



UNIVERSITAS INDONESIA

**POTENSI SEL PUNCA MESENKIM ASAL JARINGAN LEMAK
DENGAN PRODUK PLASMA UNTUK REGENERASI SEL
ODONTOBLAS JARINGAN PULPA *IN VITRO***

DISERTASI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor

ANGGRAINI MARGONO

0906598291

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN GIGI
JAKARTA
Juli 2012**

PERNYATAAN ORISINALITAS

Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri,
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Anggraini Margono

NPM : 0906598291

Tanda Tangan



Tanggal : 19 Juli 2012

HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh:

Nama : Anggraini Margono
NPM : 0906598291
Program Studi : Ilmu Kedokteran Gigi
Judul Disertasi : Potensi Sel Punca Mesenkhim Asal Jaringan Lemak Dengan Produk Plasma Untuk Regenerasi Sel Odontoblas Jaringan Pulpa *In Vitro*

Telah Berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran gigi, Universitas Indonesia.

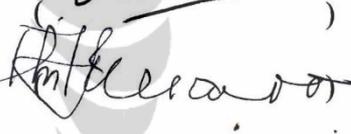
DEWAN PENGUJI

Promotor

Prof.(E) Dr.Siti Mardewi Soerono Akbar, drg., Sp.K.G.(K). ()

Ko-Promotor

Prof. Boy M. Bachtiar, drg., M.S., Ph.D. ()

Dr. Indah Yulianto, dr., Sp.K.K.(K) ()

Tim Penguji

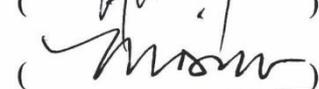
Dr. Ratna Meidyawati, drg., Sp.K.G.(K) (Ketua) ()

Prof. Trimurni Abidin, drg., M.Kes., Sp.K.G.(K)(Anggota) ()

Adang Bachtiar, dr., M.P.H., D.Sc. (Anggota) ()

Dr. Diah Iskandriati, drh. (Anggota) ()

Yuda Heru Fibriantho, drh., M.P., Ph.D. (Anggota) ()

Dr. Joko Pamungkas, drh., M.Sc. (Anggota) ()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 19 Juli 2012

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala Puji dan Syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa, atas Kasih dan KaruniaNya yang tak terhingga, pada akhirnya saya dapat menyelesaikan tugas disertasi ini, sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Saya menyadari sepenuhnya bahwa tanpa bantuan, dukungan dan bimbingan dari berbagai pihak, sejak awal mengikuti pendidikan Program Doktor Ilmu Kedokteran Gigi sampai pada tahap akhir, tidaklah mungkin bagi saya untuk menyelesaikan tugas disertasi ini. Oleh karena itu, perkenankanlah saya dengan penuh kerendahan hati, menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian disertasi ini.

Secara khusus, disertasi ini saya persembahkan bagi kedua Orang Tua tercinta, Djoko Untung Margono (Alm) dan RR.Siti Soenanti Margono (Alm), dan Oma Maria Hardjana (alm), yang telah menjadi sumber inspirasi terbesar dalam sepanjang perjalanan hidup saya selama ini. Kiranya pencapaian ini dapat memenuhi doa dan harapan mereka, agar saya dapat meraih pendidikan tertinggi sebagai bekal kehidupan yang lebih baik, dan menjadi berkat bagi orang banyak.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Rektor Universitas Indonesia, Prof. Dr. der. Soz. Gumilar Rusliwa Soemantri beserta para Wakil Rektor yang telah memberikan kesempatan pada saya untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan doktoral ini. Demikian pula kepada Prof. Bambang Irawan, drg., Ph.D dan jajarannya selaku Dekan dan Pimpinan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, yang telah memberikan izin kepada saya untuk mengikuti program ini.

Rasa terima kasih yang tak terhingga saya persembahkan kepada Promotor saya, Prof. Dr. Siti Mardewi Soerono Akbar., Sp.K.G.(K), atas dukungan, bimbingan dan kasih sayang yang tulus kepada saya selama menempuh pendidikan ini sampai selesai. Merupakan suatu kehormatan bagi saya untuk dapat meneruskan ide disertasi beliau tahun 1987, dan dibimbing oleh seorang yang selama ini selalu menjadi panutan dalam sepanjang perjalanan karier saya di bagian Konservasi Gigi. Kiranya Tuhan YME selalu memberikan kesehatan dan

kebahagiaan kepada Prof. Wiwiek, agar dapat terus membimbing kami semua untuk tetap maju dan berkiprah di bidang Ilmu Konservasi Gigi.

Kepada Ko Promotor saya, Prof. Boy M. Bachtiar, drg., M.S., Ph.D, yang selalu memberikan dorongan semangat untuk meneliti dan mengembangkan cara berfikir ilmiah yang kritis, maju dan sistematis, saya menyampaikan rasa terima kasih yang sedalam-dalamnya. Merupakan suatu kebanggaan bagi saya untuk dapat dibimbing dan diarahkan oleh seorang yang karenanya saya berkeinginan melanjutkan studi program Doktoral ini. Hanya Tuhan YME yang dapat membalas semua kebaikan dan ketulusan Prof. Boy selama saya menempuh pendidikan ini.

Secara khusus saya ingin menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Dr. Indah Yulianto, dr. Sp.K.K (K), atas dukungan tulus dan luar biasa yang selalu diberikan kepada saya sehingga pada akhirnya saya dapat menemukan ide, konsep serta pelaksanaan penelitian hingga penyelesaian penulisan disertasi ini. Tak terbayangkan, bagaimana saya dapat melalui semua ini tanpa bimbingan, pengarahan serta keterlibatan penuh dari seorang yang menjadi sumber inspirasi, dan motivasi dalam bekerja sebagai praktisi klinik dan mengembangkan penelitian. Hanya Tuhan YME yang dapat membalas semua budi baik seta ketulusan hati Dr Indah agar senantiasa diberikan kesehatan dan kemurahan hati untuk terus berkarya dan memberikan bimbingan pada kami semua yang membutuhkan.

Kepada Dr. Ratna Meidyawati, drg., Sp.K.G.(K), Prof. Trimurni Abidin, drg., Sp.K.G (K), dr. Adang Bachtiar, M.P.H., D.Sc, Dr. drh. Diah Iskandriati, drh. Yuda Heru Fibriantho, M.P., Ph.D, Dr.drh. Joko Pamungkas, M.Sc. selaku tim penguji yang sungguh luar biasa, yang telah berkenan meluangkan waktunya untuk menguji, memberikan segala masukan, kritik serta saran yang konstruktif sejak awal penulisan sampai selesainya disertasi ini, saya menyampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Kepada Dr. Ellyza Herda, drg., MSi. selaku Manajer Pendidikan dan Dr. Ratna Meidyawati, drg., Sp.K.G (K) selaku Staf Profesional Program Pascasarjana FKGUI, saya memberikan ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya atas perhatian dan bantuan yang telah diberikan selama masa

pendidikan sampai dengan selesainya penulisan disertasi ini. Kepada mbak Neneng, mbak Erni dan Doni dari bagian pendidikan, yang selama masa pendidikan sampai pelaksanaan ujian program Doktor, telah dengan setia membantu dan mendampingi saya menyelesaikan semua tugas-tugas disertasi, saya ucapkan banyak terima kasih dan doa agar kalian sukses dalam kehidupan masing-masing.

Rasa terima kasih saya sampaikan kepada Bambang Nursasongko, drg., Sp.K.G (K) dan Munyati Usman, drg., Sp.K.G.(K) selaku Ketua dan Sekretaris Departemen Ilmu Konservasi Gigi FKG UI yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti program pendidikan Doktoral. Dan kepada yang terhormat guru-guru dan rekan kerja di Departemen Konservasi Gigi FKG UI, Prof. E.H. Soendoro, drg., Sp.K.G (K), Winiati Sidharta, drg., Sp.K.G.(K), Gunawan Atmadja, drg., MDS, FICD, Sp.K.G.(K), Sp.K.G.(K), Prof.Dr.Safrida Hoesin, drg., Sp.K.G (K), Prof.Dr.Narlan Soemawinata, drg., Sp.K.G.(K), Aida Hermansyur, drg. Sp.K.G.(K), Dr.Endang Suprastiwi Latief, drg., Sp.K.G (K), Gatot Sutrisno, drg., Sp.K.G.(K), Wiwi Werdiningsih, drg., Sp.K.G.(K), Ansar Basar, drg., Sp.K.G.(K) (alm), Daru I. Suwelo, drg., Sp.K.G.(K), Nila Kesuma Djauharie, M.P.H., drg., Sp.K.G.(K), Kamizar, drg., Sp.K.G.(K), Dr. Anggraeni Afdal, drg., Sp.K.G., Dewa Ayu, drg., Sp.K.G., Dini Asrianti, drg., Sp.K.G, serta para karyawan/i Departemen Konservasi Gigi FKG UI, Yuli, Devi, Yani, terimalah ucapan terima kasih yang tak terhingga atas dukungan, doa dan kebersamaan luar biasa yang selalu diberikan kepada sehingga saya mampu menyelesaikan perjalanan disertasi ini.

Kepada semua dosen program Doktoral yang telah memberikan bekal ilmu dan filosofi pengetahuan selama berlangsungnya proses pendidikan, Prof. Dr. Benny S Latief, drg., Sp.B.M.(K), Endang Winiati Bachtiar, drg., M.Biomed, Ph.D, Prof. Boy M. Bachtiar, drg., M.S., Ph.D, Dr. Harun A. Gunawan, drg., M.S., P.A.K, Dr. Ria Puspitawati, drg., Dewi Fatma, drg., M.S., Ph.D, Prof.Dr. M. Lindawati Kusdhany, drg., Sp.Prosth., Dr. Sri Lelyati, drg., Sp.Perio., Anton Rahardjo, drg., M.K.M., Ph.D, Prof. Iwan Tofani, drg., Sp.B.M., Ph.D., Lisa Rinanda Amir, drg., Ph.D., Dr. Ellyza Herda, drg., M.Si., Prof. Dr. Sudijanto Kamso, dr., S.K.M., dan mbak Eviati Adawiyah, S.K.M., M.Si., dari Biostatistik

FKMUI, Yohanes Vincensius Yolasa, dr., Ph.D., Ketua Departemen Filsafat FIB-UI, tiada kata-kata yang dapat mengungkapkan rasa terima kasih dan syukur saya, yang telah mendapatkan kesempatan dan kemudahan dalam memperoleh bekal yang sangat berharga dalam perjalanan penelitian ini.

Secara khusus perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada drh. Yuda Heru Fibriantho, M.P., Ph.D atas waktu dan kesempatan berbagi ilmu pengetahuan dan segala sesuatunya yang berkaitan khususnya dengan jaringan lemak. Kepada “adikku” yang jenius dan luar biasa, Yuyun Rindiastuti, dr., yang saat ini tengah melanjutkan program S3 di SNU Korea, yang telah membantu penelitian ini menjadi nyata dan terlaksana dengan baik, tiada kata yang pantas diucapkan selain terima kasih yang tak terhingga dan doa saya selalu menyertai kesuksesanmu di masa yang akan datang.

Kepada dr. Adang Bachtiar, M.P.H., D.Sc., yang sejak awal membimbing dan memberikan dorongan yang luar biasa bagi kami semua peserta program S3 2009 dari pembuatan proposal sampai selesai penulisan disertasi, saya ucapkan banyak terima kasih dan kiranya Tuhan YME senantiasa memberkati Pak Adang.

Kepada Dr.drh. Tri Untari, M.Si., Ketua Bagian Mikrobiologi FKH UGM, Prof. Dr. Ambar Mudigdo, dr., Sp.P.A(K), Ketua Laboratorium Biomedik FK UNS, dan Ariadna Adisattyia Djais, M.Biomed., Ph.D., Ketua Departemen Oral Biologi FKGUI, serta Dr.drh. Diah Iskandriati, Kepala Laboratorium dan Imunologi PSPP IPB Bogor yang telah mengizinkan saya menggunakan fasilitas laboratorium untuk melaksanakan penelitian ini, saya ucapkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya. Juga kepada mbak Mona dan mbak Elly analis molekuler dari FKH dan RSUD Sardjito UGM, Adisty, dr., mbak Yenny, dan suster Yanthi dari RSUD Moewardi Surakarta dan klinik Spesialis Kulit, Dr. Indah Yulianto (Solo), mbak Maysaroh dan mbak Dessy dari Laboratorium Oral Biologi FKGUI, mbak Silmi Mariyah, analis molekuler dari PSSP IPB Bogor, yang selalu siap membantu jalannya penelitian saya, tak ada yang lebih berarti selain rasa syukur dan beruntung dikelilingi oleh orang-orang yang sangat luar biasa, terima kasih yang sebesar-besarnya, kiranya Tuhan YME akan membalas semua kebaikan dan ketulusan hati kalian.

Kepada seluruh teman seperjuangan peserta Program Doktor angkatan 2009, Ananta Ruri, drg.,Sp.P.M., CSP Dwi Atma Gunawan, drg., Sp.K.G., Eva Fauziah, drg., Sp.K.G.A., Febriana Setiawati, drg., M.Kes., Irene Margaretha, drg., Sp.Orth., Lilies D. Sulistyani, drg., Sp.B.M., Rr Tut Wuri Andajani, drg., M.S., Sari Dewayani, drg., Sp.K.G., Tien Suwartini, drg., Sp.K.G., Trijani Suwandi, drg., Sp.Perio., Yulitri Hapsari, drg., Sp.Perio., MohD. Chair Effendi, drg.,S.U., Sp.K.G.A., selamat berjuang sampai di tujuan, kita akan selalu bersama dalam doa dan harapan, saling mendukung dan menjaga kekompakan karena persahabatan ini adalah jembatan kehidupan kita semua di masa yang akan datang. Keberhasilan bukanlah bergantung pada bagaimana kita memulai, melainkan bagaimana kita mengakhirinya.

Yang tercinta sahabat dekatku, Febriana Setiawati, drg., M.Kes., Lilies Dwi Sulistyani, drg., Sp.B.M., Maria Purbiati, drg., Sp.Orth., tak dapat saya bayangkan perjalanan selama ini tanpa keberadaan kalian bertiga, sejak lulus dokter gigi tahun 1987 sampai saat ini menempuh program Doktor bersama. Terima kasih untuk canda tawa, air mata dan kasih sayang yang selalu ada untuk saya, melalui masa-masa yang teramat sulit untuk dilalui tanpa adanya dukungan kalian bertiga. Semoga persahabatan ini selalu menjadi mutiara yang indah dalam sepanjang hidup kita.

Secara khusus untuk Guru dan Mentor yang luar biasa dalam sepanjang perjalanan karier saya sebagai dokter gigi Spesialis Konservasi, Gunawan Atmadja, drg., M.D.Sc., Sp.K.G., FICD., saya menyampaikan rasa hormat dan terima kasih atas perhatian dan bimbingannya yang memberikan “jalan” pada saya untuk menjadi seperti sekarang ini. Merupakan suatu kehormatan dan kebanggaan menjadi rekan sekerja beliau selama 23 tahun ini, di klinik All Care Dental Centre, kiranya Tuhan YME senantiasa memberikan kesehatan dan kebahagiaan bagi dokter Gunawan bersama anak, menantu dan cucu-cucu semua. Demikian pula untuk Guru dan Mentor Winiati Sidharta, drg., Sp.K.G (K) yang telah memberikan kesempatan pertama untuk bekerja sebagai dokter gigi selepas lulus tahun 1987, perkenankanlah saya menyampaikan rasa terimakasih yang tak putus-putusnya atas kepercayaan, perhatian dan bimbingannya selama ini kepada saya,

semoga Tuhan YME senantiasa melimpahkan kebahagiaan dan kesehatan kepada dokter Win dan Prof. Sidharta.

Ucapan terima kasih saya kepada yang terhormat, Prof. Menaldi Rasmin, dr., Sp.P., mantan Dekan FKUI, yang selalu menjadi sahabat diskusi yang inspiratif, serta dukungan moril dan doa pada saya. Dan kepada Dr. Djumhana Atmakusuma, dr., Sp.P.D., K.H.O.M, dan Prof. Abdul Muthalib, dr., dan Herbertus Oktafandhi, dr.,Sp.Obs.Gyn., atas perhatian dan bantuannya atas pemulihan kesehatan saya selama ini, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya, semoga Tuhan YME membalas semua budi baik dan ketulusan dokter.

Kepada semua teman-teman sejawat praktek saya di klinik All Care Dental Centre, yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu, terima kasih atas kebersamaan, dukungan moril dan doa bagi saya selama ini, semoga kita semua selalu kompak dan saling mendukung dalam segala hal. Ucapan terima kasih saya tujukan untuk Direktur RS.Premier Jatinegara, Benny Handoyo, dr., Direktur RS Premier Bintaro, Juniwati Gunawan, dr., dan Bpk. Jusup Halimi, Presiden Direktur PT Affinity Health Indonesia, atas kerjasama dan dukungannya selama saya berpraktek di RS tersebut.

Kepada Rio Suryantoro, drg., Maria Davina, drg., Sp.K.G. dan James Prio Utomo, S.Si., yang telah membantu menterjemahkan ringkasan disertasi ini, saya ucapkan banyak terima kasih, semoga kalian semua sukses selalu dalam perjalanan karier ke depan. Rasa terima kasihku kepada Dewa Ayu, drg., Sp.K.G dan Tien Suwartini, drg.,Sp.K.G, yang telah berkenan menjadi paranim pada sidang promosi saya ini, semoga kalian berdua sukses dalam menyelesaikan tugas disertasi masing-masing.

Secara khusus saya ingin mengungkapkan rasa terima kasih kepada sahabat seperjuangan dalam melakukan penelitian untuk program Doktor ini, Titi Moertolo, dr. Sp.K.K., atas perhatian, bantuan dan dukungan luar biasa yang selalu diberikan untuk saya selama ini. Kiranya dokter Titi diberi kemudahan dan kelancaran dalam menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasinya.

Secara khusus, disertasi ini saya persembahkan untuk Suamiku yang tercinta, Tammy Ch. Rompas, S.E., C.H.R.P, dan “Matahariku”, Edgar Dirk

Alexander Rompas, dua orang yang teramat penting dalam hidupku selama ini, atas Cinta dan Kasih sayang tak terbatas yang selama ini dicurahkan kepada Mama. Tiada yang lebih penting dan berharga dalam hidup ini, selain keberadaan kalian berdua di sampingku selalu. Terima kasih untuk kebersamaan dan keceriaan serta dorongan semangat yang luar biasa bagi Mama untuk bangkit dari situasi yang teramat sulit untuk dapat menyelesaikan tugas disertasi ini. *Thank God, I have both of you in my life.*

Rasa terima kasihku untuk Tante Getty tercinta, yang selalu ada untuk saya selama ini, tempat berkeluh kesah dan “mengadu” semua kesumpekan hidup, tetaplah sehat dan bahagia serta panjang usia. Untuk semua sepupuku tercinta, Bpk. Herman Gunawan dan Ibu. Grace Etty Hidayat, John Boardman dan Peggy Gunawan, Adi Gunawan, S.E., dan Sri Dewi Yanthi, S.E., Bpk. Li Tjeng Oen dan Ibu Liliana, S.H., Joyce Suwarsa, Jonkie Irawan Suwarsa, M.Sc., dan Luciana Suwarsa, M.D., terima kasih atas dukungan doa dan kebersamaan kita sebagai satu keluarga besar yang saling mengasihi.

Secara khusus, ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada kakakku tercinta Pramono Margono, S.T., M.M., C.R.M.P., W.M.I., dan Lussy Kanserina Yulisia, S.E., M.M., atas dukungan moril dan materil serta perhatian yang luar biasa, sehingga saya dapat bangkit kembali, melewati masa-masa yang teramat sulit sampai akhirnya saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Hanya kepada Tuhan saya memohon, agar kalian berdua senantiasa mendapat kelimpahan berkat dalam kehidupan ini. Juga kepada adikku tercinta Linda Trimurti Margono, S.T., dan Alexander Wiwiet, terima kasih atas doa dan kasih sayang yang senantiasa diberikan kepada saya selama perjalanan menempuh pendidikan ini sampai selesai. Peluk dan cium untuk semua keponakan Bude tersayang Alvinsyah, Armansyah, Anjanette dan Althea untuk dukungan dan perhatian kalian yang luar biasa selama ini.

Rasa terima kasihku yang tak terhingga kepada Mertuaku tercinta, Christian Rudolf Rompas (alm) dan Estefine Rompas Bawondes, atas dukungan doa dan kasih sayang yang tiada putus-putusnya selama menempuh program pendidikan Doktor. Dan kepada semua adikku tercinta, Erfiani Rompas dan Michael Soriton, S.Kom., Veronique Rompas dan Bayu Redikari, S.E., Frederick

Rompas, S.E. dan Lydia Rompas, S.E, atas kebersamaan dan keceriaan serta dukungan semangat kepada mbak selama ini, sehingga akhirnya mbak dapat menyelesaikan disertasi ini. Peluk dan cium untuk semua keponakan Mama Dewi yang tersayang, Yehezkiel, Denise, Vea, Bagas, Casey dan Gwynn untuk kebersamaan dan keceriaan yang selalu ada untuk Mama Dewi selama ini.

Untuk sepupuku yang tercinta, mbak Rieka Rivinia dan semua keponakanku tersayang Abang Berry, Bunga dan Annisa, tak terlukiskan betapa kalian semua berharga di mata Tante selama ini, terima kasih atas doa dan semangat yang selalu diberikan kepada Tante selama ini. Teruslah maju dan sukses dalam hidup kalian semua. Kepada Bpk. Soeroto Prajitno, S.T., M.B.A., dan Ibu Berrar Fathia, saya mengucapkan terima kasih atas dukungan doa dan kebersamaan sebagai satu keluarga besar Eyang Prajitno (alm).

Terakhir terima kasih saya kepada yang terhormat, Bpk. Indramaulana, S.T., M.Sc. beserta keluarga, atas dukungan moril dan materil serta perhatiannya terhadap kami sekeluarga, juga pada FKGUI, kiranya kerjasama yang baik ini akan dapat tetap berjalan untuk ke depannya, Tuhan memberkati Bapak sekeluarga.

Akhirnya dengan segala kerendahan hati dan penghargaan yang setinggi-tingginya, saya mengucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang tidak mungkin disebutkan satu persatu yang telah membantu sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini. Pada kesempatan ini pula saya memohon maaf yang sebesar-besarnya kepada semua pihak, seandainya dalam penyelesaian disertasi ini ada kata-kata dan perilaku saya yang kurang berkenan di hati. Semoga disertasi ini dapat turut memberikan sumbangsih bagi semua pihak terutama bagi pengembangan ilmu pengetahuan.

Jakarta, 19 Juli 2012

Anggraini Margono

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anggraini Margono
NPM : 0906598291
Program Studi : Ilmu Kedokteran Gigi
Departemen : Ilmu Konservasi Gigi
Fakultas : Kedokteran Gigi
Jenis karya : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul : Potensi Sel Punca Mesenkhim Asal Jaringan Lemak Dengan Produk Plasma Untuk Regenerasi Sel Odontoblas Jaringan Pulpa *In Vitro*. beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : Juli 2012

Yang menyatakan



(Anggraini Margono)

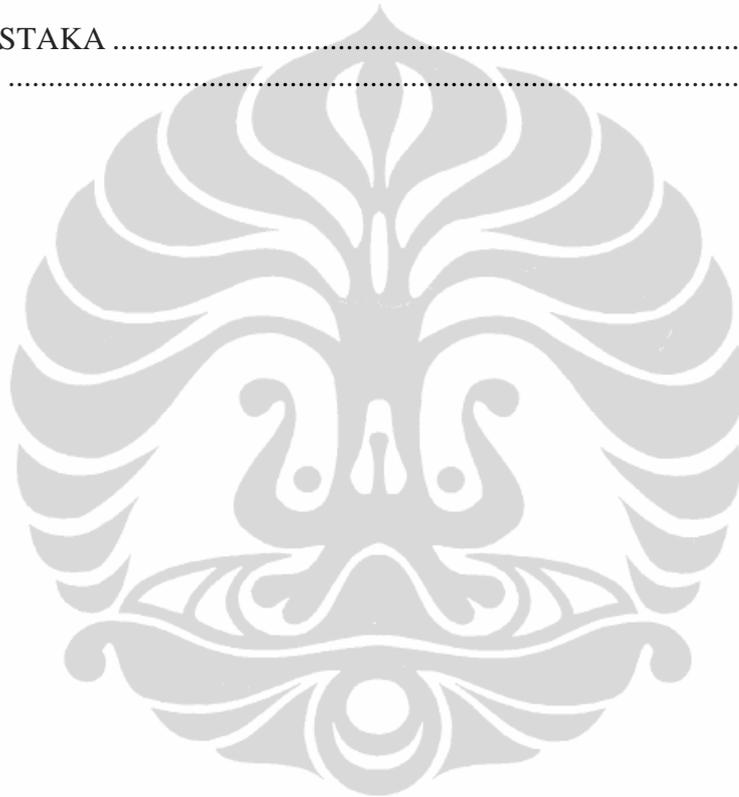
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
PERYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
UCAPAN TERIMAKASIH.....	iv
PERYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI.....	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
DAFTAR ISI.....	xv
DAFTAR TABEL.....	xix
DAFTAR GAMBAR	xx
DAFTAR SINGKATAN	xxii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	9
1.3 Pertanyaan Penelitian.....	10
1.3.1 Pertanyaan Umum.....	10
1.3.2 Pertanyaan Khusus.....	10
1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian	10
1.4.1 Tujuan Umum.....	10
1.4.2 Tujuan Khusus	11
1.4.3 Manfaat	11
1.4.3.1 Untuk Praktisi.....	11
1.4.3.2 Untuk pengembangan ilmu dan dunia pendidikan	11
1.4.3.3 Untuk Masyarakat	11
BAB 2 PENDAHULUAN	13
2.1. Biologi Pulpa	13
2.2. Pulpitis	20
2.3. Konsep Penyembuhan Jaringan Pulpa Yang Luka	24
2.3.1 Penyembuhan Perawatan Pulpa Vital	26
2.3.2 Proses Pembentukan Jembatan Dentin	28
2.4 Bahan-Bahan Yang Digunakan Untuk Memicu Jaringan Keras	33
2.4.1 Mineral Trioxide Aggregate (MTA)	34
2.4.2 Kitosan	35
2.5 Aplikasi Rekayasa Jaringan (Tissue Engineering) Berbasis Sel Punca Dari Pulpa Gigi	36
2.5.1 Pendekatan Aplikasi Rekayasa Jaringan Untuk Regenerasi Dentin	39
2.5.2 Sel Punca	40
2.5.2.1 Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSC)	42
2.5.2.2 Dental Pulp Stem Cells (DPSC).....	45

2.5.3	Growth Factors	47
2.5.3.1	Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	48
2.5.3.2	Transforming Growth Factor (TGF)	49
2.5.3.3	Insulin Like Growth Factor (IGF)	50
2.5.4	<i>Scaffold</i>	50
2.5.4.1	<i>Scaffold</i> plasma : kandungan <i>growth factor</i> dan perannya dalam penyembuhan luka jaringan	52
2.5.5	Karakterisasi Fenotip dari Diferensiasi Odontoblas	56
2.5.5.1	Karakterisasi Marker Intraselular ALP	57
2.5.5.2	Karakterisasi Marker Extracellular	57
2.5.5.3	Karakterisasi Marker Matriks Molekular	57
2.6	Kerangka Teori	58
BAB 3	KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	62
3.1.	Kerangka Konsep	62
3.2.	Identifikasi Variabel	62
3.3.	Hipotesis	62
3.3.1.	Hipotesis Umum	62
3.3.2	Hipotesis Khusus	63
BAB 4	METODE PENELITIAN	64
4.1	Jenis Dan Rancangan Penelitian	64
4.2	Sampel Penelitian	65
4.3	Tempat Dan Waktu Pelaksanaan Penelitian	65
4.4	Kriteria Sampel	65
4.5	Definisi Operasional	66
4.6	Skema Alur Penelitian	68
4.7	Prosedur Penelitian	70
4.7.1	Kultur Adipocyte Derived Mesenchymal Stem Cell	70
4.7.2	Kultur Dental Pulp Stem Cell	73
4.7.3	Pembuatan Isolasi Protein sel pulpa dengan menggunakan Trizol	76
4.7.4	Persiapan pembuatan Platelet Rich Plasma (PRP), Platelet Rich Fibrin (PRF) dan Fibrin Glue (FG)	77
4.7.4.1	Pembuatan Gel PRP untuk uji adhesi <i>in vitro</i>	78
4.7.4.2	Pembuatan PRF	78
4.7.4.3	Pembuatan Lem Fibrin	79
4.7.4.4	Mempersiapkan Autologous Thrombin (Aktivasi dengan Gluconas Calcicus)	79
4.7.4.5	Pelapisan biomaterial <i>scaffold</i> (plastic/tegaderm/PRF) dengan lem fibrin	80
4.7.4.6	Pelapisan biomaterial <i>scaffold</i> (plastik/tegaderm/PRF) dengan PRP gel	82
4.7.5	Prosedur Kerja	83
4.7.5.1	Prosedur Kerja Pengukuran BMP-2	83
4.7.5.2	Prosedur Kerja Pengukuran DMP-1	84

4.7.5.3	Protokol Imunositokimia: ANTI STRO-1, ANTI DMP-1	85
4.7.5.4	Pengukuran Kolagen Terdeposisi.....	85
4.7.5.5	Pengukuran Adhesi Sel	86
4.7.6	Analisa Data	86
4.7.6.1	Analisa statistik untuk komparabilitas kelompok sel lemak dan sel pulpa terhadap pembentukan odontoblas	86
4.7.6.2	Analisa statistik untuk melihat korelasi antar parameter kelompok perlakuan	86
BAB 5 HASIL PENELITIAN		87
5.1	Proses Persiapan Penelitian	87
5.2	Analisis Media Kondisi Jaringan Lemak (Admsc-Cm).....	90
5.3	Distribusi Rerata Stro-1	91
5.4	Efek Material Uji terhadap Ekspresi BMP-2 dan DMP-1	92
5.4.1	Distribusi Rerata BMP-2	92
5.4.2	Distribusi Rerata DMP-1	93
5.5	Efek material uji terhadap ekspresi Col-1 dan Adhesion Assay	94
5.5.1	Distribusi Rerata Col-1 tiap waktu pengamatan menurut perlakuan	97
5.5.2	Distribusi Rerata Adhesion Assay	97
5.5.3	Distribusi Rerata Col-1 setelah grafting kelompok perlakuan waktu 1 hari	98
5.6	Analisis Korelasi antar parameter pengukuran	100
5.6.1	Korelasi Stro-1 terhadap BMP-2.....	101
5.6.2	Korelasi BMP-2 terhadap DMP-1	102
5.6.3	Korelasi BMP-2 terhadap Col-1	103
5.6.4	Korelasi DMP-1 terhadap Col-1	104
5.6.5	Korelasi DMP-1 terhadap Adhesion Assay	105
5.6.6	Korelasi Col-1 terhadap Adhesion Assay	105
5.6.7	Korelasi Adhesion Assay terhadap Col-1 setelah grafting.....	106
BAB 6 PEMBAHASAN		108
6.1	Analisis Media Kondisi Sel Punca Lemak (ADMSC-CM).....	108
6.2	Sumber Sel Dalam Teknik Rekayasa Jaringan	110
6.2.1	Ekspresi STRO-1.....	112
6.2.2	Ekspresi Konsentrasi BMP 2.....	115
6.2.3	Ekspresi Konsentrasi DMP-1	115
6.2.4	Ekspresi Konsentrasi COL-1	117
6.3	<i>Scaffold</i> Yang Berasal Dari Produk Plasma (PRP,PRF Dan FG)....	119
6.3.1	Ekspresi Konsentrasi Adhesion Assay	121
6.3.2	Ekspresi Col-1 Sel Punca Setelah Interaksi Dengan <i>Scaffold</i> Plasma.....	123
6.4	Analisis Korelasi Antar Paramater Pengukuran	124

6.4.1 Korelasi ekspresi Stro-1 terhadap BMP-2.....	124
6.4.2. Korelasi ekspresi BMP-2 terhadap DMP-1.....	124
6.4.3. Korelasi ekspresi BMP-2 terhadap Col-1.....	125
6.4.4 Korelasi ekspresi DMP-1 terhadap Col-1	125
6.4.5 Korelasi ekspresi DMP-1 terhadap Adhesion assay	125
6.4.6 Korelasi ekspresi Col-1 terhadap Adhesion assay	126
6.4.7 Korelasi Adhesion assay terhadap Col-1 setelah <i>grafting</i> ...	126
 BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	 128
7.1. Kesimpulan	128
7.2 Saran	128
 DAFTAR PUSTAKA	 130
LAMPIRAN	144



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Perbedaan sel lir-odontoblast dan sel lir-osteoblas	20
Tabel 2.2	Faktor-faktor yang mempengaruhi diferensiasi adipocyte secara positif (+) atau negatif (-)	45
Tabel 4.1	Definisi, cara pengukuran dan skala ukur	66
Tabel 5.1	Uji Beda Rerata Jumlah sel punca menurut kelompok perlakuan	91
Tabel 5.2	Uji Beda Rerata ekspresi BMP-2 menurut kelompok perlakuan	92
Tabel 5.3	Uji Beda Rerata BMP-2 antar pasangan kelompok perlakuan	92
Tabel 5.4	Uji Beda Rerata DMP-1 menurut kelompok perlakuan	93
Tabel 5.5	Uji Beda Rerata DMP-1 antar pasangan kelompok perlakuan	94
Tabel 5.6	Uji Beda Rerata COL-1 tiap waktu pengamatan menurut kelompok perlakuan	95
Tabel 5.7	Uji Beda Rerata COL-1 antar kelompok perlakuan tiap waktu pengamatan	95
Tabel 5.8	Uji Beda Rerata Adhesion Assay menurut pasangan tiap kelompok Perlakuan	97
Tabel 5.9	Uji Beda Rerata Adhesion Assay antar pasangan kelompok perlakuan	97
Tabel 5.10	Uji Beda Rerata COL-1 Sel Punca Lemak dan Pulpa menurut pasangan tiap kelompok waktu perlakuan 1 hari	99
Tabel 5.11	Uji Beda Rerata COL-1 Sel Punca Lemak dan Pulpa dengan berbagai produk plasma kelompok waktu perlakuan 1 hari	100
Tabel 5.12	Hasil Korelasi-Regresi linier antar parameter perlakuan	100

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Diagram Organisasi Pulpa.....	15
Gambar 2.2	Tahap Penyembuhan Kulit yang berlangsung tumpang tindih dengan berbagai macam aktifitas sel , factor pertumbuhan dan sitokin	26
Gambar 2.3	Skema proses penyembuhan jaringan pulpa terhadap cedera respon vaskular	27
Gambar 2.4	Skema kerangka teori	61
Gambar 3.1	Skema kerangka konsep penelitian	62
Gambar 4.1	Dasar-dasar Penelitian	67
Gambar 4.2	Alur penelitian	68
Gambar 4.3	Hasil pengumpulan lemak dari <i>liposuction</i>	70
Gambar 4.4	Pengumpulan lemak hasil <i>liposuction</i> sampai pada proses penyimpanannya	71
Gambar 4.5	Rangkaian proses isolasi <i>stromal mesenchymal stem cell</i> ADMSC sampai pada kultur.....	72
Gambar 4.6	Proses ekspansi ADMSC sampai pada subkultur passase keempat.....	72
Gambar 4.7	Analisis ADMSC selama proses ekspansi berlangsung	72
Gambar 4.8	Proses persiapan ADMSC untuk diferensiasi ke arah sel yang diharapkan	73
Gambar 4.9	Peralatan dan bahan yang diperlukan untuk kultur ADMSC	74
Gambar 4.10	Peralatan laboratorium untuk melakukan kultur DPSC	74
Gambar 4.11	Proses isolasi DPSC dari jaringan pulpa	75
Gambar 4.12	Produk akhir dari proses pembuatan produk plasma.....	81
Gambar 4.13	Langkah-langkah mempersiapkan pembuatan produk plasma.....	82
Gambar 4.14	<i>Color Coded PRP Kit</i>	82
Gambar 4.15	Pengambilan sampel darah pasien di Dental Unit	82
Gambar 4.16	Tube di sentrifus pertama	82
Gambar 4.17	Setelah sentrifus pertama: erithrosit terkumpul pada dasar tube....	82

Gambar 4.18	Pengeluaran supernatan oleh kanula	83
Gambar 4.19.	PRP (dalam semprit) dan PPP (dalam tube sentrifugasi).....	83
Gambar 4.20.	Setelah sentrifus ke dua: pengeluaran PRP dengan kanula panjang bedah	83
Gambar 4.21.	Pencampuran PRP dengan CaCl dan Thrombin untuk menutupi defek.....	83
Gambar 5.1	Karakteristik Colony forming unit fibroblast (CFU-F) ADMSC.....	88
Gambar 5.2	Karakteristik Colony forming unit fibroblast (CFU-F) DPSC	89
Gambar 5.3.	Analisis <i>SDS-page</i> dari ADMSC	90
Gambar 5.4	Pemeriksaan Imunositokimia dengan anti Stro-1	91
Gambar 5.5	Sel odontoblas hasil Imunositokimia DMP-1.....	94
Gambar 5.6	Grafik error bar hasil estimasi konsentrasi COL-1 tiap waktu pengamatan menurut perlakuan	96
Gambar 5.7	Grafik error bar hasil estimasi konsentrasi <i>Adhesion Assay</i> antar pasangan kelompok perlakuan	98
Gambar 5.8	Grafik error bar hasil estimasi konsentrasi COL-1 sel punca lemak dan pulpa	99
Gambar 5.9	Grafik Regresi Linier antara Stro-1 terhadap BMP-2	101
Gambar 5.10	Grafik Regresi Linier antara DMP-1 terhadap BMP-2	102
Gambar 5.11	Grafik Regresi Linier antara Col-1 terhadap BMP-2	103
Gambar 5.12	Grafik Regresi Linier antara Col-1 terhadap DMP-2.....	104
Gambar 5.13	Grafik Regresi Linier antara Col-1 terhadap <i>Adhesion assay</i>	106
Gambar 5.14	Grafik Regresi Linier antara <i>Adhesion assay</i> terhadap Col-1	107

DAFTAR SINGKATAN



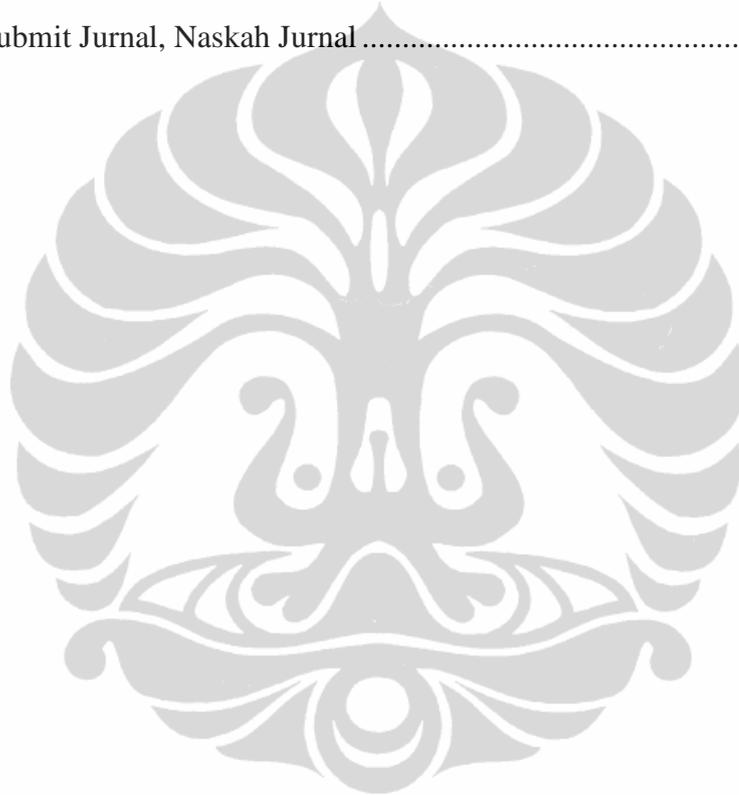
ADMSC	= Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell
ADSCs	= Adipose-Derived Stem Cells
ADP	= Adenosin Di-Phospate
ALP	= Alkaline Phospatase
ASC	= Adult Stem Cell
BDNF	= Brain-Derived Neurotrophic Factor
BMP	= Bone Morphogenic Protein
COL-1	= Collagen Type-1
CFU-F	= Colony Forming Unit- Fibroblast
CSF-1	= Colony Stimulating Factor-1
CSF	= Colony Stimulating Factor
CPP	= Calcium Polyphospate
Ca(OH) ₂	= Calcium Hidroksida
DSPP	= Dentin Sialophospoprotein
DPP	= Dentin Phospoprotein
DSP	= Dentin Sialoprotein
DMP-1	= Dentin Matrix Protein
DPSC	= Dental Pulp Stem Cell
DMEM	= Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGF	= Epidermal Growth Factor
ECM	= Extra-Cellular Matrix
ECGF	= Ephithelial Cell Growth Factor
Ff	= Fibrinogen
Fn	= Fibronectin
FGF	= Fibroblast Growth factor
FG	= Fibrin Glue
FBS	= Fetal Bovine Serum
IGF-1	= Insuline like Growth Factors-1
Ig	= Imunoglobulin
IL-1	= Interleukin-1
IVF	= In Vitro Fertilization
mRNA	= Messenger RNA
MSCs	= Mesenchymal Stem Cells
MDGF	= Macrophaged-Derived-Growth-Factor
MTT assay	= 3-(4,5 dimethylthiazol-2-y)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay
MTA	= Mineral Trioxide Aggregate
OC	= Osteo Calcin
On	= Osteo Nectin
OP	= Osteo Pontin
PRP	= Platelet Rich Plasma
PRF	= Platelet Rich Fibrin
PPP	= Platelet Poor Plasma

PDLSC	=	Periodontal Derived Ligamen Stem Cell
PDEGF	=	Platelet Derived Endothelial Growth factor
PDAF	=	Platelet Derived Angiogenesis Factor
PDGF	=	Platelet Derived Growth Factor
PF4	=	Platelet Factor 4
rhBMP-2	=	Human Recombinant Bone Morphogenetic -2
rhTGFB1	=	Recombinant Human Transforming Growth Factor Beta 1
SVF	=	Stromal Vascular Fraction
SIK	=	Semen Ionomer Kaca
SDF	=	Stromal Derived Factor
TGF α	=	Transforming Growth Factor Alpha
TGF β	=	Transforming Growth Factor Betha
TNF- α	=	Tumor Necroting Factors
TCP	=	Tri Calcium Phospate
TSP-1	=	Thrombospondin -1
Vn	=	Vitronectin
VEGF	=	Vascular Endhotelial Growth Factor
3D	=	Tiga Dimensi



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Keterangan Lolos Etik.....	144
Lampiran 2 Surat Persetujuan Tindakan Medik.....	145
Lampiran 3 Surat Keterangan Kerja Laboratorium	146
Lampiran 4 Dokumentasi riset	153
Lampiran 5 Cara kerja laboratorium	165
Lampiran 6 Uji Statistik	168
Lampiran 7 Submit Jurnal, Naskah Jurnal	176



ABSTRAK

Nama : Dewi Anggraini Margono
Program Studi : Ilmu Kedokteran Gigi
Judul : Potensi Sel Punca Mesenkhim Asal Jaringan Lemak Dengan Produk Plasma Untuk Regenerasi Sel Odontoblas Jaringan Pulpa *In Vitro*

Latar Belakang: Pendekatan biologis rekayasa jaringan gigi bertujuan meregenerasi jaringan gigi secara histologis, morfologis dan fungsional. Keterbatasan DPSC gigi manusia, memberikan ide untuk menggunakan jaringan lemak sebagai penghasil sel odontoblas. **Tujuan:** Menganalisis potensi jaringan lemak sebagai sumber MSCs alternatif untuk menjadi sel odontoblas dengan teknik rekayasa jaringan. **Material dan Metode :** Kelompok perlakuan ADMSC+rhBMP-2, ADMSC+rhBMP-2+Proterin Pulpa, dan DPSC+rhBMP-2, kontrol ADMSC dan DPSC. Analisis: Stro-1, DMP-1 dan Col-1 untuk karakterisasi odontoblastik, *Adhesion Assay*, dan Col-1 setelah grafting dengan PRP, PRF, FG. **Hasil:** Ekspresi seluruh parameter menunjukkan potensi ADMSC dan DPSC yang sama untuk berdiferensiasi ke arah odontoblas. **Kesimpulan:** Jaringan lemak berpotensi sebagai sumber sel odontoblas dalam proses regenerasi jaringan pulpa.

Kata kunci: regenerasi, sel odontoblas, ADMSC, DPSC, PRP, PRF, FG.

ABSTRACT

Name : Dewi Anggraini Margono
Study Programme : Doctoral in Dental Sciences
Title : The Potency of Mesenchymal Stem Cell Derived From Adipose Tissue with Plasma Product To Odontoblast Pulp Tissue Regeneration In Vitro

Background: Biological approach of dental tissue engineering aims to regenerate tooth structure in histological, morphological, and functional aspect. DPSC limitation of human teeth giving the idea of using adipose tissue to produce odontoblast. **Objective:** to analyze the potency of adipose tissue as an alternative source of MSCs to produce odontoblast cells by tissue engineering. **Materials and Methods:** Treatment groups were ADMSC+rhBMP-2, ADMSC+rhBMP-2+Pulp Protein, and DPSC+rhBMP-2, and control groups of ADMSC and DPSC. Analyzed: Stro-1, DMP-1 and Col-1 for odontoblastic characterization, Adhesion Assay and Col-1 after grafted with PRP, PRF, FG. **Result:** The expression of all markers showed the same potentiation of ADMSC and DPSC to differentiate towards odontoblast cells. **Conclusion:** Adipose tissues have the potency as a source of odontoblast cells in the process of pulp tissue regeneration.

Keywords: regeneration, odontoblast cell, ADMSC, DPSC, PRP, PRF, FG.

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kasus endodontik di Indonesia menduduki tempat teratas dibandingkan kasus Kedokteran Gigi lainnya. Pada Profil Direktorat Kesehatan Gigi tahun 1999, kasus endodontik ditemukan sebanyak 47.83% di Rumah Sakit Umum dan 49.99% di Puskesmas dari kasus penyakit gigi lainnya. Namun penanggulangannya terhadap kasus ini masih kurang terjangkau. Banyak tindakan perawatan endodontik yang tidak sesuai dengan kaidah-kaidah perawatan yang benar mengakibatkan jumlah kasus iatrogenik bertambah. Akibatnya terjadi peningkatan jumlah dan keparahan kasus endodontik yang memerlukan perawatan yang lebih kompleks.⁽¹⁾

Dari hasil penelitian prevalensi penyakit pulpa berdasarkan faktor pejamu (manusia) di klinik integrasi RSGMP FKG UI periode Maret-Juni 2007, menunjukkan bahwa prevalensi penyakit pulpa adalah sebesar 15.4% dengan diagnosis terbanyak adalah pulpitis reversibel (48%), pulpitis irreversibel (53%) dan pulpitis akut (2.0%). Kasus penyakit pulpa terbanyak terjadi pada kelompok usia 20-29 tahun (38.4%), pada laki-laki (51%) dan perempuan (49%).⁽²⁾ Sedangkan dari hasil penelitian tahun 2008 di klinik yang sama prevalensi penyakit pulpa sebesar 28,4%, dengan frekwensi terbanyak terjadi pada perempuan (63%) pada kelompok usia 20-29 tahun, dengan diagnosis terbanyak adalah pulpitis irreversibel (76%), pulpitis reversibel (20.1%) dan pulpitis akut (2.4%).⁽³⁾

Radang merupakan suatu respon jaringan hidup terhadap cedera yang meliputi perubahan progresif jaringan, berupa kerusakan jaringan tersebut sejak terkena cedera sampai pada pemulihannya. Keadaan tersebut dapat terjadi pada semua jenis jaringan tubuh termasuk jaringan pulpa. Di dalam jaringan pulpa terdapat beberapa kelompok komponen yang berperan dalam proses pertahanan jaringan terhadap rangsang dari luar, diantaranya yaitu perubahan dalam faktor hemodinamik, permeabilitas darah, sel darah putih serta sel jaringan. Radang jaringan pulpa, umumnya disebabkan karena infeksi bakteri pada karies gigi,

fraktur gigi atau kondisi lainnya yang mengakibatkan terbukanya pulpa gigi karena iritan kimia, faktor termal, perubahan hiperemik dan lain-lain..⁽⁴⁾

Pada saat jaringan pulpa terinfeksi, sangat sulit bagi sistem imun tubuh untuk menghilangkan infeksi mengingat kurangnya suplai pembuluh darah kolateral. Pengangkatan sebagian dari jaringan pulpa, yang dikenal sebagai pulpektomi parsial, telah terbukti tidak efektif mengingat infeksi masih tertinggal di dalam saluran akar. Oleh karena itu, perawatan ini tidak lagi dilakukan oleh para praktisi dokter gigi saat ini. Secara klinis, pada saat pulpa terdiagnosis pulpitis ireversibel, tidak ada perawatan yang dapat mengubah keadaan sisa jaringan pulpa yang masih normal, karena itu seluruh jaringan pulpa harus diamputasi dengan pulpektomi.^(1, 4-6)

Vitalitas pulpa sangat penting bagi kelangsungan hidup gigi, karena menyediakan nutrisi dan bertindak sebagai biosensor untuk mendeteksi rangsang patogen. Secara klinis, infeksi pulpa gigi umumnya bersifat ireversibel akibat letak anatomi serta pengaturannya. Sulit bagi tubuh untuk mengeliminasi infeksi, dimana selanjutnya proses ini akan bertahan dan menjadi buruk. Sekarang ini strategi yang secara luas digunakan dalam klinik adalah mengeluarkan sebagian maupun seluruh jaringan pulpa yang mengalami kontaminasi, untuk kemudian mengisi dan menutup ruang yang kosong dengan bahan sintetik. Gigi tanpa jaringan pulpa, akan kekurangan suplai pembuluh darah dan sistem saraf, sehingga menjadi sangat rentan terhadap cedera.^(4, 5)

Sejalan dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi sel punca khususnya populasi sel punca mesenkhim memberikan suatu harapan baru dalam melakukan penyembuhan terhadap suatu penyakit. Dalam bidang kedokteran gigi, sel punca ini juga perlu digali kembali mengingat keberadaan sel tersebut terkandung didalam pulpa sehat tepat dibagian tengah pulpa dibawah lapisan *cell rich zone*. Dari kepustakaan dapat diketahui bahwa sel punca merupakan sel primitif yang tidak berdiferensiasi dan membentuk suatu cadangan sel pluripoten. Sel tersebut memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel bila diperlukan. Sel ini dapat menjadi fibroblast atau sel dentinoblastik. Apabila terjadi inflamasi, sel-sel ini dapat berdiferensiasi menjadi sel makrofag atau sel dentinoclast.^(1, 4, 5)

Dengan meningkatnya pengetahuan tentang sel punca tersebut di atas khususnya DPSC, dapat meningkatkan potensi keberhasilan perawatan penyakit pulpa, serta mengubah paradigma penyembuhan perawatan pulpa dari reparatif menuju ke arah regeneratif. Keberadaan sel ini sangat membantu dalam segala hal karena memiliki fleksibilitas yang tinggi, terutama pada kondisi darurat misalnya saat pulpa terinfeksi sehingga membutuhkan perlawanan yang kuat sehingga dapat membantu proses penyembuhannya. (1, 4-6)

Untuk meningkatkan proses regenerasi, teknik rekayasa jaringan dapat diaplikasikan ke dalam ruang pulpa untuk memfasilitasi penyembuhan jaringan pulpa seluruhnya dan pembentukan dentin baru. Pada saat seluruh jaringan pulpa hilang, maka sintesis *de novo* dari pulpa dilakukan untuk meregenerasi jaringan. Untuk meregenerasi jaringan, bekuan darah digunakan sebagai sumber yang kaya akan *growth factors* di dalam membantu perbaikan jaringan. Membuat perdarahan baru untuk mengisi daerah luka merupakan prosedur rutin pada umumnya tindakan bedah. (7, 8)

Rutherford dan Fitzgerald, 1995 telah mengemukakan strategi baru dalam mempertahankan jaringan pulpa vital dengan dasar biologi molekuler untuk memacu proliferasi sel-sel pulpa. Bahan-bahan yang dapat dipakai dalam hal ini antara lain molekul-molekul dentinogenik biologi yang merupakan protein-protein matriks ekstraseluler *non-diffusible* seperti kolagen, fibronectin dan molekul-molekul matriks ekstraseluler *diffusible* seperti faktor pertumbuhan (*growth factor*) yaitu *Bone Morphogenic Protein (BMP)*, dan *Transforming Growth Factor (TGF)*.⁽⁹⁾ Dari hasil penelitian Iohara, 2004 menunjukkan bahwa regenerasi dentin dengan penggunaan sel punca pulpa yang dikombinasi dengan BMP-2 dapat memacu diferensiasi sel-sel odontoblast dalam pembentukan dentin baru.⁽¹⁰⁾ Sloan dan Smith, 2007 menunjukkan bahwa penggunaan sel punca mempunyai peranan penting dalam regenerasi dan perbaikan dentin yang rusak^(9, 11)

Sejak sel punca mesenkhim pulpa berhasil diisolasi oleh Gronthos (2000), maka hampir semua teknik rekayasa jaringan di bidang kedokteran gigi menggunakan sel punca dari jaringan pulpa gigi, sedangkan keterbatasan yang dimiliki oleh sel pulpa gigi manusia cukup banyak, diantaranya selain harus

diperoleh dari jaringan pulpa gigi sehat dengan indikasi yang terbatas, jumlah/volume jaringan yang diperoleh dari gigi tersebut sangat terbatas, sehingga untuk menyediakan sumber sel punca yang diperlukan untuk kebutuhan klinik menjadi sulit.^(11, 12)

Masalah yang selama ini dihadapi di bidang konservasi gigi diantaranya adalah upaya mempertahankan fungsi pulpa dengan menggunakan bahan sintetik^(1, 4-6, 13) Sementara hampir semua bahan artifisial yang dipergunakan dalam perawatan endodontik saat ini merupakan bahan impor yang terdiri dari unsur-unsur senyawa logam berat yang umumnya bersifat toksik, serta menimbulkan reaksi penolakan benda asing dari tubuh manusia.^(1, 4-6) Khususnya pada perawatan pulpa vital, dibutuhkan bahan-bahan seperti kalsium hidroksida dan MTA untuk mempertahankan vitalitas pulpa serta pembentukkan dentin reparatif. Sampai saat ini walaupun kalsium hidroksida lebih ekonomis dan mudah diperoleh, tetapi hasil akhir yang diharapkan tidak sebaik MTA. Meskipun demikian bahan MTA ini masih memiliki keterbatasan dalam prosedur aplikasi klinis karena memiliki waktu pengerasan yang panjang serta *compressive strength* yang rendah.⁽¹⁴⁾

Sejak ditemukannya MTA oleh Torabinejad *et al* di Universitas Loma Linda 1993, bahan ini telah banyak digunakan dalam perbaikan kerusakan jaringan pulpa dan periapiks untuk mempertahankan fungsi gigi di dalam mulut. Penelitian-penelitian dengan menggunakan MTA telah banyak dilakukan terutama dalam mempertahankan jaringan pulpa vital sebagai bahan proteksi pulpa menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan kalsium hidroksida yang merupakan bahan standar di bidang konservasi gigi. Holland *et al* 2001 dalam penelitiannya dengan melihat jaringan ikat hewan coba tikus dengan cara membuat implant *tube* dentin yang diisi dengan MTA, semen Portland, dan kalsium hidroksida, menunjukkan hasil yang tidak berbeda pada hari ketiga dan ketujuh tetapi mekanisme dari MTA dan semen Portland menunjukkan kepadatan jaringan yang jauh lebih baik daripada kalsium hidroksida.⁽¹⁵⁾ Takita *et al* 2006 dalam penelitiannya secara *in vivo* melihat efek MTA terhadap proliferasi jaringan pulpa gigi manusia, hasil penelitian ini menunjukkan MTA dapat memacu proliferasi sel-sel pulpa yang jauh lebih tinggi dari kalsium hidroksida.^(15, 16)

Untuk itulah perlu ditemukan suatu konsep baru pada perawatan pulpa vital yang mengalami inflamasi melalui teknik rekayasa jaringan dengan menggunakan sumber materi serta pendekatan biologis yang dapat meningkatkan potensi regenerasi jaringan. Perbedaan yang utama antara proses penyembuhan dan perbaikan jaringan adalah bahwa pada proses penyembuhan akan menghasilkan bentuk dan fungsi jaringan yang secara biologis sama dengan jaringan semula, sedangkan pada proses perbaikan bentuk jaringan yang dihasilkan tidak sama dengan jaringan sebelumnya misalnya jaringan tulang digantikan oleh jaringan parut.⁽¹⁷⁾

Selama ini, pada keadaan yang melibatkan pulpa terbuka seperti pulpa yang diamputasi dapat diperbaiki dengan sendirinya setelah aplikasi bahan penutup pulpa.⁽¹⁷⁾ Bergenholtz, 2001 menunjukkan bahwa pulpa yang terbuka akibat karies menunjukkan potensi yang amat terbatas untuk kembali kepada keadaan semula akibat infeksi bakteri untuk jangka waktu yang lama yang melibatkan reaksi pertahanan.⁽¹⁸⁾ Perbaikan pulpa setelah terbuka terhadap lingkungan rongga mulut membutuhkan lingkungan yang bebas bakteri, tidak adanya perubahan hemodinamik yang berat serta tidak adanya infiltrasi sel-sel radang khronis. Menurut Trowbridge 1981, reaksi selanjutnya akan menuju pada penyembuhan dan perbaikan pulpa atau sebaliknya akan mengalami nekrosis pulpa semua bergantung pada besarnya reaksi pertahanan.^(9, 19, 20)

Pada penyembuhan pulpitis diharapkan terjadi regenerasi jaringan pulpa yang ditinggalkan di dalam saluran akar. Proses regenerasi ini tidak berbeda dengan regenerasi jaringan ikat lain yang terjadi di bawah kulit, karena pada jaringan pulpa penyembuhan bersifat sekunder, sedangkan pada jaringan ikat lain seperti kulit, umumnya bersifat primer. Oleh karena itu pada perawatan pulpitis, mutlak memerlukan matriks ekstraseluler untuk menutup luka jaringan, agar jaringan ikat yang terletak di lapisan bawah matriks tersebut dapat merangsang pembentukan jaringan ikat normal maupun jaringan parut.^(1, 18)

Proses seluler yang terjadi setelah pulpa terbuka dapat dijelaskan dengan penggunaan bahan berbasis kalsium hidroksida atau bahan lain yang menghasilkan iritasi yang rendah terhadap pulpa. Pada awalnya, sel-sel pulpa di lapisan bawah bahan penutup akan mengalami proliferasi, migrasi, dan elaborasi jaringan

kolagen baru pada kontak dengan zona nekrotik dari daerah pulpa yang dirawat.^(21, 22) Kemudian terjadi presipitasi garam mineral di atas zona nekrotik dengan matriks kolagen yang baru. Selanjutnya, proses dentinogenesis reparatif dimulai, dan lapisan sel lir-odontoblas dibentuk berkaitan dengan kalsifikasi superfisial.^(9, 17, 18)

Rekayasa jaringan merupakan proses membentuk jaringan fungsional 3D dengan menggunakan sel yang dikombinasikan dengan *scaffold/* media lainnya untuk memfasilitasi pertumbuhan sel, organisasi serta diferensiasi. Regenerasi jaringan gigi dengan menggunakan konsep rekayasa jaringan merupakan suatu pendekatan biologis yang bertujuan untuk meregenerasi jaringan mineral menyerupai gigi alami dalam arti secara histologis, morfologis serta fungsional.^(9, 23) Sementara pembentukan jaringan biologi baru melalui rekayasa jaringan dapat dicapai baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.⁽²⁴⁻²⁶⁾

Pada teknik rekayasa tersebut umumnya memerlukan matrik ekstraseluler (ECM) artifisial untuk regenerasi jaringan, karena proliferasi dan diferensiasi sel akan menghasilkan regenerasi jaringan dan proses ini akan sulit terjadi tanpa adanya matriks yang berfungsi sebagai *cell scaffold*. Karena ECM artifisial ini harus terabsorpsi seluruhnya oleh tubuh pada saat jaringan baru beregenerasi, bahan untuk matriks harus merupakan *biodegradable polimer*. Persyaratan ini, sebagaimana halnya perlekatan sel ke dalam permukaan matriks, membuat bahan-bahan biologis ini menarik dalam rekayasa jaringan.⁽²⁵⁻²⁷⁾

Faktor-faktor yang diperlukan dalam teknik rekayasa jaringan diantaranya adalah sel, *scaffold* untuk proliferasi dan diferensiasi sel serta faktor pertumbuhan (*growth factor*), ketiga faktor ini disebut *triad tissue engineering*.^(24, 28) Pada prinsipnya, strategi penggunaan sel-sel mesenkhim dalam teknik rekayasa jaringan untuk memperbaiki kerusakan jaringan adalah sel-sel mesenkhim yang diisolasi dari jaringan donor (sumsum tulang, jaringan gigi dan lain-lain) serta dikultur pada *biodegradable scaffold* untuk mendukung diferensiasi sel dari jaringan.⁽²⁹⁾ Sel-sel tersebut diimplantasikan ke dalam struktur artifisial yang mampu mendukung pembentukan jaringan secara tiga dimensi. Selanjutnya sel dan *scaffold* tersebut ditransplantasikan ke pasien untuk meningkatkan regenerasi jaringan.^(29, 30)

Sel punca dapat digunakan untuk meregenerasi sebagian dari kehilangan pulpa dan dentin. Pada teknik rekayasa jaringan, sumber sel sangat penting dan sering menjadi masalah utama. Selama ini penggunaan DPSC gigi tidak mungkin diambil dari pasien di klinik, disamping itu isolasi DPSC yang terbaik diperoleh dari pulpa sehat, sehingga sulit dipergunakan untuk keperluan klinik. Karena itulah timbul pemikiran untuk menggunakan MSCs yang berasal dari jaringan lain termasuk kulit, rambut, sumsum tulang dan jaringan lemak, yang sangat banyak terdapat dalam tubuh serta relatif lebih mudah diperoleh tanpa biaya untuk *cryopreservation*.⁽³¹⁾

Dipertimbangkannya jaringan lemak sebagai sumber sel punca mesenkhim (MSCs) untuk rekayasa jaringan gigi diantaranya adalah karena bersifat autologus, mudah diperoleh dalam jumlah yang berlimpah melalui prosedur yang invasif minimal, serta mudah dilakukan kultur dan diperbanyak. Di samping itu jaringan lemak merupakan jenis sel punca dewasa (ASCs) yang mampu melakukan metamorphosis/ transdiferensiasi ke berbagai galur karena sifat plastisitasnya yang tinggi, sehingga potensi untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke arah odontoblas sangat dimungkinkan.⁽³²⁻³⁴⁾

Hasil penelitian Zuk et al (2002) menunjukkan potensi ADMSC dalam membentuk struktur jaringan keras mirip tulang dan gigi.⁽³²⁾ Hasil yang sama ditunjukkan oleh Nung Hung et al (2011) melalui perbandingan potensi jaringan lemak dan jaringan pulpa sebagai sumber MSCs untuk regenerasi gigi baru, dan dilaporkan bahwa kedua jenis sel punca mesenkhim tersebut ternyata memiliki potensi yang sama untuk tumbuh dan berkembang menjadi struktur jaringan keras mirip tulang dan gigi, pada hewan percobaan kelinci.⁽³¹⁾ Meskipun demikian sampai saat ini belum dapat dibuktikan potensi sesungguhnya dari ADMSC tersebut untuk berdiferensiasi ke galur odontoblas, untuk regenerasi jaringan pulpa.

Penggunaan *scaffold* plasma PRP, PRF dan FG sebagai *microenvironment* bagi proliferasi dan differensiasi sel punca tersebut untuk menghasilkan matriks ekstraselular sangat dimungkinkan mengingat banyaknya *growth factor* yang terkandung di dalamnya. *Growth factors* ini terlibat di dalam proses penyembuhan luka dan dikatakan mendukung regenerasi jaringan. Efek

yang menguntungkan dari berbagai produk plasma ini telah diamati pada berbagai jaringan dan mempercepat penyembuhan cedera pada jaringan tulang setelah aplikasi dari bahan tersebut.^(35, 36)

Penelitian yang dilakukan oleh Shigeru (2006), tentang efek PRP terhadap sel pulpa gigi yang diperoleh dari tikus sehat dan manusia, menunjukkan hasil bahwa, *transforming growth factor beta* (TGF-BETA1) yang merupakan *growth factor* utama yang terkandung di dalam PRP serta berperan penting dalam sinyal seluler untuk diferensiasi odontoblas, ternyata memiliki konsentrasi sebanyak 21 kali lebih banyak dibandingkan dengan kelompok perlakuan tanpa PRP.^(9, 37) Aplikasi konsentrasi PRP di dalam sel pulpa gigi mempengaruhi peningkatan proliferasi sel dan ekspresi gen mRNA DSP dan DMP.⁽³⁸⁾

Dari perspektif aplikasi klinis, PRP memenuhi hampir semua kriteria persyaratan *scaffold*, diantaranya adalah bersifat autologus, mudah disiapkan untuk keperluan perawatan gigi, kaya akan kandungan *growth factors*, mudah terurai dalam jangka waktu yang lama (*biodegradable*), serta dapat membentuk matriks fibrin tiga dimensi.^(24, 28, 29) Dari hasil penelitian Orhan et al (2011) dilaporkan bahwa penggunaan PRP sebagai matriks *scaffold* dengan *enamel matrix derivative* dapat meningkatkan jumlah sel lir-odontoblas serta menambah ketebalan dentin reparatif paska perawatan kaping pulpa pada hewan coba tikus Wistar.⁽³⁹⁾

Sedangkan Platelet-rich fibrin (PRF) merupakan konsep baru tentang konsentrasi platelet dengan membran fibrin yang diperkaya oleh platelet dan *growth factor* setelah diproses dari darah yang bebas antikoagulan. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa PRF lebih baik dibandingkan dengan PRP dilihat dari efek ALP dan induksi mineralisasi pada osteoblas tikus, serta melepaskan *autologus growth factor* dengan efek proliferasi dan differensiasi yang lebih kuat dan lama dibandingkan dengan PRP secara *in vitro*.^(40, 41)

Namun demikian sampai saat ini, masih sedikit publikasi tentang evaluasi produk plasma ini sebagai *scaffold generation* bagi sel punca mesenkhim yang berasal dari jaringan mesenkhim lain selain pulpa pada aplikasi endodontik regeneratif, sehingga hal ini membutuhkan serangkaian penelitian di masa depan. Apakah produk plasma ini dapat berperan sebagai *microenvironment* dalam

mendukung proses penyembuhan pulpitis secara biologis sehingga dapat terbentuk jaringan sesuai dengan asalnya? ⁽⁴²⁾ Keadaan tersebut di atas yang menjadi latar belakang dilakukannya analisis terhadap potensi jaringan lemak sebagai sumber sel punca mesenkhim untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke arah odontoblas melalui identifikasi penanda permukaan Stro-1 dan DMP-1 sebagai penanda khusus differensiasi odontoblas serta Col-1 sebagai penanda terbentuknya matriks ekstraseluler. Untuk melihat potensi sel tersebut menempel pada *scaffold* plasma digunakan *Adhesion Assay*, dan Col-1 untuk melihat potensi regeneratif sel dan *scaffold* tersebut dalam membentuk matriks jaringan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat disimpulkan sebagai berikut :

- 1.2.1 Perlu ditemukan suatu konsep baru, pada perawatan pulpa vital yang mengalami pulpitis, melalui pendekatan rekayasa jaringan untuk meningkatkan dentinogenesis sel-sel pulpa.
- 1.2.2 Rekayasa jaringan merupakan pendekatan baru dari aspek biologi regeneratif dan rekayasa yang terdiri dari strategi transplantasi sel, konstruksi jaringan bioartifisial dan stimulasi regenerasi sel secara *in vivo*. Hal ini memungkinkan dipacunya regenerasi jaringan pulpa dalam upaya memperbaiki jaringan yang rusak.
- 1.2.3 Untuk meningkatkan keamanan secara biologis serta menghindari timbulnya reaksi penolakan dari tubuh, perlu dikembangkan suatu bahan perancah (*scaffold*) dari bahan autologus sebagai biomaterial yang dapat menginduksi proses dentinogenesis pada pulpitis.
- 1.2.4 Dari perpektif aplikasi klinis, berbagai produk plasma seperti PRP, PRF dan FG memenuhi hampir semua kriteria persyaratan sebagai bahan perancah biologis, namun bila ingin digunakan sebagai *cell scaffold* bagi ADMSC dan DPSC untuk meningkatkan proses diferensiasi ke galur odontoblas masih diperlukan penelitian lebih jauh.
- 1.2.5 Sumber sel penting artinya dalam rekayasa jaringan, karena akan berkembang menjadi jaringan pulpa. Mengingat banyaknya keterbatasan penggunaan DPSC dari pulpa gigi sehat yang akan digunakan dalam

teknik rekayasa jaringan, karena itu dipilih alternatif ADMSC yang merupakan sumber sel punca mesenkhim yang paling besar, terdapat hampir di seluruh bagian tubuh, dalam jumlah yang melimpah serta memiliki beberapa karakteristik yang mirip dengan DPSC.

1.3 Pertanyaan Penelitian

Untuk menjawab permasalahan di atas, dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1.3.1 Pertanyaan Umum

Apakah ADMSC dapat menjadi alternatif sumber sel odontoblas yang diperlukan dalam regenerasi jaringan pulpa?

1.3.2 Pertanyaan Khusus

- 1.3.2.1 Apakah ADMSC dapat mensekresikan sitokin yang terkandung dalam media kondisi lemak yang dapat meningkatkan potensi sel tersebut untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke galur odontoblas?
- 1.3.2.2 Apakah ADMSC mempunyai penciri sel punca mesenkhim (MSCs) yang sama dengan DPSC?
- 1.3.2.3 Apakah ADMSC dan DPSC mempunyai potensi yang sama untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke galur odontoblas ?
- 1.3.2.4 Apakah ADMSC dan DPSC mempunyai potensi yang sama untuk memproduksi matriks ekstraseluler sebagai indikasi proses pembentukan jaringan ?
- 1.3.2.5 Apakah PRP, PRF dan FG mempunyai potensi yang sama sebagai *scaffold* untuk meningkatkan proliferasi dan diferensiasi ADMSC dan DPSC ke arah galur odontoblas ?
- 1.3.2.6 Apakah ADMSC dan DPSC mempunyai potensi regeneratif yang sama melalui analisis produk dari masing-masing sel punca tersebut pada saat berinteraksi dengan dan tanpa *scaffold* PRP, PRF dan FG ?

1.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Menganalisis potensi jaringan lemak sebagai salah satu sumber MSCs alternatif yang diarahkan menjadi sel odontoblas pengganti jaringan pulpa.

1.4.2 Tujuan Khusus

- 1.4.2.1 Menganalisis sitokin yang di sekresikan oleh ADMSC yang terkandung dalam media kondisi ADMSC.
- 1.4.2.2 Mengisolasi dan mengidentifikasi ADMSC dan DPSC dengan penanda sel punca mesenkhim yang sama.
- 1.4.2.3 Menganalisis potensi ADMSC dan DPSC untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke galur odontoblas.
- 1.4.2.4 Mengevaluasi potensi ADMSC dan DPSC dalam memproduksi matriks ekstraseluler sebagai indikasi proses pembentukan jaringan
- 1.4.2.5 Menganalisis potensi PRP, PRF dan FG sebagai *scaffold* untuk meningkatkan proliferasi dan diferensiasi ADMSC dan DPSC ke galur odontoblas.
- 1.4.2.6 Menetapkan potensi regeneratif ADMSC dan DPSC melalui analisis produk dari masing-masing sel punca tersebut pada saat berinteraksi dengan dan tanpa scaffold PRP, PRF dan FG.

1.4.3 Manfaat

1.4.3.1 Untuk Praktisi

Membuat terobosan baru dalam konsep perawatan pulpa vital dengan metode aplikasi rekayasa jaringan menggunakan bahan yang berasal dari individu yang bersangkutan dalam proses penyembuhan pulpitis.

1.4.3.2 Untuk pengembangan ilmu dan dunia pendidikan :

Kemajuan penelitian dalam bidang biomedik membuka jalan bagi pengembangan metode baru perawatan gigi yang bertujuan pada regenerasi kompleks pulpa-dentin, yaitu berdasarkan pada pemahaman biologi molekuler.

1.4.3.3 Untuk Masyarakat

Aspek rekayasa jaringan dengan menggunakan bahan autologus ini membuka program baru dalam bidang pengadaan bahan, dari segi keamanan biologis, metode perawatan, serta faktor ekonomi. Dengan mengurangi biaya kesehatan yang semakin mahal karena sulitnya memperoleh bahan-bahan yang tepat dalam perawatan konservasi gigi, juga memungkinkan perawatan yang lebih efisien

dengan manajemen klinis yang lebih baik. Hasil penelitian ini berpotensi untuk didaftarkan menjadi hak atas kekayaan intelektual (HAKI) dari FKG-UI.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Berkembangnya biologi molekuler memberikan kesempatan untuk mengembangkan strategi atau bahan-bahan yang digunakan dalam perawatan pulpa gigi yang mengalami inflamasi reversibel maupun irreversibel dengan terbukanya pulpa sehingga menyebabkan masuk dan berkembang biaknya mikroorganisme sehingga mengakibatkan terjadinya peradangan di jaringan pulpa maupun periradikular. ^(8, 43, 44)

Kemajuan penelitian dalam bidang biomedik membuka jalan dalam pengembangan metode baru perawatan gigi yang bertujuan pada regenerasi kompleks pulpa-dentin. Beberapa bahan yang secara biologis melepaskan molekul aktif pada daerah pulpa yang terbuka telah diteliti selama beberapa tahun terakhir ini. Pendekatan baru ini berdasarkan pada pemahaman molekuler dan seluler dari mekanisme pengaturan dentinogenesis selama proses perbaikan gigi dan potensi pemanfaatannya untuk klinik. ^(17, 45)

2.1 Biologi Pulpa

Dentin merupakan salah satu komponen utama gigi yang mengalami mineralisasi, dengan tubuli dentin yang masuk ke dalam seluruh dentin yang tebal. Pulpa gigi merupakan jaringan lunak heterogen yang terletak di tengah gigi, serta mengandung berbagai jenis sel dan molekul matriks ekstraseluler. Dentin maupun pulpa berasal dari *neural crest*, dan karena hubungan yang erat antara keduanya, khususnya selama tahap embrional dari perkembangan gigi, maka sangatlah sulit untuk membicarakan keduanya secara terpisah.

Dentin dan pulpa merupakan jaringan tunggal kompleks yang secara histologik tampilannya bervariasi berdasarkan usia dan rangsangan terhadap stimuli eksternal Jaringan pulpa dibatasi oleh jaringan dentin yang secara mikroskopik menyambung dengan lapisan paling luar sel odontoblast, dan daerah ini disebut *pulpodentinal complex*. Lapisan terluar sel odontoblas, sitoplasmanya menjorok masuk ke tubulus dentin mencapai sepertiga tebal dentin, yaitu kira-kira 0,7mm. ^(29, 46)

Sedangkan pulpa merupakan jaringan lunak yang lengkap dengan sistem mikrovaskularisasi, persyarafan, induksi dan pertahanan serta merupakan sumber yang kaya dengan sel punca mesenkhim.⁽²⁹⁾ Dari kepustakaan yang ada, *reserve cell ini* merupakan sel primif yang tidak berdiferensiasi yang membentuk suatu cadangan sel pluripoten. Sel tersebut memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi berbagai macam sel bila diperlukan.⁽⁴⁷⁾ Fungsi utama dari pulpa adalah menghasilkan dentin, termasuk dentin primer sejak awal perkembangan gigi, dentin sekunder sepanjang kehidupan gigi, serta dentin tersier akibat rangsang patogen. Odontoblas, seperti telah disebutkan di atas, merupakan jenis sel yang memiliki kapasitas membentuk dentin. Pulpa gigi merupakan jaringan yang kaya akan pembuluh darah dengan sejumlah pembuluh saraf bermielin dan tidak bermielin. Hal ini berkaitan erat dengan dua fungsi lainnya dari pulpa gigi yaitu menyediakan nutrisi untuk dentin serta menjadi biosensor untuk mendeteksi rangsang pathogen.^(37, 48)

Secara histologis pulpa terdiri dari 4 (empat) zona (Gambar 2.1) :^(49, 50)

- Zona Odontoblas pada perifer pulpa

Merupakan zona terluar yang terdiri dari sel-sel odontoblas, dan disebut juga zona dentinoblas. Di dalam zona ini terdapat pembuluh darah kapiler, serabut saraf, dan sel dendritik.

- Zona bebas sel dari *Weil*

Banyak ditemukan di bagian korona pulpa, disebut juga sebagai zona miskin sel atau zona subdentinoblas. Zona ini mengelilingi zona kaya sel, dan relatif bebas sel, sehingga disebut sebagai zona bebas sel. Zona ini mengandung banyak pembuluh darah kapiler, serabut saraf sensoris yang tidak bermielin. Zona ini tidak terlihat pada pulpa muda yang masih terjadi pembentukan dentin, dan pada pulpa matang yang sedang membentuk dentin reparatif.

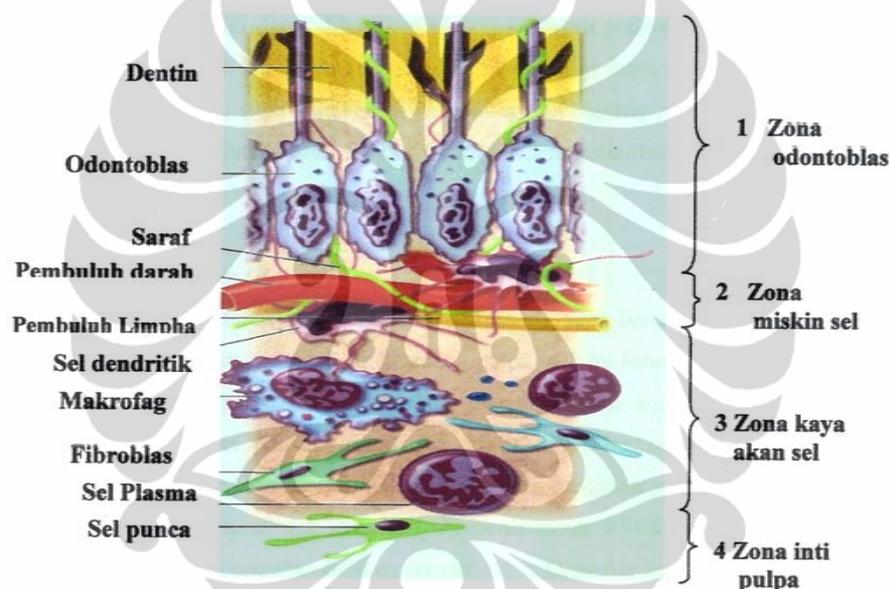
- Zona kaya akan sel

Zona ini terletak di sebelah luar zona sentral dan mengelilingi zona tersebut. Zona ini sangat padat karena mengandung banyak sel seperti fibroblast, makrofag, sel dendritik dan *undifferentiated mesenchymal* atau sel punca. Sel cadangan merupakan sel mesenkhim yang tidak terdiferensiasi dan berfungsi untuk menggantikan sel-sel yang rusak, misalnya membentuk odontoblas baru.

Meskipun demikian pembelahan sel pada pulpa normal jarang terjadi, kematian odontoblas meningkatkan terjadinya mitosis. Adanya cedera pada odontoblas akan menyebabkan migrasi sel dari zona kaya akan sel ke permukaan dalam dentin. Aktifitas mitosis merupakan langkah awal pembentukan odontoblas baru. Penelitian terakhir mengatakan bahwa sel punca sebagai sumber untuk perpindahan odontoblas kembali .

- Inti Pulpa

Inti pulpa disebut juga zona sentral, mengandung banyak pembuluh darah, saraf, serta sel jaringan ikat fibroblas.



Gambar 2.1. Diagram Organisasi Pulpa⁽⁵⁰⁾
Keterangan: Gambaran histologi pulpa

Secara anatomi, pulpa gigi hampir seluruhnya dikelilingi oleh dentin yang keras. Satu-satunya hubungan antara pulpa gigi dan jaringan sekitarnya adalah melalui ujung akar yang sangat kecil. Seluruh pembuluh darah utama dan limfe masuk ke pulpa melalui ujung akar gigi, sehingga menjadikan ujung akar jalan utama untuk nutrisi dan pembuangan. Pada beberapa gigi, juga terdapat lubang kecil di bagian lateral saluran akar, dekat dengan foramen apikal Keterbatasan akses serta batas dinding-dinding yang keras ini menyulitkan penghilangan radang pada saat pulpa mengalami keradangan. ^(45, 46, 48)

Odontoblas merupakan sel utama dari jaringan pulpa. Sel ini membentuk lapisan tunggal di perifer, mensintesis matriks dan mengontrol mineralisasi dentin. Oleh sebab itu, sejumlah penulis memilih nama 'dentinoblas' untuk menjelaskan fungsi utama sel ini sebagai pembentuk dentin. Di bagian koronal, odontoblas berjumlah banyak, tersusun lebih dari 3 lapisan, dengan bentuk relatif besar dan kolumnar tinggi. Jumlahnya rata-rata 45.000 – 65.000/mm² di area tersebut. Di bagian serviks dan tengah akar, jumlahnya lebih sedikit, tersusun dalam 1-2 lapisan, dan berbentuk kolumnar pendek atau kuboid, sedangkan di bagian apeks berbentuk pipih. Morfologi sel ini mencerminkan tingkat aktivitasnya yaitu sel-sel yang lebih besar memiliki aparatus sintesis yang terbentuk sempurna, serta memiliki kapasitas untuk mensintesis matriks lebih banyak.^(46, 49, 51)

Odontoblas terdiri atas dua komponen utama yaitu badan sel dan prosesus, dimana badan sel terletak berdekatan dengan matriks dentin tidak termineralisasi (predentin). Prosesus odontoblas yang berisi sitoplasma sel, memanjang ke arah luar dengan panjang yang bervariasi melalui tubulus di predentin dan dentin, mencapai sepertiga ketebalan dentin (0,7 mm). Badan sel merupakan bagian yang berfungsi dalam sintesis dan terdiri dari nukelus dan organel sitoplasma yang merupakan ciri khas sel-sel sekresi. Selama dentinogenesis aktif, retikulum endoplasmik dan badan golgi menonjol dan ada sejumlah mitokondria dan vesikel.^(46, 49, 51)

Odontoblas merupakan sel tahap akhir yang tidak akan mengalami pembelahan sel lagi, sehingga disebut disebut sel *postmitotic*. Selama siklus hidupnya, mereka mengalami fase fungsional, transisional, dan fase istirahat, semua itu ditandai oleh ukuran sel dan ekspresi organel. Odontoblas dapat berlanjut pada berbagai tingkat aktivitas selama hidupnya. Sejumlah sel mengalami kematian yang terencana (apoptosis) seiring dengan penurunan volume pulpa. Proses penyakit, terutama karies gigi, dapat merusak odontoblas, tetapi bila kondisi memungkinkan, sel-sel ini dapat digantikan oleh generasi baru sel lir-odontoblas yang berdiferensiasi dari sel-sel induk.^(46, 49, 51)

Sel induk adalah sel mesenkim yang belum berdiferensiasi, sering disebut juga sebagai 'sel progenitor' atau 'sel prekursor'. Walaupun merupakan

subpopulasi minor, sel ini ditemukan di semua bagian pulpa, tetapi paling banyak pada zona kaya sel dan inti pulpa. Sel induk bersifat pluripoten, yaitu memiliki kapasitas untuk berdiferensiasi menjadi bermacam-macam jenis sel sesuai dengan kebutuhan yang timbul. Sel ini merupakan sel yang pertama kali membelah ketika terjadi cedera. Sel tersebut dapat menjadi fibroblas maupun odontoblas. Selama peradangan sel-sel tersebut dapat berdiferensiasi menjadi makrofag atau sel resopsi (dentinoklas). Sel-sel induk pada dewasa lebih terbatas dan biasanya spesifik terhadap jaringan, dalam arti sel-sel tersebut hanya dapat berdiferensiasi menjadi jenis sel yang ditemukan di jaringan dari mana sel induk tersebut berasal.^(30, 46, 49, 51, 52)

Pulpa yang cedera mempunyai potensi terbatas untuk *self-recovery*. Apabila rangsang yang terjadi ringan atau berjalan lambat, seperti pada kasus atrisi, erosi atau fraktur superfisial, odontoblas umumnya dapat bertahan dan terus menghasilkan batas dentin di bawah daerah cedera, serta membiarkan jaringan pulpa lunak di bawahnya untuk tetap berfungsi sebagaimana mestinya. Strategi penting pada situasi seperti ini adalah untuk melindungi odontoblas yang masih ada. Pada saat rangsang kuat dan atau berjalan cepat, seperti karies yang dalam, abrasi berat serta fraktur, maka odontoblas primer akan rusak.^(46, 47, 49)

Pada kasus seperti tersebut di atas, odontoblas akan kehilangan kemampuannya untuk berproliferasi menggantikan odontoblas yang cedera, atau untuk menghasilkan dentin baru. Pada keadaan yang terpaksa sel-sel mesenkhim yang belum berdiferensiasi di dalam pulpa dapat berdiferensiasi menjadi odontoblas dan menghasilkan dentin reparatif. Keadaan ini sesuai dengan gambaran sel punca mesenkhim dalam pulpa yang memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi jenis sel lainnya, termasuk fibroblas untuk memperbaiki jaringan pulpa yang rusak. Kemampuan untuk merangsang sel punca berdiferensiasi menjadi sel mirip odontoblas lebih baik dibandingkan fibroblas dan hal ini penting dalam proses perbaikan dentin.^(46, 47)

Sel-sel yang terkandung dalam pulpa gigi diantaranya adalah odontoblas, preodontoblas (sel punca), fibroblas dan sel-sel sistem imun. Pada proses penjaralan penyakit, seperti karies gigi dapat merusak sel odontoblas, namun pada kondisi yang menguntungkan, sel-sel ini dapat digantikan dengan odontoblas yang

baru yang telah terdiferensiasi dari sel punca. Sedangkan preodontoblas ini baru berdiferensiasi menjadi odontoblas setelah terjadi kerusakan yang mengakibatkan kematian sel odontoblas yang ada. Fibroblas merupakan jenis sel yang paling banyak ditemukan pada pulpa dan terbanyak terdapat di bagian koronal pulpa. Sel ini memproduksi dan memelihara kolagen dan substansi dasar pulpa dan mengubah struktur pulpa yang sakit. Sel imun yang paling menonjol adalah sel dendritik. Sel ini merupakan *antigen-presenting cell* yang pada umumnya muncul pada lapisan odontoblas dan sekitar pembuluh darah, berfungsi pada respon imun.⁽⁵³⁾

Peran sel lir-odontoblas dan sel lir-osteoblas yang berasal dari sel induk pulpa pada proses dentinogenesis reparatif.

Pada sejumlah penelitian (Gronthos dkk, 2000-2002-2003; Miura dkk, 2003; Ohsima dkk, 2001; Hosya dkk, 2003; dan Zhao dkk, 2007 dalam Okiji dan Yoshida, 2009) pembentukan jaringan keras berupa dentin dan jaringan menyerupai tulang terjadi pada kavitas pulpa setelah replantasi dan transplantasi gigi. Hal ini menunjukkan bahwa pulpa gigi mengandung dua jenis sel induk yang mampu berdiferensiasi menjadi sel lir-odontoblas maupun sel lir-osteoblas. Kedua jenis sel ini dapat terlibat dalam proses dentinogenesis reparatif. Tampaknya lapisan superfisial dan fibrodentin pada matriks jembatan dentin memiliki karakteristik osteogenik.⁽⁵⁴⁾

Eni-Juliana dkk (2009) juga menyatakan bahwa sel lir-osteoblas mensekresi matriks tulang secara langsung pada jaringan pulpa.² Sel lir-odontoblas diketahui mensekresi dentin sialofosfoprotein (DSPP), *β -defensin*, *transforming growth factor (TGF)- β* , interleukin (IL-8), kolagen tipe I, dan proteoglikan; sedangkan sel lir-osteoblas mensekresi alkalik fosfatase, osteonektin, osteopontin, osteonidgen, dan osteokalsin. Ekspresi fenotip kedua sel tersebut dikode oleh gen yang berbeda pada kromosom yang berlainan.^{(55) (56)} Dengan menggunakan pendekatan biomolekuler untuk mendeteksi RNA yang mengekspresikan dua marker gen ini, Eni-Juliana dkk dalam penelitiannya mendapatkan bahwa kedua jenis sel tersebut di atas memang terdapat pada jaringan pulpa manusia.⁽⁵⁵⁾

Walaupun pencetus diferensiasi kedua sel ini sama, yaitu *bone morphogenic protein* (BMP-2) yang merupakan suatu sitokin multifungsional, kedua jenis sel tersebut berasal dari galur sel induk yang berbeda. Galur odontoblas yaitu MDPC23, sedangkan galur osteoblas yaitu MC3T3-E1.^(54, 57) Dengan demikian, diketahui bahwa sel lir-odontoblas dan sel lir-osteoblas berasal dari sel induk yang berbeda. Hal ini sesuai dengan pemahaman bahwa pada manusia, sel induk pulpa memiliki populasi heterogenus. Sel lir-osteoblas memiliki morfologi yang berbeda dari sel lir-odontoblas. Sel lir-osteoblas merupakan sel bulat dengan sitoplasma yang kaya dengan organel, sedangkan sel lir-odontoblas lebih cenderung berbentuk kuboid atau kolumnar. (Tabel 2.1) ⁽⁵⁵⁾

Penelitian Inoue dkk (2004) yang meneliti pola proliferasi antara sel lir-odontoblas dengan sel lir-osteoblas memperoleh hasil bahwa pola proliferasi kedua jenis sel ini berbeda. Dapat disimpulkan bahwa morfologi, fusi, dan proliferasi sel berbeda, bergantung pada jenis sel, dan pada permukaan biomaterial yang menjadi tempat melekat sel tersebut, apakah hidroksi apatit murni atau fluoro-apatit.⁽⁵⁷⁾

Hal yang bertentangan dikemukakan oleh Paola dkk, dalam Simposium Internasional Maksilofasial dan Biologi Regeneratif Oral di Okayama, 2005, mengemukakan bahwa MDPC23, yang merupakan sel lir-odontoblas memiliki kemampuan yang rendah dalam menginduksi pembentukan dentin karena hanya mengekspresikan dentin sialofosfoprotein (DSPP) secara eksklusif yang memiliki kapasitas yang rendah dalam menginduksi matriks dentin termineralisasi.⁽⁵⁷⁾ Walaupun pernyataan ini bertentangan dengan sejumlah penelitian, hal ini mungkin mengindikasikan bahwa pembentukan dentin reparatif pada proses dentinogenesis reparatif lebih banyak terjadi akibat peranan sel lir-osteoblas sehingga dentin reparatif yang terbentuk lebih cenderung memiliki karakteristik osteogenik, yaitu lebih padat dan tidak memiliki tubulus dentin.

Tabel 2.1 Perbedaan sel lir-odontoblast dan sel lir-osteoblas

Perbedaan	Sel lir-odontoblas	Sel lir-osteoblas
Morfologi	Kuboid, kolumnar	Bulat
Galur sel induk	MDPC23	MC3T3-E1
Produk sekresi (fenotip) dan gen pengkodennya.	<ul style="list-style-type: none"> - Utama: Dentin sialofosfoprotein (DSPP), yang selanjutnya terbagi menjadi dentin fosfoprotein (DPP) dan dentin sialoprotein (DSP). Lokasi gen pengode terletak pada kromosom 4q21. - <i>β-defensin</i>, - <i>transforming growth factor</i> (TGF)-β, - interleukin (IL-8), - kolagen tipe I, dan - proteoglikan 	<ul style="list-style-type: none"> - Utama: osteokalsin (OCN), gen pengode terletak pada kromosom 1 (1q25-q31) dan diregulasi oleh 1,25-dihidroksi vit D. - alkalik fosfatase (ALP), - osteonektin (ON), - osteopontin, - osteonidgen
Pola proliferasi dan fusi sel	Berbeda (tidak ditemukan penjelasan lebih lanjut)	Berbeda (tidak ditemukan penjelasan lebih lanjut)
Hasil dentin reparatif	Memiliki karakteristik dentin	Memiliki karakteristik menyerupai tulang

Keterangan: Pola proliferasi antara sel lir-odontoblas dengan sel lir-osteoblas menunjukkan hasil bahwa pola proliferasi kedua jenis sel ini berbeda.⁵¹

2.2 Pulpitis

Pulpitis adalah radang pada jaringan pulpa gigi, yang dapat bersifat akut, kronik, dan kronik eksaserbasi akut, bergantung pada proses patogenesis dan etiologinya. Akhir-akhir ini akibat perawatan dan pemakaian bahan-bahan kedokteran gigi juga merupakan faktor penyebab yang perlu diteliti lebih jauh di samping penyebab lainnya seperti trauma dan lain-lain. Letak jaringan pulpa yang terlindung oleh email dan dentin yang kuat dan keras, merupakan suatu keuntungan bagi jaringan pulpa dalam mempertahankan diri terhadap rangsang.^(1, 4, 6, 53)

Namun jaringan keras tersebut bersifat permeabel sehingga mudah dipengaruhi oleh faktor-faktor luar, seperti suhu, tekanan, zat kimia, dan lain-lainnya. Gejala radang jaringan pulpa secara klinis sangat sukar dibedakan, karena rasa nyeri digunakan sebagai tolok ukur dalam menentukan diagnosis penyakit. Banyak peneliti mencoba mengklasifikasikan penyakit pulpa ini dengan menghubungkannya dengan jenis perawatan endodontik, yaitu apakah jaringan pulpa masih dapat dipertahankan, dirawat atau dikeluarkan.^(4, 6, 53, 58)

Diagnosis tersebut sukar dan sering kurang sesuai dengan keadaan penyakit sebenarnya karena letak jaringan pulpa terlindung oleh jaringan keras gigi, yaitu email dan dentin. Respon jaringan dentin yang diterima jaringan pulpa juga berbeda pula. Keadaan klinik dan mikroskopik penyakit pulpa ternyata sering tidak sesuai, karena diagnosis ditegakkan hanya berdasarkan gejala klinik dan gambar radiografik, sehingga bila diagnosis tersebut digunakan sebagai pedoman untuk memilih jenis perawatan, maka akibatnya hal tersebut sering kurang sesuai. Walaupun tidak akurat, rasa nyeri masih dipakai sebagai indikator dalam menentukan diagnosis penyakit pulpa.^(53, 59)

Di samping rasa nyeri, tolok ukur lain dalam menentukan diagnosis penyakit pulpa secara klinik ialah faktor penyebab terbukanya jaringan pulpa, atau penyebab keluhan pulpa. Pulpa dapat terbuka oleh karena proses karies atau trauma. Keluhan rasa nyeri dapat disebabkan oleh rangsang termis, elektrik, dan kimia. Riwayat rasa nyeri yaitu jenis, letak, proses terjadinya, frekuensi serta kualitasnya digunakan untuk menentukan diagnosis penyakit pulpa, namun hasil rekaman tersebut belum dapat memastikan keadaan jaringan sebenarnya.

Hasil rekaman rasa nyeri, gambaran radiografik serta keadaan klinik diharapkan dapat menentukan diagnosis penyakit pulpa yang lebih akurat, yaitu pulpitis atau nekrosis. Selanjutnya pada proses penyakit dapat dilihat apakah dalam keadaan dini atau lanjut, sehingga dapat dikelompokkan dalam stadium I dan II.^(4, 6, 53, 58)

Keadaan jaringan pulpa yang sebenarnya hanya dapat dilihat dengan pemeriksaan mikroskopik. Jaringan pulpa sudah menunjukkan reaksi sejak lapisan email terbuka oleh cedera, mekanik, termik, kimia atau bakteri. Reaksi tersebut berupa terdapatnya limfosit di jaringan pulpa, dan mulai terlihatnya lapisan odontoblas yang cedera.. Bila intensitas rangsang lebih besar, maka dapat timbul cedera pada jaringan pulpa yang lebih luas dan dalam. Rangsang tersebut akan mengubah sistem mikrosirkulasi dalam jaringan pulpa, sehingga terjadi hambatan aliran darah dan metabolisme dalam jaringan. Mula-mula terjadi vasodilatasi sistem mikrovaskularisasi yang menyebabkan sirkulasi darah menjadi statis . Di dalam arteri terjadi mobilisasi leukosit, sel-sel polimorfonukleus (PMN) mengadakan marginasi yang dilanjutkan dengan emigrasi ke jaringan sekitarnya.

Hal ini mengakibatkan pengumpulan eksudat di jaringan untuk proses fagositosis, keadaan ini disebut pulpitis akut.^(47, 60)

Apabila proses berlanjut menjadi khronik, maka tanda-tanda mikroskopik berupa penyebaran sel-sel radang khronik seperti limfosit, sel plasma, histiosit yang aktif, dan makrofag yang menyebabkan fibrosis serta perkapuran. Ulkus terbentuk pada tempat pulpa yang terbuka. Pada pulpitis supurativa secara mikroskopik tampak mikro abses, yang kemudian mengalami kapsulasi dan menjadi abses ganda (multiple) dengan nekrosis yang mengalami lisis. Pulpitis supurativa dapat berkembang menjadi nekrobiosis akut, apabila seluruh jaringan pulpa hancur karena radang akibat infeksi sekunder. Nekrobiosis kronik ditandai oleh infiltrasi sel plasma yang menyeluruh sehingga terjadi nekrosis cair yang mengandung vakuol.^(1, 60)

Baum (2006) mengklasifikasikan radang pulpa secara histopatologik ke dalam pulpitis ringan, pulpitis akut, pulpitis khronik, pulpitis supurativa, nekrobiosis akut, dan nekrobiosis kronik. Sementara itu Seltzer dan Bender, mengklasifikasikan keadaan pulpa berdasarkan pemeriksaan histologik sebagai berikut diantaranya adalah pulpa sehat, pulpa atrofik (pulposis), pulpitis akut, pulpa utuh dengan sel radang khronik (tahap transisi), pulpitis khronik dengan nekrosis cair sebagian, dengan nekrosis padat sebagian, pulpitis khronik total, nekrosis pulpa total.^(1, 6, 61, 62)

Penyebab penyakit pulpa terbanyak adalah mikroorganisme atau hasil metabolismenya yang masuk ke dalam ruang pulpa melalui dentin yang terbuka akibat karies atau kecelakaan, penyebaran infeksi gingiva, atau oleh terbawa aliran darah. Peran mikroorganisme terhadap pulpa telah diselidiki oleh beberapa peneliti dan ternyata pada pulpa yang dibuka secara mekanik, penyembuhan jaringan bergantung pada ada tidaknya mikroorganisme tersebut.^(53, 62, 63)

Terjadinya penyakit pulpa oleh mikroorganisme, selain oleh jenis yang banyak terdapat, juga oleh faktor lain seperti jalan masuk, virulensi, resistensi jaringan, serta reaksi imunologik. Mikroorganisme dapat masuk ke dalam jaringan pulpa melalui tiga jalan yaitu dentin, periodontal dan darah. Ketiga jalan tersebut dilalui mikroorganisme melalui beberapa proses diantaranya ialah karies, mekanis

(preparasi kavitas, trauma), penyakit periodontal atau akibat manipulasi penyakit periodontal, penyakit periapiks gigi yang berdekatan, serta anachoresis.^{50, 55, 56}

Reaksi jaringan terhadap mikroorganisme atau hasil metabolismenya dapat menguntungkan atau merugikan. Hal ini karena zat yang dihasilkan selama proses radang justru lebih merugikan dibandingkan dengan mikroorganismenya sendiri, misalnya enzim lisosim, *acidic polysaccharides* dan *nucleic acid*, zat yang dilepaskan oleh reaksi hipersensitif (histamine, limfotoksin), kolagenase, fibrinolisis, macam-macam enzim proteolitik, hasil metabolisme (indol, amonia)^{50, 55, 56}

Namun ada beberapa faktor yang menguntungkan pada reaksi jaringan diantaranya adalah faktor serum, yaitu polypeptides dan protein yang aktif terhadap mikroba Gram+, antibodi dan komplemen yang aktif terhadap mikroba Gram+ dan Gram-, serta keasaman pH yang terjadi selama radang yang dapat menghancurkan mikroba. Faktor lainnya adalah proses fagositosis yang dapat merusak dan menelan mikroba pada tingkat permulaan yang didominasi oleh sel-sel PMN dan pada tingkat akhir oleh sel makrofag. Berikutnya adalah faktor lekositik, termasuk enzim perusak seperti leukin, lisosim, phagositin, yang berasal dari lisosim yang menghancurkan mikroba dan sistem myeloperoxidase-Cl-H₂O₂ yang menghancurkan mikroba secara oksidasi dan lisosim. Terakhir adalah faktor zat antimikoba dalam saliva misalnya sistem myeloperoksidase Cl-H₂O₂, lisosim, komplemen.^{50, 53, 57}

Reaksi imunologik dapat terjadi pada interaksi antar mikroba, antigen benda asing dan jaringan. Reaksi imunologik tersebut dapat menguntungkan, merugikan, atau campuran keduanya. Apabila reaksi bersifat melindungi maka dengan mengikutsertakan interaksi antigen dengan antibodi dan komplemen terjadi fagositosis mikroba dan toksin serta hasil metabolismenya. Pada kasus ini jaringan yang mengalami kerusakan hanya sedikit sekali. Pada radang pulpa karena karies, sel makrofag, limfosit, dan sel plasma membentuk imunoglobulin ekstrasvaskular yang didominasi oleh IgG, dan sel plasma membentuk kelompok IgG, dan kadang-kadang IgA, IgE, dan IgM.⁽⁶⁰⁻⁶³⁾

Oleh karena pulpa terlindung ketat oleh dentin, maka pada proses radang eksudat yang dihasilkan sukar memperoleh tempat, dan cepat menyebar ke apikal.

Akibatnya terjadi kelainan periapiks seperti abses, granuloma, dan kista. Hal ini dapat dipergunakan untuk menjelaskan bahwa apabila proses karies berlanjut maka terjadi kematian pulpa dan kelainan periapiks, sehingga reaksi imunologik jaringan kurang menguntungkan. Sebagai penyebab ialah faktor tertekannya eksudat dalam ruang pulpa yang ketat dan keras.^(53, 64)

Namun reaksi imun dapat terjadi bila kerusakan pulpa terhambat secara cepat pada karies yang lambat, karies yang berhenti dan pulpitis khronik. Jaringan gagal menimbulkan reaksi imun dalam pulpa akan tetapi reaksi imun tersebut dapat terjadi di daerah periapiks yaitu berupa abses periapikal, granuloma dan kista. Jaringan pulpa dan periapiks mempunyai komponen selular yang penting untuk menimbulkan reaksi imunologik, reaksi hipersensitivitas dalam tiga jenis yaitu kompleks imun, *cell mediated* serta *anaphylactic*^(53, 62)

2.3 Konsep Penyembuhan Jaringan Yang Luka

Sifat yang paling penting dari makhluk hidup adalah kapasitasnya untuk memperbaiki diri sendiri. Pada manusia proses regenerasi jaringan setiap organ mempunyai kemampuan yang terbatas, di samping itu pengaruh sifat (jenis) organ serta keadaan sistemik juga berperan dalam proses regenerasi sel jaringan. Proses pemulihan atau penyembuhan radang sudah terjadi sejak jaringan terkena cedera. Seperti halnya dengan proses pada jaringan umumnya, pemulihan jaringan dan radang berjalan beriringan. Cedera/trauma dapat didefinisikan sebagai gangguan dalam kesinambungan jaringan dan perbaikannya melalui pembentukan kembali kesinambungan tersebut. Hal ini terutama dapat dicapai melalui proliferasi, migrasi, dan differensiasi dari sel-sel yang terlibat di dalamnya.^(1, 64)

Inflamasi merupakan reaksi jaringan yang kompleks terhadap cedera atau antigen, yang terdiri dari peningkatan vasodilatasi dan permeabilitas vaskular dengan ekstrasvasasi cairan serta emigrasi dari leukosit dari sirkulasi darah ke jaringan dimana mereka akan berproliferasi dan di aktifkan untuk mengatur proses penyembuhan dan perbaikan. Reaksi inflamasi berfungsi untuk menurunkan, menghilangkan atau mengasingkan jaringan yang cedera atau patogen dengan memobilisasi leukosit untuk melindungi host dari cedera.^(65, 66)

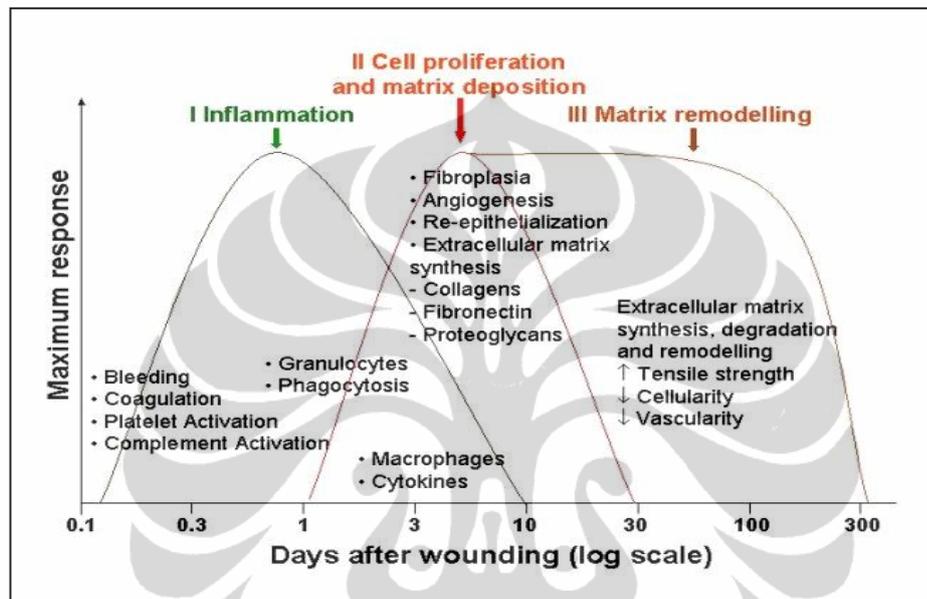
Tahap inflamasi terjadi pada hari ke 0-5 penyembuhan luka kulit, dan bekuan darah yang segera terbentuk berfungsi sebagai hemostatis serta membentuk provisional matriks ekstra seluler untuk migrasi sel-sel radang. Sel platelet tidak hanya berfungsi membentuk bekuan, tetapi juga menghasilkan beberapa mediator seperti PDGF-AB, BB, yang berfungsi menarik serta mengaktivasi makrofag dan fibroblas. ^(65, 67)

Melekatnya epitel yang terluka pada matriks kulit akan memicu makrofag mengekspresikan colony stimulating factor -1 (CSF-1), berfungsi mengaktifkan makrofag. Semua faktor pertumbuhan yang diekspresikan oleh monosit dan makrofag sangat penting untuk menginisiasi pembentukan jaringan baru, beberapa penelitian melaporkan, adanya defisiensi makrofag pada hewan coba berakibat terjadi gangguan pada penutupan luka. Selain itu makrofag berfungsi aktif sebagai transisi antara proses inflamasi dan penutupan luka yang baru. ^(65, 66)

Tahap proliferasi yang berlangsung pada hari ke 3 – 14, terjadi berbagai proses penyembuhan kulit yang tumpang tindih seperti angiogenesis, epitelisasi, pembentukan jaringan granulasi serta kontraksi dan fibroplasia. Pada angiogenesis makrofag sangat berperan pada tahap inflamasi. *Macrophage derived growth factor* (MDGF) mengaktifkan sel endotel pada sisi luka serta menstimulasi proliferasi untuk proses angiogenesis. ^(66, 67)

Tahap pembentukan granulasi terjadi pada hari ke 3 – 21. Sel yang aktif pada tahap ini adalah makrofag, fibroblast, sel endotel dan terjadi neo vaskularisasi dari pembuluh darah kecil menuju daerah yang terluka seperti gambaran granulasi. Makrofag tetap menghasilkan faktor pertumbuhan, berfungsi memicu fibroplasia (meningkatkan aktivitas dan proliferasi fibroblast) ^(68, 69) Sedangkan tahap *remodelling* penyembuhan luka kulit dimulai pada hari ke 7 sampai lebih dari 1 tahun, pada tahap ini dibentuk kembali jaringan matriks ekstra sel di daerah yang terluka, reorganisasi pembentukan skar dimulai. *Remodeling* serabut kolagen bergantung pada sintesis dan katabolisme kolagen. Degradasi kolagen diatur oleh berbagai macam enzim proteolitik matriks metallo proteinase, yang disekresi oleh makrofag pada tahap inflamasi, sel endotel pada tahap proliferasi dan sel fibroblast pada tahap *remodeling*. ⁽⁷⁰⁾ Sintesis kolagen untuk pembentukan jaringan kulit sebelum terluka berlangsung dalam waktu 6 – 12

bulan, sedangkan proses aktif *remodeling* pembentukan skar yang baru, berjalan sangat lambat dapat mencapai lebih dari 2 tahun, kekuatan scar pasca luka kulit mencapai 70% dibandingkan kulit normal.^(66, 70, 71) Pada gambar 2.2 terlihat tahap penyembuhan kulit yang berlangsung tumpang tindih dengan berbagai macam aktifitas sel, faktor pertumbuhan dan sitokin.



Gambar 2.2. : Tahap Penyembuhan Kulit yang berlangsung tumpang tindih dengan berbagai macam aktifitas sel , factor pertumbuhan dan sitokin.⁽⁷¹⁾

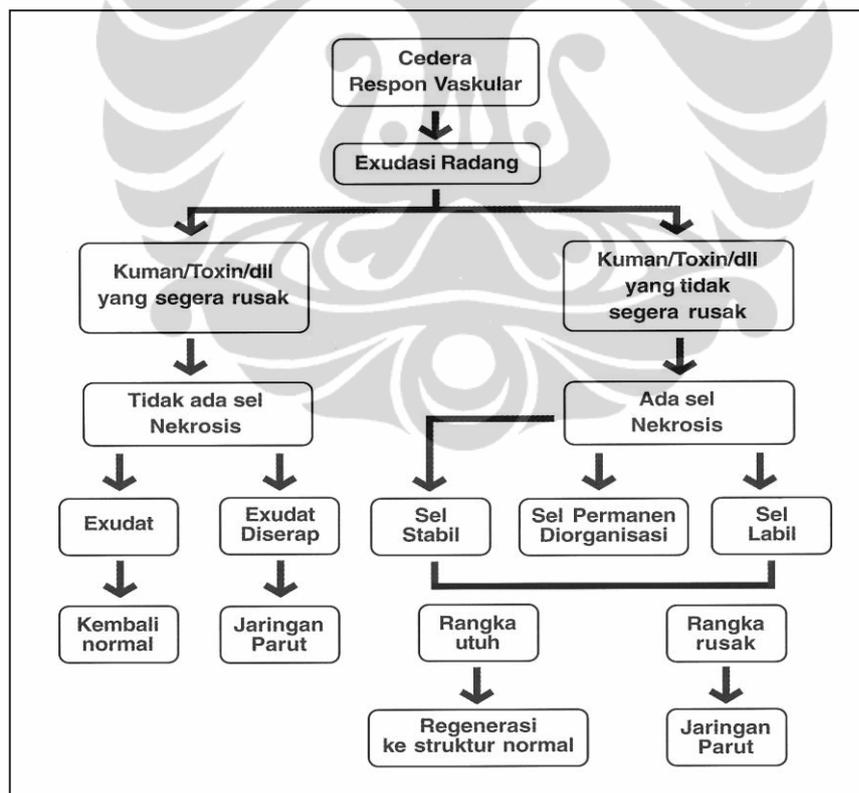
2.3.1 Penyembuhan Perawatan Pulpa Vital

Beberapa faktor yang mempengaruhi rencana perawatan gigi dengan pulpa terbuka (pulpitis). Faktor yang utama adalah mengetahui derajat infeksi dan radang terhadap pada jaringan pulpa. Mikroba dapat menyebar diruang pulpa melalui distribusi produk radang (abses/nekrosis). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa pulpa yang berdekatan dengan lesi karies baik sebelum maupun sesudah pembukaan pulpa, komponen mikroba dapat menyebabkan perubahan lokal yang bersifat ireversibel, abses atau nekrosis tepat dibawah daerah yang terbuka. Pada daerah sisa jaringan pulpa dalam saluran akar bebas dari perubahan radang atau infiltrat dengan sel-sel radang.(Gambar 2.3)^(7, 19)

Pulpa yang terinfeksi umumnya mengalami proses degeneratif dari koronal ke apikal. Pada saat infeksi dan radang pulpa terbatas hanya di daerah koronal, sisa jaringan pulpa sehat yang tidak terinfeksi berada di daerah yang

lebih dalam pada sistem saluran akar. Secara teori pengangkatan jaringan yang terinfeksi dapat mempertahankan sisa jaringan pulpa vital yang sehat berfungsi dengan baik. Setelah ditunjukkan bahwa pada pulpa yang mengalami radang berat sekalipun, dapat sembuh asalkan agen yang menyebabkan terjadinya radang itu diangkat. Penting artinya untuk menentukan tingkat/derajat dan perluasan pulpitis yang ada.^(4, 46)

Pada kasus-kasus trauma dilaporkan bahwa waktu antara terjadinya jejas dan perawatan tidak berpengaruh banyak pada hasil perawatan pulpotomi sebagian. Perawatan yang benar pada jaringan pulpa serta seleksi kasus yang tepat merupakan kunci utama hasil akhir dari perawatan. Pulpotomi sebagian bila dibandingkan dengan kaping pulpa direk atau pulpotomi total, merupakan pilihan perawatan pada kasus terbuka karena traumatik/karies pada gigi permanen yang daerah apikalnya belum menutup sempurna.⁽⁷²⁾



Gambar 2.3. Skema proses penyembuhan jaringan pulpa terhadap cedera respon vaskular⁽⁷³⁾

Penelitian pada hewan coba telah menunjukkan bahwa ukuran dari terbukanya pulpa tidak berpengaruh besar terhadap pilihan perawatan yang akan dilakukan, dibandingkan dengan status/kondisi pulpa dan tingkat kontaminasi bakteri didalamnya. Salah satu keuntungan pulpotomi sebagian dibandingkan dengan pulpotomi total adalah dipertahankannya zona kaya sel didaerah korona pulpa. Jaringan memiliki kemampuan penyembuhan yang lebih baik serta dapat mempertahankan deposisi fisiologis dari dentin di daerah servikal.^(18, 72)

Bertambahnya usia pasien mempunyai dampak negatif dapat mempengaruhi keberhasilan klinik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada pasien usia tua, jaringan pulpa lebih fibrous sehingga kemampuan mengatasi rangsang dari luar dapat berkurang. *Bioengineered medicaments* dapat bermanfaat untuk menginduksi terbentuknya dentin reparatif, sehingga mengurangi faktor negatif karena usia. Recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1) dapat menginduksi pembentukan dentin reparatif lebih besar dibandingkan pasta kalsium hidroksida pada gigi permanen monyet.^(21, 74)

2.3.2 Proses Pembentukan Jembatan Dentin

Jembatan dentin adalah lapisan pertahanan yang dibentuk pada perawatan pulpotomi. Pada penyembuhan pulpotomi diharapkan terjadi regenerasi jaringan pulpa yang ditinggalkan di dalam saluran akar. Regenerasi ini akan terjadi apabila jaringan ikat di bawah obat pulpotomi dapat merangsang pembentukan jaringan baru, baik jaringan ikat normal maupun jaringan parut⁽⁵³⁾ Proses regenerasi ini tidak berbeda dengan regenerasi jaringan ikat lain, yang terjadi di bawah kulit. Setelah pembuangan jaringan yang terinfeksi dari kamar pulpa, maka pada permukaan jaringan pulpa saluran akar yang luka terjadi pembentukan fibrin dari fibrinogen yang keluar dari pembuluh darah.^(18, 43)

Kemudian mulai terjadi pembentukan kapiler baru oleh angioblas. Proses ini mempengaruhi proliferasi fibroblas dan disebut organisasi. Selanjutnya fibroblas menghasilkan matriks protein yang disebut kolagen. Pembentukan fibroblas disebut fibroplasia. Apabila fibroplasia berlebihan maka akan terjadi jaringan parut.^(47, 53)

Proses penyembuhan ini tidak semudah yang diperkirakan. Masalahnya adalah jaringan pulpa yang terdiri dari berbagai sel dan komponen, terletak di dalam ruangan yang kaku, sehingga proses aliran darah atau cairan limfe tidak dapat bebas. Di samping itu sifat sel jaringan pulpa tidak termasuk sel labil, sehingga daya sembuhnya dipengaruhi oleh kemampuan sel untuk memperbanyak diri. Penyembuhan jaringan pulpa diantaranya ditentukan oleh saraf pulpa, selain oleh faktor luar seperti tahap preparasi, pengobatan dan penutupan.^(61, 75)

Pada manusia proses regenerasi jaringan setiap organ mempunyai kemampuan yang terbatas. Di samping itu sifat (jenis) organ serta keadaan sistemik juga berperan dalam proses regenerasi sel jaringan. Misalnya pada organ hati mempunyai kemampuan regenerasi jaringannya, berupa sel jaringan ikat. Jaringan pulpa yang terdiri dari sel-sel odontoblast, fibroblast, sel mesenchymal, histiosit dan sistem pembuluh (darah limfe) serta serabut saraf mempunyai kemampuan regenerasi yang berbeda pula. Demikian pula jaringan periapikal berbeda dari jaringan pulpa. Pengaruh proses penyembuhan bergantung dari tiga faktor diantaranya adalah, faktor yang mendorong terjadinya epitelisasi luka, fibroplasia dan vaskularisasi jaringan serta stimulasi proliferasi sel-sel jaringan.^(1, 61)

Ketiga faktor tersebut berlaku pula pada penyembuhan jaringan pulpa dan jaringan periapiks, namun sifatnya agak berbeda. Istilah epitelisasi pada jaringan pulpa dan jaringan periapiks dibedakan dalam jenis jaringannya. Pada jaringan pulpa maka epitelisasi oleh lapisan odontoblast sedangkan pada jaringan periapiks membran periodontal yang mengandung sisa epitel Hertwig.^(1, 7, 75)

Walaupun regenerasi dan revaskularisasi bukan merupakan hal yang mendasar, mengingat fakta bahwa keadaan gigi tanpa pulpa dapat bertahan untuk waktu yang lama setelah keberhasilan perawatan endodontik, mempertahankan vitalitas pulpa tetap memberikan banyak keuntungan. Bergantung pada keadaan apakah masih tersisa jaringan pulpa yang masih vital atau tidak, maka pada prinsipnya terdapat dua pendekatan untuk regenerasi dan revaskularisasi pulpa gigi, baik itu berupa perawatan pulpa vital atau regenerasi seluruh jaringan pulpa.⁽⁷⁶⁾

Terdapat dua regenerasi pulpa yang dapat dipertimbangkan berdasarkan keadaan klinik, yaitu regenerasi pulpa sebagian dan sintesis pulpa *de novo*. Telah diketahui bahwa infeksi jaringan pulpa terjadi secara bertahap sampai seluruhnya mengalami nekrosis. Sebelum nekrosis pulpa terjadi seluruhnya, sisa jaringan pulpa dapat pulih kembali setelah disinfeksi dan membantu meregenerasi bagian yang hilang. Untuk meningkatkan proses regenerasi, rekayasa jaringan dapat dimasukkan ke dalam ruang pulpa untuk memfasilitasi penyembuhan jaringan pulpa seluruhnya dan pembentukan dentin baru. Pada saat seluruh jaringan pulpa hilang, maka sintesis *de novo* dari pulpa harus dilakukan untuk meregenerasi jaringan. Untuk meregenerasi jaringan, bekuan darah digunakan sebagai sumber yang kaya akan *growth factors* di dalam mendukung perbaikan jaringan. Membuat perdarahan baru untuk mengisi daerah bedah merupakan hal rutin pada beberapa prosedur bedah. ^(7, 8)

Pada endodontik, ide ini telah digunakan oleh Ostby (1960) untuk menentukan apakah pengisian ruang pulpa dengan bekuan darah dapat mengarah pada regenerasi jaringan pulpa. Pada tahun 1970, penelitian yang sama dilakukan oleh kelompok lain dan pembentukan jaringan lunak dipelajari. rata-rata pertumbuhan jaringan dalam saluran akar hanya mencapai sekitar 0.1-1.0mm ^(77, 78)

Konsep modern dari rekayasa jaringan terjadi pada akhir tahun 1980 dan salah satu komponen kunci dari konsep modern ini adalah penggunaan material sintetis yang bersifat *biodegradable* sebagai *scaffold* untuk memegang sel jaringan ditumbuhkan secara *ex vivo*. *Scaffold* menyediakan lingkungan 3D untuk sel dapat tumbuh dan berkembang, sehingga menyerupai kondisi *in vivo*. ⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾

Sebagai tambahan, material sintetis ini dapat difabrikasi sehingga dapat membangun bentuk seperti apapun serta membawa *growth factors* untuk memandu proses diferensiasi sel serta pembentukan jaringan. Umumnya, teknik rekayasa jaringan melibatkan pembentukan jaringan atau organ secara *in vitro* untuk proses implantasi selanjutnya. Tujuan dari perawatan pulpa vital adalah untuk mempertahankan vitalitas pulpa gigi, serta untuk merangsang sisa jaringan pulpa untuk regenerasi kompleks pulpa-gigi. Terdapat dua strategi utama untuk mencapai keberhasilan perawatan pulpa vital, yaitu untuk mengurangi kerusakan lanjut dari odontoblast primer dan menginduksi diferensiasi odontoblast baru.

Keberhasilan dari perawatan pulpa vital memerlukan penutupan yang baik terhadap bakteri, tidak adanya reaksi radang dan hemodinamika yang stabil dalam jaringan pulpa.⁽⁷⁶⁾

Bahan restorasi inorganik tersebut tidak dapat mempengaruhi diferensiasi sel. Karena itulah pemberian *growth factor* dan atau penggunaan *growth factor* yang ditanamkan dalam bahan restorasi merupakan komplemen yang baik untuk kaping pulpa vital. Dentinogenesis merupakan peristiwa ekstraseluler yang dikontrol oleh sel-sel odontoblas, sel-sel postmitotik yang membentuk suatu lapisan tunggal menutupi kavitas pulpa. Oleh sebab itu sel-sel odontoblas berperan untuk mengeluarkan sekresi protein-protein ekstraseluler dan proeoglycan yang membentuk tonjol odontoblas sampai matriks ekstraseluler tersusun. Mekanisme dentinogenesis masih banyak diperdebatkan, dalam beberapa laporan dibahas bahwa proses dentinogenesis memberikan gambaran yang unik. Bergantung dari bahan yang dipakai untuk memacu proses tersebut, terlihat bahwa mekanisme juga akan berbeda, dalam hal ini sel-sel odontoblas sangat memegang peranan penting dalam proses dentinogenesis.^(76, 82)

Dentinogenesis merupakan suatu proses yang memerlukan peningkatan *collagenous extracellular matrix* (ECM), melalui proses mineralisasi. Sel-sel pulpa gigi dapat berperan dalam proses ini, dan protein dentin ECM secara aktif meningkatkan dan mengontrol mineralisasi dari serat kolagen dan pertumbuhan kristal apatit selama perubahan predentin menjadi dentin. Satu protein ECM adalah Dentin Sialophosphoprotein (DSPP), yang mengalami pembagian menjadi DPP (Dentin phosphoprotein) dan DSP (Dentin Sialoprotein), yang berhubungan dengan mineralisasi dentin dan diekspresikan oleh sel lir-odontoblas di bawah dentin reparatif yang baru terbentuk.^(76, 83)

Penelitian-penelitian klinis dan eksperimental telah menunjukkan bahwa sel-sel pulpa gigi yang telah terbentuk sempurna menunjukkan kemampuan untuk mengadakan diferensiasi dengan *cell lineage* spesifik membentuk dentin tubular pada kondisi-kondisi tertentu. Fenomena ini merupakan gambaran stereotipikal sebagai suatu mekanisme pertahanan, dalam perbaikan jaringan pulpa yang mengalami iritasi (Fitzgerald *et al*, 1990 *cit* Tziafas *et al*. 2002).⁽⁸³⁾ Kemampuan dentinogenik dari sel-sel ektomesenkimal gigi secara progresif diekspresikan

sebagai bagian dari proses healing pada gigi-gigi dewasa. Hal ini dapat ditandai bila dilakukan observasi pada pulpa yang terbuka tanpa pemberian bahan akan terlihat aktivitas odontogenik (Kakehashi et al 1969, Inoue dan Shimono, 1992).^(20, 84)

Sebagai bagian dari proses penyembuhan jaringan secara alamiah, matriks ekstraseluler di depositkan dimana pada mulanya tampak sebagai gambaran atubular atau osteotypic (fibrodentin) dan secara progresif menjadi satu baris yang disebut sebagai dentin reparative^(21, 85) Di sisi lain, aplikasi dari *signaling molekul-based delivery system*, pada pendekatan secara eksperimental akhir-akhir ini dengan cepat dapat menginduksi pembentukan jaringan keras (fibrodentin dan dentin reparatif) di luar bentuk mekanisme pertahanan yang *stereotypic*.⁽⁸⁶⁾

Dentin tersier merupakan perluasan respon, berkisar dari matriks regular, tubular yang sedikit berbeda dari dentin primer dan sekunder, sampai pengeluaran suatu matriks yang sedikit *dysplastic* dan kemungkinan menjadi atubular. Proses seluler dan molekuler yang memegang peranan dalam respon ini juga menunjukkan sejumlah perbedaan. Dentin tersier ini di subklasifikasikan baik sebagai dentin reaksioner atau reparatif, yang mempunyai perbedaan sekuens biologi, bergantung besarnya rangsang eksternal dalam memulai respon.^(17, 74, 82)

Dentin reaksioner merupakan matriks dentin tertier yang disekresikan oleh sel-sel odontoblast postmitotic yang hidup dalam responnya terhadap stimulus. Respon tersebut dapat berupa stimulus yang ringan dan menimbulkan kenaikan aktivitas sekresi sel-sel odontoblast yang berperan terhadap pembentukan dentin primer. Sebaliknya dentin reparatif merupakan matriks dentin tertier yang disekresikan oleh generasi baru dari sel-sel yang menyerupai odontoblast dalam respon terhadap rangsang setelah kematian dari odontoblast postmitotic yang original berperan dalam pembentukan dentin primer dan dentin sekunder secara fisiologis.⁽⁸²⁾

Perawatan pulpa vital bertujuan untuk memelihara vitalitas dan fungsi dari jaringan pulpa. Faktor yang berperan paling penting pada pemeliharaan vitalitas pulpa setelah perawatan kaping pulpa adalah pengembalian bentuk struktur jaringan normal pada amputasi daerah batas dentin-pulpa. Dentin primer merupakan matriks ekstraseluler yang paling sesuai terhadap rangsang eksternal

yang destruktif pada batas luar pulpa. Pada keadaan klinis, penyembuhan sempurna dari pulpa yang terbuka dengan pembentukan dentin (regenerasi dentin lengkap), secara normal tidak terjadi, disebabkan karena kerusakan total dari odontoblas primer.^(17, 74, 82, 86)

Regenerasi dentin yang tidak sempurna seringkali terjadi pada daerah yang terbuka pada saat generasi baru dari diferensiasi sel yang menyerupai odontoblas dan dentin reparatif terbentuk pada daerah batas bahan penutup pulpa. Perbaikan cedera pada daerah dentin-pulpa dengan induksi langsung dentin reparatif memberikan sifat fisik dan mekanik pada jaringan, dimana akan menentukan prognosis jangka panjang bagi pemeliharaan vitalitas dan fungsi pulpa.^(47, 74, 76, 86)

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel pulpa yang berhasil diisolasi dapat diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi sel lir-odontoblas dan menjadi struktur mineral mirip dentin secara *in vitro*. Bukti secara *in vivo* bahwa sel-sel pulpa mempunyai kapasitas membentuk dentin telah ditunjukkan oleh Gronthos *et al*, yang menunjukkan bahwa kompleks pulpa/dentin manusia dapat dibentuk secara ektopik dalam *immunocompromised* tikus. Penemuan ini memberikan titik terang pada kemungkinan regenerasi pulpa/dentin untuk aplikasi klinik.^(8, 47)

2.4 Bahan-Bahan Yang Digunakan Untuk Memicu Jaringan Keras

Bahan-bahan yang digunakan untuk menstimulasi pembentukan dentin reparatif yang merupakan matriks dentin tertier dapat dikategorikan sebagai material non-biologi dan material biologi, berdasarkan sifat dasar bahan-bahan terapeutik tersebut. Material non-biologi seperti kalsium hidroksida, cyanoacrylate, semen zinc-oxide dan fosfat telah lama dipakai dalam bidang kedokteran gigi. Kalsium hidroksida dalam perawatan pulpa dengan inflamasi reversible sampai saat ini banyak digunakan di klinik walau hasil-hasil penelitian telah mengungkapkan keuntungan dan kerugian pemakaian kalsium hidroksida.⁽⁸⁷⁾ Walaupun dikatakan kalsium hidroksida dapat memacu penyembuhan dan perbaikan jaringan, karena dengan pH tinggi dapat menstimulasi fibroblast, migrasi ke daerah yang terluka. Namun demikian bahan tersebut tidak dapat menstimulasi dentinogenesis dengan baik, karena pada pemakaiannya sebagai

bahan kaping pulpa direk, terlihat partikel-partikel kalsium hidroksida di dalam sel-sel pulpa yang menyebabkan defek *tunnel* dari jembatan dentin yang terbentuk dengan jembatan dentin yang porus.⁽⁸⁵⁾

2.4.1 Mineral Trioxide Aggregate (MTA)

Bahan ini merupakan material yang menjanjikan karena sifat-sifat superiornya sebagai bahan kaping pulpa direk dibandingkan dengan Ca(OH)₂. Pada beberapa model hewan coba, hasil-hasil penelitian menunjukkan pembentukan gambaran dentin dengan respon sel inflamasi minimal. MTA merupakan semen portland yang bahan utamanya adalah partikel-partikel hydrophilic halus dan komponen-komponen utamanya adalah kalsium fosfat dan kalsium oxide. Material ini mengeras 3-4 jam dan menimbulkan pH 12.5 sama seperti kalsium hidroksida. MTA memiliki *compressive strength* pada saat mengeras sama dengan IRM yaitu sebesar 70 MPa dan tidak bersifat *resorbable*⁽⁸⁸⁾

Penelitian-penelitian menunjukkan bahwa MTA merupakan bahan yang mempunyai biokompatibilitas yang tinggi, sitotoksik yang minimal, adaptasi marginal yang sangat baik serta dapat mengaktifkan sitokin pada sel-sel osteoblast manusia (Torabinejad *et al.* 1999 ; Koh *et al.* 1998 ; Zhu *et al.* 2000).^(14, 88, 89) Penempatan kapas basah di atas MTA dapat menginduksi pengerasan yang baik dari bahan tersebut (Torabinejad *et al.*, 2000) dan begitu mengeras material tidak mengalami kerusakan oleh darah atau kelembaban.⁽⁹⁰⁾ Pemakaian MTA dalam aplikasi klinik saat ini antara lain pada perawatan kaping pulpa, penutupan ujung akar, perbaikan perforasi dan resorpsi internal serta memacu perkembangan akar pada perawatan pulpotomi. (Torabinejad and Chivian 1999; Holland *et al.* 2001).^(89, 91)

Foraco Jr dan Holland (2004) dalam penelitiannya menemukan bahwa MTA putih dapat dipertimbangkan sebagai bahan kaping pulpa direk. Pembentukan jaringan keras berupa jembatan dentin terlihat pada semua spesimen, tanpa adanya zona nekrotik superficial walaupun dari beberapa spesimen dijumpai juga sedikit defek “tunnel” tetapi keadaan ini berdekatan dengan bahan kaping.⁽⁹²⁾ De Queiroz *et al.* (2005) dalam penelitiannya

membandingkan MTA dan kalsium hidroksida pada perawatan kaping pulpa direk yang dilakukan pada gigi-gigi anjing, menunjukkan bahwa MTA dapat menginduksi respon biologi pada sel-sel osteoblastik karena adhesi yang baik; meningkatkan sitokin dan produksi osteocalcin yang merupakan protein non kolagen yang disintesis oleh sel osteoblast dan dapat digunakan sebagai bahan yang menghasilkan matriks ekstraseluler dentin.⁽⁹³⁾

2.4.2 Kitosan

Mengingat saat ini bahan kaping pulpa di Indonesia masih sulit diperoleh seperti MTA karena merupakan produk impor yang sangat mahal harganya, maka Trimurni Abidin (2006) melakukan penelitian dengan memanfaatkan limbah kulit udang dan blangkas di Sumatra Utara yang dikembangkan menjadi bahan baru yaitu kitosan dan derivatnya yang dipakai di bidang kedokteran gigi. Walaupun kitosan telah banyak diproduksi di luar dan dalam negeri, tetapi belum dikembangkan pemakaiannya di bidang kedokteran gigi, terutama dalam perbaikan dan penyembuhan jaringan pulpa yang mengalami inflamasi reversibel.^(24, 43)

Penelitian-penelitian yang telah dilakukan pada tulang-tulang panjang hewan coba menunjukkan kitosan merupakan *bone healing accelerator* dan mempunyai efek osteogenik.⁽²⁴⁾ Kitosan mampu menginduksi osteogenesis dan mengaktifkan elemen-elemen pembentuk tulang yang berdekatan dengan jaringan lunak sekitar tulang panjang yang mengalami kerusakan.⁽²⁴⁾ Trimurni (2005) juga telah melaporkan adanya perbaikan tulang inter radikuler gigi molar satu bawah yang mengalami resorpsi dan abses berulang. Terlihat dari kasus yang dilaporkan ini bahwa dengan pemberian kitosan berberat molekul rendah menunjukkan perbaikan tulang selama 12 (duabelas) minggu setelah perawatan endodontik bedah.⁽⁹⁴⁾

Kitosan merupakan derivat kitin dengan adanya N-deacetylase yang merupakan biopolymer alami, terutama sebagai penyusun rangka *Crustacea* dengan dinding structural fungi serta hewan tingkat rendah. Kitosan mempunyai sifat yang khas antara lain bioaktivitas, biodegradasi. Sifat-sifat kitosan ini dihubungkan dengan adanya gugus-gugus amino dan hidroksil yang terikat.

Adanya gugus-gugus tersebut menyebabkan kitosan mempunyai reaktivitas yang tinggi dan menyumbang sifat elektrolit kation sehingga dapat berperan sebagai amino pengganti. Di samping itu kitosan dapat berinteraksi dengan zat-zat organik lainnya seperti protein sehingga kitosa relative banyak digunakan di bidang kesehatan⁽⁹⁴⁾

Dalam penggunaannya sebagai bahan kaping pulpa direk, bahan kitosan menunjukkan kemampuan untuk membentuk jaringan keras osteotipik irregular yang terlihat pada peletakkan kitosan selama 14 hari dan 1 bulan. Pada observasi 3 bulan, terlihat gambaran jembatan dentin yang lebih baik dibandingkan dengan kalsium hidroksida yang merupakan bahan standar. Dari penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa kitosan yang diperoleh dari cangkang blangkas (*Limulus Polyphemus*) mempunyai berat molekul tinggi mampu menstimulasi pembentukan dentin reparatif dengan memacu sel-sel pulpa odontoblast untuk mengadakan migrasi dan proliferasi. Hal ini disebabkan karena kitosan dengan berat molekul tinggi akan menghasilkan koagulan padat yang memungkinkan terbentuknya sub-base membrane yang memungkinkan perlekatan sel-sel pulpa seperti odontoblas untuk mengadakan migrasi dan proliferasi.^(24, 43)

Pemeriksaan immunohistokimia dari sampel gigi tikus yang diletakkan kitosan blangkas menunjukkan ekspresi Alkaline Fosfatase yang merupakan marker dari sel odontoblast yang aktif. Hasil uji bioaktivitas dan biokompatibilitas yang dilakukan pada kultur sel jaringan pulpa gigi manusia menunjukkan adanya proliferasi sel-sel jaringan pulpa yang dapat dilihat melalui MTT-assay dan aktivitas TGF- β 1. Hal ini menunjukkan adanya mekanisme seluler dan molekuler pada regulasi dentinogenesis. Hal ini sekaligus menandakan bahwa kitosan blangkas dapat dikembangkan sebagai biomaterial dalam rekayasa jaringan.^(24, 43)

2.5 Aplikasi Rekayasa Jaringan Berbasis Sel Punca Mesenkhim Dari Pulpa Gigi

Konsep rekayasa jaringan diungkapkan oleh Langer dan Vacant pada awal tahun 1990 untuk menggambarkan teknik regenerasi jaringan secara biologis, di mana sel, sinyal molekuler dan *scaffolds* merupakan tiga komponen utama dalam

rekayasa jaringan.⁽²⁹⁾ Tujuan umum dari rekayasa jaringan adalah memperbaiki fungsi struktur jaringan sebagaimana halnya pemeliharaan lingkungan alami serta kelangsungan hidup dan fungsi jaringan yang rusak akibat penyakit/trauma. Dalam konteks ini, penggantian gigi dalam aplikasi klinik bergantung pada penggunaan bahan/material yang mempunyai potensi sebagai anti inflamasi, antibakterial, dan secara bersamaan mendukung proliferasi dan menginduksi diferensiasi dari DPSC menjadi sel lir-odontoblas yang mengarah pada pembentukan dentin.^(8, 17, 29)

Faktor utama dari rekayasa jaringan adalah sumber sel. Penggunaan sel-sel selalu dikategorikan berdasarkan sumbernya diantaranya ialah sel autologus, sel alogenic, sel xenogenic, sel syngenic, sel primer dan sel punca. Sel-sel selalu diimplantasi atau ditanam ke dalam struktur artifisial yang mendukung jaringan tiga dimensi, yang disebut dengan bahan perancah (*scaffolds*) yang memungkinkan sel mengadakan perlekatan dan migrasi, menghantar sel dan faktor-faktor biokimianya untuk memudahkan nutrisi dari nutrient dan mengekspresikan produk-produknya.^(24, 28, 29)

Odontoblas berasal dari mesenkim, dan dalam keadaan yang sesuai sel-sel yang berasal dari pulpa gigi, apikal papilla, dan dari jaringan lainnya dapat membentuk sel lir-odontoblas.^{(29),(47)} Tantangan secara klinis adalah bagaimana menemukan sumber sel yang tepat, yang dapat berdiferensiasi ke arah odontoblast, dapat di panen, bersifat autogenus/autologus untuk menghindari reaksi penolakan atau pengenalan benda asing pathogen.^(28, 29)

Faktor kedua adalah bahan perancah (*scaffold*), di mana jaringan merupakan struktur tiga dimensi dan *scaffold* yang sesuai diperlukan untuk meningkatkan pertumbuhan sel serta diferensiasi. Telah diketahui bahwa molekul matriks ekstraseluler mengontrol diferensiasi dari sel punca dan *scaffold* yang sesuai dapat secara selektif mengikat dan melokalisir sel-sel, mengandung *growth factors* serta mengalami biodegradasi dalam jangka waktu yang panjang, agar *scaffold* dapat lebih diabsorpsi oleh jaringan sekitarnya tanpa dilakukan pengangkatan secara bedah. Oleh karena itu *scaffold* bukan hanya sekedar matriks yang sederhana namun harus memenuhi persyaratan diantaranya adalah memiliki porositas yang tinggi dan ukuran pori yang adekuat untuk memfasilitasi

pemberian nutrisi sel dan difusi melalui semua struktur sel-sel, serta menimbulkan pengaruh-pengaruh mekanis dan biologis untuk memodifikasi fase sel. ^(24, 28, 29)

Faktor ketiga dari rekayasa jaringan yang diperlukan pada endodontik regeneratif adalah sinyal molekuler. Dalam hal ini, baik *growth factors* maupun bagian yang lainnya memiliki kapasitas merangsang proliferasi sel dan mengarahkan diferensiasi sel. Sumber sel dan sinyal molekuler memegang peranan penting dalam mengarahkan perkembangan sel pada rekayasa jaringan. ^(29, 47) Peneliti lain menunjukkan bahwa dentin atau aplikasi dentin yang kaya akan *growth factor* akan mendukung pembentukan fenotipe odontoblas. Hal ini disebabkan karena banyak *growth factor* tertanam di dalam matriks dentin selama proses dentinogenesis.⁽¹⁷⁾ Hal yang menarik adalah EDTA terbukti sangat efektif melepaskan *growth factor* dari dentin manusia. Namun belum diketahui apakah irigasi saluran akar dengan EDTA dapat meningkatkan perkembangan proliferasi odontoblast dalam prosedur endodontik regeneratif. ⁽⁹⁵⁾

Karena kemiripan antara struktur dentin dan tulang, penelitian seringkali dilakukan pada rekayasa jaringan gigi dalam perbandingan dengan proses pembentukan tulang serta aplikasi bahan penginduksi tulang. Dari aspek rekayasa jaringan, patut diperhatikan adanya perbedaan antara pembentukan tulang dan dentin. Perbedaan pendekatan dapat dilakukan pada rekonstruksi tulang seperti ¹ *autologous graft* dari berbagai regio donor mengandung sel pembentuk tulang dan *growth factors* dan oleh karenanya bersifat osteogenik^{(29),2} *allograft* dan ³ *xenograft* sebagai contoh sampel tulang dari manusia lain atau binatang yang bersifat osteoinduktif karena beberapa protein yang mengandung *growth factors*. ⁽⁹⁶⁾ Berbagai biomaterial yang bersifat *osteoinductive* yang berperan sebagai pembawa *growth factors* menginduksi pembentukan tulang ⁴ *Synthetic bone substitutes* untuk penggantian tulang dengan atau tanpa resorpsi sebagian atau untuk perbaikan tulang dengan menggunakan bahan *osteoconductive* yang bersifat porous seperti *scaffold*, yang memberikan dukungan secara mekanik sampai jaringan mengalami regenerasi dan remodeling dengan sendirinya sebagai contoh diantaranya *calcium phosphates*, *poly (DL) lactide based materials*, *collagen-hydroxyapatite composites*, *bioactive glasses*, *methacrylate-based materials*. ^(97, 98)

Perbedaan bahan pengganti tulang yang berasal dari autogenic, xenogenic, dan alloplastic dapat dibedakan sesuai dengan kualitas fungsional dari jaringan yang baru terbentuk dan dinamika perubahan tulang yang dipengaruhi. Perbandingan antara *osteoconductive bone substitutes* yang disertai demineralisasi dengan bahan *osteoinductive* serta *autogenic bone grafts*, *bone inducing materials* menunjukkan bagian terbesar dari pembentukan tulang. Dalam upaya untuk mengekstrapolasikan hasil penelitian tulang kepada perbaikan dentin, diperlukan suatu pemahaman kompleks dentin-pulpa secara lebih detail dan khususnya dalam keadaan penyembuhan pulpa serta pembentukan dentin reparatif. ⁽²⁹⁾

2.5.1 Pendekatan Aplikasi Rekayasa Jaringan Untuk Regenerasi Dentin

Tujuan akhir rekayasa jaringan adalah untuk mendapatkan struktur jaringan restorasi yang fungsional, sekaligus mempertahankan lingkungan alami agar viabilitas jaringan yang mengalami kerusakan tetap terjaga. Dalam konteks jaringan pulpa, maka morfologi dentin dan berbagai tipe dentin harus diperhatikan. Pembentukan dentin tersier, reaksioner serta dentin reparatif, sesungguhnya merepresentasikan mekanisme sistem imun dan sifat regeneratif dari kompleks dentin-pulpa. ^(99, 100)

Terdapat 2 (dua) pendekatan berbeda dalam menginduksi proses dentin regeneratif. Pertama adalah dengan menggunakan bahan yang dapat diaplikasikan sebagai bahan restorasi yang berkontak langsung dengan lapisan dentin yang masih tersisa pada permukaan pulpa. Bahan tersebut harus dapat melepaskan *growth-factor* yang akan menstimulasi pembentukan dentin reparatif ⁽⁹⁹⁾ Berdasarkan pendekatan ini, jaringan pulpa akan terlindungi sekaligus menginduksi respon imun non spesifik. Akan tetapi dengan metode ini kemungkinan akan terjadi akselerasi penyempitan kamar pulpa. ⁽¹⁰⁰⁾

Pendekatan kedua adalah dengan memanfaatkan polimer, yang akan digunakan sebagai *scaffold*, maka sel lir-odontoblas yang tumbuh di dalam matriks ini selanjutnya akan dikonversi ke arah proses dentinogenesis. Menjadi tantangan bagi peneliti adalah kejelian dalam memilih biomaterial (*scaffold*) yang

bersifat dentin konduktif bagi sel lir-odontoblas sekaligus dapat diabsorpsi ketika proses regenerasi dentin sedang berlangsung.⁽¹⁰¹⁾

2.5.2 Sel Punca

Sel punca merupakan sel yang paling berharga untuk pengobatan regeneratif. Penelitian tentang sel punca memberikan pengetahuan lanjut tentang bagaimana suatu organisme berkembang dari satu sel, dan bagaimana kualitas sel yang menggantikan sel lain yang rusak pada organ dewasa. Sel punca memiliki kemampuan untuk secara berkesinambungan membelah baik untuk replikasi dirinya sendiri atau menghasilkan sel-sel khusus yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel atau jaringan (*multilineage differentiation*).⁽¹⁰²⁾

Berdasarkan potensi atau kemampuan berdiferensiasi, sel punca digolongkan menjadi: Totipoten yaitu sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi organ hidup yang lengkap, termasuk dalam golongan ini adalah zigot (telur yang telah dibuahi). Pluripoten, yaitu sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi tiga lapisan germinal: ektoderm, mesoderm, dan endoderm, tapi tidak dapat menjadi jaringan ekstraembryonik seperti plasenta dan tali pusat, termasuk golongan ini adalah sel punca embryonik. Multipoten, yaitu sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi banyak jenis sel, misalnya: sel punca hematopoietik. Unipoten, yaitu sel punca yang hanya dapat menghasilkan satu jenis sel, tapi berbeda dengan non-sel punca, jenis unipoten ini mempunyai sifat dapat memperbaharui atau meregenerasi diri.^{(28),(102)}

Sedangkan berdasarkan sumber asal sel punca diperoleh di berbagai jaringan tubuh, sel punca dibagi menjadi: zygote, yaitu pada tahap sesaat setelah sperma bertemu dengan sel telur, sel punca embryonik yang diperoleh dari *inner cell mass* dari suatu blastocyst (embrio yang terdiri dari 50 - 150 sel, kira-kira hari ke-5 pasca pembuahan). Sel punca embryonik umumnya diperoleh dari sisa embrio yang tidak dipakai pada IVF (*in vitro fertilization*). Tapi saat ini telah dikembangkan teknik pengambilan sel punca embryonik yang tidak membahayakan embrio tersebut, sehingga dapat bertahan hidup dan bertumbuh. Untuk masa depan hal ini mungkin dapat mengurangi kontroversi etik terhadap sel punca embryonik. Sel punca darah tali pusat, yang diperoleh dari darah plasenta

dan tali pusat sesaat setelah bayi lahir. Sel punca dari darah tali pusat merupakan jenis sel punca hematopoietik, dan ada yang menggolongkan jenis sel punca ini ke dalam sel punca dewasa (*Adult Stem Cell*). Sel punca dewasa diperoleh dari jaringan dewasa, antara lain dari sumsum tulang. Ada 2 jenis sel punca dari sumsum tulang yaitu sel punca hematopoietik dan sel punca stromal atau disebut juga MSCs, dari jaringan lain seperti pada susunan saraf pusat, jaringan lemak, otot rangka, pankreas. ^{(28),(102)}

Sel punca dewasa merupakan sel-sel yang tidak berdiferensiasi dan ditemukan pada jaringan yang telah mengalami diferensiasi, serta mampu memperbaharui dirinya sendiri selama seumur hidup mikroorganisme tersebut. Peran sel punca dewasa adalah lebih untuk mempertahankan dan memperbaiki jaringan tubuh di tempat sel punca ditemukan. Secara umum sel punca dewasa dianggap memiliki potensi terbatas untuk menjadi jenis sel apapun dalam tubuh, dengan kata lain hanya dapat menghasilkan varietas tipe sel dalam garis keturunan atau jenisnya sendiri dan dianggap multipotensial. Terdapat dua karakteristik yang dimiliki oleh sel punca diantaranya adalah dapat menghasilkan sel yang serupa dengan dirinya dalam periode waktu yang panjang, kemampuan tersebut dikenal sebagai pembaharuan diri jangka panjang. Selain itu, sel tersebut dapat menghasilkan jenis sel dewasa yang memiliki karakteristik morfologi dan fungsi spesifik. Sel punca dewasa mampu membentuk sel-sel yang berdiferensiasi sempurna dengan fenotip yang matang, mempunyai integrasi sempurna dengan jaringan dan mampu menjalankan fungsi khusus sesuai dengan jaringan tersebut. Umumnya peneliti mengidentifikasi sel punca dewasa dengan cara mengandalkan dua karakteristik yaitu morfologi sel dan identifikasi penanda permukaan. ^(102, 103)

Beberapa sel punca dewasa memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel jaringan lain selain jaringan asalnya atau disebut sebagai plastisitas atau transdiferensiasi. Untuk menunjukkan bahwa sel punca dewasa mempunyai sifat plastisitas, harus diidentifikasi terlebih dahulu bahwa pada populasi sel jaringan awal terdapat sel punca, kemudian dibuktikan bahwa sel punca dewasa mampu menghasilkan jenis sel normal jaringan lain, dan potensi ini dapat dideteksi pada lingkungan yang baru. Sel ini harus dapat berintegrasi dengan

lingkungan barunya, bertahan dan berfungsi seperti sel dewasa yang lain pada jaringan tersebut. Sel punca dewasa merupakan sel multipotensial karena dapat menghasilkan seluruh jenis sel yang memiliki hubungan dengan jaringan asalnya. (28), (102, 103)

2.5.2.1 Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSC)

Jaringan lemak merupakan jaringan penyambung khusus yang dapat ditemukan dalam dua jenis yaitu putih dan coklat. Kedua jenis lemak tersebut berfungsi untuk mengisolasi serta melindungi tubuh, namun masing-masing mempunyai fungsi khusus yang berkaitan dengan keadaan warna jaringan. Jaringan lemak coklat mengandung banyak pembuluh darah, dan fungsi utamanya adalah sebagai sumber panas dalam tubuh. Dengan berjalannya usia, jaringan lemak coklat akan digantikan oleh jaringan lemak putih, yang fungsi utamanya adalah menyediakan sumber energi untuk tubuh. (104)

Komponen seluler utama jaringan lemak adalah kumpulan lemak yang kaya sel dan dikenal sebagai adipocytes yang dikelilingi oleh serabut kolagen. Sitoplasma yang ada dalam adipocyte yang matang mengandung 90% lemak. Komponen seluler lain yang terkandung dalam jaringan lemak adalah sel stromal vascular termasuk di dalamnya sel otot halus, sel endotelial, fibroblas, sel darah, dan preadipocytes. Sementara jaringan lemak putih tidak mengandung pembuluh darah sebanyak jaringan lemak coklat, namun setiap sel lemak dalam jaringan lemak putih berhubungan dengan minimal satu pembuluh darah kapiler, menyediakan jaringan vascular yang mendukung pertumbuhan jaringan. (105)

Jaringan lemak (Adipose) telah terbukti sebagai jaringan yang jumlahnya melimpah ruah, mudah diperoleh serta kaya akan sumber sel punca dewasa, dengan karakteristik multipotent sehingga sesuai dengan rekayasa jaringan dan aplikasi medikamen yang bersifat regeneratif. Adipose berkembang dari sel mesenkhim melalui serangkaian kompleks peristiwa transkripsi dan non transkripsi yang terjadi sepanjang hidup manusia. *Stromal cells* yang memiliki karakteristik *preadipocytes* dapat diisolasi dari jaringan adipose manusia dewasa, yang dipropagasi secara *in vitro*, dan diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi adipocytes. (106)

Metode awal untuk mengisolasi sel dari jaringan lemak dipelopori oleh Rodbell et al pada tahun 1960, dengan menggunakan lemak tikus yang dicuci untuk mengeluarkan kontaminasi sel-sel hematopoietic, kemudian fragmen jaringan diinkubasi dengan collagenase dan di sentrifus untuk memisahkan populasi yang mengambang adipocyte matang dari pellet SVF. SVF terdiri dari populasi sel heterogenus, termasuk sel pembuluh darah, fibroblas, pericytes, dan sel endothelial sebagaimana halnya pre-adipocytes atau adipocyte progenitor. Tahap isolasi akhir dipilih dari populasi yang menempel pada lempeng plastik di dalam sel-sel SVF, yang banyak mengandung preadipocyte. Selanjutnya, prosedur tersebut telah dimodifikasi untuk isolasi sel dari spesimen jaringan lemak manusia.^(105, 106) Jaringan lemak manusia diperoleh melalui jarum biopsy atau *liposuction*, dan sampel tersebut dapat disimpan pada suhu kamar untuk jangka waktu yang tidak lebih dari 24 jam sebelum digunakan. Sel punca mesenchim lemak harus di kultur sampai mencapai tingkat konfluensi sebesar 80% untuk dapat disimpan secara *cryopreservation* dalam jangka panjang.⁽¹⁰⁶⁾

Diferensiasi adipocytes merupakan proses kompleks diikuti dengan perubahan koordinasi dalam morfologi sel, sensitivitas hormon serta ekspresi gen yang telah diteliti sejak awal pada *murine preadipocyte cell lines* dibandingkan dengan *preadipocytes* pada manusia. Protokol ini menggambarkan kultur primer *in vitro* dari *stromal cell* yang diisolasi baik dari jumlah kecil atau besar dari jaringan lemak manusia. Hal ini secara teknik menjadi penting untuk meminimalkan jumlah jaringan yang dibutuhkan untuk memperoleh kultur primer. Selanjutnya dapat ditentukan tingkat proliferasi dan diferensiasi dari jumlah terbatas jaringan adipose, sebagaimana halnya yang diperoleh dari jarum biopsy. Walaupun dari kepustakaan dikatakan bahwa *adipose-derived stromal cells* yang diungkapkan dengan istilah *preadipocytes*, merupakan sel multipotent yang memiliki kemampuan chondrogenik, neurogenik, serta osteogenik, namun kemampuan odontogenik sampai saat ini belum terbukti dalam penelitian. Selanjutnya saat ini sel-sel tersebut diidentifikasi sebagai *adipose-derived stem cells* atau ASCs. ASCs ini dibedakan dengan sel progenitor dari sumsum tulang yang sesungguhnya mengarah pada *fibroblastoid colony forming units*, dalam kepustakaan hematologi dikenal sebagai *marrow stromal*, yang selanjutnya

disebut sebagai *mesenchymal stem cells*, atau *multipotent mesenchymal stromal cells* (MSCs) ^(32, 107)

Bagian stromal dari jaringan mesenkhim merupakan tempat sel punca yang memperlihatkan kapasitas proliferaatif dan potensi *multilineage*. Seringkali disebut *mesenchymal stem cells* atau *stromal stem cells*, di mana sel-sel ini di isolasi dari beberapa jaringan mesodermal termasuk sumsum tulang, otot, perichondrium serta jaringan adipose. *Stromal stem cells* di isolasi dari berbagai jaringan mesodermal dengan beberapa karakteristik diantaranya dapat melekat membentuk koloni mirip fibroblastic (CFU-F), memiliki kapasitas untuk berproliferasi secara meluas, serta kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi beberapa galur mesodermal termasuk diantaranya adalah tulang, otot, tulang rawan, dan lemak serta dapat mengekspresikan beberapa sel permukaan antigen yang umum. ⁽¹⁰⁸⁾

Jaringan lemak mengandung jumlah *stromal stem cells* yang banyak, karena itu sangat mudah untuk memperolehnya dalam jumlah yang besar, di samping itu jaringan lemak merupakan sumber yang ideal untuk *uncultured stromal stem cells*. Sel-sel dengan $CD45^-CD31^-CD34^+CD105^+$ fenotipe permukaan yang baru diisolasi dari jaringan adipose membentuk CFU-F, berproliferasi dan dapat berdiferensiasi ke arah beberapa galur termasuk osteogenik, chondrogenik, adipogenik, dan neurogenik, kecuali odontogenik. Kemampuan transdiferensiasi ADMSC sangat baik, dengan tingkat pertumbuhan kultur yang tinggi, sehingga sangat mudah untuk dilakukan rekayasa jaringan. ^(45, 106)

Microenvironment di sekeliling jaringan yang dibentuk mempengaruhi diferensiasi dan tingkat pembentukan jaringan. Proses adipogenesis dapat dipengaruhi, sebagian oleh faktor-faktor diantaranya growth factors (endo dan exogenous), pO_2 (normoxia vs hypoxia), pH, perlekatan molekul pada matriks ekstraselluler. Pada tabel 2.2. menunjukkan faktor kimia yang dilaporkan dapat mempengaruhi diferensiasi preadipocyte menjadi adipocyte. Beberapa faktor (seperti aFGF, bFGF, dan PDGF) menimbulkan aksi yang bertentangan karena belum menjelaskan apakah faktor-faktor tersebut mempengaruhi diferensiasi preadipocyte secara langsung atau tidak langsung melalui angiogenesis. ⁽¹⁰⁹⁾

Tabel 2.2. Faktor-faktor yang mempengaruhi diferensiasi adipocyte secara positif (+) atau negatif (-) (Sumber gambar : The Anatomical Record,2001)

Faktor	Pengaruh
aFGF	+/-
bFGF	+/-
EGF	-
Glucocorticoid	+
Growth hormone	+
IGF-1	+
IL-11	-
Insulin	+
Interferon- γ	-
PDGF	+/-
Prostaglandina	
TGF- α	-
TGF- β	-
Thyroid hormone	+
TNF- α	-

Penelitian terakhir menunjukkan bahwa sel punca mesenkhim asal jaringan lemak (ADMSC) menunjukkan kemampuan pluripoten yang sangat baik serta memiliki banyak kelebihan dibandingkan sel punca mesenkhim asal sumsum tulang belakang (BMSC), diantaranya adalah kemampuan osteogeniknya dapat bertahan seiring meningkatnya usia donor⁽²³⁾ Telah dibuktikan bahwa ADMSC memiliki karakteristik yang mirip dengan sel punca mesenkhim pulpa dan keduanya dapat membentuk struktur mirip tulang atau gigi.^(32, 110)

2.5.2.2 Dental Pulp Stem Cells (DPSC)

DPSC pertama kali diisolasi oleh Gronthos et al pada tahun 2000, berdasarkan kemampuan untuk meregenerasi kompleks pulpa-dentin yang terdiri dari tubuli matriks yang termineralisasi dari odontoblas dan fibroblas yang mengandung pembuluh darah, yang tersusun mirip dengan kompleks pulpa-dentin yang ditemukan pada gigi manusia.⁽²⁸⁾ Pada penelitian-penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa sel-sel ini memiliki kapasitas proliferasi yang tinggi, *self renewal property*, serta potensi berdiferensiasi ke berbagai galur.^(8, 13, 29)

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa DPSC merupakan *multipotent stromal cells* yang dapat berproliferasi secara meluas, dapat disimpan aman

dengan teknik *cryopreservation*, sesuai dengan beberapa *scaffold*, memiliki masa hidup yang panjang, bersifat *immunosupresive*, serta memiliki kapasitas membentuk jaringan mineralisasi mirip dentin. Kultur DPSC dapat dirangsang untuk berdiferensiasi menjadi lebih dari satu macam jenis sel sesuai dengan kandungan medium kulturnya. Sebagai contoh medium osteo atau dentinogenic mengandung dexamethasone, glycerophosphate, ascorbate phosphate dan 1,25 dihydroxy vitamin D sebagai tambahan bagi elemen dasarnya. Proses kultur sel punca merupakan langkah awal dalam memperoleh *stem cell line*, yang merupakan upaya memperbanyak sel-sel identik secara genetik yang dapat digunakan untuk perkembangan perawatan dan penelitian. Sekali *stem cell line* yang stabil sudah diperoleh, maka sel punca dapat dirangsang untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel khusus.^(28, 29)

Odontoblas merupakan sel-sel postmitotik yang berdiferensiasi paling akhir, oleh karenanya tidak dapat diinduksi lagi untuk berdiferensiasi lebih lanjut. Protein utama yang disintesis oleh odontoblas yang telah berdiferensiasi adalah collagen type I, yang membentuk *scaffold* untuk deposisi mineral dan memberikan kekuatan pada dentin yang termineralisasi. Sementara itu dua protein utama non kolagen yang mempunyai kapasitas pengaturan mineralisasi adalah dentin phosphophoryn (DPP atau DMP-2) dan dentin sialoprotein (DSP). DPP dan DSP disandi oleh gen tunggal yaitu DSPP atau DMP-3, yang secara khusus menentukan karakteristik fenotip dari dentin.^(28, 29)

Protein non kolagen lain yang penting adalah dentin-matrix protein-1 (DMP-1), yang ditemukan terutama pada dentin dan tulang dan berimplikasi pada pengaturan mineralisasi, dan berperan sebagai *growth factor* untuk menginduksi proses diferensiasi dari DPSCs. Dalam upaya untuk menganalisis mekanisme penyembuhan pulpa dan mengembangkan strategi perawatan untuk regenerasi pulpa, pengembangan *odontoblast cell line* adalah penting. Walaupun demikian, sampai saat ini diferensiasi odontogenik belum sepenuhnya dapat dikarakterisasikan karena dua hal keterbatasan, diantaranya adalah :

1. Keterbatasan dari marker untuk diferensiasi, yang sekarang ini dapat diatasi dengan karakterisasi marker khusus untuk odontoblast (DMP-1, DMP-2, dan DMP-3) yang mengindikasikan adanya *true odontoblastic cell line*.

2. Keterbatasan masa hidup sel primer, yang ditunjukkan oleh beberapa metodologi termasuk kloning sel dan immortalisasi.^(111, 112)

2.5.3 Growth Factors

Growth factor merupakan sinyal yang secara ekstraseluler disekresikan pada proses morphogenesis/organogenesis selama interaksi epithelial mesenchim. *Growth factors* mengatur pembelahan atau spesialisasi dari sel punca menjadi jenis sel yang diinginkan dan memperantarai proses seluler dalam regenerasi jaringan termasuk diantaranya proliferasi sel, kemotaksis, diferensiasi dan pembentukan matriks, melalui jalur otokrin, parakrin, intakrin atau endokrin.^(28, 29)

Growth factor tersebut didepositkan dalam matriks ekstraseluler dan kemudian dilepaskan selama proses degradasi matriks. Interaksi mereka dengan permukaan reseptor pada sel target mengaktifkan jalur sinyal intraseluler yang menginduksi transkripsi dari mRNA dan protein yang diperlukan pada proses regeneratif. *Growth factor* ini dalam kombinasinya dengan faktor transkripsi lainnya kemudian mengaktifkan serangkaian gen. *Growth factors* juga menginduksi perubahan khusus pada tingkat seluler. Seluruh efek ini dikontrol oleh mekanisme balik yang melibatkan ikatan protein dan *growth factor* lainnya.^(13, 95)

Beberapa *growth factor* digunakan untuk meningkatkan jumlah sel punca, sebagaimana halnya pada platelet-derived growth factor (PDGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF), colony-stimulating factor (CSF) dan epidermal-growth factor (EGF). Fungsi lainnya adalah untuk mengatur respon humoral dan seluler (IL-1), angiogenesis seperti vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factors alpha dan beta (TGF- α , TGF- β) untuk penyembuhan luka dan regenerasi jaringan, serta bone morphogenetic proteins (BMPs) yang diketahui kemampuannya untuk menginduksi pembentukan tulang dan *cartilage*.^(113, 114)

Setiap *growth factor* memiliki kemampuan untuk menghasilkan respon yang unik dalam proses penyembuhan, khususnya dalam efek induktif pada sel-sel yang terdapat dalam luka. Telah diperlihatkan bahwa aplikasi topikal dari *growth*

factors ini untuk menyembuhkan daerah yang luka, dapat mempercepat penyembuhan serta pematangan luka. Seluruh ulasan artikel mengungkapkan prospek penggunaan PRP serta *growth factors* yang diekspresikan oleh platelet yang terkonsentrasi dalam PRP yaitu PDGF dan TGF- β sebagai tambahan pada penyembuhan jaringan pasca bedah. Baik PDGF dan TGF- β telah menunjukkan dapat mempercepat penyembuhan luka melalui mekanisme yang berbeda.⁽¹¹⁵⁾

Pada penelitian yang dilakukan oleh Pierce et al (1992), yang meneliti komposisi, jumlah, dan derajat kecepatan deposisi matriks ekstraselular dalam perawatan eksisi luka telinga kelinci yang dirawat dengan *growth factors*. Peneliti menemukan bahwa PDGF mempercepat penutupan luka terutama melalui peningkatan deposisi matriks jaringan penyambung pada tepi utama dari jaringan granulasi yang baru. Dari penelitian ini mengindikasikan bahwa PDGF mempercepat penutupan awal terutama melalui peningkatan deposisi glycosaminoglycan, asam hyaluronic serta fibronectin. Sementara itu di sisi lain TGF- β merangsang deposisi kolagen baru serta maturasi menjadi sekumpulan besar pada tepi utama dari luka, membentuk fibroblas luka yang matang secara langsung dan seperti memotong beberapa fase radang akut dari perbaikan jaringan. Melalui penelitian-penelitian telah ditunjukkan bahwa PDGF dan TGF- β secara khusus merangsang jaringan granulasi *in vivo* secara bermakna, serta menunjukkan pentingnya peran kedua *growth factors* tersebut dalam penyembuhan total luka kulit.^(35, 115)

2.5.3.1 Platelet-Derived Growth Factor (PDGF).

Kerusakan dari pembuluh darah akibat cedera mengakibatkan pembentukan fibrin dan agregasi platelet. Beberapa *growth factor* yang dilepaskan ke dalam jaringan dari platelet dan sel-sel sekitarnya setelah cedera terjadi, termasuk PDGF, TGF- α , TGF- β dan IGF-1, tulang dan sementum juga melepaskan *growth factors* selama proses penyembuhan jaringan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa PDGF, TGF- β dan IGF-1 ditemukan dalam PRP dan karena pengaruhnya terhadap penyembuhan jaringan, penggunaan faktor-faktor ini memberikan hasil yang menjanjikan.^(29, 42, 95)

PDGF merupakan *basic dimeric glycoprotein* dengan 2 *disulphide-bonded polypeptides*, yang dikenal dengan rantai A dan B. Tiga bentuk isoformis dari PDGF adalah AA, BB, dan heterodimer AB. Semua bentuk isoform PDGF dilepaskan setelah perlekatan platelet pada daerah cedera. Secara *in vitro*, semua bentuk isoform memiliki aktifitas proliferasi pada ligamen periodontal fibroblas. PDGF juga bersifat kemotaktik terhadap fibroblas ini dan meningkatkan pembentukan kolagen dan protein. Selanjutnya bentuk isoform AA dan BB mendukung proliferasi dari sel-sel tulang, meningkatkan produksi PDGF-AA dalam kultur osteoblas melalui proses otokrin.^(35, 36, 42)

PDGF bersifat kemotaktik terhadap PMN, makrofag, dan sel otot halus. PDGF juga merangsang replikasi sel dari sel punca yang penting untuk fibroblas dan sel-sel endothelial (meningkatkan kapiler baru yang mulai berkembang), merangsang produksi fibronektin yaitu suatu molekul adhesi sel yang digunakan dalam proliferasi sel dan migrasi selama proses penyembuhan, termasuk osteokonduksi dan asam hyaluronik serta membantu menimbulkan kontraksi luka dan remodeling.^(35, 116)

Dari hasil penelitian ditunjukkan bahwa konsentrasi optimal dari PDGF-BB untuk menginduksi fibroblas ligamen periodontal agar dapat melekat pada permukaan akar gigi yang mengalami periodontitis adalah 50 ng/ml (efek yang sama dapat diperoleh pada konsentrasi yang lebih tinggi). Penelitian rekonstruksi periodontal pada tikus, ditunjukkan bahwa apikasi secara *in vivo* dari PDGF dapat meningkatkan regenerasi tulang pada defek *calvarial* pada saat membrane yang dapat diresorpsi digunakan sebagai *carrier*. Penggunaan PDGF dengan barrier membran dapat meningkatkan ukuran ligamen periodontal dan tulang pada defek furkasi kl III pada hewan percobaan anjing pemburu. PDGF juga dapat digunakan dalam kombinasi dengan *growth factor* lainnya.^(28, 35)

2.5.3.2 Transforming Growth Factor (TGF)

TGF- β merupakan nama yang diberikan pada kelompok protein homodimerik yang terlibat dalam pembentukan dan pengembangan banyak jaringan. Sekali disekresikan maka *ligand* akan mengikat reseptor trans membranous heterodimerik, kemudian mengaktifkan kelompok protein

intraselular. Kemudian protein intraselular phosphorylated memulai jalur sinyal intraselular dimana sebaliknya mengaktifkan serangkaian gen.^(36, 38, 115)

Secara *in vitro* TGF- β telah diteliti dapat menaikkan produksi matriks ekstraselular dalam banyak jenis sel, seperti fibroblas ligamen periodontal. TGF- β dapat digunakan sendiri atau dalam kombinasi dengan PDGF-BB, merangsang aktifitas proliferaatif dai fibroblas ligamen periodontal. TGF- β meningkatkan pembentukan gel kolagen secara *in vitro*, dan efeknya dipengaruhi oleh kombinasi dari PDGF dan IGF. Sebagai tambahan, TGF- β merangsang biosintesis dari type I collagen dan fibronectin dan menginduksi deposisi dari matriks tulang. TGF- β merangsang kemotaksis fibroblas serta produksi kolagen dan fibronectin oleh sel, sementara menghambat degradasi kolagen melalui penurunan protease dan peningkatan inhibitor protease, yang semuanya melalui fibrogenesis.^(42, 95, 115)

Secara *in vivo* , penggunaan TGF- β sendiri tidak memiliki efek pada defek *calvarial* kelinci, walaupun demikian TGF- β dapat meningkatkan regenerasi tulang pada saat diaplikasikan dengan *scaffold* gelatin. Penyuntikan berulang dari TGF- β menghasilkan pembentukan tulang endochondral pada tulang panjang. Pada saat TGF- β_1 diaplikasikan dengan bahan osteogenik yang bersifat *biodegradable* pada kelinci, pengaruh *bone growth* terhadap defek *calvarial* meningkat secara bermakna. Pada penelitian akhir-akhir ini yang melibatkan model caninus, aplikasi dari rhTGF- β_1 bersama-sama dengan *non resorbable barrier membrane* sangat meningkatkan regenerasi tulang pada *oral osseous defects* (setelah 2 bulan).^(35, 42, 115-117)

Pada laporan terakhir, menunjukkan bahwa periode hidup yang pendek serta penyampaian yang tidak efisien pada sel target merupakan pertimbangan yang utama berkaitan dengan penggunaan secara lokal dari *recombinant human growth factors*. *Growth factors* merupakan media yang mahal dan banyak yang diperlukan untuk dapat mencapai efek terapi.⁽¹¹⁸⁾ Para penulis menyimpulkan bahwa dalam keterbatasan ini, terapi gen dapat merupakan alternatif yang sesuai di masa depan. Alternatif lain yang mudah, murah dan efektif untuk memperoleh konsentrasi yang tinggi dari *growth factor* pada penyembuhan jaringan dan regenerasi adalah menggunakan sumber bahan autologous platelet melalui PRP.^(35, 42, 116)

2.5.3.3 Insulin Like Growth Factor (IGF)

IGF memiliki 2 (dua) macam bentuk, I dan II, dimana setiap bentuknya mempunyai 2 (dua) rantai peptide. IGF mengikat reseptor yang sama seperti insulin dan terlibat dalam perkembangan banyak macam jaringan, termasuk gigi. Kedua bentuk IGF merupakan faktor yang kuat bagi kelangsungan hidup sel-sel hematopoetik, fibroblas dan sistem saraf. Kedua bentuk IGF tersebut ditemukan dalam tulang, dan IGF-II merupakan *growth factor* yang paling banyak dalam matriks tulang.^(35, 119)

Meskipun demikian, pada regenerasi periodontal, banyak penelitian dilakukan dengan IGF-I. Bentuk IGF-1 ini bersifat kemotaktik terhadap sel periodontal ligamen, dan memiliki efek yang kuat terhadap sel-sel periodontal ligamen dan sintesis protein. IGF-1 merangsang pembentukan tulang melalui proses proliferasi dan diferensiasi, bentuk tersebut disintesis dan sekresi oleh osteoblas. Bentuk IGF-1 juga mempunyai *efek dose-dependent chemotactic* terhadap osteoblas. Peningkatan proliferasi osteoblas manusia telah ditunjukkan dengan kombinasi PDGF, IGF, TGF- β dan EGF.^(35, 120)

2.5.4 Scaffold

Scaffold dapat di implantasikan sendiri atau dalam kombinasi dengan sel punca dan *growth factor* untuk memberikan *microenvironment* secara tiga dimensi baik dari segi fisiko-kimia maupun biologis atau konstruksi jaringan bagi pertumbuhan dan diferensiasi sel.^(24, 29)

Untuk mencapai rekonstruksi jaringan, *scaffold* harus memenuhi syarat-syarat tertentu antara lain mempunyai porositas yang tinggi dan ukuran pori yang adekuat untuk memfasilitasi pemberian nutrisi bagi sel dan difusi melalui semua struktur sel-sel. Selain itu bersifat *biodegradable* merupakan faktor yang penting agar *scaffold* dapat lebih diabsorpsi oleh jaringan sekitarnya tanpa dilakukan pengangkatan secara bedah. Di samping itu *scaffold* tersebut harus dapat digantikan oleh jaringan regenerasi tanpa adanya perubahan bentuk dari struktur jaringan akhir, serta memiliki kekuatan secara fisik dan mekanik.^(24, 28)

Adapun jenis bahan perancah dapat dikategorikan dalam dua jenis diantaranya adalah sebagai berikut :

a. *Biologis/natural scaffold*

Terdiri dari polimer alami seperti kolagen dan glycosaminoglikan, yang memberikan biokompatibilitas serta bioaktivitas yang baik. Kolagen merupakan komponen utama dari matriks ekstraseluler dan memberikan tensile strength yang besar pada jaringan. Sebagai bahan perancah kolagen memudahkan peletakan sel dan *growth factor* serta peletakan jaringan alami setelah mengalami proses degradasi. Walaupun demikian, dari hasil penelitian menunjukkan bahwa sel-sel pulpa dalam matriks kolagen mengalami kontraksi yang dapat mempengaruhi regenerasi jaringan pulpa.

b. *Artifisial scaffold*

Merupakan polimer sintetik dengan pengaturan bentuk fisikokimia seperti tingkat degradasi, mikrostruktur serta kekuatan mekanik sebagai contoh ; Polylactic acid (PLA), polyglycolic acid (PGA), modifikasi scaffolds dengan *cell surface adhesion peptides* seperti arginine, glycine dan asam aspartat untuk memperbaiki adhesi sel dan sintetik matriks di dalam struktur tiga dimensi, scaffolds yang mengandung komponen inorganik seperti hydroxyapatite (HA), tricalcium fosfat (TCP) dan calcium polyphosphate (CPP) yang digunakan untuk mendukung konduktivitas tulang dan telah dibuktikan sangat efektif untuk rekayasa jaringan untuk DPSCs. ^(25, 28, 29)

2.5.4.1 Scaffold plasma : kandungan *growth factor* dan perannya dalam penyembuhan luka jaringan.

Platelet-rich plasmas (PRP) telah digunakan dalam berbagai aplikasi klinis, berdasarkan pendapat bahwa kandungan *growth factor* yang tinggi akan mendukung penyembuhan yang lebih baik. PRP merupakan ekstrak autologus yang kaya akan *growth factor* serta akan mengalami degradasi dengan berlangsungnya waktu membentuk matriks fibrin 3D. Pengetahuan tentang *growth factors* dan penyembuhan jaringan telah didukung oleh pengembangan dari gel platelet autologous atau konsentrat PRP, yang digunakan dalam berbagai bidang bedah termasuk kepala dan leher, otolaryngology, bedah kardiovaskuler, bedah mulut dan maksilofasial serta periodontic, untuk mendukung penyembuhan

jaringan dan regenerasi. PRP merupakan komponen darah di mana platelet dikonsentrasikan dalam jumlah yang terbatas dari plasma^(36, 38)

PRP berperan besar terhadap proses penyembuhan secara alami sebagai *multiple growth factors*, dan dikatakan aman karena sifat autologus alami serta dihasilkan sebagaimana yang dibutuhkan dari darah pasien yang menderita penyakit pulpa. Platelet-rich plasma (PRP) didefinisikan sebagai bagian fraksi plasma dari darah yang memiliki konsentrasi platelet di atas rata-rata. PRP dapat diartikan sebagai *platelet-enriched plasma*, *platelet-rich concentrate*, *autologus platelet gel*. PRP berperan sebagai *growth factor* agonist dan memiliki sifat mitogenik dan khemotaktik.^(121, 122)

Sedangkan PRF merupakan suatu konsep baru tentang konsentrasi platelet dan *growth factor* setelah diproses dari darah yang bebas antikoagulan. PRF melepaskan *growth factor* yang secara bertahap mengekspresikan efek proliferative dan differensiatif pada osteoblas tikus dengan lebih kuat dan lebih lama dibandingkan PRP. PRF melepaskan PDGF-AB, TGF- β 1, VEGF, EGF, dan IGF-1.^(40, 41) PRF berbeda dengan PRP dalam hal polimerisasi dan sifat biologisnya, di mana PRF dihasilkan dari polimerisasi alami dan progresif yang terjadi selama proses sentrifugasi, serta menghasilkan *fibrin clot* yang lebih alami.⁽¹²¹⁾

Penelitian tentang efek PRP terhadap sel punca pulpa yang berasal dari gigi molar tiga impaksi, menunjukkan bahwa dengan konsentrasi yang sesuai (0.5% dan 1 %) dapat meningkatkan kemampuan proliferasi dan mineralisasi yang sangat bermakna pada hari ke 4 (empat), sedangkan pada konsentrasi 5% efeknya justru mengurangi kemampuan tersebut.⁽¹²³⁾ Autologous pulp CD 105+ cell ditransplantasikan dengan SDF-1 pada gigi dengan penutupan apikal yang sempurna setelah pulpektomi, menginduksi jaringan mirip pulpa termasuk pembuluh saraf dan pembuluh darah pada hari ke 14 (empat belas) diikuti oleh pembentukan dentin sepanjang dinding hari ke 90 (sembilan puluh).^(8, 35)

PRP dan PRF dan FG berfungsi sebagai penutup jaringan serta *drug delivery system*⁽³⁶⁾, dengan platelet yang dapat menginisiasi perbaikan jaringan dengan melepaskan *growth factors* secara lokal. melalui degranulasi α -granules. Sekretori protein yang mengandung α -granules dari platelet termasuk PDGF-AA,

BB dan isomer AB, TGF- β , platelet factor 4 (PF4), IL-1, PDEGF⁽³⁵⁾, ECGF, IGF⁽¹²⁴⁾, osteocalcin (OC), osteonectin (On), fibrinogen (Ff), vitronectin (Vn), fibronectin (Fn0), dan thrombospondin-1 (TSP-1)⁽¹²⁵⁾. *Growth factors* ini mendukung penyembuhan dengan menarik *undifferentiated cells* pada matriks yang baru terbentuk dan mencetuskan pembelahan sel.⁽¹²¹⁾ PRP dapat menekan pelepasan sitokin dan membatasi radang, interaksi dengan makrofak untuk memperbaiki penyembuhan jaringan dan regenerasi, mendukung pertumbuhan kapiler baru⁽¹²⁶⁾ serta mempercepat proses epitelisasi pada luka khronis.⁽³⁶⁾

Platelet dalam PRP dan PRF juga memegang peranan dalam mekanisme pertahanan host pada daerah luka dengan menghasilkan sinyal protein yang menarik makrofak⁽¹²⁷⁾. PRP juga dapat mengandung sejumlah kecil leukosit⁽¹²⁷⁾ yang mensintesis interleukin sebagai bagian dari respon imun nonspesifik. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa PRP memiliki aktifitas antimikrobal terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* termasuk *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* dan *Cryptococcus neoformans*.^(128, 129)

PRP dan PRF sangat mudah untuk diproduksi dengan upaya yang minimal serta dapat disiapkan sebagaimana yang diperlukan pada saat perawatan⁽³⁵⁾ Pada proses dua tahap ini, darah lengkap dari pasien pertama kali disentrifugasi untuk memisahkan plasma dari sekumpulan sel darah merah dan kemudia selanjutnya di sentrifugasi untuk memisahkan PRP dari PPP. Konsentrat ini kemudian diaktifkan dengan penambahan thrombin atau calcium⁽¹¹⁶⁾ Secara klinik PRP mengandung paling sedikit satu juta platelet per mikroliter⁽¹³⁰⁾. Makin kecil konsentrasi tidak dapat dihubungkan dengan peningkatan penyembuhan jaringan dan makin besar konsentrasi tidak menunjukkan peningkatan penyembuhan jaringan.

Hasil dari penggunaan PRP pada klinik gigi dilaporkan pertama kali oleh Marx dan lainnya di tahun 1998, yang menggunakan PRP untuk memperbaiki penyatuan graft pada rekonstruksi mandibula pasien yang menerima sumsum tulang cancellous setelah operasi pengangkatan tumor. Dari data-data yang dikumpulkan menunjukkan bahwa penambahan PRP pada graft tulang mempercepat tingkat dan derajat pembentukan tulang.^(35, 116)

Pada hampir seluruh kepustakaan kedokteran menunjukkan penggunaan PRP yang menjanjikan, dan *growth factors* yang terkandung diantaranya adalah PDGF serta TGF- β sebagai perawatan tambahan pada penyembuhan jaringan paska bedah. PDGF maupun TGF- β , merupakan *growth factor* utama dalam PRP, yang dapat mempercepat penyembuhan jaringan melalui mekanisme yang berbeda.^(38, 42, 131)

PDGF mempercepat penutupan jaringan pada tahap awal terutama melalui peningkatan glycosaminoglycan, asam hyaluronat, serta deposisi fibronectin. Sementara TGF- β merangsang deposisi kolagen baru dan maturasi menjadi sekumpulan besar yang terbentuk pada tepi jaringan luka, membentuk jaringan fibroblas matang secara langsung serta memotong beberapa fase radang akut dari perbaikan jaringan. PDGF maupun TGF- β secara khusus dapat merangsang jaringan granulasi baru *in vivo*, sekaligus memperlihatkan pentingnya penyembuhan keseluruhan jaringan kulit.^(38, 42, 132)

Perbedaan yang penting dalam hal komposisi antara PRP dan FG adalah dalam hal adanya konsentrasi platelet yang tinggi dan konsentrasi alam dari fibrinogen dalam PRP. Platelet dalam PRP, segera setelah diaktifkan oleh penambahan thrombin, maka mulai melepaskan *growth factors* PDGF dan TGF- β , untuk mempercepat proses penyembuhan jaringan. Sehingga dengan demikian berperan baik, dalam proses hemostatis dan perlekatan bahan graft, sehingga secara fisiologis mempercepat penyembuhan di daerah bedah. Whitman et al, menyebutkan PRP sebagai alternatif autologus terhadap FG, yang diperoleh dari donasi bank darah yang telah digunakan selama bertahun-tahun sebagai agen hemostatik dan *surgical adhesive*.^(36, 42, 133)

Plasma autologus ini dilaporkan merupakan bahan yang efektif untuk menginduksi perbaikan jaringan dan regenerasi. Pada saat platelet menempel pada pembuluh darah yang cedera, maka akan dilepaskan *granules* yang mengandung serotonin, thromboxane dan adenosine untuk memulai proses pembekuan, yang mengarah pada pembentukan fibrin. Platelet kemudian melepaskan banyak *growth factors* di dalam luka, dimana PDGF, IGF, dan TGF- β memainkan peranan yang paling penting. PDGF memiliki karakteristik untuk monosit dan makrofag, dan selama penyembuhan jaringan merupakan aktifator

dari collagenase, yang menaikkan kekuatan dari jaringan yang sembuh. TGF- β mengaktifkan fibroblas untuk membentuk procollagen, dimana menghasilkan deposisi dari collagen di dalam luka.^(42, 116, 121, 125)

Proses penyembuhan luka jaringan merupakan mekanisme yang kompleks ditandai oleh adanya 4 (empat) fase yang berbeda namun saling tumpang tindih yaitu hemostasis, inflamasi, proliferasi, dan remodeling. Semua fase ini diatur oleh interaksi antar sel dan oleh *growth factor* yang larut dan dilepaskan oleh berbagai macam jenis sel. Thrombin merupakan penginduksi kuat dari aktivasi platelet ke arah pelepasan *growth factor*.^(38, 123)

Dari hasil penelitian tentang kandungan *growth factor* dan peranan PRP pada penyembuhan jaringan menunjukkan bahwa terdapat variasi yang signifikan konsentrasi *growth factor* antara individu serta peran calcium dan thrombin dalam melepas *growth factor*, pada proses sintesis, dan atau degradasi dalam pola stereotype yang spesifik untuk setiap jenis *growth factor*. Sedangkan supernatan PRP menginduksi kuat pembelahan sel osteoblas dan endothelial, hal ini mendukung konsep bahwa PRPs bermanfaat dalam penyembuhan jaringan.^(36, 38, 115) Dapat disimpulkan bahwa PRP memberikan banyak keuntungan diantaranya ialah; menurunkan frekuensi perdarahan intraoperatif dan post operatif baik pada donor maupun resipien, memfasilitasi penyembuhan jaringan lunak lebih cepat, memberikan stabilitas awal yang kuat dari jaringan yang mengalami graft pada resipien serta menaikkan vaskularisasi dengan cepat pada penyembuhan jaringan dengan memberikan *growth factor* dan kombinasi dengan bahan-bahan pengganti tulang/jaringan lainnya dalam upaya regenerasi.^{(116, 132, 133), (134)}

2.5.5 Karakterisasi Fenotip dari Diferensiasi Odontoblast

Pembentukan matriks dentin melalui diferensiasi odontoblas selama proses mineralisasi dapat diidentifikasi dan dikuantifikasi pada level protein atau ekspresi gen. Beberapa protein yang disekresikan seperti Alkaline Phosphatase (ALP), Collagen Type-1 (Col-1), Dentin Matrix Protein1 (DMP-1), Dentin Sialoprotein (DSPP), Osteonectin (On) dan Osteocalcin (Oc) sering dijadikan biomarker untuk menganalisis aktifitas odontoblas.^(108, 117)

2.5.5.1 Karakterisasi Marker Intraselular ALP

ALP memegang peranan penting pada tahap inisiasi mineralisasi jaringan penyambung. Oleh karenanya, ALP sering digunakan sebagai marker yang diekspresikan selama proses diferensiasi mirip odontoblas secara *in vitro* maupun *in vivo* yang terletak di lapisan pre-odontoblast dan odontoblast. Peningkatan aktifitas ALP seringkali ditunjukkan dengan bentuk diferensiasi odontoblastik. Lopez-Cazaux et al (2006), menunjukkan efek kultur media menghasilkan rangsang aktifitas ALP pada sel pulpa gigi manusia setelah 14 hari dikultur dalam media MEM dibandingkan kultur dalam media RPMI.⁽¹¹⁸⁾ Telah ditunjukkan bahwa dexamethasone, glycolcorticoid, dan dikenal untuk mempengaruhi diferensiasisel lir-osteoblas, dapat merangsang aktifitas ALP setelah 14 hari dikultur.⁽¹³⁵⁾ Tingkat ALP dapat dideteksi untuk bertahan tetap selama fase pertumbuhan sel dan meningkat selama proses diferensiasi, sementara penurunannya dapat diamati setelah konfluens selama periode waktu 3 (tiga) minggu pada saat pembentukan nodul mineral dimulai.⁽¹³⁶⁾

2.5.5.2 Karakterisasi Marker Extracellular

Secara umum, pembentukan matriks ekstraselular memegang peranan penting dalam regenerasi jaringan. DPSC mampu mensintesis matriks khusus mirip dentin. Selama pembentukan *in vivo*, serabut kolagen berubah dari matriks *non calcified* menjadi fase *carbonate-rich apatite mineral* ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) di dalam dan sekeliling serabut kolagen memberikan kualitas rigid dan kuat. Kolagen yang lebih menonjol pada matriks ini adalah Col-1, yang dapat dideteksi secara *in vitro* melalui serangkaian penelitian pada ekspresi gen atau sintesis protein. Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan ekspresi Col-1 selama 14 hari di dalam kultur monolayer, tetapi ekspresi tersebut bertahan sampai waktu 28 hari.⁽¹³⁷⁾

2.5.5.3 Karakterisasi Marker Matriks Molekular

Matriks protein non kolagen yang disekresikan oleh sel lir-odontoblas adalah Osteonectin (On), Osteocalcin (Oc), Dentin Sialoprotein (DSP), Dentin Phosphoprotein (DPP). Seperti halnya Dentin Matriks Protein (DMP-1), DSP dan

DPP merupakan produk transkrip tunggal dari DSPP yang menyandi kedua protein tersebut serta merupakan fenotip marker yang penting dari odontoblas.⁽¹³⁸⁾

Zhang et al (2005) menunjukkan secara jelas interaksi serta tahap yang bergantung dengan tingkat ekspresi gen dari Col-1, DSPP, dan OC. Ekspresi OC meningkat setelah ekspresi Col-1 mencapai maksimal, hal ini menunjukkan bahwa matriks protein telah terbentuk. Selanjutnya peningkatan DSPP setelah 14 hari di dalam kultur dapat dihubungkan dengan matriks kolagen yang termineralisasi pada hari ke 21. Protein matriks dentin-1 (DMP-1) adalah protein non kolagen yang disekresikan oleh sel lir-odontoblas yang merupakan produk transkripsi tunggal penanda fenotip yang penting untuk odontoblas. Ekspresi protein ini akan terlihat setelah 14 hari dan pada saat terjadinya diferensiasi. Walaupun DMP-1 jarang digunakan sebagai marker dentin spesifik untuk mengkarakterisasi diferensiasi DPSC secara *in vitro*, namun keberadaannya akan meningkat pada tingkat ekspresi gen dalam bentuk gumpalan, sedangkan pada kultur monolayer tidak tampak.^(10, 139)

2.6 Kerangka Teori

Radang jaringan pulpa gigi, umumnya disebabkan karena infeksi bakteri pada karies gigi, fraktur gigi atau kondisi lainnya yang mengakibatkan terbukanya pulpa gigi. Untuk menjaga vitalitas jaringan pulpa dan mencegah perubahan patologis jaringan periradikular maka daerah yang terbuka harus ditutup untuk mencegah terjadinya kebocoran bakteri. Penutupan secara alami menurut Kakehashi, 1969 dapat terjadi dalam lingkungan bebas bakteri, dimana jaringan pulpa akan mengalami penyembuhan dengan proses epitelisasi, fibroplasia serta stimulasi sel-sel pulpa ke arah regenerasi jaringan pulpa normal serta proliferasi dan diferensiasi sel-sel odontoblast menuju pembentukan jaringan dentin.

Bila penutupan jaringan pulpa secara alamiah tidak terjadi, maka dilakukan tindakan penutupan dengan menggunakan bahan-bahan kedokteran gigi. Selama ini terdapat dua cara penutupan kebocoran, yang pertama adalah dengan menggunakan bahan yang bertujuan langsung menutup kebocoran diantaranya yaitu amalgam, *composite resin* dan semen ionomer kaca. Namun kekurangan dari bahan-bahan pada sistem ini di antaranya adalah adanya

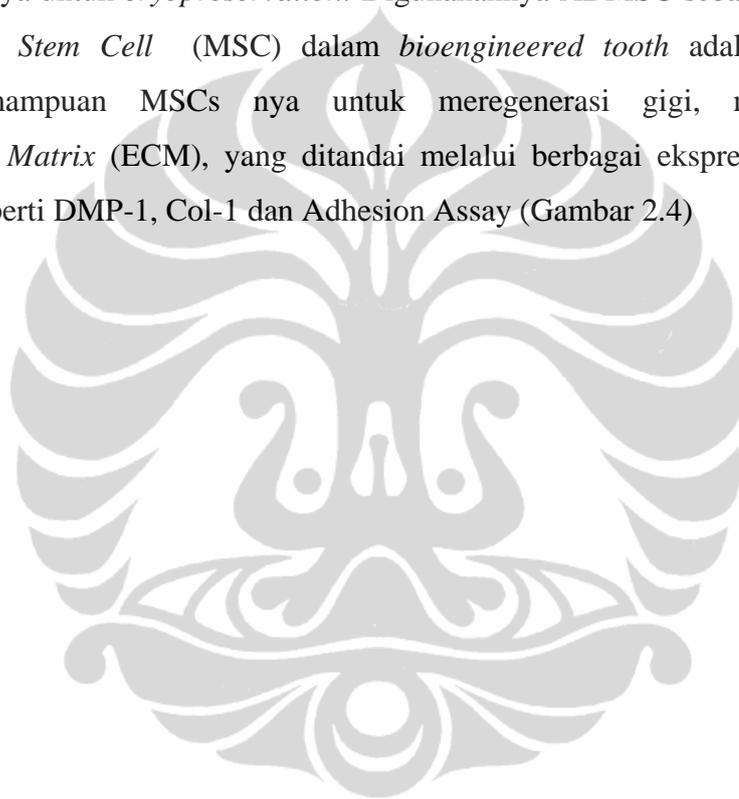
kebocoran mikro, derajat toksisitas yang bervariasi dan sensitif pada kelembaban. Cara penutupan yang kedua adalah dengan menginduksi jaringan keras seperti dentin, jaringan tulang dan sementum, sehingga jaringan keras tersebut nantinya akan dapat menutup kebocoran. Bahan yang biasa digunakan adalah kalsium hidroksida dan MTA.

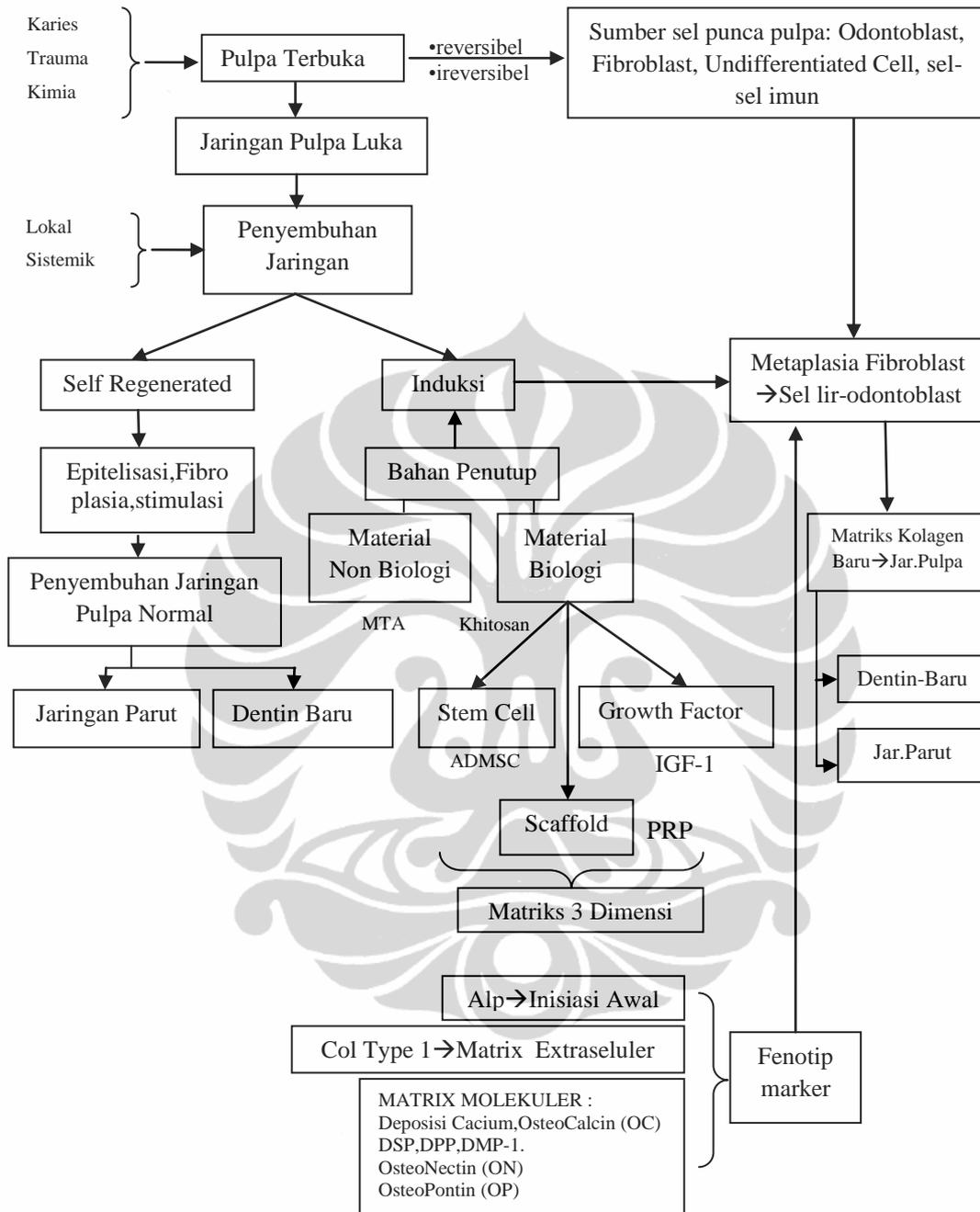
Namun permasalahan yang ada yaitu penentuan penetrasi iritan kedalam pulpa hingga menyebabkan peradangan sampai sejauh mana belum bisa ditentukan secara klinik. Di klinik, umumnya infeksi pulpa gigi bersifat ireversibel akibat letak anatomi serta pengaturannya. Sulit bagi tubuh untuk mengeliminasi infeksi, dimana selanjutnya proses ini akan bertahan dan menjadi buruk. Sekarang ini strategi yang secara luas digunakan dalam klinik adalah mengeluarkan sebagian maupun seluruhnya jaringan pulpa yang mengalami kontaminasi, serta kemudian mengisi dan menutup ruang yang kosong dengan bahan sintetik. Dengan berkembangnya rekayasa jaringan sebagai teknologi biomedik dapat dimungkinkan penggunaan bahan-bahan biomaterial yang tepat untuk memacu sel-sel mengadakan regenerasi jaringan.

Untuk meningkatkan keamanan secara biologis serta menghindari timbulnya reaksi penolakan dari tubuh perlu diteliti dan dikembangkan suatu (*scaffold*) *generation* dari bahan autologus sebagai biomaterial yang dapat menginduksi proses dentinogenesis pada pulpitis reversibel dan pulpitis irreversibel. Dari perpektif aplikasi klinis, produk plasma seperti PRP, PRF dan FG memenuhi hampir semua kriteria persyaratan sebagai bahan perancah. PRP merupakan bahan yang berasal dari jaringan tubuh sendiri (*autologus*) sehingga kecil kemungkinan terjadinya reaksi penolakan, mudah disiapkan untuk keperluan perawatan gigi, kaya akan kandungan *growth factors*, serta mudah terurai dalam jangka waktu yang lama, sehingga diharapkan dapat membentuk matriks fibrin 3D. Namun sampai sekarang, tidak ada publikasi yang mengevaluasi berbagai produk plasma ini sebagai *scaffold generation* pada aplikasi endodontik regeneratif, sehingga hal ini membutuhkan penelitian di masa depan.

Pada teknik rekayasa jaringan, sumber sel sangat penting dan sering menjadi masalah utama. Selama ini penggunaan sel punca dari pulpa gigi sangat

terbatas terutama yang berasal dari sumber autologus, karena tidak setiap orang yang memerlukan perawatan regenerasi memiliki sediaan sel yang siap pakai, di samping itu tahapan proses perkembangan dari benih embrionik gigi tidak mungkin diambil dari pasien di klinik, dan isolasi sel punca gigi lebih baik berasal dari pulpa gigi yang sehat. Karena itulah timbul ide untuk menggunakan MSCs dari jaringan lain termasuk kulit, rambut, sumsum tulang dan jaringan lemak, yang sangat banyak terdapat dalam tubuh serta relatif lebih mudah diambil kapan saja tanpa biaya untuk *cryopreservation*. Digunakannya ADMSC sebagai sumber *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) dalam *bioengineered tooth* adalah dengan melihat kemampuan MSCs nya untuk meregenerasi gigi, membentuk *Extracellular Matrix* (ECM), yang ditandai melalui berbagai ekspresi penanda molekuler seperti DMP-1, Col-1 dan Adhesion Assay (Gambar 2.4)

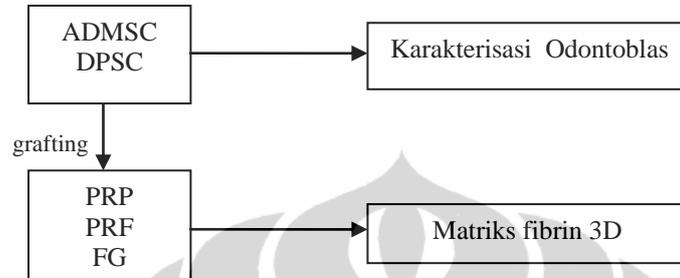




Gambar 2.4. Skema Kerangka Teori
Keterangan: Gambar di atas merupakan ringkasan teori yang mendasari penelitian ini.

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep



Gambar 3.1. Skema kerangka konsep penelitian

Keterangan: Gambar di atas merupakan rangkaian hubungan antar variabel yang akan digunakan dalam penelitian ini.

Kerangka konsep ini merupakan uji *in vitro*, di mana ADMSC dan DPSC ini terlebih dahulu dilakukan uji karakterisasi odontoblas untuk membuktikan bahwa kedua sel punca mesenkimal tersebut mempunyai potensi untuk berdiferensiasi ke arah odontoblas melalui identifikasi penanda fenotip odontoblas yaitu DMP-1 dan COL-1. Selanjutnya ADMSC dan DPSC tersebut di grafting ke dalam masing-masing kelompok *scaffold* PRP, PRF dan FG untuk kemudian menghasilkan matriks fibrin 3D yang merupakan indikasi ke arah proses regenerasi jaringan pulpa dengan uji Adhesi dan Col-1. (Gambar 3.1)

3.2. Identifikasi Variabel

Kerangka Konsep

- Variabel bebas : ADMSC, DPSC, PRP, PRF, FG,
- Variabel terikat : Matriks Fibrin 3D, Karakterisasi sel Odontoblas

3.3 Hipotesis

3.3.1 Hipotesis Umum

3.3.1.1 ADMSC dapat menjadi alternatif sumber sel odontoblas untuk regenerasi jaringan pulpa secara *in vitro*.

3.3.2 Hipotesis Khusus

- 3.3.2.1 ADMSC dapat mensekresikan sitokin yang terkandung dalam media kondisi lemak yang dapat meningkatkan potensi sel tersebut untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke galur odontoblas
- 3.3.2.2 ADMSC mempunyai karakteristik sel punca mesenkhim yang tidak berbeda dengan DPSC.
- 3.3.2.3 ADMSC dan DPSC mempunyai potensi yang tidak berbeda untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke galur odontoblas.
- 3.3.2.4 ADMSC dan DPSC mempunyai potensi yang tidak berbeda dalam menghasilkan matriks ekstraseluler sebagai indikasi proses pembentukan jaringan.
- 3.3.2.5 PRP, PRF dan FG mempunyai potensi yang tidak berbeda sebagai *scaffold* untuk meningkatkan proliferasi dan diferensiasi ADMSC dan DPSC ke arah galur odontoblas.
- 3.3.2.6 ADMSC dan DPSC mempunyai potensi regeneratif yang tidak berbeda melalui analisis produk dari masing-masing sel punca tersebut pada saat berinteraksi dengan dan tanpa scaffold PRP, PRF dan FG.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Untuk mencapai tujuan penelitian yaitu untuk menganalisis potensi ADMSC sebagai sumber odontoblas dengan *scaffold* plasma PRP, PRF dan FG dalam preparasi jaringan pulpa secara *in vitro*, maka dilakukan dalam beberapa tahap penelitian sebagai berikut:

- 4.1.1 Persiapan bahan uji berupa pengumpulan jaringan lemak hasil *liposuction*, dan pengambilan jaringan pulpa dari hasil pencabutan gigi premolar satu/dua, rahang atas/rahang bawah dengan indikasi perawatan orthodonti. Masing-masing jaringan lemak dan pulpa di kultur untuk isolasi dan identifikasi dengan penanda fenotip sel punca mesenkhim STRO-1. Dilakukan ekstraksi protein dari jaringan pulpa untuk kemudian ditambahkan pada kelompok jaringan lemak. Persiapan pembuatan PRP, PRF dan FG yang akan diambil dari vena cubiti darah pasien golongan AB.
- 4.1.2 Uji potensi diferensiasi odontoblas pada kelompok perlakuan ADMSC, ADMSC+Protein pulpa, dan DPSC, masing-masing ditambahkan rhBMP-2, kemudian hasil diferensiasi sel odontoblas di deteksi dengan penanda khusus untuk diferensiasi odontoblas yaitu DMP-1, dan COL-1 pada kelompok ADMSC dan DPSC tanpa perlakuan (kontrol negatif). Di samping itu dari ke tiga kelompok perlakuan tersebut diberikan anti BMP-2 untuk mendeteksi konsentrasi BMP-2 yang terkandung dalam masing-masing sel punca mesenkhim tersebut. Dilakukan analisis media kondisi ADMSC dengan metode *SDS-page*.
- 4.1.3 Proses *grafting* dilakukan pada ketiga kelompok perlakuan yaitu ADMSC, ADMSC+Protein pulpa, dan DPSC segera setelah sediaan plasma selesai, masing-masing dengan kelompok *scaffold* plasma PRP dan PRF dan FG sehingga terbentuk matriks fibrin. Kemudian diuji dengan *Adhesion Assay* dan COL-1 untuk melihat potensi masing-masing sel punca mesenkhim tersebut melekat pada berbagai *scaffold* plasma serta potensi regeneratif masing-masing sel punca tersebut terhadap *scaffold* plasma.

4.2 Sampel Penelitian

- 4.2.1 Sampel ADMSC diperoleh dari pasien dengan indikasi *liposuction*.
- 4.2.2 Sampel DPSC diperoleh dari pencabutan gigi sehat premolar 1/2, rahang atas atau rahang bawah pada pasien dengan indikasi perawatan orthodonti.
- 4.2.3 Sampel PRP, PRF dan FG diperoleh dengan menggunakan sampel darah dari vena cubiti pasien golongan darah AB.

4.3 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Oral Biologi FKG-UI sejak bulan Juli 2010 untuk riset awal kultur DPSC dari pulpa gigi sehat, pulpitis reversibel dan pulpitis ireversibel, isolasi dan identifikasi dengan penanda fenotip sel punca mesenkhim STRO-1, uji aktifitas mineralisasi awal pulpa ALP dan ekstraksi protein pulpa. Sedangkan untuk pengumpulan jaringan lemak dari *liposuction*, kultur, isolasi sampai identifikasi sel punca mesenkhim lemak, persiapan dan pembuatan PRP, PRF dan FG dan uji perlakuan STRO-1, DMP-1, COL-1 dan *Adhesion Assay* untuk ADMSC dan DPSC, serta analisis *SDS-Page* media kondisi lemak dilakukan di RS Moewardi Surakarta, Laboratorium Biomedik FK-UNS, dan Laboratorium Mikrobiologi FKH-UGM, pada bulan April dan September 2011 dalam kurun waktu \pm 10 bulan sampai Februari 2012.

4.4 Kriteria Sampel

4.4.1 PULPA GIGI MANUSIA:

Kriteria Inklusi

1. Pasien muda usia antara 19-40 tahun, gigi premolar 1 /2 indikasi perawatan orthodonti.
2. Pasien sehat, bebas penyakit infeksi dan menular.

Kriteria Eksklusi:

1. Kultur terkontaminasi jamur/bakteri lain, warna media berubah.
2. Sel-sel tidak tumbuh baik pada pasase 1(satu) dan seterusnya

4.4.2 LEMAK MANUSIA:

Kriteria Inklusi

1. Pasien dewasa muda antara 19-40 tahun, indikasi *liposuction*.
2. Pasien sehat, bebas penyakit infeksi dan menular.

Kriteria Eksklusi:

1. Kultur terkontaminasi jamur/bakteri lain, warna media berubah.
2. Sel-sel tidak tumbuh baik pada pasase 1(satu) dan seterusnya

4.4.3 PLASMA DARAH (GEL PRP,PRF dan FG)

Kriteria Inklusi

1. Pasien dewasa muda antara 19-40 tahun.
2. Pasien sehat, golongan darah AB, bebas penyakit infeksi dan menular.

Kriteria Eksklusi : Tidak terbentuk gel.

4.5 Definisi Operasional

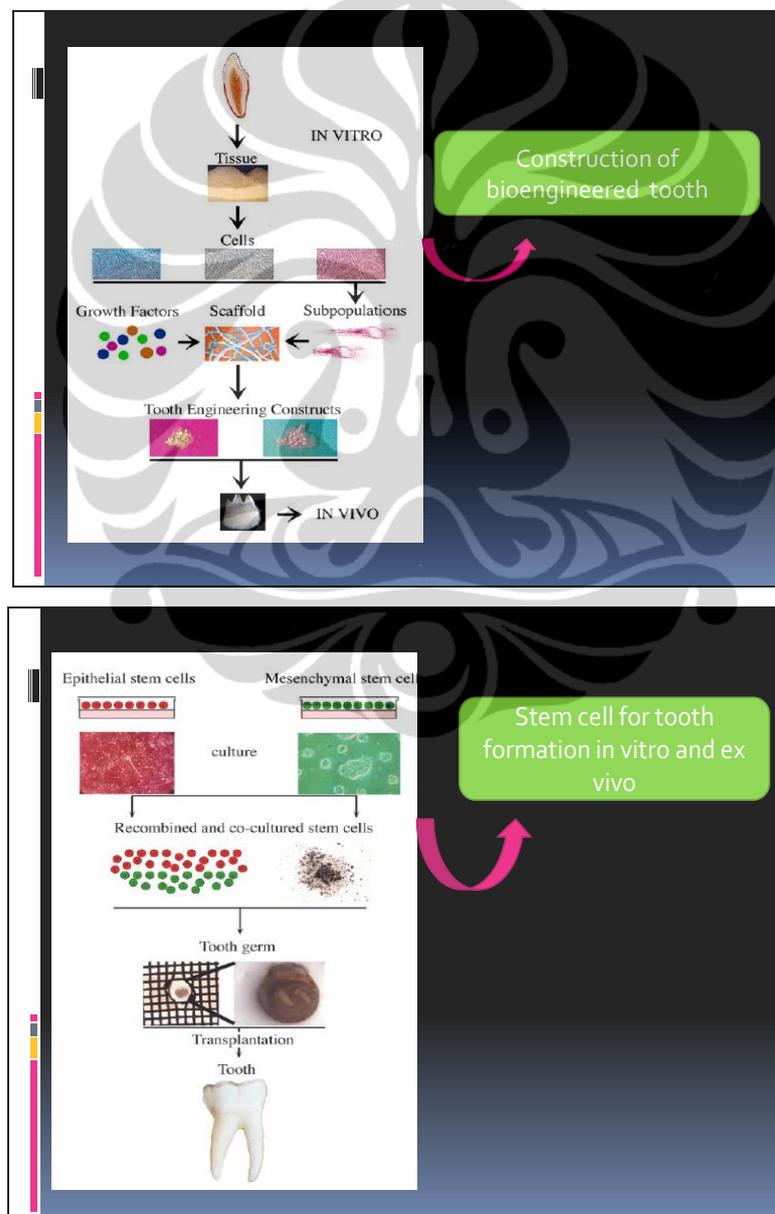
Variabel bebas dan terikat dapat dilihat pada tabel 4.1

Tabel 4.1 Definisi, cara pengukuran dan skala ukur

VARIABEL	DEFINISI	CARA PENGUKURAN	SKALA
ADMSC	Sel punca yang diperoleh dari isolasi dan identifikasi jaringan lemak manusia dewasa muda usia 19-40 tahun yang dipropagasi secara <i>in vitro</i> dan dideteksi dengan penanda molekuler Stro-1	Pemeriksaan Imunositokimia Cell count ; <i>Image J cell counting</i>	Numerik
DPSC	Sel punca yang diperoleh dari isolasi dan identifikasi jaringan pulpa gigi dewasa muda (19-40 tahun) dideteksi dengan penanda molekuler Stro-1 yang dipropagasi secara <i>in vitro</i> .	Pemeriksaan Imunositokimia Cell count ; <i>Image J cell counting</i>	Numerik
Karakterisasi sel Odontoblas	Cara identifikasi produk akhir differensial dari sel punca lemak dan sel punca pulpa dengan induktor rhBMP-2 melalui penanda molekuler DMP-1,Col-1,	DMP-1: Pemeriksaan Imunositokimia Cell count: <i>Image J cell counting</i> Col-1: <i>Elisa Assay</i>	Numerik
Gel PRP	Kombinasi PRP dengan gel yang dibuat dari PPP yang diaktifkan dengan penambahan thrombin dan calcium chloride, melalui proses sentrifugasi darah vena cubiti manusia dewasa muda (19-40 tahun) dengan hasil akhir berbentuk gel matriks.	Konsentrasi Juta platelet / mikroliter	Kategorik gel ya/tidak
PRF	Membran fibrin yang dibuat melalui proses sentrifugasi sampel darah vena cubiti manusia dewasa muda usia 19-40 tahun dengan proses pendinginan bertahap dan bebas anti koagulan	Konsentrasi Juta platelet / mikroliter	Kategorik gel ya/tidak

Fibrin Glue	Pellet yang terkandung dalam plasma darah setelah melalui proses sentrifus sampel darah vena cubiti manusia usia 19-40 tahun	Konsentrasi Juta platelet / mikroliter	Kategori gel ya/tidak
Matriks Fibrin 3D	Substansi matriks hasil grafting <i>in vitro</i> dari sel punca lemak dan sel punca pulpa dari jaringan donor manusia, kemudian dikultur pada matriks fibrin PRP ,PRF, dan FG untuk mendukung diferensiasi sel membentuk matriks ekstraselular jaringan.	<i>Adhesion Assay</i> : MTT Col-1: <i>Elisa assay</i>	Numerik

Dasar-dasar Penelitian:

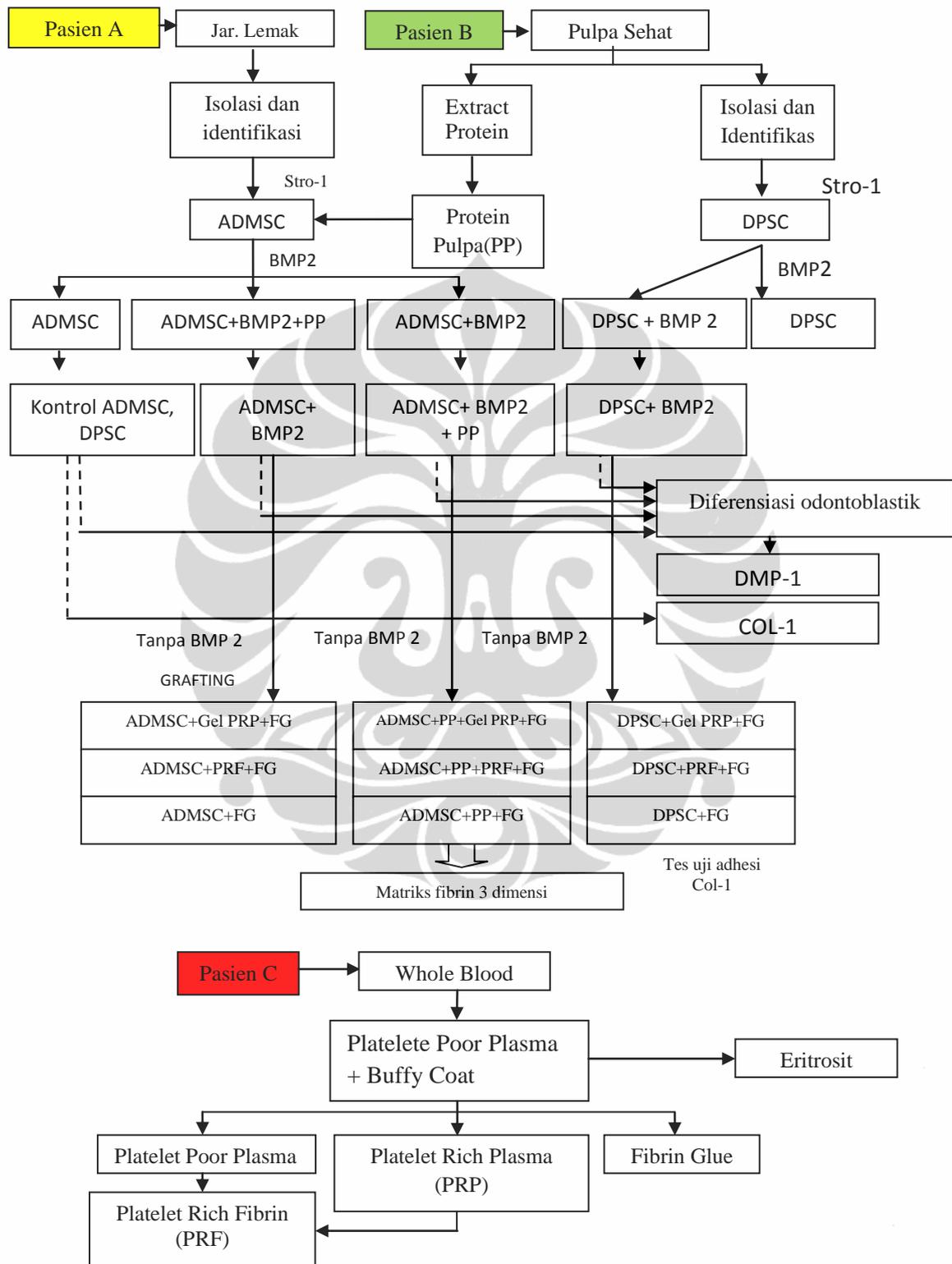


Gambar 4.1. Dasar-dasar Penelitian ⁽¹³⁸⁾

Keterangan: skema di atas menjadi landasan teori yang mendasari alur penelitian ini.

4.6 Alur penelitian

Alur penelitian tahap 1, 2, 3 dapat dilihat pada gambar 4.2 di bawah ini.



Gambar 4.2. Skema alur penelitian *in vitro*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Kultur Adipocyte Derived Mesenchymal Stem Cell

Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat: RS. Moewardi Surakarta (*liposuction*)

Laboratorium Biomedik FK-UNS Surakarta

Laboratorium Mikrobiologi FKH-UGM

Waktu: April 2011

Bahan dan Alat

Bahan:

1. Media kultur lengkap lemak (DMEM *high glucose*)
2. Media transport lemak (PBS, Fungizone, Penstrep)
3. Media kolagenase stock (Collagenase stock 0.2% dari 0.5%)
4. Media pemeliharaan lemak (DMEM *low glucose*, Penstrep, Fungizone)
5. Media untuk differensiasi lemak (DMEM + BMP-2)

Alat:

1. 200 ml botol plastic sentrifugasi
2. 0,2 um unit filter
3. 50 ml conical tubes
4. 2 ml tubes
5. Gunting
6. Haemocytometer
7. Alcohol container
8. Mikroskop inverted (Nikon Eclipse TS100)
9. Shaking water bath
10. Sentrifus
11. Biosafety Cabinet
12. Inkubator CO₂
13. Syringe filter
14. Kultur flask kecil
15. Kultur flask besar
16. Pipet steril
17. 4 (empat), 6 (enam) dan 24 (dua puluh empat) kultur disk

18. Conical 15 ml dan 50 ml

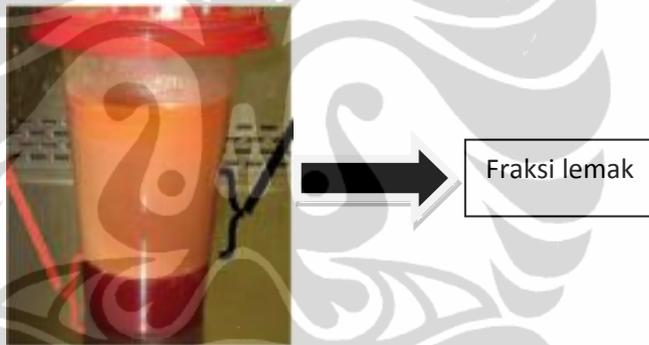
19. Eppendorf 1.5 ml

4.7.1.1. Tahap pengumpulan sampai dengan isolasi jaringan lemak:

Pengumpulan jaringan lemak hasil *liposuction*:

1. Lipid + Tumessen disimpan dalam media transport DMEM High Glucose, dengan penambahan antibakteri dan antinikotik dengan konsentrasi masing-masing 4%.
2. Pemisahan Lipid dan Tumesen:, kemudian diperoleh *stromal vascular fraction* yang baru (SVF), dapat melalui dua metode yaitu dengan enzymatic atau non enzymatic.

Standard (Enzymatic method)



Gambar 4.3. Hasil pengumpulan lemak dari *liposuction*.

Lipoaspirate di diamkan selama 10 menit dalam posisi tegak, kemudian fraksi tumessen dipindahkan ke dalam tabung steril yang lain (Gambar 4.3). Fraksi lemak ditinggalkan, kemudian dicuci dengan PBS 4-7 kali sampai bersih. Fraksi lemak dipindahkan ke dalam petri steril, di resuspensi dengan kolagenase 0.2% (1:1). dan diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam. Digoyang secara manual tiap 15 menit selama 5-10 menit dan kolagenase dinetralisasi dengan FBS 10% (1:2). Fraksi lemak disentrifugasi dengan kecepatan 400 g selama 10 menit, buang supernatant dan dilakukan resuspensi pellet dengan media kultur. Proses yang sama diulang dua kali selanjutnya pellet diresuspensi dengan media kultur dan dilakukan fortteks. Selanjutnya pellet dipindahkan ke dalam flask kultur dengan teknik tetesan bergantung. Kemudian diinkubasi selama sepuluh menit pada

inkubator dengan 37C 5% CO₂, dan ditambahkan 4ml media lengkap ke dalam flask kultur dan inkubasi selama 24 jam.

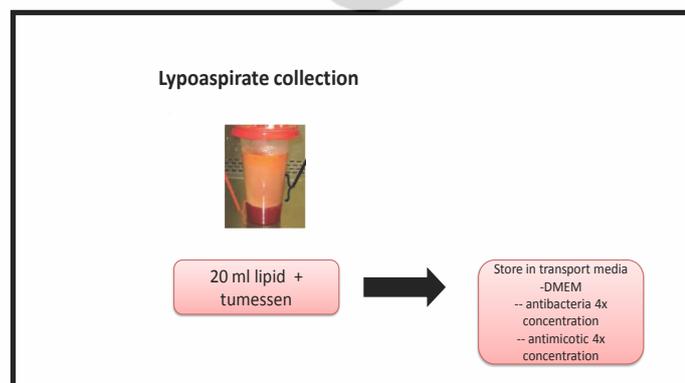
Kegiatan pengamatan sel setelah inkubasi 24 jam dan penggantian media adalah pengamatan sel dengan mikroskop inverted, penambahan media serta inkubasi kembali pada inkubator 37C 5% CO₂

4.7.1.2 Tahap ekspansi sel dan analisis potensi diferensiasi.

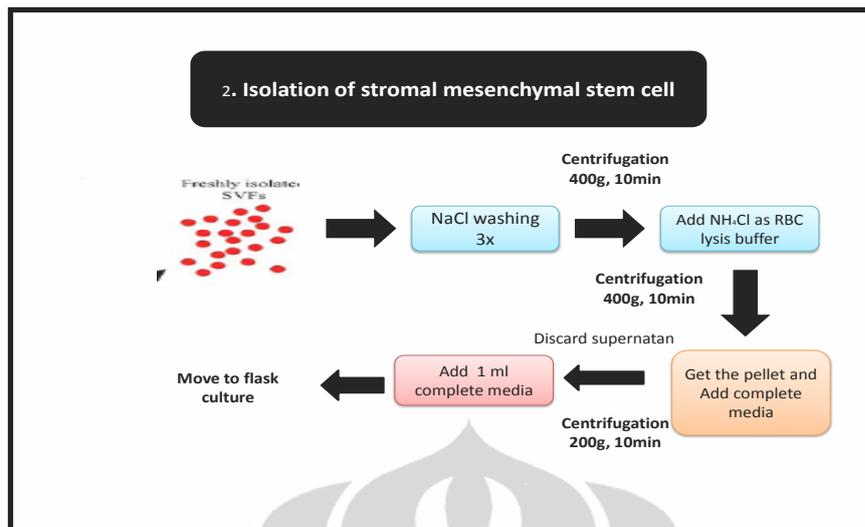
Pada tahap ini, dilakukan penggantian media setiap 2 sampai dengan 3 hari sekali dengan DMEM, 10% FBS, 1% Penstrep dan 1% Fungizone. ADMCs akan mengalami ekspansi dengan mudah dan memperlihatkan karakteristik jaringan mesodermal yang khas yaitu menempel pada permukaan plastik serta membentuk koloni mirip fibroblast (CFU-F). Sel-sel ini akan mencapai tingkat konfluensi sebesar $\pm 80\%$ dalam 7(tujuh) hari setelah kultur dan dengan mudah dapat dilakukan subkultur setiap 1 bulan sampai passase ke empat.(Gambar 4.4,4.5,4.6)

4.7.1.3 Tahap Identifikasi ADMSCs

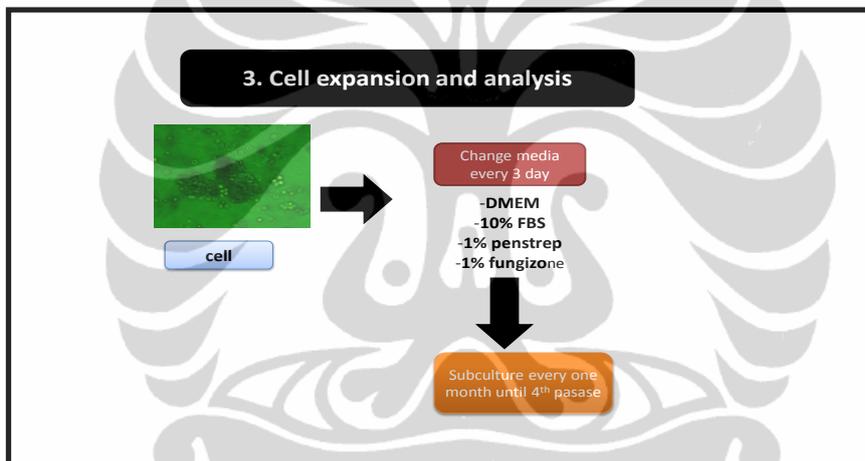
Pada tahap ini dilakukan identifikasi MSCs dengan Stro-1/CD34-, melalui pemeriksaan imunositokimia. Setelah passase ke empat sel dimasukkan ke dalam flask inkubasi selama 72 jam baru kemudian sel lemak siap untuk dilakukan proses differensiasi menjadi odontoblas.(Gambar 4.7)



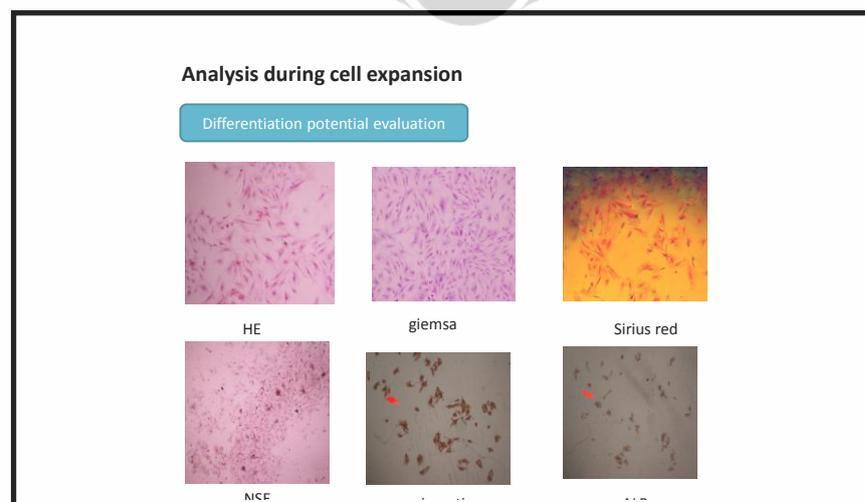
Gambar 4.4. Pengumpulan lemak hasil *liposuction* sampai pada proses penyimpanannya



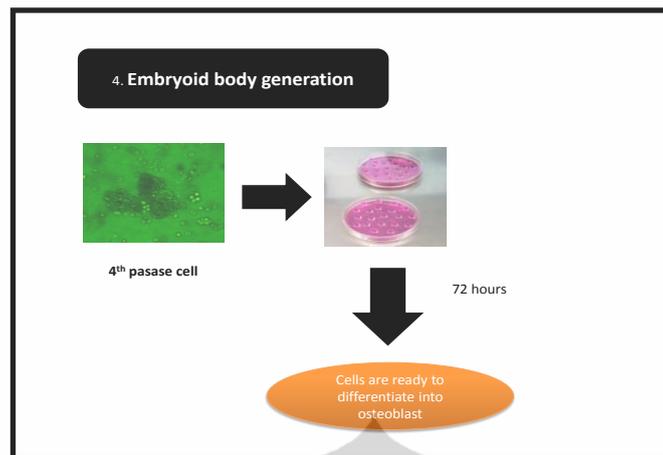
Gambar 4.5. Rangkaian proses isolasi stromal mesenchymal stem cell lemak sampai pada kultur.



Gambar 4.6 Proses ekspansi ADMSC sampai pada subkultur passase keempat



Gambar 4.7 Analisis ADMSC selama proses ekspansi berlangsung



Gambar 4.8. Proses persiapan ADMSC untuk diferensiasi ke arah sel yang diharapkan.

4.7.2 Kultur Dental Pulp Stem Cell

Tempat: Laboratorium Oral Biologi FKG UI

Waktu: Juli 2010

Bahan dan Alat

Bahan:

1. Medium kultur : Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), rendah glukosa dan mengandung : L-Glutamine, 110 mg/l Sodium Pyruvate dan Pyridoxine Hydrochloride (Gibco, UK)
2. NaHCO₃
3. Milli Q water
4. Penicilin – Streptomycin
5. Fetal Bovine Serum (FBS)
6. Gigi utuh yang baru diekstraksi
7. Trypan Blue (Gambar 4.9, 4.10)

Alat:

1. Mortar dan pestle
2. Tube 50 ml
3. Centrifuge (Sorvall)
4. 24 well plate
5. Pipettor
6. Hemocytometer

7. Mikroskop (Nikon Elipse 80i)
8. Inkubator (Memert)
9. Biosafety Cabinet
10. Sedotan dengan diameter 4 mm
11. Pinset (Gambar 4.9, 4.10)

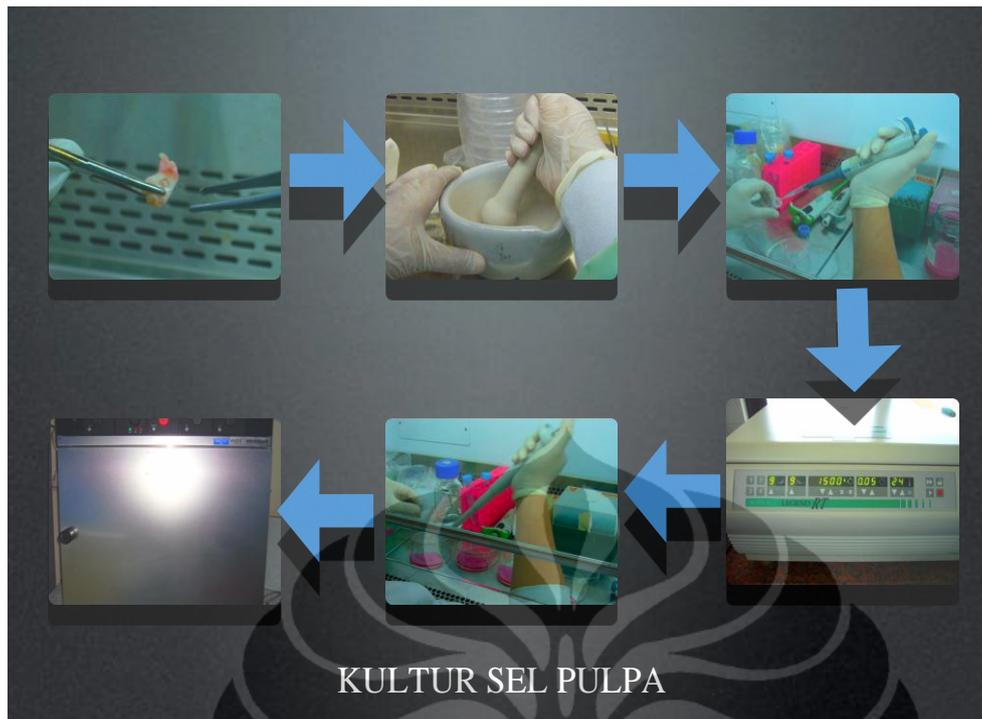


Gambar 4.9. Peralatan dan bahan yang diperlukan untuk kultur sel punca pulpa



alat-alat

Gambar 4.10 Peralatan laboratorium untuk melakukan kultur sel punca pulpa



Gambar 4.11 Proses isolasi sel punca pulpa dari jaringan pulpa.

4.7.2.1 Pengumpulan sampai dengan isolasi pulpa gigi

1. Gigi utuh yang baru diekstraksi (kurang dari 6 jam), dipecahkan dengan menggunakan *mortal* dan *pastle*. Jaringan pulpa gigi diambil dan dipindahkan ke dalam *tube* yang berisi medium kultur lengkap. Kemudian dilakukan *pipetting* untuk memisahkan ikatan antarsel. Selanjutnya, Jaringan pulpa dicuci 2 kali dengan cara disentrifugasi (2000 g/menit) selama 10 menit. Setelah itu, *supernatant* dibuang dan *pellet* dilarutkan dengan medium kultur lengkap. Kemudian dimasukkan kedalam petri disk. (Gambar 4.11)
2. Kultur sel yang digunakan dalam percobaan adalah kultur sel yang telah dipanen 4-5 kali (*passages*). Kemudian dilakukan penghitungan jumlah sel/ml dengan *trypan blue exclusion test* menggunakan hemocytometer yang diamati dibawah mikroskop dengan objektif 20x. Sel dikultur pada 96 *well plate* dan setiap *well* berisi 1×10^6 sel/ml dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO_2 selama 24 jam.
3. Dilakukan identifikasi MSCs dengan Stro-1/CD34- melalui pemeriksaan imunositokimia.

4.7.3 Pembuatan Isolasi Protein sel pulpa dengan menggunakan Trizol

Bahan Dan Alat

- Set sentrifuge 4°C
- Isopropanol
- 0.3M Guanidine HCL dalam 95% ETOH
- Ethanol
- 1% SD5

4.7.3.1 Tahap Isolasi Protein Jaringan Pulpa:

- Homogenisasi

Jaringan pulpa langsung dilarutkan dalam piring kultur dengan menambahkan 1 ml Trizol ke dalam piring ukuran diameter 3.5 cm. Sel dilarutkan beberapa kali melalui pipet.

- Fase Separasi

Sampel yang sudah homogen diinkubasi selama 5 menit pada suhu 15-30°C. 1 ml sampel yang homogen tersebut dimasukkan ke dalam tabung epis. Kemudian ditambahkan 0.2 ml Chloroform/1 ml Trizol. Dikocok kuat dengan tangan selama 15 detik, kemudian diinkubasi selama 2-3 menit pada suhu 15-30°C. Sampel disentrifus pada kecepatan 12.000 xg selama 15 menit pada suhu 4°C.

- Presipitasi DNA

Sisa lapisan atas dipindahkan di atas lapisan interfase. Kemudian tambahkan 0.3 ml 100% ethanol/1ml Trizol, dan dicampur dengan cara membalikkan tabung. Sampel disimpan selama 2-3 menit pada suhu 15-30°C. Disentrifus pada 2000 xg selama 5 menit pada suhu 4°C.

- Presipitasi Protein

Supernatan phenol ethanol dipindahkan dari tahap ke 3 ke tube yang baru. Kemudian tambahkan 1.5 ml Isopropanol, sampel disimpan selama 10 menit pada suhu 15-30°C, disentrifus pada 12 000 xg, selama 10 menit, 4°C.

- Pencucian Protein

Supernatan di pindahkan, kemudian pellet dicuci tiga kali (mengandung 0.3M Guanidine HCL dalam ETOH 95%). Kemudian tambahkan 2 ml Guanidine/1 ml Trizol. Selama periode putaran, pellet protein disimpan selama 20 menit pada suhu 15-30°C. Sentrifus pada 7500 xg pada 4°C selama 5 menit.

- Pemisahan Pellet Protein

Keringkan dengan vacum pellet protein selama 5-10 menit. Larutkan dalam larutan SDS 1% dengan pipeting sampai larut semuanya. Sampel diinkubasi pada suhu 50°C. Kemudian disentrifus 1000 xg selama 10 menit pada suhu 4°C, supernatant dipindahkan ke tabung sentrifus, disimpan pada suhu 20°C untuk waktu yang lama.

Sampel Supernatan

→ tak berwarna → RNA
 Phenol chloroform interfase → DNA
 Lower Red → PROTEIN



Difilter dengan milipore 0.22um

4.7.4 Persiapan pembuatan Platelet Rich Plasma (PRP), Platelet Rich Fibrin (PRF) dan Fibrin Glue (FG).

Tempat: Laboratorium Biomedik FK-UNS

Waktu: September 2011

Bahan dan Alat

Bahan:

1. Salep anestesia
2. Betadine
3. Aquadest steril
4. Alkohol 70%
5. Antikoagulan Citrat Dextrose 10%
6. Calcium Glukonas

Alat:

1. Semprit 10 cc/20 cc/ 25cc/50 cc atau jarum Butter fly 19
2. Pengikat lengan saat pengambilan darah vena
3. Sentrifus : bisa menggunakan yang otomatis atau yang manual (dengan penyesuaian pengaturan)
4. 4 (empat) tabung 10 ml dengan tutup kuning (BD) yang mengandung ACD-3,8% atau Falcon yang diisi dengan CPD-A (dengan catatan kekuatannya menurun 10%)

5. 6 (enam) tabung 10 ml yang tidak mengandung antikoagulan (tutup merah) atau falcon steril.
6. 2 (dua) jarum yang tumpul (63 ml dan 73 ml) / Yelco yang tumpul no 14/16.
7. 1 (satu) flacon Ca Cl₂ 10%
8. 6 (enam) semprit 5 ml, 6 (enam) semprit 1 ml lebih baik insulin (panjang jarum 0,33 ml dan nomer jarum 30G)
9. 4 (empat) mangkok steril untuk PRP dan PPP dan untuk serum
10. 4(empat) mangkok kaca steril
11. Rak untuk tabung
12. Colla tape / neo tape (penutup luka yang mengandung collagen).

4.7.4.1 Pembuatan Gel PRP untuk uji adhesi *in vitro*

Buffer sitrat 0.7ml dimasukkan ke dalam semprit 5 ml, kemudian darah diambil dari vena cubiti dan dicampurkan rata. Darah dimasukkan ke dalam tabung sentrifus steril, diputar dengan kecepatan 1700 rpm selama 10 menit. Tabung diambil dari sentrifus, kemudian akan terlihat tiga lapisan yaitu bagian atas berupa cairan plasma, di bagian tengah terdapat bagian berwarna putih (buffy coat), serta di bagian bawah adalah sel darah merah.(Gambar 4.12) Plasma dan buffy coat dipindahkan ke dalam tabung steril yang baru kemudian diputar dengan kecepatan 3500rpm selama 10 menit untuk mengendapkan platelet, kemudian terbentuk 2 lapisan yaitu plasma dan endapan pellet pada bagian bawah. Plasma bagian atas dibuang stengahnya, kemudian dilakukan pipetting pada plasma dan pellet agar homogen, sediaan PRP telah selesai. Pembuatan gel PRP dilakukan menjelang perlakuan (adhesi sel ke *scaffold* biomaterial). (Gambar 4.14 sampai dengan gambar 4.21).

4.7.4.2 Pembuatan PRF

Darah 10 cc diambil dengan semprit steril, kemudian dipindahkan ke dalam tabung sentrifus 15 ml tanpa antikoagulan. Selanjutnya diputar dengan kecepatan 200g selama 10 menit pada suhu 25 °C. Darah yang telah disentrifus dibiarkan pada posisi tegak selama 15-30 menit sampai terlihat tiga lapisan

yang terdiri dari serum supernatant, PRF, dan eritrosit. Kemudian diangkat PRF dengan hook steril, lalu pindahkan ke petri yang berisi gauze steril. Keringkan PRF dengan gauze, dipotong-potong dengan diameter 1.5 (sesuai ukuran plate multiwell 24 dan ketebalan 3mm).

4.7.4.3 Pembuatan Lem Fibrin

Darah diambil kemudian ditambahkan dengan sodium sitrat steril dengan perbandingan 1:4. Kemudian dimasukkan dalam falcon 45ml, biarkan selama 24 jam pada suhu 4⁰C maksimal sepuluh hari. Dilakukan sentrifus 40G, supernatant (plasma) dikeluarkan, dipindahkan dalam falcon baru (jika darah sudah mengendap plasma langsung diambil, sisanya disentrifus dan plasma kemudian diambil kembali. Plasma dimasukkan dalam freezer dengan suhu -80⁰C selama 24 jam. Kemudian plasma dithawing dalam suhu 60⁰C selama 12 jam. Selanjutnya plasma di sentrifus 6500G selama 5 menit pada suhu 4⁰C dalam *refrigerated sentrifus*. Plasma diambil dengan hati-hati untuk detripsinasi atau bagian dari kultur medium. Pellet yang tertinggal adalah *fibrin glue* yang siap dipakai (hasilnya biasanya sekitar 1/25 vol darah). Bila belum dipergunakan dapat disimpan dalam freezer pada suhu -30⁰C selama 5 tahun. Apabila setelah disimpan pellet akan digunakan kembali, maka pellet dithawing pada air mengalir pada suhu 37⁰C selama 10 menit.

4.7.4.4 Mempersiapkan Autologous Thrombin (aktivasi dengan Gluconas Calcicus)

Tabung Falcon steril (15ml) yang telah diisi dengan anti koagulan citrat dextrose (10%) diisi dengan darah manusia 10 ml. Kemudian dilakukan sentrifus pada kecepatan 300 g / 10 menit yang bertujuan memisahkan sel darah merah dengan plasma. Plasma terdiri dari dua lapisan yang tepat diatas bekuan darah: intermediate zone (buffy coat) lapisan tipis agak keruh mengandung sel darah putih terutama lekosit dan sel platelet (trombosit) yang besar. Diatas buffy coat PRP dan PPP merupakan cairan plasma yang nampak lebih terang. Plasma dihisap perlahan sebanyak 500 ul, dan dimasukkan kedalam vacutainer yang tidak mengandung antikoagulan, selanjutnya diberi tanda kode A digunakan untuk

mempersiapkan autologous thrombin. Sisa volume plasma termasuk buffy coat dimasukkan kedalam vacutainer tanpa anticoagulan selanjutnya diberi kode B digunakan untuk mempersiapkan PRP, didiamkan pada temperatur kamar 30 C. Pada Tabung A (yang berisi 500 ul Plasma) ditambahkan 300 ul Calcium Gluconas (Plasma 5 : Calcium Gluconas 3) kemudian dilakukan agitasi/vortex selama 10 detik dan didiamkan selama 15 menit pada temperatur 37 °C. Setelah itu kedua tabung baik A dan B dilakukan pemusingan lagi pada 640 g /10 menit. Tabung A yang berisi plasma kaya akan thrombin digunakan seluruhnya sedangkan pada tabung baru C dicampur 2 bagian PRP (Tabung B) dengan 1 bagian PRT (Plasma rich thrombin) (Tabung A), kemudian bagian PRP : PRT= 2 : 1 dilakukan vortex selama 10 detik. Selanjutnya didiamkan selama 40 menit pada temperatur kamar, untuk mendapatkan gel PRP.

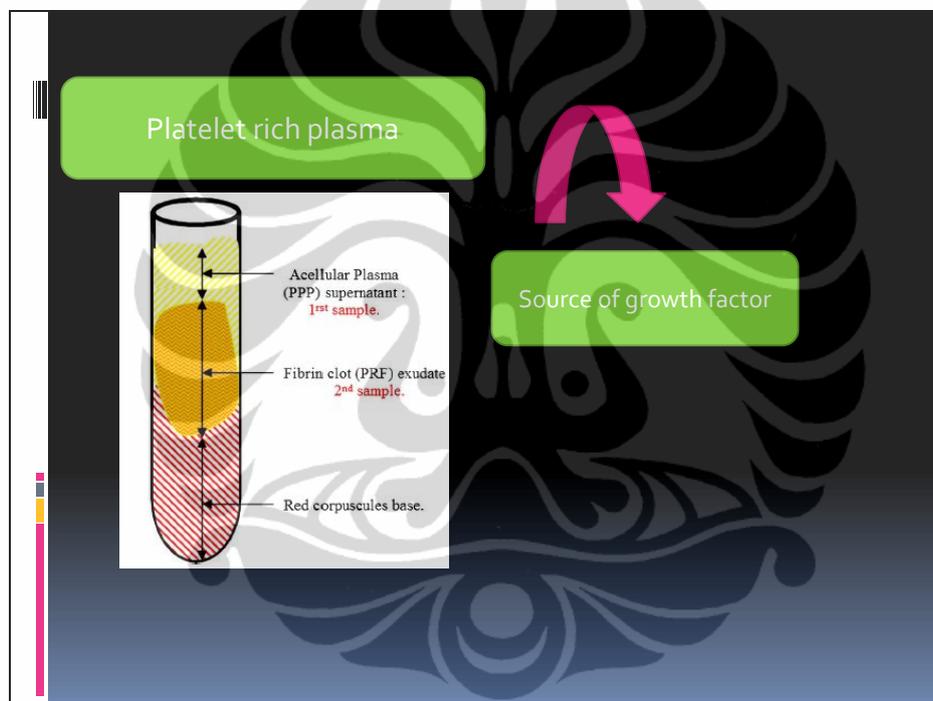
4.7.4.5 Pelapisan biomaterial *scaffold* (plastic/tegaderm/PRF) dengan lem fibrin

Scaffold biomaterial dicetak sesuai dengan ukuran sumuran multiwell plate 24, PBS dimasukkan ke dalam sumuran dengan menggunakan pipet, kemudian dimasukkan *scaffold* biomaterial sampai posisinya tepat pada dasar sumuran, kemudian PBS dikeluarkan kembali dan dibuang. Dilakukan sterilisasi multiwell dengan UVC selama 30 menit dan pelapisan lem fibrin dilakukan dengan cara memasukkan 40ul lem fibrin kedalam sumuran yang sebelumnya telah dilapisi biomaterial *scaffold*, kemudian *multiwell plate* dimasukkan kedalam inkubator selama semalam. Setelah semalam inkubasi, dimasukkan 40ul sel yang akan ditempelkan pada *scaffold* biomaterial tersebut kedalam masing-masing sumuran, kemudian ditambahkan 1ml medium lengkap. Selanjutnya sel diinkubasi dalam CO₂ 5% dan suhu 37⁰C selama 72 jam.

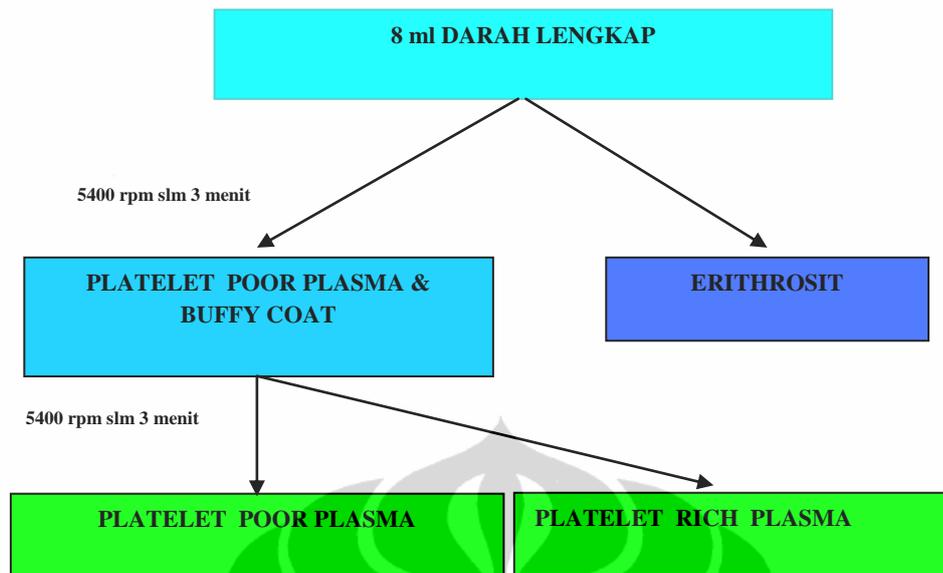
4.7.4.6 Pelapisan biomaterial *scaffold* (plastik/tegaderm/PRF) dengan Gel PRP

Scaffold biomaterial dicetak sesuai dengan ukuran sumuran multiwall plate 24. PBS dimasukkan ke dalam sumuran dengan menggunakan pipet kemudian masukkan biomaterial *scaffold* sampai posisinya pada dasar sumuran, kemudian

PBS dikeluarkan kembali dan dibuang. Dilakukan sterilisasi multiwell dengan UVC selama 30 menit dan pelapisan lem fibrin dilakukan dengan cara memasukkan PRP sesaat sebelum sel ditempelkan, yaitu dengan memasukkan 20ul PRP kedalam masing-masing sumuran, kemudian ditambahkan 20ul Ca glukonas dan dilakukan pipetting. Setelah semalam inkubasi, dimasukkan 40ul sel yang akan ditempelkan pada *scaffold* biomaterial tersebut kedalam masing-masing sumuran, kemudian tambahkan 1ml medium lengkap. Selanjutnya sel diinkubasi dalam CO₂ 5% dan suhu 37⁰C selama 72 jam.



Gambar. 4.12 Produk akhir dari proses pembuatan produk plasma



Gambar 4.13 Langkah-langkah mempersiapkan pembuatan produk plasma



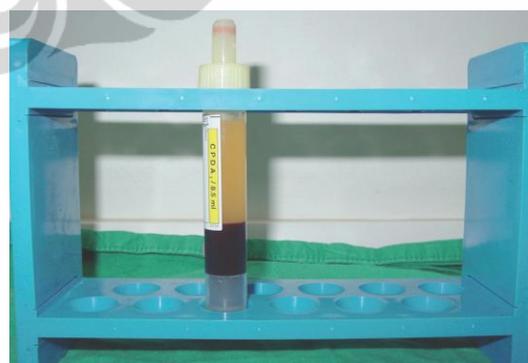
Gambar 4.14. Color Coded PRP Kit



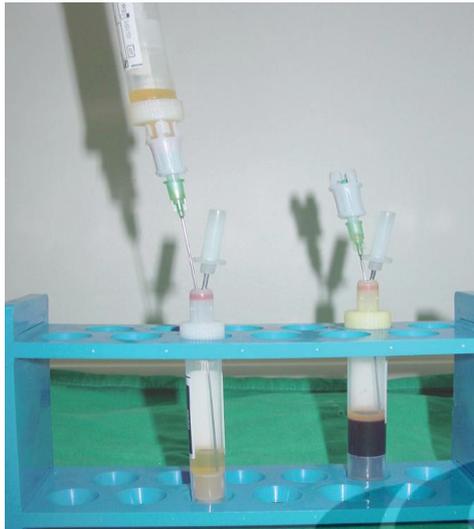
Gambar 4.15 Pengambilan sampel darah pasien di Dental Unit



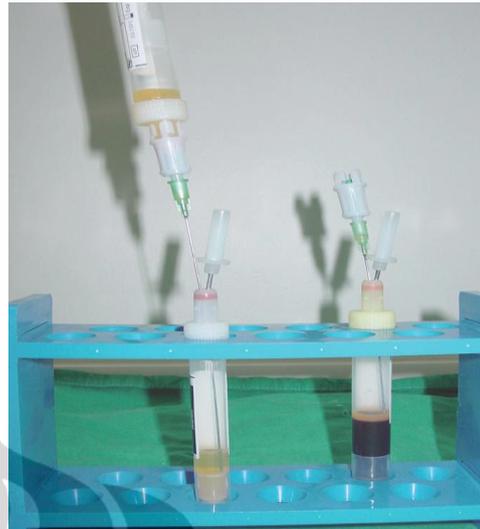
Gambar 4.16 Tube di sentrifus pertama



Gambar 4.17 . Setelah sentrifus pertama: erithrosit terkumpul pada dasar tube



Gbr.4.18 Pengeluaran supernatan oleh kanula



Gbr 4.19 . PRP (dalam semprit) dan PPP (dlm tube sentrifus).



Gbr 4.20. Setelah sentrifugasi ke dua: pengeluaran PRP dengan kanula panjang bedah



Gbr 4.21. Pencampuran PRP dengan CaCl dan Thrombin untuk menutupi defek (Sumber : Journal of the Canadian Dental Association)

4.7.5 Prosedur Kerja

4.7.5.1 Prosedur Kerja Pengukuran BMP-2

Alat Dan Bahan:

1. 1 botol wash buffer isi 20 mlg
2. Assay diluent
3. Stop solution
4. Callibrator diluent 20 mL yang kemudian diencerkan menjadi 200mL
5. Larutan substrat : berisi campuran reagen A dan B
6. BMP 2 standar isinya 1 mL yang kemudian di tambah dengan calibrator diluents sehingga kadar menjadi 20.000 pg/mL sebagai standart A

7. Dari tabung no 4 diambil 500 mL (micron) ke dalam tabung yang berisi 1 ml sehingga mempunyai kadar 4000 pg/mL sebagai standar B
8. Dari tabung no 5 diambil 500 mikron ke dalam tabung berisi 1 ml sehingga mempunyai kadar 2000 pg/ml
9. Demikian seterusnya sampai 7 tabung dijadikan standar.

Setelah semua siap dilakukan *assay*

Dimasukkan 100 mikron *assay diluent* ke dalam sumuran, kemudian ditambahkan 50 mikron standar (tabung A s/d G) dan sampel diinkubasi selama 2 jam, dicuci sebanyak 4 kali dengan *wash buffer* tiap sumuran 450 mikron. Ditambahkan 200ml conjugate, kemudian dicuci sebanyak 4 kali dengan *wash buffer* tiap sumuran 450 mikron. Setelah ditambahkan 200 mikron larutan substrat, selanjutnya diinkubasikan selama 30 menit dan ditambahkan dengan 50 mikron stop solution. Pembacaan nilai OD dengan panjang gelombang 450 nm dengan menggunakan *ELISA reader*.

4.7.5.2 Prosedur Kerja Pengukuran DMP-1

Bahan:

1. DMEM HG
2. 1% FBS
3. 1% Penstrep
4. 1% Fungizone
5. rhBMP-2 10 ng/ml

Cara Kerja

Sel ditanamkan dalam disk, kemudian diinkubasikan dengan media DMEM 10% dan FBS selama 24 jam. Media dikeluarkan dan diinkubasi kembali dalam media DMEM bebas serum (DMEM+1%FBS+1% P/S+1% Fungizone) selama 24 jam. Setelah mencapai tingkat konfluensi sebesar 60-70% media dikeluarkan kembali. Kemudian diganti dengan media perlakuan rhBMP-2 selanjutnya diinkubasi 24 jam.

4.7.5.3 Protokol Imunositokimia: Anti Stro-1, Anti DMP-1

1. Sampel difixasi dengan *cold methanol* selama 10 menit pada suhu 4°C.
2. Kemudian methanol dikeluarkan, setelah itu diteteskan dengan H₂O₂ 3% selama 15-20 menit, Selanjutnya H₂O₂ tersebut dikeluarkan, dicuci dengan aquades dan dibilas PBS selama 3-5 menit sebanyak 2 kali.
3. Sampel diteteskan dan diinkubasi dengan bloking serum ± 10 menit tanpa dicuci. Kemudian bloking serum dikeluarkan selanjutnya diteteskan dengan anti Stro-1/ anti DMP-1 masing-masing, diinkubasi selama 1 jam dan dikeluarkan, dicuci dengan PBS 2 kali selama 3-5 menit.
4. Sampel diteteskan antibodi sekunder (Biotin) selama 15 menit, kemudian dikeluarkan dan dicuci dengan PBS selama 3-5 menit sebanyak 2 kali.
5. Sampel diteteskan dengan Streptacidin HRP selama 10 menit , kemudian dikeluarkan dan dicuci dengan PBS selama 3-5 menit sebanyak 2 kali.
6. Sampel diteteskan dengan Khromogen DAB dengan perbandingan 1:50, selanjutnya diinkubasi selama 10 menit.
7. Dicuci dengan air selama 5-10 menit, di counterstain dengan Hematoxilin ± 4 menit, dikeluarkan dan dicuci dengan air, dilakukan hidrasi dengan alkohol 70%, dan 96%.
8. Dilakukan penghitungan sel dengan menggunakan program Image J counting cell untuk masing-masing hasil Stro-1 dan DMP-1.

4.7.5.4 Pengukuran Kolagen Terdeposisi

Media dikeluarkan dari plate 96 well kemudian diberi perlakuan dengan dicuci PBS selama perlakuan. Dicuci dengan PBS sebanyak 3x, masing-masing 200ul, dilakukan fixasi dengan larutan bouin selama 1 jam. Selanjutnya dicuci

dengan air mengalir sampai warna kuning hilang. Kemudian dikeringkan plate overnight dan ditambahkan 200ul sirius red per sumuran. Selanjutnya diinkubasi 1 jam dan dibuang Sirius red, dicuci dengan HCl 0.1N 200ul. HCl dibuang (pencucian diulang sampai warna Sirius red hilang dari dinding dan supernatant). Terakhir ditambahkan 200ul NaOH 0.5N, dan dibiarkan selama 30 menit kemudian dibaca pada panjang gelombang 550nm dengan *plate reader*.

4.7.5.5 Pengukuran Adhesi Sel

Setelah multiwell plate diinkubasi selama 72 jam, medium dibuang, dan selanjutnya dicuci dengan PBS sebanyak 3x, PBS yang terakhir dibuang. Dimasukkan 1ml medium dan 250ul MTT. Multiwell plate dibungkus dengan aluminium foil dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dan 37°C selama 8jam. Setelah 8 jam, medium dan MTT dalam sumuran dikeluarkan. Masing-masing *scaffold* biomaterial dipindahkan dalam multiwell plate 24 yang baru. Kemudian dimasukkan 1ml DMSO untuk melarutkan formasan, digoyang-goyang selama 10 menit dengan kecepatan rendah, kemudian ditambahkan dengan glycine buffer. Masing-masing sumuran diambil 200ul dan dipindahkan kedalam multiwell plate 96, kemudian dilakukan pengukuran densitas optik dengan spektrofotometer panjang gelombang 490nm

4.7.6 Analisa Data

4.7.6.1 Analisa statistik untuk komparabilitas kelompok sel lemak dan sel pulpa terhadap pembentukan odontoblas.

Pada analisis ekspresi Stro-1, BMP-2, DMP-1, Col-1, dan *Adhesion assay*, karena datanya numeric maka digunakan uji statistic Anova namun apabila homogenitas data tidak terpenuhi maka digunakan uji statistic non parametric Kruskal-Wallis dan Mann Whitney. Pemilihan uji ini karena yang akan dianalisis adalah konsentrasi ke lima parameter tersebut antar 3 (tiga) kelompok perlakuan yaitu ADMSC, ADMSC+Protein Pulpa, DPSC.

4.7.6.2 Analisa statistik untuk melihat korelasi antar parameter kelompok perlakuan.

Uji Korelasi Pearson untuk melihat korelasi antar masing-masing parameter kelompok perlakuan.

BAB 5 HASIL PENELITIAN

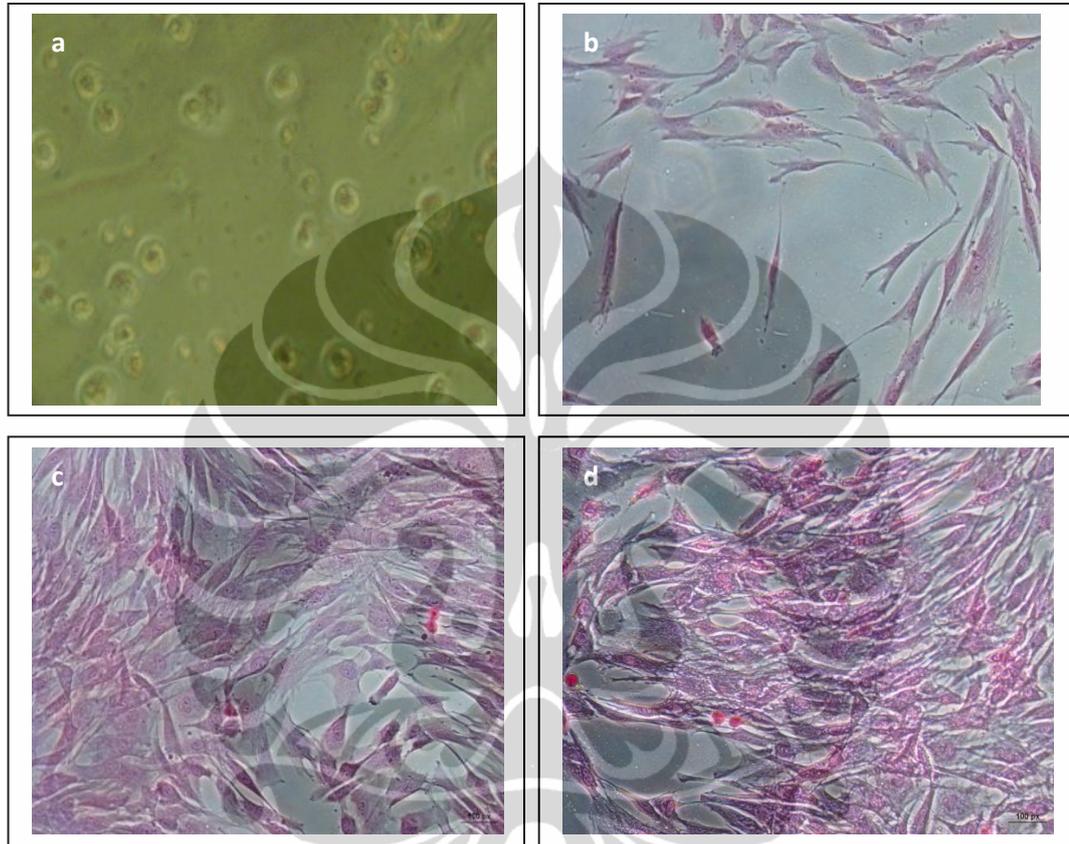
5.1 Proses Persiapan Penelitian

Pada penelitian ini diperlukan 4 (empat) sampel pasien, yaitu satu pasien untuk isolasi ADMSC dari jaringan lemak, satu orang untuk isolasi DPSC dari jaringan pulpa gigi sehat, dan satu orang untuk pembuatan produk plasma PRP dan PRF, serta satu orang lagi untuk pembuatan FG. Adapun tujuan isolasi ADMSC dari jaringan lemak adalah untuk memperoleh sumber sel odontoblas alternatif yang diperlukan dalam proses rekayasa untuk regenerasi jaringan pulpa, di samping jaringan pulpa itu sendiri. Sedangkan pengambilan donor darah dari pasien dibutuhkan untuk proses pembuatan produk plasma sebagai *cell scaffold*, tempat tumbuh dan berkembangnya sel menjadi jaringan.

Adapun kesulitan yang dihadapi dari mulai proses pemilihan sampel pasien sampai pada prosedur kerja di laboratorium cukup banyak, mengingat tahapan kerja yang harus dilalui sangat panjang untuk dapat memperoleh serta mengisolasi sumber sel punca mesenkhim yang akan digunakan untuk perlakuan dengan berbagai produk plasma yang berperan sebagai *scaffold autologus*. Namun yang terutama adalah menyangkut teknik dan metode kerja di laboratorium. Sampel lemak mudah diperoleh dari pasien *liposuction*, sedangkan sampel pulpa gigi memerlukan gigi sehat dengan indikasi pencabutan untuk perawatan orthodonti. Kesulitan dalam pemilihan sampel untuk produk plasma PRP dan PRF serta FG adalah karena jarangya pasien dengan golongan darah type AB, meskipun sudah melalui jalur donor PMI. Kesulitan teknik isolasi lemak maupun pulpa gigi ada di tahap kultur, karena sangat rentan dengan kontaminasi jamur atau bakteri sehingga mengakibatkan gagalnya proses pengisolasian sel punca mesenkhim.

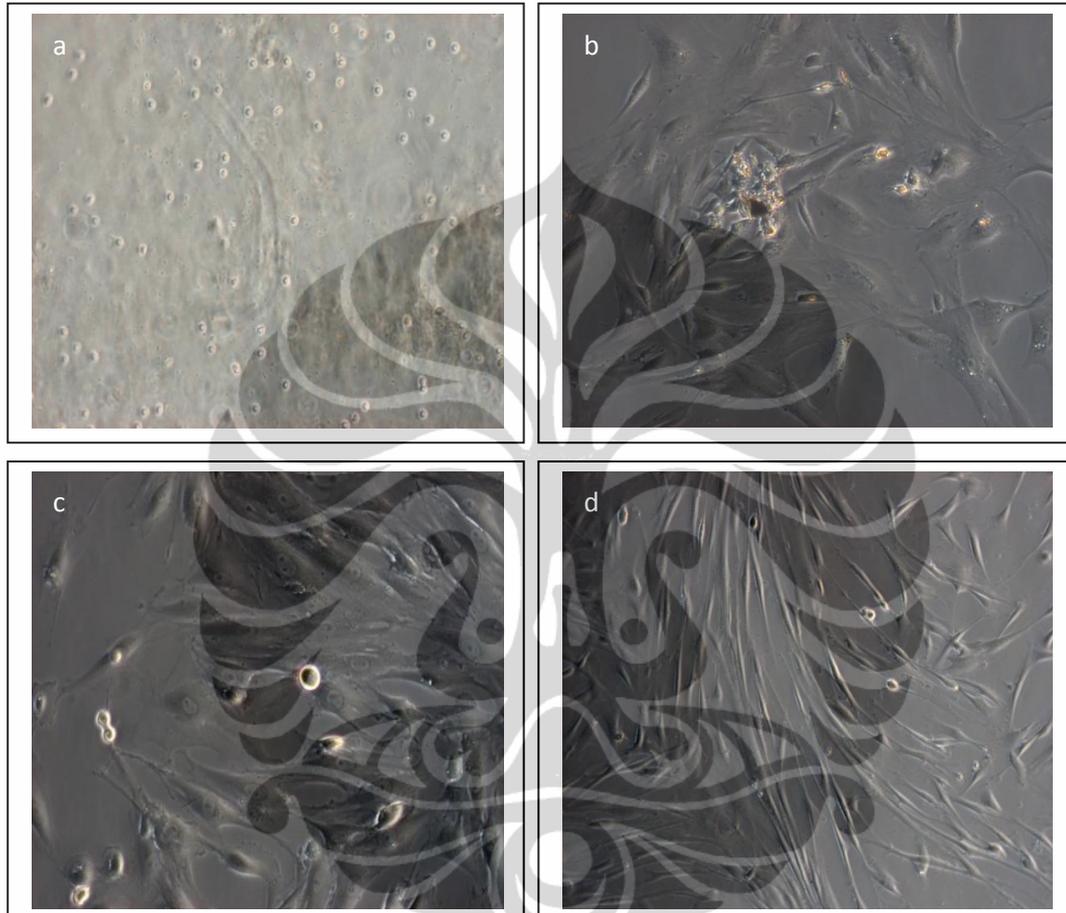
Jaringan lemak selain mudah untuk dikultur secara *in vitro* dan memperlihatkan karakteristik jaringan mesodermal, juga dapat menempel pada lempeng plastic serta membentuk koloni mirip fibroblast (disebut CFU-F). Sel-sel ini mencapai konfluensi sampai 80% selama 7 (tujuh) hari kultur dengan mudah.

Gambar 5.1 di bawah ini menunjukkan bahwa secara *in vitro* sel punca lemak mudah berkembang dan memperlihatkan karakteristik jaringan mesodermal termasuk kemampuannya untuk menempel dan membentuk koloni mirip fibroblast (CFU-F). (pembesaran 40x)



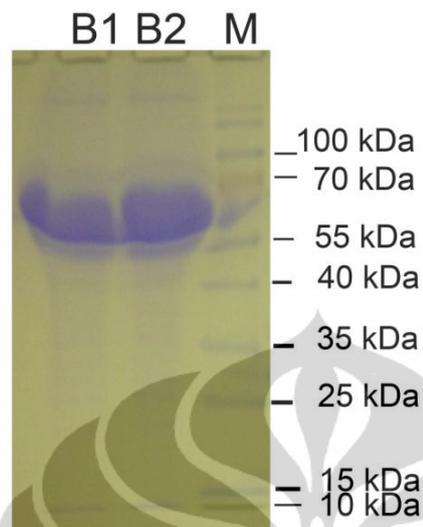
Gambar 5.1. Karakteristik Colony forming unit fibroblast (CFU-F) ADMSC; a. kultur lemak 24 jam, b. kultur ADMSC hari ketiga, c. kultur ADMSC hari ketujuh, d. kultur ADMSC hari ke empat belas

Gambar 5.2 di bawah ini menunjukkan karakteristik jaringan mesodermal sel DPSC yang mirip dengan sel ADMSC, termasuk kemampuannya untuk menempel dan membentuk koloni mirip fibroblast (CFU-F). Sel-sel ini mencapai tingkat konfluensi dalam empat belas hari setelah kultur (pembesaran 40x).



Gambar 5.2 Karakteristik Colony forming unit fibroblast (CFU-F) DPSC; a. kultur sel pulpa 24 jam, b. kultur DPSC hari ketiga, c. kultur DPSC hari ketujuh, d. kultur DPSC hari ke empat belas.

5.2. Analisis Media Kondisi Jaringan Lemak (ADMSC-CM)

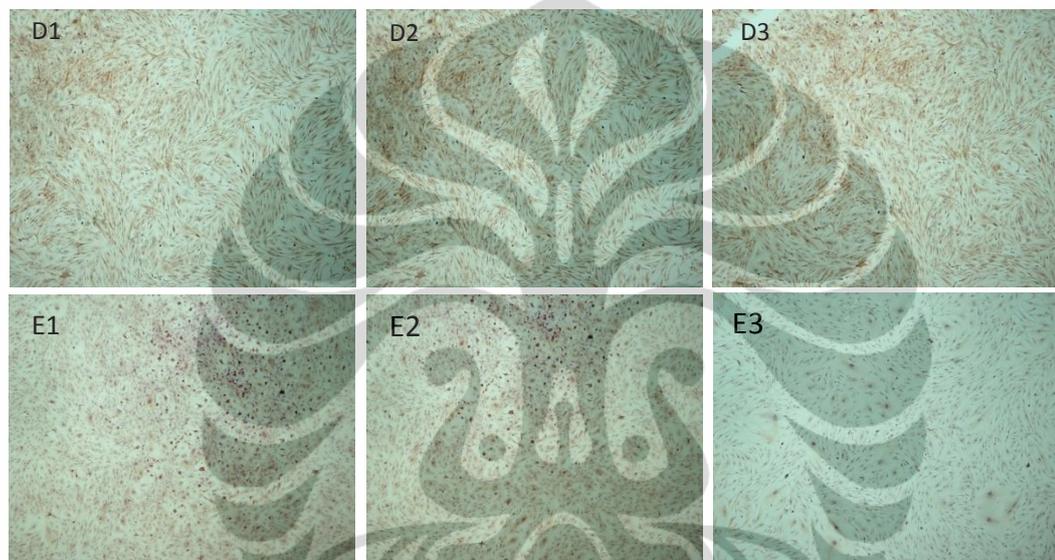


Gambar 5.3. Analisis *SDS-page* dari ADMSC. M=Penanda Protein, B1=pengenceran 50x, B2=pengenceran 100x 60-70 kDa= IGF-1, Angiopoientin, HGF, 10 kDa= MCP-1, SDF-1, 25 kDa= BMP-2.

Ketebalan pita dengan ukuran sebesar 60-70 kDa menunjuk pada IGF-1, Angiopoientin, dan HGF yang memegang peranan penting pada proses proliferasi dan diferensiasi, selanjutnya IGF-1 dapat mendukung sel punca induk untuk berdiferensiasi. Sedangkan ketebalan pita sebesar 10 kDa menunjukkan pada MCP-1, sitokin yang menginduksi proses angiogenesis, SDF-1 yang berperan sebagai pendukung sitokin untuk sel punca induk. Ketebalan pita sebesar 25 kDa mengindikasikan BMP-2 sebagai *growth factor* yang memegang peranan penting pada pembentukan osteoblas dan odontoblas.(Gambar 5.3)

5.3 Distribusi Rerata Stro-1

Dalam penelitian ini ditemukan nilai rerata Stro-1 tertinggi ada pada kelompok ADMSC, Namun dari hasil uji statistik menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna rata-rata nilai rerata Stro-1 antara kelompok ADMSC dan DPSC () Uji Stro-1 pada ADMSC dan DPSC, dilakukan dengan pemeriksaan imunositokimia dan penghitungan nilai Stro-1 dengan program *Image J counting cell*, seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.4 (pembesaran 40x)



Gambar 5.4 Pemeriksaan Imunositokimia dengan anti Stro-1, ADMSC, (D1,D2,D3) dan DPSC (E1,E2,E3)

Tabel 5.1 Uji Beda Rerata Sro-1 menurut kelompok perlakuan

Jumlah sel antar perlakuan	n	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation	p*
ADMSC	3	0,0760	0,1340	0,1050	0,0290	0,394
DPSC	3	0,1080	0,1690	0,1297	0,0341	

*uji t independen

Kesimpulan: dengan nilai $p > 0.05$, maka beda rerata nilai Stro-1 antara kelompok ADMSC dan DPSC menunjukkan tidak adanya perbedaan bermakna.

5.4. Efek Material Uji terhadap Sekresi BMP-2 dan DMP-1

5.4.1 Distribusi Rerata BMP-2

Dalam penelitian ini nilai rerata BMP-2 tertinggi adalah pada kelompok ADMSC+Protein pulpa dibandingkan dengan kelompok yang sama tanpa penambahan protein pulpa maupun dengan kelompok DPSC.(Tabel 5.2)

Hasil uji beda rerata sekresi BMP-2 antar pasangan kelompok perlakuan menunjukkan, tidak adanya perbedaan bermakna antara Kelompok ADMSC dan kelompok DPSC ($p > 0,05$). Namun antara kelompok ADMSC+Protein pulpa secara statistik berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok yang sama tanpa penambahan protein pulpa, maupun dengan kelompok DPSC. ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan protein pulpa pada ADMSC, dapat meningkatkan kadar konsentrasi BMP-2 dalam sel itu sendiri.(Tabel 5.3)

Tabel 5.2 Uji Beda Rerata Sekresi BMP-2 menurut kelompok perlakuan

BMP	ADMSC + Protein (n=3)	ADMSC (n=3)	DPSC (n=3)	p*
Range	0,0630 - 0,0640	0,0560 - 0,0590	0,0590 - 0,0600	
Median	0,0635	0,0575	0,0595	0,001
Mean	0,0635 ± 0,0005	0,0575 ± 0,0015	0,0595 ± 0,0005	

*uji Anova; Varian homogen ($p=0,305$)

Kesimpulan: dengan $p < 0,05$, maka rerata BMP-2 antara kelompok sel ADMSC (dengan atau tanpa pemberian protein pulpa) dengan kelompok DPSC menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna.

Tabel 5.3 Uji Beda Rerata Sekresi BMP-2 antar pasangan kelompok perlakuan

BMP antar Perlakuan		Beda Mean	p*
ADMSC+ Protein	ADMSC	0,006	0,001*
ADMSC+ Protein	DPSC	0,004	0,007*
ADMSC	DPSC	-0,002	0,129

*Uji Bonferroni

Kesimpulan: dengan $p < 0,05$ maka beda rerata BMP-2 antara kelompok ADMSC dengan atau penambahan protein pulpa) dengan kelompok ADMSC dan DPSC menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna, sedangkan antara kelompok ADMSC dan DPSC menunjukkan tidak berbeda bermakna.

5.4.2 Distribusi Rerata DMP-1

Dalam penelitian ini ditemukan nilai rerata DMP-1 tertinggi ada pada kelompok ADMSC+BMP-2 dan nilai terendah pada kelompok DPSC+BMP-2. sedangkan kelompok ADMSC dengan penambahan protein pulpa berada di antara nilai rerata kedua kelompok ADMSC dan DPSC (Tabel 5.4). Pada uji banding beda rerata nilai DMP-1 antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) dan kelompok DPSC terlihat tidak berbeda bermakna ($p>0.05$), hal ini menunjukkan bahwa kelompok ADMSC dan kelompok DPSC memiliki potensi yang sama untuk menghasilkan sel odontoblas jika di induksi dengan rhBMP-2. Sedangkan pada uji beda rerata nilai DMP-1 antar kelompok perlakuan kelompok DPSC+BMP2 menunjukkan ada perbedaan yang bermakna dengan kelompok kontrol DPSC ($p<0.05$), sedangkan pada kelompok ADMSC+BMP2 tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ADMSC.(Tabel 5.5) Uji DMP-1 pada ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) dan DPSC, dilakukan dengan pemeriksaan imunositokimia dan penghitungan nilai DMP-1 dengan program *Image J counting cell*, seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.5 (pembesaran 40x)

Tabel 5.4 Uji Beda Rerata Ekspresi DMP-1 menurut kelompok perlakuan

DMP-1	n	Minimum	Maximum	Mean	SD	p*
DPSC + BMP2	4	5,417	7,893	6,922	1,100	0.015
ADMSC + BMP2 + PP	4	7,310	10,283	8,807	1,218	
ADMSC + BMP2	4	6,586	15,030	10,151	3,675	
Kontrol DPSC	4	4,125	5,125	4,750	0,392	
Kontrol ADMSC	4	6,975	8,125	7,648	0,513	

*Uji Kruskal-Wallis

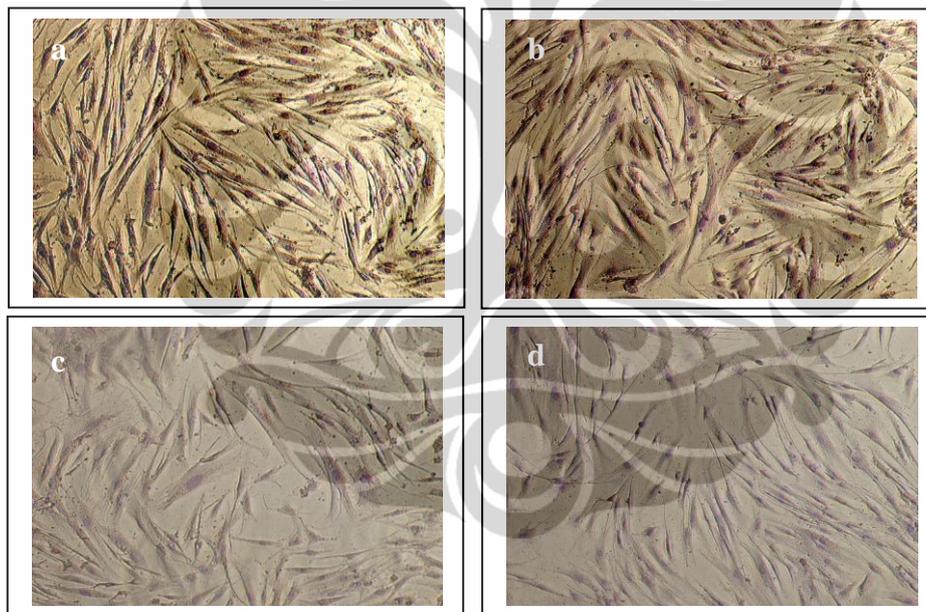
Kesimpulan : dengan $p<0.05$ menunjukkan adanya perbedaan bermakna rerata DMP-1 antara kelompok ADMSC (dengan atau penambahan protein pulpa) dengan kelompok DPSC, kontrol ADMSC dan kontrol DPSC

Tabel 5.5 Uji Beda Rerata Ekspresi DMP-1 antar pasangan kelompok perlakuan

DMP antar Perlakuan		Beda Mean	p*
DPSC+BMP2	Kontrol DPSC	2,172	0.021*
ADMSC+BMP2	Kontrol ADMSC	2,503	0.248
ADMSC+BMP2+PP	Kontrol ADMSC	0,959	0.149
DPSC+BMP2	ADMSC+BMP2	-3,229	0.149
DPSC+BMP2	ADMSC+BMP2+PP	-1,885	0.083
ADMSC+BMP2	ADMSC+BMP2+PP	-1,344	0.773
DPSC+BMP2	Kontrol ADMSC	-726	0.248
ADMSC+BMP2	Kontrol DPSC	5,401	0.021*
ADMSC+PP+BMP2	Kontrol DPSC	4,057	0.021*

*Uji Mann Whitney

Kesimpulan: dengan $p > 0.05$ menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna beda rerata DMP-1 antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) terhadap kelompok ADMSC yang sama maupun terhadap kontrol ADMSC, serta kelompok DPSC. Namun dengan $p < 0.05$ menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) terhadap kontrol DPSC, serta kelompok DPSC terhadap kontrol yang sama.



Gambar 5.5. Sel odontoblas hasil Imunositokimia DMP-1 pada kelompok;
a. ADMSC+Protein pulpa, b. ADMSC, c dan d. DPSC

5.5. Efek material uji terhadap ekspresi Col-1 dan *Adhesion Assay*

5.5.1 Distribusi Rerata Col-1 tiap waktu pengamatan menurut perlakuan

Dalam penelitian ini nilai rerata Col-1 tertinggi ada pada kelompok ADMSC hari ke dua puluh satu, sedangkan nilai rerata Col-1 terendah ada pada kelompok DPSC hari pertama. (Tabel 5.6) Terjadi peningkatan nilai rerata Col-1 antar hari pertama, hari ke empat belas, serta hari ke dua puluh satu, pada kedua kelompok baik ADMSC maupun DPSC, namun kelompok ADMSC (dengan atau

tanpa penambahan protein pulpa) memiliki nilai beda rerata lebih tinggi dibandingkan kelompok DPSC, kecuali pada kelompok ADMSC +Protein pulpa hari ke empat belas , dan hari ke dua puluh satu, secara statistik kedua kelompok tersebut tidak berbeda bermakna. Sedangkan pada uji beda rerata antar kelompok perlakuan terlihat bahwa hanya antara kelompok ADMSC dan kelompok DPSC saja yang menunjukkan adanya perbedaan bermakna dari hari pertama sampai hari ke dua puluh satu ($p < 0.05$). (Tabel 5.7) Variasi rentang nilai Col-1 sel ADMSC, sel ADMSC+PP, dan sel DPSC tiap waktu pengamatan, ditunjukkan melalui grafik error bar pada gambar 5.5.

Tabel 5.6 Uji Beda Rerata COL-1 tiap waktu pengamatan menurut kelompok perlakuan

Konsentrasi COL-1 Menurut Perlakuan	n	Minimum	Maximum	Rerata	SD	p*
Hari pertama						
ADMSC	8	0.0840	0.1340	0.1005	0.0150	0.003*
ADMSC+PP	8	0.0900	0.1250	0.1036	0.0111	
DPSC	8	0.0660	0.0990	0.0803	0.0120	
Hari keempat belas						
ADMSC	8	0.0970	0.1560	0.1281	0.0195	0.011*
ADMSC+PP	8	0.0110	0.1370	0.1064	0.0410	
DPSC	8	0.0650	0.1090	0.0823	0.0137	
Hari Kedua puluh satu						
ADMSC	8	0.0940	0.2100	0.1395	0.0379	0.005*
ADMSC+PP	8	0.0960	0.1380	0.1231	0.0138	
DPSC	8	0.0750	0.1200	0.0940	0.0150	

*Uji Anova; Varian homogen ($p < 0.05$)

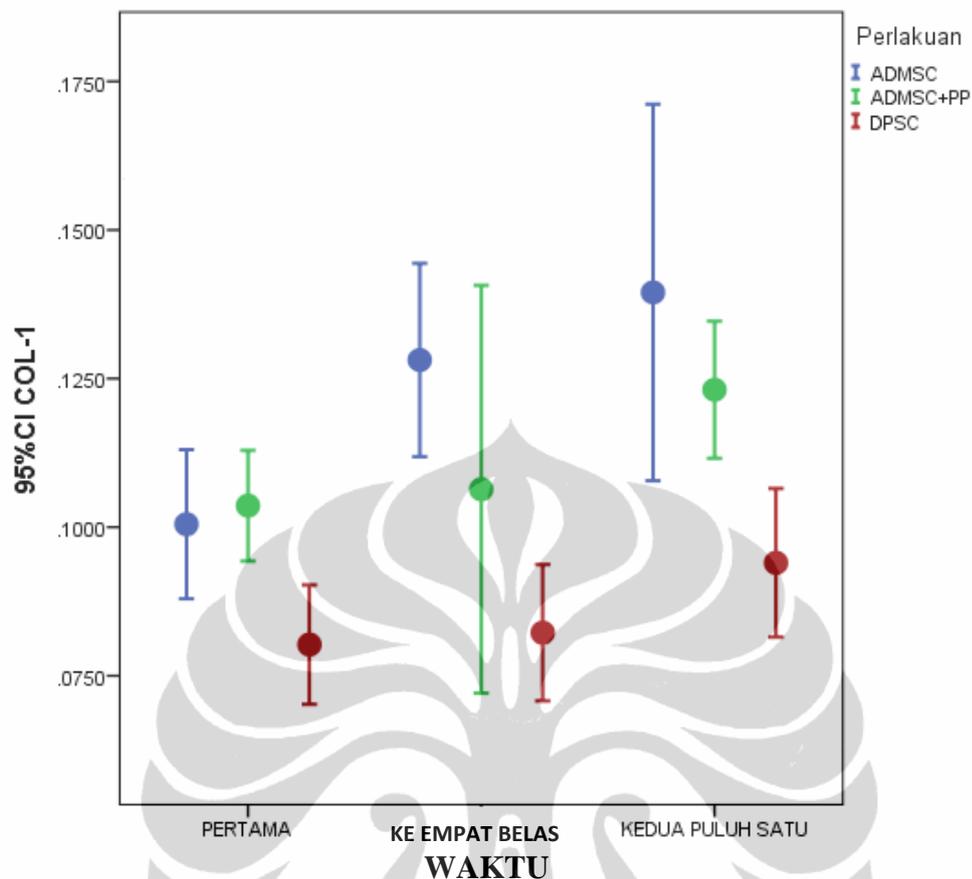
Kesimpulan: dengan $p < 0.05$ maka rerata Col-1 antara masing-masing kelompok waktu perlakuan menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) dan kelompok DPSC.

Tabel 5.7 Uji Beda Rerata COL-1 antar kelompok perlakuan tiap waktu pengamatan

Beda Konsentrasi COL-1 Antar Perlakuan		Beda Rerata	SE	p*
Hari pertama				
ADMSC	ADMSC+PP	-0.0031	0.0064	1.000
ADMSC	DPSC	.0202500	0.0064	0.014*
ADMSC+PP	DPSC	.0233750	0.0064	0.005*
Hari Keempat belas				
ADMSC	ADMSC+PP	0.0218	0.0137	0.382
ADMSC	DPSC	.0458750	0.0137	0.009*
ADMSC+PP	DPSC	0.0241	0.0137	0.278
Hari Kedua puluh satu				
ADMSC	ADMSC+PP	0.0164	0.0124	0.604
ADMSC	DPSC	.0455000	0.0124	0.004*
ADMSC+PP	DPSC	0.0291	0.0124	0.087

*Uji Bonferroni

Kesimpulan: dengan $p < 0.05$ beda rerata Col-1 antara Kelompok ADMSC (dengan atau penambahan protein pulpa) terhadap kelompok DPSC waktu satu hari menunjukkan adanya perbedaan bermakna, kelompok ADMSC dengan kelompok DPSC waktu empatbelas hari, dan kelompok ADMSC terhadap DPSC waktu duapuluh satu hari.



Gambar 5.6 Grafik error bar hasil estimasi konsentrasi COL-1 tiap waktu pengamatan menurut perlakuan.

Keterangan: grafik di atas menunjukkan variasi rentang nilai antar kelompok perlakuan

5.5.2 Distribusi Rerata *Adhesion Assay*

Dalam penelitian ini nilai rerata *Adhesion Assay* tertinggi ada pada kelompok DPSC+Fibrin Glue, sedangkan nilai rerata terendah terdapat pada kelompok ADMSC+PRP GEL+FIBRIN GLUE.(5.8) Pada uji beda rerata *Adhesion assay* antar pasangan kelompok perlakuan, menunjukkan bahwa di dalam kelompok PRPGEL antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) dengan kelompok DPSC menunjukkan hasil tidak berbeda kecuali terhadap kelompok DPSC+FG menunjukkan hasil yang berbeda. Sedangkan pada kelompok PRF antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) terhadap kelompok DPSC dengan interaksi yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda kecuali terhadap kelompok DPSC+FG, dimana nilai rerata kelompok DPSC lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok ADMSC. Demikian pula halnya dengan kelompok FG antara kelompok ADMSC (dengan

atau tanpa protein pulpa) menunjukkan hasil yang tidak berbeda. Dapat disimpulkan bahwa potensi adhesi antara *scaffold* plasma PRP,PRF dan FG terhadap masing-masing ADMSC dan DPSC menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna.(Tabel 5.9)

Gambar 5.6 menunjukkan variasi rentang nilai *Adhesion assay* antar pasangan kelompok perlakuan dari masing-masing sel ADMSC dan sel DPSC dengan interaksinya terhadap PRP GEL, PRF dan FG.

Tabel 5.8 Uji Beda Rerata *Adhesion Assay* menurut pasangan tiap kelompok perlakuan

<i>Adhesion assay</i> Menurut Perlakuan	n	Minimum	Maximum	Median	Mean	SD	p*
ADMSC+PRPGEL+FG	8	0.057	0.069	0.064	0.064	0.005	<0,001
ADMSC+PRF+FG	8	0.056	0.074	0.068	0.067	0.005	
ADMSC+FG	8	0.060	0.120	0.068	0.075	0.020	
ADMSC+PP+PRPGEL+FG	8	0.068	0.081	0.072	0.073	0.004	
ADMSC+PP+PRF+FG	8	0.068	0.079	0.072	0.072	0.004	
ADMSC+PP+FG	8	0.069	0.086	0.078	0.077	0.006	
DPSC+PRPGEL+FG	8	0.064	0.087	0.075	0.076	0.008	
DPSC+PRF+FG	8	0.066	0.085	0.077	0.076	0.006	
DPSC+FG	8	0.068	0.087	0.080	0.079	0.007	

*Uji Kruskal-Wallis

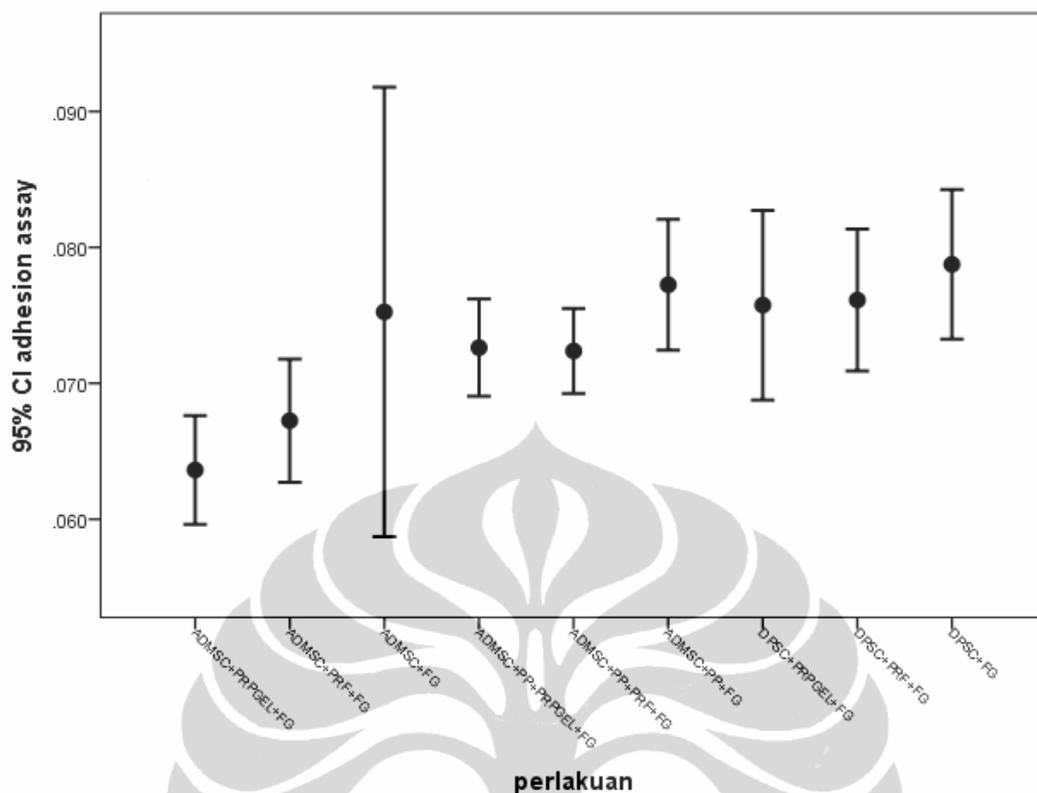
Kesimpulan: dengan $p < 0.05$ menunjukkan rerata nilai *Adhesion assay* antara masing-masing kelompok perlakuan ADMSC(dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) dan kelompok DPSC dengan scaffold PRP,PRF dan FG adanya perbedaan yang bermakna.

Tabel 5.9 Uji Beda Rerata *Adhesion assay* antar pasangan kelompok perlakuan

<i>Adhesion assay</i> Menurut Perlakuan	Beda Mean	p*	
ADMSC+PRPGEL+FG	ADMSC+FG	-0.012	0.128
ADMSC+PRPGEL+FG	DPSC+FG	.015125*	<0,001*
DPSC+PRPGEL+FG	DPSC+FG	-0.003	0.438
ADMSC+PRF+FG	ADMSC+FG	-0.008	0.289
ADMSC+PRF+FG	DPSC+FG	-0.012	0.002*
DPSC+PRF+FG	DPSC+FG	-0.003	0.427
ADMSC+PP+PRPGEL+FG	DPSC+PRPGEL+FG	-0.003	0.367
ADMSC+PP+PRF+FG	DPSC+PRF+FG	-0.004	0.167
ADMSC+PP+FG	DPSC+FG	-0.002	0.635
ADMSC+FG	DPSC+FG	-0.003	0.642

*Uji Mann-Whitney

Kesimpulan: dengan $p < 0.05$ menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna beda rerata *Adhesion assay* antara kelompok ADMSC dan kelompok DPSC terhadap penambahan PRPGEL dan terhadap penambahan PRF yaitu antara kelompok ADMSC dan kelompok DPSC.



Gambar 5.7 Grafik error bar hasil estimasi konsentrasi *Adhesion assay* antar pasangan kelompok perlakuan

Keterangan: grafik di atas menunjukkan variasi rentang nilai antar kelompok perlakuan

5.5.3. Distribusi Rerata Col-1 setelah grafting kelompok perlakuan waktu 1 hari

Dalam penelitian ini diperoleh nilai rerata Col-1 tertinggi waktu satu hari terdapat pada kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) +PRPGEL+FG, ADMSC+ PRF+FG, sedangkan pada kelompok DPSC berada di bawah nilai rerata kelompok ADMSC.(Tabel 5.10) Pada uji beda rerata COL-1 ($P < 0.05$) waktu perlakuan satu hari menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok DPSC terhadap kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa), terhadap penambahan PRPGEL yaitu antara kelompok ADMSC+FG dengan interaksi yang sama, terhadap penambahan PRF yaitu antara kelompok ADMSC+FG dengan interaksi yang sama, antara kelompok ADMSC dan DPSC, antara kelompok DPSC+FG dengan interaksi yang sama, terhadap kelompok FG yaitu antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) dengan kelompok DPSC.(Tabel 5.11) Gambar 5.7. menunjukkan variasi rentang nilai

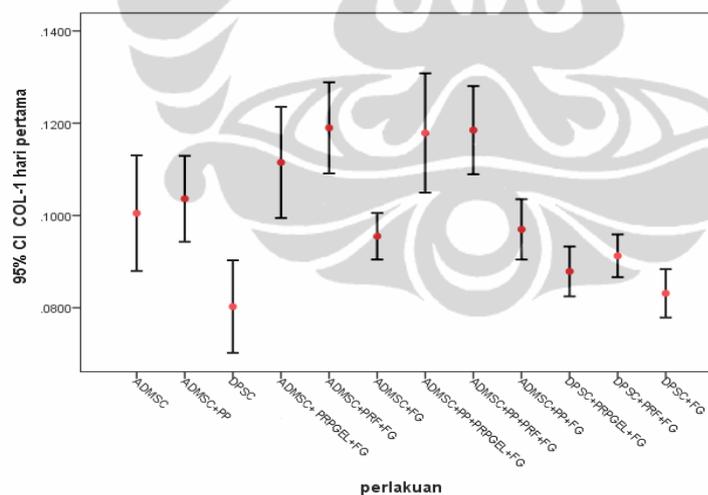
Col-1 kelompok ADMSC (dengan atau penambahan protein pulpa) dan kelompok DPSC masing-masing terhadap *scaffold* PRP,PRF, dan FG waktu perlakuan satu hari.

Tabel 5.10 Uji Beda Rerata COL-1 sel ADMSC dan sel DPSC menurut kelompok perlakuan waktu 1 hari.

	n	Minimum	Maximum	Mean	SD	p*
ADMSC	8	0.0840	0.1340	0.1005	0.0150	
ADMSC+PP	8	0.0900	0.1250	0.1036	0.0111	
DPSC	8	0.0660	0.0990	0.0803	0.0120	
ADMSC+ PRPGEL+FG	8	0.0980	0.1340	0.1115	0.0144	
ADMSC+PRF+FG	8	0.1020	0.1320	0.1190	0.0118	
ADMSC+FG	8	0.0880	0.1020	0.0955	0.0060	
ADMSC+PP+PRPGEL+FG	8	0.0950	0.1380	0.1179	0.0155	<0,001*
ADMSC+PP+PRF+FG	8	0.0990	0.1310	0.1185	0.0114	
ADMSC+PP+FG	8	0.0860	0.1100	0.0970	0.0078	
DPSC+PRPGEL+FG	8	0.0780	0.0980	0.0879	0.0065	
DPSC+PRF+FG	8	0.0820	0.1000	0.0913	0.0055	
DPSC+FG	8	0.0720	0.0910	0.0831	0.0063	
Total	96	0.0660	0.1380	0.1005	0.0168	

*Uji Kruskal-Wallis krn varian tidak homogen (p=0,033)

Kesimpulan: dengan $p < 0.05$ rerata nilai Col-1 waktu perlakuan satu hari menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) dan kelompok DPSC masing-masing terhadap *scaffold* PRP,PRF dan FG.



Gambar 5.8 Grafik error bar hasil estimasi konsentrasi COL-1 sel punca lemak dan pulpa dengan berbagai produk plasma kelompok waktu perlakuan 1 (satu) hari

Keterangan: grafik di atas menunjukkan variasi rentang nilai Col-1 kelompok ADMSC (dengan atau penambahan protein pulpa) dan DPSC masing-masing terhadap *scaffold* PRP,PRF, dan FG waktu perlakuan satu hari.

Tabel 5.11 Uji Beda Rerata COL-1 Sel ADMSC dan Sel DPSC dengan berbagai produk plasma waktu perlakuan 1 hari.

Beda Rerata	COL-1 Antar Perlakuan	Beda Rerata	p*
ADMSC+PP	ADMSC+PP	-0.0031	0.643
ADMSC+PP	DPSC	.0233750	0.001*
ADMSC	DPSC	.0202500	0.01*
ADMSC+ PRPGEL+FG	ADMSC+FG	0.0160	0.012*
ADMSC+ PRPGEL+FG	DPSC+FG	0.0284	0.001*
DPSC+PRPGEL+FG	DPSC+FG	0.0047	0.159
ADMSC+PRF+FG	ADMSC+FG	0.0235	<0,001*
ADMSC+PRF+FG	DPSC+FG	0.0359	0.004*
DPSC+PRF+FG	DPSC+FG	0.0081	0.016*
ADMSC+FG	DPSC+FG	0.0124	0.001*
ADMSC+PP+FG	DPSC+FG	0.0139	0.002*
ADMSC+PP+FG	ADMSC+FG	0.0081	0.091

*Uji Mann Whitney

Kesimpulan: dengan $p < 0.05$ beda rerata nilai Col-1 waktu perlakuan satu hari menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok DPSC terhadap kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa), terhadap penambahan PRPGEL yaitu antara kelompok ADMSC+FG dengan interaksi yang sama, antara kelompok ADMSC dan DPSC, terhadap penambahan PRF yaitu antara kelompok ADMSC+FG dengan interaksi yang sama, antara kelompok ADMSC dan DPSC, antara kelompok DPSC+FG dengan interaksi yang sama, terhadap kelompok FG yaitu antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) dengan kelompok DPSC.

5.6 Analisis Korelasi antar parameter pengukuran

Rangkaian urutan perubahan molekuler yang terjadi saat proses dentinogenesis membuat adanya saling ketergantungan dari setiap ekspresi gen. Pada tabel 5.12 terlihat adanya hubungan korelasi antara parameter perlakuan yaitu ekspresi Stro-1 dengan BMP-2, DMP-1, Col-1, *Adhesion assay*. *Inducer* differensiasi sel punca mesenkhim pulpa dan sel punca mesenkhim lemak ke galur odontoblas adalah BMP-2, selanjutnya hasil dari differensiasi tersebut di deteksi dengan penanda khusus odontoblas berupa DMP-1 dan Col-1. Masing-masing kelompok sel kemudian dilakukan *grafting* pada *scaffold* plasma PRP, PRF dan FG yang diuji dengan *Adhesion assay*, dan Col-1.

Tabel 5.12. Hasil Korelasi-Regresi linier antar parameter perlakuan

Korelasi Pearson		BMP2	DMP	COL1	ADHESION ASSAY
STRO-11	r	0,823	-0,605	-0,781	-0,357
	p	0,044	0,203	0,067	0,487
	n	6	6	6	6
BMP2	r		-0,846	-0,956	-0,682
	p		0,034	0,003	0,136
	n		6	6	6
DMP	r			0,914	0,943
	p			0,011	0,005
	n			6	6
COL1	r				.820*
	p				0,046
	n				6

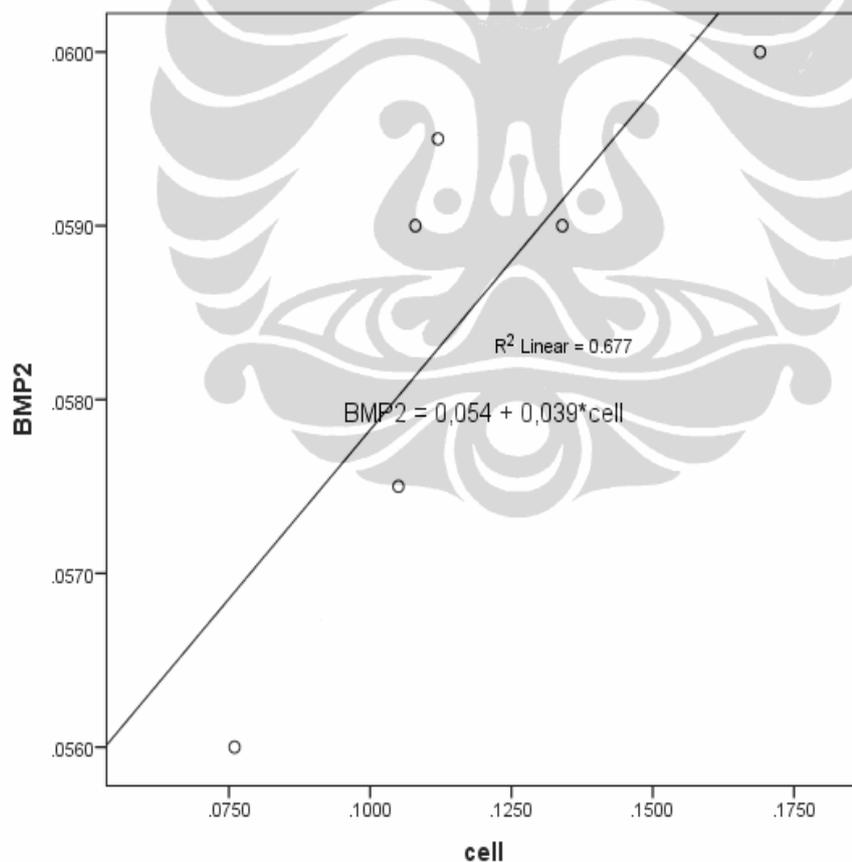
Kesimpulan: tabel ini menjelaskan hubungan korelasi antar parameter perlakuan (Stro-1, BMP-2, DMP-1, Col-1) yang menunjukkan adanya korelasi yang kuat (nilai r)

5.6.1 Korelasi Stro-1 terhadap BMP-2

Hasil korelasi antar jumlah sel (Stro-1) terhadap BMP-2 menunjukkan korelasi yang kuat dan searah sebesar 0,823. Perubahan jumlah sel (Stro-1) terhadap BMP-2 dapat dilihat pada tabel 5.12 hasil regresi linier Stro-1 terhadap BMP-2.

Persamaan regresi:

$BMP2 = 0,054 + 0,039 \cdot \text{cell}$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 67.7% atau dengan kata lain variasi nilai BMP-2 dapat dijelaskan oleh jumlah sel punca sebesar 67.7%. Hal ini berarti bahwa perubahan atau setiap kenaikan 1 unit jumlah sel punca akan meningkatkan BMP2 sebesar 0,039 nGr/mL. Terdapat nilai $p=0.044$ ($p \leq 0.05$) hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna secara statistik antara nilai Stro-1 dengan BMP-2. (Gambar 5.8)



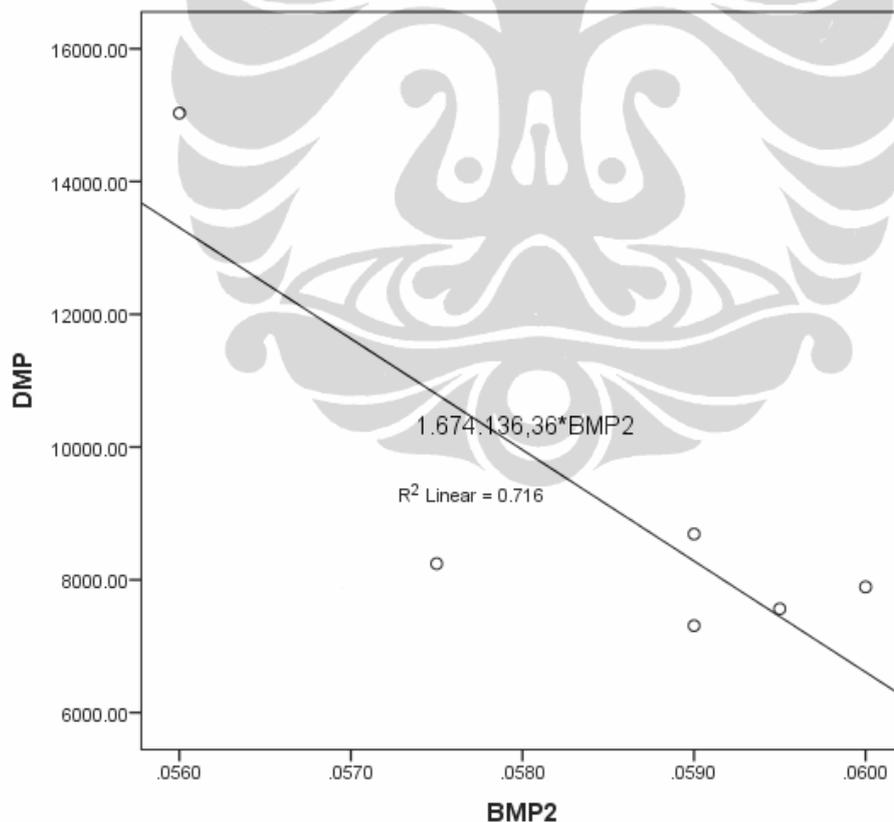
Gambar 5.9 Grafik Regresi Linier antara Stro-1 terhadap BMP-2
Keterangan : dengan $r = 0.823$ menunjukkan adanya korelasi yang kuat dan searah antara ekspresi Stro-1 terhadap BMP-2.

5.6.2 Korelasi BMP-2 terhadap DMP-1

Hasil korelasi antar BMP-2 terhadap DMP-1 menunjukkan korelasi yang kuat dan terbalik, sebesar -0,846. Perubahan BMP2 terhadap DMP dapat dilihat pada tabel 5.12 berdasarkan hasil regresi linier BMP-2 terhadap DMP-1.

Persamaan regresi:

$DMP-1 = 107.058,48 - 1.674.136,36 * BMP-2$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 71.6% atau dengan kata lain variasi nilai DMP-1 dapat dijelaskan oleh BMP-2 sebesar 71.6%. Hal ini berarti bahwa perubahan konsentrasi 1 ng/ml BMP-2 akan menurunkan konsentrasi DMP-1 sebesar 1.674.136,36 nGr/mL. Terdapat nilai $p=0.034$ ($p \leq 0.05$) hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna secara statistik antara nilai DMP-1 dengan BMP-2. (Gambar 5.9)



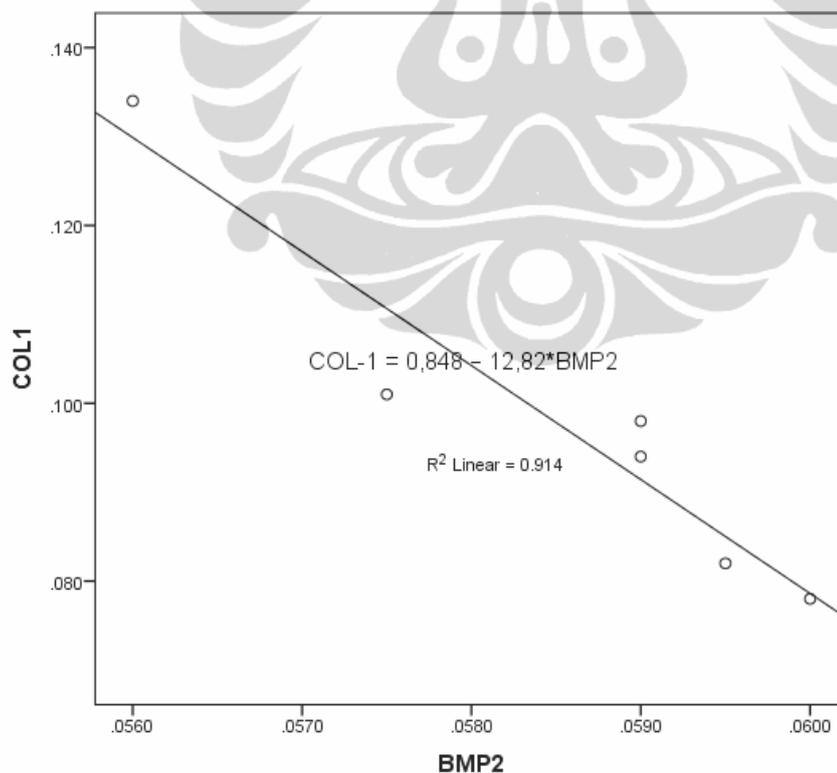
Gambar 5.10 Grafik Regresi Linier antara DMP-1 terhadap BMP-2
Keterangan : dengan $r = -0.846$ menunjukkan adanya korelasi yang kuat dan terbalik antara ekspresi BMP-2 terhadap DMP-1

5.6.3 Korelasi BMP-2 terhadap Col-1

Hasil korelasi antar BMP-2 terhadap Col-1 menunjukkan korelasi yang sangat kuat dan terbalik, sebesar -0,956. Perubahan BMP2 terhadap Col-1 dapat dilihat pada Tabel 5.12 berdasarkan hasil regresi linier BMP-2 terhadap Col-1.

Persamaan regresi:

$COL-1 = 0,848 - 12,82 * BMP2$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 91.4% atau dengan kata lain variasi nilai Col-1 dapat dijelaskan oleh BMP-2 sebesar 91.4%. Hal ini berarti bahwa perubahan konsentrasi 1 ng/ml BMP-2 akan menurunkan konsentrasi Col-1 sebesar 12.82 nGr/mL. Terdapat nilai $p=0.003$ ($p \leq 0.05$) hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna secara statistik antara nilai Col-1 dengan BMP-2. (Gambar 5.10)



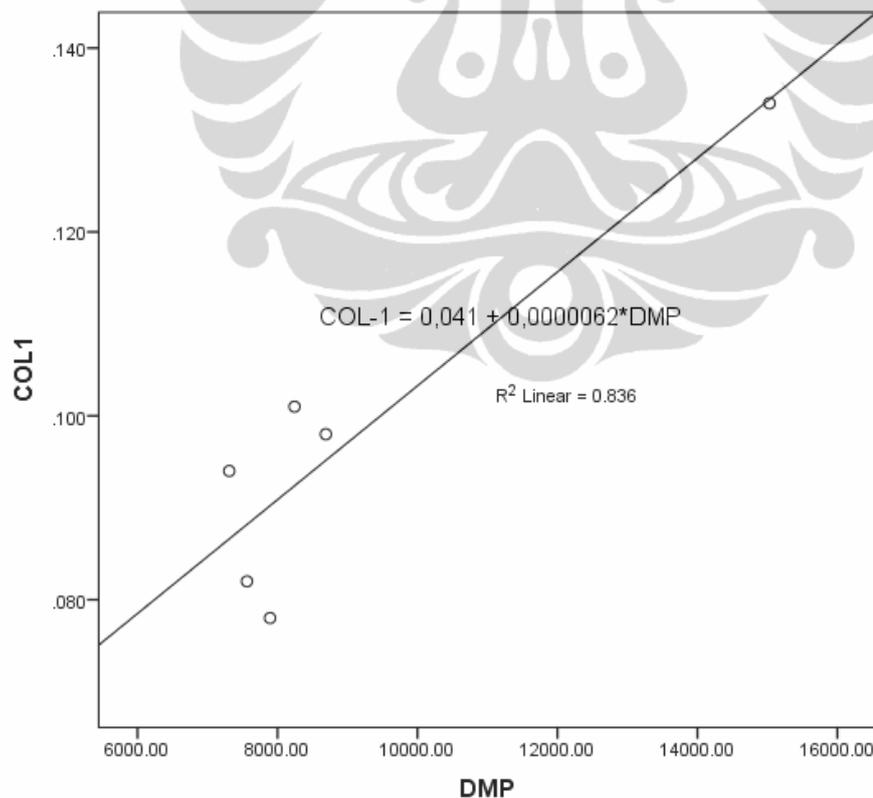
Gambar 5.11 Grafik Regresi Linier antara Col-1 terhadap BMP-2
Keterangan: dengan $r = -0.956$ menunjukkan adanya korelasi yang kuat dan terbalik antara ekspresi Col-1 terhadap BMP-2

5.6.4 Korelasi DMP-1 terhadap Col-1

Hasil korelasi antar DMP-1 terhadap Col-1 menunjukkan korelasi yang sangat kuat dan searah, sebesar 0,914. Perubahan DMP-1 terhadap Col-1 dapat dilihat pada Tabel 5.12 berdasarkan hasil regresi linier DMP-1 terhadap Col-1.

Persamaan regresi:

$COL-1 = 0,041 + 0.0000062 * DMP-1$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 83.6% atau dengan kata lain variasi nilai Col-1 dapat dijelaskan oleh DMP-1 sebesar 83.6%. Hal ini berarti bahwa perubahan konsentrasi 1 ng/ml DMP-1 akan menaikkan konsentrasi Col-1 sebesar 0.0000062 nGr/mL. Terdapat nilai $p=0.011$ ($p \leq 0.05$) hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna secara statistik antara nilai Col-1 dengan DMP-1. (Gambar 5.11)



Gambar 5.12 Grafik Regresi Linier antara Col-1 terhadap DMP-2
Keterangan: dengan $r = -0.956$ menunjukkan adanya korelasi yang kuat dan terbalik antara ekspresi Col-1 terhadap BMP-2

5.6.5 Korelasi DMP-1 terhadap *Adhesion assay*

Hasil korelasi antar DMP-1 terhadap *Adhesion assay* menunjukkan korelasi yang sangat kuat dan searah, sebesar 0,943. Perubahan DMP-1 terhadap *Adhesion assay* dapat dilihat pada Tabel 5.12 berdasarkan hasil regresi linier DMP-1 terhadap *Adhesion assay*.

Persamaan regresi:

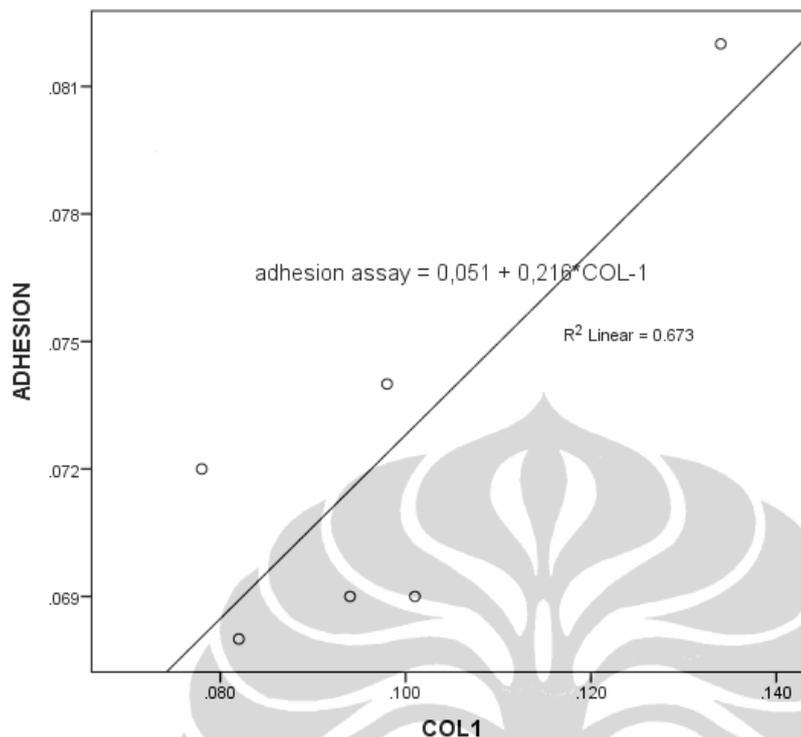
$Adhesion\ assay = 0,057 + 0.0000017 * DMP-1$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 88.9% atau dengan kata lain variasi nilai *Adhesion assay* dapat dijelaskan oleh DMP-1 sebesar 8%. Hal ini berarti bahwa perubahan konsentrasi ng/ml DMP-1 akan menaikkan konsentrasi *Adhesion assay* sebesar 0.0000017 nGr/mL. Terdapat nilai $p=0.005$ ($p \leq 0.05$) hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna secara statistik antara nilai DMP-1 dengan *Adhesion assay*.

5.6.6 Korelasi Col-1 terhadap *Adhesion assay*

Hasil korelasi antar Col-1 terhadap *Adhesion assay* menunjukkan korelasi yang kuat dan searah, sebesar 0,820. Perubahan Col-1 terhadap *Adhesion assay* dapat dilihat pada Tabel 5.12 berdasarkan hasil regresi linier DMP-1 terhadap *Adhesion assay*.

Persamaan regresi:

$Col-1 = 0,057 + 0.0000017 * Adhesion\ assay$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 67.3% atau dengan kata lain variasi nilai Col-1 dapat dijelaskan oleh DMP-1 sebesar 67.3%. Hal ini berarti bahwa perubahan konsentrasi 1 ng/ml Col-1 akan menaikkan konsentrasi *Adhesion assay* sebesar 0.0000017 nGr/mL. Terdapat nilai $p=0.046$ ($p \leq 0.05$) hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna secara statistik antara nilai Col-1 dengan *Adhesion assay*.(Gambar 5.12)



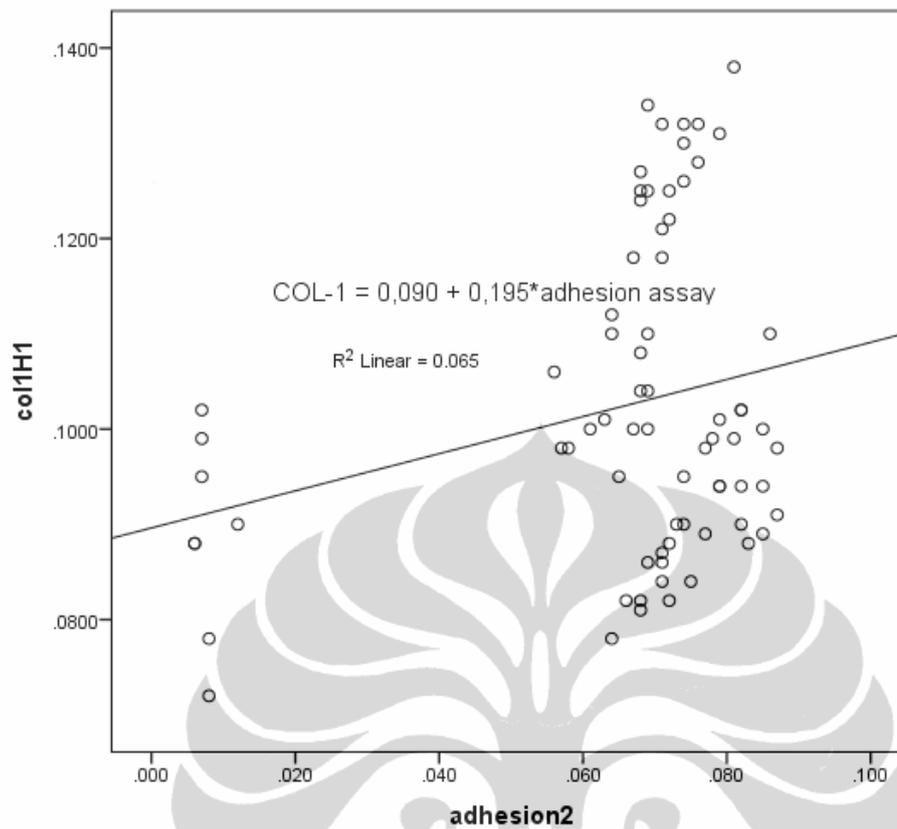
Gambar 5.13 Grafik Regresi Linier antara Col-1 terhadap *Adhesion assay*
 Keterangan : dengan $r = 0.820$ menunjukkan adanya korelasi yang kuat dan searah antara ekspresi Col-1 terhadap *Adhesion assay*.

5.6.7 Korelasi *Adhesion assay* terhadap Col-1 setelah grafting

Hasil korelasi antar *Adhesion assay* terhadap Col-1 setelah grafting menunjukkan korelasi linier yang lemah dan searah, sebesar 0,256. Perubahan *Adhesion assay* terhadap Col-1 dapat dilihat pada Tabel 5.12 berdasarkan hasil regresi linier *Adhesion assay* terhadap Col-1

Persamaan regresi:

$Col-1 = 0,090 + 0.195 * Adhesion\ assay$ dengan koefisien determinasi (R^2) hanya sebesar 6.5% atau dengan kata lain variasi nilai Col-1 dapat dijelaskan oleh *Adhesion assay* sebesar 6.5%. Hal ini berarti bahwa perubahan konsentrasi 1 ng/ml *Adhesion assay* akan menaikkan konsentrasi Col-1 sebesar 0.195 nGr/mL. Terdapat nilai $p=0.046$ ($p \leq 0.05$) hal ini menunjukkan adanya perbedaan bermakna secara statistik antara nilai Col-1 dengan *Adhesion assay*. (Gambar 5.13)



Gambar 5.14 Grafik Regresi Linier antara *Adhesion assay* terhadap Col-1 sesudah grafting
Keterangan : dengan $r = 0.256$ menunjukkan adanya korelasi yang lemah dan searah antara ekspresi *Adhesion assay* terhadap Col-1 sesudah grafting.

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Analisis Media Kondisi Sel Punca Lemak (ADMSC-CM)

Dalam penelitian ini, dengan menggunakan analisis uji *reducing SDS page* hasilnya menunjukkan adanya berbagai ukuran berat molecular yang berhubungan dengan banyak sitokin yang terkandung di dalam media kondisi sel punca mesenkhim lemak, yang kemungkinan diantaranya adalah IGF-1, HGF, MCP-1, SDF 1, dan BMP-2 pada konsentrasi yang rendah. Dengan demikian dapat diasumsikan bahwa *growth factor* ini dapat menjadi sumber *inducer* untuk meningkatkan proliferasi dan differensiasi ke arah odontoblas, dan asumsi ini terjawab pada hasil DMP-1 di tabel 5.4. Hasil analisis SDS page ini sekaligus menjawab hipotesis pertama dari penelitian ini yaitu bahwa media kondisi sel punca mesenkhim lemak mengandung beberapa *growth factor* yang dapat meningkatkan potensi sel tersebut untuk berproliferasi dan berdifferensiasi ke galur odontoblas.

Dari gambar 5.2 menunjukkan ketebalan pita sebesar 60-70 kDa mengarah pada IGF-1, angiopoientin, and HGF yang memainkan peran yang penting dalam proliferasi dan diferensiasi sel punca, serta IGF-1 dapat mendukung sel punca mesenkhim jaringan asal untuk berdiferensiasi. Dari hasil tersebut juga memperlihatkan ketebalan pita sebesar 10 kDa yang mengarah pada MCP-1, suatu sitokin yang mencetuskan proses angiogenesis, SDF 1 yang merupakan pendukung sitokin bagi sel induk jaringan asal. Ketebalan pita sebesar 25kDa mengindikasikan adanya BMP-2 sebagai *growth factor* yang memainkan peran utama pada pembentukan osteblas and odontoblas.⁽³⁴⁾

Sel punca mesenkhim merupakan elemen kunci perawatan kedokteran regeneratif, hal ini disebabkan karena kemampuannya berdiferensiasi menjadi berbagai fenotip sel, sehingga dapat mengobati berbagai jenis penyakit degeneratif dan cedera traumatik. Pergeseran paradigma akhir-akhir ini yang muncul menunjukkan berbagai efek menguntungkan sel punca mungkin tidak dibatasi hanya pada restorasi sel, namun juga karena berbagai aksi parakrin transiennya.

Sel punca mesenkhim dapat mensekresikan kombinasi poten berbagai faktor trofik yang memodulasi komposisi molekuler dari lingkungan untuk membangkitkan berbagai respon dari sel residen. Berdasarkan dari pandangan baru ini, arah penelitian saat ini juga melihat pada berbagai upaya memanfaatkan mekanisme otokrin dan parakrin sel punca bagi proses regenerasi jaringan. Beberapa faktor bioaktif yang disekresikan oleh sel punca lemak ini dapat meningkatkan regenerasi jaringan.⁽¹³⁹⁾ Faktor bioaktif ini dikenal sebagai Mesenchymal Stem Cells-Condition Media (MSCs-CM) yang dapat memodulasi proses migrasi, proliferasi, serta differensiasi sel punca jaringan asal.⁽³³⁾

Efek parakrin dari ADMSC-CM ini adalah untuk mengarahkan MSCs menjadi sel punca progenitor untuk berdifferensiasi menjadi sel odontoblas. Fungsi ADMSC-CM ini adalah memodulasi proses proliferasi serta menghambat apoptosis melalui hubungan silang antara IGF-1 dan HGF.⁽¹⁴⁰⁾ Sel punca ditentukan oleh sejauh mana *specific microenvironment* atau *stem cell niche* mempengaruhinya. Dalam hal ini ADMSC menghasilkan beberapa faktor bioaktif yang dikenal sebagai *conditioned-media* yang mengandung *growth factors* dan sitokin.

Dari hasil analisis *SDS page*, menunjukkan konsentrasi tinggi MCP-1 yang berperan sebagai faktor *chemoattraction* bagi sel induk jaringan asal untuk bermigrasi ke sekitar daerah cedera^(33, 141) Di samping itu MCP-1 menunjukkan kapasitas angiogenik untuk menjaga pembuluh darah dari daerah cedera dan mencetuskan pertumbuhan jaringan sel asal.⁽¹⁴²⁾ Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa MSC-CM mengandung sejumlah besar faktor angiogenik dan anti-apoptosis seperti, IL-6, VEGF, dan MCP-1, yang menghambat kematian kultur sel-sel endotel di bawah kondisi hipoksia serta mendukung pembentukan struktur jaringan mirip kapiler dalam percobaan secara *in vitro*^(33, 143) Pada percobaan secara *in vitro* dan *in vivo* dengan menggunakan media ini menunjukkan hasil yang menjanjikan dari gigi lengkap dengan semua struktur gigi termasuk sel-sel dan deposisi matriks ekstraselular. Lindolfo et al (2009) menemukan hal ini dan molekul anti-apoptosis dalam media MSC ini, yang menarik adalah bahwa keadaan tersebut menunjukkan bahwa bioreaktor MSC berhubungan dengan aliran darah dan angiopoietin 1 dan SDF

dalam media ini terbukti sebagai faktor bioaktif yang mendukung pertumbuhan sel induk.⁽¹⁴¹⁾

Walaupun demikian, ekspresi rendah dari ADMSC-CM ini, menunjukkan kemampuan odontogenik yang lebih kecil dibandingkan DPSC, hal ini mengindikasikan bahwa MSC yang berasal dari embrio yang berbeda tersebut tidak sebanding. Pada kenyataannya DPSC berasal dari neural crest, sedangkan ADMSC berasal dari mesoderm. Selanjutnya, perbandingan potensi osteogenik dan adipogenik dari asal MSC yang berbeda menunjukkan bahwa meskipun sel tersebut membawa penanda genetik yang sama, mereka tidak setara dan masing-masing berdiferensiasi ke jalur khusus.⁽¹⁰⁹⁾ Implikasi dari MSC-CM sebagai teknik matriks tiga dimensi (baik polimer asam polylactad atau kolagen) yang komposisinya kurang lebih mirip dengan organ untuk merekonstruksi dengan faktor pertumbuhan konstitutif yang dapat memfasilitasi transplantasi dan diferensiasi dari sel induk jaringan asal pada daerah cedera.^(33, 145)

6.2 Sumber Sel Dalam Teknik Rekayasa Jaringan.

Kriteria aplikasi sumber sel punca untuk pengobatan regeneratif diantaranya adalah dapat diperoleh dalam jumlah yang banyak (jutaan sampai triliunan sel), dapat dikumpulkan dan dikultur melalui prosedur yang minimal invasif, dapat didiferensiasikan melalui berbagai galur serta dapat dengan aman dan efektif di transplantasikan baik secara autologus maupun allogenis.^(103, 104), karena penggunaannya dibatasi oleh adanya reaksi penolakan kekebalan tubuh.^(33, 34)

Adapun keuntungan menggunakan MSCs dibandingkan jenis sel punca lainnya adalah dari sifat autologus, dapat dengan mudah diperoleh dari jaringan tubuh pasien sendiri, termasuk sumsum tulang, jaringan lemak, tulang rawan dan synovium, dapat diperbanyak dan berdiferensiasi ke arah galur sel khusus.⁽¹⁴⁶⁾ ⁽¹⁰⁹⁾ MSCs mempunyai kapasitas yang besar untuk memperbaiki diri sendiri dalam mempertahankan kapasitas multipotensinya. Uji standar untuk menetapkan kemampuan multipotensinya adalah kemampuan berdiferensiasi dari sel tersebut ke berbagai galur. Sel punca mesenchim yang berasal dari jaringan lemak mengandung *growth factor* yang ratusan jumlahnya sehingga ADMSC ini

mempunyai potensi untuk memperbaiki dan memperbaharui serta meregenerasi dirinya sendiri dan sel-sel di sekitarnya.⁽¹⁴⁷⁾ Dalam penelitian ini sampel jaringan lemak di ambil dari pasien usia dewasa muda (19-40 tahun) karena dari beberapa hasil penelitian diketahui bahwa disamping jumlah sel punca, viabilitas serta kemampuan sel punca tersebut untuk berproliferasi dan berdifferensiasi berkurang sejalan dengan usia donor.^(104, 148)

Tantangan utama dalam proses regenerasi gigi adalah bagaimana menemukan sumber sel yang dapat dipergunakan di klinik. Sel odontoblas merupakan sel utama yang berperan selama perkembangan gigi, namun karena sel odontoblas adalah sel yang telah matang berdifferensiasi serta sulit untuk dipisahkan dan di kultur secara *in vitro*, sehingga sulit digunakan untuk keperluan klinik. Potensi *multi differensiasi* khususnya potensi osteogenik dari adult stem cells seperti *Bone marrow stem cells* (BMSCs) dan *Adipose derived stem cells* (ADSCs) telah menarik banyak perhatian peneliti pada perawatan pembentukan jaringan keras. Meskipun dari banyak hasil penelitian BMSCS menunjukkan kemampuan berdifferensiasi ke arah odontogenik serta pembentukan jaringan mirip gigi, namun kemampuan tersebut berkurang sejalan dengan meningkatnya usia donor. Karena itulah BMSCs tidak dapat dipergunakan sebagai pilihan sumber sel untuk penelitian dan aplikasi jaringan gigi khususnya pada populasi orang tua.⁽²³⁾

Dari hasil-hasil penelitian ASCs akhir-akhir ini, menunjukkan kemampuan pluripotensi serta osteogenik yang dapat bertahan sejalan dengan meningkatnya usia donor. Karena itulah ASCs merupakan alternatif yang baik bagi BMSCs untuk digunakan pada teknik rekayasa pembentukan jaringan keras. Pada penelitian terakhir menunjukkan bahwa ASCs dan BMSCs memiliki bentuk ekspresi serta potensi multi differensiasi yang mirip, sehingga dimungkinkan ASCs memiliki potensi untuk diinduksi ke galur odontogenik dalam kultur yang khusus.^(146, 149)

Tujuan penelitian ini adalah untuk menetapkan potensi penggunaan sel punca mesenkhim asal jaringan lemak menjadi alternatif sumber sel odontoblas untuk persiapan regenerasi jaringan pulpa secara *in vitro* dengan *scaffold* plasma secara autologus. Dipilihnya jaringan lemak sebagai sumber sel alternatif untuk

menggantikan jaringan pulpa adalah karena lemak merupakan jaringan yang terdapat hampir di seluruh tubuh, mudah diperoleh dalam jumlah yang melimpah melalui metode yang kurang invasif. Di samping itu jaringan lemak merupakan jenis sel punca dewasa (ASCs) yang mampu melakukan metamorphosis/transdiferensiasi ke berbagai galur karena sifat plastisitasnya yang tinggi, sehingga potensi untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke arah odontoblas sangat dimungkinkan. Selanjutnya ADMSC telah terbukti memiliki beberapa karakteristik yang mirip dengan DPSC dan keduanya dapat membentuk struktur mirip tulang dan gigi.^(32, 145)

Pada penelitian ini digunakan jaringan lemak manusia, karena pada teknik pengisolasian ADMSC, walaupun *cell line preadipocyte* yang berasal dari hewan pengerat telah digunakan selama lebih dari tiga puluh tahun lamanya, terdapat perbedaan yang substansial antara perkembangan, pengaturan serta fungsi dari hewan pengerat dan manusia. Sehingga akhir-akhir ini terdapat perubahan ke arah penggunaan model kultur sel primer dengan penelitian pada proses differensiasi lemak manusia secara *in vitro*. Protokol dirancang untuk memfasilitasi teknik laboratorium yang baru dilengkapi dengan peralatan untuk mengkultur sel *precursor adipocyte* manusia. Hal yang penting untuk diperhatikan adalah meminimalisasikan jumlah jaringan yang dibutuhkan untuk memperoleh kultur primer. Selanjutnya peneliti dapat menentukan tingkat proliferasi dan diferensiasi dari jumlah jaringan lemak yang terbatas tersebut seperti halnya lemak yang diperoleh melalui teknik *fat needle biopsy* (FNB) dan *liposuction*.^(105, 150) Pada penelitian ini sampel lemak diambil dari kedua contoh baik dari FNB dan *liposuction*, namun dilihat dari jumlah volume yang besar, dan tingkat proliferasi serta differensiasinya sampel yang diperoleh dari *liposuction* memberikan hasil yang lebih baik.⁽¹⁰⁵⁾

6.2.1. Ekspresi STRO-1

Pada tabel 5.1 nilai rerata Stro-1 DPSC lebih besar dibandingkan nilai rerata ADMSC, meskipun demikian secara statistik hal tersebut tidak berbeda bermakna, ini menunjukkan bahwa secara umum kedua jenis sel dari jaringan yang berbeda tersebut memiliki ekspresi Stro-1 yang sama. Di samping itu

ADMSC dan DPSC menunjukkan ciri-ciri bentuk karakteristik sel punca mesenkhim yang sama yaitu Colony-Forming-Unit-fibroblast (CFU-F) dalam kultur, kemampuan menempel pada lempeng plastik, serta bentuk sel seperti gelondong atau poros yang berproliferasi membentuk koloni. ^(151, 152) Dengan demikian hipotesis kedua penelitian ini terbukti bahwa ADMSC mempunyai karakteristik sel punca mesenkhim yang sama dengan DPSC.

Hal ini didukung oleh hasil penelitian sebelumnya yaitu bahwa ADMSC dan DPSC adalah termasuk golongan *Adult Stem Cells* yang merupakan sel punca mesenkhim yang dapat menghasilkan jenis sel jaringan dimana mereka berada, selain jaringan asalnya. Disamping itu jaringan lemak merupakan salah satu sumber MSCs terbesar, apabila dibandingkan dengan sumsum tulang, jaringan lemak memiliki 500 kali lebih banyak jumlah sel punca mesenkhim dalam 1(satu) gram lemak bila dibandingkan dengan 1 gram sumsum tulang yang diaspirasi. ^(146, 151)

Pada penelitian ini tidak mendeteksi adanya sel lain selain sel yang positif Stro-1, karena menurut Wang Z et al (2010), bahwa sel odontoblas berasal dari sel dengan penanda Stro-1 positif yang mengindikasikan adanya sel punca mesenkhim. Disamping itu data dari penelitian ini menunjukkan bahwa sel odontoblas yang berasal dari Stro-1 positif yang diinduksi oleh rhBMP-2 adalah sel odontoblas dan bukan sel osteoblas, karena terdeteksi oleh penanda khusus untuk proliferasi dan differensiasi sel punca mesenkhim ke arah odontoblas. ⁽¹⁵³⁾

Hasil evaluasi dari setiap pasasse sel (masing-masing ADMSC dan DPSC di subkultur 4 sampai 6 kali passase), usia donor serta medium yang digunakan, mengindikasikan bahwa MSCs yang berasal dari DPSC tumbuh lebih lambat dibandingkan dengan ADMSC. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Nung Hung et al (2011) yang mengatakan bahwa tingkat pertumbuhan ADMSC secara konsisten lebih tinggi dibandingkan dengan DPSC dalam setiap pasasse sampai ke sebelas, disamping itu ADMSC lebih tahan terhadap *confluency stress* dibandingkan dengan DPSC yang memiliki tingkat proliferasi sedang. ⁽³¹⁾ Faktor-faktor tersebut di atas dapat menjadi pertimbangan yang menguntungkan dalam menggunakan kultur jaringan lemak untuk aplikasi klinik di masa depan.

Analisis ekspresi sumber ADMSC maupun DPSC diantaranya adalah Stro-1, DMP-1 menggunakan teknik imunositokimia dengan penghitungan menggunakan program *IMAGE J counting cell* untuk Stro-1 (dengan batas atas adalah 105, dan bawah 141), sedangkan untuk DMP-1 (dengan batas atas 126 dan batas bawah 140). Sedangkan ekspresi BMP2, Col-1 dan *Adhesion assay* menggunakan pengukuran ELISA. Pemilihan metode pengukuran ini karena prosedur yang akan dilakukan masing-masing sudah mempunyai sistem yang khusus sehingga tidak memerlukan ketrampilan khusus, waktu yang dibutuhkan untuk analisa lebih singkat, dengan tingkat akurasi yang tinggi.

Pada rancangan penelitian ini uji statistik untuk analisis molekuler ini adalah parametrik dan non parametrik, untuk uji beda 2(dua) rerata menggunakan uji t independen. Untuk membandingkan beda lebih dari 2(dua) rerata digunakan Anova, karena yang ingin dilihat adalah efek dari masing-masing parameter secara bersamaan antar kelompok dan untuk mengetahui antar pasangan rerata mana yang berbeda untuk kemudian dilanjutkan dengan uji Post Hoc atau Multiple Comparison dengan uji Bonferoni. Setelah dilakukan analisis ternyata pada Stro-1, BMP-2, dan Col-1, distribusi data mengikuti distribusi normal & varian homogen antar kelompok perlakuan. Sehingga uji statistik digunakan Anova, dan hasil yang diperoleh ternyata berbeda bermakna antar pasangan kelompok perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Bonferoni. Sedangkan pada DMP-1 dan *Adhesion assay* distribusi data tidak homogen karena itu digunakan uji statistik non parametrik Kruskal Wallis dan Mann Whitney.

Tidak digunakannya rumus Freederer untuk menentukan jumlah sampel yang akan digunakan adalah karena penelitian ini merupakan experimental biomolekuler dimana sampel adalah sel atau kultur sel itu sendiri, yang diisolasi dari manusia. Namun untuk memperoleh variasi nilai rerata, dilakukan pengulangan uji minimal triploid sampai dengan haploid. Validitas internal penelitian ini dilakukan dengan memperhatikan semua kriteria inklusi dan eksklusi serta menyeragamkan cara pengukuran.

6.2.2 Sekresi Konsentrasi BMP-2

Pada tabel 5.2 nilai rerata BMP-2 tertinggi adalah pada kelompok ADMSC+Protein pulpa dibandingkan dengan kelompok yang sama tanpa penambahan protein pulpa maupun dengan kelompok DPSC+BMP-2 . Pada uji beda rerata di tabel 5.3 kelompok ADMSC+Protein pulpa secara statistik berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok yang sama tanpa penambahan protein pulpa, maupun dengan kelompok DPSC. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan protein pulpa pada ADMSC, dapat meningkatkan penambahan konsentrasi BMP-2 dalam sel itu sendiri.

Tujuan menggunakan anti BMP-2 dalam penelitian ini adalah ingin membuktikan bahwa pada ADMSC dan DPSC ini tanpa pemberian *inducer* BMP-2 sudah memiliki potensi untuk dapat mengarah ke odontoblas dengan mensekresikan BMP-2 sendiri yang merupakan *inducer* ke arah odontoblas.

Penggunaan BMP-2 sebagai *growth factor* dalam penelitian ini adalah karena BMP-2 memegang peranan penting dalam fungsi odontoblas melalui sistem *diverse* signal transduksi, di mana BMP-2 ini mengatur transkripsi gen DSPP dan proses differensiasi odontoblas. Di samping itu dari hasil penelitian sebelumnya dikatakan bahwa penggunaan BMP-2 sebagai *inducer* proses differensiasi dapat meningkatkan keberhasilan sebesar 85%, sedangkan bila dibandingkan tanpa BMP-2 hasilnya tidak dapat diprediksi.⁽³¹⁾

6.2.3 Ekspresi konsentrasi DMP-1

Pada tabel 5.4 nilai rerata tertinggi DMP-1 ada pada kelompok ADMSC+BMP-2, dan terendah pada kelompok DPSC+BMP-2, sedangkan kelompok ADMSC yang diberi tambahan protein pulpa berada di antara rerata kedua kelompok ADMSC dan DPSC. Pada tabel 5.5 uji banding beda rerata nilai DMP-1 antara kelompok DPSC dan ADMSC (dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) terlihat tidak berbeda bermakna, hal ini menunjukkan bahwa DPSC dan ADMSC memiliki potensi yang sama untuk menghasilkan sel odontoblas jika di induksi dengan rhBMP-2, namun kelebihan dari ADMSC adalah bahwa tanpa pemberian rhBMP-2 tetap mempunyai potensi untuk dapat berdiferensiasi ke arah odontoblas. Hal ini dapat terlihat dari uji banding beda rerata antar

kelompok perlakuan DPSC terhadap kontrol DPSC terlihat adanya perbedaan bermakna, hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan rhBMP-2 dapat meningkatkan kemampuan diferensiasi DPSC ke arah odontoblas. Sedangkan pada kelompok ADMSC dengan atau tanpa penambahan protein pulpa terlihat tidak berbeda bermakna terhadap kontrol ADMSC, hal ini berarti bahwa ADMSC tidak memerlukan *inducer* BMP-2 untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke arah odontoblas. Karena dengan atau tanpa pemberian *inducer* BMP-2, ADMSC tetap memperlihatkan potensi yang sama untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke arah odontoblas. Dengan demikian hipotesis ketiga penelitian ini terjawab bahwa ADMSC dan DPSC mempunyai potensi yang sama untuk berproliferasi dan berdiferensiasi ke galur odontoblas, bahkan ADMSC secara umum mempunyai potensi yang lebih besar dibandingkan dengan DPSC dalam penelitian ini.

Adapun induksi dilakukan hanya dalam waktu 24 jam adalah karena BMP-2 merupakan *growth factor* untuk menginduksi odontoblas dan osteoblas. Jadi waktu yang diperkirakan di sini adalah 24 jam karena waktu tersebut osteoblas sudah terbentuk.⁽¹⁵⁴⁾ Sebelum diberikan perlakuan sel sudah disinkronisasikan dalam fase G1 dengan *serum deprivation (free serum)*, untuk meniadakan kerancuan pengaruh dari faktor lain selain yang diproduksi oleh sel punca mesenkhim itu sendiri. Mengingat dalam serum terdapat *growth hormon* yang mungkin dapat mempengaruhi proses differensiasi karena itu sel “dipuaskan” supaya tetap stabil jadi diharapkan setelah sinkronisasi 24 jam BMP-2 akan menginduksi fase S sel secara bersamaan untuk mensintesis DNA menuju galur odontoblas. Interval waktu berkaitan dengan sintesis DNA, di mana rhBMP-2 akan mengaktifkan transkripsi dengan berjalannya waktu maka sel akan mengalami subkultur sehingga dapat dilihat apakah ekspresi itu bersifat transient atau menetap, hal ini akan berhubungan dengan ekspresi DMP akan menetap atau meningkatkan odontoblas, karena BMP-2 akan memacu odontoblas.⁽¹⁵⁵⁾

Diferensiasi sel odontoblas diatur oleh serangkaian proses transkripsi dan *growth factors*. BMPs memegang peranan penting pada perkembangan dan pembentukan gigi. Sedangkan DMP-1 merupakan penanda molekuler yang khas bagi diferensiasi sel odontoblas. Untuk menganalisis mekanisme molekuler dari

pengaturan BMP-2 selama proses diferensiasi tersebut, maka dalam penelitian ini dianalisis efek pemberian rhBMP-2 terhadap ekspresi DMP-1.⁽¹⁵⁶⁾

BMP-2 merupakan suatu sitokin multifungsional pencetus diferensiasi sel osteoblas dan odontoblas. *Recombinant human* BMP-2 (rhBMP-2) digunakan untuk merangsang diferensiasi pada hewan percobaan bovine dan sel pulpa manusia dewasa ke arah odontoblas dalam kultur monolayer dan kultur pellet tiga dimensi.⁽¹⁵⁵⁾ Dalam penelitian ini, disamping pemberian rhBMP-2 untuk menginduksi diferensiasi sel punca ke arah odontoblas, juga digunakan anti BMP-2 untuk mengukur sekresi BMP-2 di dalam ADMSC dan DPSC. Karena BMP-2 merupakan pencetus diferensiasi tidak hanya untuk sel odontoblas melainkan juga untuk sel osteoblas, maka untuk mengarahkan diferensiasi tersebut ke arah odontoblas pada kelompok ADMSC diberi penambahan protein pulpa sebagai *microenvironment* bagi ADMSC tersebut.

DMP-1 merupakan protein non kolagen disekresi oleh odontoblas pada tahap akhir. Walaupun DSPP merupakan penanda protein non kolagen yang khas untuk odontoblas, tetapi pada penelitian ini yang dianalisis adalah DMP-1 karena kadar DSPP pada pulpa sangat rendah sehingga sulit untuk dianalisis.^(156, 157) Di samping itu DMP-1 secara langsung mengendalikan ekspresi DSPP selama terjadinya dentinogenesis, keduanya merupakan anggota dari SIBLING (*small integrin binding ligand N-linked glycoprotein*) yang adalah golongan glikoprotein asam yang terfosforilasi. Keduanya memiliki striktur genom yang sama dan terletak pada regio kromosom yang sama. Sifat asam aminonya juga turut memiliki kesamaan, dan keduanya juga membutuhkan proses lebih lanjut ke fragmen N-terminal dan C-terminal. Secara khusus DSPP memperlihatkan fenotip yang sama seperti pada DMP-1⁽¹⁰⁾. DMP-1 dapat berfungsi sebagai regulator ekspresi DSPP, meningkatnya kadar DMP-1 akan diikuti peningkatan DSPP⁽¹⁵⁸⁾

6.2.4 Ekspresi konsentrasi Col-1

Pada tabel 5.6 nilai rerata Col-1 tertinggi ada pada kelompok ADMSC hari ke dua puluh satu, sedangkan nilai rerata Col-1 terendah ada pada kelompok DPSC hari pertama. Terjadi peningkatan nilai rerata Col-1 antar hari pertama, hari ke empat belas, serta hari ke dua puluh satu, pada kedua kelompok baik

ADMSC maupun DPSC, namun kelompok ADMSC (dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) memiliki nilai beda rerata lebih tinggi dibandingkan kelompok DPSC, kecuali pada kelompok ADMSC +Protein pulpa hari ke empat belas, dan hari ke dua puluh satu, secara statistik kedua kelompok tersebut tidak berbeda bermakna. Sedangkan pada uji beda rerata antar kelompok perlakuan terlihat bahwa hanya antara kelompok ADMSC dan kelompok DPSC saja yang menunjukkan adanya perbedaan bermakna dari hari pertama sampai hari ke dua puluh satu ($p < 0.05$). (Tabel 5.7) Dari hasil tersebut di atas secara umum menunjukkan bahwa ADMSC mempunyai potensi yang lebih besar untuk membentuk matriks ekstraselular dibandingkan dengan DPSC, hal ini ditunjukkan secara statistik ada perbedaan bermakna. Dengan demikian hipotesis keempat penelitian ini ditolak yaitu bahwa sel ADMSC mempunyai potensi yang lebih besar dibandingkan dengan sel DPSC dalam memproduksi matriks ekstraseluler sebagai indikasi proses pembentukan jaringan.

Penetapan waktu pengukuran Col-1, berdasarkan dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang menunjukkan adanya peningkatan ekspresi Col-1 selama empat belas hari dalam kultur monolayer, tetapi kemudian ekspresi tersebut menetap selama waktu kultur berikutnya sampai hari ke duapuluh delapan. Penelitian lainnya menunjukkan bahwa waktu kultur tidak mempengaruhi sintesis Col-1 lebih dari dua puluh dua hari lamanya, Hal ini didukung oleh Tjaderhane *et al*, yang menunjukkan bahwa konsentrasi sintesis Col-1 yang menetap dalam kultur odontoblas lebih dari sepuluh hari lamanya. ⁽¹⁵⁹⁾ Demikian pula pada saat pembentukan nodul mineral diinduksi pada hari ke empat belas dalam media differensiasi, maka ekspresi Col-1 sedikit berkurang seperti yang ditunjukkan oleh Liu *et al*.⁽¹³⁶⁾ Peningkatan Col-1 menunjukkan sintesis kolagen yang terdeposisi yang dihasilkan oleh sel ADMSC dan sel DPSC.

Col-1 merupakan penanda molekuler yang terekspresikan saat odontoblas sudah mengalami differensiasi sempurna, dan berperan penting pada deposisi mineral pembentuk matriks ekstraselular serta menyediakan kekuatan pada proses mineralisasi dentin. Secara umum pembentuk matriks ekstraselular memegang peranan penting dalam proses regenerasi jaringan, hal ini sejalan dengan Zuk *et al* (2002) yang menyatakan bahwa kedua jenis ADMSC dan DPSC

tersebut memiliki potensi untuk membentuk struktur jaringan keras mirip tulang dan gigi.⁽³²⁾ Pada penelitian ini, lebih tingginya nilai rerata Col-1 pada kelompok ADMSC dibandingkan dengan kelompok DPSC, disebabkan karena Col-1 merupakan penanda molekuler yang terekspresikan saat odontoblas sudah mengalami diferensiasi sempurna, hal ini dapat terlihat dari hasil DMP-1 pada tabel 5.4 dan 5.5, yang menunjukkan bahwa ADMSC mempunyai nilai DMP-1 lebih besar dibandingkan DPSC, maka odontoblas yang dihasilkan oleh ADMSC lebih besar, sehingga kolagen yang terdeposisi tersebut juga semakin besar nilainya. Disamping itu dari uji korelasi antara ekspresi DMP-1 dan COL-1 menunjukkan hubungan yang sangat kuat dan searah, dengan $r = 0.914$ sehingga merupakan rangkaian sitodiferensiasi spesifik yang berkesinambungan antara keduanya. Disamping itu dari uji korelasi antara ekspresi DMP-1 dan COL-1 menunjukkan hubungan yang sangat kuat dan searah, dengan $r = 0.914$ yang merupakan suatu rangkaian sitodiferensiasi khusus yang berkesinambungan antara kedua parameter tersebut. (Tabel 5.12)

Predominant collagen dalam matriks ini adalah Col-1, yang secara *in vitro* dideteksi melalui serangkaian penelitian tentang ekspresi gen atau sintesis protein. Pada penelitian ini ekspresi Col-1 diukur pada masing-masing kelompok sel ADMSC dan sel DPSC sebelum berinteraksi dengan *scaffold* PRP, PRF dan FG, untuk melihat apakah kolagen terdeposisi tersebut dihasilkan oleh sel punca itu sendiri atau berasal dari matriks jaringan hasil interaksi sel punca dengan *scaffold*. Karena itulah ekspresi Col-1 diukur sebelum dan sesudah perlakuan.⁽¹¹²⁾

6.3 Scaffold Yang Berasal Dari Produk Plasma (PRP, PRF Dan FG)

Untuk dapat menginduksi proses dentin regeneratif maka dimanfaatkan polimer, yang akan digunakan sebagai *scaffold*, sehingga sel lir-odontoblas yang tumbuh di dalam matriks ini selanjutnya akan dikonversi ke arah proses dentinogenesis..⁽¹⁰⁰⁾ Digunakannya *scaffold* yang berasal dari berbagai produk plasma pada penelitian ini adalah untuk meminimalkan resiko penolakan sistem imun tubuh, karena itu sampel penelitian ini diambil dari pasien dengan golongan darah AB, sehingga tidak ada pembentukan ikatan reseptor dengan MHC II (*low risk*).^{(28),(24, 29)} Semua biomaterial yang digunakan sebagai bahan kaping pulpa

saat ini harus dapat berfungsi sebagai pembawa molekul pemberi sinyal. Disain biomaterial saat ini difokuskan pada potensi penyembuhan melalui stimulasi regenerasi jaringan pulpa karena adanya pelepasan biomolekul.⁽¹⁶⁰⁾ Efek biologi dari material restorasi sampai saat ini masih banyak yang belum terungkap karena lingkungan mulut yang dinamis dengan adanya bakteri, perubahan suhu serta iritasi mekanis maupun khemis yang terus menerus terjadi.⁽¹⁶¹⁾

Sedangkan PRP, PRF dan FG merupakan *autologus scaffolds* berfungsi sebagai bahan adhesif yang menempelkan berbagai partikel bahan grafting terutama osteoblas dan odontoblas, sehingga dalam penelitian ini PRP diekstrapolasikan terutama sebagai bahan adhesif yang bersifat aktif. Dalam proses regenerasi jaringan pulpa, terdapat tiga faktor penting untuk memastikan terjadinya proses tersebut yaitu BMP, VEGF (pembuluh darah) dan BDNF (neuron).^(113, 132) sedangkan komponen *growth factor* autologus PRP dari hasil penelitian yang ada menunjukkan bahwa rerata konsentrasi jumlah pellet PRP lebih besar empat kali lipat dibandingkan jumlah pellet *baseline* dari pasien. Dengan peningkatan yang sangat bermakna tersebut, maka penggunaan autologus PRP dapat dipastikan mempercepat proses penyembuhan secara alami dan meningkatkan prognosis untuk hasil yang diharapkan yaitu regenerasi jaringan.^(114, 132)

Platelet dalam produk plasma inilah yang akan melepaskan *α granules*, berupa adenosin di-phosphate (ADP), serotonin dan thromboxane, di mana peristiwa degranulasi ini akan menghasilkan pelepasan sitokin yang dapat merangsang migrasi dan proliferasi sel dalam matriks fibrin yang merupakan awal dari proses penyembuhan. Platelet yang melepaskan *growth factors* serta *protein bioaktif* dalam dirinya yang berperan penting dalam proses regenerasi jaringan. Atas dasar pertimbangan faktor-faktor tersebut di atas, maka dalam penelitian ini digunakan *autologus scaffold* dari produk plasma PRP, PRF dan FG, karena telah terbukti dari hasil-hasil penelitian sebelumnya dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi ke arah sel odontoblas dan sel jaringan penyambung lainnya. *Scaffold* plasma ini pada saat diadhesikan dengan sel punca maka interaksinya akan lebih banyak ke sel punca itu sendiri dan lingkungan (*niche*).

6.3.1 Ekspresi Konsentrasi *Adhesion assay*

Setelah bentuk sediaan untuk PRP, PRF tersedia dalam bentuk gel, selanjutnya segera dilakukan *grafting* dengan masing-masing ADMSC dan DPSC dengan lem fibrin (FG) serta uji Col-1 untuk mengukur kolagen terdeposisi setelah adhesi sel dan scaffold plasma. Pada *uji Adhesion assay*, nilai rerata tertinggi ada pada kelompok DPSC+ FG dan terendah ada pada kelompok ADMSC+PRP gel+FG.(Tabel 5.8)

Pada uji beda rerata *Adhesion assay* antar pasangan kelompok perlakuan (Tabel 5.9), menunjukkan bahwa di dalam kelompok PRPGEL antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) dengan kelompok DPSC menunjukkan hasil tidak berbeda kecuali terhadap kelompok DPSC+FG menunjukkan hasil yang berbeda. Sedangkan pada kelompok PRF antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) terhadap kelompok DPSC dengan interaksi yang sama menunjukkan hasil yang tidak berbeda kecuali terhadap kelompok DPSC+FG, dimana nilai rerata kelompok DPSC lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok ADMSC. Demikian pula halnya dengan kelompok FG antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) menunjukkan hasil yang tidak berbeda.

Dapat disimpulkan bahwa hasil uji adhesi antara *scaffold* plasma PRP, PRF dan FG terhadap masing-masing ADMSC dan DPSC menunjukkan hasil yang tidak berbeda bermakna. Meskipun dari hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa PRF sebagai konsentrat platelet generasi kedua yang diperkaya oleh platelet dan *growth factor* memberikan hasil yang lebih baik dalam mengekspresikan efek proliferasi dan diferensiasi pada osteoblas tikus dibandingkan dengan PRP secara *in vitro*.^(40, 41) Dengan demikian hipotesis kelima dari penelitian ini terjawab yaitu bahwa PRP, PRF dan FG mempunyai potensi yang sama sebagai *scaffold* untuk meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel ADMSC dan sel DPSC ke arah galur odontoblas.

Pada tahap adhesi terjadi proses proliferasi dan diferensiasi sel punca mesenkhim ke arah odontoblas dan sel jaringan penyambung lainnya, serta sekresi parakrin dari masing-masing sel punca mesenkhim terhadap *microenvironment* jaringan sekitarnya. Sel punca mesenkhim bersifat bioaktif terhadap sel maupun

jaringan yang ada di sekitarnya termasuk PRP, PRF maupun FG, sehingga *scaffold* plasma tersebut dapat bersifat adhesif terhadap semua partikel yang menempel pada permukaan *scaffold* tersebut. Di samping itu *growth factor* yang ada di dalam sel punca mesenkhim akan memperbaiki *second messenger* dari sel-sel yang mengalami kerusakan dan memberikan sinyal kepada jaringan di sekitarnya antara lain dengan mengaktifkan FG untuk bersifat adhesif, membentuk odontoblas, serta mencegah apoptosis. Selanjutnya *growth factor* ini akan berkolaborasi dengan *scaffold* plasma tersebut menghasilkan matriks kolagen untuk proses regenerasi jaringan dan hal ini terbukti pada tabel 5.6. Sel punca mesenkhim juga mempunyai integrin yang merupakan reseptor yang memediasi perlekatan antara sel dan jaringan sekitar, seperti halnya sel dengan *scaffold* plasma, yang berperan dalam pengiriman sinyal transduksi serta pengaturan siklus, bentuk dan motilitas sel.^(38, 151)

Sedangkan terhadap hasil uji adhesi yang menunjukkan kelompok DPSC yang memiliki nilai rerata yang lebih besar dibandingkan kelompok ADMSC, dapat dijelaskan bahwa pada hubungan antara sel dan ECM bersifat *physical microenvironment*, dimana *scaffold* plasma mengaktifkan sinyal untuk terjadinya *physical microenvironment* tersebut dari sel terhadap *scaffold*, melalui reseptor integrin yang dihasilkan oleh sel punca mesenkhim. Selanjutnya PDGF sebagai salah satu *growth factor* yang terkandung dalam *scaffold* plasma berfungsi untuk mengaktifkan proliferasi dan diferensiasi sel preadipocyte menjadi sel adipocyte yang matang (mesenkhim) untuk kemudian menjadi inhibitor yang menghambat terjadinya proliferasi yang berlebihan melalui mekanisme apoptosis, karena itulah pada grafting sel terhadap *scaffold* plasma, ADMSC memiliki nilai adhesi yang lebih rendah dibandingkan DPSC.^(31, 38, 162)

Pada penelitian ini penggunaan uji Adhesi berdasarkan modifikasi MTT Assay, seperti yang dilakukan oleh Raymond et al (1991), Ichiro et al (1993) dan Shi J et al (2009), merupakan metode pengujian yang mudah, sederhana serta mudah diaplikasikan untuk adhesi berbagai sel dan materi *scaffold* lainnya.⁽¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾

6.3.2 Ekspresi Col-1 Sel ADMSC dan Sel DPSC setelah interaksi dengan *Scaffold Plasma*.

Ekspresi Col-1 sel punca sebelum dan sesudah interaksi dengan *scaffold* plasma menunjukkan hasil yang sama yaitu nilai rerata tertinggi ada pada kelompok ADMSC (dengan atau tanpa penambahan protein pulpa) sedangkan nilai rerata terendah ada pada kelompok DPSC.(tabel 5.10)

Pada uji beda rerata COL-1 ($p < 0.05$) waktu perlakuan satu hari menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok DPSC terhadap kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa), terhadap penambahan PRPGEL yaitu antara kelompok ADMSC+FG dengan interaksi yang sama, antara kelompok ADMSC dan DPSC, terhadap penambahan PRF yaitu antara kelompok ADMSC+FG dengan interaksi yang sama, antara kelompok ADMSC dan DPSC, antara kelompok DPSC+FG dengan interaksi yang sama, terhadap kelompok FG yaitu antara kelompok ADMSC (dengan atau tanpa protein pulpa) dengan kelompok DPSC.(Tabel 5.11) Dengan demikian hipotesis keenam dari penelitian ini ditolak yaitu bahwa ADMSC mempunyai potensi regeneratif yang lebih besar dibandingkan dengan DPSC dilihat dari analisis produk dari masing-masing sel punca mesenkhim tersebut pada saat berinteraksi dengan dan tanpa *scaffold* PRP, PRF dan FG.

Potensi regeneratif yang lebih besar pada kelompok ADMSC dibandingkan dengan DPSC disebabkan karena ADMSC mempunyai sifat plastisitas yang tinggi untuk melakukan metamorphosis/transdiferensiasi membentuk matriks kolagen dibandingkan dengan DPSC. Di samping itu sel punca mesenkhim dalam ADMSC dan DPSC mempunyai integrin yang berperan dalam mediasi perlekatan sel terhadap *scaffold* melalui mekanisme pengaturan pengiriman sinyal molekul *scaffold* tersebut kepada sel. ^(38, 67, 151, 162) Sehingga interaksi ADMSC dan DPSC dengan *scaffold* plasma bersifat sinergis, meningkatkan kolagen terdeposisi. Hal tersebut sejalan dengan hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan potensi PRP dalam pemberian sinyal seluler untuk diferensiasi odontoblas, serta peningkatan ekspresi gen mRNA dari dentin sialoprotein dan dentin matriks protein, yang banyak diekspresikan dalam

odontoblas.⁽³⁸⁾ Dari hasil penelitian Orhan et al (2011) dilaporkan bahwa penggunaan PRP sebagai matriks *scaffold* dengan *enamel matrix derivative* dapat meningkatkan jumlah sel lir-odontoblas serta menambah ketebalan dentin reparatif pasca perawatan kaping pulpa pada hewan percobaan tikus Wistar.⁽³⁹⁾

Dilakukannya uji Col-1 segera setelah grafting disebabkan karena penggunaan *scaffold* plasma autologus harus segera dilakukan perlakuan, mengingat bahan biologis ini mudah terurai seiring dengan berjalannya waktu, menyebabkan terdegradasinya *growth factor*, atau menjadi fibrin lysis. Penyimpanan untuk FG dan PRP pada minus 20°C dalam jangka waktu yang cukup lama (tahun), sedangkan PRF tidak direkomendasikan untuk disimpan.^(41, 42, 120)

6.4. Analisis Korelasi Antar Paramater Pengukuran

6.4.1 Korelasi ekspresi Stro-1 terhadap BMP-2

Rangkaian perubahan molekuler yang terjadi pada saat proses dentinogenesis menunjukkan adanya hubungan yang kuat dari setiap ekspresi gen. Pada tabel 5.12 terlihat adanya hubungan korelasi yang kuat dan searah antara ekspresi Stro-1 dan BMP-2 dengan $r = 0.823$ yang mengindikasikan terjadinya rangkaian urutan yang berkesinambungan antara peningkatan jumlah sel punca mesenkhim yang diekspresikan melalui Stro-1 akan menaikkan kadar konsentrasi BMP-2 sebesar 0.039 ng/ml.

Dari analisis Stro-1 dan BMP2 ini dapat disimpulkan bahwa setiap kenaikan jumlah ADMSC dan DPSC yang terdeteksi positif oleh Stro-1 dapat menaikkan kadar konsentrasi BMP2 yang disekresikan oleh masing-masing sel punca mesenkhim tersebut.

6.4.2. Korelasi ekspresi BMP-2 terhadap DMP-1

Pada tabel 5.12 terlihat adanya hubungan korelasi yang kuat dan terbalik antara ekspresi BMP-2 terhadap DMP-1 dengan $r = -0.846$, hal ini menunjukkan bahwa keberadaan BMP-2 yang disekresikan oleh masing-masing ADMSC dan DPSC berkaitan erat tetapi tidak berhubungan langsung dengan ekspresi DMP-1. Karena DMP-1 yang terekspresi disini adalah merupakan hasil induksi dari

rhBMP-2 pada ADMSC dan DPSC yang diberikan secara exogenous untuk menghasilkan sel odontoblas.^(156, 158)

6.4.3 Korelasi ekspresi BMP-2 terhadap Col-1

Pada tabel 5.12 terlihat adanya hubungan korelasi yang kuat namun terbalik antara ekspresi BMP-2 terhadap Col-1 dengan $r = -0.956$, hal ini menunjukkan bahwa ekspresi BMP-2 yang di sekresikan oleh masing-masing ADMSC dan DPSC berkaitan erat tetapi tidak berhubungan langsung dengan ekspresi Col-1. Karena Col-1 disintesis oleh sel odontoblas yang telah berdiferensiasi sempurna.⁽¹⁵⁷⁾

6.4.4 Korelasi ekspresi DMP-1 terhadap Col-1

Pada tabel 5.12 terlihat adanya hubungan korelasi yang kuat dan searah antara ekspresi DMP-1 terhadap Col-1 dengan $r = 0.914$ yang mengindikasikan terjadinya rangkaian urutan yang berkesinambungan antara peningkatan ekspresi DMP-1 akan menaikkan kadar konsentrasi Col-1 sebesar 0.0000062 ng/ml. Hal ini berarti bahwa peningkatan ekspresi DMP-1 menunjukkan kenaikan jumlah sel odontoblas yang terdeteksi dalam ADMSC dan DPSC yang telah berdiferensiasi sempurna, sedangkan Col-1 disekresikan oleh sel odontoblas tahap akhir tersebut, sehingga terlihat adanya rangkaian yang berkesinambungan dalam proses regenerasi jaringan yang bersumber dari sel odontoblas.

6.4.5 Korelasi ekspresi DMP-1 terhadap *Adhesion assay*

Pada tabel 5.12 terlihat adanya hubungan korelasi yang kuat dan searah antara ekspresi DMP-1 terhadap *Adhesion assay* dengan $r = 0.943$ yang mengindikasikan terjadinya rangkaian urutan yang berkesinambungan antara peningkatan ekspresi DMP-1 akan menaikkan kadar konsentrasi *Adhesion assay* sebesar 0.0000017 ng/ml. Hubungan korelasi yang sangat kuat ini turut membuktikan hipotesis kelima dari penelitian ini yaitu bahwa PRP, PRF dan FG mempunyai potensi yang sama sebagai *scaffold* untuk meningkatkan proliferasi dan diferensiasi ADMSC dan DPSC ke arah galur odontoblas, dimana sel

odontoblas yang dihasilkan dideteksi oleh penanda yang khas untuk odontoblas yaitu DMP-1.

6.4.6 Korelasi ekspresi Col-1 terhadap *Adhesion assay*

Pada tabel 5.12 terlihat adanya hubungan korelasi yang kuat dan searah antara ekspresi Col-1 terhadap *Adhesion assay* dengan $r = 0.820$ yang mengindikasikan terjadinya rangkaian urutan yang berkesinambungan antara peningkatan ekspresi Col-1 akan menaikkan kadar konsentrasi *Adhesion assay* sebesar 0.0000017 ng/ml. Hal ini berarti bahwa kenaikan ekspresi Col-1 menunjukkan banyaknya matriks kolagen yang terdeposisi dari ADMSC dan DPSC yang telah berdiferensiasi sempurna dan membentuk matriks ekstraseluler jaringan. Sedangkan *scaffold* plasma dalam interaksinya dengan sel akan mempengaruhi proses proliferasi dan diferensiasi ADMSC dan DPSC ke galur odontoblas dan menghasilkan matriks kolagen yang terdeposisi. Sehingga dengan demikian dalam korelasi yang kuat ini turut mendukung penolakan hipotesis keenam dari penelitian ini yaitu bahwa ADMSC mempunyai potensi regeneratif yang lebih besar dibandingkan DPSC melalui analisis produk dari masing-masing sel punca tersebut pada saat berinteraksi dengan dan tanpa *scaffold* PRP, PRF dan FG.

6.4.7 Korelasi *Adhesion assay* terhadap Col-1 setelah *grafting*

Pada tabel 5.12 terlihat adanya hubungan korelasi yang lemah dan searah antara ekspresi Col-1 terhadap *Adhesion assay* dengan $r = 0.256$ atau dengan koefisien determinasi hanya sebesar 6.5%. Hal ini berarti bahwa pengaruh *scaffold* plasma dalam interaksinya dengan ADMSC dan DPSC untuk meningkatkan potensi pembentukan matriks ekstraseluler tidak sebesar potensi regeneratif yang dimiliki oleh masing-masing sel punca tersebut jika tanpa interaksinya dengan *scaffold* plasma.

Dari keseluruhan hasil dan pembahasan penelitian tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa, kebaruan dalam penelitian ini adalah diperolehnya suatu konsep baru tentang perawatan dan penyembuhan pulpitis melalui pendekatan teknik rekayasa jaringan dengan menggunakan sumber sel alternatif di luar jaringan pulpa dan *scaffold* autologus manusia untuk proses regenerasi jaringan

pulpa *in vitro*. Penelitian ini memodifikasi penelitian-penelitian yang telah ada tentang potensi jaringan lemak dalam berdiferensiasi ke berbagai galur kecuali odontoblas, serta *scaffold* plasma yang telah terbukti dapat meningkatkan jumlah sel lir-odontoblas untuk menjadi satu konsep perawatan berbasis rekayasa jaringan dengan pemahaman teori biomolekuler.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. ADMSC dapat mensekresikan metabolit aktif berupa sitokin yang terkandung di dalam media kondisi ADMSC yang kemungkinannya adalah Angiopoietin, HGF, IGF-1, MCP-1, SDF-1 dan BMP-2 yang dapat mendukung proses diferensiasi ke galur odontoblas.
2. Secara umum dapat disimpulkan bahwa ADMSC dapat menjadi alternatif sumber sel odontoblas untuk regenerasi jaringan pulpa.
3. ADMSC mempunyai karakteristik sel punca mesenkhim yang sama dengan DPSC.
4. ADMSC dan DPSC mempunyai potensi yang sama untuk berdiferensiasi ke galur odontoblas.
5. ADMSC mempunyai potensi pembentukan matriks ekstraseluler yang lebih besar dibandingkan dengan DPSC.
6. *Scaffold* PRP, PRF dan FG dapat meningkatkan potensi ADMSC dan DPSC dalam memproduksi matriks ekstraseluler.
7. ADMSC mempunyai potensi regeneratif yang lebih besar dibandingkan dengan DPSC dilihat dari analisis produk dari masing-masing sel punca mesenkhim tersebut pada saat berinteraksi dengan dan tanpa *scaffold* PRP, PRF dan FG.

7.2 Saran

1. Meskipun jaringan lemak telah terbukti mempunyai potensi yang sama dengan jaringan pulpa sebagai sumber sel odontoblas, namun masih diperlukan kajian yang lebih rinci tentang indikator yang lebih spesifik yang mengindikasikan proses regenerasi jaringan pulpa.
2. Untuk dapat diaplikasikan dalam praktek kedokteran gigi, maka hasil riset ini perlu dikaji melalui penelitian *in vivo* pada hewan coba dan manusia

3. Dengan tersedianya bentuk siap pakai *scaffold* plasma PRP,PRF dan Fibrin Glue dalam penelitian ini, maka dapat dijadikan protokol untuk pembuatan *scaffold autologus* untuk aplikasi klinik..
4. Dari hasil analisis media kondisi lemak dalam penelitian ini yang banyak menghasilkan faktor bioaktif , perlu dikembangkan menjadi alternatif perawatan sel punca, dengan uji klinis lebih lanjut.



DAFTAR PUSTAKA

1. Soerono Akbar SM. Penyakit Endodontik dalam Endodontologi, *Kumpulan Naskah 1991.2003, edisi 1, 2003.*
2. Lestari. PI. *Prevalensi dan Distribusi frekuensi penyakit pulpa berdasarkan faktor pejamu (manusia) di Klinik Integrasi RSGMP.FKGUI periode bulan Maret-Juni 2007.* Jakarta 2007.
3. Maureen. D. *Pola Penyebaran penyakit pulpa berdasarkan jenis kelamin, usia dan kelompok elemen gigi (kajian di Klinik Integrasi RSGMP FKGUI tahun 2008).* Jakarta 2009.
4. Soerono Akbar SM. *Respon Jaringan Pulpa dan Jaringan Periapikal Terhadap Pembuangan Jaringan Yang Terinfeksi Pada Perawatan Endodontik: universitas Airlangga.; 1986*
5. Bender IB.. Reversible and Irreversible painful pulpitis: Diagnosis and Treatment. *Aust Endod J 2000;26:1:10-4.*
6. Lopez J. JF. Aetiology, Classification and Pathogenesis of Pulp and Periapical Disease. *Med Oral Patiol Oral Civ Buccal 2004;9 Suppl:58-62:52-7*
7. Trowbridge H. Histology of pulpal inflammatio. In: *Hargreaves KM GH, editors. Seltzer and Bender's Dental Pulp.* Quintessence Publishing Co., Inc; Carol Stream ,IL, USA, editor 2002.
8. Huang TJ.. Pulp and Dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med 2009;9(4(5)):697-707.*
9. Rutherford R.B SL, Tucker M, Charette M. Osteogenic Protein-1 stimulates reactionary dentin formation (abstract). *J Dent Rest 1995(4 (Spec Iss)):83.*
10. Iohara K NM, Ito M. Dentin regeneration by dental pulp stem cells therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res;8(8):590-95.*
11. Sloan A.J Smith A.J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis 2007;13:151-57.*
12. Gronthos, J. Brahim, W. Li, L.W. Fisher, N. Cherman, A. Boyde, P. DenBesten, P. Gehron Robey, and S. Shi. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res 2002;81(8):531-5.*

13. Zhang W, Yellick PC. *Vital Pulp Therapy-Current Progress of Dental Pulp Regeneration and Revascularization.International*. 2010;856087
14. De Queiroz MA AS, Leonardo MR, Nelson-Filko P, Bezcora da Silva LA. . MTA and Calcium Hydroxide for Pulp capping. *J ApplOral Sci*. 2005;:13
15. Holland GR, Filho JAO, de Souza V, Nery MJ, Bernabe PFE, Junior ED. Mineral Trioxide Aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* 2001;27:281-84.
16. Camilleri J. The biocompatibility of modified experimental portland cements with potential use in dentistry. *Int Endod J* 2008;41::1107-14.
17. Tziafas D. The Future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Research*, 2004;38;314-20.
18. Bergenholtz G. *Factors in pulpal repair after oral exposure*. *Adv Dent Res* 2001;15:84.
19. Towbridge H.O. Pathogenesis of pulpitis resulting from dental caries. *J Endod* 1981;7;52-60
20. Kakehashi S SHR, Frtizgerald R. The Effects of Surgical Exposure of Dental Pulp in germ free and conventional laboratory rats.*Oral Surg.Oral* ,1969:20-340. MOP. The Effects of Surgical Exposure of Dental Pulp in germ free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969:20-340.
21. Cvek M, Granath L, Cleaton-Jones P.AustinJ. Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10and 60 minutes. *J Dent Res* 1987;66:1166-74.
22. Schroeder K. Effect of Calcium Hydroxide-containing agent on pulp cell migration, proliferation,and differentiation. *J Dent Res* 1985;64:541-8
23. Wei Jing LW, Yunfeng, Lin Lei Liu, Wei Tang, Weidong Tian. Odontogenic differentiation of adipose derived stem cells for tooth regeneration:necessity, possibility, and strategy. *J of Medical Hypotheses*. 2007;70:540-2.
24. Abidin. T. Inovasi perawatan konservasi gigi melalui teknologi *tissue engineering* dalam *Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap bidang Ilmu Konservasi Gigi FKG USU* 2007:1-39.

25. Rosso F, Marino G, Giordano A, et al.. Smart Material as Scaffolds for Tissue Engineering. *J of Cellular Physiology* 2005;203:465-70.
26. Lee J, Cuddihy JM, Kotov NA.. *Three- Dimensional Cell Culture: State of Art. Tissue Engineering: Part B* 2008;14(1)
27. Griffith LG SM. *Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. . Molecular Cell Biology* 2006;7 (3):211-17.
28. Shehab El-Din M.Saber. Tissue engineering in endodontics. *J Oral Science, 2009;51(4:): 495-507.*
29. C. Mauth AH, U. Graf-Hausner and J-F Roulet . *Restorative Applications for Dental Pulp Therapy. In Tissue Engineering* 2007;3:1-32.
30. Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease growth factors as key mediators. *Dent Educ* 2003;67(6):678-89.
31. Chia-Nung Hung KM, Hao-Chen Chang, Yi-Lun Chiang, Huai-Yun Hu, Chia-Chi Lai, Rei-Min Chu, Chang M.Ma. A comparison between adipose tissue and dental pulp as sources of MSCs for tooth regeneration. *J Biomaterial* 2011;32:6995-7005.
32. Zuk PA ZM, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell. 2002.;13:4279-95*
33. Sujeong Jang H-HC, Yong-Bum Cho. Neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology. 2010;11:1427-2121*
34. Yu-Xin Xu LC, Rong Wang, Wei-Kai Hou. . Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanism. 2008;71:390-3.
35. Tozum Fikret T DB. Platelet rich plasma. A Promising Innovation in Dentistry. *J Can Dent Assoc* 2003;69(10):664.
36. Lacci M.K. DA. Platelet rich plasma. Support its Use in Wound Healing. *J Biol Med* 2010;83(1):1-9.
37. Shigeru O. *Effects of Platelet rich plasma on Dental Pulp Cells. Jof Conservative Dent* 2006;49(1):149-58.
38. Frechette J-P, Martineau and Gagnon G. Platelet-rich Plasmas: Growth factor content and roles in wound healing. *J Dent Res* 2005;84(434.)

39. Orhan EO, Maden M, Senguiven B. Odontoblast-like cell numbers and reparative dentine thickness after direct pulp capping with platelet-rich plasma and enamel matrix derivative: a histomorphometric evaluation. *Journal of Endodontic* 2011.
40. Chung-Hung Tsai,¹ Shih-Ya Shen,² Jiing-Huei Zhao,³ Yu-Chao Chang^{2,3*} Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells *in vitro* *J Dent Sci* 2009;4(3):130-5
41. Ling He, PhD,^a Ye Lin, DDS^b Xiulian Hu, DDS^c Yu Zhang, DDS^c and Hui Wu, MDS^c. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts *in vitro* *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:707-13.
42. Carlson NE Roach R.B. Platelet-rich plasma: Clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc* 2002;13(10):1383-6.
43. Abidin. T. Efek dentinogenesis Kitosan dan derivatnya terhadap inflamasi jaringan pulpa gigi reversibel. Laporan akhir penelitian riset pembinaan iptek kedokteran 2006/2007(USU-Medan).
44. Linde A, Goldberg M.. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4: 679-728.
45. Laino G, Graziano A, d'Aquino R. et al. An approachable human adult stem cell source for hard tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006;;206:693-701.
46. Holland GR T. *The Dental Pulp and Periradicular Tissues*. 4th ed. ed: Saunders; 2009.
47. Weine FS. *Endodontic therapy*. 4 ed: St. Louis; 2004.
48. Batouli S MM, Gronthos S. et al . Comparison of stem cell mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Rest* 2003;82:976-81.
49. Trowbridge H SH. *Structure and Functions of the Dentin and Pulp Complex*. 8th ed: Mosby.; 2002.
50. Torabinejad M WR. *Endodontics. Principles and Practice*. ed t, editor: St. Louis Missouri: Saunders Elsevie; 2009.

51. Ghavamnasiri M, Mousavinasab M, Mohtasham N, A histopathologic study on pulp response to glass-ionomer cement in human teeth. *Journal of Dentistry* 2005:135-41.
52. Murray PE, Windsor LJ Analysis of pulpal reaction to restorative procedures, materials, pulp capping and future therapies. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2002;6:508-20.
53. Zhu Q HR, Safave K.E, Spangberg Adhesion of human osteoblast on root end filling materials. *J Endod*. 2000;26:404-06.
54. Okiji T YK . Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view . *International Journal of Dentistry* 2009
55. Eni-Juliana A SHZ, Rohaya MAW, Nik-Marzuki S. Molecular existence of mature odontoblast and osteoblast cell in adult human pulp tissues. *Asian J Biochem* 2009;40:36-44.
56. Bonson S JB, Lallier TE. Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *Journal of Dental Research* 2004;83:408-13.
57. Inoue M LR, Inoue M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Yamamoto T, Nagai N. In vitro response of osteoblast-like and sel lir-odontoblas to unsubstituted and substituted apatites. *Journal of Biomedical Materials Research* 2004;70A:585-93.
58. Pantera EA.Pulpal Diagnosis. Clinical diagnosis. Dept. of Periodontics and Endodontics. Univ of Buffalo. Pulpal Diagnosis. Clinical diagnosis. *Dept of Periodontics and Endodontics Univ of Buffalo*2010
59. Gibbs JL, Hargreaves KM. *Mechanisms of Odontogenic and Non Odontogenic Pain* . 6th ed ed2008.
60. Fouad AF, Huang TJG. *Inflammation and Immunological Responses*. 6th ed. ed2008.
61. Seltzer S, Bender ED. *The Dental Pulp*. 3th ed. Philadelphia1990.
62. Baumgartner JC, Siqueira JF, Sedgley CM, Kishen A. *Microbiology of Endodonctic Disease*. 6th ed. ed2008.
63. Baumgartner JC HJ, Siqueira JF . *Endodontic Microbiology and Treatment of Infections*. 8th ed. ed2006.

64. Smith A.J. *Pulpal response to caries and dental repair*. Caries research 2002;36:223-32.
65. Mc Kee CD. *Over the counter treatment of Scars*. Pharmacists in Community-based-practice.
66. Martins-Gren. M. The dynamics of Cell-ECM Interactions, with Implications for tissue engineering. Departmen of Biology, *University of California, Riverside* 92:521: 2005.
67. Bucala R. *New Concepts in Wound Healing*. Fibrocytes: Circulating Fibroblast that mediate tissue repair., the Picower Institute for medical research, Manhasset, NY 11030, USA *European Tissue Repair Society* 2003.
68. Singer, j. Adams and Clark, A.F. Richards.. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, Sept.1999;341:738-46.
69. Sorrel JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity : more than skin Deep. *Journal of Cell Science*2004:117:667-75.
70. Mignatti P RD, Welgus HG, Parks WC. . Proteinase and Tissue remodeling.In: Clark RAF, ed. *The molecular and cellular biology of Wound Repair*. 2nd ed New York:Plenum Press1996:171-94.
71. Enoch Stuart & Price Patricia. *Cellular,molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds,chronic wounds and wounds in the aged* 2004:.
72. Fong CD, Davis MJ.. *Partial pulpotomy for immature permanent teeth, its present and future*. *Pediatr Dent* 2002;24:29-32, .
73. Robbin SL, Angell M.. *Basic Pathology*. 28-62. Saunders Philadelphia W, editor1971.
74. Smith A.J, Murray P.E, Sloan A.J,Matthews J.B,Zhao S. *Trans-dentinal stimulation of tertiary dentinogenesis*. *ADR*2001;15:51.
75. Avery J. Repair potential of the pulp. *J Endod* 1981;7(5):205.
76. Tziafas D, Belibasakis G, Papadimitrou S. Dentin regeneration in vital pulp therapy design principles. *Advances in Dental Research* 2001;15:96.
77. Ostby BN. The Role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental hidtologic study. *Acta Odontol Scand* 1961;19:324-53

78. Myers WC FS. Dental pulp regeneration aided by blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;37:441-50.
79. Ellis E, 3rd, Cox CF, Hitchcock R, Baker J. Vital apicoectomy of the teeth: a 1-4 week histopathological study in *Macaca mulatta*. *J Oral Pathol* 1985;14:718-32.
80. Hitchcock R, Ellis E, 3rd, Cox CF. Intentional vital root transaction : a 52 week histopathologic study in *Macaca mulatta*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60:2-14
81. Sheridan MH, Shea LD, Peters MC, Mooney DJ. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue of engineering capable of sustained growth factor delivery . *J Control Release* 2000;64:91-102
82. Smith A J. Dentin Formation and Repair. In Hargreaves KM Goodies H.E.(eds): *Seltzer and Bender's Dental Pulp*. Chicago Quintessence Publ,Co,Inc 2002:41-62.
83. Tziafas D PO, Alvanou A, Belibaskus G and Papadimitrou S. . The Dentinogenic effect of Mineral Trioxide Aggregate (MTA) in short term capping experiments. *Int J Endod* 2002;35:245-54.
84. Inoue T SM. *Repair dentinogenesis following transplantation in to normal and germ free animals* Proceeding of the finish dental society 1992;88(Suppl):183-94.
85. Schroeder U. Effects of calcium hydroxide-containing agent on pulp cell migration, proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985;64:541-8
86. Rutherford R.B. *Regeneration of the pulp-dentin complex*. In: *Tissue engineering; Applications in maxillofacial surgery and periodontics*. 1999. (Lynch SE, Genco RJ, Marks RE, editors. Chicago).
87. Cox C.F, Subay R.K, Suzuki S, Suzuki S.H, Osro E. Biocompatibility of various dental materials: Pulp healing with a surface seal. *Int J Periodontic Restorative Dent Educ Quintessence Publishing Co* 1996;1999;16:240-51.185-99.
88. Koh E.T, Mc Donald F, Pittford T.R, Torabinejad M., Pittford T.R, Torabinejad M. Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1998;23:543-7.

89. Torabinejad M and Chevian N. Clinical application of Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod* 1999;25:197-205.
90. Zhu Q HR, Safave K.E, Spangberg Adhesion of human osteoblast on root end filling materials. *JEndod.* 2000;26:404-06.
91. Torabinejad M, Hong C.U, Mc Donald F, pittford T.R.. Physical and chemical properties of new root and filling materials. *J Endod* 2000;26:404-06
92. Faraco Jr i M, and Holland R. *Histopathological Response of Dogs Dental Pulp Capped With White Mineral Trioxide Aggregate.* *Braz Dent J*2004;15
93. Holland R FJA, de Souza V, Nery M.J, Bernabe P.F.E, Junior E.D. . Mineral Trioxide Aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod.* 2001;27:281-84.
94. Abidin. T. Efek Osteogenik Kitosan pada Perawatan endodontik Ulang dengan Tindakan Bedah (laporan kasus). *Majalah CerilCeramah Ilmiah XVII FKG-UGM, 2005:10-4.*
95. Pietrzak WS, Woodell-May J, Mc Donald N. Assay of Bone Morphogenetic protein-2,-4,-7 in human demineralized bone matrix. *J Craniofac Surg* 2006;17:84-90.
96. Zimmermann J, Bittner K, Stark B, Mulhaupt R.. Novel hydrogels as supports for in vitro cell growth: poly(ethylene-glycol) and gelatine based (meth) acrylamidopeptide macromonomers. *Biomaterials* 2002;23:2127-34.
97. Le Geros RZ. *Properties of osteoconductive biomaterials calcium phosphates.* *Clin Orthop Relat Rest.* 2002;395:81-98.
98. Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ. *Stimulation of the rat dentine-pulp complex by BMP-7 in vitro.* *Arch Oral Biol* 2000;;45:173-7.
99. Nakashima M. *Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in Endodontic therapy.* *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16(3):369-76.
100. Zhang W. Frank Walboomers X VKT, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. . *The Performance of human dental pulp cultures on different three-dimensional scaffold materials.* *Biomaterials* 2006;27(33):5658-68.
101. Murray. PE. *Stem Cell Responses in Tooth Regeneration, Stem Cells and Development.* *Jun* 2004;13,(3):255 -62

102. Paul H. Krebsbach DDS, Ph.D.; Pamela Gehron Robey. Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Therapeutics for Craniofacial Regeneration. *PhD Journal of Dental Education Journal of Dental Education 2002* 66:766-73
103. Cheryl T Gomillion KJLB. Stem cells and adipose tissue engineering. *J of Biomaterials*. 2006;27:6052-63.
104. Bruce A. Bunnell MF, Christine gagliardi, Bindiya Patel, Cynthia Ripoll. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods* 45. 2008:115-20.
105. Dubois SG FE, Zvonic S, et al. . *Isolation of Human Adipose-derived Stem Cells from Bipsies and Liposuction Specimens*. *Methods in Molecular Biology* 2009:449:69-79.
106. Mitchell J.B, McIntosh K, Zvonic S, et al. *The immunophenotype of human adipose-derived cells; Temporal changes in stromal and stem cell-associated markers*. *Stem cells*:. 2006;:24:376-85
107. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003:116:1827-35.
108. Patrick CW. *Tissue Engineering Strategies for Adipose Tissue Repair*. *The Anatomical Record* 2001;263:361-6.
109. Antonella Blasi CM, Luigi Balducci, et al. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vascular Cell* 2011;3(15).
110. Arany S, Nakata A, Kameda T, Koyota S, Ueno Y, sugiyama T. Phenotype properties of a novel spontaneously immortalized odontoblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;342:718-24.
111. Ritchie HH, Liu J, Kasugai S, Moller P. A mineralizing rat dental pulp cell subline expressing collagen type I and dentin sialoprotein-phosphoporyn transcripts. *In Vitro. Cell Dev Biol Anim* 2002;38:25-9.

112. Nakao K, Itoh M, Tomita Y, Tomooka Y, Tsuji T. FGF-2 potently induces both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of Adult Incisor Immature Pulp Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004.325:P.1052-1059
113. Roy H Bz, Yla -Hertuala S. *Biology of vascular endothelial growth factors*. FEBS Lett2006;580:2879-87.
114. Rozman P, Bolta Z. *Use of platelet growth factors in treating wounds and soft tissue injuries*. Acta Dermatoven APA2007;16:156-63.
115. Pierce GF, Tarpley JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A. Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing: neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* 1992;140:1375-88.
116. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, and Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*2001;189(1):54-63..
117. Zackenfels K, Oppenheim RW, Rohrer H. *Evidence for an important role of IGF-I and IGF-II for the early development of chick sympathetic neurons*. . Neuron 1995;14((4):731-41.
118. Lopez Cazaux S BG, Magne D,Lieubeau B,Guicheux J,Alliot-Licht B. . *Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note*: Eur Cell Mater 2006;11:35-42.
119. Beilharz EJ, Bassett NS, Sirimanne ES, Williams CE, Gluckman PD. *Insulin-like growth factor II is induced during wound repair following hypoxic-ischemic injury in the developing rat brain*. Brain Res Mol Brain Res 1995;29(1):81-91.
120. Mehta S, Watson JT. Platelet rich concentrate: base science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 2008;22(6):432-8.
121. Millington JT, Noris TW. *Effective treatment strategies for diabetic foot wounds*. J Fam Pract 2000; 49(11 Suppl) S40-S8
122. Lee UL, Jeon SH, Park JY, Choung PH. 79. *Effect of Platelet-rich plasma on dental stem cells derived from human impacted third molars*. Regen Med 2011;6(1):67-79.

123. Weibrich G, Kleis WK, Loos AH et al. Correlation of platelet concentration in PRP to the extraction method, age, sex and platelet count of the donor. *Int J Oral* 2001;16(5):693-9
124. Harrison P, Cramer EM.. *Platelet alpha granules*. Blood Rev 1993; 7(1):52-62.
125. McAleer JP, Sharma S, Kaplan EM, Persich G. *Use of autologous platelet concentrate in a nonhealing lower extremity wound*. Adv Skin Wound Care 2006;19(7):354-63
126. Lindeboom JA, Mathura KR, Aartman IH, Kroon FH, Milstein DM, Ince C, *Influence of the application of platelet-enriched plasma in oral mucosal wound healing*. Clin Oral Implants Res 2007;;18(1):133-9.
127. Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J et al. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 2007;89(3):417-20.
128. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. *Antimicrobial peptides from human platelets* Infect Immun 2002;70 (12):6524-33.
129. Marx RE.. Platelet-rich plasma (PRP): *what is PRP and what is not PRP?* Implant Dent 2001;10(4):225-8.
130. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from PRP, implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2004;114 (6): 1502-8.
131. Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF. Mustoe TA, Pierce GF, Morishima C, Deuel TF. Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. *J Clin Invest* 1991;87:694-703
132. Rutkowski JL, Johnson D, Radio NM, Fennell JW. Platelet Rich Plasma to facilitate wound healing following tooth extraction. *J Oral Implantology* 2010;36(1):11-23.
133. Bua Arenaz J, Re RL, Soliva SS, Seijas BP, A comparative study of platelet-rich plasma, hydroxyapatite, demineralized bone matrix and autologous bone to promote bone regeneration after mandibular impacted third molar extraction. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15(3):183-9

134. Nakamura H, Saruwatari L, Aita H, Takeuchi K, Ogawa T. Molecular and biomechanical characterization of mineralized tissue by dental pulp cells on titanium. *J Dent Res* 2005;84(6):515-20.
135. Liu H LW, Shi S, Habelitz s, Gao C, Denbesten P. *MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate*. *Arch Oral Biol* 2005;50(11):923-8.
136. Liu J JT, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH.. *In vitro* differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In Vitro. . Cell Dev Biol Anim* 2005;41(7):232-38.
137. Butler WT, Brunn JC, Qin C, McKee MD.. *Extracellular matrix proteins and the dynamics of dentin formation*. *Connect Tissue Res* 2002;43:301-7.
138. Bluteau G. Stem Cell for tooth engineering. *European cells and material* 2008
139. Zhang W, Frank Walboomers X VKT DW, Bian Z, Jansen JA. . *Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro*. *Tissue Eng* 2005;11(3-4):357-68.
140. Marcelo Paulo V, Isis Sousa Oliveira. *Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells*. 2010;25:1-4.
141. Lindolfo da Silva Meirelles AMF, Dimas Tadeu Covas, Arnold I. Caplan. . *Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells*. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2009;20:419-27
142. Shunsuke Ohnishi HS, Soichiro Kitamura, Noritoshi. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *Febs letters* 2007;581:3961-6.
143. Brent R. Weil MD, Mariuxi C. Manukyan, M.D, Jeremy L. Herrmann, et al. The Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells: Implications for Surgical Disease. *Journal of Surgical Research*. 2011;167:78-86.
144. Bruce A. Bunnell MF, Christine gagliardi, Bindiya Patel, Cynthia Ripoll. *Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation*. *Methods* 452008:115-20.
145. Kern S EH, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24:1294

146. Engler.A SS, Sweeney.H, Discher.D. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *J of Cell*2006;126(4):677-89.
147. Anastasia efimenko ES, Natalia Kalinina, Alexandra Stolzing. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *j of Translational Medicine*2011;9(10):1-13.
148. Li ZY, Chen L, Liu L, Lin YF, Li SW, Tian WD. Odontogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65:494-500.
149. Michael P.Francis PCS, Lynne W.Elmore, Shawn E.Holt. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction. *J of Organogenesis*2009;6(1):11-4Yuksel E, Weinfeld AB, Cleek R, et al. *Increased free fat-graft survival with the long term, local delivery of insulin, insulin-like growth factor-1, and basic fibroblast growth factor by PLGA/PEG microspheres.* *Plast Reconstruct Surg* 2000;105:1712-20.
150. Yuksel E wA, Cleek R, Waugh JM, et al. *De novo adipose tissue generation through long-term. local delivery of insulin and insulin-like growth factor-1 by PLGA/PEG microsphere in an in vivo rat model. A novel concept and capability.* *Plas Reconstr Surg* 2000:105:1721-9.
151. D.Baksh, L.Song, R.S.Tuan. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*2004;8(3):301-16.
152. Wan.Chao HQ, McCaigue.Mervyn. Marsch..David, Li.Gang. Nonadherent cell population of human marrow culture is a complementary source of mesenchymal stem cells (MSCs) *J of Orthopaedic Research* 2006;24(1):21-8.
153. Wang Z PJ, Wright JT, et al. Putative Stem Cells in Human Dental Pulp with Irreversible Pulpitis: An Explorative study. *J of Endodontic* 2010;36:5:820-825. Putative Stem Cells in Human Dental Pulp with Irreversible Pulpitis: An Explorative study. *J of Endodontic* 2010;36:(5):820-5.
154. Shuo Chen Jelica Gluhak-Heinrich M-M, Tong Li, Yimin Wu, Hu-Hsiu Chuang, Lei Chen, Juan Dong Isabel Gay, Mary Mac-Dougall. Bone morphogenetic Protein 2 Mediates Dentin Sialophosphoprotein Expression and Odontoblast Differentiation via NF-Y Signaling. *J of Biochemical Chemistry*2008;283(28):19359-70.

155. Kras M, Hausman DB, Martin RJ. *Tumor necrosis factor alpha stimulates cell proliferation in adipose tissue-derived stromal vascular cell culture: promotion of adipose tissue expansion by paracrine growth factors.* *Obes Rest* 2000;8:186-93.
156. Tartaix PH DM, Gorge A, Fisher LW, Butler WT, Qin C, Salih E, Tan M, Fujimoto Y, Spevak L, Boskey AL. In Vitro Effect of Dentin Matrix Protein-1 on Hydroxyapatite Formation Provide Insight into In Vivo Functions. *J Biol Chem* 2004;18:18115-20.
157. Ye L MM, Zhang S, Xie Y, Zhang J, Li Z, Lu Y, Mishina Y, Feng JQ. Deletion of Dentin Matrix Protein-1 on Hydroxyapatite Formation Provide Insight into In Vivo Functions. *JBiolChem.* 2004;279(18):19141-
158. Goldberg M SN, Decup F, Buch D, Majd ES, Lasfargus J-J, Salih E, Stanislawski L. Application of Bioactive molecules in Pulp-capping situations. *J of Adv Dent Res* 2001;15:91-5.
159. Tjaderhane L PH, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. *Human odontoblast culture method: The expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs)*. *Adv Dent Res* 2001;15(55-8).
160. Spector M. Basic Principles of Tissue Engineering. In: Lynch SE GB, Marx RE. *Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics.* *Quintessence Publ Co* 1999:3-16.
161. Shunsuke Ohnishi HS, Soichiro Kitamura, Noritoshi. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *Febs letters.* 2007;581:3961-6
162. Humpries M. Integrin structure. *J of Biochem Soc Trans* 2000;28(4):311-39.
163. Raymond R. Miller CAM. A quantitative microwell assay for chondrocytes attached to a substratum. *Analytical Biochemistry.* 1991:380-3.
164. Ichiro Miki NI, Masanari Otoshi, Hiroshi Kase. Simple colorimetric cell-cell Adhesion assays. *J of Immunological Methods.* 1993:255-61.
165. Shi J DN, Sun Z. Immobilization of decellularized valve scaffolds with Arg-Gly_Asp-containing peptide to promote myofibroblast adhesion. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2009;29(4)



UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

JLN. SALEMBA RAYA NO. 4 JAKARTA PUSAT 10430
TELP. (62-21) 31930270, 3151035
FAX. (62-21) 31931412

SURAT KETERANGAN LOLOS ETIK

Nomor: 36 /Ethical Clearance/FGGUI/X/2010

Setelah membaca dan mempelajari/mengkaji usulan penelitian yang tersebut di bawah ini:

Judul : Perbandingan Kualitas Mesenchym Stem Cell asal Jaringan Pulpa yang terinflamasi reversible dan irreversible

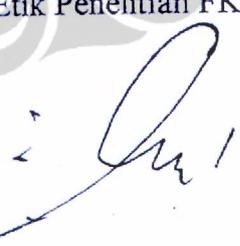
Nama Peneliti : Anggraini Margono, drg. SpKG 196402051989032001 (K)

Sesuai dengan keputusan Anggota Komisi Etik, maka dengan ini Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia menerangkan bahwa penelitian tersebut dinyatakan lolos etik.

Jakarta, 13 Oktober 2010
Ketua Komisi Etik Penelitian FKGUI,

Mengetahui:
Ketua Komisi Etik Penelitian FKGUI,

Prof. drg. Bambang Irawan, PhD.
NIP. 195306151980031005


drg. Anton Rahardjo, MKM, PhD
NIP. 195406021983031002

Rumah Sakit Gigi dan Mulut Pendidikan
Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Indonesia

Nomor Rekam Medik

--	--	--	--	--	--

SURAT PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIK

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rahmadini
Umur : 19 thn L / P
Alamat : Jl. Kenari I / 16
RT 04 / RW 03

dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya telah memberikan

PERSETUJUAN

untuk dilakukan tindakan medik : Pencabutan gigi 51

terhadap : diri saya sendiri / isteri / suami / anak

yang bernama : Rahmadini
Umur : 19 thn L / P
Alamat : Jl. Kenari I / 16
RT 04 / RW 03
Nomor rekam medik : 01.04.25.13

Yang sifat dan tujuan tindakan medik serta kemungkinan timbulnya akibat-akibat telah dijelaskan sepenuhnya oleh dokter dan telah saya mengerti seluruhnya.

Saya juga telah memberikan persetujuan saya untuk :

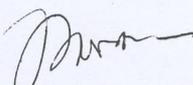
- Dilakukan pemberian anestesi dan / atau obat / bahan medik lainnya yang diperlukan untuk dapat dilakukan tindakan medik tersebut.
- Melakukan pembayaran biaya perawatan pada waktu yang telah ditentukan.
- Rumah sakit, institusi dan perangkatnya dapat menggunakan data dan dokumen medik saya untuk keperluan pendidikan dan penelitian

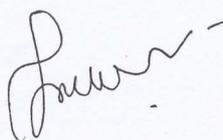
Demikian surat persetujuan ini saya tandatangi dengan kesadaran penuh tanpa paksaan.

Jakarta, Juli 2010

Dokter yang merawat

Pasien / orang tua / isteri / suami


(..... Dr. Nova K.)


(..... Rahmadini)

Nama jelas

Nama jelas



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TENGAH
RSUD Dr. MOEWARDI

Jl. Kol. Soetarto 132. Telp. 634634, Fax. 637412 Surakarta 57126

PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIK / BEDAH

1. Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Anggraini Margono
 Tanggal lahir : 05.02.1964
 Jenis Kelamin : L P
 Alamat : Jakarta

2. Dengan ini saya menyatakan menyetujui untuk dilaksanakan operasi / tindakan berupa :

.....
 yang di laksanakan oleh dokter Lipocuction Indah Yulianto SpKK

terhadap: saya sendiri istri suami anak ayah ibu keluarga

a. Nama : Anggraini Margono
 b. Tanggal lahir : 05.02.1964
 c. Jenis Kelamin : L P
 d. Alamat : Jakarta
 e. Di rawat di : RS Moewardi Surakarta
 f. Nomor rekam medis :

3. Dengan ini menyatakan bahwa saya telah menerima informasi berupa :

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Diagnosis | <input checked="" type="checkbox"/> Tujuan |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dasar Diagnosis | <input checked="" type="checkbox"/> Resiko |
| <input checked="" type="checkbox"/> Tindakan Kedokteran | <input checked="" type="checkbox"/> Komplikasi |
| <input checked="" type="checkbox"/> Indikasi Kedokteran | <input checked="" type="checkbox"/> Prognosis |
| <input checked="" type="checkbox"/> Tata Cara | <input checked="" type="checkbox"/> Alternatif & Resiko |

4. Yang bertanda tangan di bawah ini juga menyatakan setuju terhadap :

- Transfusi darah dan produk-produk lain dari darah, bila dirasa perlu oleh dokter.
- Ahli bedah yang bertugas mencari konsultasi atau mendapat bantuan dari dokter lain yang berkaitan jika di rasakan perlu, selama pelaksanaan tindakan atau operasi berlangsung.
- Pasien dapat di rawat di ruang intensif setelah operasi sesuai kondisi pasien. Untuk pelaksanaan perawatan intensif dan tindakan medis yang lazimnya dilakukan di perawatan intensif.
- Bila staf kamar bedah mengalami luka tusuk terpapar cairan tubuh pasien, pasien setuju untuk di periksa darahnya.

5. Resiko dari tindakan yang di tawarkan

- Resiko yang dapat terjadi antara lain reaksi alergi, perdarahan, pembekuan darah, infeksi, efek sampingan dari penggunaan obat-obat, atau hilangnya sebagian dari fungsi tubuh dan kematian.

Resiko-resiko lainnya yang dapat terjadi :

.....

- Saya menyadari dan mengerti resiko-resiko yang telah tercantum dalam lampiran tersebut berhubungan dengan prosedur yang di tawarkan kepada saya.

Beri tanda (V) pada kotak yang tersedia

*)Coret yang tidak perlu

Kode RM : 2012 03 1 25 01



SURAT KETERANGAN

Nomor: 0121/UN27.6.10.1.13/PG/2012

Ketua Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta c.q. Ketua Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta menerangkan bahwa:

Nama : Dewi Anggraini, drg., Sp.KG
NPM : 0906598291
Judul Disertasi : Potensi Sel Punca Asal Jaringan Lemak dengan Produk Plasma untuk Regenerasi Sel Odontoblast Jaringan Pulpa secara Molekuler

Telah melaksanakan pemeriksaan laboratorium selama 6 bulan sejak Agustus 2011-Februari 2012 di Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran UNS/RSUD Dr. Moewardi Surakarta dengan pembimbing:

Nama : Dr. Indah Julianto, dr., Sp.KK
NIP : 19480801 197610 2 001
Jabatan : Ketua Bagian I.K. Kulit & Kelamin
FKUNS/RSUD Dr. Moewardi Surakarta

Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surakarta, 31 Mei 2012

Ketua Lab. Biomedik
Fakultas Kedokteran UNS

Prof. Dr. Ambar Mudigdo, dr., Sp.PA(K)
NIP. 19490317 197609 1 001

**BAGIAN MIKROBIOLOGI****FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN, UNIVERSITAS GADJAH MADA**

Jl. Olah Raga, Karangmalang, Yogyakarta, Indonesia 55281

Telp. 0274-560861, fax. 0274-560862, e-mail : mikrobiologi-fkh@ugm.ac.id

SURAT KETERANGAN

Diberitahukan dengan hormat,

Nama Mahasiswa : **DEWI ANGGRAINI MARGONO**

Nomor Mahasiswa : 0906598291

Asal Instansi : Fakultas Kedokteran Gigi UI

Telah melaksanakan penelitian dan menyelesaikan semua ketentuan yang ada di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM, guna keperluan penyelesaian Disertasi dengan judul :

“ Potensi Sel Punca Asal Jaringan Lemak Dengan Produk Plasma Untuk Regenerasi Sel Odontoblast Jaringan Pulpa Secara Molekuler ”

Demikian harap menjadikan periksa.

Yogyakarta, 1 Juni 2012

Bagian Mikrobiologi FKH-UGM
Kepala,

Dr. drh. Tri Untari, M.Si.

Dokumentasi foto isolasi dan identifikasi ADMSC:

Pengumpulan dari Liposuction:



Gambar 1. Hasil lemak dari liposuction



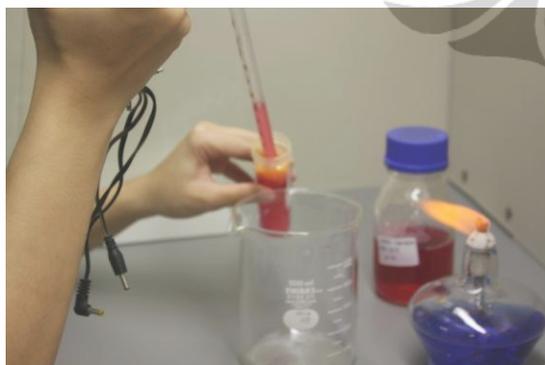
Gambar 2. Lemak dimasukkan ke dalam tabung steril



Gambar 3. Lemak dikumpulkan dan didiamkan 10 menit



Gambar 4. Lemak didiamkan dalam posisi tegak



Gambar 5. Fraksi tumessen dipindahkan ke dalam tabung steril lain.



Gambar 6. Fraksi lemak dipindahkan ke dalam petri

ISOLASI SEL PUNCA LEMAK

Gambar 7. Resuspensi lemak dengan kolagenase 0.2%



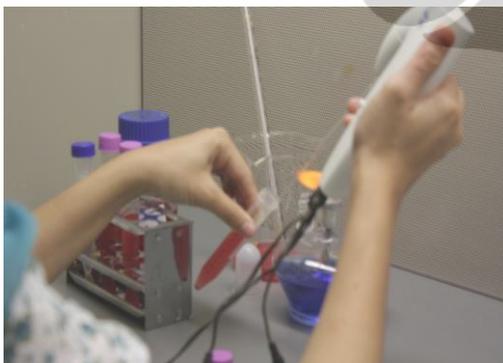
Gambar 8. Inkubasi pada 37°C , 1 jam



Gambar 9. Sentrifus 400g, 10 menit, 3kali



Gambar 10. Pellet diambil dan ditambahkan media lengkap



Gambar 10. Supernatan dibuang



Gambar 11. Resuspensi pellet dengan media kultur kemudian diforteks



Gambar 12. Pellet dipindahkan ke dalam media kultur dengan metode tetesan tetesan bergantung.



Gambar 13. Pengamatan pada mikroskop inverted



Gambar 14. Inkubasi 24 jam

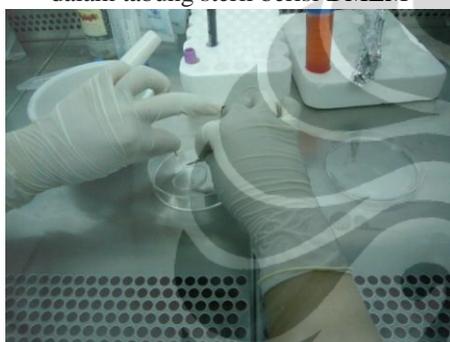
ISOLASI DAN IDENTIFIKASI DPSC



Gambar 1. Gigi hasil pencabutan dimasukkan dalam tabung steril berisi DMEM



Gambar 2. Pulpa dikeluarkan dengan jarum ekstraksi



Gambar 3. Pulpa dihaluskan dengan scalpel



Gambar 4. Pipeting untuk memisahkan ikatan antar sel



Gambar 5. Sentrifugasi selama 10 menit



Gambar 6. Supernatan dibuang



Gambar 7. Pellet dilarutkan dalam medium kultur lengkap



Gambar 8. Dimasukkan ke dalam cawan petri



Gambar 9. Inkubasi 24 jam



Gambar 10. Penggantian media kultur



Gambar 11. Penggantian media kultur



Gambar 12. Penggantian media kultur



Gambar 13. Kegiatan Peneliti di laboratorium

GAMBARAN HISTOLOGI DPSC



Gambar 1a. Sel Pulpa kultur hari ke 1



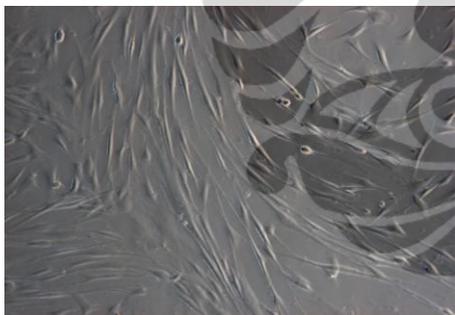
Gambar 1b DPSC kultur hari ke 1



Gambar 2a. DPSC kultur hari ke tujuh



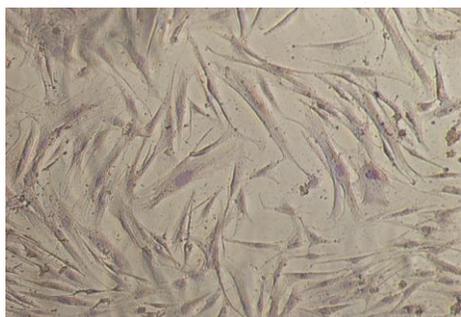
Gambar 2b. DPSC kultur hari ketujuh



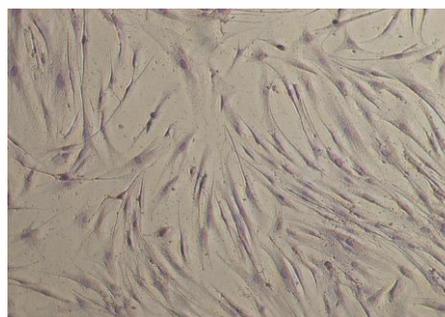
Gambar 3a. DPSC kultur hari ke empatbelas



Gambar 3b. DPSC kultur hari ke duapuluh satu

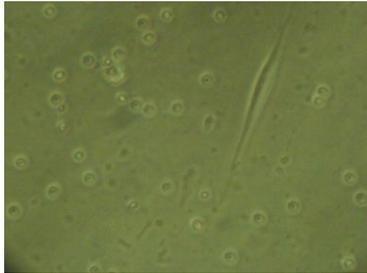


Gambar 4a Sel odontoblas; Imunositokimia dengan anti DMP-1

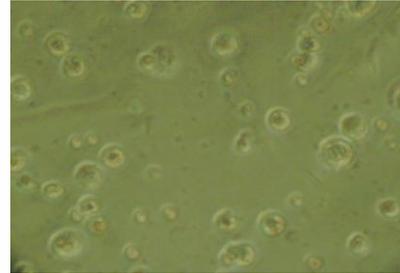


Gambar 4b. Sel odontoblas; Imunositokimia dengan anti DMP-1

GAMBARAN HISTOLOGI ADMSC



Gambar 1a. Sel lemak kultur hari kesatu



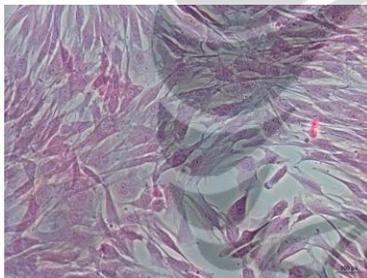
Gambar 1b. ADMSC kultur hari kesatu



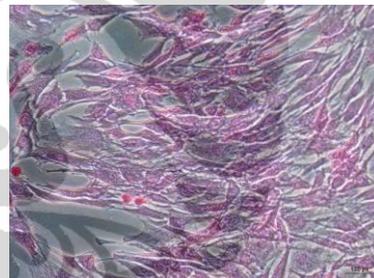
Gambar 2a. ADMSC kultur hari ke tiga



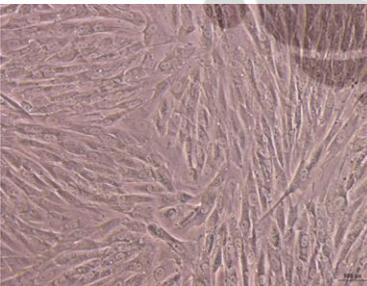
Gambar 2b. ADMSC kultur hari ke tiga



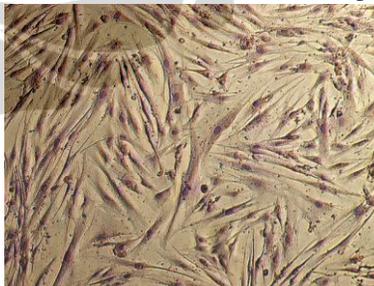
Gambar 3a ADMSC kultur hari ke tujuh



Gambar 3b ADMSC kultur hari ke empat belas



Gambar 4a ADMSC kultur hari ke dua puluh satu



Gambar 3a Sel odontoblas; Imunositokimia dengan anti DMP-1(ADMSC)



Gambar 3b. Sel odontoblas; Imunositokimia dengan anti DMP-1 (ADMSC+ Protein pulpa)

PROSES PEMBUATAN PRP/PRF



Gambar 1 Pengambilan darah vena cubiti



Gambar 2 Darah terkumpul dalam spuit



Gambar 3 Tabung vacutainer disiapkan



Gambar 4 Darah sudah dimasukkan ke tabung



Gambar 5 Hasil sentrifus pertama PPP, Buffy Coat dan Eritrosit..



Gambar 6 Supernatan dikeluarkan oleh canula



Gambar 7 PRP dalam siringe, PPP dalam tabung



Gambar 8 Hasil akhir PRP dengan sedikit RBC



Gambar 9 PRP gel



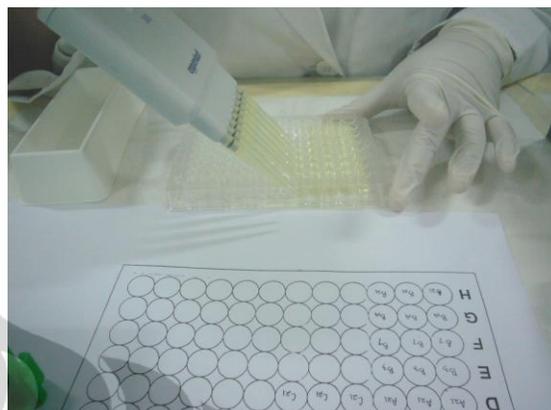
Gambar 10 PRP gel siap digunakan



PERLAKUAN



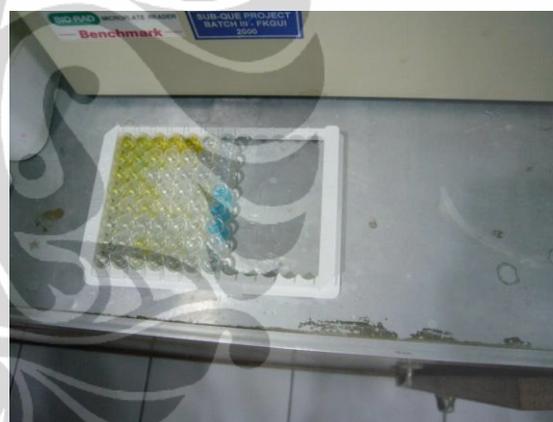
Gambar 1. Sampel perlakuan lemak & pulpa



Gambar 2. Pengisian sumuran dengan bahan sampel



Gambar 3 Sampel yang dianalisis dengan Elissa Kit



Gambar 4. Sampel yang siap dihitung dengan nilai OD



Gambar 5. Elisa Reader

CARA KERJA LABORATORIUM:

1. Pembuatan Medium Kultur Lengkap

Bubuk DMEM (Gibco,UK) dilarutkan dalam 1000 ml *milli Q water*. Kemudian ditambahkan 2 g/l NaHCO₃ (Gibco,UK) dari stok 75 g/l, 2 Unit/ml *Penicillin* - 2 jig/ml Streptomycin dari stok *Penicillin - Streptomycin* (Gibco,UK) yang mengandung 10.000 Units/ml *Penicillin G Sodium* dan 10.000 ug/ml *Streptomycin Sulfate* dalam 0,85% saline, 0.05 UG/ml Fungizone dari stok *Fungizone* (Gibco,UK) yang mengandung *Amphotericin B* 250 UG/ml, dan 10% FBS. Setelah itu lakukan penyaringan dengan menggunakan syringe 50 ml dan 'Sartorius' *Minisart single use syringe filter sterile -EO* (0,20 am). Selanjutnya medium tersebut di atas akan disebut dengan medium kultur lengkap dan harus disimpan dalam lemari pendingin.

2. Pembuatan media transport, kultur, dan kolagenase stcok

Untuk membuat 20cc media transport disiapkan; Falcon 50cc, Penstrep 4% (4% x 20cc = 800ul), Fungizone 4% (4% x 20cc = 800ul), PBS (20cc - 1600ul) = 18ml + 400ul.

3. Pembuatan media tumbuh sel (kultur sel)

Untuk membuat 100cc media tumbuh disiapkan: Duran 100cc, Penstrep 1% (1% x 100cc = 1000ul), Fungizone 1% (1% x 100cc = 1000ul), FBS 10% (10% x 100cc = 10cc), DMEM-high glucose 100 - 12cc = 88cc

4. Pembuatan *maintenance media*

Untuk membuat 100cc media *maintenance* disiapkan: Duran 100cc, Penstrep 1% (1% x 100cc = 1000ul), Fungizone 1% (1% x 100cc = 1000ul), FBS 5% (5% x 100cc = 5cc), DMEM-low glucose 100 - 7cc = 93cc

5. Pembuatan 0.2% Collagenase

Untuk membuat 0.2% collagenase disiapkan: collagenase A type I powder, PBS dengan Ca, tabung steril, stirer steril

a. Collagenase stock solution 0.5%

(0.5%=0.5 gram/ml=50mg)

Bubuk collagenase ,sebanyak 50 mg dimasukkan ke dalam tabung steril, kemudian ditambahkan dengan 50 ml PBS dengan Ca. Kemudian dimasukkan stirrer steril ke dalam tabung dan diputar sampai collagenase larut. Campuran tersebut disaring dengan filter Millipore 0.22 um dan disimpan dalam freezer.

b. Collagenase stock 0.2% dari 0.5%

Dari stock 0.5% di buat 40cc collagenase 0.2%

$$V1M1 = V2M2$$

$$0.5\%.x = 0.2\%.40cc$$

$$1/2x = 8ml$$

$$X = 16ml$$

Dari collagenase stock 0.5% diambil sebanyak 16%, kemudian ditambahkan PBS sebanyak 40 ml-16 ml= 24 ml.

6. Proses differensiasi *Mesenchimal Stem Cell* menjadi sel Odontoblast.

Penambahan growth factor BMP-2, ditunggu selama 10-12 hari (untuk proses differensiasi lengkap), ditunggu sampai 72 jam sampai pembentukan embryoid bodies. Kemudian dilakukan penggantian media setiap hari, selanjutnya dilakukan pembentukan koloni dengan *hanging drop* ke dalam 35 mm dish. Dilakukan *passage* sebanyak 3 kali (setiap *passage* berselang waktu 1 minggu), kemudian ditunggu selama 24 jam, yaitu proses differensiasi embryoid body menjadi odontoblas.. Kemudian koloni dipindahkan ke dalam 4 well dish yang dilapisi oleh *feeder layer*. Ditunggu selama 3 minggu, sementara media diganti setiap 3 hari sekali. Selanjutnya dipindahkan ke *adherent cell*.

7. Pengukuran viabilitas sel dan jumlah sel sebelum pembiakan

Untuk menentukan prosentase sel yang *viable* disiapkan: suspensi sel, tripan blue 0.4%. bilik hitung nabauer serta cover slip.

Diambil 1ml suspensi sel, kemudian dimasukkan dalam ependorf, ditambahkan 1ml tripan blue 0.4%, dilakukan vortex. Diambil 20ul campuran, dimasukkan dalam bilik hitung dan diamati dengan mikroskop perbesaran 10x pada 4 kotak

besar, sel hidup terlihat bening. Viabilitas sel dihitung dengan= $(\text{jml sel hidup/jml sel seluruhnya}) \times 100\%$

Untuk menghitung jumlah sel/ml : Dihitung semua jumlah sel pada 4 kotak besar perbesaran 10x.n Kemudian ditentukan faktor pengenceran (pada contoh di atas 1ml suspensi + 1ml trypan blue, faktor pengenceran 2x), dengan faktor konversi (nabauer=10.000)

Rumus jumlah sel= (n/jml kotak)xfaktor konversixfaktor pengencer

Faktor pengencer= jml sel awal/jml yang diinginkan

(Misalnya 30.000.000 sel, yang diinginkan 500.000 setiap plating, maka faktor pengencer $30.000.000/500.000= 6x$, artinya, 1bagian sel ditambah 5 bagian pengencer akan didapatkan 500.000 sel/ml)

Pemanenan Sel

Untuk memanen sel disiapkan: Sel yang konfluen 80%, PBS non Ca dan Mg, Tripsin, EDTA 0.25%, media lengkap dan falcon 15cc.

Media dalam kultur flask dibuang, kemudian sel dicuci dengan menggunakan PBS selama 3 menit (2-3x). Dimasukkan tripsin EDTA 2cc ke dalam flask, diinkubasi 37⁰c selama 2-3 menit, diamati dengan mikroskop inverted sambil diketok-ketok sampai semua sel lepas dari dasar flask kultur. Tripsin dinetralisasi dengan menambahkan media lengkap sebanyak 3x volume tripsin. Dilakukan pipetting dan sel dimasukkan ke dalam falcon 15cc, disentrifugasi 300g selama 10 menit. Supernatan dibuang, dan pellet ditinggalkan, kemudian ditambahkan lagi media lengkap sebanyak 2cc. Dilakukan sentrifugasi 300g selama 5 menit, dan sel siap ditanam kembali.

8. Pembuatan Media Dmem 2x

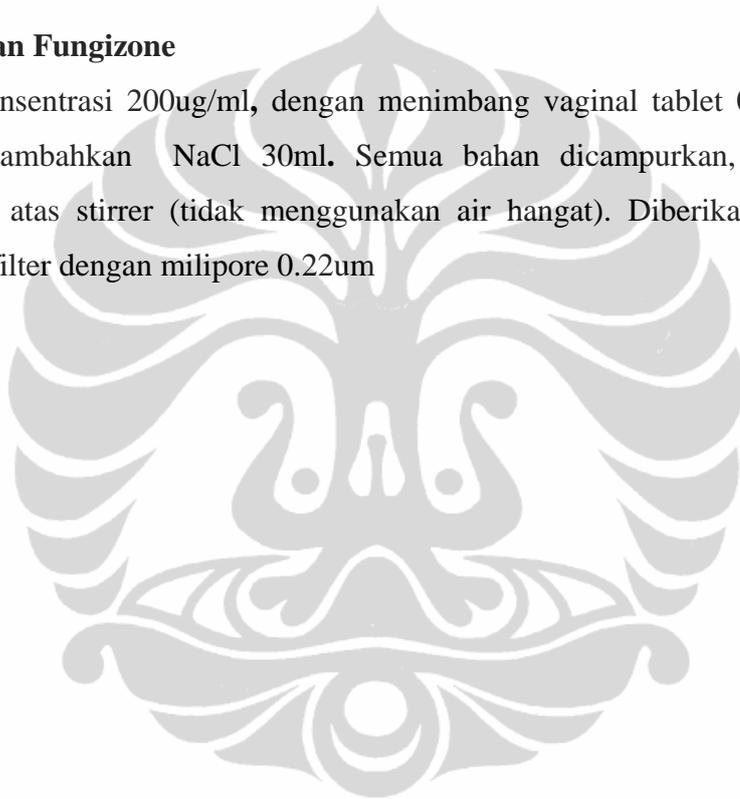
DMEM 1 bungkus, Bic nat 44ml, air deionisasi (95/100x1000):2 = 475ml (475-44=431ml). Semua bahan dicampurkan, kemudian diletakkan di atas stirrer (tidak menggunakan air hangat). Diberikan magnet peluru, dimasukkan Ph meter, diturunkan tetes demi tetes dengan HCL 100% sampai Ph 7.5, setelah itu diturunkan dengan HCL 1M sampai Ph 7.1. Kemudian disaring dengan Millipore, penyaringan dilakukan di laminary flow menggunakan vacuum.

9. Pembuatan Media Rpmi 2x

RPMI 1 bungkus, Bic nat 24ml, air deionisasi 450-24=426cc. Semua bahan dicampur, kemudian diletakkan di atas stirrer (tidak menggunakan air hangat). Diberikan magnet peluru, kemudian dimasukkan Ph meter dan diturunkan tetes demi tetes dengan HCL 100% sampai Ph 7.5, setelah itu diturunkan dengan HCL 1M sampai Ph 7.1. Disaring dengan Millipore ,penyaringan dilakukan di laminary flow menggunakan vacuum.

10. Pembuatan Fungizone

Dibuatkan konsentrasi 200ug/ml, dengan menimbang vaginal tablet 0.149gram, kemudian ditambahkan NaCl 30ml. Semua bahan dicampurkan, kemudian diletakkan di atas stirrer (tidak menggunakan air hangat). Diberikan magnet peluru dan difilter dengan milipore 0.22um



LAMPIRAN

1. UJI BEDA JUMLAH SEL ANTAR SUMBER SEL

Exploreperlakuan

Case Processing Summary

perlakuan	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
cell adipose	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
pulp	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%

Descriptives

perlakuan	Statistic	Std. Error	
cell adipose	Mean	.105000	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .032960	
		Upper Bound .177040	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	.105000	
	Variance	.001	
	Std. Deviation	.0290000	
	Minimum	.0760	
	Maximum	.1340	
	Range	.0580	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	.000	1.225
	Kurtosis	.	.
cell pulp	Mean	.129667	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound .044902	
		Upper Bound .214431	
	5% Trimmed Mean	.	
	Median	.112000	
	Variance	.001	
	Std. Deviation	.0341223	
	Minimum	.1080	
	Maximum	.1690	
	Range	.0610	
	Interquartile Range	.	
	Skewness	1.705	1.225
	Kurtosis	.	.

Tests of Normality

	perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
cell	adipose	.175	3	.	1.000	3	1.000
	pulp	.364	3	.	.799	3	.112

a. Lilliefors Significance Correction

	perlakuan	cell				
		Valid N	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation
	adipose	3	.0760	.1340	.1050	.0290
	pulp	3	.1080	.1690	.1297	.0341

T-Test

Group Statistics

	perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
cell	adipose	3	.105000	.0290000	.0167432
	pulp	3	.129667	.0341223	.0197005

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
cell	Equal variances assumed	.345	.589	-.954	4	.394	-.0246667	.0258543	-.0964497	.0471164
	Equal variances not assumed			-.954	3.899	.395	-.0246667	.0258543	-.097191	.0478584

Par Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
cell	adipose	3	2.67	8.00
	pulp	3	4.33	13.00
	Total	6		

Test Statistics^a

	cell
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	8.000
Z	-1.091
Asymp. Sig. (2-tailed)	.275
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.400 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

2. UJI BEDA DIFERENSIASI BMP2 ANTAR SUMBER SEL & PENAMBAHAN MICRO-ENVIRONMENT

Explore perlakuan

Case Processing Summary

	perlakuan	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
BMP	Lemak + BMP-2 + Protein	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	Lemak + BMP-2	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%
	Pulpa + BMP-2	3	100.0%	0	0.0%	3	100.0%

Descriptives

perlakuan		Statistic	Std. Error	
Lemak + BMP-2 + Protein	Mean	.063500	.0002887	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.062258	
		Upper Bound	.064742	
	5% Trimmed Mean	.		
	Median	.063500		
	Variance	.000		
	Std. Deviation	.0005000		
	Minimum	.0630		
	Maximum	.0640		
	Range	.0010		
	Interquartile Range	.		
		.000	1.225	
		.	.	
BMP Lemak + BMP-2	Mean	.057500	.0008660	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.053774	
		Upper Bound	.061226	
	5% Trimmed Mean	.		
	Median	.057500		
	Variance	.000		
	Std. Deviation	.0015000		
	Minimum	.0560		
	Maximum	.0590		
	Range	.0030		
	Interquartile Range	.		
	Skewness	.000	1.225	
	Kurtosis	.	.	
Pulpa + BMP-2	Mean	.059500	.0002887	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.058258	
		Upper Bound	.060742	
	5% Trimmed Mean	.		
	Median	.059500		
	Variance	.000		
	Std. Deviation	.0005000		
	Minimum	.0590		
	Maximum	.0600		
	Range	.0010		
	Interquartile Range	.		
	Skewness	.000	1.225	
	Kurtosis	.	.	

Tests of Normality

perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Lemak + BMP-2 + Protein	.175	3	.	1.000	3	1.000
BMP Lemak + BMP-2	.175	3	.	1.000	3	1.000
Pulpa + BMP-2	.175	3	.	1.000	3	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Lemak + BMP-2 + Protein	3	.063500	.0005000	.0002887	.062258	.064742	.0630	.0640
Lemak + BMP-2	3	.057500	.0015000	.0008660	.053774	.061226	.0560	.0590
Pulpa + BMP-2	3	.059500	.0005000	.0002887	.058258	.060742	.0590	.0600
Total	9	.060167	.0027726	.0009242	.058035	.062298	.0560	.0640

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.455	2	6	.305

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	30.545	.001
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.000	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: BMP
Bonferroni

(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Lemak + BMP-2 + Protein	Lemak + BMP-2	.0060000*	.0007817	.001	.003430	.008570
	Pulpa + BMP-2	.0040000*	.0007817	.007	.001430	.006570
Lemak + BMP-2	Lemak + BMP-2 + Protein	-.0060000*	.0007817	.001	-.008570	-.003430
	Pulpa + BMP-2	-.0020000	.0007817	.129	-.004570	.000570
Pulpa + BMP-2	Lemak + BMP-2 + Protein	.0040000*	.0007817	.007	-.006570	-.001430
	Lemak + BMP-2	-.0020000	.0007817	.129	-.000570	.004570

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

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
BMP	9	.060167	.0027726	.0560	.0640
perlakuan	9	2.00	.866	1	3

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank
BMP	Lemak + BMP-2 + Protein	3	8.00
	Lemak + BMP-2	3	2.17
	Pulpa + BMP-2	3	4.83
	Total	9	

Test Statistics^{a,b}

		BMP
Chi-Square		6.880
df		2
Asymp. Sig.		.032

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

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BMP	Lemak + BMP-2 + Protein	3	5.00	15.00
	Lemak + BMP-2	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a

		BMP
Mann-Whitney U		.000
Wilcoxon W		6.000
Z		-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)		.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.100 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BMP	Lemak + BMP-2 + Protein	3	5.00	15.00
	Pulpa + BMP-2	3	2.00	6.00
	Total	6		

Test Statistics^a

		BMP
Mann-Whitney U		.000
Wilcoxon W		6.000
Z		-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)		.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.100 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
BMP	Lemak + BMP-2	3	2.17	6.50
	Pulpa + BMP-2	3	4.83	14.50
	Total	6		

Test Statistics^a

		BMP
Mann-Whitney U		.500
Wilcoxon W		6.500
Z		-1.771
Asymp. Sig. (2-tailed)		.077
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.100 ^b

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

3. UJIBEDA DMP ANTAR PERLAKUAN
ExploreKelompok perlakuan

Case Processing Summary

Kelompok perlakuan	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Konsentrasi DPSC+BMP2	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
ADMSC+PP+BMP2	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
ADMSC+BMP2	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Kontrol DPSC	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%
Kontrol ADMSC	4	100.0%	0	.0%	4	100.0%

Descriptives

Kelompok perlakuan		Statistic	Std. Error	
Konsentrasi	DPSC+BMP2	Mean	6922.00	
		95% Confidence Interval for Mean	5171.61	
		Lower Bound	8672.39	
			Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	6951.67		
	Median	7189.00		
	Variance	1210065.333		
	Std. Deviation	1100.030		
	Minimum	5417		
	Maximum	7893		
	Range	2476		
	Interquartile Range	2044		
	Skewness	-1.117	1.014	
	Kurtosis	.587	2.619	
	ADMSC+PP+BMP2	Mean	8807.25	609.138
			95% Confidence Interval for Mean	6868.70
			Lower Bound	10745.80
			Upper Bound	
5% Trimmed Mean		8808.44		
Median		8818.00		
Variance		1484198.250		
Std. Deviation		1218.277		
Minimum		7310		
Maximum		10283		
Range		2973		
Interquartile Range		2294		
Skewness		-.052	1.014	
Kurtosis		1.282	2.619	
ADMSC+BMP2		Mean	10151.00	1837.280
			95% Confidence Interval for Mean	4303.96
			Lower Bound	15998.04
			Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	10078.00		
	Median	9494.00		
	Variance	13502388.667		

	Std. Deviation		3674.560	
	Minimum		6586	
	Maximum		15030	
	Range		8444	
	Interquartile Range		6959	
	Skewness		.861	1.014
	Kurtosis		.058	2.619
Kontrol DPSC	Mean		4750.00	196.150
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4125.76	
		Upper Bound	5374.24	
	5% Trimmed Mean		4758.89	
	Median		4830.00	
	Variance		153900.000	
	Std. Deviation		392.301	
	Minimum		4215	
	Maximum		5125	
	Range		910	
	Interquartile Range		735	
	Skewness		-1.039	1.014
	Kurtosis		.978	2.619
Kontrol ADMSC	Mean		7648.25	256.471
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6832.05	
		Upper Bound	8464.45	
	5% Trimmed Mean		7659.17	
	Median		7746.50	
	Variance		263108.917	
	Std. Deviation		512.941	
	Minimum		6975	
	Maximum		8125	
	Range		1150	
	Interquartile Range		968	
	Skewness		-.833	1.014
	Kurtosis		-.669	2.619

Tests of Normality

Kelompok perlakuan	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi DPSC+BMP2	.220	4	.	.919	4	.529
ADMSC+PP+BMP2	.212	4	.	.977	4	.885
ADMSC+BMP2	.198	4	.	.955	4	.747
Kontrol DPSC	.225	4	.	.944	4	.682
Kontrol ADMSC	.227	4	.	.939	4	.646

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway Descriptives
Konsentrasi

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound	Upper Bound	Lower Bound		Upper Bound	Lower Bound
DPSC+BMP2	4	6922.00	1100.030	550.015	5171.61	8672.39	5417	7893
ADMSC+PP+BMP2	4	8807.25	1218.277	609.138	6868.70	10745.80	7310	10283
ADMSC+BMP2	4	10151.00	3674.560	1837.280	4303.96	15998.04	6586	15030
Kontrol DPSC	4	4750.00	392.301	196.150	4125.76	5374.24	4215	5125
Kontrol ADMSC	4	7648.25	512.941	256.471	6832.05	8464.45	6975	8125
Total	20	7655.70	2470.640	552.452	6499.40	8812.00	4215	15030

Test of Homogeneity of Variances
Konsentrasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.338	4	15	.016

ANOVA
Konsentrasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	66136212.700	4	16534053.175	4.976	.009
Within Groups	49840983.500	15	3322732.233		
Total	115977196.200	19			

NPar Tests
Kruskal-Wallis Test
Ranks

	Kelompok perlakuan	N	Mean Rank
Konsentrasi	DPSC+BMP2	4	8.75
	ADMSC+PP+BMP2	4	15.00
	ADMSC+BMP2	4	15.00
	Kontrol DPSC	4	2.50
	Kontrol ADMSC	4	11.25
	Total	20	

Test Statistics(a,b)

	Konsentrasi
Chi-Square	12.357
Df	4
Asymp. Sig.	.015

a Kruskal Wallis Test
b Grouping Variable: Kelompok perlakuan

T-Test
Group Statistics

	Kelompok perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	DPSC+BMP2	4	6922.00	1100.030	550.015
	ADMSC+PP+BMP2	4	8807.25	1218.277	609.138

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
									Lower	Upper	Lower
Konsentrasi	Equal variances assumed	.000	.998	-2.297	6	.061	-1885.250	820.711	3893.457	122.957	
	Equal variances not assumed			-2.297	5.939	.062	-1885.250	820.711	3898.507	128.007	

T-Test

Group Statistics

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	DPSC+BMP2	4	6922.00	1100.030	550.015
	ADMSC+BMP2	4	10151.00	3674.560	1837.280

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
									Lower	Upper	Lower
Konsentrasi	Equal variances assumed	3.860	.097	-1.684	6	.143	-3229.000	1917.841	7921.787	1463.787	
	Equal variances not assumed			-1.684	3.533	.177	-3229.000	1917.841	8842.873	2384.873	

T-Test

Group Statistics

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	DPSC+BMP2	4	6922.00	1100.030	550.015
	Kontrol DPSC	4	4750.00	392.301	196.150

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
									Lower	Upper	Lower
Konsentrasi	Equal variances assumed	2.814	.144	3.720	6	.010	2172.000	583.945	743.139	3600.861	
	Equal variances not assumed			3.720	3.751	.023	2172.000	583.945	507.361	3836.639	

**T-Test
Group Statistics**

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	DPSC+BMP2	4	6922.00	1100.030	550.015
	Kontrol ADMSC	4	7648.25	512.941	256.471

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	
Konsentrasi	Equal variances assumed	1.700	.240	-1.197	6	.277	-726.250	606.872	2211.212	-	758.712
	Equal variances not assumed			-1.197	4.246	.294	-726.250	606.872	2373.428	-	920.928

**T-Test
Group Statistics**

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	ADMSC+PP+BMP2	4	8807.25	1218.277	609.138
	ADMSC+BMP2	4	10151.00	3674.560	1837.280

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means							
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference		
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	
Konsentrasi	Equal variances assumed	3.602	.106	-.694	6	.514	-1343.750	1935.626	6080.055	-	3392.555
	Equal variances not assumed			-.694	3.652	.529	-1343.750	1935.626	6926.258	-	4238.758

**T-Test
Group Statistics**

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	ADMSC+PP+BMP2	4	8807.25	1218.277	609.138
	Kontrol DPSC	4	4750.00	392.301	196.150

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi	Equal variances assumed	1.673	.243	6.340	6	.001	4057.250	639.941	2491.371	5623.129
	Equal variances not assumed			6.340	3.616	.004	4057.250	639.941	2203.438	5911.062

T-Test Group Statistics

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	ADMSC+PP+BMP2	4	8807.25	1218.277	609.138
	Kontrol ADMSC	4	7648.25	512.941	256.471

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi	Equal variances assumed	1.020	.352	1.754	6	.130	1159.000	660.929	458.234	2776.234
	Equal variances not assumed			1.754	4.031	.154	1159.000	660.929	670.439	2988.439

T-Test Group Statistics

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	ADMSC+BMP2	4	10151.00	3674.560	1837.280
	Kontrol DPSC	4	4750.00	392.301	196.150

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi	Equal variances assumed	6.767	.041	2.923	6	.027	5401.000	1847.721	879.790	9922.210
	Equal variances not assumed			2.923	3.068	.060	5401.000	1847.721	405.830	11207.830

T-Test

Group Statistics

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	ADMSC+BMP2	4	10151.00	3674.560	1837.280
	Kontrol ADMSC	4	7648.25	512.941	256.471

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower
Konsentrasi	Equal variances assumed	6.144	.048	1.349	6	.226	2502.750	1855.094	-	7042.002
	Equal variances not assumed			1.349	3.117	.267	2502.750	1855.094	-	8283.208

T-Test

Group Statistics

Kelompok perlakuan		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi	Kontrol DPSC	4	4750.00	392.301	196.150
	Kontrol ADMSC	4	7648.25	512.941	256.471

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower
Konsentrasi	Equal variances assumed	.483	.513	-8.976	6	.000	-2898.250	322.881	-	2108.188
	Equal variances not assumed			-8.976	5.615	.000	-2898.250	322.881	-	2094.866

4. UJI BEDA COL1

Exploreperlakuan

Case Processing Summary

Perlakuan		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
coll	kontrol absorpsi sinar	24	100.0%	0	0.0%	24	100.0%
	col-1 + pulpa	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	col-1 + pulpa 1 hari	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	col-1 + pulpa 12 hari	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%

Descriptives

Perlakuan		Statistic	Std. Error	
kontrol absorpsi sinar	Mean	28.66667	3.100764	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	22.25225	
		Upper Bound	35.08108	
	5% Trimmed Mean	27.12963		
	Median	30.00000		
	Variance	230.754		
	Std. Deviation	15.190577		
	Minimum	10.000		
	Maximum	80.000		
	Range	70.000		
	Interquartile Range	18.750		
	Skewness	1.550	.472	
	Kurtosis	4.712	.918	
	col-1 + pulpa	Mean	94.00000	5.294876
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	81.47961
Upper Bound			106.52039	
5% Trimmed Mean		93.61111		
Median		89.50000		
Variance		224.286		
Std. Deviation		14.976172		
Minimum		75.000		
Maximum		120.000		
Range		45.000		
Interquartile Range		23.500		
Skewness		.636	.752	
Kurtosis		-.410	1.481	
col-1 + ADMSC + lemak 1 hari		Mean	100.50000	5.301617
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	87.96367
	Upper Bound		113.03633	
	5% Trimmed Mean	99.55556		
	Median	98.00000		
	Variance	224.857		
	Std. Deviation	14.995237		
	Minimum	84.000		
	Maximum	134.000		
	Range	50.000		
	Interquartile Range	12.500		
	Skewness	1.779	.752	
	Kurtosis	4.266	1.481	
	col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	Mean	128.12500	6.885382
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	111.84366
Upper Bound			144.40634	
5% Trimmed Mean		128.30556		
Median		126.50000		
Variance		379.268		

	Std. Deviation	19.474801	
	Minimum	97.000	
	Maximum	156.000	
	Range	59.000	
	Interquartile Range	33.250	
	Skewness	-.061	.752
	Kurtosis	-.311	1.481
	Mean	139.50000	13.396428
		Lower Bound	
	95% Confidence Interval for Mean	107.82248	
		Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	138.11111	
	Median	129.50000	
col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	Variance	1435.714	
	Std. Deviation	37.890821	
	Minimum	94.000	
	Maximum	210.000	
	Range	116.000	
	Interquartile Range	55.750	
	Skewness	1.035	.752
	Kurtosis	.566	1.481
	Mean	80.25000	4.245796
		Lower Bound	
	95% Confidence Interval for Mean	70.21029	
		Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	80.00000	
	Median	80.00000	
col-1 + pulpa 1 hari	Variance	144.214	
	Std. Deviation	12.008925	
	Minimum	66.000	
	Maximum	99.000	
	Range	33.000	
	Interquartile Range	23.250	
	Skewness	.380	.752
	Kurtosis	-1.005	1.481
	Mean	82.25000	4.854122
		Lower Bound	
	95% Confidence Interval for Mean	70.77183	
		Upper Bound	
	5% Trimmed Mean	81.72222	
	Median	82.50000	
col-1 + pulpa 12 hari	Variance	188.500	
	Std. Deviation	13.729530	
	Minimum	65.000	
	Maximum	109.000	
	Range	44.000	
	Interquartile Range	18.250	
	Skewness	.827	.752
	Kurtosis	1.330	1.481

Tests of Normality

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
kontrol absorpsi sinar	.190	24	.026	.846	24	.002
col-1 + pulpa	.203	8	.200*	.951	8	.726
col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	.283	8	.059	.823	8	.050
col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	.166	8	.200*	.960	8	.807
col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	.297	8	.036	.886	8	.214
col-1 + pulpa 1 hari	.129	8	.200*	.942	8	.629
col-1 + pulpa 12 hari	.186	8	.200*	.938	8	.594

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

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol absorpsi sinar	24	28.66667	15.190577	3.100764	22.25225	35.08108	10.000	80.000
col-1 + pulpa	8	94.00000	14.976172	5.294876	81.47961	106.52039	75.000	120.000
col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	100.50000	14.995237	5.301617	87.96367	113.03633	84.000	134.000
col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	8	128.12500	19.474801	6.885382	111.84366	144.40634	97.000	156.000
col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	8	139.50000	37.890821	13.396428	107.82248	171.17752	94.000	210.000
col-1 + pulpa 1 hari	8	80.25000	12.008925	4.245796	70.21029	90.28971	66.000	99.000
col-1 + pulpa 12 hari	8	82.25000	13.729530	4.854122	70.77183	93.72817	65.000	109.000
Total	72	78.95833	44.162133	5.204557	68.58074	89.33593	10.000	210.000

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.530	6	65	.029

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	114985.667	6	19164.278	53.041	.000
Within Groups	23485.208	65	361.311		
Total	138470.875	71			

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
col1	72	78.95833	44.162133	10.000	210.000
perlakuan	72	3.33	2.175	1	7

Kruskal-Wallis Test

Ranks

Perlakuan	N	Mean Rank

col1	kontrol absorpsi sinar	24	12.83
	col-1 + pulpa	8	44.31
	col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	49.75
	col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	8	61.88
	col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	8	63.13
	col-1 + pulpa 1 hari	8	34.69
	col-1 + pulpa 12 hari	8	36.25
	Total	72	

Test Statistics^{a,b}

	col1	
Chi-Square		59.808
Df		6
Asymp. Sig.		.000

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

NPar TestsMann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	kontrol absorpsi sinar	24	12.54	301.00
	col-1 + pulpa	8	28.38	227.00
	Total	32		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	301.000
Z	-4.139
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test Ranks

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	kontrol absorpsi sinar	24	12.50	300.00
	col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	28.50	228.00
	Total	32		

	col1
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	300.000
Z	-4.182
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	kontrol absorpsi sinar	24	12.67	304.00
	col-1 + pulpa 1 hari	8	28.00	224.00
	Total	32		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	304.000
Z	-4.008
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
kontrol absorpsi sinar	24	12.63	303.00
col1 col-1 + pulpa 12 hari	8	28.13	225.00
Total	32		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	303.000
Z	-4.051
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col-1 + pulpa	8	7.50	60.00
col1 col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	9.50	76.00
Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	24.000
Wilcoxon W	60.000
Z	-.841
Asymp. Sig. (2-tailed)	.400
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.442 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col-1 + pulpa	8	5.00	40.00
col1 col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	8	12.00	96.00
Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	40.000
Z	-2.943
Asymp. Sig. (2-tailed)	.003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col-1 + pulpa	8	10.69	85.50
col1 col-1 + pulpa 1 hari	8	6.31	50.50
Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	14.500
Wilcoxon W	50.500
Z	-1.841
Asymp. Sig. (2-tailed)	.066
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col-1 + pulpa	8	10.25	82.00
col1 col-1 + pulpa 12 hari	8	6.75	54.00
Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	18.000
Wilcoxon W	54.000
Z	-1.475
Asymp. Sig. (2-tailed)	.140
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.161 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	5.63	45.00
	col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	8	11.38	91.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-2.419
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	5.75	46.00
	col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	8	11.25	90.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	46.000
Z	-2.312
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.021 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	11.63	93.00
	col-1 + pulpa 1 hari	8	5.38	43.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	43.000
Z	-2.629
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 1 hari	8	11.25	90.00
	col-1 + pulpa 12 hari	8	5.75	46.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	46.000
Z	-2.314
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.021 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	8	7.75	62.00
	col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	8	9.25	74.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	26.000
Wilcoxon W	62.000
Z	-.631
Asymp. Sig. (2-tailed)	.528
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.574 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	8	12.38	99.00
	col-1 + pulpa 1 hari	8	4.63	37.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	37.000
Z	-3.256
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 12 hari	8	12.38	99.00
	col-1 + pulpa 12 hari	8	4.63	37.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	37.000
Z	-3.256
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	8	12.31	98.50
	col-1 + pulpa 1 hari	8	4.69	37.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	37.500
Z	-3.208
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + ADMSC + lemak 21 hari	8	12.31	98.50
	col-1 + pulpa 12 hari	8	4.69	37.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	37.500
Z	-3.208
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.000 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1	col-1 + pulpa 1 hari	8	8.19	65.50
	col-1 + pulpa 12 hari	8	8.81	70.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1
Mann-Whitney U	29.500
Wilcoxon W	65.500
Z	-.263
Asymp. Sig. (2-tailed)	.793
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.798 ^b

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

5. UJI BEDA ADHESSION
Exploreperlakuan

Case Processing Summary

perlakuan		Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+FIBRIN GLUE	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%

Descriptives

perlakuan		Statistic	Std. Error
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+FIBRIN GLUE	Mean	.07525
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.05871
		Upper Bound	.09179
	5% Trimmed Mean	.07361	
	Median	.06800	
	Variance	.000	
	Std. Deviation	.019783	
	Minimum	.060	
	Maximum	.120	
	Range	.060	
	Interquartile Range	.020	
	Skewness	1.993	.752
	Kurtosis	4.363	1.481
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP GEL+FIBRIN GLUE	Mean	.06363
95% Confidence Interval for Mean		Lower Bound	.05963
		Upper Bound	.06762
5% Trimmed Mean		.06369	
Median		.06350	
Variance	.000		

	Std. Deviation		.004779	
	Minimum		.057	
	Maximum		.069	
	Range		.012	
	Interquartile Range		.010	
	Skewness		-.162	.752
	Kurtosis		-1.606	1.481
	Mean		.06725	.001916
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.06272	
		Upper Bound	.07178	
	5% Trimmed Mean		.06750	
	Median		.06800	
	Variance		.000	
ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	Std. Deviation		.005418	
	Minimum		.056	
	Maximum		.074	
	Range		.018	
	Interquartile Range		.006	
	Skewness		-1.289	.752
	Kurtosis		2.444	1.481
	Mean		.07575	.002950
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.06877	
		Upper Bound	.08273	
	5% Trimmed Mean		.07578	
	Median		.07450	
	Variance		.000	
ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	Std. Deviation		.008345	
	Minimum		.064	
	Maximum		.087	
	Range		.023	
	Interquartile Range		.016	
	Skewness		.070	.752
	Kurtosis		-1.490	1.481
	Mean		.07613	.002207
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.07091	
		Upper Bound	.08134	
	5% Trimmed Mean		.07619	
	Median		.07650	
	Variance		.000	
ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	Std. Deviation		.006244	
	Minimum		.066	
	Maximum		.085	
	Range		.019	
	Interquartile Range		.010	
	Skewness		-.206	.752
	Kurtosis		-.648	1.481
	Mean		.07875	.002328
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.07325	
		Upper Bound	.08425	
	5% Trimmed Mean		.07889	
	Median		.08000	
	Variance		.000	
ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	Std. Deviation		.006585	
	Minimum		.068	
	Maximum		.087	
	Range		.019	
	Interquartile Range		.012	
	Skewness		-.478	.752
	Kurtosis		-.866	1.481

Tests of Normality

	perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+FIBRIN GLUE	.249	8	.155	.767	8	.012
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP GEL+FIBRIN GLUE	.195	8	.200 [*]	.904	8	.314
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	.232	8	.200 [*]	.904	8	.314
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	.173	8	.200 [*]	.948	8	.695
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	.177	8	.200 [*]	.975	8	.932
	ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	.200	8	.200 [*]	.953	8	.744

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

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+FIBRIN GLUE	8		
ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	.06363	.004779	.001690	.05963	.06762	.057	.069
ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	8	.06725	.005418	.001916	.06272	.07178	.056	.074
ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	.07575	.008345	.002950	.06877	.08273	.064	.087
ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	8	.07613	.006244	.002207	.07091	.08134	.066	.085
ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	8	.07875	.006585	.002328	.07325	.08425	.068	.087
Total	48	.07279	.010894	.001572	.06963	.07595	.056	.120

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3.044	5	42	.020

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	5	.000	2.839	.027
Within Groups	.004	42	.000		
Total	.006	47			

NPar Tests

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
adhesion assay	48	.07279	.010894	.056	.120
perlakuan	48	3.50	1.726	1	6

Kruskal-Wallis Test

	perlakuan	N	Mean Rank
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+FIBRIN GLUE	8	22.19
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	10.75
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	8	17.00
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	30.25
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	8	31.31
	ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	8	35.50
	Total	48	

Test Statistics^{a,b}

	adhesion assay
Chi-Square	18.464
df	5
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: perlakuan

NPar TestsMann-Whitney Test

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+FIBRIN GLUE	8	10.13	81.00
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	6.88	55.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	19.000
Wilcoxon W	55.000
Z	-1.370
Asymp. Sig. (2-tailed)	.171
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.195 ^b

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

NPar TestsmMann-Whitney Test

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+FIBRIN GLUE	8	8.94	71.50
	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	8	8.06	64.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	28.500
Wilcoxon W	64.500
Z	-.368
Asymp. Sig. (2-tailed)	.713
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.721 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+FIBRIN GLUE	8	7.31	58.50
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	9.69	77.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	22.500
Wilcoxon W	58.500
Z	-.999
Asymp. Sig. (2-tailed)	.318
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.328 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion	8	7.19	57.50
assay	8	9.81	78.50
Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	21.500
Wilcoxon W	57.500
Z	-1.108
Asymp. Sig. (2-tailed)	.268
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.279 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion	8	6.63	53.00
assay	8	10.38	83.00
Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	17.000
Wilcoxon W	53.000
Z	-1.578
Asymp. Sig. (2-tailed)	.115
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.130 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion	8	6.94	55.50
assay	8	10.06	80.50
Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	19.500
Wilcoxon W	55.500
Z	-1.319
Asymp. Sig. (2-tailed)	.187
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.195 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion	8	5.25	42.00
assay	8	11.75	94.00
Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	42.000
Z	-2.737
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.005 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	Perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	4.88	39.00
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	8	12.13	97.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	39.000
Z	-3.050
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	4.81	38.50
	ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	8	12.19	97.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	2.500
Wilcoxon W	38.500
Z	-3.105
Asymp. Sig. (2-tailed)	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	8	6.13	49.00
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	10.88	87.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	13.000
Wilcoxon W	49.000
Z	-2.004
Asymp. Sig. (2-tailed)	.045
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.050 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	8	5.63	45.00
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	8	11.38	91.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	adhesion assay
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-2.423
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY ADMSC/LEMAK+PRP + FIBRIN GLUE	8	5.13	41.00
	ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	8	11.88	95.00
Total		16		

Test Statistics^a

		adhesion assay	
Mann-Whitney U		5.000	
Wilcoxon W		41.000	
Z		-2.846	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.004	a. Grouping Variable: perlakuan
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.003 ^b	b. Not corrected for ties.

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	8.31	66.50
	ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	8	8.69	69.50
Total		16		

Test Statistics^a

		adhesion assay	
Mann-Whitney U		30.500	
Wilcoxon W		66.500	
Z		-.158	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.874	a. Grouping Variable: perlakuan
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.878 ^b	b. Not corrected for ties.

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY PULPA+PRP GEL+FIBRIN GLUE	8	7.63	61.00
	ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	8	9.38	75.00
Total		16		

Test Statistics^a

		adhesion assay	
Mann-Whitney U		25.000	
Wilcoxon W		61.000	
Z		-.738	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.461	a. Grouping Variable: perlakuan
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.505 ^b	b. Not corrected for ties.

NPar TestsMann-Whitney Test

perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks
adhesion assay	ADHESION ASSAY PULPA+PRP+FIBRIN GLUE	8	7.31	58.50
	ADHESION ASSAY PULPA+FIBRIN GLUE	8	9.69	77.50
Total		16		

Test Statistics^a

		adhesion assay	
Mann-Whitney U		22.500	
Wilcoxon W		58.500	
Z		-1.000	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.317	a. Grouping Variable: perlakuan
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.328 ^b	b. Not corrected for ties.

LAMPIRAN KORELASI
Correlations

Correlations

		cell	BMP2	DMP	COL1H1	COL1H14	COL1H21
cell	Pearson Correlation	1	.823*	-.559	-.791	-.594	-.181
	Sig. (2-tailed)		.044	.249	.061	.214	.732
	N	6	6	6	6	6	6
BMP2	Pearson Correlation	.823*	1	-.814*	-.962**	-.762	-.620
	Sig. (2-tailed)	.044		.048	.002	.078	.189
	N	6	6	6	6	6	6
DMP	Pearson Correlation	-.559	-.814*	1	.825*	.416	.508
	Sig. (2-tailed)	.249	.048		.043	.413	.304
	N	6	6	6	6	6	6
COL1H1	Pearson Correlation	-.791	-.962**	.825*	1	.705	.549
	Sig. (2-tailed)	.061	.002	.043		.118	.259
	N	6	6	6	6	6	6
COL1H14	Pearson Correlation	-.594	-.762	.416	.705	1	.826*
	Sig. (2-tailed)	.214	.078	.413	.118		.043
	N	6	6	6	6	6	6
COL1H21	Pearson Correlation	-.181	-.620	.508	.549	.826*	1
	Sig. (2-tailed)	.732	.189	.304	.259	.043	
	N	6	6	6	6	6	6

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Nonparametric Correlations

Correlation

		cell	BMP2	DMP	COL1H1	COL1H14	COL1H21
cell	Correlation Coefficient	1.000	.899*	-.486	-.829*	-.714	-.429
	Sig. (2-tailed)	.	.015	.329	.042	.111	.397
	N	6	6	6	6	6	6
BMP2	Correlation Coefficient	.899*	1.000	-.464	-.986**	-.841*	-.638
	Sig. (2-tailed)	.015	.	.354	.000	.036	.173
	N	6	6	6	6	6	6
DMP	Correlation Coefficient	-.486	-.464	1.000	.486	.543	.771
	Sig. (2-tailed)	.329	.354	.	.329	.266	.072
	N	6	6	6	6	6	6
COL1H1	Correlation Coefficient	-.829*	-.986**	.486	1.000	.886*	.714
	Sig. (2-tailed)	.042	.000	.329	.	.019	.111
	N	6	6	6	6	6	6
COL1H14	Correlation Coefficient	-.714	-.841*	.543	.886*	1.000	.829*
	Sig. (2-tailed)	.111	.036	.266	.019	.	.042
	N	6	6	6	6	6	6
COL1H21	Correlation Coefficient	-.429	-.638	.771	.714	.829*	1.000
	Sig. (2-tailed)	.397	.173	.072	.111	.042	.
	N	6	6	6	6	6	6

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

DISTRIBUSI COL1 ANTAR PERLAKUAN
Exploreperlakuan

Case Processing Summary

	perlakuan	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
collH1	lemak	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	pulpa	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	lemak + PRP + FG	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	lemak + PRF +FG	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	lemak + FG	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	pulpa + PRP + FG	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	pulpa + FG	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%
	pulpa + PRF + FG	8	100.0%	0	0.0%	8	100.0%

Descriptives

	perlakuan		Statistic	Std. Error	
collH1	lemak	Mean	.100500	.0053016	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.087964	
			Upper Bound	.113036	
		5% Trimmed Mean		.099556	
		Median		.098000	
		Variance		.000	
		Std. Deviation		.0149952	
		Minimum		.0840	
		Maximum		.1340	
		Range		.0500	
		Interquartile Range		.0125	
		Skewness		1.779	.752
		Kurtosis		4.266	1.481
		Mean		.080250	.0042458
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.070210	
			Upper Bound	.090290	
collH1	pulpa	5% Trimmed Mean	.080000		
		Median	.080000		
		Variance	.000		
		Std. Deviation	.0120089		
		Minimum	.0660		
		Maximum	.0990		
		Range	.0330		
		Interquartile Range	.0232		
		Skewness	.380	.752	
		Kurtosis	-1.005	1.481	
		Mean	.099125	.0148233	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.064073	
			Upper Bound	.134177	
		5% Trimmed Mean	.102639		
		Median	.106500		
		Variance	.002		
collH1	lemak + PRP + FG	Std. Deviation	.0419266		
		Minimum	.0010		
		Maximum	.1340		
		Range	.1330		
		Interquartile Range	.0267		
		Skewness	-2.242	.752	
		Kurtosis	5.646	1.481	
		Mean	.106625	.0142277	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.072982	

	Mean	Upper Bound	.140268	
	5% Trimmed Mean		.110528	
	Median		.121500	
	Variance		.002	
	Std. Deviation		.0402419	
	Minimum		.0110	
	Maximum		.1320	
	Range		.1210	
	Interquartile Range		.0278	
	Skewness		-2.413	.752
	Kurtosis		6.180	1.481
	Mean		.060625	.0167960
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.020909	
		Upper Bound	.100341	
	5% Trimmed Mean		.061639	
	Median		.088000	
	Variance		.002	
lemak + FG	Std. Deviation		.0475062	
	Minimum		.0010	
	Maximum		.1020	
	Range		.1010	
	Interquartile Range		.0965	
	Skewness		-.610	.752
	Kurtosis		-2.175	1.481
	Mean		.077750	.0100796
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.053916	
		Upper Bound	.101584	
	5% Trimmed Mean		.080444	
	Median		.086000	
	Variance		.001	
pulpa + PRP + FG	Std. Deviation		.0285094	
	Minimum		.0090	
	Maximum		.0980	
	Range		.0890	
	Interquartile Range		.0137	
	Skewness		-2.544	.752
	Kurtosis		6.833	1.481
	Mean		.083125	.0022236
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.077867	
		Upper Bound	.088383	
	5% Trimmed Mean		.083306	
	Median		.083000	
	Variance		.000	
pulpa + FG	Std. Deviation		.0062892	
	Minimum		.0720	
	Maximum		.0910	
	Range		.0190	
	Interquartile Range		.0100	
	Skewness		-.547	.752
	Kurtosis		-.159	1.481
	Mean		.093500	.0022200
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.088250	
		Upper Bound	.098750	
	5% Trimmed Mean		.093889	
	Median		.094500	
	Variance		.000	
pulpa + PRF + FG	Std. Deviation		.0062792	
	Minimum		.0800	
	Maximum		.1000	

Range	.0200	
Interquartile Range	.0068	
Skewness	-1.553	.752
Kurtosis	3.011	1.481

Tests of Normality

	perlakuan	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
col1H1	lemak	.283	8	.059	.823	8	.050
	pulpa	.129	8	.200 [*]	.942	8	.629
	lemak + PRP + FG	.364	8	.002	.721	8	.004
	lemak + PRF +FG	.329	8	.011	.664	8	.001
	lemak + FG	.343	8	.006	.736	8	.006
	pulpa + PRP + FG	.378	8	.001	.640	8	.000
	pulpa + FG	.156	8	.200 [*]	.961	8	.822
	pulpa + PRF + FG	.220	8	.200 [*]	.862	8	.125

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

a. Lilliefors Significance Correction

PERBEDAAN COL1 ANTAR PERLAKUAN

NPar TestsKruskal-Wallis Test

	perlakuan	N	Mean Rank
col1H1	lemak	8	36.69
	pulpa	8	17.63
	lemak + PRP + FG	8	39.63
	lemak + PRF +FG	8	44.13
	lemak + FG	8	21.50
	pulpa + PRP + FG	8	21.13
	pulpa + FG	8	18.81
	Total	56	
col1H14	lemak	8	43.19
	pulpa	8	19.44
	lemak + PRP + FG	8	38.69
	lemak + PRF +FG	8	40.06
	lemak + FG	8	27.56
	pulpa + PRP + FG	8	16.38
	pulpa + FG	8	14.19
	Total	56	
col1H21	lemak	8	39.31
	pulpa	8	17.00
	lemak + PRP + FG	8	43.50
	lemak + PRF +FG	8	32.31
	lemak + FG	8	27.38
	pulpa + PRP + FG	8	23.06
	pulpa + FG	8	16.94
	Total	56	

Test Statistics^{a,b}

	col1H1	col1H14	col1H21
Chi-Square	22.610	26.741	19.667
df	6	6	6
Asymp. Sig.	.001	.000	.003

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: perlakuan

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak	8	11.63	93.00
	pulpa	8	5.38	43.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	43.000
Z	-2.629
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak	8	7.25	58.00
	lemak + PRP + FG	8	9.75	78.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	22.000
Wilcoxon W	58.000
Z	-1.053
Asymp. Sig. (2-tailed)	.293
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.328 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar TestsMann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak	8	6.50	52.00
	lemak + PRF +FG	8	10.50	84.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	16.000
Wilcoxon W	52.000
Z	-1.682
Asymp. Sig. (2-tailed)	.093
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.105 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak	8	10.56	84.50
	lemak + FG	8	6.44	51.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	15.500
Wilcoxon W	51.500
Z	-1.737
Asymp. Sig. (2-tailed)	.082
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.083 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak	8	11.38	91.00
	pulpa + PRP + FG	8	5.63	45.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-2.419
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

a. Grouping Variable: perlakuan

b. Not corrected for ties.

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak	8	11.88	95.00
	pulpa + FG	8	5.13	41.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	5.000
Wilcoxon W	41.000
Z	-2.840
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.003 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa	8	5.75	46.00
	lemak + PRP + FG	8	11.25	90.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	46.000
Z	-2.312
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.021 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa	8	5.50	44.00
	lemak + PRF +FG	8	11.50	92.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	44.000
Z	-2.522
Asymp. Sig. (2-tailed)	.012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.010 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa	8	8.13	65.00
	lemak + FG	8	8.88	71.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	29.000
Wilcoxon W	65.000
Z	-.316
Asymp. Sig. (2-tailed)	.752
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.798 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa	8	7.63	61.00
	pulpa + PRP + FG	8	9.38	75.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	25.000
Wilcoxon W	61.000
Z	-.737
Asymp. Sig. (2-tailed)	.461
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.505 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa	8	7.75	62.00
	pulpa + FG	8	9.25	74.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	26.000
Wilcoxon W	62.000
Z	-.632
Asymp. Sig. (2-tailed)	.527
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.574 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRP + FG	8	7.31	58.50
	lemak + PRF +FG	8	9.69	77.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	22.500
Wilcoxon W	58.500
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.328 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRP + FG	8	10.94	87.50
	lemak + FG	8	6.06	48.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	12.500
Wilcoxon W	48.500
Z	-2.059
Asymp. Sig. (2-tailed)	.040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.038 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRP + FG	8	11.38	91.00
	pulpa + PRP + FG	8	5.63	45.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	9.000
Wilcoxon W	45.000
Z	-2.423
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRP + FG	8	11.50	92.00
	pulpa + FG	8	5.50	44.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	44.000
Z	-2.522
Asymp. Sig. (2-tailed)	.012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.010 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRF +FG	8	11.81	94.50
	lemak + FG	8	5.19	41.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	5.500
Wilcoxon W	41.500
Z	-2.791
Asymp. Sig. (2-tailed)	.005
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.003 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRF +FG	8	11.63	93.00
	pulpa + PRP + FG	8	5.38	43.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	43.000
Z	-2.627
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRF +FG	8	11.50	92.00
	pulpa + FG	8	5.50	44.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	44.000
Z	-2.522
Asymp. Sig. (2-tailed)	.012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.010 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + FG	8	8.56	68.50
	pulpa + PRP + FG	8	8.44	67.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	31.500
Wilcoxon W	67.500
Z	-.053
Asymp. Sig. (2-tailed)	.958
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.959 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + FG	8	8.88	71.00
	pulpa + FG	8	8.13	65.00
	Total	16		

Test Statistics^a

		col1H1		
Mann-Whitney U		29.000		
Wilcoxon W		65.000		
Z		-.316		
Asymp. Sig. (2-tailed)		.752	a. Grouping Variable: perlakuan	
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.798 ^b	b. Not corrected for ties.	

NPar Tests

Mann-Whitney Test

Ranks

		perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa + PRP + FG		8	9.19	73.50
	pulpa + FG		8	7.81	62.50
	Total		16		

Test Statistics^a

		col1H1		
Mann-Whitney U		26.500		
Wilcoxon W		62.500		
Z		-.580		
Asymp. Sig. (2-tailed)		.562	a. Grouping Variable: perlakuan	
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.574 ^b	b. Not corrected for ties.	

Custom Tables

		col1H1				
		Valid N	Minimum	Maximum	Mean	Standard Deviation
perlakuan	lemak	8	.0840	.1340	.1005	.0150
	pulpa	8	.0660	.0990	.0803	.0120
	lemak + PRP + FG	8	.0010	.1340	.0991	.0419
	lemak + PRF +FG	8	.0110	.1320	.1066	.0402
	lemak + FG	8	.0010	.1020	.0606	.0475
	pulpa + PRP + FG	8	.0090	.0980	.0778	.0285
	pulpa + FG	8	.0720	.0910	.0831	.0063

NPar TestsMann-Whitney Test

		perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa		8	6.06	48.50
	pulpa + PRF + FG		8	10.94	87.50
	Total		16		

Test Statistics^a

		col1H1		
Mann-Whitney U		12.500		
Wilcoxon W		48.500		
Z		-2.051		
Asymp. Sig. (2-tailed)		.040	a. Grouping Variable: perlakuan	
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.038 ^b	b. Not corrected for ties.	

NPar TestsMann-Whitney Test

		perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRP + FG		8	11.00	88.00
	pulpa + PRF + FG		8	6.00	48.00
	Total		16		

Test Statistics^a

		col1H1		
Mann-Whitney U		12.000		
Wilcoxon W		48.000		
Z		-2.116		
Asymp. Sig. (2-tailed)		.034	a. Grouping Variable: perlakuan	
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]		.038 ^b	b. Not corrected for ties.	

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + PRF +FG	8	11.50	92.00
	pulpa + PRF + FG	8	5.50	44.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	44.000
Z	-2.524
Asymp. Sig. (2-tailed)	.012
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.010 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak + FG	8	7.31	58.50
	pulpa + PRF + FG	8	9.69	77.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	22.500
Wilcoxon W	58.500
Z	-1.001
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.328 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa + PRP + FG	8	6.19	49.50
	pulpa + PRF + FG	8	10.81	86.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	13.500
Wilcoxon W	49.500
Z	-1.950
Asymp. Sig. (2-tailed)	.051
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.050 ^b

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

NPar TestsMann-Whitney Test

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	pulpa + FG	8	5.31	42.50
	pulpa + PRF + FG	8	11.69	93.50
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1
Mann-Whitney U	6.500
Wilcoxon W	42.500
Z	-2.682
Asymp. Sig. (2-tailed)	.007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.005 ^b

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

PERBEDAAN ANTAR WAKTU
NPar Tests Wilcoxon Signed Ranks Test

Ranks

perlakuan		N	Mean Rank	Sum of Ranks	
lemak	col1H14 - col1H1	Negative Ranks	4.00	8.00	
		Positive Ranks	4.00	20.00	
		Ties	1 ^c		
	col1H21 - col1H1	Total	8		
		Negative Ranks	3 ^d	3.67	11.00
		Positive Ranks	5 ^e	5.00	25.00
	col1H21 - col1H14	Ties	0 ^f		
		Total	8		
		Negative Ranks	1 ^g	1.00	1.00
	col1H14 - col1H1	Positive Ranks	0 ^h	.00	.00
		Ties	7 ⁱ		
		Total	8		
pulpa	col1H14 - col1H1	Negative Ranks	4.67	14.00	
		Positive Ranks	4.40	22.00	
		Ties	0 ^c		
	col1H21 - col1H1	Total	8		
		Negative Ranks	2 ^d	6.00	12.00
		Positive Ranks	6 ^e	4.00	24.00
	col1H21 - col1H14	Ties	0 ^f		
		Total	8		
		Negative Ranks	2 ^g	5.00	10.00
	col1H21 - col1H14	Positive Ranks	5 ^h	3.60	18.00
		Ties	1 ⁱ		
		Total	8		

- a. col1H14 < col1H1
- b. col1H14 > col1H1
- c. col1H14 = col1H1

- d. col1H21 < col1H1
- e. col1H21 > col1H1
- f. col1H21 = col1H1

- g. col1H21 < col1H14
- h. col1H21 > col1H14
- i. col1H21 = col1H14

Test Statistics^a

perlakuan		col1H14 - col1H1	col1H21 - col1H1	col1H21 - col1H14
lemak	Z	-1.016 ^b	-.981 ^b	-1.000 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.310	.326	.317
pulpa	Z	-.561 ^b	-.840 ^b	-.676 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.574	.401	.499

a. Wilcoxon Signed Ranks Test

b. Based on negative ranks.

c. Based on positive ranks.

PERBEDAAN COLI ANTAR LEMAK & PULPA TIAP WAKTU
NPar Tests Mann-Whitney Test

Ranks

	perlakuan	N	Mean Rank	Sum of Ranks
col1H1	lemak	8	11.63	93.00
	pulpa	8	5.38	43.00
	Total	16		
col1H14	lemak	8	11.38	91.00
	pulpa	8	5.63	45.00
	Total	16		
col1H21	lemak	8	11.25	90.00
	pulpa	8	5.75	46.00
	Total	16		

Test Statistics^a

	col1H1	col1H14	col1H21
Mann-Whitney U	7.000	9.000	10.000
Wilcoxon W	43.000	45.000	46.000
Z	-2.629	-2.415	-2.312
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009	.016	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.007 ^b	.015 ^b	.021 ^b

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





ADIPOSED DERIVED MESENCHYMAL STEM CELL CONDITIONED MEDIA: PROMISING THERAPY FOR TOOTH REGENERATION

Dewi A Margono, Indah Yulianto, SitiMardewi SA, Boy BM Bachtiar, YudaFibrianto, YuyunRindiastuti

margonodewi@yahoo.com, dr_inyuda@yahoo.com, mardewi39@yahoo.com,
boybachtiar@gmail.com, fibrianto1802@gmail.com

FKG-UI,FK-UNS,FKH-UGM

Background: Tooth loss compromises oral health, conventionally several prosthetic method had been used to overcome that problems such as artificial denture and dental implant. Recently, stem cell based tissue engineering is thought to be a promising way to replace the missing tooth. ADMSC can differentiate into a variety of cell type. Of majority, ADMSC could easily expandable, not decreasing with the age, and ethically appropriate autologous source. Mesenchymal stem cells (MSCs) secrete a variety of cytokines and growth factors in addition to self-renewal and multiple forms of differentiation. Some of these secreted bioactive factors could improve dental regeneration. **The objective** of this study is to analyze this conditioned media if it can be an alternative therapy instead of stem cells themselves. **Material and method:** human adipose panicle (2-3 cm) were removed by lipectomy, fragmented and washed with PBS and enzymatically dissociated with 0.2% collagenase. Lately, these cells were incubated in culture medium DMEM up to 2 passage. ADMSC-CM were obtained after 48 hours ADMSC free serum culture using hanging drop method to generate embryoid bodies of MSC. Subsequently, ADMSC-CM were performed reducing SDS page to determine the existence of growth factor/cytokine through their molecular weight. **Result:** Reducing SDS PAGE analysis is confirmed the occurrence of thick band of 60-70kDa in size refers to IGF-1, angiopoietin, and HGF, It also presents 10kDa band refers to MCP-1, SDF 1 as a supportive cytokine for resident stem cell. A thin band of 25kDa indicating BMP-2 as a growth factor that play a major role in osteoblast and odontoblast formation. **Conclusion:** ADMSC-CM can be a promising therapy for tooth regeneration

Keywords: ADMSC, ADMSC-CM, *tooth engineering*, sds page.

Introduction

Tooth loss compromises human oral health. Although several prosthetic methods, such as artificial denture and dental implants, are clinical therapies to tooth loss problems, they are thought to have safety and usage time issues.¹ Tooth regeneration using tissue engineering concepts is a promising biological approach that aims to regenerate natural tooth-like mineral tissues in terms of histology, morphology and function. Odontoblasts from dental pulp stem cells showed odontogenic differentiation potential in basic research, whereas these cells are not practical to harvest in clinic.²

In recent studies, adipose derived mesenchymal stem cell (ADMSC) showed excellent pluripoten potential and had many advantages over bone marrow stem cell (BMSC), and their odontogenic and osteogenic potential can be maintained with aging.² Mesenchymal stem cells (MSCs) secrete a variety of cytokines and growth factors in addition to self-renewal and multiple forms of differentiation. Some of these secreted bioactive factors could improve the tissue regeneration.³ These secreted bioactive factor known as mesenchymal stem cells conditioned media contain trophic factor that can modulate migration, proliferation, and differentiation of resident stem cells. Furthermore, this conditioned media approved to release several cytokines and growth factors that is characterized as anon species specific.⁴ Therefore, the objective of this study is to analyze this conditioned media to be an alternative therapy instead of stem cells due to their easiness to obtain in large quantity and low cost rather than stem cells isolation.

Material and method

ADMSC isolation

Human adipose panicle (2-3 cm) were removed by lipectomy, fragmented and washed with PBS and enzymatically dissociated with 0.2% collagenase. Subsequent the digested cells were filtered, supernatant was discarded, and pellet was mixed with complete media (high glucose DMEM, 10% fetal bovine serum, 1% penicillin streptomycin, and 1% fungizone). Lately, these cells were incubated at 37⁰C 5%CO₂ incubator. Subculture was conducted when the growing cells reach 80% confluency. Stem cells culture was subcultured up to 2 passage using warm trypsin method.

Collection of Conditioned media

Second pasase of ADMSC were cultivated using warm trypsin method, then the cultivated cells were resuspended in 10.000 cells/ml density. The cells were seeded in culture disk to generate embryoid bodies colony using hanging drops method and were incubated in 37⁰C 5%CO₂ incubator. After the embryoid bodies reach intercolonyconfluency, the media was replaced with free serum media. ADMSC-CM was obtained after 48 hours ADMSC free serum culture incubation.

Secreted bioactive factor identification

Subsequently, ADMSC-CM were performed reducing SDS page to measure molecular weight of a variety growth factor/cytokine.

Result

ADSCs expanded easily in vitro and exhibited mesodermal tissues share key characteristics, including ability to adhere to plastic and form fibroblastic-like colonies (called CFU-F). These cells reached 80% confluency in 7 days of culture and easily cultivated.as seen in figure 1 and 2.

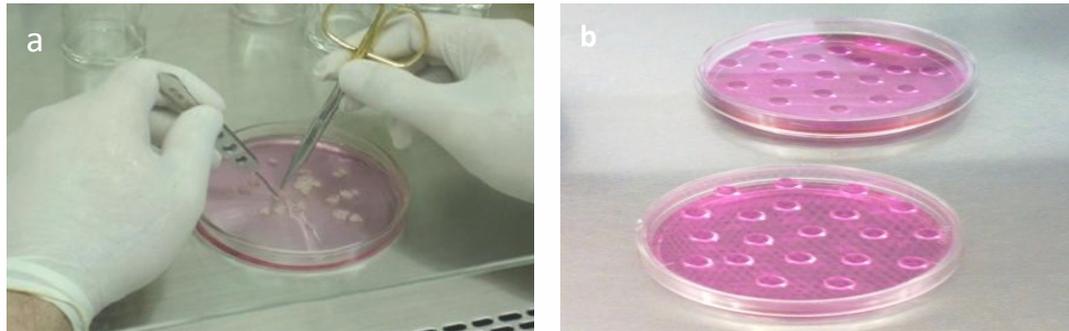


Figure 1. ADMSC isolation. (a) adipose panicle rinsed before enzymatic method conducted. (b) generating embryoid bodies using hanging drop methods to obtain conditioned media

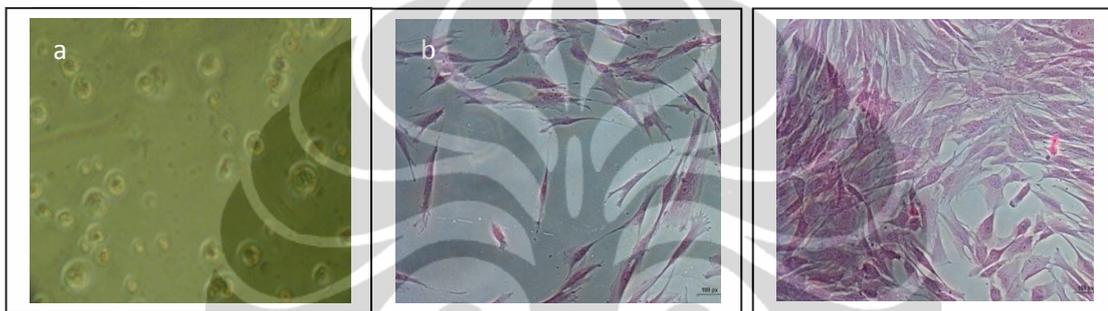


Figure 2. Colony forming unit fibroblast characteristic of ADMSC. (a) 24h after culture (b) 3d after culture (c) 7d after culture

ADMSC-CM was collected 5ml from each disk culture using hanging drop method. Amount of 1.2 ul sodium dodecyl sulfate solution was diluted per ml conditioned media solution, after that it was performed electrophoresis. Reducing SDS page test showed many sizes of molecular weight that correlate with many bioactive factors including IGF-1, HGF, MCP-1, SDF 1, and BMP-2 in low concentration.

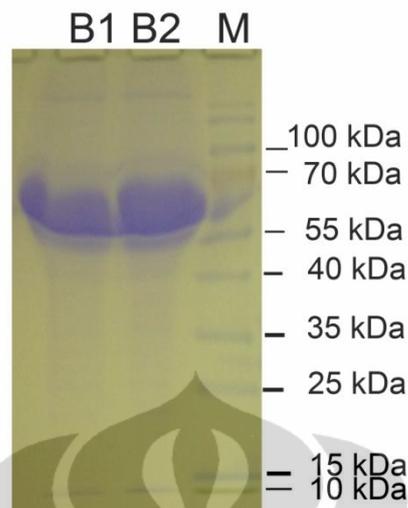


Figure 3. SDS-page analysis of ADMSC-CM

Thick band of 60-70kDa in size refers to IGF-1, angiopoietin, and HGF that play a critical role in stem cell proliferation and differentiation, moreover IGF-1 can promote resident stem cell to differentiate. It also presents 10kDa band refers to MCP-1, a cytokine which promote angiogenesis; SDF 1 as a supportive cytokine for resident stem cell. A thin band of 25kDa indicating BMP-2 as a growth factor that play a major role in osteoblast and odontoblast formation.(figure 3).

Discussion

The isolation of post-natal stem cells from an easily accessible source is indispensable for tissue engineering and clinical applications. Thus Adipose tissue as one of mesenchymal stem cells source shared characteristic as CFU-F formation and adhere to plastic disk, whereas MSCs marker identification was not performed in this research yet.⁵Mesenchymal stem cell possess a high self-renewal capacity and the potential to differentiate into mesodermal lineages thus forming cartilage, bone, adipose tissue, skeletal muscle and the stroma of connective tissues. Mesenchymal progenitors had been assessed for tooth engineering purposes, such as progenitors derived from teeth and bone

marrow. It is proved that ADMSC share numerous characteristics with dental pulp stem cells and are both able to form bone-like or tooth-like structures.⁶

Commitment could arise from conditioning of stem cells by their specific microenvironment or stem cell niche. In which ADMSCs secrete such bioactive factors known as conditioned media containing growth factors and cytokine. This research presents high concentration of MCP-1 that play a role as chemoattraction factor for resident stem cells to migrate around injury area.^{4,7} In addition, MCP-1 shows angiogenic capacity to maintain the vasculature of injury site and promote growth of resident stem cells.⁶ MSC-conditioned medium contains high amounts of angiogenic and anti-apoptotic factors such as IL-6, VEGF and MCP-1, which inhibit the death of endothelial cells cultured under hypoxic conditions and promote the formation of capillary-like structures in an *in vitro* assay.^{4,8} *In vitro* and *in vivo* experiments using these conditioned media have provided promising results illustrated by the generation of a complete tooth with all dental structures including cells and extracellular matrix deposition. However, ADMSC-CM play vital role to modulate proliferation and inhibit apoptosis through IGF-1 and HGF crosstalk signaling. Lindolfo et al found the presence of these and other anti-apoptotic molecules in MSC-conditioned medium and, interestingly, showed that an MSC-containing bioreactor been connected to the bloodstream. Angiopoietin 1 and SDF are contained within this conditioned media which were proved as a supportive bioactive factor for stem cell growth.^{4,6,7,9}

However, low expression of ADMSC-CM display a lower odontogenic potential than DPSC, indicating that MSC from different embryonic origins are not equivalent. Indeed, DPSC derived from neural crest cells, whereas ADMSC originate from the mesoderm. Furthermore, the comparison of the osteogenic and adipogenic potential of MSC from different origins shows that even if cells carry common genetic markers, they are not equivalent and are already committed towards a specific differentiation pathway.⁶ It remains to be explored which source might be used for an optimal tooth development for clinical application. However, many problems remain to be addressed before considering the clinical use of stem cells technologies. The use of allogenic stem cells or even xenogenic is restricted by immune rejection risks.^{4,10} Additionally, isolating autologous stem

cells requires a source of easily accessible cells without the need for surgery. It may be possible to replace dental mesenchymal stem cells with mesenchymal stem cells conditioned media as an alternative solution such as there is no MHC II expression within this media indicating low risk of immune rejection. The implication of MSC-CM considering as the engineering of tridimensional matrices (either polylactic acid polymers or collagen sponges) which a composition more or less similar to that of the organs to reconstruct with the constitutive of growth factors that might facilitate the transplantation and the differentiation of resident stem cells within injury site.^{4,6}

Conclusion

Adipose derived mesenchymal stem cells conditioned media secrete bioactive factors regarding a trophic factor that has a variety of implications for tooth engineering. Of majority, the bioactive factors presented indicate that this conditioned media can be an alternative therapy instead of stem cells themselves, because they are easy to obtain in large quantity and low cost over stem cell isolation.

References

1. G. Bluteau, H-U. Luder, C. De Bari, T. A. Mitsiadis. 2008. Stem cells for tooth engineering. *European cells and materials*. 16: 1-9
2. Wei Jing, Ling Wu, Yunfeng Lin, Lei Liu, Wei Tang, Weidong Tian. 2008. Odontogenic differentiation of adipose-derived stem cells for tooth regeneration: necessity, possibility, and strategy. *Medical Hypotheses* 70: 540–542
3. Marcelo Paulo, Vaccari Mazzetti, Isis Sousa Oliveira. 2010. Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells. 25: 1-4
4. Sujeong Jang, Hyong-Ho Cho², Yong-Bum Cho. 2010. Neural differentiation of human adipose tissue-derived stem cells using bFGF and forskolin. *BMC Cell Biology*. 11: 1427-2121
5. Anastasia Efimenko, Ekaterina Starostina, Natalia Kalinina, Alexandra Stolzing. 2011. Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning. *Journal of Translational Medicine* 9:1-10
6. Antonella Blasi, Carmela Martino, Luigi Balducci, et al. 2011. Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vascular Cell* 2011, 3:15
7. Lindolfo da Silva Meirelles, Aparecida Maria Fontes, Dimas Tadeu Covas, Arnold I. Caplan. 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 20: 419-427.
8. Brent R. Weil, M.D, Mariuxi C. Manukyan, M.D, Jeremy L. Herrmann, et al. 2011. The Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells: Implications for Surgical Disease. *Journal of Surgical Research*. 167:78-86.
9. Shunsuke Ohnishi, Hideaki Sumiyoshi, Soichiro Kitamura, Noritoshi. 2007. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *Febs letters*. 581: 3961–3966
10. Yu-Xin Xu, Li Chen, Rong Wang, Wei-Kai Hou. 2008. Mesenchymal stem cell therapy for diabetes through paracrine mechanisms. 71:390-393