

DAFTAR ISI

Sampul depan	i
Sampul dalam	ii
Prasyarat gelar	iii
Lembar pengesahan	iv
Ucapan Terima Kasih	vi
Ringkasan	xii
Summary	xv
Abstract	xviii
Daftar isi	xix
Daftar tabel	xxvi
Daftar gambar	xxvii
Daftar lampiran	xxx
Daftar singkatan	xxxii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	7
1.3. Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4. Manfaat Penelitian	8
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. Struktur Anatomi dan Histologi Tulang Mandibula	9

2.2. Defek Pasca Reseksi Mandibula	11
2.3. Rekonstruksi Mandibula dengan Autogenous Bone Graft.....	11
2.3.1. Penyembuhan tulang pasca autogenous bone graft	12
2.3.2. Problema pada prosedur autogenous bone graft	14
2.4. Rekayasa Jaringan (Tissue Engineering)	15
2.4.1. Rekayasa jaringan tulang	17
2.4.2. Scaffold	18
2.4.2.1. Biokeramik sintetik	20
2.4.2.2. Biokeramik alami	21
2.4.3. Stem cell	22
2.4.3.1. Stem cell niche.....	24
2.4.3.2. Mesenchymal stem cell (MSC)	26
2.4.3.3. Isolasi MSC	28
2.4.3.4. Kultur ekspansi MSC	29
2.4.4. Sinyal induktif	30
2.4.5. Bioreactor	32
2.4.6. Regenerasi tulang dengan rekayasa jaringan berbasis MSC (MSC-based)	33
2.4.7. Mekanisme penyembuhan critical size defect dengan MSC-based therapy.	36
2.4.7.1 Proses angiogenesis	38
2.4.7.2 Proses diferensiasi osteogenik/osteoblastik	39
2.5. Foetal Membrane Plasenta Manusia sebagai Sumber Stem Cell.....	42
2.5.1. Struktur anatomi dan histologi foetal membrane plasenta manusia	43
2.5.2. Embriologi human foetal membrane	44
2.5.3. Stem cell pada human amniotic membrane	45
2.5.4. Human amniotic mesenchymal stem cells (hAMSC)	48

2.5.5.	Protokol isolasi hAMSC	49
2.5.6.	Aplikasi hAMSC pada rekayasa jaringan dan terapi sel	51
BAB 3	KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	53
3.1.	Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian	54
3.2.	Hipotesis Penelitian	57
BAB 4	METODE PENELITIAN	58
4.1.	Rancangan Penelitian	58
4.2.	Unit Eksperimen	59
4.3.	Replikasi dan Randomisasi	59
4.4.	Variabel Penelitian	60
4.4.1	Variabel bebas	60
4.4.2	Variabel tergantung	60
4.4.3	Variabel kendali	61
4.4.4	Definisi operasional variabel	61
4.5.	Materi dan Bahan Penelitian	63
4.5.1	Materi penelitian	63
4.5.2	Bahan penelitian	63
4.6.	Jadwal dan tempat penelitian	64
4.6.1	Jadwal Penelitian	64
4.6.2	Tempat penelitian	64
4.7.	Langkah Penelitian	65
4.7.1	Uji Laik Etik Penelitian	65
4.7.2	Prosedur pengambilan human amniotic membrane (hAM)	65

4.7.3	Prosedur isolasi dan kultur ekspansi hAMSC	66
4.7.4	Protap passase/trypsinasi	68
4.7.5	Karakterisasi hAMSC	68
4.7.5.1	Pemeriksaan Imunositokimia	68
4.7.5.2	Pemeriksaan flowcytometry	69
4.7.6	Uji potensi diferensiasi osteogenik in vitro hAMSC	70
4.7.6.1	Kultur hAMSC pada medium osteogenik	71
4.7.6.2	Pemeriksaan diferensiasi osteogenik hAMSC in vitro (Alizarin Red)	71
4.7.7	Pembuatan scaffold bovine bone mineral (BBM)	72
4.7.8	Uji toksisitas scaffold BBM terhadap hAMSC (MTT assay)	73
4.7.9	Pembenihan (seeding) hAMSC pada scaffold BBM	74
4.7.10	Pengamatan seeding hAMSC pada scaffold BBM (pemeriksaan SEM)	74
4.7.11	Penanaman scaffold BBM-hAMSC dan graf pada hewan coba	75
4.7.11.1	Prosedur pembuatan critical size defect pada mandibula kelinci	75
4.7.11.2	Prosedur pengambilan graf tulang otogenus crista iliaca kelinci.....	76
4.7.11.3	Prosedur implantasi graf pada critical size defect mandibula kelinci	76
4.7.12	Pengorbanan hewan coba dan pengambilan spesimen penelitian	78
4.7.13	Prosedur dekalsifikasi spesimen penelitian	79
4.7.14	Pemrosesan dan pemeriksaan spesimen penelitian	79
4.7.15	Pewarnaan Hematoxyllin Eosin (HE)	80
4.7.16	Pewarnaan Imunohistokimia	81
4.7.16.1	Pewarnaan terhadap VEGF	81
4.7.16.2	Pewarnaan terhadap BMP-2	82
4.7.16.3	Pewarnaan terhadap Runx-2	83
4.7.16.4	Pewarnaan terhadap Osteocalcin	84

4.7.16.5	Pewarnaan terhadap Kolagen tipe-I	85
4.8	Analisis Data	85
4.9	Skema Prosedur Penelitian	86
BAB 5	ANALISIS HASIL PENELITIAN	87
5.1	Penyembuhan Critical Size Defect Mandibula pasca Rekonstruksi	87
5.2	Hasil Pengamatan Mikroskopik Proses Penyembuhan Tulang	88
5.3	Hasil Pemeriksaan Ekspresi VEGF	91
5.4	Hasil Pemeriksaan Angiogenesis	93
5.5	Hasil Pemeriksaan Ekspresi BMP2	95
5.6	Hasil Pemeriksaan Ekspresi Runx2	98
5.7	Hasil Pemeriksaan Ketebalan Serabut Kolagen I	100
5.8	Hasil Pemeriksaan Ekspresi Osteocalcin	101
5.9	Hasil Pemeriksaan Luas Trabekula Tulang	103
5.10	Hasil Pemeriksaan Inkorporasi Tulang Baru dan Tulang Resipien.....	105
5.11	Hasil Analisis Jalur	106
BAB 6	PEMBAHASAN	109
6.1	Pengambilan human fetal amniotic membrane	111
6.2	Isolasi dan kultur ekspansi hAMSC	111
6.3	Karakterisasi Fenotip hAMSC	112
6.4	Diferensiasi Osteogenik hAMSC in vitro	112
6.5	Model Critical Size Defect pada Mandibula Kelinci	113
6.6	Scaffold Bovine Bone Mineral (BBM)	113
6.7	Uji Toksisitas Scaffold BBM terhadap hAMSC	114

6.8	Pengambilan Graf Tulang Otogenus Crista Iliaca Kelinci	114
6.9	Implantasi Scaffold BBM dan Graf Tulang	114
6.10	Penyembuhan Tulang Pasca Implantasi	115
6.11	Mekanisme Penyembuhan Critical Size Defect pada Mandibula	116
6.11.1	Penyembuhan tahap awal critical size defect pada mandibula	116
6.11.2	Penyembuhan tahap lanjut critical size defect pada mandibula.....	121
6.12	Analisis Jalur	124
6.13	Temuan Baru Penelitian	125
6.14	Implikasi Hasil Penelitian	126
BAB 7	PENUTUP	127
7.1	Kesimpulan	127
7.2	Saran	128
	DAFTAR PUSTAKA	130
	LAMPIRAN	142

DAFTAR TABEL

4.1	Deskripsi data optical density pada kultur BBM-hAMSC dan hAMSC.....	73
5.1	Deskripsi data ekspresi VEGF	92
5.2	Deskripsi data Angiogenesis	94
5.3	Deskripsi data ekspresi BMP2	96
5.4	Deskripsi data ekspresi Runx2	99
5.5	Deskripsi data Ketebalan Serabut Kolagen-I	101
5.6	Deskripsi data ekspresi Osteocalcin	102
5.7	Deskripsi data Luas Trabekula (matriks) Tulang	104
5.8	Deskripsi data inkorporasi tulang baru dan tulang host	105

DAFTAR GAMBAR

2.1	Gambar skematis tulang mandibula	9
2.2	Struktur histologi tulang mandibula (Hazell, 2008)	10
2.3	Critical size defect pada mandibula (Ellis, 2008)	12
2.4	Konsep Rekayasa Jaringan (Barrileaux et al., 2006)	16
2.5	Struktur mikroskopik human dan bovine cancellous bone (Fassina et al., 2010)	22
2.6	Pembelahan asimetrik stem cell (Wilson et al., 2007)	23
2.7	Hematopoietic stem cell niche di dalam sumsum tulang (Tong Yin & Li, 2006)	25
2.8	Mesenchymal stem cell lineage (Nikovits & Stockdale, 2007)	26
2.9	Surface markers yang diekspresikan oleh MSC (Pountos et al., 2007)	27
2.10	Bioreactors pada rekayasa jaringan tulang (Martin et al., 2004)	32
2.11	Skema Diferensiasi Osteoblastik (Lian et al., 2003)	40
2.12	Struktur histologi foetal membrane pada kelahiran term (Ilancheran et al., 2009)	44
2.13	Proses pembentukan amnion (Carlson, 2004)	46
2.14	Perkembangan chorion dan amniochorionic membrane. (Moore & Persaud, 2003)	47
2.15	Morfologi kultur sel foetal membranes (Portman-Lanz et al., 2006)	48
3.1	Kerangka konsep penelitian	53
4.1	Skema rancangan penelitian	58
4.2	Prosedur pengambilan membran amnion plasenta manusia	66
4.3	Pengamatan mikroskopik sel tunggal dan mesenchymal stem cell	67
4.4	Karakterisasi MSC dengan imunositokimia	69
4.5	Karakterisasi MSC dengan flowcytometry	70
4.6	Gambaran mikroskopik diferensiasi osteogenik kultur hAMSC	72
4.7	Scaffold blok Bovine Bone Mineral (BBM)	72

4.8	Pembenihan (seeding) hAMSC pada scaffold BBM	75
4.9	Gambar skematis cranium kelinci (Crossley, 2001)	76
4.10	Prosedur Autogenous Bone Grafting	77
4.11	implantasi scaffold BBM pada critical size defect mandibula kelinci	78
4.12	Skema tahap penelitian	86
5.1	Gambaran makroskopik defek mandibula pasca implantasi scaffold dan graf.....	87
5.2	Gambaran mikroskopik penyembuhan defek tulang pada akhir minggu ke-1	89
5.3	Gambaran mikroskopik penyembuhan defek tulang pada akhir minggu ke-2	90
5.4	Gambaran mikroskopik penyembuhan defek tulang pada akhir minggu ke-12	91
5.5	Rerata jumlah sel yang mengekspresikan VEGF	91
5.6	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi VEGF	93
5.7	Rerata Angiogenesis	94
5.8	Hasil pemeriksaan Angiogenesis	95
5.9	Rerata jumlah sel yang mengekspresikan BMP2	96
5.10	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi BMP2	97
5.11	Rerata jumlah sel yang mengekspresikan Runx2	98
5.12	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Runx2	99
5.13	Rerata ketebalan serabut Kolagen tipe-I	100
5.14	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ketebalan serabut Kolagen tipe-I	101
5.15	Rerata jumlah sel yang mengekspresikan Osteocalcin	102
5.16	Hasil pemeriksaan imunohistokimia ekspresi Osteocalcin	103
5.17	Rerata luas trabekula (matriks) tulang	103
5.18	Hasil pemeriksaan trabekula tulang	104
5.19	Median skor inkorporasi tulang baru dan tulang resipien	105
5.20	Hasil inkorporasi antara tulang baru dan tulang resipien	106

5.21	Model hasil analisis jalur penyembuhan tulang tahap awal (BBM-hAMSC)	106
5.22	Model hasil analisis jalur penyembuhan tulang tahap lanjut (BBM-hAMSC)	107
5.23	Model hasil analisis jalur penyembuhan tulang tahap awal (autogenous bone graft).....	107
5.24	Model hasil analisis jalur penyembuhan tulang tahap lanjut (autogenous bone graft).....	108
6.1	Skema proses osteogenesis oleh BBM-hAMSC dan autogenous bone graft.	123



DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Lembar Laik Etik Kesehatan (RSUD Dr. Soetomo)	142
Lampiran 2. Lembar Laik Etik Penelitian (Fakultas Kedokteran Hewan)	143
Lampiran 3. Publikasi pada jurnal internastional	144
Lampiran 4. Analisis statistik hasil penelitian	145



DAFTAR SINGKATAN

ABG	: autogenous bone graft
ALP	: alkaline phosphatase
BBM	: bovine bone mineral
BCP	: Biphasic calcium phosphate
BDGF	: Brain-derived growth factors
BHA	: bovine hydroxyapatite
BM-MSC	: bone marrow-derived mesenchymal stem cells
BMP	: bone morphogenic proteins
Cbfa-1	: core binding factor subunit alpha-1
CD	: cluster differentiation
DMEM	: <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EGF	: Epidermal growth factors
ES	: embrionic stem cells
FACS	: fluorescence-activated cell sorting
FBS	: fetal bovine serum
FCS	: fetal calf serum
FGF	: fibroblast growth factors
GATA	: transcription factors capable of binding to DNA sequence "GATA".
HA	: hydroxyl apatite
hAMSC	: human amniotic mesenchymal stromal (stem) cells
hAEC	: human amniotic epithelial cells
hASC	: human amniotic stromal cells
hCSC	: human chorionic stromal cells

XXX

HSC	: hematopoietic stem cells
IGF	: insulin-like growth factor
IL	: interleukin
MAPK	: mitogen-activated protein kinase
MSC	: mesenchymal stem cell
Oct	: octamer-binding transcription factor
OSX	: osterix gene
PDGF	: platelet derived growth factors
POU	: Pituitary-specific Pit-1 , Octamer , neural Unc-86 transcription factor
POU5F1	: POU domain, class 5, transcription factor 1
PRP	: platelet-rich plasma
RANKL	: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
rhBMP	: human recombinant bone morphogenic proteins
Runx2	: Runt-related transcription factor 2
SEM	: scanning electron microscope
SOX	: SRY (sex determining region Y)-box transcription factor family
SSEA	: stage specific embryonic antigen
STAT	: signal transducer and activator of transcription
TCP	: tricalcium phosphate
TGF- β	: transforming growth factors beta
VEGF	: vascular endothelial growth factor
vWF	: <i>von Willebrand's</i> factors