

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Proporsi cedera yang terjadi di Indonesia semakin meningkat. Berdasarkan data hasil Riset Kesehatan Dasar tahun 2018, proporsi cedera pada tahun 2007 sejumlah 7,5% kemudian meningkat menjadi 8,2% pada tahun 2013 dan semakin meningkat pada tahun 2018 menjadi 9,2%. Cedera dapat disebabkan oleh jatuh, kecelakaan sepeda motor, terkena benda tajam/tumpul, kejatuhan benda, dan sebagainya (Kementrian kesehatan RI, 2018). Cedera dapat mengakibatkan terjadinya defek tulang. Defek tulang diartikan sebagai kekurangan tulang yang diakibatkan oleh trauma, tumor, atau infeksi (*American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2018*).

Penyembuhan defek tulang memerlukan biaya yang tinggi. Di Amerika Serikat, biaya yang dibutuhkan oleh pasien untuk sembuh dari fraktur akibat kecelakaan diperkirakan sekitar \$10.000 per kasus (*Corso et al., 2015*). Tingginya jumlah operasi di seluruh dunia (hingga empat juta operasi setahun) untuk kasus defek tulang menyebabkan peningkatan terhadap penggunaan graf tulang (*Brydone, Meek dan MacLaine, 2010*). Di Indonesia khususnya di Surabaya, data dari Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo menunjukkan bahwa penggunaan graf tulang meningkat dari 110 penggunaan di tahun 2016 menjadi 282 penggunaan pada tahun 2017 dan semakin meningkat menjadi 585

penggunaan pada tahun 2018, sedangkan hanya 5% kebutuhan graf tulang nasional yang dapat terpenuhi (Bank Jaringan RSUD Dr. Seotomo, 2018).

Defek tulang dapat disembuhkan dengan operasi. Teknik operasi untuk menyembuhkan defek tulang bervariasi seperti cangkok tulang dengan ataupun tanpa vaskularisasi autologous, cangkok tulang *allograft* yang disediakan oleh bank jaringan muskuloskeletal, *xenograft*, atau prostesis yang memiliki kelebihan serta kekurangan masing-masing (Paderni, Terzi dan Amendola, 2009). Namun ada jenis defek tulang yang tidak dapat sembuh secara spontan meskipun telah dilakukan stabilisasi bedah sehingga memerlukan intervensi bedah lebih lanjut. Tindakan intervensi bedah yang diberikan bergantung pada ukuran defek dan lokasinya. Sebagai contoh, defek tulang yang panjangnya hingga 6 cm dan kehilangan lebih dari 50% lingkaran tulang di lokasi tulang manapun akan memerlukan *autogenous bone graft* (Keating, Simpson dan Robinson, 2005). Defek tulang tersebut dikenal dengan *critical-sized bone defect*. *Critical-sized bone defect* merupakan luka intraoseus pada tulang yang tidak akan sembuh seumur hidup atau menunjukkan kurang dari 10% regenerasi selama hidup (Schemitsch, 2017).

Graf tulang yang banyak dibutuhkan dalam penyembuhan defek tulang dapat bersumber dari tulang autograf, tulang alograf, dan material pengganti tulang. Tulang autograf memiliki kekurangan seperti volume dan bentuknya terbatas, membutuhkan operasi tambahan untuk pengambilan autograf, dan menimbulkan nyeri, infeksi maupun cedera nervus pada tempat donor (Mahyudin F, 2018a). Alternatif lain graf tulang yaitu tulang alograf yang

banyak digunakan saat ini. Alograf memiliki risiko menularkan penyakit sehingga diperlukan proses seleksi dan pengolahan yang baik (Mahyudin F, 2018b). Selain alograf, alternatif lain untuk graf tulang yaitu material pengganti tulang. Material pengganti tulang didefinisikan sebagai material sintetis, anorganik atau kombinasi organik yang dapat dipakai sebagai graf untuk terapi defek pada tulang yang bersifat biokompatibel, tidak menimbulkan reaksi inflamasi, bersifat osteokonduktif, osteoinduktif, dan dapat diserap (*resorbable*).

Beberapa jenis material pengganti tulang yaitu *xenograft*, keramik, dan polimer. *Xenograft* berasal dari spesies lain selain manusia, seperti tulang sapi (*bovine*) dan babi (*porcine*). Material pengganti tulang seperti hidroksiapatit dapat diperoleh dari bahan alami seperti tulang *bovine* sapi (dikenal dengan istilah *bovine hydroxyapatite/BHA*) atau dibuat dari bahan sintesis yang menyerupai mikrostruktur dan komposisi tulang. *Xenograft* bersifat osteokonduktif yang akan bertindak sebagai *scaffold* untuk sel tulang osteoblas dan osteoklas melekat, migrasi, tumbuh, dan membelah (Mahyudin F, 2018b).

Saat ini, graf tulang natural maupun sintetik yang bersifat osteokonduktif ideal untuk digunakan pada operasi penyembuhan defek tulang (Paderni, Terzi dan Amendola, 2009). Mayoritas kasus defek tulang dapat disembuhkan dengan *scaffold* saja sehingga hanya membutuhkan graf tulang yang bersifat osteokonduktif. Pada kasus defek tulang yang parah seperti *critical-sized bone defect*, dapat disembuhkan dengan *scaffold* yang

dikombinasikan dengan faktor osteogenik sehingga dibutuhkan graf tulang yang bersifat osteokonduktif dan osteoinduktif.

Dalam beberapa kasus dengan defek tulang, masih memungkinkan untuk memperbaiki defek tersebut tanpa transplantasi sel dengan bertindak pada sel inang (*host*) dan menginduksi kemampuan regenerasi jaringan *host*. Contohnya yaitu graf tulang dari hidroksiapatit yang ditambahkan dengan metabolit *stem cell* / sekretom. Sekretom mampu memodulasi lingkungan di sekitar jaringan yang rusak dan merangsang proses regenerasi (Mancuso *et al.*, 2019). Kelebihan lain dari sekretom yaitu dapat diliofilisasi (*freeze dried*) sehingga memungkinkan kondisi penyimpanan yang lebih praktis dan siap digunakan (Burdette *et al.*, 2018). *Freeze-dried* sekretom tidak menyebabkan perubahan morfologi vesikel ekstraseluler (EV), aman, dan efektif melawan kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif (Bari *et al.*, 2018).

Hidroksiapatit bersifat biokompatibel, tidak toksik, osteokonduktif, tidak menimbulkan inflamasi dan reaksi penolakan pada sistem imun serta bersifat bioaktif. Metabolit *stem cell* dapat diartikan sebagai faktor/molekul yang disekresikan oleh *stem cell* ke ruang ekstraseluler. Faktor yang disekresikan di antaranya protein terlarut, asam nukleat bebas, lipid dan vesikula ekstraseluler. *Growth factors* yang terkandung dalam *stem cells* berperan penting dalam regenerasi pada jaringan organ yang rusak khususnya pada proses proliferasi (Vizoso *et al.*, 2017). Kadar *growth factors* seperti TGF- β , *vascular endothelial growth factors* (VEGF), *fibroblast growth factor 2* (FGF2), *hepatocyte growth factor* (HGF) dan *insulin-like growth factor* (IGF)

pada sekretom dapat ditingkatkan dengan beberapa strategi, salah satunya menggunakan strategi kultur hipoksia (Cunningham, Redondo-Castro dan Allan, 2018). Sekretom yang diberi perlakuan pada kondisi hipoksia dapat memengaruhi regenerasi tulang secara efektif melalui peningkatan migrasi dan adhesi *mesenchymal stem cells* (MSC) (Chang *et al.*, 2015).

Penelitian mengenai pengaruh sekretom terhadap penyembuhan *critical-sized bone defect* pada model hewan coba telah dilakukan oleh Burdette *et al.* tahun 2018. Tikus yang diberi perlukaan *critical-sized bone defect* dan diberikan sekretom terbukti mengalami peningkatan volume dan konektivitas tulang baru pada minggu ke-12, peningkatan angiogenesis pada minggu ke-4 serta kepadatan tulang pada minggu ke-4 dan ke-12 tanpa batasan yang merusak dari penggunaan *autograft* sebab dalam penelitiannya, Burdette *et al* menggunakan *autograft* yang menjadi pilihan utama namun memiliki kekurangan pada ketersediaan *autograft* yang terbatas serta memerlukan operasi tambahan. Penggunaan sekretom yang dikompositkan dengan *autograft* mampu mengatasi kekurangan tersebut (Burdette *et al.*, 2018).

Penelitian klinis aplikasi sekretom pada salah satu kasus kedokteran gigi yang disebut *maxillary sinus floor elevation* (SFE) telah dilakukan oleh Katagiri *et al* tahun 2017. Hasil dari penelitian tersebut yaitu sekretom dapat meningkatkan vaskularisasi dan pembentukan tulang baru pada *maxillary* SFE (Katagiri *et al.*, 2017). Selain itu, sebuah laporan kasus mengenai penggunaan sekretom dari *human* MSC untuk regenerasi tulang alveolar membuktikan bahwa sekretom aman digunakan dengan tanda-tanda inflamasi yang lebih

sedikit berdasarkan hasil uji histopatologi anatomi serta memiliki potensi osteogenik yang besar untuk pengobatan regeneratif tulang (Katagiri *et al.*, 2016).

Penelitian menggunakan komposit *freeze-dried* BHA-sekretom normoksia dan hipoksia sebagai graf tulang untuk aplikasi defek tulang belum pernah dilakukan sebelumnya. Ide penelitian untuk mengkompositkan BHA dengan sekretom merupakan pengembangan material graf tulang yang diharapkan dapat bersifat osteokonduktif dan osteoinduktif. Metode *freeze-dried* diharapkan dapat membuat komposit *freeze-dried* BHA-sekretom normoksia dan hipoksia dapat disimpan dalam suhu ruang.

Berdasarkan hasil penelitian di atas, maka perlu dilakukan penelitian *freeze-dried* BHA-sekretom pada kondisi kultur normoksia dan hipoksia untuk mengetahui efikasi kandidat graf tulang tersebut pada penyembuhan *critical-sized defect*. Efektivitas komposit tersebut dapat diketahui melalui serangkaian uji *in vitro* dan *in vivo*. Pada uji *in vitro*, perlu dilakukan uji morfologi menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM), analisa gugus fungsi menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR), uji sitotoksisitas menggunakan metode MTT Assay, uji degradasi, dan uji *swelling* untuk mengetahui rasio *swelling* dari BHA terhadap sekretom. Sedangkan pada uji *in vivo*, perlu dilakukan uji histopatologi anatomi untuk mengetahui adanya *woven bone* pada proses penyembuhan tulang (*bone healing*) kasus *critical-sized defect* pada minggu ke-4 karena pada minggu ke-4 merupakan waktu terbentuknya *woven bone* yang diawali sejak hari ke-5 hingga 4 minggu setelah

dilakukan operasi pembedahan pada kelinci (Zhao, Yang dan Wang, 2018). Pada minggu ke-4 juga terjadi peningkatan angiogenesis (Burdette *et al.*, 2018). Proses remodeling akan mencapai puncaknya pada minggu ke-6 setelah operasi (Zhao, Yang dan Wang, 2018).

1.2 Rumusan Permasalahan

1. Bagaimana pengaruh kondisi kultur normoksia dan hipoksia terhadap karakteristik sampel komposit *freeze dried* BHA-sekretom melalui uji morfologi, analisa gugus fungsi, uji sitotoksitas, uji degradasi, dan uji *swelling* sebagai kandidat graf tulang?
2. Bagaimana pengaruh kondisi kultur normoksia dan hipoksia terhadap karakteristik *woven bone* dalam proses penyembuhan tulang pada seluruh sampel sebagai kandidat graf tulang terhadap uji histopatologi anatomi pada minggu ke-4?

1.3 Batasan Masalah

Pembatasan masalah perlu dibuat agar pembahasan masalah lebih mengerucut dan tidak menyimpang dari topik penelitian. Batasan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. *Bovine hydroxyapatite* (BHA) yang digunakan merupakan produksi Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
2. Metabolit *stem cell* / sekretom yang digunakan berasal dari *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells* (BM-MSCs).

3. Sintesis BHA dan metabolit *stem cell*/sekretom dilakukan sesuai prosedur Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya.
4. Kadar *growth factor* pada setiap sampel dalam penelitian ini tidak diteliti.
5. Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci putih New Zealand jantan usia 6-9 bulan dengan berat badan 2500-3000 gram.
6. *Critical-sized defect* dibuat di tulang pengumpil (os radius) kelinci sepanjang ± 1 cm.
7. Karakterisasi yang dilakukan meliputi uji morfologi, uji gugus fungsi, uji sitotoksitas, uji degradasi, uji *swelling*, dan uji histopatologi anatomi untuk mengetahui keberadaan *woven bone* pada tulang radius hewan coba.
8. Waktu pengamatan hewan coba untuk dilakukan uji histopatologi anatomi adalah pada minggu ke-4.

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Mengetahui efikasi penyembuhan tulang yang ditandai oleh terbentuknya *woven bone* pada tulang radius hewan coba yang telah diimplankan komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia sebagai kandidat graf tulang.

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui struktur permukaan dan ukuran pori pada komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia melalui uji morfologi menggunakan SEM.

2. Mengetahui gugus fungsi yang terbentuk pada komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia melalui analisa gugus fungsi menggunakan FTIR.
3. Mengetahui tingkat sitotoksisitas komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia melalui MTT Assay.
4. Mengetahui laju degradasi komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia melalui uji degradasi.
5. Mengetahui rasio *swelling* komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia melalui uji *swelling*.
6. Mengetahui karakteristik *woven bone* dalam proses penyembuhan tulang pada komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia melalui uji histopatologi anatomi yang dilakukan pengamatan pada minggu ke-4.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Manfaat Teoritis

Mengetahui karakteristik permukaan dan ukuran pori, gugus fungsi yang terbentuk, sitotoksisitas, laju degradasi, rasio *swelling* serta karakteristik *woven bone* berdasarkan hasil uji histopatologi dari komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia sebagai kandidat graf tulang.

1.5.2 Manfaat Praktis

Didapatkan graf tulang komposit *freeze dried* BHA-sekretom yang dikultur pada kondisi normoksia dan hipoksia yang dapat disimpan dalam suhu ruang sehingga dapat diproduksi massal dan dapat digunakan pada aplikasi klinis untuk penyembuhan *critical-sized bone defect*.