



**EFEK MEDIUM TERKONDISI DARI *HUMAN GINGIVAL*
MESENCHYMAL STEM CELL (GMSC) TERHADAP
SINTESIS GLIKOSAMINOGLIKAN PADA MODEL
KONDROGENIK *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

Oktavia Yosy Putri Utami

NIM 181610101034

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2022



**EFEK MEDIUM TERKONDISI DARI *HUMAN GINGIVAL*
MESENCHYMAL STEM CELL (GMSC) TERHADAP
SINTESIS GLIKOSAMINOGLIKAN PADA MODEL
KONDROGENIK *IN VITRO***

SKRIPSI

Disusun guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh
Oktavia Yosy Putri Utami
NIM 181610101034

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER**

2022

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT, dan dengan karunia serta hidayah-Nya, saya persembahkan skripsi ini untuk:

1. Ayahanda Jumadi Sriyono, Ibunda Siti Lestari, Adek Satriyo Wibowo Bimo B., dan Rangga Yudha Ongko Wijoyo yang selalu memberikan doa, dorongan semangat, dan curahan kasih sayang selama perjalanan hidup saya hingga saat ini;
2. Guru-guru dan dosen-dosen saya yang telah memberikan ilmu demi meraih cita-cita saya;
3. Teman-teman yang telah memberikan dukungan dan motivasi serta menemani dalam perjalanan saya dalam suka maupun duka;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

MOTO

Kemudian, apabila engkau telah membulatkan tekad, maka bertawakkallah kepada Allah. Sungguh Allah mencintai orang yang bertawakkal*



*) Terjemahan Al-Qur'an Surat Ali 'Imran Ayat 159

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Oktavia Yosy Putri Utami

NIM : 181610101034

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah saya yang berjudul “Efek Medium Terkondisi dari *Human Gingival Mesenchymal Stem Cell* Terhadap Sintesis Glikosaminoglikan Pada Model Kondrogenik *in vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi manapun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung setinggi-setingginya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan, dan paksaan dari pihak manapun, serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,2022

Yang menyatakan

Oktavia Yosy Putri Utami

NIM 181610101034

SKRIPSI

**EFEK MEDIUM TERKONDISI DARI *HUMAN GINGIVAL*
MESENCHYMAL STEM CELL (GMSC) TERHADAP
SINTESIS GLIKOSAMINOGLIKAN PADA MODEL
KONDROGENIK *IN VITRO***

Oleh

Oktavia Yosy Putri Utami

NIM 181610101034

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes

Dosen Pembimbing Pendamping: Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M. Kes

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efek Medium Terkondisi dari *Human Gingival Mesenchymal Stem Cell* Terhadap Sintesis Glikosaminoglikan Pada Model Kondrogenik *in Vitro*” karya Oktavia Yosy Putri Utami telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 28 April 2022

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua

Dr. drg. Muhammad Nurul Amin, M.Kes
NIP 197702042002121000

Dosen Pembimbing Utama

Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes
NIP 1970050919990322001

Dosen Penguji Anggota

Prof. Dr. drg. Herniyati, M. Kes
NIP 195909061985032001

Dosen Pembimbing Pendamping

Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M. Kes
NIP 196109031986022001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros
NIP 196901121996011001

RINGKASAN

Efek Medium Terkondisi dari *Human Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) Terhadap Sintesis Glikosaminoglikan Pada Model Kondrogenik *in Vitro*; Oktavia Yosy Putri Utami, 181610101034; 68 halaman: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Glikosaminoglikan merupakan salah satu matriks ekstraseluler kartilago. Glikosaminoglikan dapat menjadi penanda terjadinya diferensiasi kondrogenik. Diferensiasi kondrogenik berperan penting dalam perbaikan kerusakan kartilago TMJ. Salah satu terapi yang dapat dipilih untuk memperbaiki kerusakan kartilago TMJ adalah *cell-based therapy* dengan *mesenchymal stem cell* (MSC) karena memiliki kemampuan diferensiasi kondrogenik dan multipotensi. MSC dapat diisolasi dari lamina propia gingiva yang disebut dengan *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC). Metode *cell-based therapy* ternyata memiliki beberapa kekurangan sehingga menyebabkan rasa sakit dan tidak nyaman bagi pasien. Oleh karena itu, dikembangkan metode *cell-free therapy* dari medium terkondisi yang juga memiliki kemampuan dalam perbaikan kerusakan kartilago. Medium terkondisi dipilih karena memiliki kemampuan perlindungan dan perbaikan jaringan melalui mekanisme parakrin, karena mengandung faktor terlarut seperti *growth factor*, sitokin, lemak, dan mineral. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek medium terkondisi terhadap sintesis glikosaminoglikan pada model kondrogenik.

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post test control group design*. Parameter dalam penelitian ini adalah akumulasi glikosaminoglikan yang diamati pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 melalui pewarnaan *alcian blue*. Penelitian ini terdiri dari dua kelompok, yaitu a) kelompok kontrol yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) b) kelompok perlakuan yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM+FBS) yang ditambahkan dengan bahan penginduksi. Metode penelitian diawali dengan

preparasi medium terkondisi, sel GMSC ditumbuhkan dalam media kultur dan ditunggu hingga mencapai konfluen 80%. Media kultur diambil, sel dicuci dengan PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) sebanyak 5 kali kemudian ditambahkan media baru berupa DMEM dan FBS (*Fetal Bovine Serum*). Sel diinkubasi selama 24 jam, media sel dimasukkan ke *conical tube* dan disentrifusi dengan kecepatan 3000xg selama 10 menit. Supernatan diambil dan disaring dengan filter 0,22 μm untuk mendapatkan medium terkondisi. Kemudian dilakukan kultur kondrogenik, sel dikultur dalam *flat-bottom 24-well plate* dengan media kultur hingga mencapai konfluen 80%. Setelah mencapai konfluen media kultur diganti dengan media penginduksi berupa medium kondrogenik standar *OricellTM* dan medium terkondisi (DMEM+FBS) yang ditambahkan dengan bahan penginduksi, kemudian diinkubasi selama 28 hari. Pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 dilakukan pewarnaan *alcian blue*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok medium kondrogenik standar (*OricellTM*) dan medium terkondisi (DMEM+FBS) keduanya memiliki akumulasi glikosaminoglikan. Kelompok medium terkondisi (DMEM+FBS) memiliki akumulasi glikosaminoglikan yang lebih banyak jika dibandingkan dengan kelompok medium kondrogenik standar (*OricellTM*). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa akumulasi glikosaminoglikan pada hari ke-21 lebih banyak jika dibandingkan dengan hari lain.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa medium terkondisi dari *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) mampu memicu sintesis glikosaminoglikan pada model kondrogenik yang dibuktikan dengan adanya akumulasi glikosaminoglikan setelah dilakukan pewarnaan *alcian blue* pada hari ke-7, 14, 21, dan 28.

Kata kunci: Medium terkondisi, *Gingival Mesenchymal Stem Cell*, akumulasi glikosaminoglikan, dan medium kondrogenik standar

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Medium Terkondis dari *Human Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) Terhadap Sintesis Glikosaminoglikan Pada Model Kondrogenik *in Vitro*” sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program sarjana (S1) Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, dukungan, dorongan, dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT atas segala limpahan nikmat, karunia, dan hidayah-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan lancar;
2. Bapak dan Ibu tersayang yang selalu mendoakan, memberi semangat, mendukung, memotivasi, dan memberikan kasih sayang selama saya menempuh perjalanan hidup saya hingga sekarang;
3. Adek Satriyo Wibowo Bimo B. dan Rangga Yudha O.W. tersayang yang memberi dukungan, semangat, dan membantu dalam penyusunan skripsi ini;
4. drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp. Pros, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
5. Dr. drg. Banun Kusumawardani, M. Kes, selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, memotivasi, memberi semangat, doa, serta saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
6. Dr. drg. I Dewa Ayu Susilawati, M. Kes, selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktunya untuk membimbing, memotivasi, memberi semangat, doa, serta saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
7. Dr. drg. Muhammad Nurul Amin, M.Kes, selaku Dosen Penguji Ketua dan Prof. Dr. drg. Herniyati, M. Kes selaku Dosen Penguji Anggota yang telah

berkenan memberikan kritik dan saran ilmu yang membangun dan memperbaiki untuk penulisan skripsi ini. drg. Tantin Ermawati, M. Kes selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan memberi nasehat dalam perjalanan studi saya di masa preklinik;

8. Mbak Dea dan Mbak Larissa yang telah banyak membantu saya dalam melakukan dan mengerjakan penelitian saya;
9. Teman-teman Ratna W, Regina, Viola, Maria, Beatrice, Shinta, yang telah membantu, memotivasi, dan berjuang bersama selama masa perkuliahan;
10. NIM atas dan bawah saya, Nadia Alfiana Uba dan Kumara Pandya F.A. yang telah membantu, memotivasi, dan mendengarkan keluh kesah saya selama masa perkuliahan dan penyusunan skripsi;
11. Team CDAST SQUAD dan Intan Julita yang telah membantu dan menemani saya selama melakukan penelitian;
12. Teman kelompok Tutorial D yang telah menemani perjalanan selama perkuliahan;
13. Teman praktikum A2 yang telah membantu saya;
14. Teman-teman sejawat Eldentium 2018
15. Semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian ini yang tidak dapat saya sebutkan satu per satu, atas perhatian, berkenaan yang telah diberikan, ucapan terimakasih untuk kalian semua.

Penulis menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pendidikan dan kesehatan.

Jember,2022

Penulis

DAFTAR ISI

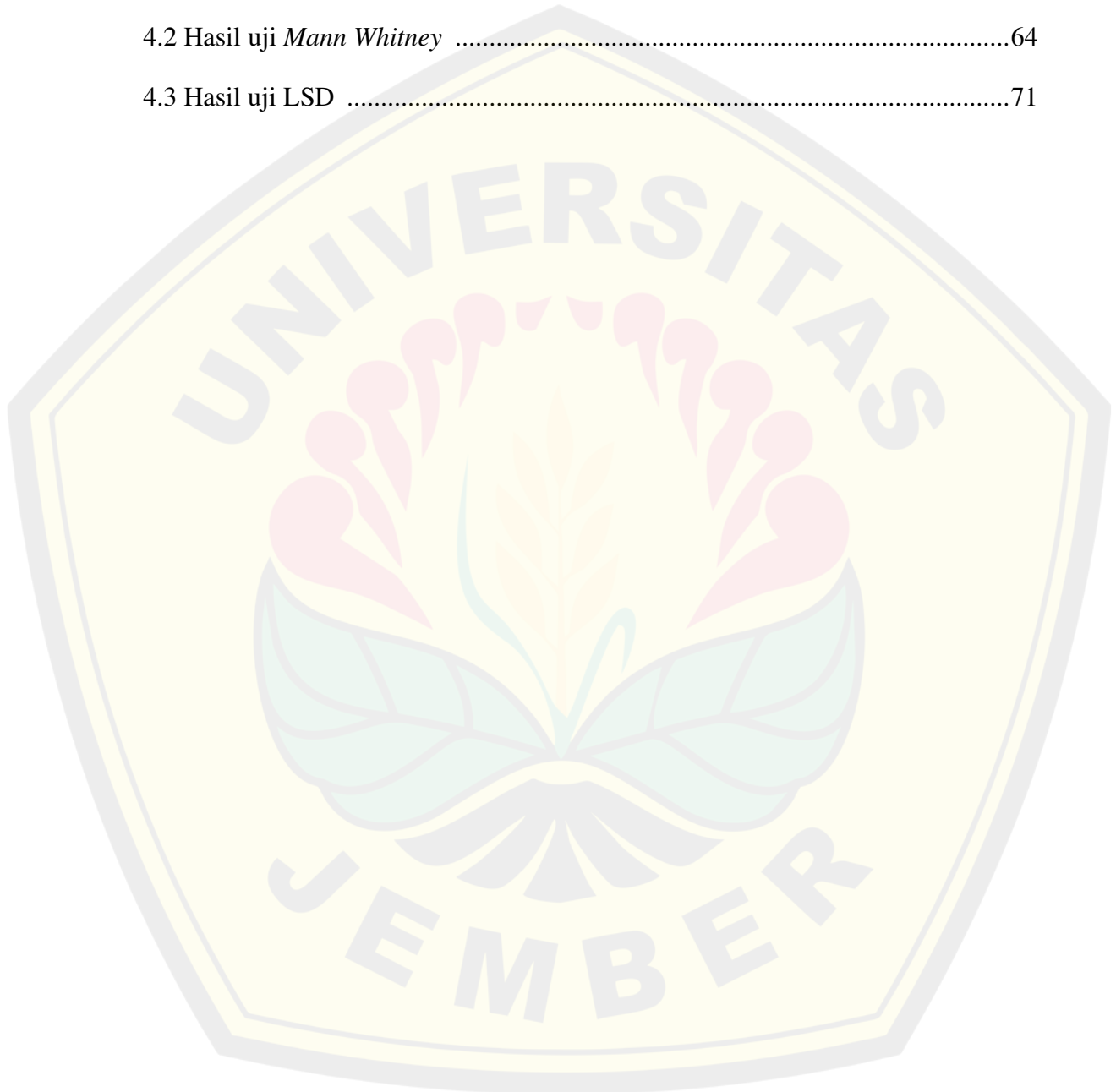
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Kartilago TMJ	4
2.2 Komposisi Kartilago.....	6
2.3 Model Kondrogenik (Kondrogenesis).....	6

2.4.1 Sel	6
2.3.2 <i>Growth Factor</i>	8
2.3.3 Proses Kondrogenesis	10
2.4 Glikosaminoglikan (GAG).....	12
2.5 <i>Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC)</i>	15
2.6 Medium Terkondisi	17
2.7 <i>Software ImageJ</i>	19
2.8 Kerangka Konsep	20
2.9 Deskripsi Kerangka Konsep.....	21
2.10 Hipotesis	21
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	22
3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian.....	22
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.2.1 Tempat Penelitian	22
3.2.2 Waktu Penelitian	22
3.3 Variabel Penelitian	22
3.3.1 Variabel Bebas	22
3.3.2 Variabel Terikat	23
3.3.3 Variabel Terkendali.....	23
3.4 Definisi Operasional	23
3.4.1 Medium Terondisi dari <i>Gingival Mesenchymal Stem Cell</i> (GMSC).....	23
3.4.2 Medium Kondrogenik Standar.....	23
3.4.3 Glikosaminoglikan Pada Model Kondrogenik.....	23

3.5 Kelompok Penelitian	24
3.6 Alat dan Bahan Penelitian	24
3.6.1 Alat Penelitian.....	24
3.6.2 Bahan Penelitian	25
3.7 Prosedur Penelitian	26
3.7.1 Kultur GMSC	26
3.7.2 Preparasi dan Pembuatan Medium Terkondisi dari GMSC.....	26
3.7.3 Kultur Kondrogenik GMSC dalam GMSC-CM	27
3.7.4 Validasi Sintesis Glikosaminogikan	27
3.7.5 Pengukuran Intensitas Penyerapan Warna <i>Software ImageJ</i>	28
3.8 Alur Penelitian.....	29
3.9 Analisis Data	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data	31
4.2. Pembahasan	39
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Kesimpulan	43
5.2. Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN.....	50

DAFTAR TABEL

2.1 Isolasi dan karakterisasi <i>Gingival Mesenchymal Stem Cell</i>	17
4.1 Hasil pengukuran intensitas glikosaminoglikan	33
4.2 Hasil uji <i>Mann Whitney</i>	64
4.3 Hasil uji LSD	71



DAFTAR GAMBAR

2.1	Gambaran histologi 4 zona <i>Temporomandibular Joint</i>	5
2.2	Gambaran histologi kondrosit dan matriks	7
2.3	Mikrograf elektron kondrosit muda	8
2.4	Regulator dalam diferensiasi kondrogenik <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	10
2.5	Struktur kimia 4 jenis Glikosaminoglikan	13
2.6	Rantai molekul <i>Aggrecan</i>	14
2.7	Jalur sintesis Glikosaminoglikan	14
2.8	Skema <i>Mesenchymal Stem Cell</i> dari rongga mulut.....	15
2.9	Morfologi <i>Gingival Mesenchymal Stem Cell</i> dengan perbesaran 20x.....	16
2.10	Kerangka Konsep Penelitian.....	20
2.11	Alur Penelitian	29
4.1	Hasil akumulasi Glikosaminoglikan pada hari ke-7	31
4.2	Hasil akumulasi Glikosaminoglikan pada hari ke-14	31
4.3	Hasil akumulasi Glikosaminoglikan pada hari ke-21	32
4.4	Hasil akumulasi Glikosaminoglikan pada hari ke-28	32
4.5	Grafik penyerapan intensitas warna	35
4.6	Grafik penyerapan luas daerah akumulasi Glikosaminoglikan	36

DAFTAR LAMPIRAN

3.1 Surat Keterangan <i>Ethical Clearance</i>	46
3.2 Surat Izin Penelitian di Laboratorium CDAST	47
3.3 Sertifikat <i>Good Laboratory Practice</i>	49
3.4 Alat Penelitian.....	50
3.5 Bahan Penelitian	50
3.6 Prosedur Penelitian	51
3.6.1 Kultur <i>Gingival Mesenchymal Stem Cell</i>	51
3.6.2 Preparasi dan Pembuatan Medium Terkondisi dari GMSC.....	51
3.6.3 Kultur Kondrogenik GMSC	53
3.6.4 Validasi Sintesis Glikosaminoglikan Hari ke-7,14,21, dan 28	54
4.1 Gambar Hasil Pengamatan.....	54
4.1.1 Kelompok Kontrol (Kondrogenik Standar)	54
4.1.2 Kelompok Perlakuan (Medium Terkondisi (DMEM+FBS)).....	56
4.2 Analisis Data.....	58

DAFTAR SINGKATAN



BM-MSC	: <i>Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell</i>
BMP	: <i>Bone Morphogenetic Protein</i>
DMEM	: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FBS	: <i>Fetal Bovine Serum</i>
FGF	: <i>Fibroblast Growth Factor</i>
GAG	: <i>Glikosaminoglikan</i>
GMSC	: <i>Gingival Mesenchymal Stem Cell</i>
HSC	: <i>Hematopoietic Stem Cell</i>
IGF	: <i>Insulin Growth Factor</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
PBS	: <i>Phosphate-Buffer Saline</i>
PFA	: <i>Paraformaldehyde</i>
SZP	: <i>Superficial Zone Protein</i>
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
TMJ	: <i>Temporomandibular Joint</i>

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kartilago TMJ berperan penting dalam fungsi artikulasi dan mengurangi beban yang akan diteruskan ke kondilus mandibula. Kerusakan kartilago TMJ dapat menyebabkan rasa sakit dan gangguan fungsional. Kartilago TMJ merupakan jaringan fibrokartilago yang memiliki kapasitas perbaikan jaringan yang rendah, karena merupakan jaringan avaskular, alimfatik, aneural, dan kondrosit memiliki kemampuan sekresi matriks ekstraseluler yang lebih rendah (Lee *et al.*, 2020). Perbaikan kartilago terjadi melalui proses kondrogenesis atau diferensiasi kondrogenik yang diatur oleh banyak pensinyalan seperti ligan ekstraseluler, *transcription factor*, molekul adhesi, dan *growth factor* (Ross dan Pawlina, 2016). Terapi yang ada saat ini, hanya difokuskan pada pemberian obat-obatan untuk mengurangi rasa sakit, namun tidak mampu menginduksi diferensiasi kondrogenik untuk perbaikan kerusakan kartilago TMJ (Zhang *et al.*, 2015).

Diferensiasi kondrogenik ditandai dengan pembentukan matriks ekstraseluler kartilago oleh sel kondroblas, salah satunya glikosaminoglikan. Glikosaminoglikan merupakan rantai molekul linear, bermuatan tinggi karbohidrat yang tersusun atas unit disakarida berulang (El Sayed dan Dorfer, 2016). Oleh karena itu, dikembangkan terapi regeneratif yang dapat membantu perbaikan kartilago yang lebih cepat melalui proses kondrogenesis, salah satunya melalui terapi regeneratif *mesenchymal stem cell* (MSC).

Mesenchymal stem cell (MSC) merupakan *non-hematopoietic stem cell* yang memiliki kemampuan tinggi untuk perbaikan dan regenerasi. MSC dapat berdiferensiasi pada jalur osteogenik, kondrogenik, dan adipogenik akibat stimulasi beberapa faktor penginduksi. MSC dapat diisolasi dari sumsum tulang, sendi, otot, jaringan lemak, dan rongga mulut. MSC dari rongga mulut dapat diisolasi dari pulpa gigi sulung, sumsum tulang orofasial, papilla apikal, dental folikel, pulpa gigi, periosteum, kelenjar saliva, ligamen periodontal dan lamina propia gingiva yang disebut dengan *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) (Grawish *et al.*, 2018).

Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) dapat dipilih sebagai agen terapi karena memiliki berbagai keuntungan jika dibandingkan dengan MSC dari jaringan lain. GMSC tersedia dalam jumlah yang melimpah dengan prosedur isolasi yang tidak invasif (Nugraha *et al.*, 2018). GMSC memiliki kemampuan perbaikan diri, immunomodulasi, dan diferensiasi osteogenik, kondrogenik, dan adipogenik, serta memiliki efek antitumor. Seperti MSC lainnya, GMSC juga dapat digunakan dalam *cell based-therapy* untuk penyembuhan luka, regenerasi tendon, regenerasi kerusakan tulang, regenerasi periodontal, dan, regenerasi kartilago (Venkatesh *et al.*, 2017). Namun *cell based-therapy* dengan MSC memiliki beberapa kekurangan karena memiliki potensi untuk menimbulkan reaksi imun, diperlukan dalam jumlah yang besar, waktu penyembuhan yang lama, perkembangan kanker, dan proses bedah berulang sehingga menimbulkan sakit dan ketidaknyamanan pada pasien (Sumarta *et al.*, 2018). Penelitian terus dilakukan untuk mencari metode *cell-free therapy* dengan MSC yang lebih aman dan nyaman bagi pasien.

Salah satu metode *cell-free therapy* yang dikembangkan adalah medium terkondisi dari *Mesenchymal Stem Cell* (MSC). Medium terkondisi sebagai metode *cell-free therapy* dapat mencegah potensi tumorigenitas, reaksi penolakan sel oleh imun resipien, pembentukan emboli, diferensiasi yang tidak diinginkan, dan transmisi infeksi yang dapat terjadi dalam *cell-based therapy* (Hu *et al.*, 2020). Medium terkondisi merupakan faktor terlarut yang disekresikan oleh MSC ke lingkungan tempat kulturnya dan mengandung berbagai *growth factor* (FGF2, insulin, PDGF, dan EGF), sitokin, lipid (asam lemak dan fosfolipid), dan mineral yang berperan dalam perlindungan dan perbaikan (Yoshida *et al.*, 2018). Medium terkondisi dapat digunakan dalam terapi regenerasi kulit, penyembuhan luka, kerusakan tulang dan kartilago melalui mekanisme parakrin yang dapat memicu perbaikan, regenerasi jaringan, dan diferensiasi osteogenik, adipogenik, dan kondrogenik (El Moshy *et al.*, 2018). Oleh karena itu, dikembangkan terapi regeneratif berupa injeksi medium terkondisi dari MSC ke daerah yang mengalami kerusakan kartilago, sehingga dapat memicu perbaikan kerusakan kartilago melalui mekanisme diferensiasi kondrogenik yang ditandai dengan sintesis glikosaminoglikan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat ditarik suatu rumusan masalah yaitu “Bagaimana efek medium terkondisi dari *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) terhadap sintesis glikosaminoglikan pada model kondrogenik *in vitro*?”

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis efek medium terkondisi dari *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) terhadap sintesis glikosaminoglikan pada model kondrogenik *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah

- a. Memberikan informasi dan landasan teori mengenai efek medium terkondisi dari *Human Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) terhadap sintesis glikosaminoglikan pada model kondrogenik *in vitro*.
- b. Menjadi alternatif terapi dalam perbaikan kerusakan kartilago TMJ yang lebih aman, nyaman, dan memiliki potensi yang lebih baik.
- c. Menjadi dasar rujukan untuk penelitian lanjutan mengenai efek medium terkondisi dari *Human Gingival Mesenchymal Stem Cell*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kartilago *Temporomandibular Joint*

Kartilago *Temporomandibular Joint* (TMJ) memegang peranan penting dalam fungsi TMJ. Kartilago TMJ membantu artikulasi antara kondilus mandibula dengan diskus artikularis dan membantu mengurangi beban yang akan diteruskan ke kondilus mandibula di bawahnya. Kartilago TMJ merupakan tulang rawan jenis fibrokartilago (Kuroda *et al.*, 2009).

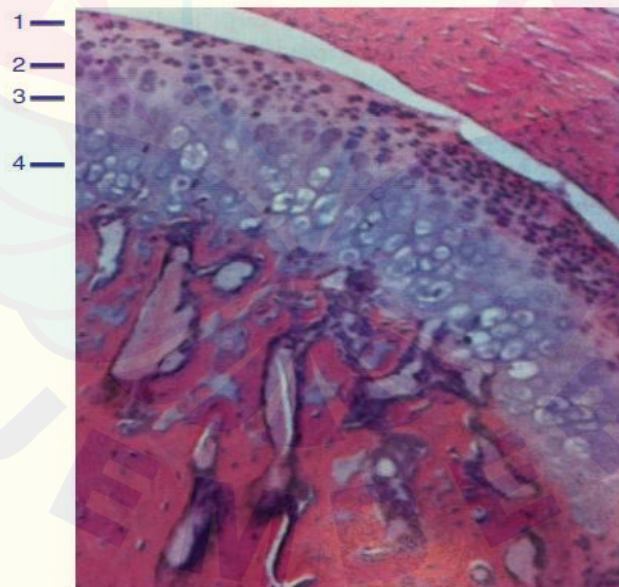
Lapisan kartilago TMJ pada prosesus kondilaris terbagi menjadi 4 zona, yaitu zona artikular, zona proliferasi, zona fibrokartilago, dan zona kartilago terkalsifikasi (*calcified cartilage zone*) (Gambar 2.1). Zona artikular merupakan lapisan paling superfisial dari kartilago TMJ. Zona artikular mampu menghilangkan beban gesekan ketika rahang berfungsi dikarenakan adanya kandungan *superficial zone protein* (SZP). SZP juga terkandung dalam permukaan superfisial diskus. SZP disintesis dan disekresikan pada *synovial fluid* dan berfungsi sebagai pelumasan. Zona artikular pada kartilago TMJ tersusun atas jaringan ikat fibrous padat, berbeda dengan kebanyakan sendi *synovial* yang tersusun atas kartilago hialin. Karakteristik seperti ini menguntungkan bagi TMJ dikarenakan jaringan ikat fibrous padat mampu menahan beban yang lebih besar jika dibandingkan dengan kartilago hialin, sehingga lebih tahan terhadap kerusakan dan memiliki kemampuan yang lebih baik dalam reparasi jaringan (Hand dan Frank, 2014).

Zona kedua merupakan zona proliferasi yang kaya akan sel. Zona proliferasi berisi *mesenchymal stem cell* yang akan berdistribusi secara heterogen sebagai prekursor kondrosit pada zona di bawahnya. Proliferasi dapat terjadi secara alami dikarenakan adanya respon terhadap beban pada permukaan artikular. Protein SOX-9 disekresikan pada zona ini, tetapi tidak terdapat ekspresi untuk kolagen tipe II (Hand dan Frank, 2014).

Zona ketiga merupakan zona fibrokartilago atau disebut dengan zona kondrosit. Karakteristik pada zona ini adalah susunan serat kolagen membentuk berkas kolagen yang tersusun dalam pola menyilang, dan kartilago yang tersusun

acak membentuk jaringan tiga dimensi yang mampu memberikan ketahanan terhadap gaya tekan dan lateral. Pada zona ini, sel kondrosit sudah matur dan memiliki kemampuan untuk berproliferasi. Pada lapisan ini ditemukan ekspresi SOX-9, Indian Hedgehog Protein, kolagen tipe I dan kolagen tipe II (Hand dan Frank, 2014).

Zona keempat merupakan zona kartilago terkalsifikasi atau disebut dengan zona hipertofi. Zona keempat mengandung kondrosit hipertofi di atas lapisan termineralisasi, yang berada di atas daerah subkondral tulang atau disebut dengan zona pembentukan tulang. Ketika kondrosit hipertofi mati, lakuna akan kosong dan digantikan oleh pembuluh darah dan sel osteoprogenitor dari sumsum tulang, selanjutnya osteoblas akan berdiferensiasi dan terjadi deposit tulang pada kerangka kartilago yang ada. Zona ini juga memiliki karakteristik dengan adanya aktifitas remodeling. Aktivitas remodeling dapat terjadi karena matriks ekstraseluler kartilago dapat berfungsi sebagai *scaffold* ketika terjadi pertumbuhan endosteal tulang. Pada zona ini ditemukan ekspresi IndianHedgehog, osteopontin, dan kolagen tipe-X (Hand dan Frank, 2014).



(1) Zona Artikular, (2), Zona Proliferatif, (3) Zona Fibrokartilago, (4) Zona Kartilago Terkalsifikasi

Gambar 2.1 Gambaran histologi kartilago *Temporomandibular Joint* yang tersusun atas 4 zona (Sumber: Ovalley dan Nahirney, 2018)

2.2 Komposisi Kartilago

Kartilago merupakan jaringan yang aneural, alimfatik, dan avaskular. Kartilago mengandung kondrosit dan matriks makromolekul seperti proteoglikan, glukosaminoglikan (GAG), dan kolagen tipe II, IX, serta X. Matriks kartilago memiliki konsistensi seperti gel yang elastis dan kuat. Matriks kartilago tersusun atas 70%-75% air, 15%-25% kolagen, dan 2%-10% proteoglikan. Matriks tersebut berperan dalam fleksibilitas kartilago dan melindungi sendi dari stress mekanik dari gaya tekan, gaya geser dan gaya regangan. Fungsi penahan gaya pada kartilago terjadi akibat adanya sifat viskoelastisitas jaringan serat kolagen dan tekanan osmotik akibat adanya proteoglikan. Proteoglikan memiliki kemampuan untuk mengikat cairan interstisial. Di bawah beban tekan, cairan ini dapat menean untuk menahan beban sesungguhnya terutama pada beban yang besar. versican dan decorin merupakan jenis proteoglikan yang ditemukan pada kartilago TMJ, namun proteoglikan terbanyak yang ditemukan adalah *aggrecan*. *Aggrecan* banyak ditemukan pada zona fibrokartilago dan zona hipertrofi. *Aggrecan* berperan dalam pengaturan tekanan osmotik pada kartilago yang juga berperan dalam ketahanan terhadap beban dan gaya tekan (Berkovitz *et al.*, 2018).

Proteoglikan mengandung inti protein yang terikat dengan GAG. Pada *aggrecan* terdapat rantai polisakarida bermuatan negative yang besar. Oleh karena itu, proteoglikan mampu mengikat air. *Aggrecan* merupakan komponen matriks ekstraseluler yang paling banyak, yang berperan dalam integritas structural dan fungsional kartilago TMJ (Berkovitz *et al.*, 2018).

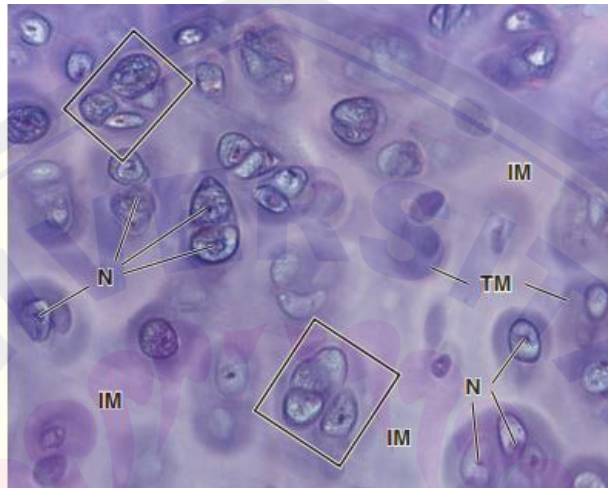
2.3 Kondrogenesis

2.3.1 Sel

a. Kondrosit

Kondrosit dalam kartilago dapat ditemukan singular atau dalam bentuk kelompok yang disebut dengan *isogenous group*. Ketika kondrosit ditemukan dalam bentuk *isogenous group* menunjukkan bahwa kondrosit baru saja mengalami pembelahan. Kondrosit anak hasil pembelahan selanjutnya akan mensekresikan

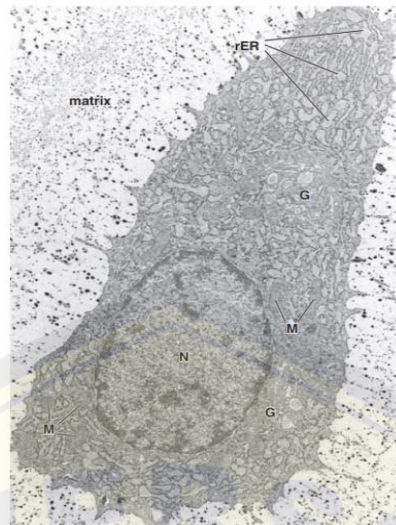
matriks ekstraseluler ke sekitarnya (Gambar 2.2). Matriks yang padat akan memisahkan kondrosit anak dengan kondrosit induk. Kondrosit juga mensekresikan matriks metalloproteinase, enzim yang dapat mendegradasi matriks ekstraseluler kartilago sehingga sel mampu memperluas dan mereposisi dirinya dari *isogenous group* (Ross dan Pawlina, 2016).



N=Matriks; TM= Territorial Matriks; IM=Interterritorial Matriks; Kotak=*Isogenous Group*

Gambar 2.2 Gambaran histologi kondrosit dan matriks (Sumber: Ross dan Pawlina, 2016)

Sitoplasma kondrosit tergantung pada aktivitasnya. Kondrosit yang aktif mensekresikan matriks akan menunjukkan sitoplasma yang basofilik yang mengindikasikan sintesis protein, dan daerah yang jernih menunjukkan Golgi Apparatus yang besar. Kondrosit tidak hanya mensekresikan kolagen tetapi juga glukosaminoglikan dan proteoglikan. Pada kondrosit yang lebih tua dengan aktivitas sel yang rendah Golgi Apparatus terlihat lebih kecil, sitoplasmanya jernih, dan ketika terlihat jelas akan tampak droplet lipid dan simpanan glikogen. Dalam spesimen kondrosit juga dapat menunjukkan distorsi yang dihasilkan akibat penyusutan setelah glikogen dan lipid hilang selama prosesi jaringan. Dalam *transmission electron microscop* (TEM) kondrosit aktif menunjukkan retikulum endoplasma kasar, Golgi Apparatus yang besar, granula sekretori, vesikel, filamen intermediate, mikrotubuli, dan mikrofilamen aktin (Gambar 2.3) (Ross dan Pawlina, 2016).



rER=Retikulum Endoplasma kasar. **G**= Golgi Apparatus. **M**= Mitokondria. **N**=Nukleus

Gambar 2.3 Mikrograf elektron kondrosit muda (Sumber: Ross dan Pawlina, 2016)

2.3.2 Growth Factor

a. Bone Morphogenetic Protein

Bone Morphogenetic Protein (BMP) berperan dalam kondensasi sel kondroprogenitor dan memicu diferensiasi kondrogenik *mesenchymal stem cell* (MSC) baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. BMP juga berperan dalam migrasi MSC menuju ke tempat destruksi untuk menstimulasi penyembuhan kartilago (Green *et al.*, 2015).

BMP-2 dan BMP-7 telah terbukti memiliki kemampuan sebagai faktor penginduksi diferensiasi kondrogenik MSC. BMP berperan dalam migrasi endogenous MSC sehingga dapat memicu proses penyembuhan kartilago. Dorman *et al* (2012) melakukan penelitian untuk mengetahui efek pemberian BMP pada MSC yang belum berdiferensiasi (primitif). 48 jam setelah perlakuan pemberian BMP, MSC menunjukkan perubahan morfologi dan jumlah MSC bertambah. Hal ini menunjukkan bahwa BMP dapat menginduksi proliferasi dan diferensiasi MSC (Le *et al.*, 2020).

Grande dan Smith (2015) melakukan isolasi MSC dari periosteum, kemudian sel ditransfusi gen BMP-7 dan ditransplantasikan ke *full-thickness osteochondral defect*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa MSC yang ditransfusi

dengan BMP memiliki kualitas perbaikan jaringan yang lebih baik jika dibandingkan dengan MSC normal tanpa tranfusi BMP. Hal ini menunjukkan bahwa BMP dapat memiliki potensi dalam terapi perbaikan kartilago (Le *et al.*, 2020).

b. *Transforming Growth Factor- β*

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) merupakan *growth factor* yang paling penting dalam diferensiasi kondrogenik MSC. TGF- β akan berikatan dengan reseptor TGF- β dan mengaktifkan *Smad-dependent signal transduction pathways* pada sel target. Aktivasi jalur pensinyalan tersebut akan mengaktifkan protein Smad2, Smad3, dan Smad 4 yang kemudian ditranslokasikan ke nukleus sel dan berinteraksi dengan *transcription factor SOX-9*. Diferensiasi kondrogenik dapat terjadi akibat aktivasi *transcription factor SOX-9* (Barlian *et al.*, 2020).

Penelitian yang dilakukan oleh Kalpakci *et al* (2011) menunjukkan TGF- β_1 dapat memicu pembentukan matriks ekstraseluler pada kultur fibrokondrosit dan kondrosit. Penelitian *in vivo* yang dilakukan oleh Ying *et al* (2013) menunjukkan bahwa injeksi intra artikular TGF- β_1 dapat meningkatkan sintesis proteoglikan pada kartilago yang terdegradasi dan mencegah kerusakan tulang subkondral pada *osteoarthritis TMJ (TMJOA)* (Wang *et al.*, 2015).

c. *Insulin Growth Factor*

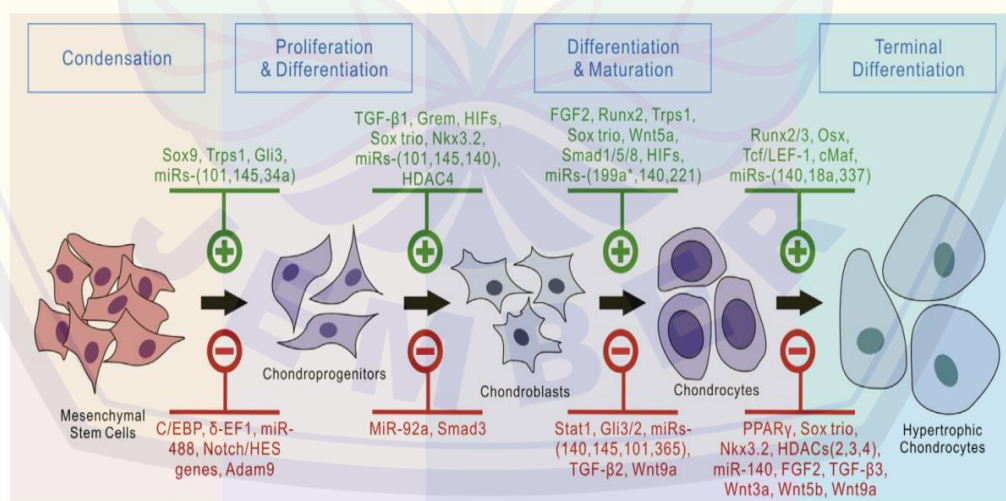
Insulin Growth Factor (IGF) merupakan faktor penginduksi kartilago yang mengatur kemampuan kondrogenik MSC dan dapat memicu produksi matriks ekstraseluler kartilago. IGF-1 merupakan keluarga IGF yang paling sering digunakan dalam terapi kartilago. IGF-1 berperan sebagai mediator dalam homeostasis kartilago dikarenakan dapat menstimulasi sintesis proteoglikan dan memicu proliferasi kondrosit. IGF-1 dapat menginduksi diferensiasi kondrogenik *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell* (BM-*MSC*) dengan meningkatkan produksi glikosaminoglikan (GAG). Transfer gen IGF pada MSC dapat memicu proses diferensiasi kondrogenik. Kandungan GAG dan kolagen tipe II meningkat pada kelompok MSC yang ditransfer gen IGF (Le *et al.*, 2020).

d. *Fibroblast Growth Factor*

Fibroblast Growth Factor (FGF) memiliki beberapa fungsi dalam mengatur MSC untuk perbaikan kerusakan kartilago. FGF dapat meningkatkan proliferasi MSC yang belum berdiferensiasi dan meningkatkan kemampuan kondrogenik MSC secara *in vitro*. FGF-2 diketahui dapat meningkatkan proliferasi MSC dan memicu diferensiasi kondrogenik melalui jalur pensinyalan Wingless (Wnt). FGF dapat memicu differensiasi kondrogenik lebih awal dan memicu kondrogenesis MSC *in vitro* (Le *et al.*, 2020).

2.3.3 Proses Kondrogenesis

Kondrogenesis merupakan proses perkembangan kartilago yang dimulai dengan berkumpulnya *chondroprogenitor mesenchymal stem cells*. Kondrogenesis diatur oleh banyak molekul dan pensinyalan, termasuk ligan ekstraseluler, reseptor nuklear, *transcription factor*, molekul adhesi, *growth factor* dan matriks protein (Gambar 2.4). Lebih lanjut, pertumbuhan dan perkembangan kartilago juga dipengaruhi oleh faktor biomekanik. Faktor biomekanik tidak hanya mempengaruhi bentuk, regenerasi, dan penuaan pada kartilago tetapi juga memodifikasi interaksi antara sel dan matriks ekstraseluler pada kartilago (Ross dan Pawlina, 2016).



Gambar 2.4 Regulator dalam diferensiasi kondrogenik *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) (Sumber: Green *et al.*, 2015)

Pada daerah kepala, kartilago berasal dari perkembangan sel mesenkim atau ektomesenkim yang merupakan turunan dari sel neural crest. Ekspresi faktor transkripsi SOX-9 memicu diferensiasi *chondroprogenitor mesenchymal stem cell* menjadi kondroblas. Kondroblas melakukan pembelahan mitosis dan mensekresikan matriks ekstraseluler kartilago berupa kolagen tipe II, proteoglikan, *aggrecan*, dan glukosaminoglikan. Seiring dengan perkembangan kartilago, kondroblast dikelilingi oleh ekstraseluler matriks yang disekresikannya dan terjebak pada ruang matriks (lakuna) sehingga berubah menjadi kondrosit. Fungsi utama kondrosit adalah untuk menjaga matriks kartilago. Beberapa lakuna terlihat berisi lebih dari 1 kondrosit yang disebut dengan *isogenous group* (Ross dan Pawlina, 2016; Eroschenko, 2013).

Kondrogenesis terjadi melalui dua jalur, yaitu *appositional growth* dan *interstitial growth*. *Appositional growth* merupakan proses pembentukan kartilago baru pada permukaan kartilago yang sudah ada. Sel kartilago baru yang diproduksi selama *appositional growth* merupakan turunan dari bagian dalam periodonsium. Bentuk sel menyerupai fibroblas dan memproduksi kolagen sebagai komponen matriks perikondrium berupa kolagen tipe I. Sel tersebut kemudian akan berdiferensiasi yang diatur oleh ekspresi *transcription factor SOX-9*. Proses diferensiasi mengakibatkan proses sitoplasma menghilang, nukleus sel menjadi bulat, dan sitoplasma menjadi meningkat jumlahnya serta menjadi lebih dominan. Perubahan ini mengakibatkan sel yang awalnya memiliki bentuk seperti fibroblast berdiferensiasi menjadi kondroblas. Kondroblas memiliki fungsi untuk mensekresikan matriks kartilago, termasuk sekresi tipe II kolagen. Matriks baru yang disekresikan oleh kondroblas menambah massa kartilago. Fibroblast baru juga tetap diproduksi secara simultan untuk menjaga populasi sel perikondrium (Ross dan Pawlina, 2016).

Sementara *interstitial growth* merupakan proses pembentukan kartilago baru dalam massa kartilago yang ada. Sel kartilago baru selama proses *interstitial growth* berasal dari pembelahan kondrosit dalam lakuna. Hal ini dapat terjadi dikarenakan kondrosit masih mempertahankan kemampuannya untuk membelah dan matriks di sekitarnya masih dapat diregangkan sehingga masih dapat terjadi

proses sekretori. Ketika kondrosit selesai membelah, sel kondrosit anak dan sel kondrosit induk menempati lakuna yang sama. Ketika sel kondrosit anak berhasil mensekresikan matriks sendiri, maka akan menciptakan jarak antara sel kondrosit anak dengan sel kondrosit induk sehingga sel kondrosit anak dapat menempati lakunanya sendiri. Sel kondrosit akan terus mensekresikan matriks sehingga matriks-matriks ini akan memisahkan antar sel kondrosit (Ross dan Pawlina, 2016).

Diferensiasi kondrogenik terjadi apabila sel berdiferensiasi menjadi kondroblas. Sekresi matriks menunjukkan sel telah berdiferensiasi kondrogenik menjadi kondroblas. Sekresi matriks dapat dilihat melalui hasil perwarnaan *alcian blue* terlihat berwarna biru yang menunjukkan sintesis glukosaminoglikan yang merupakan salah satu matriks yang disekresikan oleh kondroblas (Tanthaisong *et al.*, 2017).

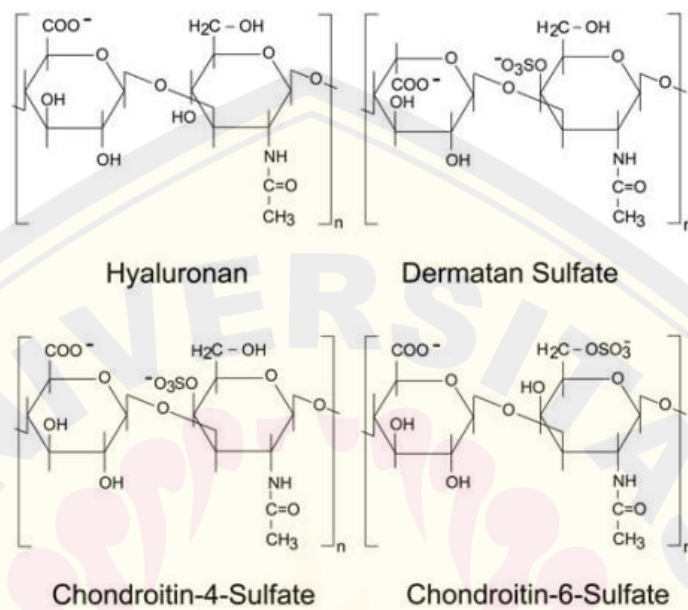
Diferensiasi kondrogenik dapat diidentifikasi melalui metode *in vitro* dengan kultur *mesenchymal stem cell* (MSC) pada *culture dish* sesuai dengan prosedur kultur yang diinduksi oleh *growth factor*. Diferensiasi kondrogenik melalui proses kondrogenesis dapat ditandai dengan adanya akumulasi glikosaminoglikan yang dihasilkan oleh MSC yang telah beridiferensiasi menjadi kondroblas (Somoza *et al.*, 2014).

2.4 Glikosaminoglikan

Glikosaminoglikan (GAG) merupakan mukopolisakarida penyusun tulang rawan dan tendon. Senyawa GAG memiliki karakteristik tipis, kenyal, kental, berupa gel, dengan elastisitas yang tinggi. GAG memiliki unit penghubung β 1-4 O-glikosidik dan β 1-3 O-glikosidik (Wulandari dan Hendarmin, 2010).

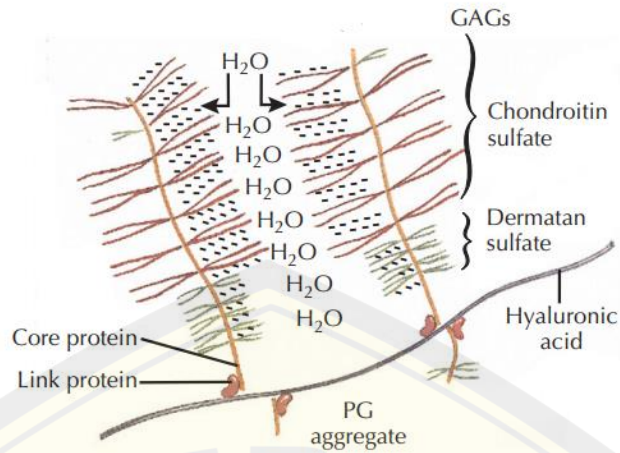
Glikosaminoglikan (GAG) merupakan rantai molekul linear, bermuatan tinggi karbohidrat yang tersusun atas unit disakarida yang berulang. Berdasarkan struktur dan kandungan sulfatnya, GAG dibedakan menjadi *sulfated GAG* dan *non-sulfated GAG*. *Sulfated GAG* dibedakan menjadi tiga jenis, antara lain kondroitin sulfat, dermatan sulfat, dan keratan sulfat. Sementara *non-sulfated GAG* hanya tersusun dari satu jenis GAG yaitu *hyaluronic acid* (Gambar 2.5). GAG berperan

penting dalam homeostasis kartilago. GAG bukan hanya memberikan ketahanan mekanikal terhadap beban tekan, tetapi juga berperan dalam mengatur beberapa jalur pensinyalan proses biologis seperti adhesi, pertumbuhan, dan diferensiasi sel (Silva *et al.*, 2020).



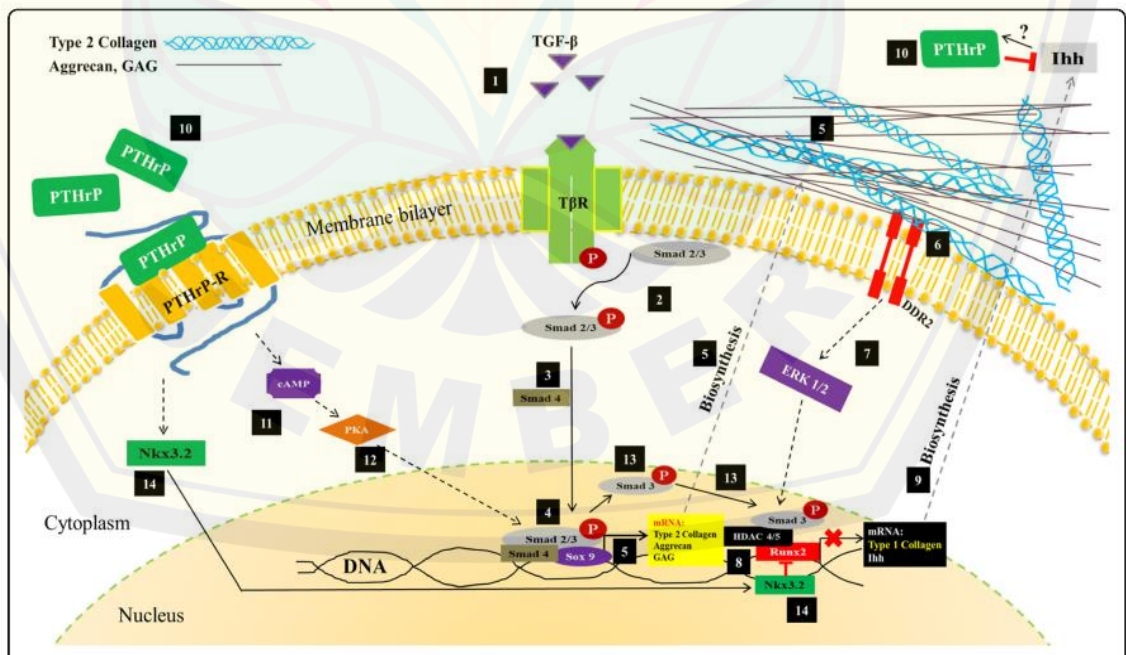
Gambar 2.5 Struktur kimia 4 jenis Glikosaminoglikan (Sumber: Pichert *et al.*, 2012)

Glikosaminoglikan (GAG) merupakan salah satu penyusun matriks ekstraseluler kartilago. Kondroitin sulfat dan keratan sulfat pada matriks kartilago akan berikatan dengan inti protein membentuk monomer preteoglikan. Kondroitin sulfat dan keratan sulfat pada inti protein proteoglikan juga berikatan dengan *hyaluronic acid* melalui N-terminus membentuk *aggrecan*. Setiap molekul *aggrecan* mengandung 100 rantai kondroitin sulfat dan 60 molekul keratan sulfat. Dikarenakan adanya kandungan *sulfated GAG* pada rantai *aggrecan* mengakibatkan *aggrecan* memiliki muatan negatif yang besar dengan afinitas terhadap molekul air (Gambar 2.6). *Aggrecan* yang bermuatan tinggi, berikatan dengan fibril kolagen melalui interaksi elektrostatis dan glikoprotein multiadhesif (Ovalley dan Nahirney, 2014; Mescher, 2018; Ross dan Pawlina, 2016).



Gambar 2.6 Rantai molekul *aggrecan* (Sumber: Ovalley dan Nahirney, 2014)

TGF- β akan berikatan dengan TGF- β reseptor. Ikatan ligan antara TGF- β dan TGF- β reseptor akan menginisiasi fosforilasi protein smad 2/3. Protein smad 2/3 akan berinteraksi dengan protein smad 4 dan ditranslokasikan ke nukleus untuk ekspresi gen yang diatur oleh *the sry-related HMG box (Sox 9) transcription factor*. *Sox 9 transcription factor* akan menginduksi ekspresi gen kolagen tipe II, *aggrecan*, dan GAG. Gen tersebut selanjutnya akan ditranslasikan dan disekresikan menjadi protein ekstraseluler matriks kondrosit (Gambar 2.7) (Rosati *et al.*, 2019).

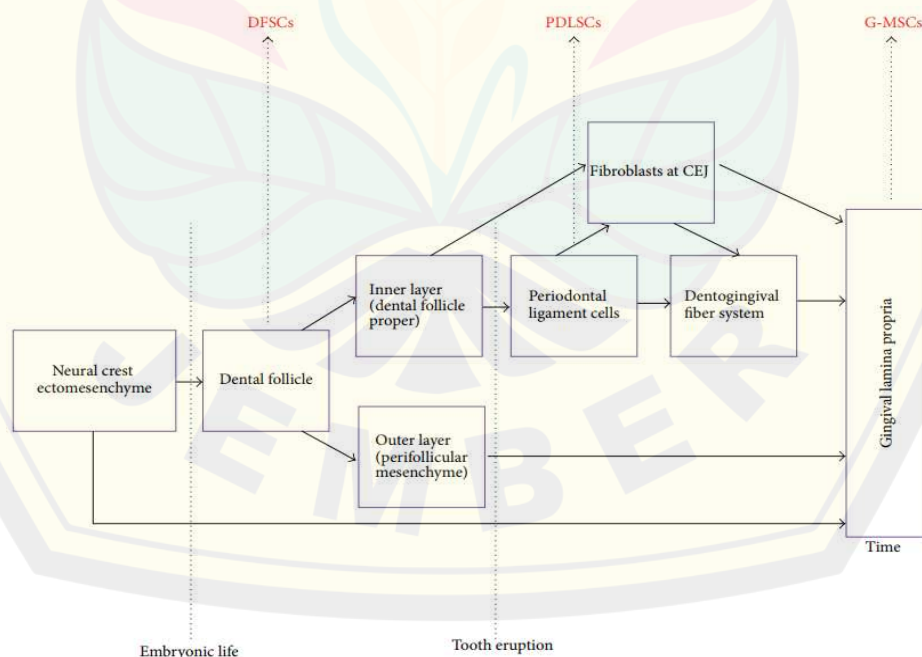


Gambar 2.7 Jalur sintesis glikosaminoglikan (Sumber: Rosati *et al.*, 2019)

2.5 Gingival Mesenchymal Stem Cell

Regenerasi jaringan dan terapi regeneratif sedang dikembangkan pada penelitian masa kini. Sumber untuk pengambilan sel punca/sel progenitor/sel regeneratif menjadi fokus perhatian beberapa tahun terakhir. *Mesenchymal stem cell* (MSC) memiliki kemampuan regenerasi yang sesuai untuk rekayasa jaringan. MSC merupakan sel stromal yang memiliki kemampuan adipogenik, kondrogenik, dan osteogenik. MSC juga memiliki kemampuan proliferasi yang tinggi. MSC dapat diisolasi dari berbagai jaringan seperti jaringan adiposa, sumsum tulang, sendi dan otot, dan darah. Kemudian penelitian terus berkembang untuk mencari sumber MSC hingga bagian mulut juga dieksplorasi untuk mendapatkan MSC dengan kemampuan diferensiasi yang berbeda (Nugraha *et al.*, 2018).

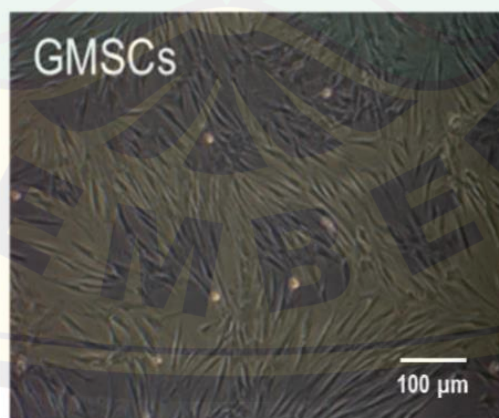
MSC dapat diisolasi dari berbagai jaringan rongga mulut termasuk sel progenitor folikel dental (PC), stem sel pulpa (DPSC) stem sel yang berasal dari gigi sulung yang dicabut, stem sel ligamen periodontal, stem sel dari papilla apeks dan yang terbaru merupakan MSC dari jaringan gingiva yang dikenal dengan *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC). GMSC merupakan MSC yang diisolasi dari lamina propia gingiva (Venkatesh *et al.*, 2017).



Gambar 2.8 Skema *mesenchymal stem cell* rongga mulut yang berkontribusi pada perkembangan lamina propia gingiva (Sumber: El Sayed *et al.*, 2020)

Gingiva merupakan bagian dari jaringan pendukung gigi. Gingiva memiliki karakteristik unik yaitu kemampuan penutupan luka dan perbaikan jaringan yang cepat setelah luka atau proses ekstraksi tanpa meninggalkan sikatrik. Gingiva mudah untuk diisolasi dan seringkali direseksi selama proses pembedahan seperti pemanjangan mahkota gigi, gingivektomi, dan berbagai prosedur bedah periodontal lainnya dengan ketidaknyamanan pasien minimal. Oleh karena itu gingiva dijadikan sebagai sumber bagi MSC yang disebut dengan *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC). GMSC memiliki kemampuan sebagai immunomodulator yang dapat memodulasi sel imun dan memiliki kemampuan regeneratif. GMSC berbeda dari MSC lainnya dikarenakan GMSC cukup melimpah, mudah untuk diisolasi dari lamina propia gingiva dengan teknik invasif yang minimal sehingga tidak menyakiti pasien. Lamina propia gingiva kemudian dicacah dan dilakukan isolasi GMSC dari jaringan tersebut (Nugraha *et al.*, 2018).

GMSC memiliki berbagai karakteristik yang sama seperti MSC yang diisolasi dari sumsum tulang (BM-MS), yaitu secara *in-vitro* memiliki kemampuan untuk berproliferasi dan menempel pada media kultur dengan morfologi seperti jaringan fibroblas (Gambar 2.9), memiliki kemampuan membentuk koloni, dan kemampuan berdiferensiasi menjadi berbagai sel seperti mesodermal (adiposity dan osteosit), endodermal dan neuroectodermal serta mengekspresikan marker untuk MSC. GMSC secara *in-vivo* diketahui memiliki kemampuan untuk memperbaiki diri dan berdiferensiasi (Venkatesh *et al.*, 2017).



Gambar 2.9 Morfologi *Gingival Mesenchymal Stem Cell* dengan perbesaran 20x pada mikroskop *inverted* (Sumber: Gao *et al.*, 2014)

GMSC jika dibandingkan dengan BM-MSC yang merupakan sumber utama dalam terapi sel memiliki beberapa keunggulan diantaranya, mudah untuk diisolasi, homogen dan uniform, dan dapat berproliferasi dengan cepat tanpa adanya *growth factor*. GMSC juga menunjukkan fenotip yang stabil, mampu menjaga kariotipe normal dan aktivitas telomerase selama waktu kultur yang panjang, tidak tumorigenik, dan dapat menghasilkan jumlah sel yang banyak dengan biopsi kecil pada lamina propia gingiva (Venkatesh *et al.*, 2017).

GMSC dapat memenuhi syarat sebagai MSC apabila memiliki beberapa karakter MSC antara lain, (i) dapat menempel pada media kultur, (ii) memiliki kemampuan osteogenik, kondrogenik, dan adipogenik, dan (iii) mampu mengekspresikan beberapa *marker* (positif CD73, CD90, dan CD105) serta tidak mengekspresikan *marker* HSC (CD 34 dan 45) (Nugraha *et al.*, 2108). Hasil penelitian Kim *et al.*, 2021 menunjukkan bahwa sel kultur GMSC memiliki morfologi bentuk sel spindle seperti fibroblast, kemampuan pembentukan koloni, dan meleka pada media kultur. Selain itu juga terdeteksi bahwa GMSC memiliki hasil positif untuk *marker* MSC yaitu CD44, CD73, CD90, dan CD105, serta hasil negatif untuk ekspresi *marker* HSC yaitu CD34 dan CD45 dengan menggunakan imunofluoresen (Tabel 2.1).

Tabel 2.1 Isolasi dan karakterisasi *Gingival Mesenchymal Stem Cell*

Isolation Method	Cell Surface Marker	Multipotency
Enzymatic	CD73, CD90, CD105, SSEA4, STRO-1, CD146	Osteocytes, adipocytes, neural cells, endothelial cells
Enzymatic	CD29, CD44, CD90, CD73	Osteocytes, adipocytes, chondrocytes
Explant	CD29, CD44, CD90, CD73, CD105, STRO-1	Osteocytes, adipocytes, chondrocytes
Explant	CD13, CD44, CD73, CD90, CD105	Osteocytes, adipocytes, chondrocytes
Enzymatic	CD29, CD44, CD90, CD105, CD146, STRO-1	Osteocytes, adipocytes, chondrocytes
Enzymatic	CD29, CD90, CD105, STRO-1	Osteocytes, adipocytes, chondrocytes
Enzymatic	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166	Osteocytes, adipocytes, chondrocytes
Enzymatic	CD29, CD90, CD105, CD146, STRO-1	Osteocytes, adipocytes, chondrocytes
Enzymatic	CD29, CD90, CD105, CD146, STRO-1	Osteocytes, adipocytes, odontogenic

(Sumber: Kim *et al.*, 2021)

2.6 Medium Terkondisi

Mesenchymal stem cell (MSC) berperan langsung dalam berbagai aktivitas seluler di dalam tubuh. Selain itu MSC memiliki kemampuan dalam perbaikan dan regenerasi jaringan secara tidak langsung melalui efek parakrin. MSC memiliki kemampuan untuk mensekresikan beberapa faktor dan molekul terlarut atau vesikel ekstraseluler yang dapat membawa berbagai senyawa biologis penting ke lingkungan sel target. Beberapa faktor tersebut termasuk di dalamnya merupakan molekul yang berperan dalam proteksi, perbaikan, regenerasi, imunomodulasi, proliferasi, komunikasi sel dan berbagai fungsi penting lainnya (Maia *et al.*, 2017).

MSC dapat mengeluarkan sekretom yang berupa molekul ke lingkungan sekitarnya dapat mempengaruhi homeostatis jaringan dan regenerasi jaringan, sekretom dapat menginduksi migrasi sel, proliferasi, imunomodulasi, dan regenerasi jaringan. Dengan stimulasi, MSC dapat mensekresikan sekretom dan faktor tropik pada media kultur yang disebut dengan medium terkondisi dari *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC). Sekretom MSC mengandung lipid, protein, asam nukleat, *growth factor*, hormone, dan vesikel ekstraseluler (VE) (El Moshy *et al.*, 2020).

Sekretom yang disekresikan oleh MSC terdiri dari berbagai *growth factor*, antara lain *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epidermal growth factor*, *insulin-like growth factor I and II* (IGF-I, IGF-II), *hepatocyte growth factor* (HGF), *fibroblast growth factor 2/basic fibroblast growth factor* (FGF-2/bFGF), *keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7* (KGF/FGF-7), *platelet-derived endothelial cell growth factor*, *heparin binding epidermal growth factor*, *neural growth factor* (NGF), and *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Selain itu sekretom MSC juga mengeluarkan sitokin anti-inflamasi seperti *transforming growth factor- (TGF-) β 1* dan *interleukin*, diantaranya; *IL-6*, *IL-10*, *IL-27*, *IL-17*, and *IL-13*, and *proinflammatory cytokines including IL-8/CXCL-8*, *IL-9*, and *IL-1 β* . Selain itu juga terdapat *granulocyte colonystimulating factor* (GCSF), *granulocyte macrophage CSF* (GM-CSF), and *prostaglandin E2* (PGE2) (El Moshy *et al.*, 2020).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa medium terkondisi dari medium terkondisi dari *human Mesenchymal Stem Cell* (hMSC) dapat memicu jalur diferensiasi mesodermal yang terdiri atas diferensiasi osteogenik dan kondrogenik. Selama kultur *in vitro*, MSC mengeluarkan berbagai *growth factors* dan sitokin seperti BMP-4 dan TGF- β 1 yang terakumulasi dalam media kulturnya. BMP-4 dan TGF- β 1 dilaporkan dapat menstimulasi jalur pensinyalan diferensiasi mesodermal. Pensinyalan BMP-4 dibutuhkan untuk pemisahan ectodermal dan mesodermal, dan induksi diferensiasi mesodermal *in vitro*. TGF- β 1 diketahui dapat menghambat diferensiasi ectodermal dan endodermal, dan mampu meningkatkan diferensiasi mesodermal ke arah diferensiasi osteogenik dan kondrogenik (Le *et al.*, 2014).

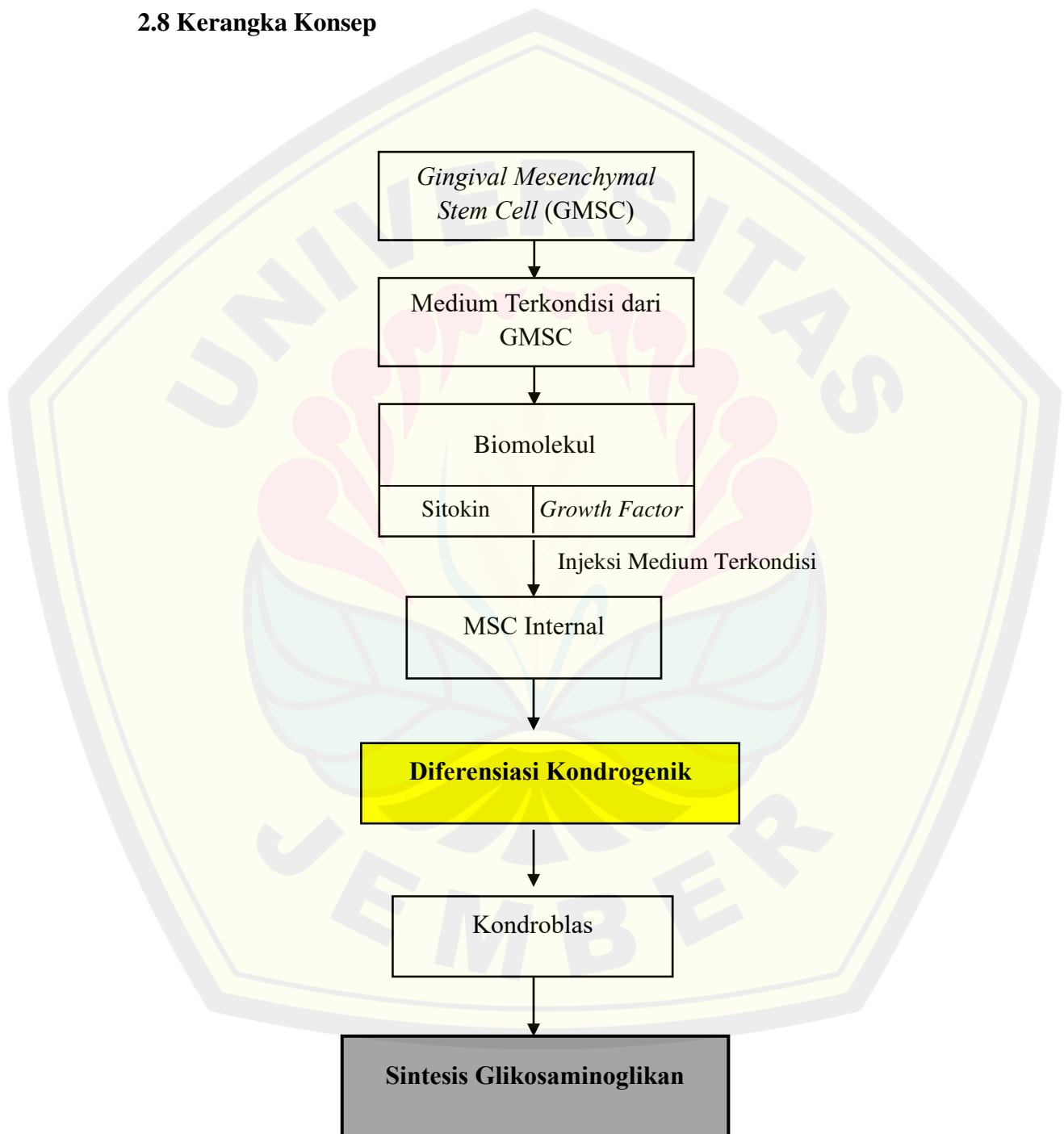
2.7 Software ImageJ

ImageJ merupakan suatu *platform* yang diciptakan oleh Wayne Rasband dari *National Institutes of Health* (NIH) pada tahun 1997. *ImageJ* banyak digunakan dalam analisa gambar untuk kepentingan ilmu biologi dan fisika. *ImageJ* dipilih karena mudah digunakan, tersedia dalam berbagai bahasa, dan memiliki berbagai tampilan menu yang akan memudahkan penggunaannya. *ImageJ* dapat digunakan oleh *non-programmer*, progamer amatir bahkan progamer professional (Rueden *et al.*, 2017).

ImageJ mudah diunduh dan diinstal ke komputer atau laptop dengan menjalankan paket instalasi yang tersedia. *ImageJ* tersedia dalam versi 32-bit dan 64-bit. Pemilihan versi dalam instalasi *ImageJ* didasarkan pada perangkat *windows* yang terpasang pada laptop atau komputer. Dalam analisa gambar dengan mikroskop, gambar terlebih dahulu diberi *scale bar*. Pemberian *scale bar* diawali dengan kalibrasi gambar dari piksel ke μm . Kalibrasi dilakukan dengan membuka gambar yang akan dianalisa kemudian pilih *image > properties >* lalu isikan kolom *unit length*, *pixel width*, dan *pixel height* sesuai dengan perbesaran gambar mikroskop yang diambil. Selanjutnya set skala yang dipilih dengan klik *analyze > set scale >* sesuaikan dengan acuan yang diinginkan. Tahapan berikutnya menabahkan *scale bar* dengan klik *analyze > tools > scale bar >* isikan ukuran *scale bar* yang

diinginkan. Setelah melakukan kalibrasi selanjutnya gambar dapat dianalisa sesuai kebutuhan dengan berbagai menu yang ada pada *software ImageJ* (Kurniawan *et al.*, 2011)

2.8 Kerangka Konsep



2.9 Deskripsi Kerangka Konsep

Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) merupakan *mesenchymal stem cell* (MSC) yang dapat diisolasi dari lamina propia gingiva. GMSC dapat dimanfaatkan sebagai agen terapi dalam regenerasi dan perbaikan jaringan. GMSC dapat dimanfaatkan sebagai agen *cell free-therapy* melalui medium terkondisi dari GMSC. Medium terkondisi dari GMSC merupakan biomolekul yang disekresikan oleh GMSC ke lingkungan kulturnya yang mengandung berbagai *growth factor* yang bermanfaat dalam perlindungan dan perbaikan. *Growth factor* eksternal yang didapat dari kultur medium terkondisi secara *in vitro* dapat dimanfaatkan sebagai terapi melalui injeksi medium terkondisi ke daerah kerusakan kartilago. *Growth factor* eksternal yang diinjeksikan selanjutnya dapat menginduksi *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) internal yang berada di sekitar daerah kerusakan kartilago untuk migrasi dan berdiferensiasi kondrogenik menjadi kondroblas yang ditandai dengan sintesis glikosaminoglikan sebagai salah satu matriks ekstraseluler kartilago.

2.10 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah medium terkondisi dari *Human Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) mampu menginduksi sintesis glikosaminoglikan pada model kondrogenik *in vitro*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitiannya secara *post-test control group desain*.

3.2 Tempat Penelitian dan Waktu Penelitian

3.2.1 Tempat Penelitian

- a. Kultur *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) dilakukan di Laboratorium Kedokteran dan Biomolekular *Center Development of Advanced Science dan Technology* (CDAST)
- b. Preparasi dan pembuatan medium terkondisi dari *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) dilakukan di Laboratorium Kedokteran dan Biomolekular *Center Development of Advanced Science dan Technology* (CDAST).
- c. Kultur kondrogenik dalam medium terkondisi dari *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC) dilakukan di Laboratorium Kedokteran dan Biomolekular *Center Development of Advanced Science dan Technology* (CDAST).
- d. Validasi akumulasi sintesis glikosaminoglikan dengan pewarnaan *alcian blue* dilakukan di Laboratorium Kedokteran dan Biomolekular *Center Development of Advanced Science dan Technology* (CDAST).

3.2.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan November 2021- Januari 2022.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah media kondrogenik dari medium terkondisi *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC)

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah akumulasi sintesis glikosaminoglikan.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian adalah jenis GMSC, jumlah GMSC, media kultur standar, dan prosedur penelitian.

3.4 Definisi Operasional

3.4.1 *Gingival Mesenchymal Stem Cell*

Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) diperoleh dari Laboratorium Kedokteran dan Biomolekuler CDAST Universitas Jember yang telah terkarakterisasi sebagai MSC karena memenuhi karakter MSC antara lain; menempel pada *culture dish*, mampu berdiferensiasi pada jalur osteogenik, kondrogenik, dan adipogenik serta mampu mengekspresikan marker positif untuk MSC (CD146, CD105, dan CD90) dan tidak mengekspresikan marker HSC (CD34 dan CD45). Sel yang digunakan terkarakterisasi sebagai sel pasase 4 (GP4).

3.4.2 *Medium Terkondisi dari Gingival Mesenchymal Stem Cell*

Medium terkondisi dari Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) merupakan medium spesifik hasil sekresi GMSC ke lingkungan kulturnya. Medium terkondisi dari GMSC diperoleh dengan kultur GMSC pada media dengan DMEM+FBS tanpa *Penicilin-Streptomycin*, kemudian setelah sel mencapai konfluen 80-90% media kultur diambil dan dimasukkan ke dalam *conical tube*. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000xg selama 10 menit dan difilter dengan filter 0,22 µm.

3.4.3 Medium Kondrogenik Standar (*Oricell™ Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium*)

Medium Kondrogenik Standar (*Oricell™ Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium*) merupakan medium diferensiasi kondrogenik standar pabrikan yang digunakan dalam penginduksi diferensiasi kondrogenik secara *in vitro*.

3.4.4 Glikosaminoglikan pada Model Kondrogenik (Kondrogenesis)

Glikosaminoglikan merupakan material matriks ekstraseluler yang disekresikan oleh GMSC yang terwarnai biru dengan pewarnaan *Alcian Blue* pada hari ke-7, 14, 21, dan 28. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop *inverted* (EVOS XL Core) pada perbesaran 10x dan 20x. Hasil pengamatan dilakukan pengukuran intensitas penyerapan warna *alcian blue* dengan *color histogram* pada aplikasi *ImageJ*.

3.5 Kelompok Penelitian

Pada penelitian ini, terdapat dua kelompok perlakuan yaitu

Kelompok Kontrol	Kelompok Perlakuan
<i>Gingival Mesenchymal Stem Cell</i> (GMSC) yang dikultur dalam <i>flat-bottom 24-well plate</i> dengan konsentrasi sel 2×10^4 sel dengan diberi 500 μ l medium kondrogenik standar (<i>Oricell™ Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium</i>) yang berisi <i>Mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation basal medium</i> , <i>dexamethasone</i> , <i>ascorbate</i> , <i>ITS+suplemen</i> , <i>sodium pyruvate</i> , <i>proline</i> , dan TGF- β .	<i>Gingival Mesenchymal Stem Cell</i> (GMSC) yang dikultur dalam <i>flat-bottom 24-well plate</i> dengan konsentrasi sel 2×10^4 sel dengan diberi 500 μ l medium terkondisi dari GMSC (DMEM+FBS) yang ditambahkan dengan 2mM L-Glutamin, 0,2 mM <i>ascorbic acid-2 phosphate</i> , dan 10^{-7} M <i>dexamethasone</i> sebagai bahan penginduksi diferensiasi kondrogenik yang juga terkandung dalam medium kondrogenik standar.

3.6 Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- 10 cm *tissue culture dish*
- *Centrifuge (Thermo Scientific)*
- *Yellow Tip 200 µl (Vertex)*
- *Blue tip 1000 µl (Vertex)*
- Mikropipet 10 µl (Vertex)
- *Conical tube 15 ml*
- Inkubator (*Thermo Scientific*)
- *Laminar Flow (1300 Series A2)*
- Bunsen dan Spirtus
- *Autoclave (Thermo Scientific)*
- Mikroskop (EVOS XL Core)
- *Conical tube 50 ml*
- Filter 0,22 µm (TRP)
- *flat-bottom 24-well plate*

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- 0,25 % Trypsin-EDTA (Gibco)
- 10% *Fetal Bovine Serum (FBS)*
- *Penicilin (Gibco)*
- *Streptomycin (Gibco)*
- Media basal *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* yang mengandung :
 - Mineral (Kalsium, kalium, dan magnesium)
 - *D-Glucose,*
 - *L-Glutamine,*
 - Sodium Piruvat (Gibco)

- 2mM L-Glutamin
- 0,2 mM *ascorbic acid-2 phosphate*
- 10^{-7} M *dexamethasone*
- *phosphate-buffered saline* (PBS)
- *Alcian Blue* (*OricellTM Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium*)
- Medium kondrogenik standar (*OricellTM Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium*)
- *Aquadest Steryl*
- *Trypan-Blue* (Gibco)

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Kultur *Gingival Mesenchymal Stem Cell*

Gingival Mesenchymal Stem Cell diperoleh dari Laboratorium Kedokteran dan Biomelokeluar CDAST Universitas Jember yang telah terkarakterisasi sebagai sebagai MSC pasase 4 (GP4). Sel kemudian di kultur dalam media DMEM yang ditambahkan dengan *fetal bovine serum* (FBS 10%) dan 1% *Penicilin-Streptomycin*. Kemudian sel diinkubasi dalam 5% CO₂ pada 37°C. Kultur sel dilakukan pada 10 cm *tissue culture dish* (Nugraha *et al.*, 2021; Kusumawardani *et al.*, 2021; Rosadi *et al.*, 2020).

3.7.2 Preparasi dan Pembuatan Medium Terkondisi dari *Gingival Mesenchymal Stem Cell*

Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) yang telah dikultur hingga mencapai konfluensi 80-90% dibuang media kulturnya. Kemudian dilakukan pencucian dengan *phosphate-buffered saline* (PBS). Pencucian dengan PBS dilakukan sebanyak 5 kali dengan masing-masing 5 menit. Selanjutnya sel diberi media kultur baru berupa media basal DMEM dengan tambahan FBS tanpa *Penicilin-Streptomycin*. Sel kemudian dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi selama 24 jam dalam 5% CO₂ pada 37°C. Kemudian media diambil

dengan menggunakan tip biru yang steril. Media dikumpulkan dalam *conical tube*. *Conical tube* yang telah berisi media dari GMSC di sentrifugasi 3000xg selama 10 menit, dan disaring dengan filter 0,22 μm untuk mendapatkan *Medium terkondisi* (CM) (Sagaradze *et al.*, 2019).

3.7.3 Kultur Kondrogenik *Gingival Mesenchymal Stem Cell*

GMSC (*Gingival Mesenchymal Stem Cell*) dikultur dalam *flat-bottom 24-well plate* dengan 500 μl media kultur dengan masing masing *well* berisi sel dengan konsentrasi 2×10^4 sel. Sel diinkubasi hingga mencapai konfluensi sebesar 80%. Media kultur diganti dengan media induksi berupa medium terkondisi dari GMSC (DMEM+FBS) yang ditambahkan dengan bahan penginduksi berupa 2mM L-Glutamin, 0,2 mM *ascorbic acid-2 phosphate*, dan 10^{-7} M *dexamethasone* sebagai kelompok perlakuan dan media kondrogenik standar (*OricellTM Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium*) yang berisi *mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation basal medium*, *dexamethasone*, *ascorbate*, *ITS+suplemen*, *sodium pyruvate*, *proline*, dan TGF- β sebagai kelompok kontrol. Media induksi diberikan sebesar 500 μl pada masing-masing *well*. Sel diinkubasi dalam inkubator dalam 5% CO_2 pada 37°C. Media induksi diganti setiap 2 hari sekali. Dilakukan pengamatan proses diferensiasi kondrogenik pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 (Thantaisong *et al.*, 2017).

3.7.4 Validasi Sintesis Glikosaminoglikan

Setelah hari ke 7, 14, 21, dan 28 dilakukan pengamatan dan pewarnaan. Media induksi diambil dari *well* dengan tip biru. Sel difiksasi dengan 4% *paraformaldehyde* (PFA) pada temperatur ruang selama 30 menit. Setelah 30 menit, sel dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan pewarnaan *Alcian Blue* dengan cara memberikan *alcian blue* sebanyak 200 μl tiap *well* kemudian didiamkan selama 30 menit. Setelah 30 menit dilakukan pencucian dengan *aquadest steril* selama 2 menit. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop inverted (Evos XL Core) dengan perbesaran 100x dan 200x. Pengamatan yang dilakukan merupakan pengamatan kuantitatif dan kualitatif. Pengamatan kualitatif

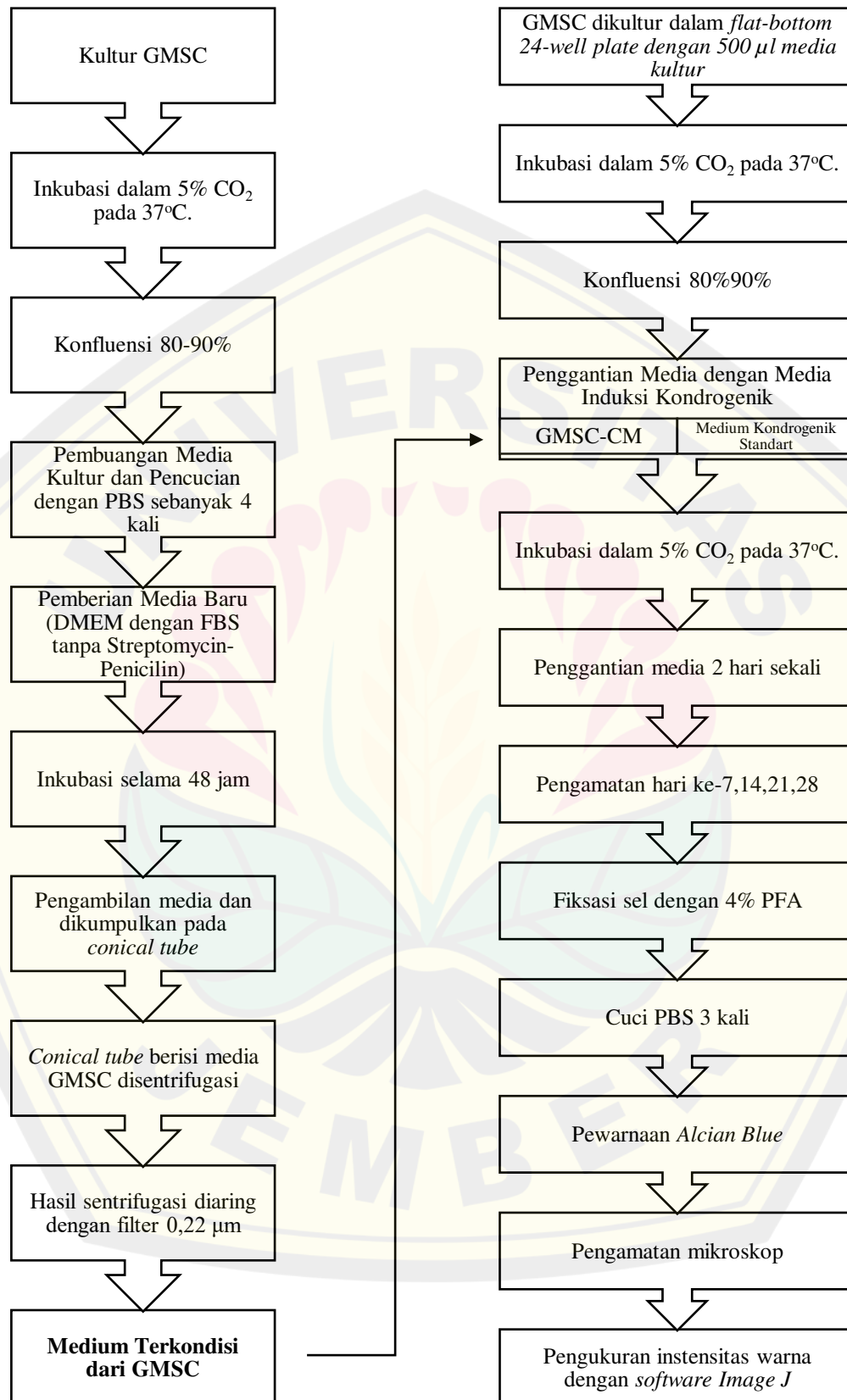
dilakukan untuk melihat warna biru dan banyaknya bagian yang terwarnai biru saat pewarnaan *alcian blue* untuk membandingkan sintesis glikosaminoglikan pada hari ke-7,14, 21, dan 28. Warna biru menunjukkan sintesis glikosaminoglikan (GAG) yang disekresikan oleh GMSC sebagai parameter adanya diferensiasi kondrogenik *mesenchymal stem cell* (MSC). *Alcian blue* disebut sebagai pewarna kationik phthalosianin yang sering digunakan dalam pewarnaan asam mukopolisakarida atau glikosaminoglikan. *Alcian blue* memiliki muatan positif dalam molekulnya yang berasal dari gugus tetrametilisothiuronium dan mampu berinteraksi secara elektrostatis dengan muatan negatif makromolekul melalui ikatan *reversible* dengan GAG (Nugroho dan Maeyama, 2011; Thantaisong *et al.*, 2017).

3.7.5 Pengukuran Intensitas Penyerapan Warna *Alcian Blue* dan Luas Daerah dengan *Software ImageJ*

Intensitas penyerapan warna *alcian blue* diukur menggunakan *software Image J* (Versi 1.53k, USA). Hasil foto mikroskop pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dikalibrasi ukuran piksel gambar menjadi μm . Kalibrasi dilakukan dengan membuka gambar yang akan dianalisa kemudian pilih *image > properties >* lalu isikan kolom *unit length, pixel width, dan pixel height* sesuai dengan perbesaran gambar mikroskop yang diambil. Selanjutnya set skala yang dipilih dengan klik *analyze>set scale*. Selanjutnya ubah gambar menjadi RGB *color* dengan cara klik *Analyze > Type > RGB Color*. Gambar diukur intensitas penyerapan warna biru *alcian blue* dengan cara klik *Analyze > Tools > Color Histogram*. Hasil intensitas penyerapan warna biru akan terlihat.

Pengukuran luas daerah akumulasi glikosaminoglikan dilakukan dengan *Image> Adjust > Color Treshold*. Pada kotak *color space* pilih RGB. Kemudian atur *Red* dan *Green* menjadi 0. Lalu pilih daerah yang terwarnai merah. Selanjutnya klik *Measure* dan akan muncul area (Ross, 2007; Kurniawan *et al.*, 2011; Hartig, 2013).

3.8 Alur Penelitian



3.9 Analisis Data

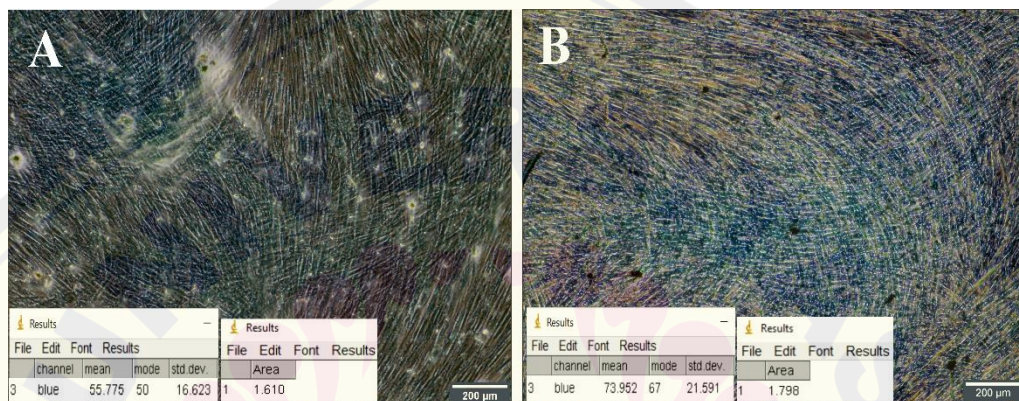
Data dianalisis dan ditampilkan dalam bentuk gambar dan grafik. Analisis statistik dilakukan dengan *SPSS 26.0 software* yang diawali dengan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Jika data berdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) data dianalisis dengan *one-way analysis of variance (ANOVA)* untuk melihat adanya perbedaan pada lebih dari dua kelompok sampel. Jika terdapat perbedaan ($p < 0,05$) selanjutnya dilakukan uji beda lanjutan yaitu *Least Significance Difference (LSD)* untuk melihat pada pasangan kelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Jika data tidak berdistribusi normal dan/atau tidak homogen selanjutnya dilakukan uji non parametrik dengan *Kruskal Wallis*. Jika terdapat perbedaan ($p < 0,05$) dilanjutkan dengan uji beda lanjutan yaitu *Mann-Whitney* untuk melihat pasangan kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan signifikan (Hamid *et al.*, 2019).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian dan Analisis Data

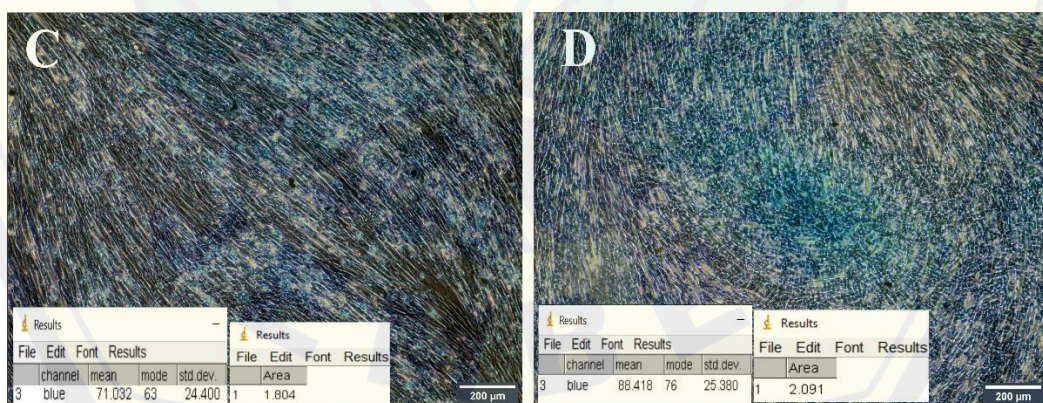
Hasil pengamatan dan pewarnan akumulasi glikosaminoglikan pada hari ke-7, 14, 21, dan 28 ditampilkan dalam Gambar 4.1 hingga 4.4.

Pengamatan Hari Ke-7



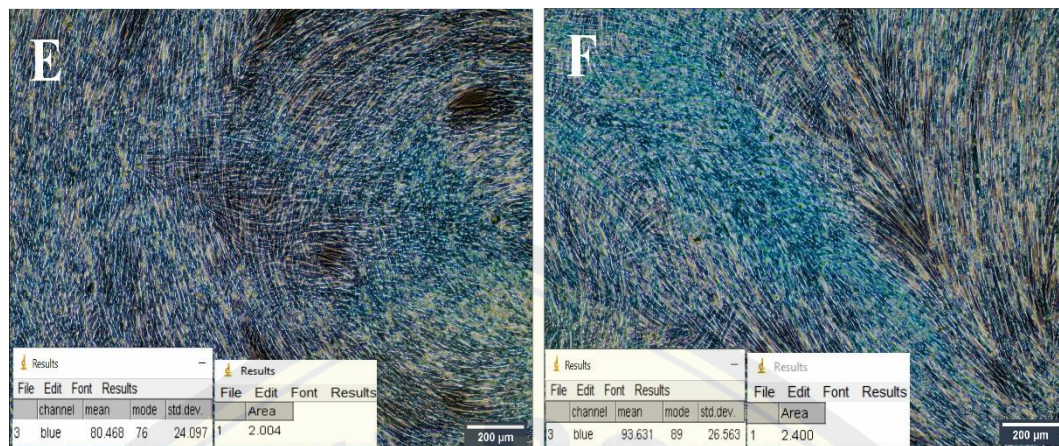
Gambar 4.1 Perwanaaan Glikosaminoglikan dengan *Alcian Blue* pada hari ke-7 pada mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x. (A) Kelompok sel MSC yang diinduksi oleh Kondro Kit Standar dari *Oricell™*; (B) Kelompok sel MSC yang diinduksi oleh Medium Terkondisi dari GMSC (DMEM+FBS) dan bahan penginduksi. Pengukuran intensitas penyerapan warna dan luas daerah akumulasi GAG dengan *Software ImageJ*

Pengamatan Hari Ke-14



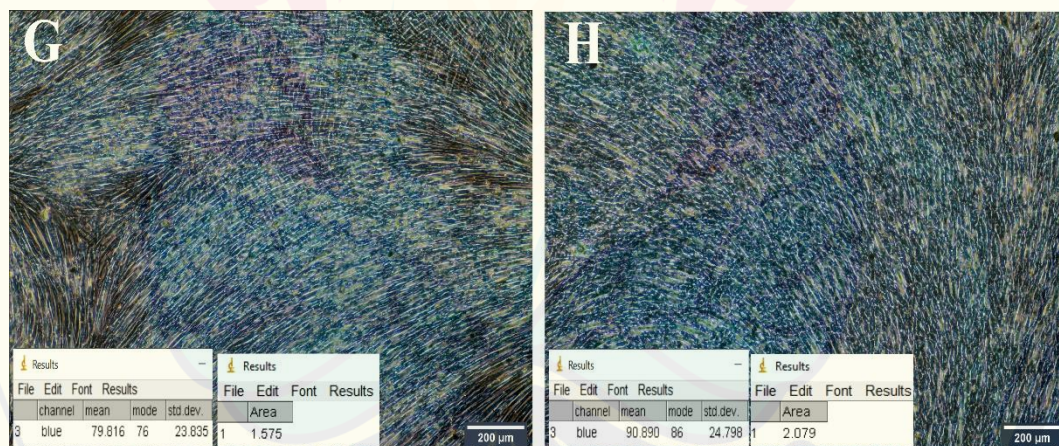
Gambar 4.2 Perwanaaan Glikosaminoglikan dengan *Alcian Blue* pada hari ke-14 pada mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x. (C) Kelompok sel MSC yang diinduksi oleh Kondro Kit Standar dari *Oricell™*; (D) Kelompok sel MSC yang diinduksi oleh Medium Terkondisi dari GMSC (DMEM+FBS) dan bahan penginduksi. Pengukuran intensitas penyerapan warna dan luas daerah akumulasi GAG dengan *Software ImageJ*

Pengamatan Hari Ke-21



Gambar 4.3 Perwarnaan Glikosaminoglikan dengan *Alcian Blue* pada hari ke-21 pada mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x. (E) Kelompok sel MSC yang diinduksi oleh Kondro Kit Standar dari *OricellTM*; (F) Kelompok sel MSC yang diinduksi oleh Medium Terkondisi dari GMSC (DMEM+FBS) dan bahan penginduksi. Pengukuran intensitas penyerapan warna dan luas daerah akumulasi GAG dengan *Software ImageJ*

Pengamatan Hari Ke-28



Gambar 4.4 Perwarnaan Glikosaminoglikan dengan *Alcian Blue* pada hari ke-28 pada mikroskop *inverted* dengan perbesaran 100x. (G) Kelompok sel MSC yang diinduksi oleh Kondro Kit Standar dari *OricellTM*; (H) Kelompok sel MSC yang diinduksi oleh Medium Terkondisi dari GMSC (DMEM+FBS) dan bahan penginduksi. Pengukuran intensitas penyerapan warna dan luas daerah akumulasi GAG dengan *Software ImageJ*

Pada Gambar 4.1 hingga 4.4 dapat terlihat bahwa kedua kelompok penelitian memiliki daerah yang terwarnai *alcian blue* yang menunjukkan adanya akumulasi glikosaminoglikan (GAG). Hasil ini menandakan baik pada kelompok sel yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) maupun

kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) yang ditambahkan dengan bahan penginduksi, sel mampu berdiferensiasi kondrogenik dan melakukan sintesis glikosaminoglikan sebagai matriks ekstraseluler. Jika dilihat secara lebih teliti kedua kelompok perlakuan memiliki hasil akumulasi GAG yang berbeda. Secara keseluruhan terlihat bahwa GMSC yang dikultur dengan media diferensiasi dari medium terkondisi GMSC (kelompok perlakuan) memiliki akumulasi glikosaminoglikan yang lebih banyak jika dibandingkan dengan GMSC yang dikultur dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) (kelompok kontrol) dilihat dari ketebalan warna dan daerah yang terwarnai.

Berdasarkan Gambar 4.1. hingga 4.4 melalui pengamatan kualitatif dapat terlihat bahwa warna biru semakin banyak dan tebal pada hari ke-7, 14, dan mencapai puncak pada hari ke-21. Sementara pada hari ke-28, warna biru menjadi lebih muda dan lebih pudar. Warna biru yang semakin banyak tebal menunjukkan adanya penumpukan GAG yang menandakan akumulasi GAG semakin banyak. Selanjutnya hasil intensitas penyerapan warna *alcian blue* yang menunjukkan akumulasi GAG dan luas daerah sintesis glikosaminoglikan diukur dengan *software ImageJ*.

Tabel 4.1 Hasil pengukuran intensitas penyerapan *alcian blue* pada *ImageJ* untuk melihat akumulasi glikosaminoglikan

Hari Pengamatan	Intensitas penyerapan warna <i>alcian blue</i> ± SD	
	Medium kondrogenik standar	Medium Terkondisi dan Bahan Penginduksi
7	59.08 ± 3.47 ^{a,b,c,d}	74.88 ± 1.44
14	72.47 ± 1.50 ^{a,b,c,d}	90.13 ± 1.62 ^a
21	84.47 ± 3.52 ^{c,d,1}	94.64 ± 1.37 ^{a,b}
28	80.83 ± 1.33 ^{a,c,d,1,2}	92.85 ± 1.84 ^a

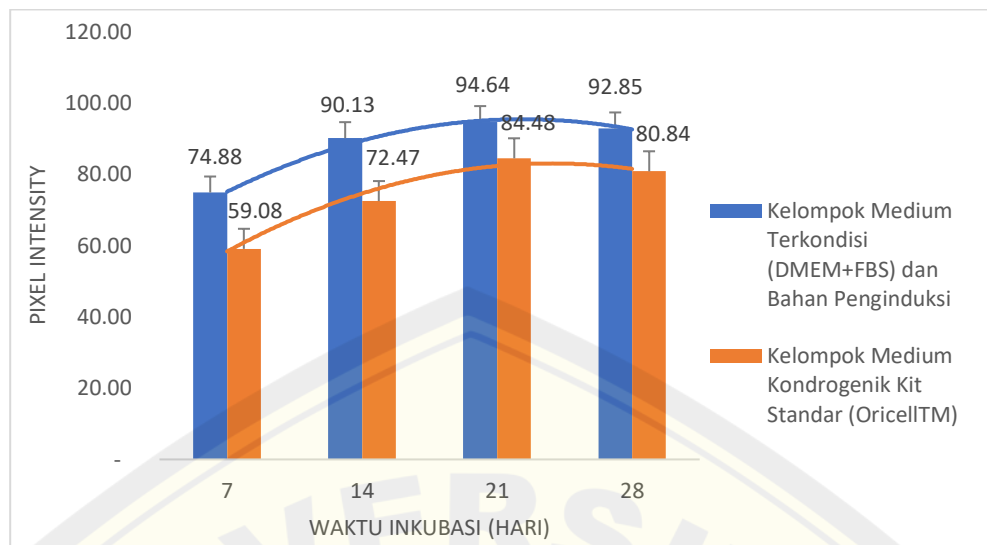
^{a,b,c,d}: Intensitas penyerapan warna berbeda signifikan dengan kelompok medium terkondisi 1,2,3,4; Intensitas penyerapan warna berbeda signifikan dengan kelompok medium kondrogenik standar

Berdasarkan Tabel 4.1. menunjukkan hasil intensitas penyerapan warna biru oleh *alcian blue* yang menunjukkan adanya akumulasi glikosaminoglikan. Pada pengamatan hari ke-7 menunjukkan intensitas penyerapan warna biru pada

kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) sebesar 74,88 sementara pada kelompok sel yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) sebesar 59,08. Waktu pengamatan pada hari ke-14 menunjukkan intensitas penyerapan warna pada kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) sebesar 90,13 dan kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) sebesar 72,47. Hasil pengukuran pada kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM+FBS) pada hari ke-7 setara dengan hasil pengukuran pada hari ke-14 pada kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*), yang menandakan medium terkondisi mampu menginduksi proses diferensiasi kondrogenik lebih cepat.

Pada pengamatan hari ke-21 menunjukkan adanya peningkatan intensitas penyerapan warna biru jika dibandingkan hari ke-14 yaitu pada kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) sebesar 94,64 dan kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) sebesar 84,47. Pada pengamatan hari ke-28 penyerapan intensitas warna sebesar 92,85 pada kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) dan 80,83 pada kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*). Hasil ini menunjukkan penurunan jika dibandingkan dengan intensitas penyerapan warna pada hari ke-21. Hal ini mengindikasikan bahwa terjadi penurunan akumulasi glikosaminoglikan pada hari ke-28.

Hasil pengamatan penyerapan warna *alcian blue* disajikan dalam bentuk grafik (Gambar 4.5), menunjukkan peningkatan pada hari ke-7 hingga ke-21, kemudian mengalami penurunan pada hari ke-28. Grafik menunjukkan kelompok GMSC yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) (kelompok perlakuan) memiliki penyerapan warna *alcian blue* yang tinggi jika dibandingkan dengan kelompok GMSC yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) (kelompok kontrol).



Gambar 4.5 Grafik hasil pengukuran penyerapan intensitas warna *alcian blue* untuk melihat akumulasi glikosaminoglikan pada hari ke 7, 14, 21, dan 28

Gambar hasil penelitian selanjutnya dilakukan pengukuran luas daerah akumulasi glikosaminoglikan (GAG). Pengukuran luas daerah akumulasi GAG bertujuan untuk mengetahui seberapa banyak daerah yang mengalami diferensiasi kondrogenik.

Tabel 4.2 Hasil pengukuran luas daerah akumulasi glikosaminoglikan

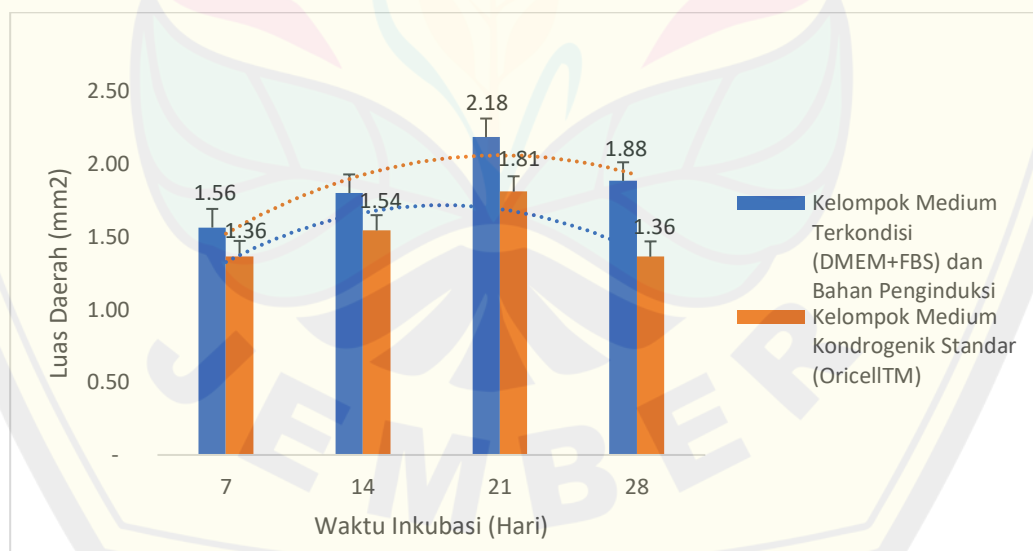
Hari Pengamatan	Luas daerah akumulasi glikosaminoglikan (mm ²) ± SD	
	Medium kondrogenik standar	Medium Terkondisi dan Bahan Penginduksi
7	1.36 ± 0.77 ^{b,c,d}	1.56 ± 0.33
14	1.54 ± 0.32 ^{c,1}	1.80 ± 0.27 ^a
21	1.81 ± 0.27 ¹	2.18 ± 0.27 ^a
28	1.62 ± 1.36 ^{b,c,d,3}	1.88 ± 0.26

^{a,b,c,d}: Luas daerah akumulasi GAG berbeda signifikan dengan kelompok medium terkondisi
^{1,2,3,4}: Luas daerah akumulasi GAG berbeda signifikan dengan kelompok medium kondrogenik standar

Dari Tabel 4.2 dapat terlihat bahwa secara keseluruhan hasil pengukuran luas daerah akumulasi glikosaminoglikan (GAG) kelompok MSC yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) lebih besar jika dibandingkan dengan

kelompok MSC yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*). Hasil pengukuran juga menunjukkan luas daerah akumulasi GAG pada kelompok yang diinduksi medium terkondisi (DMEM + FBS) pada hari ke-7 yaitu 1,56 mm² memiliki hasil pengukuran yang sama dengan luas daerah akumulasi GAG pada kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) pada hari ke-14, yaitu 1,54 mm². Hal ini menunjukkan bahwa medium terkondisi mampu menginduksi diferensiasi kondrogenik lebih cepat sehingga menghasilkan kondroblas yang lebih banyak dan akumulasi GAG yang dihasilkan juga semakin banyak.

Hasil pengukuran luas daerah akumulasi glikosaminoglikan (GAG) disajikan dalam bentuk grafik (Gambar 4.6). Dari grafik hasil penelitian dapat terlihat baik pada kelompok MSC yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) maupun yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) menunjukkan peningkatan luas daerah pada hari ke-7, 14, dan mencapai puncaknya pada hari ke-21. Hal ini menunjukkan jumlah sel MSC yang mengalami diferensiasi kondrogenik meningkat pada hari ke-7, 14, dan mencapai puncaknya pada hari ke-28.



Gambar 4.6 Grafik hasil pengukuran luas daerah akumulasi glikosamoniglikan pada hari ke 7, 14, 21, dan 28.

Data hasil penelitian yang telah diperoleh selanjutnya dilakukan uji statistik dengan *software spss*. Analisis data diawali dengan uji normalitas dengan uji *Saphiro-wilk* dan uji homogenitas. Hasil uji normalitas intensitas penyerapan warna nilai signifikansi $p > 0,05$ sehingga mengindikasikan data berdistribusi normal (Lampiran 4.2). Dilanjutkan uji homogenitas intensitas penyerapan warna didapatkan nilai signifikansi 0,021 yang mengindikasikan data tidak homogen ($p < 0,05$). (Lampiran 4.2). Hasil analisis statistik pada intensitas penyerapan warna menunjukkan data berdistribusi normal dan tidak homogen sehingga dilanjutkan dengan uji non-parameterik yaitu *kruskal-wallis*. Hasil uji non-parametrik *Kruskal-wallis* didapatkan nilai signifikansi 0,005 ($P < 0,05$) yang mengindikasikan adanya perbedaan intensitas penyerapan warna (Lampiran 4.2). Selanjutnya dilakukan uji statistik lanjutan dengan uji Mann-Whitney. Uji *Mann-Whitney* juga dilakukan berdasarkan hari pengamatan untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai signifikansi $p \leq 0,05$. Berdasarkan hasil uji *Mann-Whitney* intensitas penyerapan warna, menunjukkan beberapa kelompok memiliki nilai signifikansi $p \leq 0,05$. Sehingga dapat terlihat beberapa kelompok memiliki perbedaan intensitas penyerapan warna yang signifikan (Lampiran 4.2).

Analisis data juga dilakukan pada hasil pengukuran luas daerah akumulasi glikosaminoglikan (GAG). Analisis data diawali dengan uji normalitas *Saphiro-wilk* dan didapatkan nilai signifikansi $> 0,05$ sehingga disimpulkan data berdistribusi normal (Lampiran 4.3). Dilanjutkan uji homogenitas dengan *Levene test* didapatkan nilai signifikansi 0,676 ($> 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa sebaran data homogen (Lampiran 4.3). Data berdistribusi normal dan homogen kemudian dilakukan uji parametrik, *One-Way Anova*. Hasil uji *One-Way Anova* menghasilkan nilai signifikansi 0,012 ($< 0,05$) yang menunjukkan terdapat perbedaan luas daerah akumulasi GAG antar kelompok perlakuan (Lampiran 4.3). Kemudian dilakukan uji statistik lanjutan dengan uji LSD untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan dengan nilai signifikansi $p \leq 0,05$. Berdasarkan hasil uji *LSD* luas daerah akumulasi GAG, menunjukkan beberapa kelompok memiliki nilai

signifikansi $p \leq 0,05$. Sehingga dapat terlihat beberapa kelompok memiliki perbedaan luas daerah akumulasi GAG yang signifikan (Lampiran 4.2).

4.2 Pembahasan

Diferensiasi kondrogenik dapat diidentifikasi melalui perwarnaan *alcian blue* untuk melihat adanya akumulasi glikosaminoglikan. Pada hasil percobaan dengan pewarnaan *alcian blue* terlihat bahwa baik pada kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) dan kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) saat dilakukan uji *alcian blue* kedua kelompok tersebut terwarnai biru yang menunjukkan adanya akumulasi glikosaminoglikan. Akumulasi glikosaminoglikan menunjukkan adanya diferensiasi kondrogenik. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh El Sayed dan Dorfer (2016), bahwa diferensiasi kondrogenik dapat dibuktikan dengan pewarnaan *alcian blue* yang menunjukkan adanya akumulasi glikosaminoglikan. Akumulasi glikosaminoglikan yang teridentifikasi pada kelompok perlakuan menunjukkan bahwa medium terkondisi dari GMSC (DMEM+FBS) dapat menginduksi diferensiasi kondrogenik.

Gambar hasil penelitian menunjukkan bahwa medium terkondisi (DMEM+FBS) mampu meningkatkan induksi diferensiasi kondrogenik yang dibuktikan dengan hasil pengamatan kualitatif yang menunjukkan warna biru yang lebih tebal jika dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*). Warna biru yang tebal menunjukkan adanya penumpukan glikosaminoglikan (Tanthaisong *et al.*, 2017).

Grafik hasil penelitian menunjukkan bahwa hasil penyerapan intensitas warna *alcian blue* dan luas daerah akumulasi GAG kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*). Hal ini membuktikan bahwa akumulasi glikosaminoglikan pada kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) lebih banyak jika dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*).

Kelompok sel yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM+FBS) pada hari ke-7 memiliki hasil pengukuran yang setara dengan hari ke-14 pada kelompok sel yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*). Hal ini menandakan bahwa medium terkondisi mampu menginduksi proses diferensiasi kondrogenik lebih cepat dan kondroblas yang dihasilkan semakin banyak. Medium terkondisi mengandung *growth factor*, sitokin, dan mineral yang berperan penting dalam sintesis glikosaminoglikan dan pembentukan kartilago. Mineral didapatkan dari DMEM yang merupakan bahan utama pembentukan medium terkondisi. Salah satu mineral yang terkandung dalam medium terkondisi adalah kalsium yang berperan dalam pembentukan tulang. Selain itu medium terkondisi juga mengandung *growth factor* dan sitokin yang disekresikan oleh MSC untuk memicu sintesis glikosaminoglikan. Menurut Barlian *et al* (2020), TGF- β mampu berikatan dengan TGF- β reseptor yang mampu mengaktifkan pensinyalan *cascade smad 2/3/4* yang kemudian ditranslokasikan ke nukleus sel. Selanjutnya protein smad 2/3/4 akan berinteraksi dengan *transcription factor SOX-9* sehingga dapat mengatur ekspresi kolagen tipe II dan glikosaminoglikan yang selanjutnya akan terdeposisi menjadi matriks ekstraseluler kartilago. Medium terkondisi juga mengandung BMP-2, BMP-7, IGF, dan FGF. BMP-2 dan BMP-7 berperan dalam peningkatan diferensiasi kondrogenik dan migrasi serta proliferasi *mesenchymal stem cell* (MSC) ke daerah defek kartilago. IGF berperan dalam peningkatan produksi matriks kondrogenik yaitu glikosaminoglikan dan kolagen IIA. FGF berperan dalam peningkatan proliferasi MSC dan diferensiasi kondrogenik serta mampu memicu kondrogenesis lebih awal (Le *et al*, 2020).

Medium terkondisi yang digunakan sebagai penginduksi telah ditambahkan dengan L-Glutamin, *ascorbic acid-2-phosphate*, dan *dexamethasone* yang dapat mempercepat sintesis glikosaminoglikan. L-Glutamin dapat mengatur ekspresi gen kondrosit, membantu biosintesis kondrosit dengan menjaga proliferasi dan sekresi matriks (Steege *et al.*, 2020). *Dexamethasone* dapat meningkatkan sekresi matriks glikosaminoglikan, memicu diferensiasi kondrogenik, dan mengatur ekspresi gen yang memicu diferensiasi kondrogenik (Stewart *et al.*, 2011). *Ascorbic acid-2-phosphate* berperan dalam menginduksi proliferasi kondroblas, membantu proses

diferensiasi kondrogenik, dan sebagai kofaktor enzim dalam biosintesis glikosaminoglikan sebagai matriks ekstraseluler kartilago (Barlian *et al.*, 2020).

Pada tabel hasil penelitian intensitas penyerapan warna dan luas daerah akumulasi GAG, menunjukkan baik pada kelompok yang diinduksi dengan medium kondrogenik standar (*OricellTM*) maupun kelompok yang diinduksi dengan medium terkondisi (DMEM + FBS) menunjukkan penyerapan intensitas warna *alcian blue* mengalami peningkatan dari hari ke-7, hari ke-14, dan mencapai puncak pada hari ke-21. Namun pada hari ke-28 mengalami penurunan. Hal ini membuktikan bahwa jumlah kondroblast dan sintesis glikosaminoglikan meningkat dari hari ke-7, hari ke-14, dan mencapai puncaknya pada hari ke-21. Pada hari ke-28 terjadi penurunan sintesis glikosaminoglikan. Keadaan ini berkaitan dengan sintesis matriks dalam proses kondrogenesis. Pada hari ke 1 kondrogenesis terjadi kondensasi *mesenchymal stem cell* (MSC). Selanjutnya pada hari ke-2 hingga hari ke 10 terjadi diferensiasi MSC menjadi prekondroblas dan densitas sel meningkat. Pada hari ke-14 hingga hari ke-21 prekondroblas mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi kondroblas. Pada tahapan ini kondroblas mensintesis glikosaminoglikan sebagai matriks utama dalam jumlah banyak untuk selanjutnya dideposisikan sehingga akumulasi glikosaminoglikan meningkat. Pada hari ke-28 dan seterusnya kondroblas mengalami maturasi dan diferensiasi terminal menjadi kondrosit. Pada tahapan diferensiasi terminal, kondrosit mengalami hipertrofi dan tidak lagi mensekresikan glikosaminoglikan, namun lebih banyak mensekresikan kolagen tipe-X sebagai matriks utamanya. Keadaan ini mengakibatkan akumulasi glikosaminoglikan pada hari ke-28 mengalami penurunan (Cheng *et al.*, 2009; Dexheimer *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2017).

Growth factor dan sitokin yang terkandung dalam medium terkondisi termasuk dalam kelompok protein. Protein merupakan rantai polimer yang tersusun atas lebih dari 20 jenis asam amino. Asam amino tersebut dihubungkan dalam rantai linier tidak bercabang oleh ikatan asam amino yang disebut dengan ikatan peptida. Protein memiliki gugus amina dan gugus karboksil pada kedua ujung rantainya. Protein sangat peka terhadap pengaruh fisik dan kimia yang dapat menyebabkan perubahan pada strukturnya yang disebut dengan denaturasi. Denaturasi merupakan

gangguan pada struktur protein baik pada struktur sekunder maupun tersier tanpa disertai dengan pemutusan ikatan peptida. Denaturasi dapat disebabkan oleh suhu. Suhu tinggi dan pemanasan lama dapat menyebabkan denaturasi pada protein dan menyebabkan hilangnya fungsi normal protein (Lodish *et al.*, 2016). Oleh karena itu medium terkondisi yang mengandung *growth factor* dan sitokin di dalamnya yang merupakan salah satu jenis protein harus disimpan dalam suhu rendah berkisar -20 °C hingga -80°C atau dalam bentuk *freeze dried* agar tidak mengalami denaturasi dan kehilangan fungsinya.

Bentuk *freeze dried* memiliki beberapa keuntungan jika dibandingkan dengan medium terkondisi bentuk cair yang digunakan dalam penelitian ini. Medium terkondisi dalam bentuk *freeze dried* memiliki jangka waktu penyimpanan yang lebih lama, lebih mudah dalam penggunaan, dan mampu menjaga keefektifan kandungan biomolekul dalam medium terkondisidan dapat digunakan sesuai dengan kebutuhan terutama dalam keadaan darurat (Bari *et al.*, 2019).

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa medium terkondisi dari *gingival mesenchymal stem cell* (GMSC) mampu meningkatkan sintesis glikosaminoglikan pada model kondrogenik yang terlihat melalui adanya akumulasi glikosaminoglikan yang terwarnai biru saat pewarnaan *alcian blue* pada hari ke 7, 14, 21, maupun 28.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diajukan beberapa saran, antara lain:

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui ketahanan penyimpanan medium terkondisi dari *gingival mesenchymal stem cell*.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efek medium terkondisi dari *gingival mesenchymal stem cell* yang disimpan dalam bentuk *freeze-dried*.

DAFTAR PUSTAKA

- Barlian, A., H. Judawisastra, A. Ridwan, A. R. Wahyuni, dan M. E. Lingga. 2020. Chondrogenic differentiation of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells on silk chondroitin-fibrin mix scaffold supplemented with L-ascorbic acid and platelet rich plasma. *Scientific Reports*. 10 (19449): 1-17.
- Bari, E., Perteghella, S., Catenacci, L., Sorlini, M., Croce, S., Mantelli, M., Avanzini, M. A., Sorrenti, M. dan Torre, M. L. 2019. Freeze-dried and GMP-compliant pharmaceuticals containing exosomes for acellular mesenchymal stromal cell immunomodulant therapy. *Nanomedicine*. 14 (6): 753-765.
- Berkovitz, B. K. B., G.R. Holland, dan B. J. Moxham. 2018. *Oral Anatomy, Histology, and Embryology*. Fifth Edition. London: Elsevier.
- Cheng, N-C., B. T. Estes, H. A. Awad, dan F. Guilak. 2009. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Engineering Part A*. 15(2): 231-241.
- Dexheimer, V., S. Frank, dan W. Richter. 2012. Proliferation as a requirement in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*. 10(21): 2160-2169.
- Dorman, L. J., M. Tucci, dan H. Beghuzzi. *In vitro* effects of BMP-2, BMP-7, dan BMP-13 on proliferation and differentiation of mouse mesenchymal stem cells. *Biomed Sci Instrum*. 48: 8177-8181.
- El Moshy, S., I. A. Radwan, D. Rady, M. M. Abbass, A. A. El-Rashidy, K. Sadek, C. E. Dorfer, dan K. M. F. El-Sayed. 2020. Dental stem cell-derived secretome/Medium terkondisi: The future for regenerative therapeutic applications. *Stem Cells International*. 2020: 1-29.
- El-Sayed, K. M. F., dan C. E. Dorfer. 2016. Gingival mesenchymal stem/progenitor cells: A unique tissue engineering gem. *Hindawi Stem Cells International*. 2016: 1-16.
- Feng, R., dan C. Lengner. 2013. Application of stem cells technology in dental regenerative medicine. *Advances in wound care*. 2(6): 296-305.

- Ferrazo, K. L., L. B. Osorio, V. A. Ferrazo. 2013. CT images of a severe TMJ *osteoarthritis* and differential diagnosis with other joint disorders. *Case Reports in Dentistry*. 2013: 1-5.
- Gao, Y., G. Zhao, D. Li, X. Chen, J. Pang, dan J. Ke. 2014. Isolation and multiple differentiation potential assessment of human gingival mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Science*. 15(11): 20982-20996.
- Grande, D. A., dan B. D. Smith. 2015. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nature Review Rheumatology*. 11(4): 213-222.
- Grawish, M. E. 2018. Gingival-derived mesenchymal stem cells: An endless resource for regenerative dentistry. *World Journal of Stem Cells*. 10(9): 116-118.
- Green, D. J., V. Tollemar, M. Dougherty, Z. Yan, L. Yin, J. Ye, Z. Collier, M. K. Mohammed, R. C. Haydon, H. H. Luu, R. Kang, M. J. Lee, S. H. Ho, T. He, L. L. Shi, dan A. Athiviraham. 2015. Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes & Disease*. 2(4): 307-327.
- Hamid, M., I. Sufi, W. Konadi, dan Y. Akmal. 2019. *Analisis Jalur dan Aplikasi SPSS Versi 25*. Lhoksumawe: Sefa Bumi Persada.
- Hand, A. R., dan M. E. Frank. 2014. *Fundamentals of Oral Histology and Physiology*. Oxford: John Willey & Sons, Inc.
- Hartig, M.S. 2013. Basic image analysis and manipulation in *ImageJ*. *Current protocols in molecular biology*. doi:10.1002/0471142727.mb1415s102.
- Hu, C., L. Zhao, L. Zhang, Q. Bao, dan L. Li. 2020. Mesenchymal stem cell-based cell-free strategies: safe and effective treatments for liver injury. *Stem Cell Research and Therapy*. 11(377): 1-12.
- Kalladka, M., S. Quek, G. Hair, E. Eliav, M. Mupparau, dan A. Visnawath. 2013. Temporomandibular *osteoarthritis*: Diagnosis and long-term conservative management: A topic review. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*. 14(1): 6-15.

- Kim, D., A. E. Lee, Q. Xu, Q. Zhang, dan A. D. Le. 2021. Gingiva-derived mesenchymal stem cells: Potential application in tissue engineering and regenerative medicine – A comprehensive review. *Frontiers in Immunology*. 12: 667221.
- Kurniawan, C., T.B. Waluyo, dan P. Sebayang. 2011. Analisis ukuran partikel menggunakan *free software ImageJ*. *Seminar Nasional Fisika 2011*. Serpong, 12-13 Juli 2011.
- Kuroda, S., K. Tanimoto, T. Izawa, S. Fujihara, J. H. Koolstra, dan E. Tanaka. 2009. Review biomechanical and biochemical characteristics of the mandibular condylar cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 17: 1408-1415.
- Kusumawardani, B., D.M.C. Robin, E. Puspitasari, I.J. Savitri. Cultivation and expansion of mesenchymal stem cells from human gingival tissue and periodontal ligament in different culture medium. *Dental Journal*. 2021. 54(1): 39-45.
- Le, H., W. Xu, X. Zhuang, F. Chang, Y. Wang, dan J. Ding. 2015. Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration. *Journal of Tissue Engineering*. 11: 1-22.
- Lee, T. J., J. Jang, S. Kang, S. H. Bhang, G. J. Jeong, H. Shin, D. W. Kim, dan B. S. Kim. 2014. Mesenchymal stem cell-Medium terkondisi enhances osteogenic and chondrogenic differentiation differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells by mesodermal lineage induction. 20(7): 1306-1313.
- Lodish, H., A. Berk, C.A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, dan K.C. Martin. 2016. *Molecular Cell Biology Eighth Edition*. New York: w.h. freman Macmilan Learning.
- Maia, L., M. C. Dias, C. N. de Moraes, C. de Paula Freitas-Dell'Aqua, L. S. L. S. da Mota, V. Santiloni, dan F. da Cruz Landim-Alvarenga. Medium terkondisi: A new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*. 41(3): 239-248.
- Mescher, A. L. 2018. *Junquiera's Basic Histology Text and Atlas*. Fifteenth Edition. New York: Mc Graw Hill Education.

- Monasterio, G, F. Castillo, D. Betancur, A. Hernandez, G. Flores, W. Diaz, M. Hernandez, dan R. Vernal. 2017. *Osteoarthritis* of the temporomandibular joint: Clinical and imagenological diagnosis, pathogenic role of the immuno-inflammatory response, and immunotherapeutic strategies based on T regulatory lymphocytes. *Intechopen*. doi: 10.5772/intechopen.72496.
- Nugraha, A. P., I. B. Narmada, D. S. Ernawati, A. D. W. Widodo, P. Lestari, A. Dinaryanti, E. Hendrianto, I. S. Ihsan, H. Susilowati, N. Ertanti, D. Karsari, F. A. Rantam. 2018. Gingival mesenchymal stem cells from wistar rat's gingiva (*Rattus Novergicus*)-isolation and characterization (in vitro study). *Journal of International Dental and Medical Research*. 11(2): 694-699.
- Nugroho, A.E., dan K. Maeyama. 2011. Evaluasi pewarnaan *alcian blue* terhadap sel mast jaringan ikat dari preparat beku jaringan kulit kaki tikus. *Pharmacy*. 8(2): 10-20.
- Ovalle, W. K., dan P. C. Nahirney. 2014. *Netter's Essential Histology*. Second Edition. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Pichert, A., D. Schlorke, S. Franz, dan J. Arnhold. 2012. Functional aspects of the interleukin-8 and sulfated glycosaminoglycans. *Biomatter*. 2(3): 142-148.
- Rosati, I., K. Karina, I. Rosliana, S. Sobariah, I. Afini, T. Widyastuti, dan A. Barlian. 2019. In vitro study of cartilage tissue engineering using human adipose-derived stem cells induced by platelet-rich plasma and cultures on silk fibroin scaffold. *Stem Cell Research and Therapy*. 10(369): 1-15.
- Rosadi, I., Karina, K.A. Wahyuningsih, I. Rosliana, T. Widyastuti, S. Sobariah, I. Afini, dan A. Barlian. 2020. Kondrogenesis *adiposed-derivd stem cells* menggunakan *platelet-rich plasma* pada *scaffold* sutra. *Jurnal Biologi*. 13(1): 31-38.
- Ross, M. 2007. Colour analysis tools in *ImageJ*. *Biomedical Imaging Research Unit*. 1-23.
- Ross, M. H., dan W. Pawlina. 2016. *Histology A Text and Atlas*. Seventh Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.
- Ruede, C.T., J. Schindelin, M.C. Hiner, B.E. DeZonia, A.E. Walter, E.T. Arena, dan K.W. Eliceiri. 2017. *ImageJ: ImageJ* for the next generation of scientific image data. *BMC Informatics*. 18:529.

- Sagaradze, G., O. Grigorieva, P. Nimiritsky, N. Basalova, N. Kalinina, Z. Akopyan, dan A. Efimenko. 2019. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(7): 1656.
- Silva, J. C., X. Han, T. P. Silva, K. Xia, P. E. Mikael, J. M. Cabral, F. C. Ferreira, R. J. Linhardt. 2020. Glycosaminoglycan remodeling during chondrogenic differentiation of human bone marrow-/synovial-derived mesenchymal stem/stromal cells under normoxia and hypoxia. *Glycoconjugate Journal*. 37: 345-360.
- Somoza, R.A., J.F. Welter, D. Correa, dan A.I. Caplan. 2014. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Engineering*. 20(6): 596-608.
- Song, H., J.Y. Lee, K-H. Huh, dan J.W. Park. 2020. Long-term changes of temporomandibular joint osteoarthritis on computed tomography. *Scientific Report*. 10(6731): 1-10.
- Sumarta, N. P. M., C. Pramono, E. Hendrianto, H. Susilowati, D. Karsari, F. A. Rantam. 2016. Chondrogenic differentiation capacity of human umbilical cord mesenchymal stem cells with platelet rich fibrin scaffold in cartilage regeneration (in vitro study). *Bali Medical Journal*. 5(3): 65-70.
- Tanthaisong, P., S. Imsoonthornruksa, A. Ngernsoungnern, M. Ketudat-Cairns, dan R. Parnpai. 2017. Enhanced chondrogenic differentiation of human umbilical cord Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cells by GSK-3 inhibitors. *Journal PLOS ONE*. 12(1): e0168059.
- Utomo, D. K., dan I. G. A. Widiastana. 2017. The effect of platelet rich plasma on mesenchymal stem cells (MSCs) differentiation into chondroblast. *Journal of Orthopaedi and Traumatology Surabaya*. 6(2): 80-85.
- Venkatesh, D., K. P. M. Kumar, dan J. B. Alur. 2017. Gingival mesenchymal stem cells. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 21(2): 296-298.
- Visozo, F., N. Eiro, S. Cid, J. Scheneider, dan R. Perez-Fernandez. 2017. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Science*. 18(9): 1852.

Wang, X.D., J. N. Zhang, Y. H. Gan, dan Y. H. Zhou. 2015. Current understanding of pathogenesis and treatment of TMJ *osteoarthritis*. *Journal of Dental Research*. 94(5): 666-673.

Wulandari, E., dan L.A. Hendarmin. 2015. Integrasi Biokimia dalam Modul Kedokteran. Jakarta: Fakultas Kedokteran Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah.

Yoshida, K., A. Nakashima, S. Doi, T. Ueno, T. Okubo, K. Kawano, M. Kanawa, Y. Kato, Y. Higashi, dan T. Masaki. 2018. Serum-free medium enhances the immunosuppressive and antifibrotic abilities of mesenchymal stem cells utilized in experimental renal fibrosis. *Stem Cells Transational Medicine*. 2018 (9999): 1-13.

Zhang, S., A. U. J. Yap, dan W. S. Toh. 2015. Stem cells for temporomandibular joint repair and regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*. 11(5): 728-742.

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 3.1 Surat Keterangan *Ethical Clearance*

	KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS JEMBER (THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH FACULTY OF DENTISTRY UNIVERSITAS JEMBER)
No.1396/UN25.8/KEPK/DL/2021	
Title of research protocol :	" The Effect of <i>Human Gingival Mesenchymal Stem Cell Conditioned Medium</i> For <i>Glycosaminoglycan's</i> Synthesis on <i>Chondrogenic Model in Vitro</i> "
Document Approved :	Research Protocol
Principal investigator :	Oktavia Yosy Putri Utami
Member of research :	-
Responsible Physician :	Oktavia Yosy Putri Utami
Date of approval :	Desember 2021-selesai
Place of research :	Laboratorium Kedokteran Molekuler CDAST
The Research Ethic Committee Faculty of Dentistry Universitas Jember States That the above protocol meets the ethical principle outlined and therefore can be carried out.	
Jember, December 09 th 2021	
Chairperson of Research Ethics Committee Dentistry Universitas Jember	
	
 (Prof. Dr. I Dewa Ayu Ratna Dewanti, M.Si.)	

Lampiran 3.2 Surat Keterangan Izin Penelitian di Laboratorium Terpadu CDAST



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS JEMBER
UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi
Jl. Kalimantan No 37, Kampus Tegalboto Jember. 68121. Telp./Fax.: +62-331-321825
Web: cdast.unej.ac.id, Email: cdast@unej.ac.id

Nomor : 038/UN25.6.4/2022
Lampiran : -
Hal : Persetujuan Ijin Penelitian

Yth. Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Jember
Jember

Menindaklanjuti surat Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember Nomor: 6021/UN25.8/PG/2021 Tanggal 28 Desember 2021 perihal permohonan ijin penelitian atas nama mahasiswa di bawah ini:

Nama : Oktavia Yosy Putri Utami
NIM : 181610101034
Fakultas/Jurusan : Kedokteran Gigi
Judul Penelitian : Efek Medium Terkondisi dari Human Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) terhadap Sintesis Glikosaminoglikan Pada Model Kondrogenik In Vitro

Dengan ini disampaikan bahwa permohonan ijin penelitian atas nama mahasiswa tersebut diatas dapat disetujui. Dimohon mahasiswa yang bersangkutan untuk mengurus surat selesai penelitian dan bebas tanggungan setelah menyelesaikan penelitian di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi-CDAST. Atas perhatian dan kerjasamanya kami mengucapkan terima kasih.



Lampiran 3.3 Sertifikat *Good Laboratory Practice*

 KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS JEMBER
UPT LABORATORIUM TERPADU DAN SENTRA INOVASI TEKNOLOGI-CDAST
Jl. Kalimantan No. 37, Kampus Tegalboto Jember, 68121. Telp./Fax.: 0331-321825
Web: cdast.unej.ac.id; Email: cdast@unej.ac.id

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini, Kepala UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi-CDAST menyatakan bahwa :

Nama : Oktavia Yosy Putri Utami
NIP/NRP/NIM : 181610101034
Fakultas/Jurusan : Kedokteran Gigi

Telah mengikuti *Good Laboratory Practice (GLP)* yang dilaksanakan oleh UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi-CDAST Universitas Jember pada tanggal 27-28 April 2021






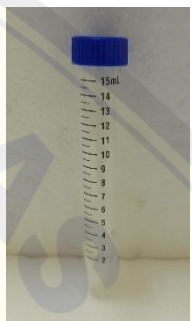




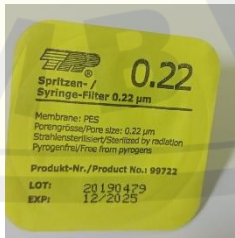
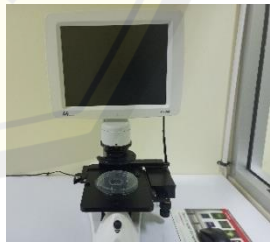
Demikian surat keterangan ini kami buat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 24 Mei 2021
Kepala,

Prof. Bambang Sugiharto
NIP. 195510221982121001



Lampiran 3.4 Alat Penelitian



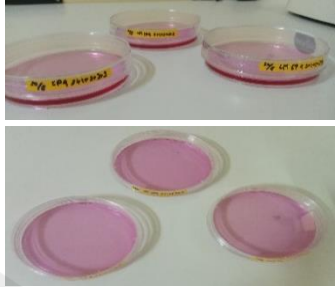
 <p>10 cm tissue culture dish</p>	 <p>Centrifuge (Thermo Scientific)</p>	 <p>Yellow Tip 200 µl (Vertex)</p>
 <p>Blue tip 1000 µl (Vertex)</p>	 <p>Mikropipet 10 µl (Vertex)</p>	 <p>Conical tube 15 ml</p>
 <p>Conical tube 50 ml</p>	 <p>Inkubator</p>	 <p>Laminar Flow</p>
 <p>Bunsen dan Spirtus</p>	 <p>0,22 µm filter</p>	 <p>Mikroskop</p>

Lampiran 3.5 Bahan Penelitian

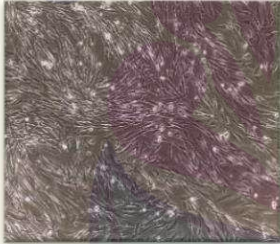

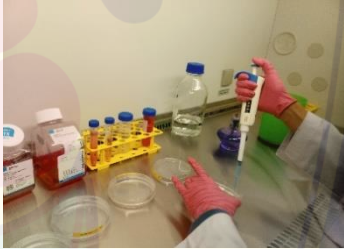



 <p>0,25 % Trypsin-EDTA</p>	 <p>10% <i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)</p>	 <p><i>Penicilin-Streptomycin</i></p>
 <p>Media basal DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>) (Gibco)</p>	 <p>Glutamin</p>	 <p><i>ascorbic acid-2 phosphate</i></p>
 <p><i>Dexamethasone</i></p>	 <p><i>Phosphate-buffered saline</i></p>	 <p><i>Alcian blue</i></p>
 <p><i>Aquadest steril</i></p>	 <p><i>Paraformaldehyde (PFA)</i></p>	






Lampiran 3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Kultur *Gingival Mesenchymal Stem Cell*


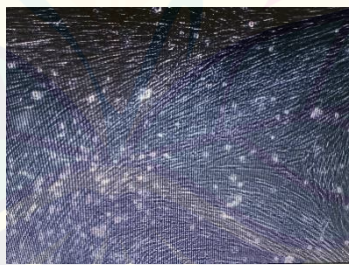

 <p>Sel GMSC Phasase 4</p>	 <p>GMSC dikultur dalam media DMEM yang ditambahkan dengan <i>fetal bovine serum</i> (FBS 10%) dan 1% Penicilin-Streptomycin</p>	 <p>Kultur GMSC dalam 10 cm <i>tissue culture dish</i>.</p>
---	--	--

3.6.2 Preparasi dan Pembuatan Medium Terkondisi dari GMSC

 <p>GMSC yang telah konfluen 80%-90%</p>	 <p>Media kultur dibuang</p>	 <p>Pencucian dengan PBS sebanyak 5 kali</p>
 <p>Pembuatan media kultur baru DMEM dengan FBS tanpa <i>Penicilin-Streptomycin</i></p>	 <p>Pemberian media kultur baru (DMEM+FBS) pada sel</p>	 <p>Inkubasi selama 24 jam dalam 5% CO₂ pada 37°C</p>

		
<p>Setelah 24 jam, media kultur dikumpulkan dalam <i>conical tube</i></p>	<p><i>Conical tube</i> yang berisi media kultur disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit</p>	<p>Hasil sentrifugasi</p>
		
<p>Hasil sentrifugasi disaring dengan filter filter 0,22 μm untuk mendapatkan <i>Medium terkondisi</i></p>	<p>Medium terkondisi disimpan dalam -20 °C</p>	

3.6.3 Kultur Kondrogenik *Gingival Mesenchymal Stem Cell* (GMSC)

		
<p>GMSC dikultur dalam <i>flat-bottom 24-well plate</i> dengan 500 μl media kultur dengan masing masing <i>well</i> berisi sel dengan konsentrasi 2×10^4 sel. Kemudian diinkubasi hingga konfluen 80%</p>	<p>Sel telah konfluen hingga 80%</p>	<p>Media kultur diganti dengan 2 media penginduksi untuk 2 kelompok perlakuan yang berbeda, yaitu 1) media terkondisi dari GMSC, 2) medium kondrogenik standar</p>



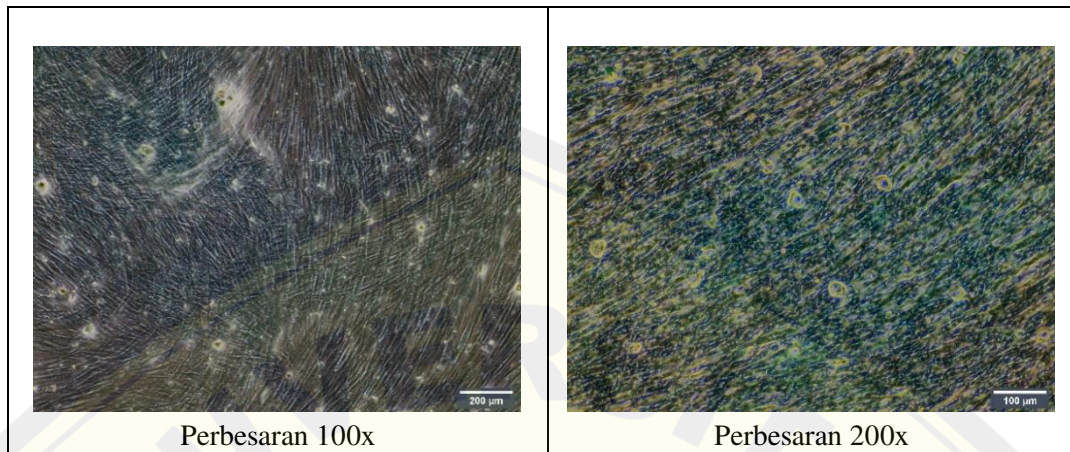
3.6.4 Validasi Sintesis Glikosaminoglikan pada Hari Ke-7, 14, 21, dan 28



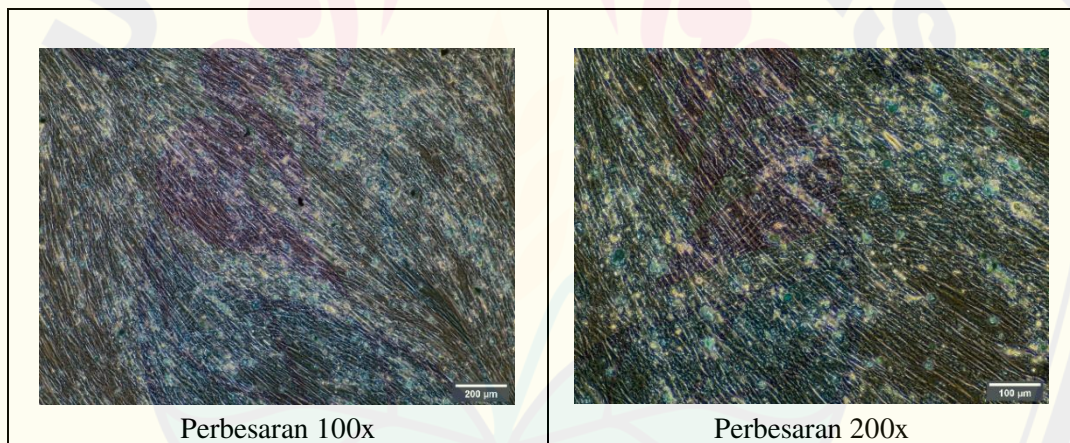
Lampiran 4.1 Gambar Hasil Pengamatan

4.1.1 Kelompok Kontrol (Medium kondrogenik standar)

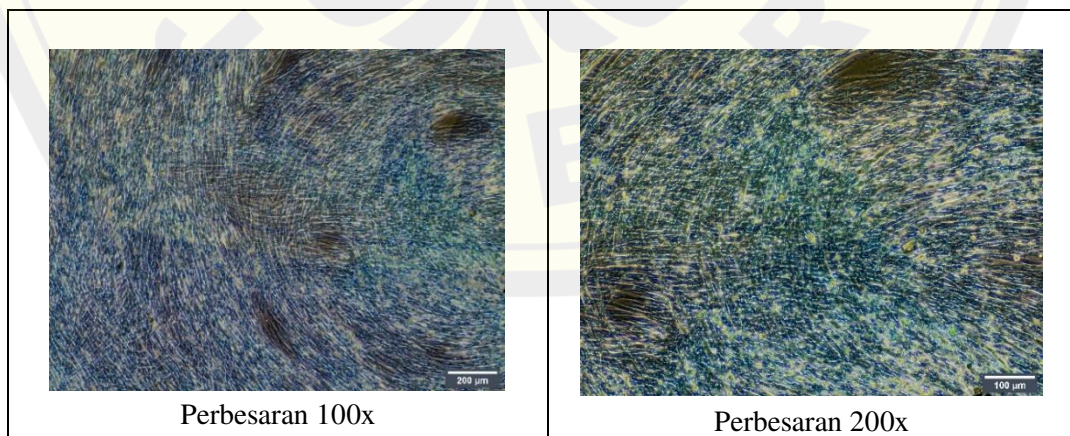
a. Hari Ke-7



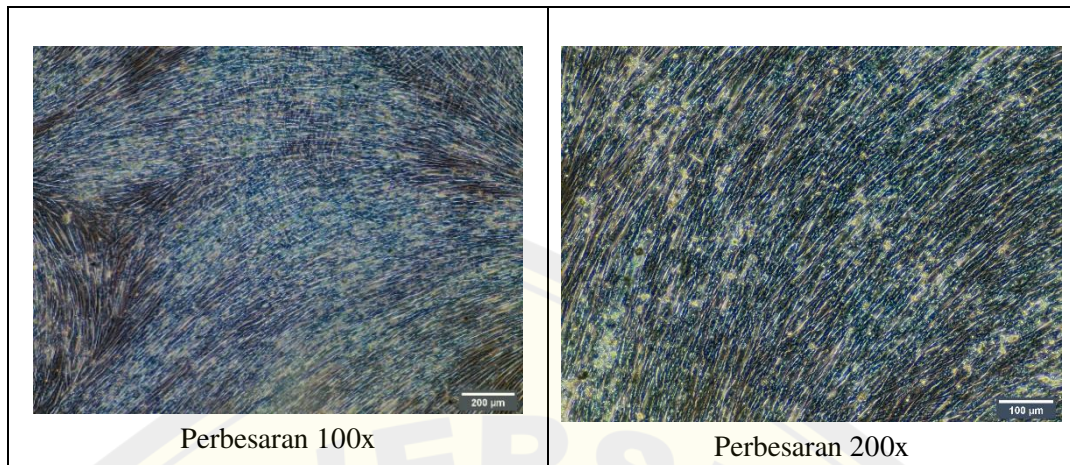
b. Hari Ke-14



c. Hari Ke-21

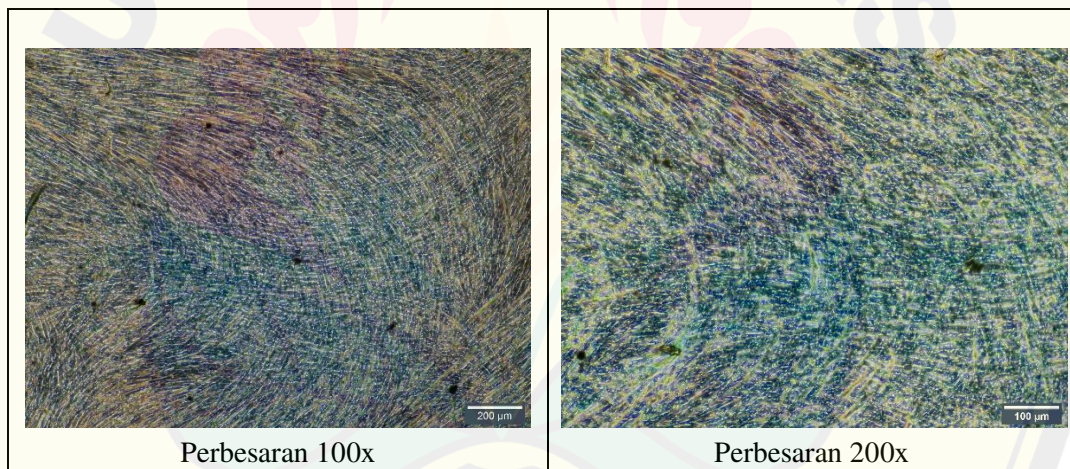


d. Hari Ke-28

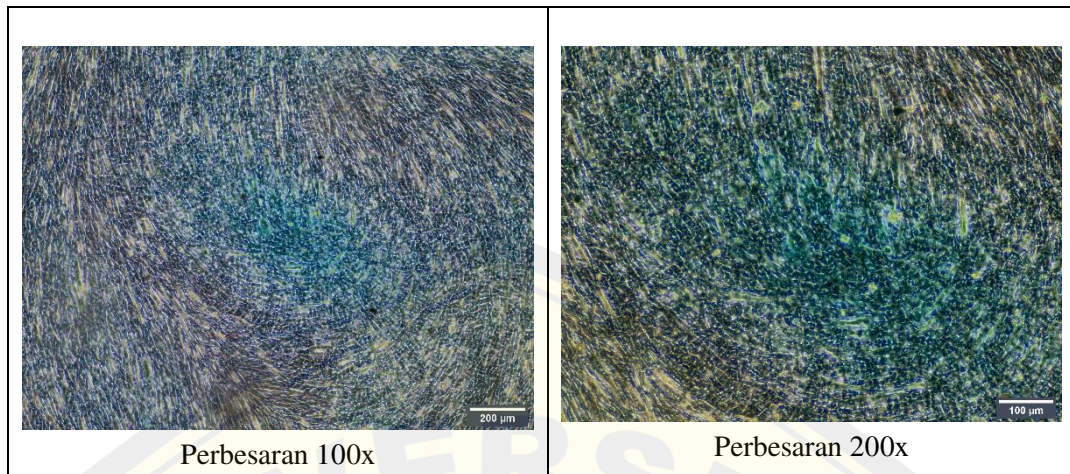


4.1.2 Kelompok Perlakuan (Medium Terkondisi (DMEM+FBS) dan Bahan Penginduksi)

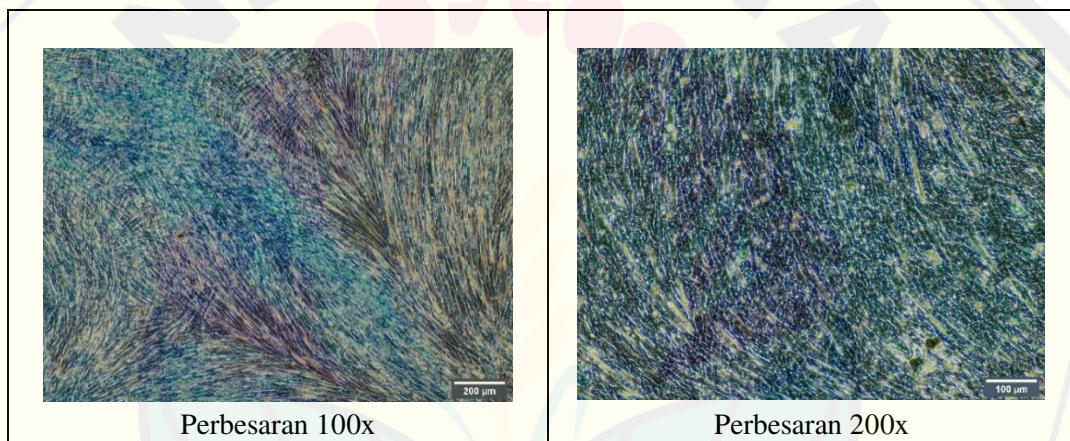
a. Hari Ke-7



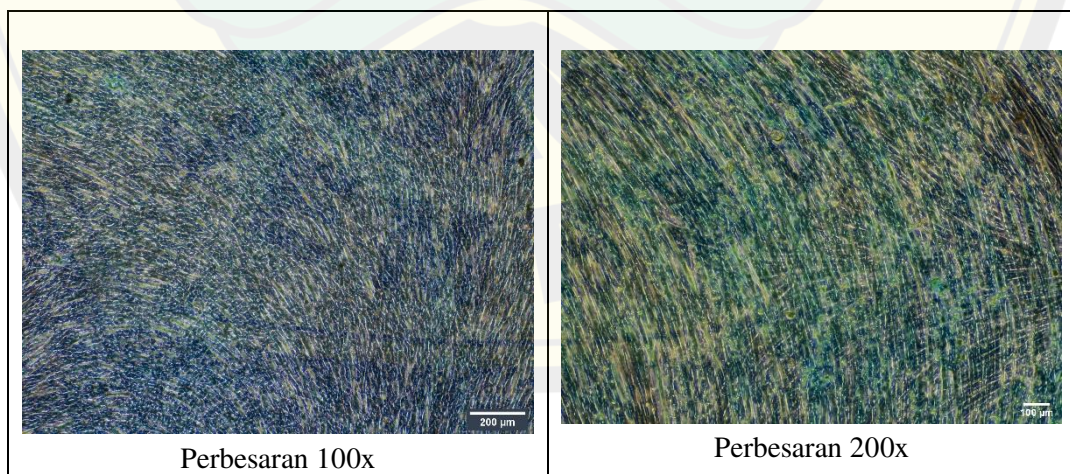
b. Hari Ke-14



c. Hari Ke-21



d. Hari Ke-28



Lampiran 4.2 Analisis Data Intensitas Penyerapan Warna

4.2.1 Uji Normalitas dengan *Saphiro Wilk*

Tests of Normality

Waktu Inkubasi	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Color Intensity	CM 7	.292	3	.924	3	.465
	CM 14	.309	3	.900	3	.387
	CM 21	.231	3	.980	3	.731
	CM 28	.244	3	.971	3	.676
Kondro 7	Kondro 7	.292	3	.923	3	.463
	Kondro 14	.358	3	.812	3	.144
	Kondro 21	.273	3	.945	3	.550
	Kondro 28	.207	3	.992	3	.833

a. Lilliefors Significance Correction

Kesimpulan:

Berdasarkan hasil uji normalitas dengan *Saphiro Wilk* didapatkan nilai signifikansi $>0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal.

4.2.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Color Intensity	Based on Mean	3.375	7	16	.021
	Based on Median	.597	7	16	.750
	Based on Median and with adjusted df	.597	7	6.164	.743
	Based on trimmed mean	3.020	7	16	.032

Kesimpulan:

Berdasarkan hasil uji homogenitas didapatkan nilai signifikansi $0,021(<0,05)$ sehingga dapat disimpulkan bahwa sebaran data tidak homogen. Selanjutnya dilakukan uji statistic non-parametrik

4.2.3 Uji Statistik Non-Parametrik dengan *Kruskal Wallis*

Test Statistics^{a,b}

	Color Intensity
Kruskal-Wallis H	20.493
df	7
Asymp. Sig.	.005

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Waktu Inkubasi

Kesimpulan:

Berdasarkan hasil uji statistic non-parametrik dengan *Kruskal Wallis* sebagai uji beda, didapatkan nilai signifikansi 0,005 (<0,05) sehingga dapat disimpulkan bahwa H0 ditolak. Artinya terdapat perbedaan intensitas penyerapan warna. Dilakukan uji lanjutan dengan *Mann-Whitney*

4.2.4 Uji Beda dengan *Mann Whitney*

Tabel 4.3 Hasil uji *Mann-Whitney* berdasarkan waktu pengamatan

	MT 7	MT14	MT 21	MT 28	KS 7	KS 14	KS 21	KS 28
MT 7		0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*	0,513	0,05*
MT 14			0,05*	0,275	0,05*	0,05*	0,127	0,127
MT 21				0,275	0,05*	0,05*	0,05*	0,05*
MT 28					0,05*	0,05*	0,05*	0,05*
KS 7						0,127	0,05*	0,05*
KS 14							0,275	0,05*
KS 21								0,827
KS 28								

*p<0,05: Rata-rata intensitas penyerapan warna *alcian blue* memiliki perbedaan yang signifikan

p>0,05 : Rata-rata intensitas penyerapan warna *alcian blue* tidak memiliki perbedaan yang signifikan

MT 7 : Medium terkondisi (DMEM+FBS) hari ke-7

MT 14 : Medium terkondisi (DMEM+FBS) hari ke-14

MT 21 : Medium terkondisi (DMEM+FBS) hari ke-21

MT 28 : Medium terkondisi (DMEM+FBS) hari ke-28

- KS 7 : Medium kondrogenik standar hari ke-7
 KS 14 : Medium kondrogenik standar hari ke-14
 KS 21 : Medium kondrogenik standar hari ke-21
 KS 28 : Medium kondrogenik standar hari ke-28

a. Medium Terkondisi Hari Ke-7 dan 14

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

b. Medium Terkondisi Hari Ke-7 dan Ke-21

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

c. Medium Terkondisi Hari Ke-7 dan Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

d. Medium Terkondisi Hari Ke-7 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-7

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

- e. Medium Terkondisi Hari Ke-7 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-14

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

- f. Medium Terkondisi Hari Ke-7 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-21

Test Statistics^a

	Color Intensity
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	9.000
Z	-.655
Asymp. Sig. (2-tailed)	.513
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.700 ^b

a. Grouping Variable: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p > 0,05$ sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan

- g. Medium Terkondisi Hari Ke-7 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

- h. Medium Terkondisi Hari Ke-14 dan Hari Ke-21

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

- i. Medium Terkondisi Hari Ke-14 dan Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p > 0,05$ sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan

- j. Medium Terkondisi Hari Ke-14 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-7

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

- k. Medium Terkondisi Hari Ke-14 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-14

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan.

- l. Medium Terkondisi Hari Ke-14 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-21

Test Statistics^a

	Color Intensity
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b

a. Grouping Variable: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p > 0,05$ sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan

- m. Medium Terkondisi Hari Ke-14 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b

a. Grouping Variable: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p > 0,05$ sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

- n. Medium Terkondisi Hari Ke-21 dan Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p > 0,05$ sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan

- o. Medium Terkondisi Hari Ke-21 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-27

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan.

- p. Medium Terkondisi Hari Ke-21 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-14

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan.

- q. Medium Terkondisi Hari Ke-21 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-21

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan.

- r. Medium Terkondisi Hari Ke-21 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

- s. Medium Terkondisi Hari Ke-28 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-7

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi
b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

- t. Medium Terkondisi Hari Ke-28 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-14

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi
b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

- u. Medium Terkondisi Hari Ke-28 dan Medium kondrogenik standar Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi
b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

v. Medium kondrogenik standar Hari Ke-7 dan Hari Ke-14

Test Statistics^a

	Color Intensity
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b

a. Grouping Variable: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p > 0,05$ sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan

w. Medium kondrogenik standar Hari Ke-7 dan Hari Ke-21

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

x. Medium kondrogenik standar Hari Ke-7 dan Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

y. Medium kondrogenik standar Hari Ke-14 dan Hari Ke-21

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan

z. Medium kondrogenik standar Hari Ke-14 dan Hari Ke-28

Test Statistics^a

	Color Intensity
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: Waktu Inkubasi

b. Not corrected for ties.

Hasil nilai signifikansi $p \leq 0,05$ sehingga terdapat perbedaan yang signifikan.

Lampiran 4.3 Analisis Data Luas Daerah Akumulasi GAG

4.3.1 Uji Normalitas *Saphiro Wilk*

Tests of Normality							
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Waktu Inkubasi	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Luas Area	CM 7	.361	3	.	.807	3	.132
	CM 14	.194	3	.	.997	3	.888
	CM 21	.264	3	.	.955	3	.591
	CM 28	.294	3	.	.921	3	.455
	Kondro 7	.333	3	.	.861	3	.272
	Kondro 14	.300	3	.	.913	3	.427
	Kondro 21	.188	3	.	.998	3	.910
	Kondro 28	.256	3	.	.962	3	.623

a. Lilliefors Significance Correction

Kesimpulan:

Berdasarkan hasil uji normalitas dengan *Saphiro Wilk* didapatkan nilai signifikansi $>0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa data berdistribusi normal.

4.3.2 Uji Homogenitas *Levene Test*

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Luas Area	Based on Mean	.695	7	16	.676
	Based on Median	.184	7	16	.985
	Based on Median and with adjusted df	.184	7	9.892	.982
	Based on trimmed mean	.642	7	16	.715

Kesimpulan:

Berdasarkan hasil uji homogenitas didapatkan nilai signifikansi $0,676(>0,05)$ sehingga dapat disimpulkan bahwa sebaran data homogen.

4.3.3 Uji Beda *One Way Anova*

ANOVA					
Luas Area					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.914	7	.845	3.868	.012
Within Groups	3.495	16	.218		
Total	9.409	23			

Kesimpulan:

Berdasarkan hasil uji statistic non-parametrik dengan *One Way ANOVA* sebagai uji beda, didapatkan nilai signifikansi $0,012 (<0,05)$ sehingga dapat disimpulkan bahwa H_0 ditolak. Artinya terdapat perbedaan intensitas penyerapan warna. Dilakukan uji lanjutan dengan *LSD*

4.3.4 Uji Lanjutan LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Luas Area
LSD

(I) Waktu Inkubasi	(J) Waktu Inkubasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound	
CM 7	CM 14	-.69333	.38160	.088	-1.5023	.1156	
	CM 21	-.96000*	.38160	.023	-1.7690	-.1510	
	CM 28	-.33667	.38160	.391	-1.1456	.4723	
	Kondro 7	.56000	.38160	.162	-.2490	1.3690	
	Kondro 14	-.14667	.38160	.706	-.9556	.6623	
	Kondro 21	-.65000	.38160	.108	-1.4590	.1590	
CM 14	CM 28	.36333	.38160	.355	-.4456	1.1723	
	CM 7	.69333	.38160	.088	-.1156	1.5023	
	CM 21	-.26667	.38160	.495	-1.0756	.5423	
	CM 28	.35667	.38160	.364	-.4523	1.1656	
	Kondro 7	1.25333*	.38160	.005	.4444	2.0623	
	Kondro 14	.54667	.38160	.171	-.2623	1.3556	
Kondro 14	Kondro 21	.04333	.38160	.911	-.7656	.8523	
	Kondro 28	1.05667*	.38160	.014	.2477	1.8656	
	CM 21	CM 7	.96000*	.38160	.023	.1510	1.7690
		CM 14	.26667	.38160	.495	-.5423	1.0756
		CM 28	.62333	.38160	.122	-.1856	1.4323
		Kondro 7	1.52000*	.38160	.001	.7110	2.3290
Kondro 14		.81333*	.38160	.049	.0044	1.6223	
Kondro 21		.31000	.38160	.429	-.4990	1.1190	
Kondro 21	Kondro 28	1.32333*	.38160	.003	.5144	2.1323	
	CM 28	CM 7	.33667	.38160	.391	-.4723	1.1456
		CM 14	-.35667	.38160	.364	-1.1656	.4523
		CM 21	-.62333	.38160	.122	-1.4323	.1856
		Kondro 7	.89667*	.38160	.032	.0877	1.7056
		Kondro 14	.19000	.38160	.625	-.6190	.9990
Kondro 21		-.31333	.38160	.424	-1.1223	.4956	
Kondro 7	Kondro 28	.70000	.38160	.085	-.1090	1.5090	
	CM 7	-.56000	.38160	.162	-1.3690	.2490	
	CM 14	-1.25333*	.38160	.005	-2.0623	-.4444	
	CM 21	-1.52000*	.38160	.001	-2.3290	-.7110	
	CM 28	-.89667*	.38160	.032	-1.7056	-.0877	
	Kondro 14	-.70667	.38160	.083	-1.5156	-.1023	
Kondro 14	Kondro 21	-1.21000*	.38160	.006	-2.0190	-.4010	
	Kondro 28	-.19667	.38160	.613	-1.0056	.6123	
	CM 7	-.14667	.38160	.706	-.6623	.9556	
	CM 14	-.54667	.38160	.171	-1.3556	.2623	
	CM 21	-.81333*	.38160	.049	-1.6223	-.0044	
	CM 28	-.19000	.38160	.625	-.9990	.6190	
Kondro 21	Kondro 7	.70667	.38160	.083	-.1023	1.5156	
	Kondro 14	-.50333	.38160	.206	-1.3123	.3056	
	Kondro 28	.51000	.38160	.200	-.2990	1.3190	
	CM 7	.65000	.38160	.108	-.1590	1.4590	
	CM 14	-.04333	.38160	.911	-.8523	.7656	
	CM 21	-.31000	.38160	.429	-1.1190	.4990	
Kondro 28	CM 28	.31333	.38160	.424	-.4956	1.1223	
	Kondro 7	1.21000*	.38160	.006	.4010	2.0190	
	Kondro 14	.50333	.38160	.206	-.3056	1.3123	
	Kondro 28	1.01333*	.38160	.017	.2044	1.8223	
	CM 7	-.36333	.38160	.355	-1.1723	.4456	
	CM 14	-1.05667*	.38160	.014	-1.8656	-.2477	
Kondro 7	CM 21	-1.32333*	.38160	.003	-2.1323	-.5144	
	CM 28	-.70000	.38160	.085	-1.5090	.1090	
	Kondro 14	.19667	.38160	.613	-.6123	1.0056	
	Kondro 21	-.51000	.38160	.200	-1.3190	.2990	
	Kondro 28	-1.01333*	.38160	.017	-1.8223	-.2044	

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

Tabel 4.4 Hasil uji *LSD* berdasarkan waktu pengamatan

	MT 7	MT14	MT 21	MT 28	KS 7	KS 14	KS 21	KS 28
MT 7		0,088*	0,023*	0,391	0,162	0,706	0,108	0,355
MT 14			0,495	0,364	0,005*	0,171	0,911	0,014*
MT 21				0,122	0,001*	0,049*	0,429	0,003*
MT 28					0,032*	0,625	0,424	0,085*
KS 7						0,083*	0,006*	0,613
KS 14							0,206	0,200
KS 21								0,017*
KS 28								

* $p < 0,05$: Rata-rata luas daerah akumulasi GAG memiliki perbedaan yang signifikan

$p > 0,05$: Rata- luas daerah akumulasi GAG tidak memiliki perbedaan yang signifikan

MT 7 : Medium terkondisi (DMEM+FBS) hari ke-7

MT 14 : Medium terkondisi (DMEM+FBS) hari ke-14

MT 21 : Medium terkondisi (DMEM+FBS) hari ke-21

MT 28 : Medium terkondisi (DMEM+FBS) hari ke-28

KS 7 : Medium kondrogenik standar hari ke-7

KS 14 : Medium kondrogenik standar hari ke-14

KS 21 : Medium kondrogenik standar hari ke-21

KS 28 : Medium kondrogenik standar hari ke-28