

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Defek tulang masih menjadi masalah di dunia orthopaedi. Defek tulang dapat disebabkan karena metabolik seperti osteoporosis, osteopenia dan penyakit metabolik lainnya, juga karena tumor tulang baik karena tumornya sendiri maupun karena reseksi oleh dokter bedahnya. Penyebab defek tulang lainnya adalah infeksi pada tulang dan akibat trauma yang hebat sehingga tulang banyak yang rusak dan harus dibuang. Selain sulitnya penanganan masalah tersebut, defek tulang memerlukan pembiayaan yang mahal, dilaporkan di Amerika dikatakan bahwa pembiayaan masalah ini, setiap kasusnya adalah 25.000 dolar Amerika. (Wiese *et al.*, 2010).

Beberapa usaha telah dilakukan untuk penanganan masalah ini dengan menggunakan berbagai macam cangkok tulang. Berdasarkan penelitian multisenter didapatkan data adanya kegagalan cangkok tulang sebesar 17 %, baik karena infeksi, patah pada cangkok tulang dan *nonunion*. Penelitian tersebut juga dilaporkan bahwa terjadi komplikasi sebesar 13% pada operasi yang pertama, dan masalah terbesar adalah penggunaan *allograft* sepanjang 18 centimeter atau lebih. ( Zakry *et al.*, 2019)

*Mesenchymal stem cell* didefinisikan sebagai sel yang belum terdiferensiasi. Sel tersebut mampu berkembang sendiri, berdiferensiasi menjadi jenis sel yang lain, serta mempunyai fungsi yang khusus (Biehl *et al.*, 2009).

*Mesenchymal stem cell* dibedakan berdasarkan kemampuan sel tersebut untuk menghasilkan keturunan sel tertentu, yang tergantung pada jenis sel induk dan lingkungan ekstraselulernya. Sel induk berperan dalam mengontrol perubahan menjadi beberapa jenis sel yang berguna untuk membentuk berbagai sistem jaringan dan organ yang berbeda. Hal ini memungkinkan para ilmuwan berkesempatan untuk menghasilkan sel tertentu sebagai pengganti fungsi yang berbeda atau hilang pada beberapa penyakit. (Elbuluk, *et al.*, 2017)

Pada penelitian, rekonstruksi kerusakan tulang masif sebagai akibat berbagai penyakit seperti trauma maupun tumor, masih menjadi permasalahan di bidang orthopaedi dan traumatologi, jika tidak mendapatkan penanganan yang baik akan menyebabkan kecacatan pada pasien. Rekonstruksi pada kerusakan tulang masif memerlukan *graft* tulang yang berukuran besar. *Graft* tulang yang ideal harus memiliki karakteristik osteoinduktif, osteokonduktif, dan osteogenesis. Pada suatu penelitian telah terbukti bahwa terjadi proses regenerasi tulang pada kerusakan tulang yang masif dengan menggunakan *bovine hydroxyapatite* sebagai *scaffold* yang telah dilakukan *seeding mesenchymal stem cell (MSC)*. (Ferdiansyah *et al.*, 2011)

Pada kondisi defek tulang yang luas merupakan tantangan pada dunia kedokteran terutama bidang ortopaedi. Pada pasien dengan penurunan kemampuan regenerasi jaringan yang kurang karena trauma berat, penyakit kronis, dan usia lanjut akan sulit terjadi penutupan pada defek tulang tersebut. Beberapa penelitian mengusahakan peningkatan kualitas tulang untuk membantu beregenerasi dengan mengaplikasikan *mesenchymal stem cell (MSC)*. atau

jaringan tulang berbasis sel terapi atau *mesenchymal stem cell*. Namun, dalam penggunaan klinis telah terjadi hambatan karena rumitnya perlakuan terhadap sel dan kompleksitas terapi sel tersebut, serta biaya yang berkaitan dengan pembuatan, dan peraturan yang berlaku. Saat ini, terjadi pergeseran dari pandangan terapi dari MSC yang secara langsung berkontribusi pada regenerasi jaringan, berubah menjadi MSC sebagai pemroduksi molekul bioaktif yang berguna untuk regenerasi tulang. Bioaktif yang diproduksi oleh *mesenchymal stem cell* ini disekresikan oleh *mesenchymal stem cell* dan biasa disebut *secretome*. Bioaktif atau protein pada *secretome* inilah yang akan dapat berperan pada regenerasi tulang. Metode ini tentunya akan lebih mudah, sederhana dan murah jika dibandingkan dengan terapi sel. (Marolt Presen *et al.*, 2019)

Untuk mendapatkan *secretome* yang berguna untuk regenerasi tulang maka harus dimengerti protein apa saja yang penting untuk regenerasi tulang. *Secretome* yang banyak mengandung protein yang berguna untuk regenerasi tulang ini dapat digunakan untuk terapi regenerasi tulang baik menggunakan atau tanpa *scaffold*. Berbagai faktor pertumbuhan diperlukan dalam proses diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblast*. *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) dalam hal ini adalah BMP 2, *Insulin Growth Factor* (IGF) dan *Transforming Growth Factor* (TGF $\beta$ ) dikatakan sebagai faktor pertumbuhan yang berperan dalam diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblast*. BMPs, TGF  $\beta$ , dan IGF dilaporkan dapat mengaktivasi faktor transkripsi RUNX 2 ini akan mengaktifkan faktor transkripsi yang lain, yaitu *osterix* (ORX) sehingga terjadilah

proses diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblastt*. (De Gorter *et al.*, 2013)

Dalam proses diferensiasi *mesenchymal stem cell* menjadi *osteoblastt*, RUNX2 merupakan gen yang sangat penting untuk *mesenchymal stem cell* menuju garis turunan *osteoblastt* dan secara aktif mengarahkan tahap awal diferensiasi *osteoblastt*. *Osterix* (OSX) mulai memainkan peran penting dalam diferensiasi menuju *osteoblast* mengikuti kondensasi *mesenchymal* yang dimediasi RUNX2. Selama proses berdiferensiasi, RUNX2 terlibat dalam ekspresi gen matriks tulang *collagen type 1* (Col1), *osteopontin* (OPN), dan *osteonectin* (ON). (Choi *et al.*, 2014) (Bruderer *et al.*, 2014)

Pada terapi regeneratif menggunakan *Mesenchymal stem cell* yang diperbanyak secara *in vitro*, menawarkan harapan yang baik bagi penderita penyakit degeneratif yang selama ini dianggap tidak dapat diobati. Kondisi laboratorium, secara umum untuk kultur sel induk melibatkan kadar oksigen pada media kultivasi. Pada media kultivasi konsentrasi oksigen 20% pada ruangan laboratorium berbeda dengan kondisi lingkungan asli jaringan di mana kadar oksigen sekitar 2-9%, untuk musculoskeletal adalah 5%. Kadar oksigen memainkan peran penting pada nasib *Mesenchymal stem cell* dalam hal proliferasi dan diferensiasi, melalui pengaturan ekspresi yang dimediasi *hipoksia-inducible-factor 1* (HIF-1) dari gen yang berbeda. Pada akhirnya dapat disimpulkan bahwa lingkungan hipoksia dapat sangat meningkatkan kinetika pertumbuhan, stabilitas genetik, dan ekspresi reseptor kemokin selama kultivasi. (Haque *et al.*, 2013)

Pada penelitian tentang pengaruh hipoksia terhadap proses osteogenesis atau diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblast* memberikan hasil yang negatif. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa kondisi hipoksia akan mengaktivasi HIF-1 yang akan mengaktifkan TWIST yang nantinya juga akan meningkatkan produksi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Pada proses diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblast*, ternyata TWIST yang muncul akibat kondisi hipoksia ini merupakan faktor penghambat ekspresi gen RUNX2 pada *mesenchymal stem cell*. Sedangkan RUNX2 ini sangat diperlukan untuk memproduksi *osterix* yang berguna untuk diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju osteogenesis dan mineralisasi, sehingga proses diferensiasi *mesenchymal stem cell* menjadi *osteoblast* terhambat dan *mesenchymal stem cell* tetap pada kondisi originalitasnya. (Tsai *et al.*, 2012)

*Demineralized bone matrix* (DBM) dilaporkan berpengaruh pada kultur *mesenchymal stem cell* pada media kultivasi, terjadi banyak diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblast*. Pada penelitian tersebut juga menunjukkan peningkatan sekresi protein penanda *osteoblast* seperti ALP, *osteocalcin*, *osteopontin* (El-Sabban *et al.*, 2007) Pada penelitian lain, DBM merupakan suatu osteoinduktif, yang didalamnya mengandung faktor pertumbuhan yang berupa *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) 2, *insulin-like growth factor-1* (IGF-I) dan *transforming growth factor- $\beta$ 1* (TGF $\beta$ 1). Faktor pertumbuhan tersebut berfungsi dalam proses osteogenesis. (Blum *et al.*, 2004)

DBM yang mengandung IGF, TGF $\beta$  dan BMP2 akan mempengaruhi *mesenchymal stem cell* melalui reseptornya IGFR, TGF $\beta$ R dan BMPR2. IGF

melalui reseptornya IGFR akan mengaktifkan protein *Protein kinase B (PKB)* yang biasa disebut Akt dan (*Protein kinase C*) PKC yang mempengaruhi faktor transkripsi RUNX2 sehingga terpicu proses diferensiasi menuju *osteoblast*. TGF $\beta$  dan BMP2 melalui reseptor yang berbeda mengaktifkan protein SMAD menjadi SMAD aktif (SMAD $\beta$ ) yang memicu faktor transkripsi RUNX2 juga sehingga juga memicu diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblast*. Pada proses diferensiasi ini RUNX2 memicu protein lain seperti ALP, kolagen tipe 1, Osteokalsin, Osteopontin, Osteonektin yang dikenal sebagai protein sebagai produk proses diferensiasi. (Grafe *et al.*, 2018) Pada penelitian lain, dilaporkan DBM pada kultur *mesenchymal stem cell*, juga akan memicu proses proliferasi, sehingga jumlah sel semakin banyak. Pada media kultur *mesenchymal stem cell* juga mengeluarkan banyak jenis sekretom. *Secretome* tersebut terdiri banyak protein, baik media inflamasi maupun berbagai faktor pertumbuhan. IGF melalui protein Akt (Jung, H. J., & Suh, Y. , 2015) sedangkan TGF $\beta$  dan BMP2 yang melalui protein SMAD yang aktif akan memicu proses proliferasi sel.( *Prunier, C et al.*, 2018)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dampak produksi protein yang berguna untuk regenerasi tulang, IGF1, TGF $\beta$  dan BMP2 pada *secretome* kultur *mesenchymal stem cell* dengan pengaruh perlakuan DBM dan kondisi hipoksia. DBM yang dapat meningkatkan proliferasi *mesenchymal stem cell* yang akan menghasilkan protein pertumbuhan untuk osteogenesis yang banyak. DBM pada sisi lain mempengaruhi proses diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblast* akan segera menutup produksi protein pertumbuhan yang diperlukan

untuk osteogenesis. Faktor hipoksia merupakan faktor penghambat diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju *osteoblast* sehingga *mesenchymal stem cell* tetap pada originalitasnya memproduksi hormon pertumbuhan lebih banyak. Tentunya harapan kami dengan adanya faktor hipoksia dan DBM akan meningkatkan metabolisme *mesenchymal stem cell* dan menghasilkan *secretome* yang banyak mengandung protein yang diperlukan untuk diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju sel *osteoblast* sehingga berguna untuk terapi regenerasi tulang.

## 1. 2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan pada penelitian ini adalah;

1. Apakah terdapat perbedaan kadar sekresi TGF $\beta$  antara kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.
2. Apakah terdapat perbedaan kadar sekresi BMP2 antara kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.
3. Apakah terdapat perbedaan kadar sekresi IGF antara kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.
4. Apakah terdapat perbedaan kadar sekresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi

normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.

5. Apakah terdapat perbedaan kadar sekresi *alkaline phosphatase* (ALP) pada kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan umum

Menjelaskan peran kondisi hipoksi dan DBM dalam meningkatkan produksi *secretome* yang berpengaruh dalam diferensiasi *mesenchymal stem cell* menjadi sel *osteoblast*.

#### 1.3.2 Tujuan khusus

1. Menganalisis perbedaan kadar sekresi *transforming growth factor* (TGF  $\beta$ ), pada kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.
2. Menganalisis perbedaan kadar sekresi *bone morphogenetic factors* (BMP 2), pada kultur *mesenchymal stem* kondisi normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.
3. Menganalisis terdapat perbedaan kadar sekresi *insulin-like growth factor* (IGF) pada kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi

normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.

4. Menganalisis terdapat perbedaan kadar sekresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.
5. Menganalisis perbedaan kadar *alkaline phosphatase* (ALP) pada kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi normoksia, dengan kultur *mesenchymal stem cell* dengan kondisi hipoksia dalam media dengan atau tanpa DBM secara *in vitro*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat teoritis

Secara ilmiah dapat memberikan informasi faktor hipoksia dan DBM akan meningkatkan metabolisme *mesenchymal stem cell* menghasilkan *secretome* yang diperlukan untuk diferensiasi *mesenchymal stem cell* menuju sel *osteoblast*.

### 1.4.2 Manfaat praktis

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai alternatif terapi regeneratif pada tulang. Penelitian ini akan dapat diketahui faktor DBM, hipoksia dalam perannya menghasilkan *secretome* yang tinggi kadar protein yang berguna untuk regenerasi tulang.