

**SEKRESI OSTEOPONTIN PADA
SCAFFOLD KITOSAN – HIDROKSIAPATIT DENGAN
SEEDING CRYOPRESERVED HUMAN UMBILICAL
CORD MESENCHYMAL STEM CELL**

SKRIPSI



Oleh:

PATRICIA TALITHA DAMAYANTI

NIM: 021911133144

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

**SEKRESI *OSTEOPONTIN* PADA
SCAFFOLD KITOSAN – HIDROKSIAPATIT DENGAN
*SEEDING CRYOPRESERVED HUMAN UMBILICAL
CORD MESENCHYMAL STEM CELL***

SKRIPSI



Oleh:

PATRICIA TALITHA DAMAYANTI

NIM: 021911133144

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

LEMBAR PENGESAHAN

**SEKRESI OSTEOPONTIN PADA SCAFFOLD
KITOSAN – HIDROKSIAPATIT DENGAN SEEDING
CRYOPRESERVED HUMAN UMBILICAL CORD
MESENCHYMAL STEM CELL**

SKRIPSI

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan
Pendidikan Kedokteran Gigi di Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Airlangga Surabaya**

Oleh:

PATRICIA TALITHA DAMAYANTI
NIM: 021911133144

Menyetujui

Pembimbing Utama



Dr. Michael Josef Kridanto K.,
drg., M.Kes., Sp.Pros(K)
NIP: 196305311989021001

Pembimbing Serta



Karina Mundiratri, drg.,
Sp.Pros
NIP: 198910082018047201

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2022**

PENETAPAN PANITIA PENGUJI SKRIPSI

Skripsi ini telah diuji pada tanggal 12 Januari 2023

PANITIA PENGUJI SKRIPSI

- 1. Dr. Michael Josef Kridanto K., drg., M.Kes., SpPros(K)**
(Ketua Penguji/Pembimbing Utama)
- 2. Karina Mundiratri, drg., SpPros**
(Sekretaris Penguji/Pembimbing Serta)
- 3. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg., MKes., SpPros(K)**
(Anggota Penguji)
- 4. Harry Laksono, drg., Mkes., SpPros(K) (Anggota Penguji)**
- 5. Nadia Kartikasari, drg., Mkes., PhD (Anggota Penguji)**

SURAT PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Patricia Talitha Damayanti

NIM : 021911133144

Program studi : Pendidikan Dokter Gigi

Fakultas : Kedokteran Gigi

Jenjang : Sarjana (S1)

Menyatakan bahwa saya tidak melakukan plagiat dalam penulisan skripsi saya yang berjudul:

SEKRESI OSTEOPONTIN PADA *SCAFFOLD* KITOSAN –
HIDROKSIAPATIT DENGAN *SEEDING HUMAN UMBILICAL CORD*
MESENCHYMAL STEM CELL

Apabila pada suatu saat nanti terbukti melakukan tindakan plagiat, maka saya akan menerima sanksi yang telah ditetapkan.

Demikian surat pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Surabaya, 5 Januari 2023



Patricia Talitha Damayanti
NIM. 021911133144

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan pada Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga penelitian dan skripsi yang berjudul “**SEKRESI OSTEOPONTIN PADA *SCAFFOLD* KITOSAN – HIDROKSIAPATIT DENGAN *SEEDING CRYOPRESERVED HUMAN UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELL***” dapat diselesaikan dengan baik. Penulis menyadari penyusunan skripsi ini tidak dapat terselesaikan tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak. Perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Dr. Agung Sosiawan, drg., M.Kes., SH., MH., MKes. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk menempuh Pendidikan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
2. Prof. Dr. Nike Hendrijantini, drg., MKes., SpPros(K) selaku Ketua Departemen Prostodonsia yang telah memberikan izin dalam pembuatan skripsi.
3. Dr. Michael Josef Kridanto K., drg., M.Kes., SpPros(K) selaku dosen pembimbing utama yang selalu memberikan bimbingan, masukan, arahan, evaluasi, koreksi serta meluangkan waktu selama penyusunan skripsi.
4. Karina Mundiratri, drg., SpPros selaku dosen pembimbing serta yang turut memberikan bimbingan, masukan, arahan serta meluangkan waktu selama penyusunan skripsi.
5. Seluruh dosen penguji yang telah membantu melalui kritik dan saran serta banyak ilmu dalam penyusunan skripsi ini.

6. Seluruh dosen dan staff Departemen Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.
7. Prof. Dr. Theresia Indah Budhy S., drg., M.Kes. selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan selama proses perkuliahan strata 1 di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
8. Ayah dan Ibu penulis, David Prayoga Sanyoto dan Monica Soebekti, Adik Stevanus Darma Pramana yang telah memberikan semangat, doa dan dukungan yang tiada henti dalam segala hal.
9. Faizah Rahma, Mayang Aziza, Sandria Visichella, Alvin Aurellius, Caeleb Fabrizio, Thariq dan Nadien Sekar yang telah memberikan dukungan moral dan semangat dalam menyelesaikan penulisan skripsi
10. Paul Henry Grahito Roma Andilolo Lobing yang telah banyak membantu, menemani, memberi dukungan serta doa dalam pembuatan skripsi.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih membutuhkan penyempurnaan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Surabaya, 5 Januari 2023

Penulis

RINGKASAN

Rekayasa jaringan telah menjadi pilihan pengobatan regeneratif dengan tujuan mengembalikan, memulihkan, dan memelihara jaringan yang rusak. Dalam upaya meregenerasi tulang, terapi yang dapat dilakukan merupakan rekayasa jaringan tulang berupa pemberian *bone graft*. Salah satu biomaterial yang banyak dikembangkan dalam rekayasa jaringan tulang adalah *scaffold*. *Scaffold* merupakan *template sel* yang digunakan sebagai medium pertumbuhan jaringan baru untuk pertumbuhan sel, dan diferensiasi, merangsang adhesi sel dan migrasi sel. *Scaffold* yang sesuai untuk rekayasa jaringan tulang dapat dibuat dari material yang berbeda – beda diantaranya kitosan dan hidroksiapatit. Penggabungan dari kedua material ini menjadi *scaffold* dapat meningkatkan kemampuan osteoinduktif. *Scaffold* hasil gabungan dari kitosan-hidroksiapatit juga dapat meningkatkan kekuatan mekanik dan menurunkan waktu degradasi dari *scaffold*. Penggunaan hUCMSCs memiliki banyak kelebihan dan dapat dikembangkan secara *in vitro*. Ketersediaan MSC dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya dengan teknik *cryopreservation*. *Cryopreserved* hUCMSCs memungkinkan penyimpanan dan penggunaan hUCMSCs terlepas dari peristiwa kelahiran sehingga dapat mempersingkat waktu penelitian. Osteopontin merupakan protein non kolagen dari sel osteoblas. Sekresi dari osteopontin akan meningkat pada tahap akhir maturasi osteoblas. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh sekresi osteopontin pada *scaffold* kitosan-hidroksiapatit dengan *seeding cryopreserved* hUCMSCs. Pendahuluan dalam proses penelitian dilakukan dengan *thawing* hUCMSCs yang telah tersedia pada *Stem Cell Research Centre* dengan kondisi *frozen* pada pasase 2. Kemudian,

dilanjutkan dengan prosedur pembuatan *scaffold* kitosan-hidroksiapatit dan prosedur sterilisasi *scaffold* kitosan-hidroksiapatit dengan dosis 25kGy. *Scaffold* terlebih dahulu diperiksa ukuran pori $<150\mu\text{m}$ menggunakan pemeriksaan SEM dan hUCMSCs terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan *immunocytochemistry* pada CD 45 dan 90 untuk membuktikan sel yang digunakan adalah hUCMSCs. Setelah terbukti benar maka, dilanjutkan dengan prosedur *seeding* pada *scaffold* kitosan-hidroksiapatit. *Seeding* hUCMSCs dilakukan selama tiga hari kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan SEM untuk memeriksa perlekatan sel pada *scaffold*. Perlakuan pada setiap kelompok diamati pada hari ke – 14 dan hari ke – 21. Setelah itu, dilakukan pembacaan dengan ELISA untuk melihat sekresi osteopontin, Hasil penelitian menunjukkan jika pada hari ke – 14 dan hari ke – 21 tidak menunjukkan peningkatan secara signifikan pada kelompok KP dan P dan mengalami peningkatan signifikan pada KN. Dari penelitian ini dapat disimpulkan sekresi osteopontin pada *scaffold* kitosan-hidroksiapati dengan ukuran $<150\mu\text{m}$ dengan *seeding cryopreserved* hUCMSCs tidak berpengaruh secara signifikan.

**SECRETION OF OSTEOPONTIN IN CHITOSAN – HYDROXYPATITE
SCAFFOLD WITH INDUCTION OF HUMAN UMBILICAL CORD
MESENCHYMAL STEM CELL**

ABSTRACT

Background : Regenerative medicine has grown significantly in recent years, particularly tissue engineering. Bone tissue engineering in the form of bone grafts is a therapy that can be used in an attempt to regenerate bone. Scaffold is one of the most advanced biomaterials for bone tissue engineering. The combination of chitosan – HA can improve the mechanical properties of the scaffold such as increasing strength and having good biocompatibility. Osteopontin is a non-collagen protein secreted from osteoblast cells. Osteopontin is highly expressed in the late stages of osteogenesis from the 7th to the 28th day of osteoblast maturation. **Objective :** To determine the effect of osteopontin secretion on the chitosan-hydroxyapatite scaffold by in vitro induction of hUCMSCs. **Methods :** hUCMSCs were thawed, then immunocytochemistry was performed on the cells' CD 45 and CD 90. The cells were subsequently seeded on the scaffold to evaluate cell attachment and pore size. Osteopontin secretion was examined using an ELISA. **Result :** Days 14 and 21 found no significant increase in osteopontin secretion in the chitosan-hydroxyapatite scaffold with hUCMSCs induction. **Conclusion :** Osteopontin secretion in the chitosan-hydroxyapatite scaffold with hUCMSCs did not have a significant effect.

Keywords : Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell, cryopreserved, chitosan-hydroxyapatite, osteopontin, scaffold

**SEKRESI OSTEOPONTIN PADA *SCAFFOLD* KITOSAN –
HIDROKSIAPATIT DENGAN *SEEDING CRYOPRESERVED HUMAN
UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELL***

ABSTRAK

Latar Belakang : Dalam beberapa tahun terakhir pengobatan regeneratif khususnya bidang rekayasa jaringan telah meningkat dengan pesat. Dalam upaya meregenerasi tulang, terapi yang dapat dilakukan merupakan rekayasa jaringan tulang berupa pemberian *bone graft*. Salah satu biomaterial yang banyak dikembangkan dalam rekayasa jaringan tulang adalah *scaffold*. Gabungan kitosan – HA dapat meningkatkan sifat mekanik pada *scaffold* seperti peningkatan kekuatan dan memiliki biokompatibilitas yang baik. Osteopontin merupakan sekresi non kolagen protein dari sel osteoblast. Osteopontin terekspresi tinggi dalam tahap akhir osteogenesis yaitu pada dari hari ke-7 sampai hari ke-28 saat maturasi osteoblast.

Tujuan : Mengevaluasi lebih lanjut jumlah osteopontin melalui *scaffold* kitosan – hidroksiapatit yang diinduksi dengan *human umbilical cord mesenchymal stem cell* (hUCMSCs). **Metode :** *Thawing* hUCMSCs dilanjutkan dengan pemeriksaan *immunocytochemistry* pada hUCMSCs CD 45 dan CD 90 kemudian dilakukan *seeding* pada *scaffold* dan diperiksa perlekatan sel serta besar pori melalui SEM, dilakukan sekresi osteopontin dengan ELISA. **Hasil :** Hari ke 14 dan 21 ditemukan peningkatan tidak signifikan pada sekresi osteopontin pada *scaffold* kitosan-hidroksiapatit dengan induksi hUCMSCs. **Kesimpulan :** sekresi osteopontin pada *scaffold* kitosan – hidroksiapatit dengan hUCMSCs tidak berpengaruh secara signifikan.

Kata Kunci : *Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell, cryopreserved, kitosan – hidroksiapatit, osteopontin, scaffold*

DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN	iii
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	iv
SURAT PERNYATAAN ORISIONALITAS.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN.....	viii
ABSTRACT	x
ABSTRAK.....	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	7
1.4.2 Manfaat Praktis.....	7
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1 Rekayasa Jaringan.....	8
2.1.1 Rekayasa Jaringan Tulang	8
2.2 Osteogenesis	9
2.3 Scaffold.....	10
2.3.1 Definisi <i>Scaffold</i>	10
2.3.2 Morfologi <i>Scaffold</i>	11
2.3.3 Diferensiasi Sel Osteogenik pada <i>Scaffold</i>	11
2.3.4 Metode Pembuatan <i>Scaffold</i>	12

2.4 Kitosan	14
2.5 Hidroksiapatit (HA)	16
2.5 <i>Scaffold</i> Kitosan-Hidroksiapatit.....	17
2.7 <i>Stem Cell</i>	18
2.7.1 Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell (hUCMSCs)	19
2.7 <i>Bone Remodelling</i>	20
2.8 Osteopontin.....	22
 BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	24
3.1 Kerangka Konseptual.....	24
3.2 Keterangan Kerangka Konseptual	25
3.3 Hipotesis Penelitian	26
 BAB IV METODOLOGI PENELITIAN	27
4.1 Jenis Penelitian	27
4.2 Rancangan Penelitian.....	27
4.3 Sampel dan Besar Sampel Penelitian.....	28
4.3.1 Sampel Penelitian	28
4.3.2 Besar Sampel Penelitian	28
4.3.3 Kriteria Inklusi.....	30
4.3.4 Kriteria Eksklusi	30
4.4 Variabel Penelitian.....	30
4.4.1 Variabel Bebas	30
4.4.2 Variabel Terikat	30
4.4.3 Variabel Terkendali	30
4.5 Definisi Operasional	31
4.6 Waktu dan Lokasi Penelitian	32
4.6.1 Waktu Penelitian.....	32
4.6.2 Lokasi Penelitian	32
4.7 Alat dan Bahan Penelitian.....	32
4.7.1 Alat Penelitian	32
4.7.2 Bahan Penelitian	32
4.8 Cara Kerja	33
4.8.1 Pengajuan Etik Penelitian	33
4.8.2 Prosedur <i>Thawing cryopreserved</i> hUCMSCs	33
4.8.3 Prosedur Pembuatan <i>Scaffold</i> Kitosan - Hidroksiapatit.....	35
4.8.4 Prosedur Sterilisasi <i>Scaffold</i> Kitosan - Hidroksiapatit.....	35
4.8.5 Pemeriksaan <i>Immunocytochemistry</i>	36
4.8.6 Prosedur <i>Seeding</i> hUCMSCs pada <i>Scaffold</i> Kitosan - Hidroksiapatit	37
4.8.7 Pemeriksaan <i>Scanning Electron Microscope</i> (SEM) Pada <i>Scaffold</i>	37
4.8.8 Metode Sekresi Osteopontin	38
4.9 Prosedur Pengambilan dan Pengumpulan Data	39
4.10 Pengolahan dan Analisis Data	39
4.11 Alur Penelitian	40

BAB 5 HASIL PENELITIAN	41
5.1 Pemeriksaan <i>Immunocytochemistry</i> pada hUCMSCs	41
5.2 Pemeriksaan <i>Scanning Electron Microscope</i>	42
5.3 Hasil Penelitian	43
5.4 Analisis Data	45
5.4.1 Uji Normalitas Jumlah Sekresi Osteopontin	45
5.4.2 Uji Homogenitas Jumlah Sekresi Osteopontin	46
5.4.3 Uji ANOVA Perbedaan Jumlah Sekresi Osteopontin	46
BAB 6 PEMBAHASAN.....	49
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	56
7.1 Kesimpulan	56
7.2 Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	67

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Teknik fabrikasi konvensional dan <i>rapid prototyping</i>	13
Tabel 5.1 Nilai rata – rata dan standar deviasi sekresi osteopontin.....	44
Tabel 5.2 Hasil uji normalitas sekresi osteopontin.....	45
Tabel 5.3 Hasil uji homogenitas jumlah sekresi osteopontin.....	46
Tabel 5.4 Hasil uji ANOVA	47
Tabel 5.5 Hasil uji Tukey – HSD	48

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Triad rekayasa jaringan	9
Gambar 2.2 Bentuk <i>scaffold</i> 3D untuk regenerasi jaringan	10
Gambar 2.3 Contoh desain <i>scaffold</i> acak untuk rekayasa jaringan	11
Gambar 2.4 Struktur kimia kitosan	14
Gambar 2.5 Proses KOnvensional Ekstraksi Kitosan dari Exoskeleta Krustaea .	15
Gambar 2.6 Strukur kimia hidroksiapatit	17
Gambar 2.7 Representasi diagram tali pusat manusia	20
Gambar 2.8 Proses <i>Bone Remodelling</i>	20
Gambar 2.9 Bentuk Struktur dari Osteopontin	23
Gambar 3.1 Kerangka konseptual	24
Gambar 4.1 Rancangan penelitian	27
Gambar 4.2 Alur Penelitian.....	40
Gambar 5.1 Pemeriksaan <i>Immunocytochemistry</i> pada hUCMSCs	41
Gambar 5.2 Pemeriksaan SEM pada <i>scaffold</i> tanpa induksi hUCMSCs	42
Gambar 5.3 Grafik rata - rata sekresi osteopontin.....	44

DAFTAR SINGKATAN

ECM	: Extracellular matrix
3D	: Tiga dimensi
HA	: Hidroksiapatit
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
hUCMSCs	: <i>Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell</i>
PBS	: <i>Phosphate buffersaline</i>
FBS	: <i>Fetal bovine serum</i>
BSA	: <i>Bovine serum albumin</i>
FACS	: <i>Fluorescent activated cell sorting</i>
OPN	: Osteopontin
SEM	: <i>Scanning Electro Microscope</i>