

## COMBINATION OF DECIDUAL DENTAL STEM CELL AND PLATELET RICH PLASMA IN FIBROBLAST FORMATION IN THE JAWBONE REGENERATION OF WISTAR RATS

Ade Ismail\*, Rahmawati Sri Praptiningsih\*\*, Muhammad Naufal\*\*\*

\*Departemen Periodontologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Islam Sultan Agung

\*\*Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Islam Sultan Agung

\*\*\*Program Studi Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Islam Sultan Agung

Correspondence: [ade@unissula.ac.id](mailto:ade@unissula.ac.id)

### Keywords:

Fibroblast; SHED; PRP; Orthodontic tooth movement; Alveolar bone regeneration

### ABSTRACT

**Background:** Orthodontic tooth movement is caused by mechanical forces that cause pseudo-inflammation with the result that FGF (Fibroblast Growth Factors) was activated. The combination of SHED (Stem Cell From Human Exfoliated Deciduous Teeth) and PRP (Platelet Rich Plasma) hydrogels can affect the formation of fibroblast in the alveolar bone regeneration. The purpose of this study is the effect determination of SHED and PRP hydrogels for fibroblast formation in alveolar bone regeneration in wistar rats.

**Method:** An experimental study was held using post-test only control group design. There were four groups, namely the PRP hydrogel group, the SHED hydrogel group, the SHED and PRP hydrogel group, and the povidone iodine group (n=8) treated with orthodontic tooth movement. Their mandibular tissue was made as histological slide, and the FGF expression were observed microscopically with 100x magnification. The data analyzed by ANNOVA and LSD test.

**Result:** There was a significant effect of the combination of SHED and PRP hydrogel in ordering fibroblast in alveolar bone regeneration by ANNOVA test 0.001 (<0.05). This is because SHED and PRP are able to stimulate FGF expression through external stimulation.

**Conclusion:** It concluded that the combination of SHED and PRP hydrogel affected fibroblast formation on alveolar bone regeneration in wistar rats.

### PENDAHULUAN

Pergerakan ortodontik dapat menimbulkan reaksi inflamasi pada *tension side* dan *pressure side* yang diinduksi oleh zat sitokin, sel leukosit, sel monosit, dan sel makrofag pada jaringan periodontal setelah proses inflamasi selesai. Tahap selanjutnya yaitu proliferasi yang melibatkan sel-sel baru berupa fibroblas, osteoblas, dan osteoklas. Akan tetapi, pergerakan ortodontik membutuhkan waktu yang lama yaitu sekitar pada hari ke-14 setelah inflamasi. Inflamasi ini terjadi pada jaringan periodontal dan tulang alveolar (1).

Pada *periodontal remodeling*, inflamasi pada pergerakan ortodontik melibatkan sel-sel yang sama, yaitu sel-sel inflamasi hingga proses pengurangan dan pembentukan tulang. Terdapat stem cell yang dapat membantu regenerasi tulang secara mutakhir yaitu *Mesencymal Stem Cells* (MSCs). Hampir keseluruhan MSCs dapat menginduksi regenerasi jaringan periodontal yang diantaranya *dental Pulp Stem Cells* (DPSCs), *Dental Folicle Stem Cells* (DFSCs), *Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth* (SHEDs), dan *non-dental stem cell* yaitu *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells* (BMMSCs), *Adipose-Derived Stem Cells* (ADSCs), *Embryonic Stem*

*Cells* (ESCs), *Induced Pluripotent Stem Cells* (iPSCs). Penelitian ini menggunakan MSCs jenis SHEDs karena SHEDs mempunyai kemampuan *multipotent* yang baik dan berproliferasi yang tinggi (2). Diharapkan dengan membuat formulasi obat dengan SHEDs dapat mempercepat proses pergerakan ortodontik. Hal ini telah diperkuat dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan objek yang sama tetapi zat aktifnya sedikit berbeda yaitu menggunakan kombinasi dari *chitosan* dan PRP (*Platelet Rich Plasma*) (3)

Berdasarkan penelitian sebelumnya terbukti bahwa kombinasi *Chitosan* dan PRP dapat menghambat proses resorpsi tulang dan menginduksi regenerasi tulang alveolar gigi. Kitosan merupakan zat aktif berupa kitin yang memiliki kemampuan osteokonduktif, biokompatibel, biodegradasi, proliferasi sel, antimikroba, antioksidan, anti tumor, dan menstimulasi *growth factor*. PRP adalah bagaian dari darah berupa plasma yang kaya akan platelet dan *growth factor* yang dapat menstimulasi terbentuknya sel osteoprogenitor yang berdiferensiasi menjadi osteoblast yang nantinya osteoblast akan membentuk struktur tulang sebagai *bone remodeling* (3). Akan tetapi terdapat kekurangan dalam penelitian tersebut yaitu kombinasi antara zat aktif khususnya PRP dan hidrogelnya kurang bagus sehingga berakibat zat aktif tidak dapat bekerja dengan baik (3). Oleh karena itu peneliti mengganti basis gel dengan kombinasi yang lebih baik sehingga masalah pada penelitian sebelumnya diharapkan dapat terselesaikan pada penelitian ini. Zat aktif Kitosan diganti dengan SHEDs yang memiliki sifat hampir sama. SHEDs merupakan sel punca yang berasal dari pulpa gigi desidui yang memiliki potensi *adipogenic*, *chondrogenic*, *myogenic*, *neurogenic*, *dentinogenic*, *osteoinductive*, dan *osteogenic*. Kemampuan *osteoinductive* dan *osteogenic* dari

SHED akan digunakan pada regenerasi tulang alveolar (2).

Berdasarkan penjelasan tersebut, peneliti akan meneliti efek dari kombinasi SHED dan PRP dalam bentuk hidrogel untuk membentuk jaringan lunak pada tikus wistar jantan melalui pembentukan fibroblas.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh hidrogel kombinasi SHED dan PRP guna pembentukan fibroblas pada regenerasi tulang alveolar tikus wistar jantan. Manfaat dalam penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai pengaruh hidrogel SHED dan PRP sehingga dapat digunakan sebagai regenerasi tulang alveolar selama pergerakan gigi ortodontik.

## METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian ini merupakan eksperimental laboratoris dengan *post-test only control group design*. Sampel penelitian ini berjumlah 32 ekor tikus Wistar yang dibagi menjadi 4 kelompok secara *random sampling*. Masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor tikus Wistar yang diberi perlakuan berbeda. Kelompok 1 hidrogel PRP, kelompok 2 hidrogel SHED, kelompok 3 hidrogel kombinasi SHED dan PRP, dan kelompok 4 povidone iodine.

**Hidrogel PRP** : PRP didapatkan langsung dari isolasi darah vena mata tikus wistar menggunakan spuit sebanyak 1 ml. Selanjutnya, sebanyak 10 ml darah hasil isolasi dimasukan pada *tube* yang berisi EDTA lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000rpm selama 15 menit untuk menghilangkan sel darah merah (RBC). Dari sentrifus didapatkan PRP sebanyak 10% dari total volume darah. Carbomer 0,75 g dilarutkan dalam 100ml aquades, didiamkan selama 1 hari. Kemudian ditambahkan propilenglikol dan triethanolamine sebanyak 5 tetes serta 1ml plasma,

lalu dihomogenkan dengan *mixing applicator* sampai membentuk hidrogel PRP selama 30 – 60 detik. Sebelum diaplikasikan, hidrogel PRP disimpan dalam suhu -20°C.

**Hidrogel SHED** : Isolasi gigi desidui yang telah diekstraksi kemudian disimpan dalam vial yang berisi larutan hipotonik *phosphate buffered saline* 10%. Gigi tersebut didesinfeksi dengan DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*) sebanyak 3 kali. Lalu jaringan pulpa diambil dengan forcep atau dental ekskavator. Kemudian jaringan pulpa dilarutkan dalam 3 mg/mL kolagenase tipe I dan dispase selama 45 menit pada suhu 37°C, lalu diberikan 3ml  $\alpha$ -MEM, 10% Fetal Bovine Serum, dan 1% Penicillin atau Streptomycin. Kemudian disentrifuse dengan kecepatan 1200rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi *cell pellets* dikultur dalam suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> dalam  $\alpha$ -MEM. Carbomer 0,75 g dilarutkan dalam 100ml aquades, lalu didiamkan selama 1 hari. Kemudian ditambahkan propilenglikol dan triethanolamine sebanyak 5 tetes serta 1ml SHED hasil *thawing*, lalu dihomogenkan dengan *mixing applicator* sampai membentuk hidrogel SHED selama 30 – 60 detik. Sebelum diaplikasikan, hydrogel SHED disimpan dalam suhu -20°C.

**Gel kombinasi SHED dan PRP** : Isolasi gigi desidui yang telah diekstraksi kemudian disimpan dalam vial yang berisi larutan hipotonik *phosphohate buffered saline* 10%. Gigi tersebut didesinfeksi dengan DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline*) sebanyak 3 kali. Lalu mengambil jaringan pulpa dengan forcep atau dental ekskavator. Kemudian jaringan pulpa dilarutkan dalam 3 mg/mL kolagenase tipe I dan dispase selama 45 menit pada suhu 37°C, lalu diberikan 3ml  $\alpha$ -MEM, 10% Fetal Bovine Serum, dan 1% Penicillin atau Streptomycin. Kemudian

disentrifugasi dengan kecepatan 1200rpm selama 5 menit. Hasil sentrifugasi *cell pellets* dikultur dalam suhu 37 dan 5% CO<sub>2</sub> dalam  $\alpha$ -MEM. Isolasi PRP didapatkan langsung dari isolasi darah vena mata tikus wistar menggunakan spuit sebanyak 1 ml. Selanjutnya sebanyak 10 ml darah hasil isolasi dimasukan pada *tube* yang berisi EDTA lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000rpm selama 15 menit untuk menghilangkan sel darah merah (RBC). Dari sentrifus didapatkan PRP sebanyak 10% dari total volume darah. Carbomer 0,75 g dilarutkan dalam 100 ml aquades, lalu didiamkan selama 1 hari. Kemudian ditambahkan propilenglikol dan triethanolamine sebanyak 5 tetes serta 1 ml SHED hasil *thawing* dan 1ml PRP, lalu dihomogenkan dengan *mixing applicator* sampai membentuk hidrogel kombinasi SHED dan PRP selama 30–60 detik. Sebelum diaplikasikan hidrogel kombinasi SHED dan PRP disimpan dalam suhu -20°C.

**Perlakuan Hewan Coba** : Sebanyak 32 ekor tikus wistar jantan dengan usia 30 – 60 hari dan memiliki berat badan 115 – 150g yang diadaptasikan dalam kandang dengan ukuran 40cm x 30cm x 25cm, temperature dalam ruangan 20 – 28°C, serta kelembapan 60 – 10% dengan siklus cahaya selama 12 jam terang/gelap. Sebelum dilakukan perlakuan, tikus wistar diberikan general anetesi Ketamin sebanyak 0,01 ml. selanjutnya *blade* no 15 digunakan untuk memisahkan jaringan ikat dengan perlekatannya pada gigi insisivus. Kemudian gigi digerakkan kerah lingual/palatal, bukal/labial, dan rotasi menggunakan forcep. Gigi insisivus yang telah goyang kemudian dililitkan *ligator silk* 0,3mm ke dalam sulkus gingiva. Setelah 14 hari, *ligator silk* diambil lalu hidrogel diaplikasikan kedalam sulkus gingiva dengan menginjeksikan satu kali selama periode penelitian ke dalam sulkus gingiva sebanyak 0,2ml.

**Pembuatan dan pembacaan preparat :**

Setelah dilakukan pemotongan rahang, jaringan diisolasi lalu difiksasi untuk mencegah perubahan jaringan. Diberikan larutan NBF (Neutral Buffered Formalin) 10% agar jaringan tetap awet. Kemudian, jaringan didekalsifikasi selama 1 bulan menggunakan larutan EDTA yang diganti setiap 3 hari sekali sampai dekalsifikasi sempurna. Lalu jaringan dilanjutkan sampai menghasilkan blok paraffin. Blok paraffin dipotong dengan *rotary microtom* dengan ketebalan 3 – 4 $\mu$ , lalu potongan dimasukkan ke dalam *water bath* dengan suhu 40°C untuk menghilangkan sisa paraffin dan ditiriskan. Lalu dilanjutkan pewarnaan *Hematoxilin Eosin* (HE)

Pembacaan jumlah fibroblas pada jaringan dilakukan secara mikroskopis dengan pembesaran 100x dalam 5 lapang pandang.

**Analisis Hasil :** Perhitungan pada masing-masing kelompok terhadap uji statistik ekspresi FGF dilakukan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* sebagai uji normalitas sampel kurang dari 50 dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene Statistic*. Karena didapatkan data terdistribusi normal dan varian data yang homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way ANOVA* dengan analisis data menggunakan program SPSS. Untuk mengetahui kelompok yang memiliki intervensi yang paling berpengaruh terhadap peningkatan jumlah *fibroblast* dilanjutkan uji *Post Hoc LSD*.

**HASIL PENELITIAN**

Hasil pemeriksaan pada masing-masing kelompok terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan tulang alveolar selama 14 hari akibat pergerakan gigi ortodontik sebagai berikut.

**Tabel 1. Rerata Jumlah Fibroblas dalam Kelompok Perlakuan**

No	Kelompok	Jumlah	Mean $\pm$ SD
1	Hidrogel PRP	8	513,65 $\pm$ 190,7
2	Hidrogel SHED	8	629,57 $\pm$ 254,2
3	Hidrogel Kombinasi SHED dan PRP	8	883,8 $\pm$ 173,0
4	Povidone Iodine	8	703,62 $\pm$ 231,3

Berdasarkan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene Statistic* didapatkan hasil rerata data yang terdistribusi normal dan varian data yang homogen,  $p > 0,05$ , sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji *One Way ANOVA*.

**Tabel 2. Hasil Uji One Way ANOVA**

Kelompok	Jumlah Fibroblas	Sig.
	Mean $\pm$ SD	
Hidrogel PRP	513,65 $\pm$ 190,7	0,001
Hidrogel SHED	629,57 $\pm$ 254,2	
Hidrogel Kombinasi SHED dan PRP	883,8 $\pm$ 173,0	
Povidon Iodine	703,62 $\pm$ 231,3	

Berdasarkan uji *One Way ANOVA* (Tabel 2) didapatkan nilai  $p = 0,015$  maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada perlakuan antar kelompok. Hasil pengukuran rerata jumlah fibroblas menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rerata presentasi ekspresi FGF di antara keempat kelompok. Untuk mengetahui perbedaan bermakna antarkelompok, maka dilakukan analisis uji *post-hoc LSD*.

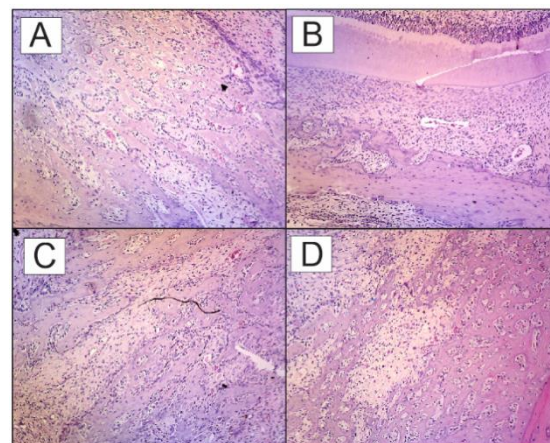
**Tabel 3. Hasil Uji Post Hoc LSD**

Kelompok		Mean Difference (*)	P Sig.
Hidrogel PRP	Hidrogel SHED	-115,92	0,290

	Hidrogel Kombinasi SHED dan PRP	-370,20*	0,002
	Povidon Iodine	-189,97	0,088
Hidrogel SHED	Hidrogel PRP	115,92	0,290
	Hidrogel Kombinasi SHED dan PRP	-254,27*	0,025
	Povidon Iodine	-74,05	0,496
Hidrogel Kombinasi SHED dan PRP	Hidrogel PRP	370,20*	0,002
	Hidrogel SHED	254,27*	0,025
	Povidon Iodine	180,22	0,104
Povidon Iodine	Hidrogel PRP	189,97	0,088
	Hidrogel SHED	74,05	0,496
	Hidrogel Kombinasi SHED dan PRP	180,22	0,104

Hasil pada tabel 3 menunjukkan terdapat perbedaan pada kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol terhadap jumlah *fibroblast* dengan nilai signifikan  $p > 0,05$ . Jika nilai signifikan  $p < 0,05$ , maka tidak terdapat signifikan dalam peningkatan jumlah fibroblas.

Hasil pengamatan histologis jumlah fibroblas selama pergerakan gigi ortodontik setelah aplikasi 14 hari pada kelompok perlakuan didominasi oleh warna coklat pada sitoplasma sel. Sementara itu jumlah fibroblas pada kelompok kontrol didominasi oleh warna biru pada gambar 1 dibawah ini.



**Gambar 1.** Jumlah *Fibroblast* dengan perbesaran 100X pada bagian trabekula dan tulang kompak A) Jumlah *fibroblast* pada kelompok hidrogel PRP B) Jumlah *fibroblast* pada kelompok hidrogel SHED C) Jumlah *fibroblast* pada kelompok kombinasi hidrogel SHED dan PRP D) Jumlah *fibroblast* kelompok kontrol

## DISKUSI

Berdasarkan hasil uji beda terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Hal itu menunjukkan bahwa pemberian hidrogel kombinasi SHED dan PRP yang diamati selama 14 hari dapat menaikkan jumlah fibroblas secara bermakna. Hal ini relevan dengan pendapat yang dikemukakan oleh (4) yang menyatakan bahwa peran fibroblast yang diinduksi melalui FGF dalam pembentukan tulang adalah membantu dalam membentuk matriks ekstraseluler yang nantinya akan mengalami kalsifikasi menjadi struktur tulang. Pada fase proliferasi, matriks mensekresikan beberapa gen yaitu prokolagen, fibronectin, (*bone morphogenetic protein*) BMP (2,4,dan 6), TGF  $\beta$ 1, dan  $\beta$ -integrin. Fungsi TGF- $\beta$ 1 juga menstimulasi terbentuknya kolagen tipe I yang dibutuhkan pada proses selanjutnya (5). Proses remodeling diperkaya oleh MMP, osteopontin, FGF-R1 (*Fibroblast Growth Factor-Receptor 1*) dan PDGFR- $\alpha$  (*Platelet Derived*

*Growth Factor Receptor- $\alpha$* ). Proses mineralisasi fibroblas tidak memiliki peran. Komponen yang mendominasi pada proses ini adalah gen osteokalsin, osteopontin dan MMP (4).

Di antara gen tersebut terdapat sitokin dan kemokin. Sitokin yang berperan dalam proses tersebut didapat dari PRP antara lain PDGF memiliki fungsi sinergis dengan IGF-1 meningkatkan sintesis protein, matriks ekstraseluler, dan kolagenase secara umum. Sitokin dan *growth factors* (GFs) berasal dari P-granul yang didegradasi dari beberapa sitokin dan GFs tersebut. Terdapat TGF- $\beta$ 1 dan FGF yang memiliki peran dalam regenerasi jaringan lunak (6).

Kelompok hidrogel kombinasi SHED dan PRP memiliki perbedaan pengaruh yang signifikan terhadap proses regenerasi tulang rahang tikus wistar selama pergerakan ortodontik. Pada tabel 2 jumlah fibroblas yang terdeteksi pada kelompok hidrogel SHED dan PRP lebih tinggi dibandingkan dengan rerata jumlah fibroblas pada kelompok hidrogel PRP, hidrogel SHED dan povidone iodine. Hal ini disebabkan kombinasi SHED dan PRP dapat mempercepat pembentukan matriks tulang yang dinilai dari jumlah fibroblas.

Hidrogel PRP akan mengalami degranulasi dan menghasilkan *growth factor* yang berperan sebagai salah satu gen untuk membentuk matriks tulang. Akan tetapi efek yang ditimbulkan tidak sebesar hidrogel kombinasi. Hal ini disebabkan oleh karena SHED yang dikombinasikan dengan PRP akan lebih cepat membentuk matriks tulang (7).

Sementara itu hidrogel SHED hanya berperan melalui pembentukan matriks kolagen melalui *bone-like nodule* tanpa stimulasi dari GFs (8). SHED bermigrasi dan menginvasi melalui pembuluh kapiler lalu berdiferensiasi menjadi fibroblast untuk membentuk matriks tulang dan juga dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas dengan

membentuk *bone-like nodule formation* yang penyusunnya juga terdapat jaringan fibroblastik. Dalam membentuk jaringan tulang, SHED mengalami tiga tahap yaitu proliferasi, *Extracellular Matrix (ECM) remodeling*, dan *ECM mineralization*. Akan tetapi kerja dari *bone-like nodule* akan kurang efektif dikarenakan tidak adanya stimulasi dari *growth factors* (4).

Povidone iodine bekerja pada tahap *blood coagulation and inflammation phase* dari penyembuhan luka periodontal. Kerja dari povidone yaitu sebagai antiseptik dan antimikroba sehingga povidone hanya membantu kinerja dari makrofag sehingga tubuh dapat mempercepat proses penjendalan darah. Oleh karena itu efek pemberian povidone dalam kelompok kontrol hanya membantu makrofag (9).

Penelitian ini memiliki keterbatasan berupa ketahanan *stem cell*. Selama 24 jam setelah sel dicampurkan oleh bahan gel, sediaan tidak dapat disimpan, sehingga harus segera di aplikasikan kedalam hewan coba. Jadi penelitian ini membuktikan bahwa MSCs jenis SHED dapat meningkatkan sintesis matriks tulang yang kita nilai melalui jumlah fibroblas.

## KESIMPULAN

Pemberian hidrogel kombinasi SHED dan PRP guna pembentukan fibroblas lebih efektif dalam meningkatkan jumlah fibroblas tikus wistar jantan pada regenerasi tulang alveolar selama pergerakan gigi ortodontik dibandingkan hidrogel PRP dan hidrogel SHED.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang turut membantu dalam penelitian ini, khususnya kepada institusi peneliti yaitu Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Islam Sultan Agung.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Li Y, Jacox LA, Little SH, and Ko CC. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. 2018; 34 (4), 207-214.
2. Wang LHYLS. Stem cell- based tooth and periodontal regeneration. 2018;(May 2017):696–705.
3. Maryani I, Rochmah YS, Parmana AD. analisis gel kombinasi platelet rich plasma dan chitosan terhadap peningkatan jumlah osteoblas sebagai bone regeneration. 2018;5:89–96.
4. Carolina S. Tissue Engineering and Regenerative Medicine tissue engineering and regenerative medicine Concise Review: In Vitro Formation of Bone - Like Nodules Sheds Light on the Application of Stem Cells for Bone Regeneration. 2016;1587–93.
5. Smith PC, Martínez C, Martínez J, Mcculloch CA, Smith PC. Role of Fibroblast Populations in Periodontal Wound Healing and Tissue Remodeling. 2019;10(April).
6. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: *History, Biology, Mechanism of Action, and Classification*. 2018;18–24.
7. Tehranian A, Esfehni-mehr B, Pirjani R, Rezaei N, Sadat S, Sepidarkish M. Application of Autologous Platelet-Rich Plasma ( PRP ) on Wound Healing After Caesarean Section in High-Risk Patients. 2016;18(7).
8. Charoenlarp P, Rajendran AK, Iseki S. Role of fibroblast growth factors in bone regeneration. 2017;19:1–7.
9. Lorenz P, Abdul S, Alsagoff L, El-kafrawi HY, Pyon J, and Tse C. Povidone iodine in wound healing: A review of current concepts and practices. *Int Jour Surg*.2017.06.073