

**PENGARUH PEMAKAIAN SEL BERINTI TUNGGAL
ISOLAT DARAH TEPI TERHADAP REGENERASI
JARINGAN PERIODONTAL**

Uji Klinik Randomisasi pada Kasus Periodontitis Kronis

Oleh:

Mochamad Orliando Roeslan

TESIS

**DIAJUKAN UNTUK MEMENUHI SEBAGIAN DARI
PERSYARATAN GUNA MEMPEROLEH GELAR
MAGISTER BIOMEDIK ORAL**

No KLAS :	617 632/Noe/p
No INDIK :	1/000140/112e/
TG TERIMA :	20 Des 2011
HADIANBGL Rp.	
DARI :	



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS TRISAKTI
2011**

**PENGARUH PEMAKAIAN SEL BERINTI TUNGGAL
ISOLAT DARAH TEPI TERHADAP REGENERASI
JARINGAN PERIODONTAL**

Uji Klinik Randomisasi pada Kasus Periodontitis Kronis

Tesis ini telah diuji tanggal : 29 September 2010

Tim Penguji:

Ketua

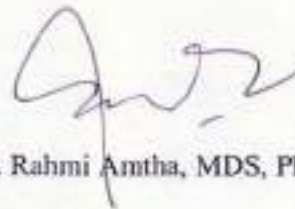


(Prof. Dr. drg. Loes D. Sjahrudin, MKes)

Anggota



(Prof. drg. Ferry Sandra, PhD.)



(drg. Rahmi Amtha, MDS, PhD.)



(Dr. Erni Erfan, SPd, MBIomed)

**PENGARUH PEMAKAIAN SEL BERINTI TUNG GAL
ISOLAT DARAH TEPI TERHADAP REGENERASI
JARINGAN PERIODONTAL**

Uji Klinik Randomisasi pada Kasus Periodontitis Kronis

Tesis ini telah diperiksa dan disetujui

Tanggal: 23 Februari 2011

Pembimbing Utama



(Prof. DR. drg. Bambang S.T., M.Biomed)

Pembimbing I,



(Prof. drg. Ferry Sandra, PhD.)

Pembimbing II



(drg. Setyohadi Sp.Perio)

Program Pascasarjana

Direktur,



(Prof. Dr. Thoby Mutis)

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT, Tuhan seluruh sekalian alam, yang telah memberi kekuatan dan jalan terang kepada saya. Hanya atas perkenan dan ridho-Nya penelitian dan tesis ini dapat saya selesaikan. Shalawat dan salam semoga dilimpahkan kepada Nabi Besar Muhammad s.a.w., Nabi pembawa rahmat dan penghulu sekalian umat. Demikian juga kepada keluarga dan para sahabatnya, para pembimbing umat menuju kebenaran.

Orang tua saya Prof. Dr. drg. H. Boedi Oetomo Roeslan, MBiomed, FISID, FICD dan Hj. Ramalaini Farsicha, merupakan dua orang pertama saya harus berterima kasih. Berkat teladan, bimbingan, dan pendidikan disertai kasih sayang yang diberikan mereka saya bisa memperoleh pendidikan dan ilmu pengetahuan ini.

Banyak hambatan yang saya hadapi dalam menyelesaikan penelitian untuk tesis ini. Namun berkat nasehat, bimbingan, petunjuk, dan bantuan yang sangat berharga yang diberikan oleh berbagai pihak, tesis ini akhirnya dapat saya selesaikan. Sehubungan dengan itu, saat inilah merupakan kesempatan yang baik bagi saya untuk menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan kepada semua pihak yang ikut mengantarkan saya menyelesaikan penelitian untuk tesis ini.

Ucapan terima kasih dan penghargaan saya sampaikan kepada Prof. Dr. drg. Bambang S. Trenggono, MBiomed., Prof. drg. Ferry Sandra, PhD., dan drg. Setyohadi Sp.Perio, selaku dosen pembimbing yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, saran serta petunjuk dalam penulisan tesis ini.

Terima kasih kepada seluruh tim Penguji Prof. Dr. drg. Loes D. Sjahrudin MKes, drg. Rahmi Amtha, MDS, PhD., Dr. Erni Erfan SPd, MBiomed. dan Prof. drg. Ferry Sandra, PhD., yang telah meluangkan waktu untuk menguji tesis ini.

Terima kasih serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada Prof. Dr. drg. Boedi Oetomo Roeslan, MBiomed, FISID, FICD selaku Ketua Program Magister Ilmu Kedokteran Gigi, drg. Rahmi Amtha, MDS, PhD, selaku Koordinator beserta seluruh staf pengajar Program Magister Konsentrasi Biomedik Oral Universitas Trisakti atas semua bimbingan yang telah diberikan.

Terima kasih kepada RSGM(P) FKG Usakti dan *Stem Cell and Cancer Institute* (SCI) yang telah mengijinkan tempat dan fasilitasnya dipakai untuk melakukan

penelitian. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Laura, Camy, dan Agnes, yang telah membantu dalam melakukan penelitian di SCL.

Ucapan terima kasih juga saya tujukan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti Prof. Dr. drg. Melanie S. Djamil MBIomed Dan dekan FKG Usakti periode sebelumnya Prof. Dr. drg. Bambang S. Trenggono, MBIomed atas kesempatan yang diberikan untuk saya mengikuti program magister.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada seluruh staf FKG Usakti, terutama di Bagian Histologi, Drs. Del Afriadi MBIomed. dan Komariah Ssi, MBIomed. yang telah memberi semangat dan dukungan moril selama mengikuti program magister.

Untuk istriku tercinta Restia Wulandari yang sudah selalu setia mendampingiku dalam suka dan duka serta selalu mendukungku, sulit mencari kata-kata yang dapat mewakili rasa sayang, hormat dan terima kasihku. Hanya doaku, semoga Allah SWT melimpahkan rahmat dan berkah-Nya bagimu.

Juga untuk kakak-kakakku tercinta Rollando Roeslan, Puti Annisa Moeloek, Farliando Roeslan, dan Yasmina Samiudin yang telah memberikan dukungan dalam proses penulisan tesis ini,

Ucapan terima kasih dihaturkan juga kepada seluruh teman sejawat, se-angkatan S2 yang telah membantu M. Ihsan Rizal, drg., MBIomed., Ciptadhi Tri Oka, drg., MBIomed. dan Armelia Sari, drg., MBIomed., dan seluruh teman-teman di program magister ortodontik.

Akhirnya, kepada semua pihak yang telah membantu saya, baik secara moril maupun materiil, baik langsung maupun tidak, hingga tesis ini dapat saya selesaikan, saya hanya bisa memohon kepada Allah SWT agar semuanya diberi karunia yang berlipat ganda sesuai dengan amal perbuatannya. Amin.

Jakarta, Februari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	viii
DAFTAR SINGKATAN.....	ix
DAFTAR LAMBANG.....	x
ABSTRAK.....	xi
<i>ABSTRACT</i>	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan.....	3
D. Manfaat.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
A. Penyakit Periodontal.....	4
B. Regenerasi Jaringan Periodontal.....	6
C. PBMNCs.....	8
D. PBMNCs untuk Regenerasi Jaringan Periodontal.....	10
BAB III. KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	12
A. Kerangka Teori.....	12
B. Kerangka Konsep.....	14
C. Hipotesis.....	14
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	15
A. Jenis Penelitian.....	15
B. Subyek, Sampel, dan Jumlah Ulangan.....	15
C. Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	16

D. Variabel Penelitian.....	16
E. Definisi Operasional Variabel.....	16
F. Alat dan Bahan	17
G. Cara Kerja.....	18
BAB V. HASIL PENELITIAN.....	23
A. Gambaran Umum.....	23
B. Penurunan Kedalaman Poket Periodontal.....	23
C. Analisa perbaikan kedalaman poket pada subyek	25
D. Peningkatan pertumbuhan tulang alveolar.....	25
BAB VI. PEMBAHASAN.....	29
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
<i>SUMMARY</i>	36
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Beberapa molekul yang teridentifikasi di sementum dan aktivitasnya.....	8
2. Analisa perbaikan kedalaman poket pada subyek.....	26
3. Uji normalitas data kedalaman poket periodontal dengan uji Kolmogorov-Smirnov	57
4. Hasil uji homogenitas data kedalaman poket periodontal antara dua kelompok sebelum perlakuan memakai uji-t.....	57
5. Hasil uji hipotesis penurunan kedalaman poket periodontal.....	57
6. Uji normalitas penambahan tulang dengan uji Kolmogorov-Smirnov.....	57
7. Hasil uji homogenitas data penambahan tulang antara dua kelompok sebelum perlakuan memakai uji-t.....	58
8. Hasil uji hipotesis peningkatan pertumbuhan tulang alveolar.....	58
9. Tabel induk.....	60
10. Hasil kemajuan kedalaman poket dan pertumbuhan tulang.....	62

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Skema kerangka teori. Periodontitis disebabkan oleh iritasi lokal. Penyakit sistemik juga ada yang bermanifestasi di jaringan periodontal atau memperparah periodontitis. Untuk mempercepat regenerasi jaringan periodontal dilakukan kuretase ditambah transplantasi sel berinti tunggal.....	13
2. Kerangka konsep penelitian. Sel berinti tunggal dari darah tepi yang ditransplantasikan dapat meregenerasi jaringan periodontal.....	14
3. Sebagian alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian. A. <i>Biosafety Cabinet</i> ; B. Alat sentrifugasi; C. Mikroskop <i>inverted</i> ; D. Ficoll-Paque Premium.....	18
4. Alur penelitian. Darah tepi pasien diambil sebanyak 10 mL dan diisolasi sel berinti tunggal. Subjek dikuret, langsung ditransplantasi dengan sel pada lesi periodontitis pasien. Satu bulan kemudian ditentukan kedalaman poket dan pertumbuhan tulang alveolarnya, dibandingkan dengan sebelum perlakuan.....	19
5. A. Memindahkan sample darah ke tabung konikal 50 mL yang sudah berisi Ficoll, dengan menempelkan ujung pipet ke dinding tabung dengan perlahan; B. tabung yang sudah berisi sample darah dan Ficoll, siap untuk sentrifugasi; C. tabung konikal 50 mL setelah sentrifugasi 30 menit.....	21
6. A. Kuretase lesi dengan kuret Gracey; B. Irigasi lesi dengan larutan H ₂ O ₂ ; C. Irigasi dengan larutan aquades;	

D. Sel berinti tunggal isolat darah tepi di dalam siring siap untuk ditransplantasikan ke pasien; F. Transplantasi sel ke pasien.....	21
7. Grafik perubahan kedalaman poket sebelum dan satu bulan setelah gigi yang mengalami periodontitis kronis dikuretase dan ditranplantasi dengan sel berinti tunggal. Tampak kedalaman poket gigi yang ditransplantasi dengan sel berinti tunggal berkurang yang berarti terjadi regenerasi jaringan periodontal yang lebih baik.....	24
8. Grafik pertumbuhan tulang alveolar yang meningkat pada kelompok perlakuan (persentase turun) dan berkurang pada kelompok kontrol (persentase naik) menunjukkan penambahan tulang alveolar pada kelompok, perlakuan lebih baik.....	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
2. Keterangan Kelaikan Etik, Surat Pernyataan Kesediaan Menjadi Subyek Penelitian dan Formulir Laporan Kasus.....	53
3. Cara Penghitungan Besar Sampel.....	55
4. Tabel Hasil Uji Normalitas, Tabel Hasil Uji Homogenitas, Tabel Hasil Uji Hipotesis.....	57
5. Tabel Induk.....	60
6. Tabel hasil kemajuan kedalaman poket dan pertumbuhan tulang.....	62

DAFTAR SINGKATAN

ABC	= <i>Alveolar bone crest</i>
AP	= <i>Apeks</i>
BMPs	= <i>Bone morphogenetic proteins</i>
BSP	= <i>Bone Sialoprotein</i>
bFGF	= <i>basic fibroblast growth factor</i>
CEJ	= <i>Cemento-enamel junction</i>
CGF	= <i>Cementum Growth Factor</i>
CTU	= <i>Cell Therapy Unit</i>
EGF	= <i>Epidermal Growth Factor</i>
GTR	= <i>Guided Tissue Regeneration</i>
IGF-I	= <i>Insulin-like growth factor-I</i>
OPN	= <i>Osteopontin</i>
PBMNCs	= <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PDGF	= <i>Platelet derived growth factor</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PRP	= <i>Platelet-Rich Plasma</i>
PMI	= <i>Palang Merah Indonesia</i>
SPA	= <i>Skeling dan Penghalusan Akar</i>
SKRT	= <i>Survei Kesehatan Rumah Tangga</i>
TGF- β I	= <i>Transforming growth factor-I</i>

DAFTAR LAMBANG

mm = milimeter

mL = milliliter

μ L = mikroliter

N = Newton

Abstrak:

Penyakit periodontal disebabkan oleh adanya iritasi lokal berupa mikroorganisme yang berkolonisasi di permukaan gigi yang terdiri dari plak bakteri. Keterbatasan akses instrumen ke poket periodontal membuat perawatan non-bedah kurang efektif. Sel berinti tunggal yang diisolasi dari darah tepi mengandung berbagai tipe sel yang masing-masing mempunyai peran untuk meregenerasi jaringan periodontal. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi efek transplantasi sel berinti tunggal yang diisolasi dari darah tepi dapat untuk meregenerasi jaringan periodontal yang rusak. Sampel penelitian ini adalah kedalaman probing dan pertumbuhan tulang pasien periodontitis kronis. Hasil penelitian menunjukkan ada penurunan kedalaman probing yang signifikan ($p < 0.05$) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah satu bulan. Sedangkan untuk penambahan tulang, ada perbedaan antara kedua kelompok namun tidak signifikan. Kesimpulan. Transplantasi sel berinti tunggal ke jaringan periodontal yang rusak dapat mempercepat penurunan kedalaman probing.

Kata kunci: Regenerasi, periodontal, sel berinti tunggal

Effect of Peripheral Blood Mononuclear Cells on Periodontal Regeneration

Mochamad Orliando Roeslan

ABSTRACT

Background: Periodontal disease comprises a group of inflammatory conditions of the teeth' supporting tissues that is caused by bacteria. Due to teeth anatomy's complexity, it is difficult for instruments to reach periodontal pocket. Therefore, non-surgery treatment for periodontitis can't be performed maximally. Peripheral blood mononuclear cells (PBMNCs) consist of stem cell, progenitor cell, lymphocyte, and monocyte. Stem cell and progenitor cell can support regeneration in periodontal tissue. **Objectives:** The aims of this study were to evaluate effects of PBMNCs on regeneration of periodontal tissue in chronic periodontitis patients within 1 month. **Method:** Fifteen patients were selected based on inclusion and exclusion criteria. Autologous PBMNCs were isolated, prepared and applied on damaged-periodontal tissue with 3-6 mm pocket depth. Prior to PBMNCs application, periodontitis was treated with curettage. Curettage without application of PBMNCs was also performed as control in each PBMNCs-applied patient. After 1 month, application's evaluation was performed with parameter of pre-post intra-oral examination, depth probing and dental radiography.

Results: After 1 month, there was not any intra-oral inflammatory response of control and treatment groups. In probing depth, 7 patients gained clear benefit of the PBMNCs application and significant difference ($p < 0.05$) between control and treatment groups was obtained. Meanwhile, in radiographically-evaluated bone growth, 11 patients gained clear benefit of the PBMNCs application, however, significant difference between control and treatment groups was not obtained.

Conclusion: Curettage with PBMNCs application regenerated periodontal tissue in chronic periodontitis patients within 1 month. Therefore, this treatment should be considered as potential treatment for chronic periodontitis patients.

Keywords: Periodontitis, PBMNCs, regeneration, probing depth, alveolar bone growth

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit periodontal diderita hampir 90% populasi dunia dan merupakan penyebab terbesar kehilangan gigi pada orang dewasa di usia 30 tahun ke atas. Di Indonesia, laporan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) Depkes RI tahun 2001 menunjukkan bahwa di antara penyakit yang dikeluhkan dan yang tidak dikeluhkan, prevalensi karies gigi dan penyakit periodontal adalah yang tertinggi, yaitu sekitar 60%.

Penyakit periodontal terdiri atas sekelompok keadaan peradangan jaringan pendukung gigi yang disebabkan bakteri (Carranza dan Newman, 1996). Penyakit ini dapat diklasifikasikan menjadi dua bagian, yaitu peradangan terbatas hanya pada gingiva disebut gingivitis, dan selanjutnya peradangan yang meluas ke jaringan pendukung di bawah gingival disebut periodontitis. Penyebab utama penyakit periodontal adalah mikroorganisme yang berkolonisasi di permukaan gigi, terdiri atas plak bakteri dan produk-produknya. Pada gingivitis, bakteri yang berperan adalah Gram positif dan Gram negatif bertransisi dari aerob ke anaerob. Sedangkan pada periodontitis, bakteri yang berperan adalah Gram negatif anaerob (Chappel dan Gilbert, 2002).

Periodontitis merupakan proses peradangan yang dimulai dari gingiva yang kemudian menyebar ke jaringan pendukung yang lebih dalam. Oleh karena itu periodontitis ditandai dengan adanya peradangan pada gingiva, selanjutnya menimbulkan poket periodontal, kerusakan ligamen periodontal, sementum, dan kerusakan tulang alveolar serta menyebabkan kehilangan gigi secara perlahan (Hoag dan Pawlak, 1990).

Selama ini perawatan penyakit periodontal dimulai dengan membersihkan bakteri dari jaringan melalui pembersihan mekanis, yaitu *scaling* dan penghalusan

akar (SPA). Namun tindakan SPA terkadang tidak dapat mencapai hasil yang maksimal. Hal ini disebabkan oleh kompleksitas anatomi gigi yang menyulitkan akses instrumen ke dalam poket periodontal sehingga membatasi efektivitas penghalusan akar (Rudhart dkk., 1998). Pendekatan selanjutnya untuk perawatan poket periodontal adalah dengan pemberian antibiotika, aplikasi antimikroba secara lokal, dan penggunaan faktor-faktor pertumbuhan. Ternyata teknik-teknik perawatan yang telah disebutkan tidak secara utuh mengakibatkan regenerasi jaringan periodontal (Berendsen, 2008).

Untuk mencapai regenerasi jaringan periodontal dengan baik, diperlukan adanya pembentukan *epithelial seal*, serat jaringan penyambung ke akar gigi, pembentukan kembali sementum non-selular pada permukaan akar gigi, dan regenerasi tinggi tulang alveolar (Bartold dkk., 2000). Namun hambatan untuk mencapai regenerasi periodontal setelah perawatan secara konvensional adalah proliferasi jaringan epitel ke dalam bagian yang rusak lebih cepat dibandingkan regenerasi jaringan mesenkim (Benatti dkk., 2007).

Regenerasi jaringan periodontal adalah proses pembentukan kembali jaringan periodontal baru agar jaringan lama yang telah rusak dapat diganti. Proses regenerasi ini berdasarkan pertumbuhan sel secara biologis. Untuk itu dapat digunakan sel punca yang masih belum berdiferensiasi, ditambah sinyal molekular untuk menstimulasi respon sel punca tersebut (Berendsen, 2008). Sel ligamen periodontal berasal dari mesenkim, karena itu sel punca yang dapat mendukung terjadinya regenerasi di jaringan periodontal adalah sel punca mesenkim (Benatti dkk., 2007).

Sel punca dapat ditemukan di dalam populasi sel berinti tunggal yang diisolasi dari darah tepi/*peripheral blood mononuclear cells* (PBMNCs) (Sardjono dkk., 2009). Selain itu juga ditemukan sel progenitor, limfosit, dan monosit (Frisca dkk., 2008). Sel punca berfungsi untuk regenerasi bila terjadi kerusakan selama kehidupan. Sel progenitor menghasilkan sel prekursor (sel blas) yang secara morfologi tidak dapat dibedakan dengan sel punca (Junqueira dkk., 1997). Limfosit dan monosit adalah sel yang berperan untuk mengeliminasi zat asing dan hancuran darah, limfe, serta jaringan (Roeslan, 2002).

Periodontitis merupakan proses peradangan, maka limfosit dan monosit berperan

penting dalam mekanisme pertahanan pada jaringan periodontal. Pada periodontitis akan terjadi kerusakan jaringan yang disebabkan oleh plak bakteri yang bertindak sebagai antigen. Penyembuhan periodontitis setelah dilakukan perawatan memerlukan regenerasi jaringan periodontal. Aplikasi PBMNCs yang mengandung sel punca ke jaringan periodontal yang rusak, diharapkan dengan cepat dapat meregenerasi jaringan tersebut mengingat berbagai jenis sel yang ada di dalam populasi tersebut mampu mendukung terjadinya regenerasi.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang sudah dikemukakan, dapat dirumuskan masalah: apakah aplikasi PBMNCs dapat meregenerasi jaringan periodontal yang rusak dalam 1 bulan dengan parameter (1) penurunan kedalaman poket periodontal dan (2) peningkatan pertumbuhan tulang alveolar secara radiografi?

C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan aplikasi PBMNCs untuk regenerasi jaringan periodontal yang rusak dalam 1 bulan.

D. Manfaat

1. Menambah khasanah ilmu pengetahuan dengan memberi masukan tentang kemampuan PBMNCs untuk regenerasi jaringan periodontal.
2. Memberi masukan data bagi penelitian lanjutan tentang regenerasi jaringan periodontal.
3. Mendapatkan alternatif penatalaksanaan untuk regenerasi jaringan periodontal yang rusak.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Penyakit Periodontal

Penyakit periodontal merupakan penyakit yang menyerang jaringan penyangga gigi. Secara klinis, terjadi perubahan warna pada gingiva, pembentukan poket periodontal, perdarahan, kehilangan perlekatan, dan kegoyangan gigi. Kehilangan tulang alveolar dapat dilihat melalui pemeriksaan radiografi. Penyebab utama penyakit ini adalah mikroorganisme yang berkolonisasi di permukaan gigi dekat gingiva yang terdiri atas plak bakteri dan produk yang dihasilkannya. Jenis periodontitis kronis adalah bentuk periodontitis yang paling sering ditemui. Kebanyakan terjadi pada orang dewasa, tetapi pada anak-anak kadang juga bisa terjadi (Nagy dan Novak, 2006).

Periodontitis kronis didefinisikan sebagai penyakit yang disebabkan infeksi sehingga terjadi inflamasi pada jaringan penyangga gigi, kehilangan perlekatan secara progresif, dan kehilangan tulang. Karakter klinisnya adalah akumulasi plak di supragingiva dan subgingiva. Gingiva biasanya agak bengkak dan menunjukkan perubahan warna dari merah pucat sampai magenta. Pada beberapa pasien, perubahan warna, kontur, dan konsistensi yang dihubungkan dengan inflamasi gingival mungkin tidak terlihat, inflamasi akan terdeteksi sebagai perdarahan gingiva pada saat dilakukan *probing*. Kedalaman poket bervariasi, dan dapat ditemukan kehilangan tulang secara horizontal dan vertikal. Kegoyangan gigi sering terlihat pada kasus berat yang banyak kehilangan tulang (Nagy dan Novak, 2006).

Periodontitis kronis biasanya progresif, dari lambat ke sedang, walaupun progresi yang cepat juga kadang terjadi. Peningkatan progresi penyakit dapat disebabkan oleh penyakit sistemik, atau faktor lingkungan yang mungkin mempengaruhi interaksi antara pejamu dan bakteri. Pada penderita diabetes mellitus dan HIV, akan mempengaruhi pertahanan pejamu. Faktor lingkungan seperti rokok

dan stres mungkin akan mempengaruhi respon pejamu terhadap akumulasi plak (Nagy dan Novak, 2006). Kerusakan periodontal juga dapat diperparah dengan adanya kelainan darah, mengingat semua sel darah berperan penting dalam memelihara jaringan periodontal sehat (Klokkevold dkk., 2006).

Terapi penyakit periodontal dapat dilakukan secara lokal dan sistemik. Terapi lokal yaitu dengan menghilangkan plak dan semua faktor yang menyebabkan akumulasi. Sedangkan terapi sistemik adalah sebagai perawatan tambahan bersama dengan terapi lokal. Pada periodontitis lokal dan *generalized aggressive periodontal*, antibiotika digunakan untuk membunuh bakteri yang masuk ke dalam poket setelah dilakukan SPA (Nagy dan Novak, 2006).

Perawatan periodontal biasanya diawali dengan menghilangkan bakteri pada jaringan. Cara konvensional adalah SPA atau bedah periodontal. Namun akhir-akhir ini dilakukan pendekatan lain, yaitu penggunaan antibiotika, *root conditioning agent*, *guided tissue regeneration* (GTR), dan penggunaan faktor-faktor pertumbuhan. *Root conditioning* adalah aplikasi permukaan akar yang sebelumnya sudah dibersihkan secara mekanis, dengan bahan dekalsifikasi kimia untuk meningkatkan perlekatan sel dan sintesis matriks. Namun perawatan ini sering menimbulkan ankilosis dan resorpsi tulang. GTR adalah prosedur yang menggunakan membran *barrier* yang diletakkan di antara jaringan penyambung pada flep periodontal dan permukaan akar. Membran ini diharapkan mencegah sel epitel migrasi ke apikal (Berendsen, 2008).

Faktor-faktor pertumbuhan yang banyak digunakan untuk induksi regenerasi adalah *platelet derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Takayama dkk., 2001) dan *bone morphogenetic proteins* (BMPs). Namun masalah yang timbul dalam aplikasinya adalah mudah hilangnya faktor pertumbuhan tersebut selama proses pembersihan secara mekanis. Walaupun penggunaan GTR dan faktor-faktor pertumbuhan menunjukkan hasil yang memuaskan pada penelitian secara *in vitro*, pada penelitian *in vivo* belum berhasil menghasilkan sementum dan ligamen periodontal yang baru (Beertsen dkk., 2000).

Tujuan utama perawatan periodontal adalah untuk mencegah kehilangan perlekatan lebih lanjut dan meregenerasi jaringan periodontal. Untuk mencapai

regenerasi jaringan periodontal yang baik, diperlukan adanya pembentukan *epithelial seal*, serat jaringan penyambung ke akar gigi, pembentukan kembali sementum non-selular pada permukaan akar gigi, dan regenerasi tinggi tulang alveolar (Bartold dkk., 2000). Namun hambatan untuk mencapai regenerasi periodontal setelah perawatan secara konvensional adalah proliferasi jaringan epitel ke dalam bagian yang rusak lebih cepat dibandingkan jaringan mesenkim. Hal ini mengarah ke pembentukan *epithelium junction*, yang akan mencegah migrasi, proliferasi dan diferensiasi sel derivat ligamen periodontal (Benatti dkk., 2007).

B. Regenerasi Jaringan Periodontal

Setelah bedah periodontal, akan terjadi proses penyembuhan dengan perbaikan dan regenerasi. Perbaikan jaringan melibatkan penyembuhan luka oleh jaringan yang hasil akhirnya tidak secara utuh mengembalikan bentuk dan fungsi daerah yang rusak. Sedangkan pada regenerasi terjadi reproduksi pada bagian jaringan yang rusak. Tantangan yang dihadapi pada perawatan periodontal adalah mengembalikan perlekatan jaringan ligamen periodontal agar membentuk sementum yang baru yang melekat pada permukaan akar dan mengembalikan tulang yang hilang. Beberapa metode untuk meregenerasi jaringan periodontal sudah dilakukan, tetapi kebanyakan hanya menghasilkan perbaikan jaringan, bukan regenerasi (Berendsen, 2008).

Regenerasi adalah tumbuh dan berdiferensiasinya sel-sel baru serta substansi interselular untuk membentuk jaringan yang baru. Regenerasi jaringan periodontal merupakan proses yang berjalan secara kontinu. Pada kondisi normal, sel-sel dan jaringan baru secara konstan dibentuk untuk menggantikan sel-sel yang mati. Hal ini merupakan manifestasi aktivitas mitosis sel di epitel gingiva dan jaringan penyambung di bawahnya yaitu ligamen periodontal. Proses regenerasi akan terhambat bila bakteri dan produknya penyebab penyakit periodontal tetap berada pada jaringan. Karena itu, plak bakteri harus dibersihkan untuk menyingkirkan penghambat proses regenerasi (Carranza, 2006).

Regenerasi jaringan periodontal adalah proses yang unik, karena diperlukan adanya serat jaringan penyambung baru untuk masuk ke dalam sementum dan tulang. Masuknya serat ini membutuhkan penyembuhan semua komponen lunak

dan keras jaringan periodontal secara utuh. Aktivitas molekular dan selular yang berhubungan dengan regenerasi sangat kompleks. Terjadinya penyembuhan jaringan melalui regenerasi, tergantung oleh 2 faktor. Pertama, adanya tipe sel yang dibutuhkan dan kedua adalah adanya sinyal yang dibutuhkan untuk menstimulasi sel-sel tersebut. Tipe sel yang dibutuhkan tadi adalah sel progenitor atau sel punca (Carranza, 2006). Sedangkan yang termasuk sinyal untuk menstimulasinya adalah hormon dan faktor-faktor pertumbuhan. Sinyal-sinyal ini berperan penting dalam promosi regenerasi jaringan periodontal. Peranannya dianggap penting dalam mengatur aktivitas selular, seperti proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sel di periodontal (Berendsen, 2008).

Pada proses regenerasi jaringan periodontal harus terjadi restorasi tulang alveolar sampai pada ketinggian *cemento-enamel junction*, regenerasi gingiva yang rusak karena inflamasi, sintesis serat Sharpey yang masuk ke permukaan akar, dan membentuk kembali *epithelial seal* di bagian koronal (Grzesik dan Narayanan, 2002). Sementum adalah tempat perlekatan jaringan lunak, dan matriks sementum merupakan sumber banyak faktor pertumbuhan yang mempengaruhi aktivitas berbagai sel periodontal. Sementum mengandung molekul yang mempromosikan migrasi kemotaksis, adhesi, proliferasi dan differensiasi beberapa sel periodontal. Molekul-molekul tersebut tidak terdeteksi di jaringan periodontal yang lain (BarKana dkk., 2000). Faktor-faktor pertumbuhan dan molekul yang ada di sementum juga berpengaruh terhadap sel di gingiva, ligamen periodontal, dan tulang alveolar (Bartold dkk., 2000). Karena itu, komponen sementum mempunyai potensi untuk berperan dalam regulasi homeostasis dan regenerasi jaringan periodontal (Grzesik dan Narayanan, 2002). Molekul yang teridentifikasi di sementum dan aktivitasnya disajikan pada Tabel 1.

Progenitor sementoblas akan menempel di permukaan akar, dan ekspansinya akan difasilitasi oleh faktor pertumbuhan yang ada di matriks sementum (MacNeil dan Somerman, 1999). Oleh karena itu penting untuk mempersiapkan lingkungan sementum untuk inisiasi dan mempromosikan pembentukan sementum baru. Integritas sementum secara biokimiawi akan berubah karena adanya penyakit yang disebabkan deposisi endotoksin bakteri, karena itu

Tabel 1. Beberapa molekul yang teridentifikasi di sementum dan aktivitasnya

Molekul	Aktivitas Biologis
Faktor pertumbuhan	
▪ IGF-1	Proliferasi, diferensiasi, sintesis matriks
▪ FGF	Proliferasi, diferensiasi, sintesis matriks, angiogenesis
▪ PDGF	Proliferasi, diferensiasi, sintesis matriks
▪ TGF- β	Sintesis matriks, angiogenesis, kemotaksis
▪ BMPs	Sintesis matriks, diferensiasi, pembentukan tulang
▪ EGF	Proliferasi, diferensiasi
▪ CGF	Proliferasi, diferensiasi
Komponen matriks	
▪ Kolagen	Adhesi sel, diferensiasi, regulasi proliferasi
▪ BSP	Adhesi sel, diferensiasi, mineralisasi
▪ OPN	Adhesi sel, pengaturan proliferasi
▪ Fibronektin	Adhesi sel, diferensiasi, regulasi proliferasi
▪ Osteonektin	Regulasi angiogenesis, diferensiasi dan proliferasi
▪ Protein perlekatan sementum	Adhesi sel, diferensiasi

IGF: *Insulin Growth Factor*, FGF: *Fibroblast Growth Factor*, PDGF: *Platelet Derived Growth Factor*, TGF- β : *Transforming Growth Factor β* , BMP: *Bone Morphogenetic Protein*, EGF: *Epidermal Growth Factor*, CGF: *Cementum Growth Factor*, BSP: *Bone Sialoprotein*, OPN: *Osteopontin*. Sumber: Grzesik dan Narayanan, 2002.

dilakukan SPA untuk membersihkannya dari permukaan akar (Grzesik dan Narayanan, 2002).

Parameter yang digunakan untuk evaluasi regenerasi jaringan periodontal adalah adanya penurunan kedalaman poket, yaitu jarak antara pertautan semento-enamel dan dasar sulkus atau poket (Mombelli, 2005). Selain itu parameter lain yang digunakan untuk evaluasi pertumbuhan tulang adalah melalui radiografi. Radiografi digunakan untuk memeriksa keparahan kerusakan tulang, panjang akar, dan mendeteksi lesi patologis (Fukuda dkk., 2008).

C. PBMNCs

PBMNCs mengandung populasi sel punca (Sardjono dkk., 2009). Isolasi sel progenitor endotel dengan memisahkan fraksi sel berinti tunggal dari sel-sel lain di dalam darah, sudah pernah dilakukan. Metode isolasi sel berinti tunggal dilakukan dengan sentrifugasi dalam suatu gradien dengan massa tertentu agar dapat dipisahkan berdasarkan densitasnya. Metode ini akan memisahkan sel yang

densitasnya lebih tinggi seperti sel darah merah dan granulosit dengan sel yang densitasnya lebih rendah seperti sel berinti tunggal. Di dalam sel berinti tunggal terdapat sel punca, progenitor, limfosit, dan monosit. Salah satu reagen pemisah yang sering digunakan dalam metode ini adalah Ficoll (Frisca dkk., 2008).

Sel punca dewasa yang terdapat di dalam populasi sel berinti tunggal adalah sel yang berfungsi melakukan regenerasi untuk mengatasi berbagai kerusakan yang selalu terjadi dalam kehidupan. Tubuh kita mengalami kerusakan oleh berbagai faktor dan semua kerusakan yang mengakibatkan nekrosis (kematian sel dan jaringan) akan dibersihkan oleh makrofag yang beredar dalam darah. Kemudian sel punca dewasa berfungsi untuk memperbaiki jaringan yang mengalami kerusakan. Sel punca dewasa dapat diambil dari fetus, sumsum tulang, darah tepi, atau tali pusat (Setiawan, 2006).

Sel progenitor endotel merupakan sel yang memiliki karakteristik seperti sel punca, namun memiliki kemampuan proliferasi dan diferensiasi yang lebih terbatas. Sel ini bersifat unipoten, yaitu dapat berdiferensiasi menjadi sel endotel matang. Sel progenitor endotel memiliki peran penting dalam pembentukan pembuluh darah dan remodelisasi sel endotel pada pembuluh darah yang mengalami kerusakan (Smadja dkk., 2007).

Sel berinti tunggal adalah sel darah yang mempunyai karakteristik inti sel bulat. Limfosit dan monosit dibedakan berdasarkan ukuran, struktur kromatin, dan adanya anak inti pada sedimen apus. Studi mengenai sel prekursor limfosit dan monosit sulit dilakukan karena sel-sel ini tidak memiliki granula sitoplasma yang spesifik atau lobulasi inti seperti yang terdapat di granulosit. Sel darah ini sangat berperan dalam sistem imun untuk melawan infeksi (Junqueira dkk., 1997).

Sewaktu limfosit menjadi matang, kromatinnya makin padat, anak inti makin sulit dilihat, dan selnya makin kecil. Limfosit yang bersirkulasi terutama berasal dari timus dan organ limfoid perifer (limpa, limfonodus, tonsil, dan sebagainya). Akan tetapi, mungkin semua sel progenitor limfosit berasal dari sumsum tulang. Progenitor sel limfoid pertama yang dapat dikenali adalah limfoblas, sebuah sel besar yang sanggup mengikat 3H-timidin dan membelah dua atau tiga kali menghasilkan prolimfosit. Sel ini lebih kecil dan memiliki relatif lebih banyak

kromatin padat namun tidak dibekali antigen permukaan sel yang menandai prolimfosit sebagai limfosit-T atau limfosit-B (Junqueira dkk., 1997).

Monoblas adalah sel progenitor yang morfologinya identik dengan mieloblas. Diferensiasi selanjutnya menghasilkan promonosit, sebuah sel besar dengan garis tengah sampai 18 μm , sitoplasma basofil dengan sebuah inti besar yang sedikit berlekuk. Kromatinnya jarang, dan anak intinya jelas. Promonosit membelah dua kali dalam perjalanan perkembangannya menjadi monosit. Terdapat sejumlah besar retikulum endoplasma kasar, begitu pula sebuah kompleks Golgi yang memperlihatkan kondensasi granula. Granula ini adalah lisosom primer, yang tampak sebagai granula azurofilik halus dalam monosit darah. Monosit matang masuk peredaran darah, bersirkulasi selama lebih kurang 8 jam, dan kemudian masuk ke jaringan ikat, tempat monosit mengalami pematangan menjadi makrofag dan berfungsi beberapa bulan lamanya (Junqueira dkk., 1997).

D. PBMNCs untuk Regenerasi Jaringan Periodontal

Regenerasi pasca bedah periodontal dibutuhkan stimulasi respon inflamasi inisial yang diikuti dengan merekrut populasi sel yang spesifik, kemudian diinduksi supaya terjadi proliferasi, diferensiasi selular seperti fibroblas yang membentuk jaringan penyambung, sementoblas untuk sementogenesis, osteoblas untuk pembentukan tulang, dan sel endotel untuk angiogenesis. Aktivitas selular tersebut diregulasi oleh sejumlah mediator (Ten Cate dkk., 2003).

Sel punca yang ada dalam populasi sel berinti tunggal, diharapkan dapat meregenerasi jaringan periodontal. PBMNCs juga melepaskan faktor-faktor yang mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi sel ligamen periodontal secara *in vitro* (Tjoa dkk., 2008).

Regenerasi jaringan pasca bedah periodontal memerlukan sel punca dan faktor pertumbuhan. Sel punca diperlukan untuk pembentukan sel ligamen periodontal yang baru, dan faktor pertumbuhan untuk stimulasi sel punca agar terjadi proliferasi, diferensiasi, angiogenesis, dan sintesis matriks. Sementum mempunyai faktor-faktor pertumbuhan yang dibutuhkan untuk stimulasi sel punca, sehingga proses diferensiasi sel punca dapat terjadi.

Sel berinti tunggal mengandung sel punca, sel progenitor, limfosit, dan monosit (Frisca dkk., 2008). Masing-masing sel tersebut mempunyai peran untuk meregenerasi jaringan periodontal. Sel punca dan sel progenitor untuk diferensiasi menjadi sel ligamen periodontal yang baru, limfosit dan monosit untuk mempercepat proses eliminasi zat asing di dalam jaringan periodontal. Oleh karena itu, sel berinti tunggal mungkin dapat digunakan untuk meregenerasi jaringan periodontal yang rusak.

BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP, DAN HIPOTESIS

A. Kerangka Teori

Penyakit periodontal disebabkan oleh iritasi lokal berupa mikroorganisme yang berkolonisasi di permukaan gigi dekat gingiva yang dalam bentuk plak bakteri. Namun penyakit periodontal juga dapat terjadi sebagai akibat manifestasi penyakit sistemik (Gambar 1) seperti pada diabetes melitus, yang mempengaruhi respon pertahanan penjamu. Kelainan darah juga akan memperparah penyakit periodontal, karena semua sel darah berperan penting dalam memelihara jaringan periodontal sehat.

Inflamasi pada jaringan periodontal menyebabkan degradasi serat kolagen dan resorpsi tulang alveolar, yang akhirnya mengakibatkan hilangnya gigi. Setelah terjadi kerusakan tulang alveolar, biasanya tidak selalu terjadi regenerasi. Padahal untuk mengembalikan fungsinya, dibutuhkan regenerasi dan rekonstruksi jaringan periodontal.

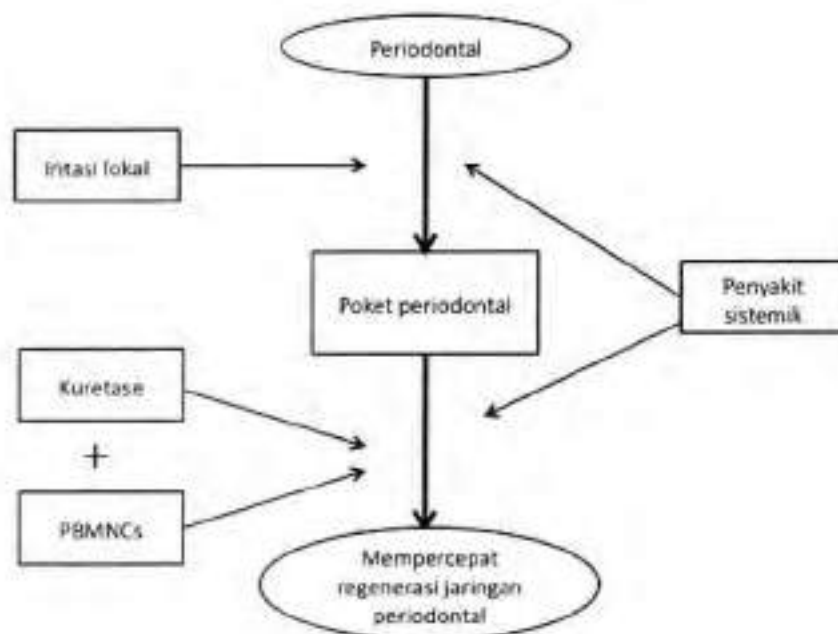
Ligamen periodontal mengandung berbagai populasi sel, yaitu fibroblas gingiva dan periodontal, endotel, sel Malassez, sel yang berhubungan dengan sistem saraf, sel yang berhubungan dengan tulang (osteoblas, osteosit, osteoklas), dan sel yang berhubungan dengan sementum (sementoblas, sementosit). Namun sel yang paling banyak di ligamen periodontal adalah fibroblas. Seluruh jaringan periodontal juga mengandung matriks ekstraselular yang kaya kolagen.

Matriks sementum merupakan sumber berbagai macam faktor pertumbuhan yang mempengaruhi aktivitas sel di dalam jaringan periodontal. Sementum mengandung molekul yang tidak terdeteksi di jaringan periodontal lain yang mempromosikan migrasi kemotaksis, adhesi, proliferasi, dan diferensiasi beberapa sel jaringan periodontal. Komponen sementum mempunyai potensi untuk regenerasi jaringan periodontal.

Kuretase adalah pilihan utama untuk merawat penyakit periodontal (Gambar 1), namun keterbatasan akses instrumen ke poket periodontal membuat perawatan ini kurang efektif. Hal ini disebabkan oleh iritasi lokal di jaringan periodontal yang kurang dapat dibersihkan, sehingga menimbulkan potensi untuk rekuren. Akibatnya regenerasi jaringan tidak akan tercapai.

Terjadinya regenerasi jaringan tergantung oleh 2 faktor. Pertama, adanya tipe sel yang dibutuhkan dan kedua, ada atau tidaknya sinyal untuk menstimulasi sel tersebut. Dalam hal ini, tipe sel yang dibutuhkan adalah sel progenitor atau sel punca, dan sinyal yang menstimulasinya adalah beberapa faktor pertumbuhan.

PBMNCs mengandung berbagai tipe sel yang masing-masing mempunyai peran untuk meregenerasi jaringan periodontal (Gambar 1). Sel punca dan sel progenitor yang ada di populasi sel berinti tunggal mempunyai kemampuan memperbaharui diri dan dapat berkembang menjadi satu atau bahkan lebih dari satu tipe sel. Selain itu, dengan adanya limfosit dan monosit di dalam populasi sel berinti tunggal, akan mempercepat proses eliminasi zat asing di dalam jaringan periodontal.



Gambar 1. Skema kerangka teori. Periodontitis disebabkan oleh iritasi lokal. Penyakit sistemik juga ada yang bermanifestasi di jaringan periodontal atau memperparah periodontitis. Untuk mempercepat regenerasi jaringan periodontal dilakukan kuretase ditambah aplikasi PBMNCs.

Faktor-faktor pertumbuhan yang dibutuhkan untuk menstimulasi sel punca ditemukan di dalam sementum. Dengan demikian, diharapkan aplikasi PBMNCs, dapat digunakan untuk mempercepat regenerasi jaringan periodontal yang mengalami periodontitis kronis. Keberhasilan regenerasi jaringan periodontal dapat dilihat melalui penurunan kedalaman poket yang berarti terjadi perbaikan perlekatan epitel dan peningkatan pertumbuhan tulang alveolar yang mendukung jaringan gingival.

B. Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka konsep penelitian ini. PBMNCs yang diaplikasikan dapat meregenerasi jaringan periodontal.

C. Hipotesis

Berdasarkan kerangka teori yang sudah diuraikan, dapat dibangun hipotesis: aplikasi PBMNCs dapat meregenerasi jaringan periodontal yang rusak dalam 1 bulan dengan parameter (1) penurunan kedalaman poket periodontal dan (2) peningkatan pertumbuhan tulang alveolar secara radiografi.

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan uji klinik untuk mengevaluasi efek aplikasi PBMNCs untuk meregenerasi jaringan periodontal yang rusak. PBMNCs, diaplikasikan secara autologus ke pasien dengan penyakit periodontal untuk meregenerasi jaringan periodontalnya yang rusak. Parameter untuk regenerasi jaringan periodontal yang rusak adalah (1) penurunan kedalaman poket periodontal dan (2) peningkatan pertumbuhan tulang alveolar secara radiografi.

B. Subjek, Sampel, dan Jumlah Ulangan

1. Subjek penelitian adalah pasien yang didiagnosis periodontitis kronis di Bagian Periodonti Rumah Sakit Gigi dan Mulut Pendidikan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti (RSGMP FKG Usakti) yang bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani surat kesediaan setelah diberi penjelasan (*informed consent*) (Lampiran 1).
2. Sampel pada penelitian ini adalah jaringan periodontal yang mengalami periodontitis kronis.
3. Jumlah ulangan perlakuan dihitung dengan rumus (Lemeshow dkk., 1990) seperti berikut.

$$n = \frac{sd^2 (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2}{\Delta^2}$$

- n : besar sample per kelompok
 sd : rata-rata standar deviasi kedua kelompok
 $Z_{1-\alpha}$: tingkat kemaknaan
 $Z_{1-\beta}$: kekuatan uji
 Δ : perbedaan rata-rata kelompok

Berdasarkan hasil penghitungan (Lampiran 2), diperlukan ulangan sebanyak 15 (lima belas kali).

C. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria inklusi

- a. Periodontitis kronis mengenai lebih dari 3 gigi
- b. Poket periodontal 3-6 mm
- c. Derajat kegoyangan gigi derajat 1-2
- d. Bersedia dihubungi kembali
- e. Bersedia menjadi subjek penelitian

2. Kriteria eksklusi

- a. Ada kelainan rongga mulut selain gingivitis dan periodontitis
- b. Pasien dengan penyakit sistemik (diabetes melitus, leukemia, anemia, trombositopenia, kelainan imunodefisiensi, kelainan jantung)
- c. Sedang minum antibiotika dan anti inflamasi sejak 3 bulan terakhir
- d. Pasien hamil
- e. Pasien dengan kelainan pertumbuhan fisik
- f. Pasien dengan riwayat kanker
- g. Pasien dengan ketergantungan narkoba
- h. Pasien dengan penyakit menular
- i. Pasien yang pernah menerima terapi transplantasi sel atau jaringan
- j. Pasien dalam terapi faktor pertumbuhan, sitokin, *chemical agent* tertentu
- k. Pasien dengan kelainan kejiwaan atau retardasi mental

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas adalah aplikasi PBMNCs setelah kuretase.
2. Variabel tergantung adalah regenerasi pada jaringan periodontal.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Periodontitis kronis merupakan peradangan jaringan periodontal yang ditentukan berdasarkan adanya kedalaman poket periodontal 3-6 mm di daerah mesial atau distal (skala rasio)
2. Kuretase tertutup yang dilakukan oleh satu orang operator (skala nominal)
3. Aplikasi PBMNCs (skala nominal)

4. Regenerasi jaringan periodontal ditentukan berdasarkan hal berikut.

- a. Penurunan kedalaman poket periodontal yang ditentukan secara klinis menggunakan *probe* periodontal dan dibandingkan antara sebelum dan 1 bulan setelah transplantasi sel (skala rasio).
- b. Peningkatan pertumbuhan tulang alveolar di daerah proksimal melalui pemeriksaan radiologis, ditentukan sebelum dan satu bulan setelah aplikasi sel (skala rasio). Peningkatan pertumbuhan tulang alveolar ditentukan dengan membandingkan jarak dari pertautan semento-enamel ke *crest* tulang alveolar dengan jarak pertautan semento-enamel ke apeks gigi, yang kemudian dimasukkan ke dalam rumus:

$n = \frac{(CEJ-ABC) - 2mm}{(CEJ-AP) - 2mm} \times 100\%$	n : peningkatan pertumbuhan tulang alveolar CEJ-ABC : jarak dari pertautan semento-enamel ke <i>crest</i> alveolar CEJ-AP : jarak pertautan semento-enamel ke apeks gigi
---	---

Hasil perhitungan tersebut, menunjukkan bahwa semakin rendah nilainya, peningkatan pertumbuhan tulang alveolarnya semakin banyak.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. *Biosafety cabinet* (Gambar 3A)
- b. Sentrifugasi (Gambar 3B)
- c. Tabung konikal 10 dan 50 mL
- d. Rak tabung konikal
- e. Hemasitometer
- f. Tabung eppendorf 1,5 mL
- g. *Micropipet*
- h. Mikroskop *inverted* (Gambar 3C)
- i. *Probe* periodontal
- j. *Scaler* ultrasonik
- k. Kuret Gracey



Gambar 3. Sebagian alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian. A. *Biosafety Cabinet*; B. Alat sentrifugasi; C. Mikroskop inverted ; D. Ficoll-Paque Premium

2. Bahan

- a. Foto Rontgen periapikal (*Kodak Insight Periapical*, ukuran 30,5 x 40,5 mm)
- b. *Povidon Iodine*
- c. *Xylocaine* adrenalin 2%
- d. Larutan H_2O_2
- e. Akuades
- f. Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) (Gambar 3D)
- g. *Vacutainer* dengan antikoagulan 3 mL (BD Franklin Lakes, NJ, USA)
- h. Jarum dan siring 10 mL
- i. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) KCl 1x pH 7,2
- j. Pipet Pasteur
- k. *Trypan Biru* (Sigma)
- l. Tip steril 1 mL, 100 μ L, dan 10 μ L

G. Cara Kerja

Pasien yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi serta bersedia menandatangani *informed consent*, ditentukan kedalaman poketnya dan dibuatkan foto Rontgen periapikal pada dua gigi yang didiagnosis periodontitis kronis. Satu lesi diaplikasi PBMNCs dan lesi lainnya sebagai kontrol hanya



Gambar 4. Alur penelitian. Darah tepi pasien diambil sebanyak 10 mL dan PBMNCs diisolasi. Subjek dikuret, langsung ditransplantasi dengan sel pada lesi periodontitis pasien. Satu bulan kemudian ditentukan kedalaman poket dan pertumbuhan tulang alveolarnya, dibandingkan dengan sebelum perlakuan.

dikuretase tanpa aplikasi PBMNCs. PBMNCs diisolasi dari darah tepi masing-masing pasien. Skema lengkap penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4.

1. Isolasi PBMNCs

Pengambilan darah tepi pasien dilakukan pada pukul 9 pagi di RSGMP FKG Usakti oleh petugas Palang Merah Indonesia (PMI). Darah diambil sebanyak 10 mL dengan menggunakan siring, kemudian dipindahkan ke dalam *vacutainer* yang sudah mengandung antikoagulan. *Vacutainer* yang sudah berisi darah pasien dimasukkan ke dalam kotak es dan siap dibawa ke laboratorium *Stem Cell and Cancer Institute*.

Isolasi PBMNCs diawali dengan mengukur darah subjek, dimasukkan ke dalam tabung konikal I (50 mL), lalu ditambahkan larutan PBS sebanyak 2 kali jumlah darah. Ficol-Paque Premium sebanyak 15 mL atau setengah dari jumlah darah dan PBS dimasukkan ke dalam tabung konikal II (50 mL). Isi tabung konikal I diambil dengan pipet serologi dan dimasukkan ke dalam tabung konikal II secara perlahan melalui dinding tabung. Campuran

disentrifugasi selama 30 menit, 500 x g (Gambar 5), lalu disimpan sementara di dalam *biosafety cabinet* sambil mempersiapkan tabung konikal 15 mL. Lapisan cairan yang berada di paling atas dalam larutan yang sudah disentrifugasi diambil sebanyak 1 mL. Lapisan kedua dari atas (berupa lapisan tipis berwarna putih), dipindahkan ke dalam tabung konikal 15 mL, kemudian dicampurkan dengan PBS sebanyak jumlah sampel dan disentrifugasi selama 10 menit, 300 x g. PBS dibuang dan pelet disuspensikan dengan pipet. Setelah itu pada pelet ditambahkan PBS sebanyak 50 mL, disentrifugasi selama 10 menit, 200 x g. Akhirnya jumlah sel yang diperoleh dihitung dengan Trypan biru dan hemasitometer, dan dilihat melalui mikroskop *inverted*.

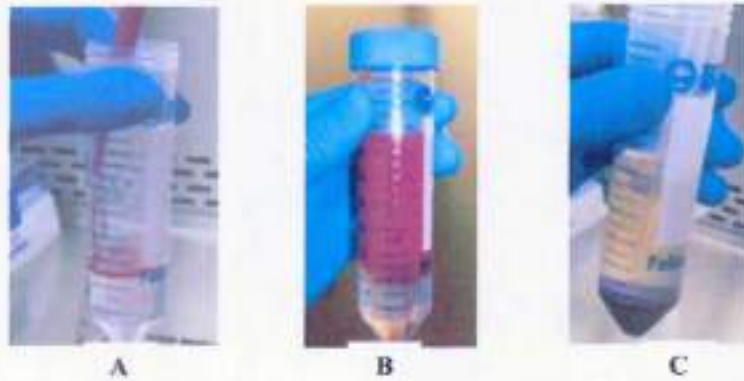
2. Kuretase dan aplikasi PBMNCs ke pasien

Daerah lesi dianestesi dengan 2% *Xylocaine* adrenalin, kemudian jaringan patologis diambil dari daerah lesi dan permukaan akar dikuret dengan kuret Gracey. Setelah itu daerah lesi diirigasi dengan larutan H_2O_2 , dilanjutkan dengan larutan aquades (Gambar 6 A, B, dan C).

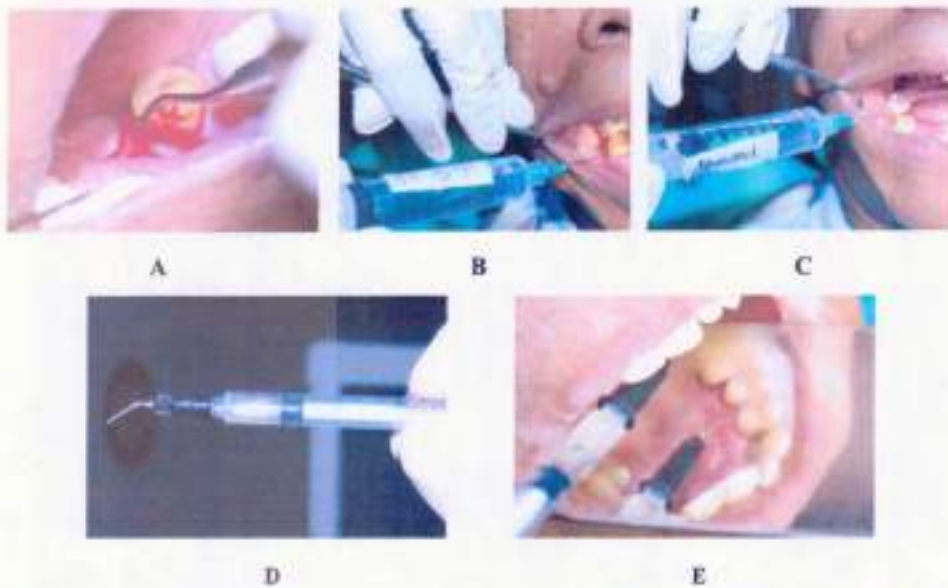
Daerah yang akan ditransplantasikan diisolasi dengan *cotton roll* agar tidak terkena saliva. PBMNCs yang sudah disiapkan di dalam siring diaplikasikan ke dalam poket periodontal yang rusak (Gambar 6D dan E). Subjek diinstruksikan menggigit *cotton roll* di regio lain yang tidak diapikasi sel selama 15 menit. Selain itu, subjek diinstruksikan untuk tidak makan dan minum satu jam setelahnya. Satu bulan kemudian, subjek datang kembali untuk pengukuran kedalaman poket dan dibuatkan foto Rontgen periapikal pada daerah lesi.

3. Pengumpulan dan pengolahan data

Data yang dikumpulkan adalah data kedalaman poket ditentukan dengan *probe* periodontal dan peningkatan pertumbuhan tulang alveolar. Untuk menentukan peningkatan tulang alveolar, digunakan foto Rontgen sebelum



Gambar 5. A. Memindahkan sampel darah ke tabung konikal 50 mL yang sudah berisi Ficoll, dengan menempelkan ujung pipet ke dinding tabung dengan perlahan; B. Tabung yang sudah berisi sampel darah dan Ficoll, siap untuk sentrifugasi; C. Tabung konikal 50 mL setelah sentrifugasi 30 menit



Gambar 6. A. Kuretase lesi dengan kuret Gracey; B. Irigasi lesi dengan larutan H_2O_2 ; C. Irigasi dengan larutan aquades; D. PBMNCs di dalam siring siap untuk diaplikasikan ke pasien; E. Aplikasi PBMNCs ke pasien

dan satu bulan sesudah aplikasi PBMNCs. Data yang terkumpul diolah secara statistik sebagai berikut.

- a. Analisis deskriptif untuk mendiskripsikan rata-rata dan simpang baku data setiap kelompok serta subjek penelitian
- b. Uji Kolmogorov-Smirnov satu kelompok untuk menentukan uji normalitas distribusi data normal atau tidak, dan untuk menentukan jenis uji statistik parametrik atau non parametrik.
- c. Uji homogenitas dengan uji-t untuk melihat apakah data awal kedua kelompok data berasal dari populasi yang sama. Bila bukan berasal dari populasi yang sama maka yang diuji adalah selisih antara data sebelum dan sesudah diberi perlakuan.
- d. Uji-t untuk menguji hipotesis apakah ada perbedaan antara data sebelum dan sesudah diberi perlakuan.

BAB V

HASIL PENELITIAN

A. Gambaran Umum

Subjek pada penelitian ini sebanyak 15 orang, terdiri atas 13 laki-laki, dan 2 perempuan. Kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, dilakukan pada subjek yang sama, namun berbeda lokasi lesinya, baik pada rahang atas maupun rahang bawah, regio kanan maupun regio kiri. Rata-rata dan simpang baku usia subjek penelitian ini $39,47 \pm 12,92$ tahun. Data lengkap hasil penelitian ini dapat dilihat pada Lampiran C.

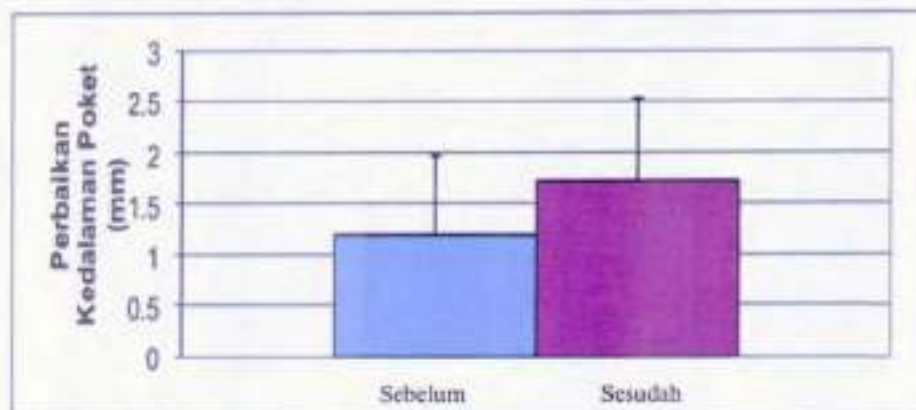
B. Penurunan kedalaman poket periodontal

1. Deskripsi Data

Rata-rata dan simpang baku hasil pengukuran kedalaman poket periodontal sebelum perlakuan pada kelompok kontrol $3,600 \pm 0,623$ mm, sedangkan kelompok perlakuan $3,800 \pm 0,862$ mm. Rata-rata dan simpang baku kedalaman poket setelah perlakuan kelompok kontrol $2,400 \pm 0,507$ mm dan kelompok perlakuan $2,066 \pm 0,258$ mm. Sehingga penurunan kedalaman poket pada kelompok kontrol $1,2 \pm 0,775$ mm dan kelompok perlakuan $1,733 \pm 0,799$ mm (Gambar 7). menunjukkan bahwa kedalaman poket periodontal kelompok perlakuan lebih banyak berkurang daripada kelompok kontrol. Berdasarkan hasil ini, terlihat kedalaman poket gigi yang diaplikasi dengan PBMNCs berkurang yang berarti terjadi regenerasi jaringan periodontalnya lebih baik.

2. Distribusi data

Hasil uji normalitas data dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk 1 kelompok data, menunjukkan bahwa hasil pengukuran kedalaman poket



Gambar 7. Grafik perubahan kedalaman poket periodontitis kronis sebelum, dan satu bulan setelah dikuretase dan diaplikasi dengan PBMNCs. Tampak perbaikan kedalaman poket gigi yang diaplikasi dengan PBMNCs, yang berarti terjadi regenerasi jaringan periodontal.

periodontal dengan *probe* periodontal kelompok kontrol sebelum perlakuan terdistribusi secara normal ($p > 0,15$), sedangkan data kelompok kontrol setelah perlakuan juga terdistribusi normal. Demikian juga data hasil pengukuran kedalaman poket periodontal kelompok perlakuan sebelum ($p > 0,15$) dan setelah ($p > 0,15$) diberi perlakuan, terdistribusi secara normal (Tabel 3; Lampiran C). Dengan demikian, uji statistik berikutnya dapat menggunakan analisis statistik parametrik.

3. Homogenitas data

Hasil uji homogenitas hasil pengukuran kedalaman poket periodontal menggunakan *probe* periodontal dengan uji-t antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan sebelum diberi perlakuan, menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($t = -0,72$; $p > 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa kedua kelompok berasal dari populasi yang sama (Tabel 4; Lampiran C).

4. Uji hipotesis tentang penurunan kedalaman poket periodontal

Berdasarkan hasil uji homogenitas data pengukuran kedalaman poket periodontal dengan *probe* periodontal sebelum perlakuan antara kedua kelompok yang menunjukkan bahwa kedua kelompok berasal dari populasi

yang sama, maka untuk uji hipotesisnya cukup dilakukan dengan uji-t setelah perlakuan antara kedua kelompok. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($t = 2,27$; $p < 0,05$) penurunan kedalaman poket periodontal antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Tabel 5; Lampiran C). Kelompok yang diaplikasi PBMNCs lebih menurun kedalaman poket periodontalnya bila dibandingkan dengan kelompok yang hanya dikuret. Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis yang menyebutkan bahwa PBMNCs dapat digunakan untuk meregenerasi jaringan periodontal yang rusak yang ditunjukkan dengan penurunan kedalaman poket periodontal, dapat dibuktikan.

C. Analisa perbaikan kedalaman poket pada subyek

Kedua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perbaikan, dihitung perbaikan kedalaman poketnya. Dari tabel ini terlihat bahwa dari 15 subyek, ada 7 subyek yang mendapat keuntungan dari aplikasi PBMNCs. Rata-rata penurunan kedalaman poket pada pasien yang mendapatkan keuntungan dari aplikasi PBMNCs pada kelompok kontrol mencapai 0,714 mm, sedangkan pada kelompok perlakuan mencapai 2 mm. Persentase rata-rata penurunan kedalaman poket pada pasien yang mendapatkan keuntungan dari aplikasi PBMNCs mencapai 280% (Tabel 2).

D. Peningkatan pertumbuhan tulang alveolar

1. Deskripsi Data

Rata-rata dan simpang baku hasil pengukuran pertumbuhan tulang alveolar sebelum perlakuan pada kelompok kontrol sebesar $9,87 \pm 3,91\%$, sedangkan pada kelompok perlakuan sedalam $12,78 \pm 9,87\%$. Rata-rata dan simpang baku pertumbuhan tulang alveolar setelah perlakuan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, masing-masing sedalam $15,27 \pm 12,27\%$ dan $9,37 \pm 6,83\%$.

Tabel 2. Analisa perbaikan kedalaman poket pada subyek

No	Kedalaman Poket Kelompok Kontrol Awal (A)	Kedalaman Poket Kelompok Perlakuan Awal (B)	Kedalaman Poket Kelompok Kontrol Akhir (C)	Kedalaman Poket Kelompok Perlakuan Akhir (D)	Penurunan Poket Kelompok Kontrol (A-C)	Penurunan Poket Kelompok Perlakuan (B-D)	Penurunan Poket Kelompok Perlakuan terhadap Kelompok Kontrol*
1	4	4	3	2	1	2	1
2	4	4	3	2	1	2	1
3	3	3	2	2	1	1	0
4	3	3	3	2	0	1	1
5	4	4	2	2	2	2	0
6	3	3	2	2	1	1	0
7	3	3	2	2	1	1	0
8	4	4	3	2	1	2	1
9	4	4	3	2	1	2	1
10	3	3	3	2	0	1	1
11	4	4	2	2	2	2	0
12	3	3	2	2	1	1	0
13	4	5	2	3	2	2	0
14	5	4	2	2	3	2	0
15	3	6	2	2	1	4	1
					1.2	1.733	
Jumlah pasien yang mendapatkan keuntungan dari aplikasi PBMNCs							7
Rerata penurunan kedalaman poket pada pasien yang mendapatkan keuntungan (mm)					0.714	2	
Persentase rerata penurunan kedalaman poket pada pasien yang mendapatkan keuntungan (kelompok perlakuan terhadap kelompok kontrol)					280%		

*Penurunan poket kelompok perlakuan lebih besar daripada penurunan poket kelompok kontrol = 1; Penurunan poket kelompok perlakuan sama atau lebih kecil daripada penurunan poket kelompok kontrol = 0

Berdasarkan hasil tersebut, terlihat bahwa persentase rasio jarak dari pertautan semento-enamel ke *crest* tulang alveolar dengan jarak pertautan semento-enamel ke apeks gigi pada kelompok perlakuan berkurang, sedangkan pada kelompok kontrol justru meningkat (Gambar 8). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan tulang alveolar pada kelompok perlakuan meningkat dan pada kelompok kontrol turun.

2. Distribusi data

Hasil uji normalitas data dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk 1 kelompok data, menunjukkan bahwa hasil pengukuran pengukuran pertumbuhan tulang alveolar kelompok kontrol sebelum perlakuan terdistribusi secara normal ($p > 0,15$), sedangkan data kelompok kontrol setelah perlakuan juga terdistribusi normal ($p > 0,15$). Demikian juga data hasil pengukuran pertumbuhan tulang alveolar kelompok perlakuan sebelum ($p > 0,15$) dan setelah ($p > 0,15$) diberi perlakuan, terdistribusi secara normal (Tabel 6; Lampiran C). Dengan demikian, uji statistik berikutnya dapat menggunakan analisis statistik parametrik.



Gambar 8. Grafik pertumbuhan tulang alveolar yang meningkat pada kelompok perlakuan (persentase turun) dan berkurang pada kelompok kontrol (persentase naik) menunjukkan penambahan tulang alveolar pada kelompok perlakuan lebih baik

3. Homogenitas data

Hasil uji homogenitas hasil pengukuran pertumbuhan tulang alveolar dengan uji-t antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan sebelum diberi perlakuan, menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna ($t = 1,06$; $p > 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa kedua kelompok berasal dari populasi yang sama (Tabel 7; Lampiran C).

4. Uji hipotesis tentang peningkatan pertumbuhan tulang alveolar

Berdasarkan hasil uji homogenitas data pengukuran pertumbuhan tulang alveolar sebelum perlakuan antara kedua kelompok yang menunjukkan bahwa kedua kelompok berasal dari populasi yang sama, maka untuk uji hipotesisnya cukup dilakukan dengan uji-t setelah perlakuan antara kedua kelompok. Hasilnya menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($t = 1,63$; $p > 0,05$) peningkatan pertumbuhan tulang alveolar antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Tabel 8; Lampiran C). Hasil ini menunjukkan bahwa hipotesis yang menyebutkan bahwa PBMNCs dapat digunakan untuk meregenerasi jaringan periodontal yang rusak yang ditunjukkan dengan peningkatan pertumbuhan tulang alveolar, tidak terbukti.

BAB VI

PEMBAHASAN

Rekayasa jaringan adalah bidang kedokteran yang berkembang saat ini. Sudah banyak penelitian yang melakukan rekayasa jaringan dengan cara aplikasi sel, namun untuk penyakit periodontal belum banyak penelitian yang dilakukan. Apalagi penelitian regenerasi jaringan periodontal dengan aplikasi PBMNCs, hingga kini belum ada yang melakukan di Indonesia.

Aplikasi sel berinti tunggal yang diisolasi dari sumsum tulang, sudah dilakukan pada subjek *dilated cardiomyopathy* secara autologus (Kaparthi dkk., 2008). Aplikasi sel untuk regenerasi jaringan periodontal secara autologus juga sudah dilakukan oleh Yamada dkk. (2005), menggunakan sel punca mesenkim isolat sumsum tulang. Alasan mengapa memilih aplikasi sel secara autologus adalah untuk memperkecil kemungkinan terjadinya reaksi tolakan dari pasien.

Penelitian ini bertujuan melakukan aplikasi secara *autologous* PBMNCs ke subjek periodontitis kronis untuk meregenerasi jaringan periodontal. Sel yang digunakan sebagai terapi pada penelitian ini, diisolasi dari darah tepi bukan dari sumsum tulang. Penggantian sumsum tulang sebagai sumber sel progenitor dengan darah tepi karena di dalam darah tepi juga mengandung sel berinti tunggal, termasuk sel punca (Sardjono dkk., 2009). Selain itu, dari populasi PBMNCs juga terdapat limfosit dan monosit, yang perannya juga sangat penting dalam respon imun (Frisca dkk., 2008) untuk mengeliminasi zat asing dan hancuran darah, limfe, serta jaringan (Roeslan, 2002).

Hasil penelitian yang membandingkan isolasi PBMNCs antara metode alat pemisah sel darah dengan metode Ficoll, menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara keduanya, namun metode Ficoll dianggap lebih sederhana dan efektif secara ekonomis untuk dilakukan di rumah sakit yang tidak memiliki peralatan yang canggih seperti alat pemisah sel darah. Pada aplikasi kilinis, dilaporkan bahwa PBMNCs yang diisolasi dengan metode Ficoll, dan diaplikasikan

pada penyakit *limb ischaemia*, hasilnya menunjukkan terjadinya penyembuhan (Hernandez dkk., 2007).

Pada penelitian ini, sampel dikumpulkan dari lima belas subjek penelitian dengan diagnosis periodontitis kronis, 13 pria dan 2 wanita, dengan usia rata-rata 39,47 tahun. Kontrol yang digunakan adalah sama subjek, artinya lesi kontrol dan perlakuan ada dalam satu mulut namun berbeda lokasi, baik pada rahang atas maupun rahang bawah, regio kanan maupun regio kiri. Lesi kontrol hanya dilakukan kuretase, tanpa aplikasi PBMNCs, sedangkan pada lesi perlakuan dilakukan kuretase dan aplikasi PBMNCs. Alasan menggunakan kontrol sama subyek adalah karena proses penyembuhan satu individu dengan individu yang lain berbeda-beda. Maka dengan menggunakan kontrol sama subyek, proses penyembuhan antara lesi kontrol dan lesi perlakuan dapat dibandingkan pada individu yang sama.

Darah tepi diambil dari subjek pada pagi hari, yang kemudian langsung dibawa ke laboratorium untuk dilakukan isolasi PBMNCs. Proses isolasi dilakukan di ruang *Cell Therapy Unit* (CTU) dan berlangsung kira-kira selama 2 jam. Setelah selesai, langsung diaplikasi ke lesi periodontal subjek. Jadi sel hasil isolasi tidak disimpan terlebih dahulu, sehingga sel masih segar. Alasan memilih melakukan isolasi dan aplikasi di hari yang sama adalah karena bila sel disimpan terlebih dahulu, maka sel harus melalui proses kriopreservasi, yang membuat jumlah sel yang akan diaplikasikan berkurang. Hal ini tentu saja akan mempengaruhi proses regenerasi yang diharapkan terjadi. Alasan lainnya adalah untuk efisiensi waktu kunjungan pasien selama perawatan.

Jumlah PBMNCs yang didapat dari tiap subjek pada penelitian ini juga bervariasi, sehingga jumlah PBMNCs yang diaplikasikan ke lesi periodontal subjek juga berbeda-beda. Pada penelitian ini, jumlah darah tepi yang diambil dari subjek adalah 10 mL, setelah isolasi didapat jumlah sel rata-rata $19,35 \times 10^6$ sel/mL, dengan viabilitas rata-rata 85,80%. Tidak ada korelasi antara jumlah sel yang diaplikasikan dengan tingkat penurunan kedalaman *probing*. Pengambilan darah sebanyak 10 mL sesuai dengan laporan kasus Yamada dkk. (2005). Dilaporkan bahwa dari 10 mL darah yang diambil dari sumsum tulang, jumlah sel punca mesenkim yang diaplikasikan sebanyak 10×10^6 sel/mL. Karena itu, diketahui

bahwa dengan mengaplikasikan jumlah sel sebanyak 10×10^6 sel/mL, sudah dapat memberikan efek penyembuhan. Untuk mendapatkan jumlah sel sebanyak itu, diperlukan pengambilan darah sebanyak 10 mL.

Pada penelitian ini, sel hasil isolasi diresuspensi dalam 1 mL plasma subjek itu sendiri. Pemilihan plasma dengan pertimbangan bahwa dalam plasma darah banyak mengandung faktor pertumbuhan yang berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel (Yamada dkk, 2005). Selain itu plasma juga mengandung faktor pertumbuhan yang mempercepat regenerasi tulang dan penyembuhan luka (Hokugo dkk., 2007). Namun hal ini justru membuat kerancuan, apakah penyembuhan yang terjadi karena sel yang ditransplantasikan, atau malah karena plasma darah. Untuk mengetahui kepastiannya, diperlukan penelitian lanjutan yang hanya melakukan transplantasi plasma tanpa sel.

Populasi PBMNCs yang ditransplantasikan ke lesi periodontal pada penelitian ini, diantaranya juga terdapat limfosit-T dan limfosit-B. Kedua tipe sel ini mempunyai kemampuan untuk berinteraksi dan merespon stimulus yang datang dari luar tubuh (Houry-Haddad dkk., 2007). Pada penyakit periodontal, sel inflamasi menerobos masuk di antara bakteri dan jaringan. Infiltrasi ini mengandung semua komponen yang diperlukan untuk mengontrol infeksi, termasuk limfosit-T, limfosit-B, dan sel plasma.

Penelitian ini dilakukan pada pasien periodontitis kronis, karena penyakit periodontal dalam tingkat kronis adalah yang paling umum dijumpai. Prevalensi periodontitis kronis terutama ditemukan pada orang dewasa, namun juga dapat terjadi pada anak-anak. Karakteristik periodontitis kronis adalah adanya akumulasi plak dan kalkulus, inflamasi gingival, adanya pembentukan poket periodontal, dan kerusakan tulang alveolar. Biasanya progresi penyakitnya dari lambat ke sedang, tetapi ada juga yang progresinya cepat, dan bila terjadi peningkatan progresi penyakit biasanya disebabkan oleh penyakit sistemik atau faktor lingkungan di dalam mulut yang akan mempengaruhi interaksi antara pejamu dan bakteri (Nagy dan Novak, 2006). Karena itu, dalam penelitian ini penyakit sistemik seperti diabetes mellitus, leukemia, anemia, trombositopenia, kelainan imunodefisiensi, termasuk dalam kriteria eksklusi.

Pasien hamil juga termasuk dalam kriteria eksklusi, karena pada kehamilan terjadi kerusakan sel *mast* di gusi yang disebabkan oleh meningkatnya hormon seks. Pelepasan histamin dan enzim proteolitik juga berkontribusi terhadap bertambah parahnya respon inflamasi terhadap faktor lokal, seperti plak dan kalkulus (Klokkevold dkk, 2006). Alasan lainnya adalah pertimbangan etika, karena pada penelitian ini bukan bayi di dalam kandungan yang akan diberi perawatan, tetapi gusi sang ibu, jadi tidak ada hubungannya dengan bayi. Ibu hamil tidak boleh dilakukan percobaan terapi karena termasuk yang harus dilindungi secara etika.

Sebelum aplikasi PBMNCs ke subjek penelitian ini, dilakukan kuretase untuk pembersihan kalkulus subgingiva dan jaringan granulasi pada lesi periodontal. Kuretase adalah indikasi untuk poket periodontal yang kurang dari 6 mm, mengingat kriteria inklusi dalam penelitian ini adalah adanya poket periodontal 3-6 mm. Segera setelah dilakukan kuretase, beku darah akan mengisi daerah poket yang sebagian atau seluruh lapisan epitelnya sudah tidak ada (Carranza dkk., 2006). Dalam keadaan inilah PBMNCs diaplikasikan, yang diharapkan akan menyatu dalam pembekuan darah yang terjadi di lesi. Kuretase juga berguna untuk mengembalikan integritas sementum. Hal ini sangat penting, karena faktor-faktor pertumbuhan yang dibutuhkan untuk diferensiasi sel yang meregenerasi jaringan periodontal, dilepaskan oleh sementum yang sehat. Yamada dkk. (2005) dalam laporan kasusnya, menggunakan *Platelet-Rich Plasma* (PRP), karena dianggap banyak mengandung faktor pertumbuhan yang dapat memberikan sinyal molekuler ke sel punca mesenkim agar berdiferensiasi menjadi sel jaringan periodontal. Pada laporan kasus ini, sebelum transplantasi, jaringan periodontal yang rusak dilakukan bedah periodontal. Alasan dilakukan pembedahan karena kedalaman poket pada lesi lebih dari 6 mm. Setelah satu tahun, kedalaman probing menjadi 1 mm, dan pada gambaran radiografi terlihat adanya pertumbuhan tulang alveolar.

Parameter yang digunakan pada penelitian ini adalah kedalaman poket yang diukur dengan *probe* periodontal dan pertumbuhan tulang yang diobservasi melalui gambaran radiografi. Adanya pembentukan poket periodontal adalah ciri-ciri adanya penyakit periodontal. Penurunan kedalaman poket adalah tujuan klinis terapi periodontal, dan probing poket juga dilakukan sebagai metode untuk diagnosis penyakit periodontal dan evaluasi terapi (Mombelli, 2005). Pengukuran

kedalaman poket adalah tes diagnostik klinis untuk menentukan nilai perluasan koronoapikal atau kedalaman poket periodontal.

Pada penelitian ini terjadi penurunan kedalaman poket pada seluruh subyek, namun penurunan kedalaman poket pada kelompok perlakuan lebih banyak (Gambar 7) secara bermakna ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada gigi dengan kedalaman poket 6 mm terjadi perbaikan menjadi 2 mm setelah dilakukan aplikasi sel. Hal ini mungkin terjadi karena dalamnya poket membuat sel yang diaplikasikan dapat tetap berada di dalam poket, sehingga sel dapat berfungsi secara maksimal, mengingat penelitian ini tidak menggunakan *scaffold*. Sedangkan posisi gigi tidak berpengaruh terhadap penurunan poket. Gigi regio atas tidak berbeda dengan gigi regio bawah dalam hal penurunan poket, demikian juga pada gigi anterior tidak berbeda dengan gigi posterior. Berdasarkan jenis kelamin juga tidak ada perbedaan dalam hal penurunan kedalaman probing setelah transplantasi sel (Tabel 8; Lampiran D). Bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, kelompok perlakuan yang mengalami penurunan kedalaman poket lebih dari 100% ada 5 subjek. Sedangkan yang mengalami penurunan kedalaman poket hingga 100% ada 9 subjek, dan hanya 1 subjek yang penurunannya di bawah 100% (Tabel 9; Lampiran D).

Parameter lainnya yang digunakan dalam penelitian ini adalah pertumbuhan tulang yang diobservasi melalui gambaran radiografi. Aktivitas *remodelling* tulang di sekitar lesi periodontitis kronis pada manusia tidak dapat diteliti secara langsung. Hal ini menyebabkan masih sedikitnya informasi yang didapat mengenai apa yang terjadi di daerah lesi akibat aplikasi sel. Karena itu digunakan gambaran radiografi sebagai alat yang memberikan informasi tinggi tulang alveolar. Informasi ini berguna untuk mengetahui apakah terjadi penambahan tulang alveolar setelah transplantasi sel berinti tunggal. Evaluasi tulang alveolar pada penelitian dengan subjek manusia hanya dapat dilakukan dengan radiografis. Selain itu, radiografis juga dapat memberi informasi faktor retensi plak, karies, kerusakan furkasi, kalkulus subgingival, dan kelainan patologis lainnya (Tugnait dkk., 2000). *Rontgen* foto periapikal dianggap lebih akurat untuk mengobservasi tinggi tulang alveolar dibandingkan panoramik dan teknik *bitewing*. Teknik pengambilan *rontgen* foto paralel juga dianggap baik dibandingkan dengan teknik *bisecting* (Bragger, 2005).

Ada hubungan antara radiografi dengan kedalaman poket (Tugnait dkk., 2000), yang keduanya dipakai sebagai parameter pada penelitian ini.

Teknik untuk melihat penambahan tulang melalui gambaran radiografis ada bermacam-macam. Pada penelitian ini menggunakan teknik perbandingan antara jarak dari pertautan semento-enamel ke *crest* tulang alveolar dengan jarak pertautan semento-enamel ke apeks gigi (Fukuda dkk., 2008). Setelah satu bulan, ada penambahan tulang pada kelompok perlakuan, namun perbedaannya tidak signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Akan tetapi pada penilaian tiap subjek memperlihatkan bahwa adanya perbaikan penambahan tulang pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Bila dilihat kecenderungannya (Gambar 8), pertumbuhan tulang alveolar pada kelompok perlakuan meningkat karena semakin turun persentase rasio jarak dari pertautan semento-enamel ke *crest* tulang alveolar dengan jarak pertautan semento-enamel ke apeks gigi, berarti terjadi penambahan pertumbuhan tulang alveolar. Sedangkan pada kelompok kontrol yang tidak diaplikasi dengan PBMNCs justru cenderung turun yang ditandai dengan persentase yang meningkat. Pada penelitian ini tidak ditemukan adanya reaksi tolakan, rasa sakit, ataupun inflamasi setelah aplikasi.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Aplikasi PBMNCs ke pasien periodontitis kronis dapat mengurangi kedalaman probing dalam waktu satu bulan.
2. Dalam waktu satu bulan belum terlihat penambahan tulang alveolar pada pasien periodontitis kronis yang diaplikasi dengan PBMNCs.

Saran

Aplikasi PBMNCs dapat disarankan untuk terapi penyakit periodontitis kronis. Bila dibandingkan dengan terapi sel punca, penggunaan PBMNCs lebih hemat waktu dan biaya dalam hal pengerjaan isolasi sel. Dibutuhkan penelitian lanjutan dengan waktu penelitian yang lebih lama untuk mengevaluasi pertumbuhan tulang alveolar, dan regenerasi jaringan periodontal secara keseluruhan.

SUMMARY

EFFECT OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS ON PERIODONTAL TISSUE REGENERATION

Randomized Clinical Trial on Chronic Periodontitis Patients

Literature Review

Periodontal disease comprises a group of inflammatory conditions of the supporting tissues of the teeth that cause by bacteria (Carranza and Newman, 1996). Major etiology of periodontal disease is colonization of microorganism on teeth surface, consist of plaque bacteria and its products.

Usually periodontal treatment starts from removing bacteria from periodontal tissues by scaling and root planning. Sealing and root planing may not result maximally due to teeth anatomy's complexity, which makes it difficult for the instruments to reach periodontal pocket so it will limit the root planing effectivity (Rudhart et al., 1998).

Regeneration is the growth and differentiation of new cells and intercellular substances form new tissues or parts. In the periodontal tissue, gingival epithelium is replaced by epithelium, and the underlying connective tissues and periodontal ligament are derived from connective tissue. Under normal conditions, new cells and tissues are constantly being formed to replace those that mature and die. It is manifested by mitotic activity in the epithelium of the gingival and connective tissues of the ligament periodontal. By removing bacterial plaque and creating the conditions to prevent its new formation, periodontal treatment removes the obstacle to regeneration (Carranza, 2006).

To achieve successful periodontal regeneration, the formation of a functional epithelial seal, the insertion of new connective tissue fibers to root, the reformation of new acellular cementum reformed on the root surface and the restoration of alveolar bone height are required (Bartold et al., 2000). However, the obstacle to achieving periodontal regeneration after conventional treatment modalities is the

proliferation of epithelial tissues into the defect at a faster rate than that mesenchymal tissues (Benatti et al., 2007).

Regeneration process is based on cell growth biologically. Stem cell that undifferentiated and molecule signals have major role in regeneration (Berendsen, 2008). Ligament periodontal cells are mesenchymal derived, based on that, stem cell that can support periodontal regeneration is mesenchymal stem cell (Benatti et al., 2007).

Cementum contains molecules that promote chemotactic migration, adhesion, proliferation, and differentiation of some periodontal cell types better than others, and these molecules are not detectable in other periodontal structures (BarKana et al., 2000). The growth factors and adhesion molecules present in cementum are also active toward cells of the gingiva, periodontal ligament, and alveolar bone (Bartold et al., 2000). Therefore, it is possible that cementum components have the potential to participate in the regulation of homeostasis and regeneration of these tissues (Grzesik and Narayanan, 2002).

In population of peripheral blood mononuclear cell (PBMNCs), beside stem cell, (Sardjono et al., 2009) there are progenitor cell, lymphocyte, and monocyte (Frisca dkk., 2008). Stem cell and progenitor cell has their role for regeneration of tissue damage, lymphocyte and monocyte are involved in immune system (Roeslan, 2002).

Periodontitis is an inflammatory process, therefore lymphocyte and monocyte has important role in immune system in periodontal tissues. In periodontitis there is tissue damage cause by plaque-bacteria which act as antigen. Mononuclear cell transplantation can regenerate tissue damage considered there are many cell type that can support regeneration in periodontal tissue.

The aims of this study was to evaluate effects of PBMNCs transplantation on periodontal tissue regeneration.

Material and Method

A. Material

1. Biosafety cabinet
2. Cell Counter
3. Centrifugation
4. Conical tube 10 and 50 mL
5. Conical tube rack
6. Hemocytometer
7. Eppendorf tube 1,5 mL
8. *Micropipet*
9. *Inverted microscope*
10. Periodontal probe
11. Ultrasonic scaler
12. Gracey's Curettes
13. Periapical Rontgen (*Kodak Insight Periapical*, size 30,5 x 40,5 mm)
14. Povidon Iodine
15. 2% *Xylocaine* adrenalin
16. H₂O₂ solution
17. Aquadest solution
18. Ficoll-Paque Premium (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)
19. *Vacutainer* with EDTA 3 mL (BD Franklin Lakes, NJ, USA)
20. Needle and syringe 50 mL
21. PBS (*Phosphate Buffer Saline*) KCl 1x pH 7,2
22. *Trypan Blue* (Sigma)
23. Steril tips 1 mL, 100 μ L, and 10 μ L

B. Method

The 15 samples (mean age 39,47 years) of this randomized clinical trial study were the patients undergoing treatment at Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti from February till April 2010. Autologous PBMNCs applicated into periodontal tissues. Reduction of probing depth and improvement of alveolar bone in dental radiograph are the parameter of periodontal

regeneration.

Inclusion criteria of this research were patients with chronic periodontitis more than 3 tooth, periodontal pocket 3-6 mm, tooth mobility 1-2 degree, patients willing to be recalled and willing to be research subject. Exclusion criteria were patients with other oral lesions other than gingivitis and periodontitis, patients with systemic disease (diabetes mellitus, leukemia, anemia, trombositopenia, immunodeficiency disease, and heart disease), patient with antibiotic and anti-inflammation treatment for the last 3 months, patient with cancer history, patient with drugs dependent, patient with infectious disease, patient had cell or tissue transplantation therapy, patient in growth factor, cytokines, and other chemical agents therapy, and patient with mental retardation.

Patients matched with inclusion criteria and willing to be research subject, were measured the pocket depth and periapical Rontgen were taken on 2 tooth chronic periodontitis diagnosed. First chronic periodontitis lesion was done with PBMNCs application, and other lesion was curettage only, without PBMNC application.

1. PBMNCs Isolation

Patient's peripheral blood was taken at 9 a.m. in RSGMP FKG Usakti by Palang Merah Indonesia (PMI) officer. The blood was collected for 10 mL with syringe, then removed into vacutainer with anticoagulants (EDTA). Then the vacutainer was put into ice box, and brought to *Stem Cell and Cancer Institute* laboratory. Blood removed from vacutainer to conical tube I (50 mL), added 20 mL PBS. Prepare 15 mL Ficoll-Paque Premium in conical tube II (50 mL). Transferred blood from conical tube I with pipette by layering on Ficoll-Paque Premium in conical tube II. Centrifuge conical tube II at 500g for 30 minutes. After that, drew off the upper layer containing plasma and platelets using a sterile pipette, leaving the layer of mononuclear cells undisturbed at the interface. Transferred the layer of mononuclear cells to a new conical tube (15 mL) using a sterile pipette. Added PBS as much as the transferred mononuclear cells. Suspend the cells by gently drawing them in and out of a pipette. Centrifuge at 300 g for 10 minutes. Removed the supernatant and resuspended

cell pellet using pipette. Add 50 mL PBS, centrifuge at 200 g for 10 minutes. Removed the supernatant and resuspended cell pellet using pipette. Finally, counted cells and assessed viability using Trypan blue through inverted microscope.

2. Curettage and PBMNCs application

Lesions anesthetized with Xylocaine adrenaline 2%. Granulation tissue and root surface was curettage with Gracey's curettes. Then, lesions irrigated with H₂O₂ and aquadest solution. PBMNCs was applied into the periodontal pocket. Patients instructed not to eat and drink afterwards for 1 hour. After 1 month, patients recall for pocket depth measurement and periapical Rontgen.

3. Statistical analysis

The pocket depth data obtained by direct measurements with periodontal probe, and the growth of alveolar bone data obtained by measurement in periapical Rontgen before and after PBMNCs application.

- a. Analyze of descriptive for determining mean and standard deviation each group.
- b. One group Kolmogorov-Smirnov test for determining normality distribution and for determining parametric or non-parametric statistic test.
- c. Homogeneity test using student's T-test
- d. Student's T-test for hypothesis test

Results

A. General

The subjects of this research consisted of 15 people, 13 men and 2 women. The treatment group and the control group were conducted on the same subjects in different lesion locations, either on upper or lower jaw, left or right regio. The average and common age of the subjects is $39,47 \pm 12,92$ years old.

B. The Decrease in The Periodontal Pocket

5. Data Description

The average and common result of periodontal pocket depth measure before treatment on the control result was $3,600 \pm 0,623$ mm, while in the treatment group it was $3,800 \pm 0,862$ mm. The average and standard deviation of pocket depth after treatment in the control group was $2,400 \pm 0,507$ mm and in the treatment group $2,066 \pm 0,258$ mm. Therefore, the decrease of pocket depth in the control group was $1,2 \pm 0,775$ mm and treatment group $1,733 \pm 0,799$ mm. It showed that the depth of periodontal pocket in treatment group was much less than the periodontal depth in the control treatment. Based on this result, the depth of tooth pocket applied with PBMNCs decreased and this meant better periodontal tissue regeneration.

6. Data Distribution

The result of normality test and Kolmogorov-Smirnov test for one data group shows that the result of pocket periodontal depth by periodontal probe in the control group before treatment was normally distributed ($p > 0,15$), while the control group data after treatment was also distributed normally. It was the same for the result of pocket periodontal depth measurement in the treatment group before ($p > 0,15$) and after ($p > 0,15$) treatment, it was distributed normally. Therefore, the next statistics test can use statistics parametric analysis.

7. Data Homogeneity

The homogeneity test result on the result of periodontal pocket depth measurement using periodontal probe with a student's t-test between the control group and the treatment group before treatment showed no significant difference ($t = -0,72$; $p > 0,05$). This result showed both groups came from the same population.

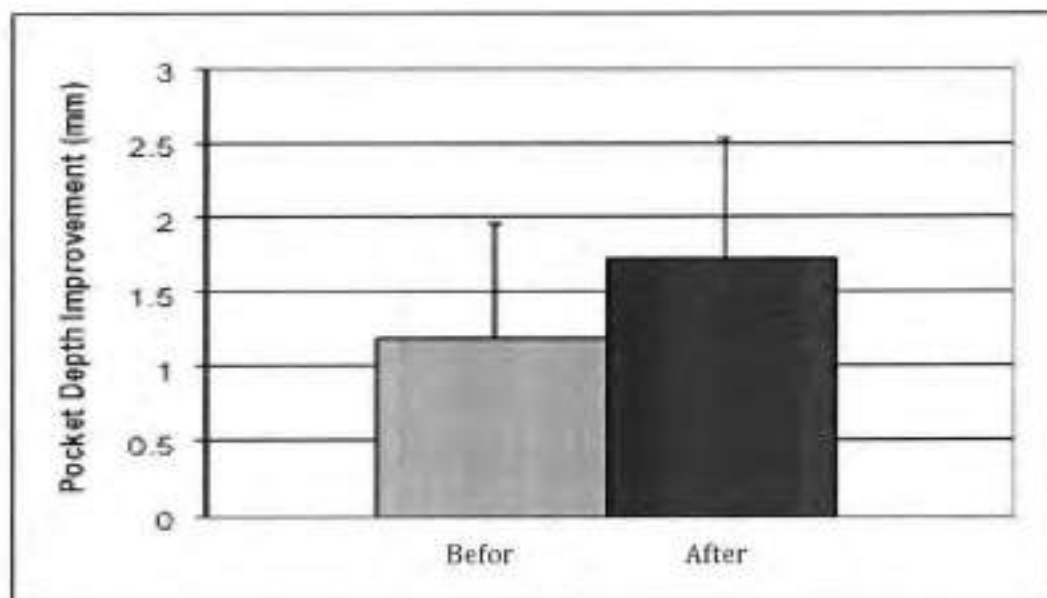


Figure 1. Chart of pocket depth improvement before and one month after curettage and PBMNCs application. Shown improvement of pocket depth in lesion with PBMNCs application, meaning there are periodontal tissue regeneration

8. Hypothesis Test on The Decrease of Periodontal Pocket Depth

Based on the homogeneity test result, the data of periodontal pocket depth measurement with periodontal probe before treatment between the two groups

showed that both came from the same population. Therefore, the hypothesis test could be conducted with just a student's t-test between the two groups after

The result showed that there was a significant difference ($t = 2,27$; $p < 0,05$), a decrease in the periodontal pocket depth between the control group and the treatment group. The group using PBMNCs application had a bigger periodontal pocket decrease than the group using curette only. This result shows that the hypothesis stating PBMNCs can be used to regenerate broken periodontal tissue shown by periodontal pocket decrease has been proven.

D. Improvement of Alveolar Bone Growth

5. Data Description

The average and common result of alveolar bone growth measurement before treatment in the control group was $9,87 \pm 3,91\%$, while in the treatment group it was $12,78 \pm 9,87\%$. The average and common alveolar bone growth after treatment in the control group and the treatment group was $15,27 \pm 12,27\%$ dan $9,37 \pm 6,83\%$ respectively.

Based on that result, it showed that the ratio percentage of the distance from semento-enamel junction to alveolar bone crest and the distance from semento-enamel junction to tooth apex in the treatment group decreased, while in the control group such distances increased. This showed that alveolar bone addition in the treatment group increased and in the control group, decreased.

6. Data Distribution

Data normality test result with Kolmogorov-Smirnov test for 1 group data showed that the result of alveolar bone growth measurement in the control group before treatment was distributed normally ($p > 0,15$), while data in the same group after treatment was also distributed normally ($p > 0,15$). The same condition applied to the treatment group before ($p > 0,15$) and after treatment ($p > 0,15$). Thus, the next statistics test can use parametric statistics analysis.

7. Data Homogeneity

Homogeneity test result on the result of alveolar bone growth measurement with student's t-test between control and treatment groups before treatment showed there was no significant difference ($t = 1,06$; $p > 0,05$). This result showed that the two groups came from the same population.

8. Hypothesis Test on Increase of Alveolar Bone Growth

Based on the data homogeneity test of alveolar bone growth measurement before treatment between the two groups which showed both groups were from the same population, it was concluded that the hypothesis test could be conducted only with a student's t-test after treatment between the groups. The result showed that there was no significant difference ($t = 1,63$; $p > 0,05$) in the increase of alveolar bone growth between the control and treatment groups. This result shows that the hypothesis stating PBMNCs can be used for periodontal tissue regeneration shown by the increase of alveolar bone growth is not true.

Discussion

Tissue engineering is currently growing in dentistry. There have been many researchs on tissue engineering by cell application, but for periodontal diseases not many researches have been conducted. No research on periodontal tissue engineering with PBMNCs application has been conducted in Indonesia.

The application of PBMNCs has been done on dilated cardiomyopathy by autologous (Karpathi, 2008). Cell application for periodontal tissue regeneration by autologous has also been done by Yamada *et al.* (2005), using the bone marrow mesenchymal stem cell. Autologous cell application was chosen to minimize the probability patients allergy reaction.

This research purposed to conduct a PBMNCs autologous application on chronic periodontitis subjects. The cell used for therapy in this research was isolated from peripheral blood, not from bone marrow. Bone marrow replacement was used as a progenitor cell resource with peripheral blood because peripheral blood has mononuclear cells inside, including stem cells (Sardjono *et al.*, 2009). Other than that, PBMNCs population also had lymphocytes and monocytes which had a very important role in immunity response (Frisca *et al.*, 2008) to eliminate foreign substance, blood ruins, and lymph (Roeslan, 2002).

Research results which compared PBMNCs isolation between blood cell sorting to Ficoll method showed that there was no significant difference between the two,

but the Ficoll method was considered simpler and more effective economically to be conducted in hospitals with no advanced equipments such as blood cell sorting. On clinical applications, reports have shown that PBMNCs isolated by the Ficoll method and applied to limb ischemia diseases results in recovery (Hernandez et al, 2007).

In this research, samples were collected from fifteen subjects diagnosed with chronic periodontitis, 13 men and 2 women with the average age of 39.47 years old. The control used was same subject, meaning control and treatment were in the same mouth but different locations, such as top and lower jaws, left and right regions. The only means of control lesion was curettage with no PBMNC application, while for treatment lesions, curettage and PBMNCs application were done. The reason for the use of same subject control was because recovery process differed from individual to individual. With the use of same subject control, the recovery process between control lesion and treatment lesion could be compared on the same individual.

Peripheral blood was taken from the subject in the morning, which would be directly brought to the laboratory for PBMNCs isolation. The isolation was carried out in the Cell Therapy Unit (CTU) room and took about two hours. Therefore, cell as the result of isolation was not stored to keep its freshness. Isolation and application were done on the same day because if cell had been stored it had to go through cryopreservation process, which would have resulted in a smaller amount of cells for application. This surely would have had affected the expected regeneration process. Another reason was to save the patient's treatment time.

The amount of PBMNCs gained from each subject in this research varied, so the amount of PBMNCs applied to subjects's periodontal lesion also varied. In this research, the amount of peripheral blood taken from subjects was 10 mL, which after isolation we gained an average cell amount of 19.35×10^6 cel/mL, with the average viability of 85.80%. There was no correlation between the amount of applied cells with the decrease in the level of probing depth. The taking of blood for 10 mL was in line with the case of Yamada et al. (2005) report. It was reported that from 10 mL of blood taken from the bone marrow, the amount of mesenchymal stem cells applied was 10×10^6 cell/mL. Therefore, we found out that applying $10 \times$

10^6 cell/mL could result in recovery effects. To get said amount of cells, blood was taken until it reached 10 mL.

In this research, isolation cells were resuspended in 1 mL subject's plasma. The plasma was chosen with the consideration that there was a growth factor which had a role in the proliferation and differentiation of cells (Yamada et al, 2005) in blood.

Other than that, plasma also has a growth factor which accelerates bone regeneration and injury recovery (Hokugo et al, 2007). However, this causes doubts about whether recovery is helped by transplanted cells or blood plasma. To find out, an extended research is needed just on the plasma transplantation without cells.

This research was conducted on chronic periodontitis patients because chronic periodontal diseases are the most common. The prevalence of chronic periodontitis is found mostly in adults, but sometimes in children as well. Systemic diseases on patients will affect the increase of disease progression (Nagy and Novak, 2006). Therefore, in this research systemic diseases such as diabetes mellitus, leukemia, anemia, thrombocytopenia and immunodeficiency are included in the exclusion criteria.

Before the application of PBMNCs on the research subject, curettage was conducted to clean subgingiva calculus and granulation tissue in periodontal lesion. Curettage is an indication of periodontal pocket less than 6 mm, considering that the inclusion criterion for periodontal pockets is the size of 3-6 mm. As soon as curettage was carried out, frozen blood would fill in some of the pocket areas or it would lose its epithelial layers (Carranza et al, 2006). It was in this condition that PBMNCs was applied, which was expected to blend with the frozen blood in the lesion. Curettage is also useful to recover the sementum integrity. This is very important because the growth factors needed for cell differentiation which regenerates periodontal tissue are dispatched by healthy sementum.

The parameter used in this research is the depth of the pockets which is measured by periodontal probe and bone growth observed through radiograph. The decrease of pocket depth is the clinical purpose of periodontal therapy, and pocket probing is also conducted as a method to diagnose periodontal diseases and therapy evaluation (Mombelli, 2005).

In this research a decrease in pocket depth happened to all subjects, but said decrease in the treatment group is significantly more ($p < 0,05$) compared to the control group. The 6 mm pocket depth of teeth shrank to 2 mm after cell application was carried out. This was possible because pocket depth made applied cells stay put so cells could function to a maximum, considering that this research did not use a scaffold. The position of the teeth did not affect the pocket decrease. Upper regio teeth did not differ from lower regio teeth when it came to pocket decrease, just as there was no difference between anterior and posterior teeth. Gender difference did not affect the probing depth decrease after cell transplant. If compared to control group, treatment group experienced a decrease of more than 100% on five subjects. Nine subjects experienced a decrease of 100% and only one experienced a decrease of less than 100%.

Other parameter used in this research was the bone growth observed through periapical radiograph image. Bone remodelling activities around chronic lesion periodontitis on human could not be directly observed. Thus, there was little information on what could happen around the lesion area after cell application, and radiography image was used as a means to find out the height of alveolar bone. This was useful to find out if alveolar bone addition took place after PBMNCs transplant.

There are many techniques to see bone addition through radiography image. This research used the technique of distance comparison from semento-enamel junction to the crest of alveolar bone and semento-enamel junction to tooth apex (Fakuda et al, 2008). After one month, there was a bone addition to the treatment group, but there was no significant difference compare to the control group. However, in the grading, each subject showed improvement in the bone addition in the treatment group instead of the control group. If we look at the tendency, the growth of alveolar bone in the treatment group increased because if the distance percentage from semento enamel junction to alveolar bone crest decreased more compared to the distance of semento-enamel junction to tooth apex, it would mean an additional growth to alveolar bone had taken place. The control treatment with no PBMNCs application experienced a decrease which was signalled by an

increased percentage. There was no pain, allergy or inflammation found in this research after PBMNCs application.

Conclusion

3. PBMNCs application to chronic periodontitis patients can decrease probing depth in one month.
4. In one month's time the addition of bone alveolar applied by PBMNCs was not apparent in chronic periodontitis patients.

Daftar Pustaka

- Adriaens, P.A., dan Adriaens L.M., 2004. Effects of nonsurgical periodontal therapy on hard and soft tissues. *Periodontol 2000*. 36:121-145.
- BarKana, I., Narayanan, A.S., Grosskop, A., Savion, N., Pitaru, S. 2000. Cementum attachment protein enriches putative cementoblastic populations on root surfaces *in vitro*. *J Dent Res* 79:1482-1488.
- Bartold, P.M., McCulloch, C.A., Narayanan, A.S., Pitaru, S. 2000. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol*. 24:253-269.
- Bartold, P.M., Walsh, L.J., dan Narayanan, A.S. 2000. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000*. 24:28-55.
- Beertsen, W., McCulloch, C.A.G., Sodek, J. 2000. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol*. 13:20-40.
- Benatti, B.B., Silverio, K.G., Casati, M.Z., Sallum, E.A., Nociti Jr, F.H. 2007. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. *J. Biosci. Bioeng.* 103:1-6.
- Berendsen, A. 2008. A tissue engineering approach to the regeneration of periodontal tissues. Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam. Amsterdam. *Thesis*.
- Bragger, U. 2005. Radiographic parameters: biological significance and clinical use. *Periodontol 2000*. 39:73-90.
- Carranza, F.A dan Newman.M.G.1996. *Glickmans Clinical Periodontology*.Ed.ke-8. Saunders., Philadelphia. Hlm. 58-61.
- Carranza, F., dan Takei. H.H. 2006. Rationale for Periodontal Treatment. Dalam *Carranza's Clinical Periodontology*. Ed. Ke-10. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Hlm. 632.
- Carranza, F. 2006. Surgical Anatomy of The Periodontium and Related Structures. Dalam *Carranza's Clinical Periodontology*. Ed. Ke-10. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Hlm. 912.

- Chapple, L.C.I dan Gilbert A.D. 2002. How does plaque cause disease? *Understanding Periodontal Disease: Assesment and Diagnostic Procedures in Practice*. Quintessence Publishing Co. Ltd.London. Hlm. 26
- Djulfbegovic, B. 2005. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: An individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. *J Clin Oncol*. 23: 5074-5087.
- Eickholz, P. 2004. Clinical periodontal diagnosis: Probing pocket depth, vertical attachment level and bleeding on probing. *Perio*. 1:75-80.
- Frisca, Sarjono, C.T, Sandra, F. 2009. Ekspansi Endothelial Progenitor Cell. *Cernin Duna Kedokteran*. 39:2. Hal. 69.
- Fukuda, C.T., Carneiro, S.R., Alves, V.T., Pustiglioni, F.E., De Micheli, G. 2008. Radiographic alveolar bone loss in patients undergoing periodontal maintenance. *Bull Tokyo Dent Coll*. 49(3):99-106.
- Gemmell, E., Yamazaki, K., dan Seymour, G.J. 2007. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol 2000*. 43:14-40.
- Grzesik, W.J. dan Narayanan, A.S. 2002. Cementum And Periodontal Wound Healing And Regeneration. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*. 2002; 13; 474.
- Hernandez, P. dkk. 2006. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation in patients with severe lower limb ischaemia: A comparison of using blood cell separator and Ficoll density gradient centrifugation. *Atherosclerosis*. 194:e52-e56.
- Hoag, P.M. dan Pawlak, E.A. 1990. *Essentials of Periodontics*. Ed. ke-4. C.V Mosby Co. St.Louis. Hlm. 38
- Hokugo, A. dkk., 2007. Controlled release of platelet growth factors enhances bone regeneration at rabbit calvaria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 104:44-8.
- Houri-Haddad, Y., Wilensky, A. dan Shapira, L. 2007. T-cell phenotype as a risk factor for periodontal disease. *Periodontol 2000*. 45:67-75.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. 1997. *Histologi Dasar*. Penerjemah: Jan Tambayong. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta. Hlm. 243.
- Kaparthi, P.L.N. 2008. Autologous bone marrow mononuclear cell delivery to dilated cardiomyopathy patients: A clinical trial. *Afr. J. Biotechnol.*. 7:207-210.

- Klokkevold, P.R., Mealey, B.R., Carranza, F.A. 2006. Influence of systemic disease and disorder on the periodontium. Dalam *Carranza's Clinical Periodontology*. Ed. Ke-9. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Hlm. 214.
- Komaki, M., Kang, M., Narayanan, A.S. 2000. Role of MAP kinases p42erk-2/p44erk-1 in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J Dent Res* 79:1789-1793.
- Lee, J-L, dkk. 2003. Clinical usefulness of the hematopoietic progenitor cell counts in predicting the optimal timing of peripheral blood stem cell harvest. *J Korean Med Sci*. 18: 27-35.
- Lemeshow, S., Hosmer, D.W.Jr., Klar, J., dan Lwansa, S. 1990. Adequacy of Sample Size in Health Studies. John Wiley and Sons. Chichester. Hlm. 39.
- Mombelli, A. 2005. Clinical parameters: biological validity and clinical utility. *Periodontol 2000*. 29:30-39.
- MacNeil, R.L. dan Somerman, M.J. 1999. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontol 2000* 19:8-20.
- Nagy, R.J., Novak, M.J. 2004. . Dalam *Carranza's Clinical Periodontology*. Ed. Ke-9. W.B. Saunders Co. Philadelphia. Hlm. 398-400.
- Roeslan, B.O. 2002. *Imunologi Oral Kelainan di dalam Rongga Mulut*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hlm. 38.
- Rudhart, A., Purucker, P., Kage, A., Hopfenmuller, W., Bernimoulin, J.P. 1998. Local metronidazole application in maintenance patients. Clinical and microbiological evaluation. *J Periodontol*. 69:1148-54.
- Sardjono, C.T., Frisca, Prawiro, E., Setiawan, B., Sandra, F. 2009. The secrets of stem cell therapy fo myocardial infarction. *Cermin Dunia Kedokteran*. 36:177-79.
- Setiawan, B. 2006. Aplikasi terapeutik sel stem embrionik pada berbagai penyakit degeneratif. *Cermin Dunia Kedokteran*. 153: 5-7.
- Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, dkk. Endothelial progenitor cells: Characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol*. 2007;23: 223-39.
- Ten Cate, A.R., Bartold, M.P., Squier, C.A., Nanci, A. 2003. Repair and regeneration of oral tissue. Dalam *Ten Cate's Oral Histology Development, Structure, and Function*. Ed. Ke-6. Mosby. St. Louise. Hlm. 410.

- Tjoa, S.T.S., de Vries, T.J., Schoenmaker, T., Kelder, A., Loos, B.G., Everts, V. 2008. Formation of osteoclast-like cells from peripheral blood of periodontitis patients occurs without supplementation of macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Clinical Periodontology*. 35:568-575.
- Tugnait, A., Clerehugh, V., Hirschmann, P.N. 2000. The usefulness of radiographs in diagnosis and management of periodontal diseases: a review. *Journal of Dentistry*. 28:219-226.
- Wang, Y., Dong, R., Liang L., Li, Y-M., Huang J., Wang, W-Q., Ding, Y. 2007. The Effects of human peripheral blood mononuclear cells on the proliferation and differentiation of human periodontal ligament fibroblast cells. *Journal of US-China Medical Science*, 4:45-50.
- Yamada, Y., Ueda, M., Hibi, H., Baba, S. 2005. A Novel Approach to Periodontal Tissue Regeneration With Mesenchymal Stem Cells And Platelet-Rich Plasma Using Tissue Engineering Technology: A Clinical Case Report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 6:363-69.
- Zhao, Y., Glesne, D., Huberman, E. 2003. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Science*. 100:2426-31.

LAMPIRAN A

- **Keterangan Kelaikan Etik**
- **Surat Pernyataan Kesediaan Menjadi Subyek Penelitian**
- **Formulir Laporan Kasus**



**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS TRISAKTI**

Komisi Etik dan Riset Biomedik pada Manusia/Hewan

Nomor : 09/KE/FKG/01/2010

Komisi Etik Riset biomedik yang menyangkut Manusia/Hewan fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti, setelah mempelajari dengan seksama Rancangan Riset yang diusulkan, menyatakan bahwa riset dengan judul :

Pengaruh Pemakaian Sel Berinti Tunggal Isolat Darah Tepi terhadap Regenerasi Jaringan Periodontal (Uji Klinik Randomisasi pada Kasus Periodontitis Kronis)

Pimpinan Riset : Drg. Moehamad Orliando

Penanggung jawab medik : DR. Drg. Bambang S.Trenggono, MBiomed

Lembaga/tempat penelitian : RSGM(P) FKG Universitas Trisakti

Dinyatakan memenuhi persyaratan etik, untuk dapat dilaksanakan dengan catatan sewaktu-waktu Komisi dapat melakukan pemantauan

Jakarta, 6 Januari 2010

Ketua

Prof. Janti Sudiono, drg.MDSc.



Sekretaris

Rahmi Amtha, drg.MDS.,PhD



INSTITUTIONAL REVIEW BOARD STEM CELL AND CANCER INSTITUTE

Jl. Ahmad Yani No. 2
Pulomas, Jakarta 13210
Indonesia
Tel : +6221-47860173; 47869756
Fax : +6221-47860180

IRB 00066254 IORG 0005199 FWA 00012373 KNEPK No.Reg 037/KNEPK/2008

No : 03/ EC/ IRB/ SCI/ KF/ 2010

Komisi Etik Penelitian Stem, Cell and Cancer Institute/ Institutional Review Board-Stem Cell and Cancer Institute (IRB-SCI), dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran telah mengambil keputusan dengan waive pada protokol yang berjudul:

Judul protokol	Pengaruh Sel Berinti Tunggal Isolat Darah Tepi Terhadap Regenerasi Jaringan Periodontal (Uji Klinik Randomisasi pada Kasus Periodontis Kronis)
Alasan waive protokol (* beri tanda √)	☐ Studi yang tidak berhubungan langsung dengan manusia ☒ Studi yang sudah mendapat Ethical Clearance dari komisi etik lain ☐ Studi atau koleksi dari data yang sudah ada (misal : spesimen pathologi) ☒ Studi untuk keperluan pendidikan ☐ Studi untuk keperluan kualitas, evaluasi, keberterimaan masyarakat terhadap makanan dan sejenisnya ☐ Studi suatu evaluasi program pelayanan (NIH, ICH-GCP)
Nama Peneliti Utama	Drg. Moehamad Orliando
Asal institusi	FKG Universitas Trisakti
Telah menyetujui protokol diatas	
Jakarta, 12 February 2010	
Ketua	
	
Prof. Dr. R. Sjamsuhidajat, Sp. B, KBD	

Informed Consent
Donatur darah tepi pada penelitian
Regenerasi Jaringan Periodontal dengan Sel Berinti Tunggal

Penyakit periodontal atau periodontitis adalah penyakit yang menyerang jaringan penyangga gigi. Penyakit ini terdiri atas sekelompok keadaan peradangan dari jaringan pendukung gigi yang disebabkan bakteri. Periodontitis merupakan proses peradangan yang dimulai dari gusi yang kemudian menyebar ke jaringan pendukung yang lebih dalam. Oleh karena itu periodontitis ditandai dengan adanya peradangan pada gusi, selanjutnya menimbulkan poket periodontal, kerusakan ligamen periodontal, dan kerusakan tulang alveolar yang akhirnya akan menyebabkan kehilangan gigi secara perlahan.

Regenerasi jaringan periodontal adalah teknik perawatan untuk menghasilkan jaringan baru agar jaringan lama yang telah rusak dapat diganti. Proses regenerasi ini berdasarkan pertumbuhan sel secara biologis. Sel yang berperan adalah sel punca yang masih belum berdiferensiasi yang berfungsi untuk regenerasi bila terjadi kerusakan selama kehidupan. Sel punca dapat ditemukan dalam populasi sel berinti tunggal yang diisolasi dari darah tepi, selain ditemukan sel punca, juga terdapat sel progenitor, limfosit, dan monosit.

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti saat ini sedang melakukan penelitian mengenai regenerasi jaringan periodontal dengan sel berinti tunggal yang diambil dari darah tepi. Penelitian ini berguna untuk menganalisa kemampuan sel berinti tunggal untuk menggantikan jaringan yang rusak di penyangga gigi dengan jaringan sehat yang baru. Oleh karena itu keterlibatan Bapak/Ibu, sebagai donatur darah dalam penelitian ini sangat bermanfaat untuk perkembangan ilmu kedokteran gigi.

Prosedur penelitian

Proses pengambilan darah tepi merupakan prosedur yang aman dan tidak menimbulkan resiko pada orang yang diambil. Prosedurnya sama dengan prosedur pengambilan darah biasa yang akan dijelaskan lebih detail sebagai berikut:

1. Proses pengambilan darah

Kami akan mengambil sedikit darah (sekitar 10 cc) dari pembuluh darah vena Anda. Pengambilan darah dilakukan oleh dokter di RSGM Universitas Trisakti dalam kondisi aseptik untuk meminimalkan resiko terjadinya infeksi. Darah selanjutnya akan diproses lebih lanjut di laboratorium SCI Jakarta.

2. Pemrosesan

Pengisolasian sel berinti tunggal dari sampel darah tepi akan dilakukan segera setelah pengambilan darah dilakukan.

3. Penggunaan

Sel berinti tunggal yang sudah diisolasi kemudian digunakan untuk meregenerasi jaringan periodontal Anda yang rusak, dengan cara ditransplantasikan ke dalam jaringan periodontal.

4. Kerahasiaan

Semua informasi dan hasil tes yang diperoleh akan tetap dijaga kerahasiaannya secara ketat, sehingga tidak memungkinkan orang lain menghubungkannya dengan Anda.

5. Kompensasi

Kami tidak memberikan kompensasi dalam bentuk apapun atas keikutsertaan Anda dalam penelitian ini. Anda melakukannya secara sukarela dan tidak akan melakukan tuntutan apapun dikemudian hari.

Anda berhak menolak ikut atau mengundurkan diri dalam penelitian ini tanpa kekhawatiran apapun. Apabila anda telah memutuskan secara sukarela untuk ikut ambil bagian, maka Anda diminta untuk menandatangani formulir persetujuan keikutsertaan dalam penelitian ini.

Formulir Persetujuan

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

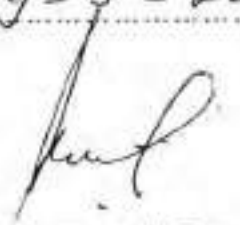
Nama : Samingan

No. KTP/SIM : 0821

Alamat : Kampung Anyar II Rt 04/Rw 10 Jelam
Kav. Pakri

Dengan ini menyatakan kesediaan saya sebagai donatur darah dalam penelitian *Regenerasi Jaringan Periodontal dengan Sel Berinti Tunggal*. Kesediaan saya untuk ikut dalam penelitian ini adalah sepenuhnya tanpa paksaan dan saya berhak untuk mengundurkan diri dari penelitian ini. Semua penjelasan di atas telah disampaikan kepada saya dan semua pertanyaan saya telah dijawab oleh pihak peneliti. Saya mengerti bahwa apabila masih memerlukan penjelasan, saya akan mendapat jawaban dari pihak peneliti. Saya telah menerima satu salinan formulir persetujuan ini.

Jakarta, 29-3-2010.


(Samingan)
Donatur

Jika diperlukan

Dalam situasi dimana penandatanganan surat persetujuan sukar diperoleh dari donatur karena kondisi donatur atau donatur tidak dapat membaca atau menulis, persetujuan secara lisan dapat diterima asalkan disaksikan oleh saksi yang tidak berpihak selama diberikan penjelasan tentang penelitian ini.

Saya, (Nama Saksi), (tanda tangan saksi)

Menyatakan bahwa (Nama Donatur) setuju untuk ikut ;

Dalam penelitian pada (tanggal persetujuan)

TRIAL ID : FKG/2010/01
Uji Klinik : Sel Berinti Tunggal

Nomer Pasien : 01
RSGM FKG Usakti :

FORMULIR LAPORAN KASUS

Regenerasi Jaringan Periodontal dengan Sel Berinti
Tunggal Isolat Darah Tepi

Principal Investigator :
Drg. Mochamad Orliando R.

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

Address : Jl. Kyai Tapa, Grogol, JaKARTA 11440

Phone No. :021-5655788

Kota : Jakarta

Negara : Indonesia

Trial ID	: FKG/2010/01
Uji Klinik	: Sel Berinti Tunggal

Petunjuk Pengisian

1. Gunakan bolpen berwarna hitam untuk mengisi formulir ini
2. Semua pertanyaan di formulir ini harus diisi
 - a. Jika suatu tes tidak dilakukan atau tidak akan dilakukan, tulis dengan "ND" (*Not Done*)
 - b. Jika pertanyaan tidak relevan (contohnya: tidak dapat diaplikasi), tulis dengan "NA" (*Not Applicable*)
 - c. Jika pertanyaan tidak dapat dijawab (contohnya: tanggal tidak diketahui), tulis dengan "NK" (*Not Known*)
3. Jika ada kesalahan dalam penulisan, dicoret saja. DATA YANG SALAH TULIS JANGAN DIHAPUS. Tulis data yang benar diatas atau disebelah data salah yang sudah dicoret. Tiap koreksi/perubahan harus ditandatangani dan diberi tanggal oleh investigator.
4. Ada tempat khusus untuk catatan-catatan/komentar penting. JANGAN MENULIS KOMENTAR DI LUAR TEMPAT YANG SUDAH DISEDIAKAN.

Trial ID : FKG/2010/01	Baseline	No. pasien : 01
Kriteria inklusi dan eksklusi	Tanggal kunjungan : $\frac{29}{\text{Hari}} / \frac{3}{\text{bulan}} / \frac{10}{\text{tahun}}$	Inisial : SM

Kriteria Inklusi untuk pasien Periodontitis Kronis	Ya	Tidak
1. Menandatangani <i>Informed Consent</i> Tanggal <i>informed consent</i> ditandatangani : $\frac{29}{\text{Hari}} / \frac{3}{\text{Bulan}} / \frac{10}{\text{Tahun}}$	☒	☐
2. Periodontitis lebih dari 3 gigi	☒	☐
3. Poket periodontal 3-6 mm di mandibula pada kedua regio	☒	☐
4. Derajat kegoyangan gigi 1-2°	☒	☐

Semua kriteria inklusi harus dijawab YA, jika ada jawaban TIDAK → Pasien tidak disertakan dalam penelitian

Trial ID : FKG/2010/01	Baseline	No. pasien : 01
Kriteria inklusi dan eksklusi	Tanggal kunjungan : 29 / 3 / 10 Hari bulan tahun	Inisial : SM

Kriteria Eksklusi untuk pasien Periodontitis Kronis	Ya	Tidak
1. Mempunyai kelainan lain di dalam rongga mulut selain gingivitis dan periodontitis	☐	☒
2. Pasien dengan penyakit sistemik (diabetes mellitus, leukemia, anemia, trombositopenia, kelainan imunodefisiensi, kelainan jantung)	☐	☒
3. Pasien tidak sedang minum antibiotika dan anti inflamasi sejak 3 bulan terakhir	☐	☒
4. Pasien dengan kelainan pertumbuhan fisik	☐	☒
5. Untuk pasien wanita : Dalam masa kehamilan/menyusui	☐	☐
6. Pasien dengan riwayat kanker	☐	☒
7. Pasien dengan ketergantungan narkoba	☐	☒
8. Pasien dengan penyakit menular	☐	☒
9. Pasien yang pernah menerima terapi transplantasi sel atau jaringan	☐	☒
10. Pasien yang dalam terapi faktor pertumbuhan, sitokin, <i>chemical agent</i> tertentu	☐	☒
11. Pasien dengan kelainan kejiwaan atau retardasi mental	☐	☒

Semua kriteria eksklusi harus dijawab TIDAK, jika ada jawaban YA → Pasien tidak disertakan dalam penelitian

Trial ID : FKG/2010/01	Baseline
Demografi/Riwayat	Tanggal kunjungan : <u>29</u> / <u>3</u> / <u>10</u> No. pasien : 01 Hari bulan tahun Inisial : SM

Demografi	
• Tanggal Lahir : <u>17</u> / <u>3</u> / <u>49</u> Hari Bulan Tahun	
• Berat : <u>60</u> _____ kg	Tinggi : <u>159</u> cm
• ☒ Laki-laki ☐ Wanita	
Pendaftaran di RSGM	
• Tanggal : <u>29</u> / <u>3</u> / <u>10</u> Hari Bulan Tahun	Jam : <u>13</u> : <u>10</u>
Diagnosis : <u>Periodontitis kronis</u> _____ _____ _____	

Trial ID : FKG/2010/01	Baseline		No. pasien : 01
Demografi/Riwayat	Tanggal kunjungan :	29 / 3 / 10 Hari bulan tahun	Inisial : SM

Riwayat Kesehatan

- 1 Apakah Anda sedang dalam perawatan dokter?
- 2 Pernahkah Anda menderita penyakit yang serius/masuk Rumah Sakit/
menjalani operasi besar
- 3 Pernahkah Anda Membutuhkan transfusi darah?
- 4 Apakah Anda menderita Diabetes Mellitus?
- 5 Apakah Anda pernah menderita penyakit-penyakit tersebut dibawah ini?
Rheumatic Fever
Inflammatory Rheumatism
Jaundice (yellow skin & eyes)
Tuberculosis
Venereal Disease
Heart Attack
Gastric Ulcer
- 6 Pernahkah dokter mengatakan Anda menderita penyakit jantung?
- 7 Pernahkah Anda lekas lelah bila bekerja ringan/jalan dekat?
- 8 Pernahkah Anda batuk dalam jangka waktu lama?
- 9 Pernahkah Anda batuk darah?
- 10 Pernahkah Anda alergi terhadap salah satu obat dibawah ini?
Aspirin
Sulfa
Penicilline
Barbiturate (obat tidur)
Anastheticum
- 11 Apakah Anda alergi terhadap salah satu makanan dibawah ini?
Udang/Kepiting
ikan
telur
- 12 Apakah Anda menderita Asthma?
- 13 Apakah Anda sedang dalam perawatan dokter untuk:
Penyakit paru-paru
Penyakit kelamin
- 14 Apakah Anda penderita:
Hypertensi
Hypotensi
Apakah Anda mengalami pendarahan yang lama/luar biasa bila Anda
- 15 terluka
- 16 Apakah Anda pernah mengalami cedera pada muka dan rahang?
- 17 Apakah Anda pernah dioperasi/mendapat perawatan penyinaran
untuk suatu tumor atau keadaan lain-lain dalam mulut dan bibir Anda?
- 18 Apakah Anda pernah mengalami sakit gigi?
- 19 Apakah gusi Anda sering berdarah?
- 20 Apakah Anda pernah mencabut gigi?

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Y/T
Y/T

Trial ID : FKG/2010/01	Baseline	No. pasien : 01
Demografi/Riwayat	Tanggal kunjungan : <u>29</u> / <u>3</u> / <u>10</u> Hari bulan tahun	Inisial : SM

21 Apakah Anda mengalami kesukaran pada waktu Anda membuka mulut lebar-lebar?

Y/T
Y/T

22 Apakah rahang Anda berbunyi "klik" waktu Anda mengunyah

23 Khusus Wanita:

Apakah Anda sedang hamil?

Y/T

Bila sedang hamil, sudah berapa bulan?

Y/T

Apakah Anda sedang haid?

Y/T

Apakah Anda telah memasuki masa menopause?

Y/T

Trial ID : FKG/2010/01	Skeling & Penghalusan Akar	
Skeling & Penghalusan Akar	Tanggal kunjungan : <u>5</u> / <u>4</u> / <u>10</u> Hari Bulan Tahun	No. pasien : 01 Inisial : SM

Skeling & Penghalusan Akar mulai jam : 13 : 30

Kondisi Umum : _____

Aggi 24, 25 & 47

Pocket 4 mm (semua)

Skeling & Penghalusan Akar selesai jam: 14 : 00

Catatan :

Trial ID : FKG/2010/01	Transplantasi Sel		No. pasien : 01
Selama transplantasi sel	Tanggal kunjungan :	5 Hari 4 bulan 10 tahun	Inisial : SM

Transplantasi Sel berinti tunggal mulai jam : 15 : 45

Kondisi Umum :

Transplantasi sel berinti tunggal gigi : 24 mesial
da

Transplantasi plasma gigi 25 mesial

Kontrol : gigi 47 distal

Transplantasi Sel berinti tunggal selesai jam: 16 : 10

Catatan :

Foto Rontgen :

Trial ID : FKG/2010/01	Setelah 4 minggu	No. Pasien : 01
Kunjungan setelah transplantasi sel	Tanggal kunjungan : <u>4</u> / <u>5</u> / <u>10</u> Hari Bulan Tahun	Inisial : S

Jam kunjungan : 12 : 45

Kondisi umum :

47 distal	3 mm
24 mesial	2 mm

Catatan :

Foto Rontgen :

Trial ID : FKG/2010/01 Uji Klinik Sel Berinti Tunggal	Pernyataan Tanggal kunjungan : <u>4</u> / <u>5</u> / <u>10</u> Hari Bulan Tahun No. Pasien : 01 Inisial : SM
--	--

Pernyataan investigator yang bertanggung jawab dalam uji klinik Saya menyatakan bahwa data dalam formulir ini adalah benar dan akurat	
Tandatangan Investigator : 	Tanggal: <u>4</u> / <u>5</u> / <u>10</u> Hari Bulan Tahun

LAMPIRAN B

- **Hasil Penghitungan Besar Sampel**

Hasil Penghitungan Besar Sampel

$$n = \frac{2sd^2 (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2}{\Delta^2}$$

n : besar sampel
 sd : rata-rata standar deviasi kedua kelompok
 $Z_{1-\alpha}$: tingkat kemaknaan
 $Z_{1-\beta}$: kekuatan uji
 Δ : perbedaan rata-rata kelompok

Hasil penelitian sebelumnya:

Rata-rata subjek sehat = 0,550

Rata-rata standar deviasi = $(0,957 + 0,577) : 2 = 0,767$

$$n = \frac{2(0,767)^2 \times (1,645 + 0,550)^2}{0,550^2} = \frac{4,425}{0,3025} = 14,6$$

Dibulatkan menjadi 15

LAMPIRAN C

- **Tabel Hasil Uji Normalitas**
- **Tabel Hasil Uji Homogenitas**
- **Tabel Hasil Uji Hipotesis**

Tabel 3. Uji normalitas data kedalaman poket periodontal dengan uji Kolmogorov-Smirnov

Variabel	D	P	Keterangan
Kontrol awal	0,095	>0,150	Distribusi normal
Kontrol akhir	0,075	>0,150	Distribusi normal
Perlakuan awal	0,118	>0,150	Distribusi normal
Perlakuan akhir	0,097	>0,150	Distribusi normal

Tabel 4. Hasil uji homogenitas data kedalaman poket periodontal antara dua kelompok sebelum perlakuan memakai uji-t

Variabel	Rata-rata $\pm$ SD	t	P
Kontrol awal	3,600 $\pm$ 0,632	-0,72	0,475
Perlakuan awal	3,800 $\pm$ 0,862		

Tabel 5. Hasil uji hipotesis penurunan kedalaman poket periodontal

Variabel	Rata-rata $\pm$ SD	t	P
Kontrol akhir	2,400 $\pm$ 0,507	2,27	0,035
Perlakuan akhir	2,067 $\pm$ 0,258		

Tabel 6. Uji normalitas penambahan tulang dengan uji Kolmogorov-Smirnov

Variabel	D	P	Keterangan
Kontrol awal	0,218	0,052	Distribusi normal
Kontrol akhir	0,195	0,099	Distribusi normal
Perlakuan awal	0,201	0,127	Distribusi normal
Perlakuan akhir	0,196	0,124	Distribusi normal

Tabel 7. Hasil uji homogenitas data penambahan tulang antara dua kelompok sebelum perlakuan memakai uji-t

Variabel	Rata-rata $\pm$ SD	t	P
Kontrol awal	9,87 $\pm$ 3,91	-1,06	0,302
Perlakuan awal	12,78 $\pm$ 9,88		

Tabel 8. Hasil uji hipotesis peningkatan pertumbuhan tulang alveolar

Variabel	Rata-rata $\pm$ SD	t	P
Kontrol akhir	15,3 $\pm$ 12,3	1,63	0,119
Perlakuan akhir	9,37 $\pm$ 6,83		

LAMPIRAN D

Tabel 9. Tabel Induk

No Pasien	Usia	Jenis Kelamin	Lokasi Lesi		Jumlah sel	Viabilitas sel (%)	Kedalaman probing (mm)				Pertumbuhan tulang (%)			
							Awal		Akhir		Awal		Akhir	
			P	K			P	K	P	K	P	K		
1	61	Laki-laki	24 mesial	47 distal	17.04 x 10 ⁶	83	4	4	2	3	15.0475	13.413	4.4625	17.0685
2	46	Laki-laki	44 mesial	47 distal	16.16 x 10 ⁶	92	4	4	2	3	10.632	9.87	10.9555	29.681
3	35	Laki-laki	41 distal	33 mesial	13.92 x 10 ⁶	75	3	3	2	2	19.891	13.626	16.6645	12.422
4	53	Laki-laki	34 distal	32 distal	17.60 x 10 ⁶	71	3	3	2	3	20.699	19.0255	16.1745	32.33
5	33	Laki-laki	33 distal	33 mesial	10.24 x 10 ⁶	85	4	4	2	2	5.6075	3.7595	2.781	5.6935
6	37	Laki-laki	44 mesial	45 mesial	7.04 x 10 ⁶	89	3	3	2	2	8.09	5.912	5.341	5.0165
7	52	Laki-laki	43 distal	33 mesial	31.20 x 10 ⁶	96	3	3	2	2	20.717	9.87	18.4215	23.7985
8	58	Laki-laki	42 mesial	43 mesial	21.76 x 10 ⁶	98	4	4	2	3	7.859	10.014	3.522	8.599
9	38	Laki-laki	44 mesial	33 mesial	28.16 x 10 ⁶	98	4	4	2	3	7.106	10.0075	7.5465	14.4045
10	32	Laki-laki	34 mesial	13 mesial	19.20 x 10 ⁶	80	3	3	2	3	0.275	9.634	2.1195	1.0465
11	32	Laki-laki	44 mesial	42 mesial	27.20 x 10 ⁶	61	4	4	2	2	6.8125	13.5645	2.1195	6.557
12	48	Laki-laki	31 mesial	42 mesial	14.40 x 10 ⁶	76	3	3	2	2	8.499	9.87	7.7225	44.5465
13	25	Laki-laki	15 mesial	13 mesial	21.44 x 10 ⁶	95	5	4	3	2	5.4005	6.0235	4.036	5.847
14	21	Perempuan	42 mesial	33 mesial	32.16 x 10 ⁶	93	4	5	2	2	14.3315	7.7955	16.971	14.2865
15	21	Perempuan	46 mesial	41 mesial	12.32 x 10 ⁶	95	6	3	2	2	40.7475	5.63	21.774	7.78

LAMPIRAN E

**Tabel 10. Hasil kemajuan kedalaman poket dan
pertumbuhan tulang**

No	Kedalaman poket (mm)				Kemajuan (%)*	Pertumbuhan tulang (%)				Kemajuan (+/-)**
	Sebelum		Sesudah			Sebelum		Sesudah		
	K	S	K	S		K	S	K	S	
1	4	4	3	2	200%	13.413	15.0475	17.0685	4.4625	Positif
2	4	4	3	2	200%	9.87	10.632	29.681	10.9555	Negatif
3	3	3	2	2	100%	13.626	19.891	12.422	16.6645	Positif
4	3	3	3	2	100%	19.0255	20.699	32.33	16.1745	Positif
5	4	4	2	2	100%	3.7595	5.6075	5.6935	2.781	Positif
6	3	3	2	2	100%	5.912	8.09	5.0165	5.341	Positif
7	3	3	2	2	100%	9.87	20.717	23.7985	18.4215	Positif
8	4	4	3	2	200%	10.014	7.859	8.599	3.522	Positif
9	4	4	3	2	200%	10.0075	7.106	14.4045	7.5465	Negatif
10	3	3	3	2	100%	9.634	0.275	1.0465	2.1195	Negatif
11	4	4	2	2	100%	13.5645	6.8125	6.557	2.1195	Positif
12	3	3	2	2	100%	9.87	8.499	44.5465	7.7225	Positif
13	4	5	2	3	100%	6.0235	5.4005	5.847	4.036	Positif
14	5	4	2	2	66%	7.7955	14.3315	14.2865	16.971	Negatif
15	3	6	2	2	400%	5.63	40.7475	7.78	21.774	Positif

*Perbandingan kemajuan kontrol dan perlakuan: $\frac{S \text{ sebelum} - S \text{ sesudah}}{K \text{ sebelum} - K \text{ sesudah}} \times 100$

**Kemajuan pertumbuhan tulang kelompok perlakuan (S), Positif = ada pertumbuhan tulang, Negatif = tidak ada pertumbuhan tulang