (Constant), Klp

Model	Coefficients ^a					
		Unstandardized Coefficients	Std. Error	Standardized Coefficients	t	Sig.
1	(Constant)	11.889	2.706		4.394	.001
	Klp	-1.278	.420	-.831	-3.044	.011
	IL1RA	-.207	.189	-.299	-1.094	.298
2	(Constant)	9.343	1.389		6.725	.000
	Klp	-1.000	.337	-.651	-2.968	.012

- a. Dependent Variable: IL1B

Model	Excluded Variables ^a					
		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics Tolerance
2	IL1RA	-.299 ^b	-1.094	.298	-.313	.634

- a. Dependent Variable: IL1B
 b. Predictors in the Model: (Constant), Klp

Regression

Model	Variables Entered/Removed ^a		Method
	Variables Entered	Variables Removed	
1	MDA, IL1B ^b	.	Enter
2	.	MDA	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).

- a. Dependent Variable: RUNX2
 b. All requested variables entered.

Model	Model Summary			Std. Error of the Estimate
	R	R Square	Adjusted R Square	
1	.717 ^a	.514	.426	1.9787
2	.650 ^b	.422	.374	2.0657

- a. Predictors: (Constant), MDA, IL1B
 b. Predictors: (Constant), IL1B

		ANOVA ^a				
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	45.585	2	22.792	5.821	.019 ^b
	Residual	43.069	11	3.915		
	Total	88.654	13			
2	Regression	37.450	1	37.450	8.777	.012 ^c
	Residual	51.204	12	4.267		
	Total	88.654	13			

- a. Dependent Variable: RUNX2
- b. Predictors: (Constant), MDA, IL1B
- c. Predictors: (Constant), IL1B

		Coefficients ^a				
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	14.167	2.689		5.268	.000
	IL1B	-1.162	.351	-.710	-3.313	.007
	MDA	-.479	.332	-.309	-1.441	.177
2	(Constant)	11.442	1.997		5.730	.000
	IL1B	-1.064	.359	-.650	-2.963	.012

- a. Dependent Variable: RUNX2

		Excluded Variables ^a				
Model		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics Tolerance
2	MDA	-.309 ^b	-1.441	.177	-.399	.963

- a. Dependent Variable: RUNX2
- b. Predictors in the Model: (Constant), IL1B

Regression

		Variables Entered/Removed ^a		
Model		Variables Entered	Variables Removed	Method
1		RUNX2, MDA, IL1B ^b	.	Enter
2		.	IL1B	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).
3		.	MDA	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).

- a. Dependent Variable: Osterix
- b. All requested variables entered.

		Model Summary		
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.542 ^a	.293	.081	2.5364
2	.541 ^b	.293	.164	2.4195
3	.469 ^c	.220	.155	2.4330

- a. Predictors: (Constant), RUNX2, MDA, IL1B
- b. Predictors: (Constant), RUNX2, MDA
- c. Predictors: (Constant), RUNX2

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	26.695	3	8.898	1.383	.304 ^b
	Residual	64.334	10	6.433		
	Total	91.029	13			
2	Regression	26.632	2	13.316	2.275	.149 ^c
	Residual	64.396	11	5.854		
	Total	91.029	13			
3	Regression	19.995	1	19.995	3.378	.091 ^d
	Residual	71.033	12	5.919		
	Total	91.029	13			

- a. Dependent Variable: Osterix
- b. Predictors: (Constant), RUNX2, MDA, IL1B
- c. Predictors: (Constant), RUNX2, MDA
- d. Predictors: (Constant), RUNX2

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.607	6.470		.094	.927
	IL1B	.063	.635	.038	.099	.923
	MDA	.449	.464	.286	.968	.356
	RUNX2	.549	.386	.542	1.422	.186
2	(Constant)	1.182	2.663		.444	.666
	MDA	.431	.404	.274	1.065	.310
	RUNX2	.523	.261	.516	2.003	.070
3	(Constant)	3.437	1.624		2.117	.056
	RUNX2	.475	.258	.469	1.838	.091

- a. Dependent Variable: Osterix

Excluded Variables^a

Model		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics Tolerance
2	IL1B	.038 ^b	.099	.923	.031	.482
3	IL1B	-.113 ^c	-.325	.752	-.097	.578
	MDA	.274 ^c	1.065	.310	.306	.971

- a. Dependent Variable: Osterix
- b. Predictors in the Model: (Constant), RUNX2, MDA
- c. Predictors in the Model: (Constant), RUNX2

Regression

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Osterix, MDA, IL1B, RUNX2, Klp ^b	.	Enter
2	.	RUNX2	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).
3	.	Klp	Backward (criterion: Probability of F-to-remove >= .100).

- a. Dependent Variable: Remodeling
- b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.911 ^a	.830	.723	.39392
2	.904 ^b	.818	.737	.38430
3	.886 ^c	.785	.720	.39581

- a. Predictors: (Constant), Osterix, MDA, IL1B, RUNX2, Klp
- b. Predictors: (Constant), Osterix, MDA, IL1B, Klp
- c. Predictors: (Constant), Osterix, MDA, IL1B

ANOVA ^a						
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	6.045	5	1.209	7.791	.006 ^b
	Residual	1.241	8	.155		
	Total	7.286	13			
2	Regression	5.957	4	1.489	10.084	.002 ^c
	Residual	1.329	9	.148		
	Total	7.286	13			
3	Regression	5.720	3	1.907	12.170	.001 ^d
	Residual	1.567	10	.157		
	Total	7.286	13			

a. Dependent Variable: Remodeling

b. Predictors: (Constant), Osterix, MDA, IL1B, RUNX2, Klp

c. Predictors: (Constant), Osterix, MDA, IL1B, Klp

d. Predictors: (Constant), Osterix, MDA, IL1B

Coefficients ^a						
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	-2.982	1.383		-2.156	.063
	Klp	.243	.194	.337	1.255	.245
	IL1B	.337	.116	.718	2.895	.020
	MDA	.379	.079	.853	4.822	.001
	RUNX2	.050	.066	.173	.752	.474
	Osterix	-.177	.065	-.626	-2.709	.027
2	(Constant)	-2.390	1.110		-2.154	.060
	Klp	.240	.189	.332	1.268	.237
	IL1B	.287	.093	.612	3.076	.013
	MDA	.352	.068	.792	5.157	.001
	Osterix	-.161	.060	-.570	-2.671	.026
3	(Constant)	-1.239	.657		-1.885	.089
	IL1B	.213	.075	.453	2.845	.017
	MDA	.326	.067	.733	4.864	.001
	Osterix	-.108	.045	-.383	-2.410	.037

a. Dependent Variable: Remodeling

Excluded Variables ^a						
Model		Beta In	t	Sig.	Partial Correlation	Collinearity Statistics Tolerance
2	RUNX2	.173 ^b	.752	.474	.257	.404
3	RUNX2	.166 ^c	.700	.502	.227	.404
	Klp	.332 ^c	1.268	.237	.389	.296

a. Dependent Variable: Remodeling

b. Predictors in the Model: (Constant), Osterix, MDA, IL1B, Klp

c. Predictors in the Model: (Constant), Osterix, MDA, IL1B

Lampiran 5 Gambar Penelitian

1. Tali pusat manusia yang akan diproses untuk isolasi dan kultur hUCMSCs.



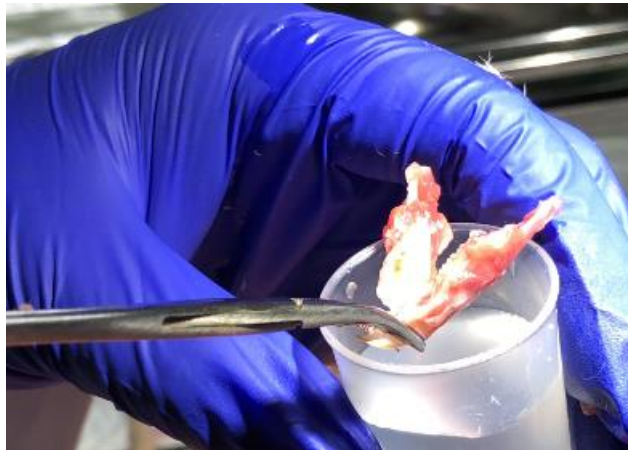
2. Preparasi saluran akar pada gigi molar pertama rahang bawah kanan tikus



3. Deponir hUCMSCs kedalam saluran akar menggunakan jarum suntik Hamilton



4. Spesimen mandibula yang didapatkan setelah prosedur terminasi hewan coba





KEMENTERIAN PENDIDIKAN KEBUDAYAAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131

Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472

Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

BERITA ACARA UJIAN AKHIR TAHAP PERTAMA (TERTUTUP)

PENDIDIKAN DOKTOR

Pada hari ini **Rabu** tanggal **Empat Belas** , Bulan **Juli** tahun **Dua Ribu Dua Puluh Satu** mulai pukul **13.00 – 16.00** WIB di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga diselenggarakan Ujian Akhir Tahap Pertama (Tertutup) yang disusun oleh :

Nama : Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K)

NIM : 011617017324

Judul :PENGARUH PEMBERIAN *HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELLS* TERHADAP REMODELING TULANG LESI PERIAPIKAL GIGI PADA KASUS DIABETES MELLITUS

Panitia penguji disertasi terdiri dari

1.	Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si	Ketua	1.	
2.	Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh	Anggota		2.
3.	Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)	Anggota	3.	
4.	Prof. Dr. Aulanni'am, drh.,DES	Anggota		4.
5.	Prof. Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr.,Sp.OT(K)	Anggota	5.	
6.	Prof. Dr. Ira Widjiastuti, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K)	Anggota		6.
7.	Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes	Anggota	7.	
8.	Dr. Michael Josef Kridanto Kamadjaja, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)	Anggota		8.

Memutuskan bahwa ujian akhir tahap pertama (tertutup) pendidikan doktor tersebut :

- Lulus / Tidak Lulus *) dengan nilai :
- Masih harus di uji kembali pada tanggal :

Ketua panitia penguji disertasi ,

Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si
NIP. _____

Catatan : Penelitian dibimbing oleh :

Promotor : Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh

Ko-Promotor : Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg.,M.Kes.,Sp.Pros(K)

Catatan : *) coret yang tidak perlu



KEMENTERIAN PENDIDIKAN KEBUDAYAAN

UNIVERSITAS AIRLANGGA

FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131

Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472

Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : dekan@fk.unair.ac.id

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :

NIP :

Pangkat/Golongan :

Tenaga tetap di :

Dengan ini menyatakan bahwa pada hari dan jam tersebut dibawah ini saya **tidak sedang bertugas di tempat lain** sehingga **bersedia / tidak bersedia** *) untuk menjadi ketua / anggota Penguji Disertasi Program Doktor atas nama Eric Priyo Prasetyo, drg.,M.Kes.,Sp.KG(K) yang akan diselenggarakan pada :

Hari, Tanggal : Rabu, 14 Juli 2021

Pukul : 13.00 – 16.00 WIB

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya,

Yang membuat,

NIP.-----

*) coret yang tidak perlu