

TESIS



**KEMAMPUAN METABOLIT SEL PUNCA MESENKIMAL GINGIVA
TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI RUNX2 DAN OSTERIX PADA
OSTEOLISIS KALVARIA YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (*IN VIVO*)**

Oleh:

Nastiti Faradilla Ramadhani
022024153005

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KESEHATAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS AIRLANGGA

2022

TESIS



**KEMAMPUAN METABOLIT SEL PUNCA MESENKIMAL GINGIVA
TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI RUNX2 DAN OSTERIX PADA
OSTEOLISIS KALVARIA YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (*IN VIVO*)**

Oleh:

Nastiti Faradilla Ramadhani
022024153005

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KESEHATAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS AIRLANGGA

2022

**KEMAMPUAN METABOLIT SEL PUNCA MESENKIMAL GINGIVA TERHADAP
PENINGKATAN EKSPRESI RUNX2 DAN OSTERIX PADA OSTEOLISIS
KALVARIA YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (*IN VIVO*)**

TESIS

**Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Menyelesaikan Pendidikan Program
Magister Ilmu Kesehatan Gigi Pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga**

Oleh:

**Nastiti Faradilla Ramadhani
NIM.022024153005**

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KESEHATAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS AIRLANGGA

2022

**KEMAMPUAN METABOLIT SEL PUNCA MESENKIMAL GINGIVA TERHADAP
PENINGKATAN EKSPRESI RUNX2 DAN OSTERIX PADA OSTEOLISIS
KALVARIA YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (*IN VIVO*)**

TESIS

Oleh:

Nastiti Faradilla Ramadhani
NIM.022024153005

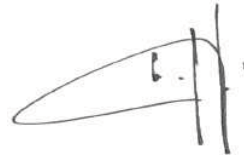
Menyetujui,

PEMBIMBING UTAMA,



Dr. Sri Wigati Mardi Mulyani, drg., M.Kes
NIP. 196601011991032003

PEMBIMBING SERTA,



Prof. Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M.Kes
NIP. 196412161990022001

KOORDINATOR PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU KESEHATAN GIGI



Dr. Taufan Bramantoro, drg., M.Kes
NIP. 198406222008121004

PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS

Tesis ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai pada Tanggal 18 Juli 2022

PANITIA PENGUJI:

Ketua : 1. Dr. Devi Rianti, drg., M. Kes.

Anggota : 1. Dr. Sri Wigati Mardi Mulyani, drg., M. Kes
2. Prof. Dr. Rini Devijanti Ridwan, drg., M. Kes
3. Dr. Taufan Bramantoro, drg., M. Kes
4. Tania Saskianti, drg., Ph. D., Sp.KGA(K)

LEMBAR PERNYATAAN ORISINALITAS

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya:

Nama : Nastiti Faradilla Ramadhani

NIM : 022024153005

Judul Tesis : KEMAMPUAN METABOLIT SEL PUNCA MESENKIMAL GINGIVA
TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI RUNX2 DAN OSTERIX PADA OSTEOLISIS
KALVARIA YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (IN VIVO)

Saya menyatakan bahwa karya ilmiah yang berjudul Kemampuan Metabolit Sel Punca Mesenkimal Gingiva Terhadap Peningkatan Ekspresi RUNX2 Dan Osterix Pada Osteolisis Kalvaria yang Diinduksi Lipopolisakarida (*in vivo*) adalah hasil karya sendiri, dan semua sumber yang saya kutip maupun rujuk saya nyatakan benar. Atas pernyataan ini, saya siap menanggung risiko dan sanksi yang dijatuhkan kepada saya apabila dikemudian ditemukan adanya pelanggaran terhadap etika keilmuan dalam karya ini, atau ada klaim dari pihak lain terhadap keaslian karya saya ini.

Surabaya, 26 Juli 2022

Yang membuat pernyataan,



Nastiti Faradilla Ramadhani

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirabbil'alamiin, segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan pembuatan Tesis dengan judul “Kemampuan Metabolit Sel Punca Mesenkimal Gingiva Terhadap Peningkatan Ekspresi RUNX2 Dan Osterix Pada Osteolisis Kalvaria Yang Diinduksi Lipopolisakarida (*in vivo*)”.

Penyusunan Tesis ini tidak terlepas dari bantuan dan dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan banyak terimakasih kepada:

1. Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Dr. Agung Sosiawan, drg., M.Kes beserta seluruh jajarannya.
2. Ketua Program Studi Magister Ilmu Kesehatan Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Dr. Taufan Bramantoro, drg., M.Kes.
3. Dosen Pembimbing Akademik, Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes
4. Pembimbing Utama Dr. Sri Wigati Mardi Mulyani, drg., M.Kes., serta Pembimbing Serta Prof. Dr. Rini Devijanti, drg., M.Kes
5. Dosen Penguji: Dr. Devi Rianti, drg., M.Kes, Dr. Taufan Bramantoro, drg., M.Kes., dan Tania Saskianti, drg., Ph.D., Sp.KGA.
6. Para Dosen Program Studi Ilmu Kesehatan Gigi Universitas Airlangga, dan Ibu Dian Pramita Santi selaku bagian administrasi IKESGI.
7. Kedua orang tua, Papa Agus Sulaiman Suaidy., SH., MM dan Mama Ahmisia Herlina yang selalu mendukung, memotivasi, dan mendoakan dalam setiap langkah. Kedua mertua, Bapak Ir. Dwi Arijanto dan Ibu drg. Suciati atas segala dukungan dan doa untuk penulis
9. Suami, Lettu Kes drg. Muhammad Akbar Arsyah Setyaji yang selalu mendukung baik moril maupun materil, memotivasi, dan memberi semangat. Anakku tersayang Azqila Nafisha Syaharani yang sudah menjadi penyemangat dan motivasi hidup.

10. Adik-adikku, Muthia Tsania Meraldyasti S.M, Rifat Emirraynor Suaidy, Sunu Dwi Subogo, Nur Rahma.
11. Seluruh Staf Bagian Radiologi Kedokteran Gigi, Dr. Eha Renwi Astuti, drg., M.Kes., Sp.RKG(K), Otty Ratna Wahjuni, drg., M.Kes., Yunita Savitri, drg., M.Kes., Deny Saputra, drg., M.Kes., Alhidayati Asymal , drg., M.Kes., Ramadhan Hardani Putra, drg., M.Kes., Ph.D., Dina Karimah Putri, drg., M.Si., Aga Satria N., drg., Sp.RKG
12. Teman-teman IKESGI 2021, Vitra, Mas Fredy, Cindy, Masya, Gea dan Mba Indah
13. Sahabat-sahabat serta senior terbaikku, Dr. Alexander Patera Nugraha, drg., M.Kes., M.Imun, Astari Puteri, drg., M.Kes., Adya Pramusita, drg., M.Si., Saka Winias, drg., M.Kes., Sp.PM., Alivy Aulia Azzahra, drg., Sp.KGA., Ratri Maya Sitalaksmi, drg., M.Kes., Sp.Pros(K)., Ph.D., Dini Setyowati, drg., MPH., Ph.D., Muhammad Dimas Aditya Ari, drg., M.Kes., Sp.Pros., Kintan Deviana, drg., Ryza Indah Permatasari, drg., Sp.KG., Fyrial Putri N., drg., Revinska Bagus I, drg., Febrian A., drg., Dalhar H., drg., Sp.KG.,
14. Seluruh civitas akademika Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga
15. Pihak-pihak lain yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang turut berperan serta dalam penyusunan tesis ini.

Penulis menerima saran dan kritik yang membangun demi kesempurnaan dan perbaikan di kemudian hari, dan tidak lupa penulis memohon maaf sebesar-besarnya apabila terdapat kekurangan maupun kesalahan. Semoga Tesis ini dapat memberikan manfaat kepada berbagai pihak.

Surabaya, 27 Juli 2022

Penulis

ABSTRAK

KEMAMPUAN METABOLIT SEL PUNCA MESENKIMAL GINGIVA TERHADAP PENINGKATAN EKSPRESI RUNX2 DAN OSTERIX PADA OSTEOLISIS KALVARIA YANG DIINDUKSI LIPOPOLISAKARIDA (*IN VIVO*)

Nastiti Faradilla Ramadhani

Latar Belakang: Penyakit tulang yang disebabkan inflamasi dapat menurunkan *quality of life*. Metabolit GMSCs merupakan biomaterial yang mengandung sitokin, anti-mikroba *peptide*, *growth factor* yang dapat diperoleh dari hasil kultur GMSCs. GMSCs- CM dapat menghambat resorpsi tulang dan mempercepat regenerasi tulang untuk meningkatkan kualitas hidup pasien. RUNX2 dan Osterix merupakan gen transkripsi penting dalam osteoblastogenesis

Tujuan: Menganalisa kemampuan metabolit sel punca mesenkimal gingiva terhadap peningkatan RUNX2 dan OSX pada model osteolisis kalvaria *R. norvegicus* yang diinduksi lipopolisakarida secara *in vivo*

Metode: 10 tikus wistar jantan dan sehat (*R. norvegicus*) umur 1-2 bulan dengan berat badan 250-300 gram dibagi menjadi 3 kelompok, yaitu Kelompok LPS: 100µg LPS hari 1-7; Kelompok LPS dan Metabolit GMSCs: 100µg LPS + 100µg Metabolit GMSCS hari 1-7. LPS *E. Coli* digunakan untuk menginduksi resorpsi tulang pada calvaria dengan injeksi subkutan. GMSCs-CM diambil setelah kultur passage 4-5 dan difilter berdasarkan ukuran molekul kemudian disuntikkan secara subkutan pada calvaria. Semua sampel diperiksa pada hari ke-8. Jumlah ekspresi RUNX2 dan Osterix pada osteoblas kemudian diamati di bawah perbesaran 100x, 400x dan 1000x. Independent-t-test dilakukan untuk menganalisis perbedaan antar kelompok ($p < 0,01$).

Hasil: Ekspresi RUNX2 dan Osterix meningkat secara signifikan pada kelompok LPS + Metabolit GMSCs dibandingkan dengan kelompok LPS ($p < 0,01$).

Kesimpulan: Metabolit GMSCs dapat meningkatkan Ekspresi RUNX2 dan Osterix pada resorpsi tulang calvaria yang diinduksi LPS pada tikus wistar (*R. norvegicus*).

Kata kunci: Metabolit, GMSCs, Osteolisis, RUNX2, Osterix

ABSTRACT

GINGIVAL MEDICINAL SIGNALING CELLS CONDITIONED MEDIUM EFFECT ON RUNX2 AND OSTERIX EXPRESSION IN LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED CALVARIA BONE RESORPTION IN WISTAR RATS' (*RATTUS NOVERGICUS*)

Nastiti Faradilla Ramadhani

Background: Bone disease caused by inflammation can reduce quality of life. GMSCs metabolites are biomaterials containing cytokines, anti-microbial peptides, growth factors that can be obtained from GMSCs culture. Metabolites of GMSCs can inhibit bone resorption and accelerate bone regeneration to improve patients' quality of life. RUNX2 and Osterix are important transcriptional genes in osteoblastogenesis

Purpose: Analyzing the ability of gingival mesenchymal stem cell metabolites to increase RUNX2 and OSX in lipopolysaccharide-induced R. novergicus osteolysis model *in vivo*

Methods: 10 healthy male wistar rats (*R. novergicus*) aged 1-2 months with a body weight of 250-300 grams were divided into 3 groups, namely the LPS group: 100µg LPS days 1-7; LPS Group and GMSCs Metabolites: 100µg LPS + 100µg GMSCS Metabolites Days 1-7. LPS E. Coli was used to induce bone resorption in the calvaria by subcutaneous injection. GMSCs-CM were taken after culture passage 4-5 and filtered based on molecular size and then injected subcutaneously in the calvaria. All samples were examined on the 8th day. The total expression of RUNX2 and Osterix in osteoblasts was then observed under 100x, 400x and 1000x magnification. Independent-t-test was conducted to analyze the differences between groups ($p < 0.01$).

Results: Expression of RUNX2 and Osterix was significantly increased in the LPS + Metabolite GMSCs group compared to the LPS group ($p < 0.01$).

Conclusion: GMSCs metabolites can increase RUNX2 and Osterix expression on LPS-induced calvarial bone resorption in wistar rats (*R. novergicus*).

Keywords: Metabolite, GMSCs, Osteolysis, RUNX2, Osterix

DAFTAR ISI

Sampul Depan	i
Sampul Dalam	ii
Lembar Pengesahan	iii
Penetapan Panitia Penguji	iv
Lembar Pernyataan Orisinalitas	v
Ucapan terima kasih	vi
Abstrak	viii
Abstract.....	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan.....	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Penelitian Teoritis	6
1.4.2 Manfaat Praktis	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Sel Punca Mesenkimal (MSCs)	7
2.1.1 Karakteristik terapeutik sel punca mesenkimal.....	8
2.2 Sel Punca Mesenkimal Gingiva	9
2.2.1 Karakterisasi Sel Punca Mesenkimal Gingiva (GMSCs).....	10
2.2.1.1 <i>Self-renewal</i>	11
2.2.1.2 Potensi Diferensiasi Multilineage	11
2.2.2 Sifat Imunomodulator GMSCs	13
2.2.2.1 Efek GMSCs pada sistem imun bawaan	13
2.2.2.1.1 <i>Toll-Like Receptors</i> (TLR)	14
2.2.2.1.2 Sel Dendritik	15
2.2.2.1.3 Makrofag	16
2.2.2.1.4 Sel Mast	16
2.2.2.2 Efek GMSCs pada Sistem Imun yang didapat	17
2.2.2.2.1 Efek GMSCs pada T-Sel	17
2.3 Metabolit Sel Punca Mesenkimal	18
2.3.1 Analisis Proteomik Metabolit MSCs	19
2.3.2 <i>Immunomodulatory</i> Metabolit MSCs	21
2.4 Proses Regenerasi Tulang	22
2.4.1 <i>Runt-Related Transcription Factor-2</i> (RUNX2)	25
2.4.2 <i>Osterix</i> (OSX)	27
2.5 Lipopolisakarida	28
BAB 3 KERANGKA KONSEP	30
3.1 Kerangka Konsep	31
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	32
BAB 4 METODE PENELITIAN	34

4.1 Jenis Penelitian	34
4.2 Populasi	34
4.3 Sampel	34
4.3.1 Kriteria Sampel.....	34
4.3.2 Besar Sampel	34
4.4 Variabel Penelitian	36
4.5 Definisi Operasional Variabel	36
4.6 Lokasi Penelitian	36
4.7 Alat dan Bahan	37
4.7.1 Alat	37
4.7.2 Bahan	37
4.8 Cara Kerja	38
4.8.1 Prosedur isolasi, <i>thawing</i> , kultur, subkultur GMSCs	38
4.8.2 Uji karakterisasi <i>Gingival Mesenchymal Stem Cells</i>	39
4.8.2.1 Analisa imunositokimia dengan Imunofluorosense	39
4.8.3 Persiapan Metabolit GMSCs	39
4.8.4 Prosedur Persiapan Sampel Penelitian	40
4.8.5 Perlakuan pada hewan coba	40
4.8.6 Pengambilan Jaringan dan Pewarnaan	41
4.8.6.1 Pengambilan Jaringan	41
4.8.6.2 Proses Pemotongan Jaringan Berupa Makros	41
4.8.6.3 Proses Pengeblokan dan Pemotongan Jaringan	41
4.8.6.4 Proses Deparafinisasi	41
4.8.6.5 Proses Pewarnaan Imunohistokimia	42
4.9 Analisis Data	42
4.10 Alur penelitian	43
BAB 5 HASIL PENELITIAN	44
5.1 Deskripsi Hasil Penelitian	44
5.1.1 Karakterisasi Isolat GMSCs Gingiva tikus wistar (<i>Rattus Novergicus</i>)	44
5.1.2 Ekspresi RUNX2	46
5.1.3 Ekspresi Osterix.....	48
BAB 6 PEMBAHASAN	51
6.1 Karakterisasi Gingival Mesenchymal Stem Cell.....	51
6.2 Ekspresi RUNX2	52
6.3 Ekspresi Osterix.....	54
BAB 7 PENUTUP	56
7.1 Kesimpulan.....	56
7.2 Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.5.1 Peran RUNX2 pada osteoblast dan kondroblas	27
Gambar 5.1 Morfologi Gingival Mesenchymal Stem Cells menunjukkan bentukan morfologi seperti fibroblast berbentuk spindle dan melekat pada dasar plate (panah merah). Pemeriksaan dengan mikroskop Elektron (CX22 Binocular, Olympus) dengan pembesaran 400x	44
Gambar 5.2. Pemeriksaan imunositokimia immunofluoresence GMSCs mengekspresikan marker permukaan MSCs positif (+) (panah merah). A, B. CD73; C, D. CD90; E, F. CD105; berlabel FITC. Pemeriksaan dengan mikroskop Elektron (Immunofluoresence Microskop, Olympus) dengan pembesaran 100x.	45
Gambar 5.3. . Pemeriksaan ICC immunofluoresence GMSCs tidak mengekspresikan marker HSC; A. CD34 (panah merah) B. negatif CD34 (tidak berpendar) ; C. CD45 (panah merah) D. negatif CD45 (tidak berpendar) berlabel FITC. Pemeriksaan dengan mikroskop Elektron (Immunofluoresence Microskop, Olympus) dengan pembesaran 400x.	45
Gambar 5.4 Rerata ekspresi RUNX2 pada GMSCs tikus wistar (Rattus Novergicus) pada kelompok kontrol (LPS) dan kelompok perlakuan (LPS + Metabolit GMSCs)	46
Gambar 5.5 Gambaran ekspresi RUNX2 pada GMSCs tikus wistar (Rattus Novergicus). Kelompok kontrol pembesaran 100x (A); 400x; (B) 1000x; (C). Kelompok perlakuan positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 100x(D); 400x(E); 1000x (F).....	47
Gambar 5.6 Rerata ekspresi Osterix pada GMSCs tikus wistar (Rattus Novergicus) pada kelompok kontrol (LPS) dan kelompok perlakuan (LPS + Metabolit GMSCs)	48
Gambar 5.7 Gambaran ekspresi Osterix pada GMSCs tikus wistar (Rattus Novergicus). Kelompok kontrol pembesaran 100x (A); 400x; (B) 1000x; (C). Kelompok perlakuan positif ditandai dengan warna coklat pada GMSCs dengan pembesaran 100x(D); 400x(E); 1000x (F).	49

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Protein terapeutik yang diidentifikasi melalui metode yang berbeda dari metabolit MSCs	21
Tabel 5.1 Hasil Uji Statistik Ekspresi RUNX2 pada kelompok kontrol dan perlakuan	47
Tabel 5.2 Hasil Uji Statistik Ekspresi Osterix pada kelompok kontrol dan perlakuan	49

DAFTAR SINGKATAN

Daftar Singkatan	Keterangan
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BMSCs	<i>Bone Marrow Stem Cells</i>
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
CBFA1	<i>Core-Binding Factor Alpha-1</i>
DAMP	<i>Danger-Associated Molecular Pattern</i>
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
ECM	<i>Extracellular Matrix</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
GF	<i>Growth Factors</i>
GMSCs	<i>Gingival Mesenchymal Stem Cells</i>
HRQL	<i>Health-related quality of life</i>
IFN- γ	<i>Interferon-γ</i>
IGF	<i>Insuline Growth Factor</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
LPS	<i>Lipopolisakarida</i>
MC	<i>Mast Cells</i>
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>
MMP-9	<i>Matrix Metalloproteinase-9</i>
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
NFATc1	<i>Nuclear Factor Associate Tcell1</i>
NFKB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
OSX	<i>Osteorix</i>
PAMP	<i>Pathogen Associate Molecule Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>

PDGF- β	<i>Platelet Derived Growth Factor-β</i>
PDL	<i>Periodontal Ligament</i>
PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B Ligand</i>
RAMP	<i>Resolution-Associated Molecular Pattern</i>
RUNX2	<i>Runt-Related Transcription Factor-2</i>
SOST	<i>Sclerostin</i>
TGF β -1	<i>Tumor Growth Factor-β1</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-α</i>
TNFRSF11B	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily Member 11B</i>
TRAP	<i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>