



Orthopaedic Tissue Engineering

INOVASI TATA LAKSANA
PENYAKIT MUSKULOSKELETAL

Ferdiansyah Mahyudin

EDITOR

Heri Suroto

Dwikora Novembri Utomo

Orthopaedic Tissue Engineering

INOVASI TATA LAKSANA
PENYAKIT MUSKULOSKELETAL

Pasal 113 Undang-undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta:

- (1) Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
- (2) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/ atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
- (3) Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/ atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
- (4) Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

Orthopaedic Tissue Engineering

INOVASI TATA LAKSANA
PENYAKIT MUSKULOSKELETAL

Dr. FERDIANSYAH MAHYUDIN, dr., Sp.OT(K)

EDITOR

Dr. HERI SUROTO, dr., Sp.OT(K)

Dr. DWIKORA NOVEMBRI UTOMO, dr., Sp.OT(K)



Airlangga
Universitas
Press

■ Pusat Penerbitan dan Percetakan
Universitas Airlangga

ORTHOPAEDIC TISSUE ENGINEERING

Inovasi Tata Laksana Penyakit Muskuloskeletal

Ferdiansyah Mahyudin; Editor: Heri Suroto, Dwikora Novembri Utomo

ISBN 978-602-473-622-4
e-ISBN 978-602-473-638-5

© 2020 Penerbit **Airlangga University Press**

Anggota IKAPI dan APPTI Jawa Timur
Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115
Telp. (031) 5992246, 5992247 Fax. (031) 5992248
E-mail: adm@aup.unair.ac.id

Layout (Achmad Tohir S.)
Cover (Erie Febrianto)
Digitalisasi (Tim Ebook AUP)

Dicetak oleh:

Pusat Penerbitan dan Percetakan UNAIR
AUP 992/09.20 - RK162/06.20

Hak Cipta dilindungi oleh undang-undang.
Dilarang mengutip dan/atau memperbanyak tanpa izin tertulis
dari Penerbit sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apa pun.

Prakata

Ucapan syukur *Alhamdulillah* kami sampaikan kepada Allah SWT, yang maha mengetahui (*Al-Aleem*), yang maha pandai (*Ar-Rashid*) atas berkat rahmat dan bimbingan-Nya maka buku yang berjudul *Orthopadic Tissue Engineering, Inovasi Tata Laksana Penyakit Muskuloskeletal* dapat terselesaikan. Buku ini menjadi istimewa karena dapat diselesaikan pada masa pandemik Covid-19, di mana penulis memiliki waktu lebih banyak untuk menyelesaikan buku ini.

Dewasa ini pengetahuan dan penelitian Ilmu Kedokteran Regeneratif (*Regenerative Medicine*) yang meliputi terapi sel punca (*cells based therapy*) dan rekayasa jaringan (*tissue engineering*) telah berjalan sangat pesat, banyak temuan baru yang telah dihasilkan. Penelitian *in vitro* di laboratorium dilanjutkan penelitian pada model hewan coba dan sekarang sudah banyak penelitian dilakukan pada manusia dengan berbagai penyakit. Penelitian-penelitian akan membawa terapi sel punca dan rekayasa jaringan kepada penggunaan sebagai standar untuk penyakit-penyakit yang belum bisa disembuhkan dengan metode terapi saat ini.

Buku ini disusun berdasarkan pengalaman penulis sebagai peneliti sel punca sejak tahun 2006. Materi buku ini merupakan kompilasi dari berbagai publikasi baik berupa buku, jurnal, bahan kuliah, dan presentasi pada forum ilmiah yang merupakan karya penulis dan beberapa anggota Pusat Kedokteran Regeneratif dan Stem Cells RSUD Dr. Soetomo/FK UNAIR dari berbagai bidang ilmu, terutama dari Ilmu Orthopaedi dan Traumatologi, dilengkapi dengan beberapa literatur terbaru di bidang rekayasa jaringan orthopaedi. Dengan demikian diharapkan buku ini akan menjadi referensi bagi peneliti, dan para praktisi di bidang sel punca.

Tentu saja kami menyadari bahwa ilmu berkembang pesat termasuk di bidang Ilmu Kedokteran Regeneratif, sehingga kita semua harus terus belajar dan meneliti dalam rangka mengembangkan ilmu ini sehingga bermanfaat bagi masyarakat dan pasien pada khususnya.

Kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Instalasi Bank Jaringan dan Sel RSUD Dr. Soetomo/FK UNAIR, Pusat Penelitian dan Pengembangan Sel Punca UNAIR beserta seluruh stafnya yang telah banyak membantu dalam publikasi berbagai jurnal dan buku di bidang sel punca, begitu juga kepada Departemen Orthopaedi & Traumatologi di mana penulis bekerja sebagai staf medik. Akhirnya, kami mengucapkan terima kasih kepada istri (Dr. Rahayu Setyaningsih, dr., Sp.KFR[K]), kedua putri kami (dr. Fadhilah Rahmah Pratiwi dan Haniyah Puti Alimah, S.Ked) serta kedua orang tua dan mertua yang menjadi pendorong dan pemberi semangat atas penulisan buku ini.

Penulis

Dr. Ferdiansyah Mahyudin, dr., Sp.OT(K)

Daftar Isi

Prakata	v
Daftar Gambar	ix
Daftar Tabel	xvii
Daftar Singkatan	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
BAB 2 BIOLOGI JARINGAN MUSKULOSKELETAL	9
Tulang	9
Kartilago	20
Tendon dan Ligamentum	30
BAB 3 PROBLEM PENYEMBUHAN JARINGAN MUSKULOSKELETAL	39
Tulang	39
Kartilago	47
Tendon dan Ligamentum	54

BAB 4 REKAYASA JARINGAN	59
Biomaterial/Scaffold	62
Sel-Sel	91
Bioreaktor	112
BAB 5 REKAYASA JARINGAN TULANG (BONE TISSUE ENGINEERING)	117
Graft Tulang dan Subtitutes untuk Terapi Defek Tulang	120
Faktor-Faktor Pertumbuhan untuk Regenerasi Tulang	132
Graft Tulang Extender	135
Sel Punca Mesenkimal (<i>Mesenchymal Stem Cells/Mscs</i>) untuk Regenerasi Tulang	139
BAB 6 REKAYASA JARINGAN KARTILAGO	159
Sejarah Terapi Cedera Kartilago	162
Strategi Pembedahan untuk Defek Kartilago Saat Ini	165
BAB 7 REGENERASI JARINGAN TENDON	185
Terapi Klinis Saat Ini pada Cedera Tendon yang Sering Terjadi	187
Rekayasa Jaringan Tendon	191
Daftar Pustaka	199

Daftar Gambar

Gambar 1.1	Korelasi antara vaskularisasi dan kapasitas penyembuhan jaringan muskuloskeletal	2
Gambar 1.2	Strategi pendekatan terapi pada Kedokteran Regeneratif	5
Gambar 1.3	Triad rekayasa jaringan terdiri dari sel, sinyal (kimia berupa faktor-faktor pertumbuhan atau fisik dengan bioreaktor), dan <i>scaffold</i> yang berfungsi sebagai pola untuk pembentukan jaringan yang memungkinkan sel untuk migrasi, melekat, dan menghasilkan jaringan fungsional.	6
Gambar 2.1	Ilustrasi tulang femur mewakili tulang panjang.	11
Gambar 2.2	Struktur dan histologi tulang.	12
Gambar 2.3	Pengecatan histologi pada <i>bone multi-cellular unit</i> menunjukkan osteoblas (OB) pada permukaan terbentuknya tulang, beberapa terbenam di dalam matriks membentuk osteosit (OC).	17
Gambar 2.4	Diagram ilustrasi proses perlekatan osteoklas pada tulang melalui ikatan <i>RGD-containing proteins</i> (segitiga biru) ke integrin dan proses reopsi oleh osteoklas.	19

Gambar 2.5	Lapisan kartilago, karakteristik, dan fungsi. <i>C</i> , <i>Cytoplasm</i> ; <i>EM</i> , <i>electron micrograph</i> ; <i>IF</i> , <i>intermediate filaments</i> ; <i>N</i> , <i>nucleus</i> .	22
Gambar 2.6	Organisasi molekuler kartilago artikular normal	23
Gambar 2.7	(A) Struktur proteoglikan kompleks tipe agrekan, (B) Gambar mikroskop elektron proteoglikan kartilago artikular bovine	27
Gambar 2.8	Berbagai protein nonkolagen dalam membentuk organisasi kartilago	28
Gambar 2.9	Hierarki struktur tendon, rangkaian molekul-molekul kolagen ke dalam rangkaian yang lebih besar sampai mencapai tendon.	32
Gambar 2.10	<i>Bone-tendon junction</i>	33
Gambar 2.11	(A) Tendon fleksor digitorum profundus manusia, menunjukkan kontribusi <i>vinculum</i> (struktur seperti pita menghubungkan tendon fleksor dan jari-jari). (B) Gambar diperbesar menunjukkan ekstensi aliran darah <i>vinculum</i>	34
Gambar 2.12	Perbedaan morfologi sel-sel intrartikular ACL (A) dan sel-sel ekstra-artikular MCL (B) pada kelinci putih New Zealand. Sel-sel ACL berbentuk kondroid sementara sel-sel MCL berbentuk memanjang	36
Gambar 3.1	Histologi fase awal penyembuhan fraktur femur pada tikus	41
Gambar 3.2	Penyembuhan fraktur femur dengan model fraktur femur tikus yang difiksasi dengan <i>rod intramedular</i> .	42
Gambar 3.3	Ilustrasi <i>Diamond concept</i> yang memengaruhi keberhasilan penyembuhan fraktur	43
Gambar 3.4	(A) Atrofik <i>non-union</i> pada tulang tibia dan fibula di mana tidak tampak pembentukan kalus. (B) Hipertrofik <i>non-union</i> pada tibia, tampak kalus yang sangat banyak tetapi tidak melewati area fraktur sehingga terjadi <i>non-union</i>	46
Gambar 3.5	<i>Critical-size defect</i> akibat cedera pada tulang femur	47
Gambar 3.6	Ilustrasi lesi kartilago menurut <i>International Cartilage Repair Society (ICSR)</i>	49

Gambar 3.7	Beban abnormal akan mengaktivasi mekanoreseptor kondrosit dan jalur katabolik, menimbulkan degradasi kartilago melalui siklus <i>mechanoreceptor-MMP-ECM breakdown</i>	52
Gambar 3.8	Mekanisme patogenesis terjadinya PTOA	52
Gambar 3.9	Radiografi berbagai <i>grade</i> PTOA pasca rekonstruksi ACL	53
Gambar 3.10	Osteoartritis degeneratif (dokumentasi pribadi).	53
Gambar 3.11	Proses reparasi tendon pada manusia	55
Gambar 3.12	Penyembuhan tendon intrasinovial terutama melalui infiltrasi fibroblas dari sisi luar dan dalam permukaan tendon (panah hitam).	56
Gambar 4.1	Skema pendekatan dasar untuk membuat <i>engineered tissue graft</i> untuk aplikasi kedokteran regeneratif	61
Gambar 4.2	Berbagai tipe <i>scaffold</i> , sumber, dan sifat degradasinya	62
Gambar 4.3	Mikroskop konvokal memperlihatkan sel-sel osteoblas (hijau) melekat pada <i>scaffold</i> kolagen-GAG berpori (merah)	66
Gambar 4.4	Interaksi sel-ECM dan <i>remodelling</i> matriks	68
Gambar 4.5	Diagram skema <i>scaffolds</i> ECM. <i>Scaffold</i> ECM masih menjadi komponen utama matriks ekstraselular, menyerupai struktur asli jaringan dan organ target, dan memberikan penunjang fisik dan sinyal biomekanik untuk regenerasi jaringan	76
Gambar 4.6	<i>Milestone</i> teknologi deselelurasi	78
Gambar 4.7	Teknik yang digunakan untuk deselularisasi pada jaringan dan organ	79
Gambar 4.8	Strategi deselularisasi	80
Gambar 4.9	(A) Kiri dan tengah, <i>deep-frozen</i> tulang osteoartikular proksimal femur dan proksimal humerus untuk rekonstruksi tulang <i>allograft</i> osteoartikular, kanan <i>deep-frozen</i> tulang tibia untuk rekonstruksi tulang interkalari. (B) Berbagai ukuran dan bentuk <i>freeze-dried</i> tulang <i>allograft</i>	86
Gambar 4.10	Berbagai bentuk <i>demineralized bone matrix</i> (DBM) <i>allograft</i>	86

Gambar 4.11	(A) Plasenta manusia, (B) Pengolahan membran amnion, (C) produk akhir	87
Gambar 4.12	Produk <i>scaffold</i> kartilago yang berasal dari <i>bovine</i> (dokumentasi Bank Jaringan).	87
Gambar 4.13	Produk sel punca mesenkimal manusia untuk penelitian dan aplikasi klinis (dokumentasi Bank Jaringan).	88
Gambar 4.14	<i>Timeline</i> penemuan utama yang membentuk pengertian tentang lingkungan mikro MSCs dan HSCs	95
Gambar 4.15	<i>Homing</i> dan migrasi transendotelial MSCs.	101
Gambar 4.16	Migrasi transendotelial melalui sel-sel endotelial dari endotelium.	102
Gambar 4.17	Interaksi imun (imunomodulasi) MSCs	105
Gambar 4.18	Aktivitas parakrin <i>mesenchymal stromal cells</i> (MSCs)	106
Gambar 4.19	Eksosom yang disekresi sel stromal mesenkimal berperan dalam komunikasi antara sel, mencetuskan efek terapi dengan menurunkan stres oksidatif, meningkatkan perkiraan hidup sel dan menunjukkan toleransi imunologi melalui penurunan aktivasi dan proliferasi sel-sel imun adaptif dan diferensiasi sel-sel <i>innate</i> menuju regulasi fenotip	109
Gambar 4.20	Skema kondisi lingkungan mikro yang mengoordinasikan keseimbangan antara <i>self-renewal</i> sel punca dan diferensiasi menjadi sel <i>mature</i> yang fungsional	110
Gambar 4.21	<i>Niches</i> sel punca sangat kompleks, heterotopik, struktur dinamis yang meliputi komponen-komponen selular yang berbeda, faktor-faktor yang disekresi, kontrol imunologik, ECM, parameter-parameter fisik, dan kontrol metabolik	111
Gambar 4.22	Paradigma rekayasa jaringan: keuntungan kultur bioreaktor	115
Gambar 4.23	Keuntungan dan kerugian <i>seeding</i> statik dan dinamik: <i>seeding</i> dinamik bisa membentuk lingkungan mikro jaringan yang seragam.	116
Gambar 5.1	Trauma dan penyakit pada tulang yang membutuhkan <i>graft</i> tulang	118
Gambar 5.2	Skema alur dalam mengambil keputusan untuk penatalaksanaan defek tulang	120
Gambar 5.3	Trias rekayasa jaringan	122

Gambar 5.4	Analisis pembentukan jaringan ikat dan konsentrasi IgG dari berbagai macam <i>graft</i> tulang	127
Gambar 5.5	Hasil perbandingan komposisi mineral hidroksiapatit manusia dengan <i>bovine</i>	127
Gambar 5.6	Hasil pemeriksaan mikroskop elektron dengan pembesaran 35 kali	128
Gambar 5.7	Berbagai variasi bentuk dan metode pemrosesan <i>bovine xenogenic</i> .	128
Gambar 5.8	Perjalanan penyembuhan fraktur	138
Gambar 5.9	Evaluasi penyembuhan tulang dengan variabel histologi, imunohistokimia, dan imunologi	139
Gambar 5.10	<i>Critical sized defect</i> pada tulang tibia	143
Gambar 5.11	Regulasi penyembuhan tulang melalui jalur sinyal <i>Hypoxia-inducible factor (HIF)-1-dependent</i>	144
Gambar 5.12	Beberapa mekanisme aksi MSC pada rekonstruksi dan reparasi tulang	145
Gambar 5.13	Jumlah sel osteoblas, skor imunoreaktif ALP dan osteokalsin BMSCs dan ASCs pada kultur normal dan kultur osteogenik (*= $p < 0.05$ **= $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ #= $p > 0.05$).	151
Gambar 5.14	(A) Pengecatan HE pada kultur normal BMSCs, (B) Pengecatan HE pada kultur normal ASCs, (C) Ekspresi ALP kultur normal BMSCs, (D) Ekspresi ALP pada kultur normal ASCs, (E) Ekspresi OC pada kultur normal BMSCs dan (F) Ekspresi OC pada kultur normal ASCs.	152
Gambar 5.15	(A) Pengecatan HE pada kultur osteogenik BMSCs. (B) Pengecatan HE pada kultur osteogenik ASCs, (C) Ekspresi ALP pada kultur osteogenik BMSCs. (D) Ekspresi ALP pada kultur osteogenik ASCs. (E) Ekspresi OC pada kultur osteogenik BMSCs. (F) Ekspresi OC pada kultur osteogenik ASCs.	152
Gambar 5.16	Tahapan aplikasi rekayasa jaringan pada <i>critical sized defect</i> tulang ulna kelinci	154
Gambar 5.17	Hasil evaluasi histologi area trabekula dan inkorporasi tulang pada minggu ke 12	155

Gambar 5.18	Terapi <i>Critical Sized Defect</i> menggunakan kombinasi <i>allograft</i> kanselos, PRP, dan <i>aspirate bone marrow</i>	156
Gambar 5.19	(A) <i>Congenital pseudoarthrosis tibia</i> . (B) Reseksi jaringan patologis pada tulang tibia. (C) <i>Massive intercalary bone allograft</i> di- <i>seeding</i> dengan BMSCs. (D) Hasil evaluasi radiologi menunjukkan <i>union</i> tulang tibia dengan dan fungsi ekstremitas normal	156
Gambar 5.20	(A) Hemangioma pada femur distal. (B) Reseksi tumor. (C) <i>Massive intercalary bone allograft</i> . (D) Paska rekonstruksi. (E) 6 tahun paska rekonstruksi terlihat <i>remodeling</i> sempurna tulang <i>allograft</i>	157
Gambar 6.1	Perbedaan lingkungan fisiologi, laju metabolik, dan selular menyebabkan tulang dan kartilago memiliki dampak besar pada potensinya untuk regenerasi jaringan ini	162
Gambar 6.2	Perjalanan sejarah terapi trauma kartilago dan munculnya konsep baru pada abad 20	165
Gambar 6.3	Skema teknik <i>microfracturing</i>	168
Gambar 6.4	Skema dari <i>mosaicplasty</i>	170
Gambar 6.5	Skema teknik ACI	173
Gambar 6.6	Kiri, ekspresi kolagen tipe II, tengah, ekspresi SOX 9 dan kanan, ekspresi RUNX2 pada kultur BMSCs yang diberi perlakuan	177
Gambar 6.7	Perbandingan kolagen tipe II, SOX 9, dan RUNX2 pada kultur BMSCs dengan berbagai perlakuan.	178
Gambar 6.8	Komponen selular pada (A) Grup SBCS dan (B) Grup DSBCS. Panah merah menunjukkan komponen selular grup SBCS. ⁷⁸	179
Gambar 6.9	Pengecatan HE 4 minggu setelah <i>seeding</i> BMSCs	179
Gambar 6.10	Gambaran mikroskopik defek kartilago setelah 3 bulan implantasi.	181
Gambar 6.11	Ketebalan kolagen pada defek kartilago	182
Gambar 6.12	Rekonstruksi defek <i>full thickness</i> kartilago kondilus femur menggunakan teknik <i>microfracture</i> dan implantasi komposit <i>Sponge Bovine Cartilage</i> dengan sel punca mesensimal dari <i>bone marrow</i>	183

Gambar 7.1	Molekular kunci, perubahan selular dan matriks terjadi selama 3 fase utama reparasi tendon	187
Gambar 7.2	Regenerasi jaringan berbasis biomaterial (<i>scaffold</i>)	194
Gambar 7.3	Strategi rekayasa jaringan untuk regenerasi tendon	195
Gambar 7.4	(A) Reparasi Supraspinatus, (B) Augmentasi dengan membran amnion, dan (C) PRP.	196
Gambar 7.5	Skor SPADI sebelum dan sesudah operasi	197
Gambar 7.6	Kiri, MRI pada tendon <i>rotator cuff</i> dengan defek 32,5 mm	197

Daftar Tabel

Tabel 1.1	Tahapan perkembangan awal Ilmu Kedokteran Regeneratif	3
Tabel 1.2	<i>Milestone</i> sejarah rekayasa jaringan	7
Tabel 2.1	Berbagai protein penyusun matriks ekstraselular tulang	14
Tabel 2.2	Berbagai komponen kolagen, proteoglikan, non kolagen protein yang menyusun kartilago	24
Tabel 2.3	Fungsi kolagen tipe III, VI, IX, XI	26
Tabel 3.1	Faktor-faktor risiko <i>non-union</i>	44
Tabel 4.1	Perbandingan sifat <i>scaffold</i> natural dengan sintetik pada rekayasa jaringan	89
Tabel 4.2	Kelebihan dan kelemahan MSCs dari berbagai sumber jaringan.	97
Tabel 4.3	Faktor-faktor parakrin yang disekresi oleh MSCs	108
Tabel 5.1	Faktor-faktor pertumbuhan tertentu dan fungsinya pada penyembuhan fraktur	133
Tabel 5.2	Potensi sifat biologis, kekuatan mekanis, inkorporasi, dan <i>remodeling</i> dari berbagai jenis <i>graft</i>	137

Tabel 5.3	Diferensiasi <i>osteogenic</i> pada MSCs	151
Tabel 6.1	Penggolongan <i>scaffold</i> untuk kartilago berdasarkan unsur kimianya	176
Tabel 6.2	Persyaratan <i>scaffold</i> matriks untuk kartilago	176

Daftar Singkatan

ACI	<i>autologous chondrocyte implantation</i>	BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
ACL	<i>anterior cruciate ligament</i>	BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>
ADMSCs	<i>adipose tissue-derived MSCs</i>	BMSCs	<i>bone marrow-derived MSCs</i>
ALP	<i>alkali fosfatase</i>	CaP	<i>calcium phosphate</i>
AMIC	<i>autologous matrix-induced chondrogenesis</i>	CCL-2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
ASCs	<i>adiposa stem cells</i>	CCR	<i>chemokine receptor</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>	CCR2	<i>C-C chemokine Receptor type 2</i>
BCP	<i>biphasic calcium phosphate</i>	CD	<i>cluster of differentiation</i>
BESTT	<i>BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma</i>	CDMP	<i>cartilage-derived morphogenetic protein</i>
bFBF	<i>basic fibroblast growth factor</i>	CFU-Fs	<i>colony-forming unit-fibroblasts</i>
BMAC	<i>bone marrow aspirate concentrate</i>		

CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
CPC	<i>calcium phosphate cement</i>	FDBC	<i>freeze dried bovine cartilage powder scaffold</i>
CSDs	<i>critical-sized defects</i>	FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>	FGFR	<i>fibroblast growth factor receptors</i>
CXCL	<i>chemokine receptor</i>	GAG	<i>glycosaminoglycan</i>
CXCR	<i>chemokine receptor</i>	GDF	<i>growth differentiation factor</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	GEF	<i>guanine-exchange factors</i>
DC	<i>sel-sel dendritik</i>	GMP	<i>good manufacturing practice</i>
DCBS	<i>decellularized cartilage bovine scaffold</i>	H&E	<i>haematoxylin & eosin</i>
Dcn	<i>decorin</i>	HA	<i>hidroksiapatit</i>
DKK1	<i>Dickkopf-related protein 1</i>	hAMSCs	<i>human amniotic mesenchymal stem cells</i>
DPSCs	<i>dental pulp stem cells</i>	HCAM	<i>homing cell adhesion molecule</i>
ECD	<i>effective cell dose</i>	HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
ECM	<i>extracellular matrix</i>	HIFUS	<i>high intensity focused ultrasound</i>
ECSW	<i>extracorporeal shockwave therapies</i>	HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>	HLA-G	<i>Human Leukocyte Antigen-G</i>
EG	<i>embryonic germ</i>	HSCs	<i>haematopoietic stem cells</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	IA	<i>intraarterial</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>	ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
EMEA	<i>european medicines evaluation agency</i>	ICRS	<i>International Cartilage Repair Society</i>
ESB	<i>European Society for Biomaterials</i>	IDO	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase</i>
ESC _s	<i>embryonic stem cells</i>	IFN- γ	<i>interferon gamma</i>
EV	<i>extracellular vesicles</i>		

IGF-1	<i>insulin-like growth factor-1</i>	OC	<i>osteokalsin</i>
IgG	<i>immunoglobulin G</i>	OT	<i>osteochondral transplantation</i>
IL	<i>interleukin</i>	PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
IL-8	<i>interleukin-8</i>	PGA	<i>polyglycolic acid</i>
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>	PGE2	<i>Prostaglandin E2</i>
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>	PI3K/Act	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>	PKC	<i>phosphokinase C</i>
IV	<i>intravenous</i>	PLA	<i>asam polilatik</i>
LIPUS	<i>low intensity pulsed ultrasound</i>	PLA	<i>processed lipoaspirate</i>
LRP	<i>LDL-receptor-related protein</i>	PLC	<i>phospholipase C</i>
M2	<i>makrofag</i>	PLGA	<i>polylactic-co-glycolic acid</i>
MACI	<i>matrix-associated autologous chondrocyte implantation</i>	PLGA	<i>poly-lactic-co-glycolic acid</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	PLLA	<i>poly-l-lactic acid</i>
MBVs	<i>matrix-bound nanovesicles</i>	PMN	<i>polymorphonuclear leukocyte</i>
MCL	<i>medial collateral ligament</i>	PRF	<i>platelet-rich fibrin</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	PTH	<i>parathyroid hormone</i>
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>	PTHrP	<i>parathyroid-hormone-related protein</i>
MPa	<i>mega Pascal</i>	PTOA	<i>post traumatic osteoarthritis</i>
MS	<i>marrow stimulation</i>	RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor κB ligand</i>
MSCs	<i>mesenchymal stem cells</i>	rhBMP	<i>recombinant human bone morphogenetic protein</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	rhGH	<i>recombinant human growth hormone</i>
OA	<i>osteoarthritis</i>	rhPTH	<i>recombinant human parathyroid hormone</i>
		Runx2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
		SAL	<i>sterility assurance level</i>

SBCS	<i>sponge bovine cartilage scaffold</i>	TDSC	<i>tendon-derived stem cells</i>
Scx	<i>scleraxis</i>	TE	<i>tissue engineering</i>
SDF-1 α	<i>stromal cell-derived factor 1 alpha</i>	TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
SHEDs	<i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i>	TIMPs	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
SLRPs	<i>the small leucine-rich proteoglycan family</i>	TLRs	<i>toll-like receptors</i>
SMPC	<i>scaffold-mesenchymal stem cells-platelet rich plasma composite</i>	TnBP	<i>tri(n-butyl) phosphate</i>
SOX	<i>sry-box transcription factor</i>	TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
SPADI	<i>shoulder pain and disability Index</i>	TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>	Tnmd	<i>tenomodulin</i>
SVF	<i>stromal vascular fraction</i>	Treg	<i>T regulatory cells</i>
TCP	<i>trikalsium fosfat</i>	TSG6	<i>tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein</i>
		VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
		VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
		VGF	<i>vascularized fibular graft</i>
		VLA-4	<i>very late antigen 4</i>

BAB 1

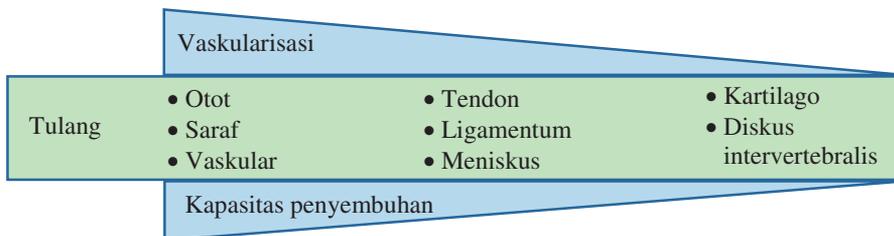
Pendahuluan

Sistem muskuloskeletal adalah salah satu dari sistem di tubuh manusia yang memiliki fungsi utama untuk menggerakkan tubuh, melindungi organ vital, dan sebagai bagian dari metabolisme kalsium dan fosfat. Sistem ini terdiri dari tulang, kartilago, otot, tendon, ligamentum, saraf, dan pembuluh darah.

Ortopedi adalah cabang ilmu kedokteran yang fokus pada promosi, pencegahan, terapi penyakit dan trauma sistem muskuloskeletal dengan cara pembedahan, medikamentosa dan terapi fisik.⁽¹⁾

Cedera atau kerusakan pada jaringan muskuloskeletal memberikan respons yang berbeda tergantung penyebab cedera dan jenis jaringan yang terlibat. Dalam kondisi normal tulang merupakan salah satu dari sedikit jaringan tubuh manusia yang bisa regenerasi secara sempurna di mana jaringan yang terbentuk adalah jaringan tulang seperti aslinya, tanpa membentuk jaringan sikatrik. Tentu saja regenerasi sempurna harus didukung oleh berbagai faktor yang terlibat seperti potensi sel punca yang ada di periosteum dan endosteum tulang, imobilisasi baik interna maupun eksterna serta rehabilitasi. Walaupun begitu terdapat gangguan penyembuhan tulang seperti *delayed union* dan *nonunion* yang bisa mencapai 5-10%, ditambah lagi dengan *critical sized defect* oleh karena penyakit

pada tulang. Penyembuhan jaringan muskuloskeletal lainnya, memiliki kapasitas penyembuhan hampir sama dengan penyembuhan cedera pada sebagian besar jaringan dan organ tubuh manusia, di mana jaringan yang terbentuk adalah jaringan sikatrik (jaringan ikat). Pada penyembuhan dengan jaringan sikatrik ini akan menimbulkan gangguan fungsi dari jaringan terlibat yang berat ringannya tergantung dari besarnya jaringan sikatrik. Pada jaringan muskuloskeletal dengan aliran darah yang minimal bahkan avaskular kemampuan penyembuhan sangat minimal sampai tidak punya kemampuan untuk penyembuhan sama sekali, contoh jaringan ini adalah kartilago dan diskus intervertebralis.



Gambar 1.1 Korelasi antara vaskularisasi dan kapasitas penyembuhan jaringan muskuloskeletal. Semakin ke kanan semakin jelek. Tulang merupakan pengecualian sebab dalam kondisi normal dapat regenerasi sempurna membentuk jaringan tulang kembali.

Terapi yang menjadi standar baku (*gold standard*) untuk gangguan penyembuhan atau defek pada sistem muskuloskeletal adalah transplantasi jaringan dengan sumber donor dari jaringan tubuh pasien sendiri (*autograft*). Sumber donor ini memiliki keuntungan sekaligus memiliki kekurangan sehingga pada banyak kasus tidak dapat dilakukan. Kekurangan utama *autograft* adalah menambah morbiditas akan operasi pengambilan *autograft* (perdarahan, nyeri dan infeksi), juga terbatas dalam ukuran dan bentuk. Alternatif berikutnya yang banyak digunakan adalah *allograft* yang didapatkan dari donor atau *xenograft* dari hewan, kedua jenis *graft* ini banyak memberi kontribusi dalam terapi defek muskuloskeletal dan keduanya telah banyak digunakan dalam praktik klinik. Material sintetik juga telah banyak digunakan, walaupun masih banyak tantangan untuk membuat material yang *inert* dan memiliki sifat yang sama dengan target jaringan yang dituju (*biomimicking*). Pada kondisi-kondisi tertentu terapi berdasarkan material saja tidak cukup, sehingga diperlukan penambahan

faktor-faktor pertumbuhan yang bisa menginduksi sel residen dan memiliki kemampuan memperbaiki lingkungan mikro yang rusak. Penggunaan faktor-faktor pertumbuhan ini walaupun sudah lama diperkenalkan tetapi sampai saat ini penggunaannya sangat terbatas karena penentuan dosis yang sulit, pada proses penyembuhan merupakan orkestrasi dari banyak faktor-faktor pertumbuhan sehingga pemberian hanya satu faktor pertumbuhan diragukan efektivitasnya dan harganya yang mahal. Perkembangan terbaru dalam penanganan defek muskuloskeletal yang sulit dan menimbulkan kecacatan adalah dengan penggunaan sel punca yang menjadi dasar dari Ilmu Kedokteran Regeneratif (*Regenerative Medicine*).

Secara mendasar tujuan dari Ilmu Kedokteran Regeneratif adalah melakukan regenerasi dengan sel terutama sel punca. Regenerasi jaringan atau organ sangat berbeda hasil akhirnya dengan *repair*. *Repair* merupakan proses adaptasi pada jaringan atau organ normal yang mengalami kerusakan dan restorasi yang terjadi adalah terbentuknya jaringan sikatrik pada daerah yang rusak tanpa restorasi menjadi jaringan normal, sedangkan regenerasi adalah restorasi jaringan yang rusak dengan sintesis jaringan normal sehingga hasil akhirnya adalah jaringan normal. Regenerasi mengembalikan struktur normal jaringan atau organ yang rusak sedangkan *repair* tidak.¹ Ilmu Kedokteran Regeneratif (*Regenerative Medicine*) didefinisikan sebagai ilmu multidisplin untuk penelitian dan aplikasi klinis fokus pada *repair*, penggantian atau regenerasi sel, jaringan atau organ dengan mengembalikan fungsi yang terganggu oleh berbagai sebab seperti defek kongenital, penyakit, cedera, dan penuaan.¹

Tabel 1.1 Tahapan perkembangan awal Ilmu Kedokteran Regeneratif.²

Year	First
1968	First cell transplantation: bone marrow transplant
1978	Discovery of stem cells in human cord blood
1981	First in vitro stem cell line developed from mice
1981	First engineered tissue transplantation: skin
1996	Creation of the first cloned animal: a sheep, named Dolly
1998	Isolation of human embryonic stem cells
1999	First laboratory-grown organ: an artificial bladder implanted in a patient suffering from myelomeningocele

Year	First
2004	Implantation of first engineered tubular organs (urine conduits)
2007	Discovery of stem cells derived from amniotic fluid and placenta
2009	First solid organ engineered by recycling donor liver

Rekayasa Jaringan (*Tissue Engineering*-TE) adalah ilmu yang menggunakan kombinasi sel-sel hidup, biomaterial yang kompatibel sebagai struktur (*scaffold*), dan biokimia (contoh: *growth factors*) serta kondisi fisik (contoh: *cyclic mechanical loading*) yang sesuai untuk membentuk struktur jaringan atau organ yang normal.³ Terminologi Ilmu Kedokteran Regeneratif (*Regenerative Medicine*-RM) dan Rekayasa Jaringan (*Tissue Engineering*-TE) bisa saling tertukar, tetapi sebenarnya Rekayasa Jaringan merupakan bagian dari Ilmu Kedokteran Regeneratif yang ruang lingkupnya lebih luas.

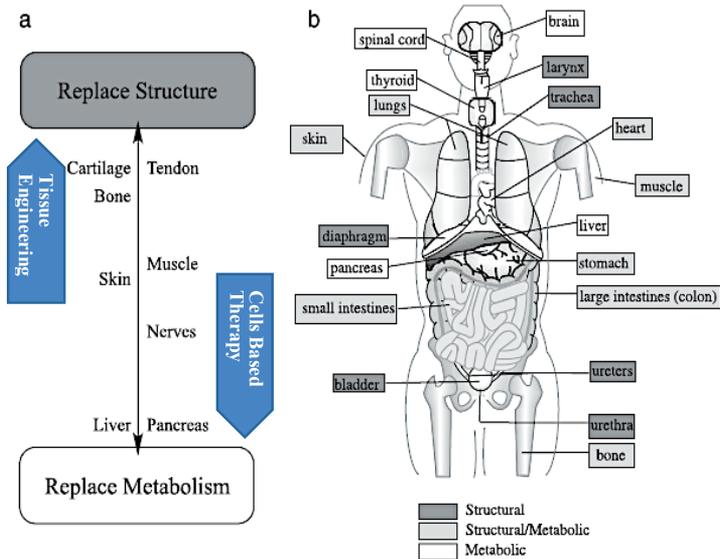
Jaringan dan organ pada tubuh manusia bisa dibagi dalam 3 kelompok menurut fungsi utamanya. *Pertama* adalah sekelompok organ yang mempunyai fungsi utama mengatur atau regulasi fungsi tubuh melalui sel yang memproduksi berbagai jenis protein-protein serta ion-ion. Kerusakan organ seperti otak, medula spinalis, glandula tiroid, liver, dan pankreas akan menimbulkan gangguan fungsi tubuh akibat terganggunya metabolisme sel yang menghasilkan serangkaian protein-protein dan ion-ion yang berfungsi sebagai regulasi fungsi tubuh manusia. *Kedua*, jaringan atau organ yang mempunyai 2 fungsi utama, yaitu selnya mempunyai fungsi regulasi tubuh sedangkan strukturnya dibutuhkan kegunaan tertentu. Kelompok jaringan atau organ ini adalah jantung, kulit, otot, gaster, usus kecil, dan usus besar serta tulang. Jantung manusia memiliki fungsi struktur sebagai bagian dari saluran sistem vaskular di sisi lain sel-sel jantung berfungsi sebagai pompa yang memungkinkan jantung memompa darah ke seluruh tubuh. Tulang juga memiliki dua fungsi, yaitu sebagai kerangka tubuh manusia dan di sisi lain sel-selnya sangat dibutuhkan untuk metabolisme kalsium. *Ketiga*, laring, trakea, diafragma, kandung kemih, ureter, dan uretra yang fungsi utamanya sebagai saluran dari sistem di tubuh manusia, sedangkan fungsi selnya minimal.

Strategi pendekatan terapi pada Ilmu Kedokteran Regeneratif sangat bergantung dari jaringan atau organ apa yang mengalami kerusakan oleh berbagai penyakit dan juga besarnya defek yang terjadi. Strategi tersebut terdiri dari²:

1. terapi sel, baik dengan sel punca maupun sel matur (*cells based therapy*);
2. penggunaan biomaterial, baik natural maupun sintesis untuk rekonstruksi; dan
3. implantasi komposit biomaterial dengan sel punca maupun sekretomnya.

Strategi terapi ke-2 dan ke-3 disebut sebagai Rekayasa Jaringan (*Tissue Engineering*). Strategi terakhir paling sering dihubungkan dengan konsep rekayasa jaringan, dengan menggunakan sel hidup yang ditanamkan pada *scaffold* baik natural maupun sintetik untuk membuat bagian dari jaringan atau organ untuk diimplantasikan.⁴

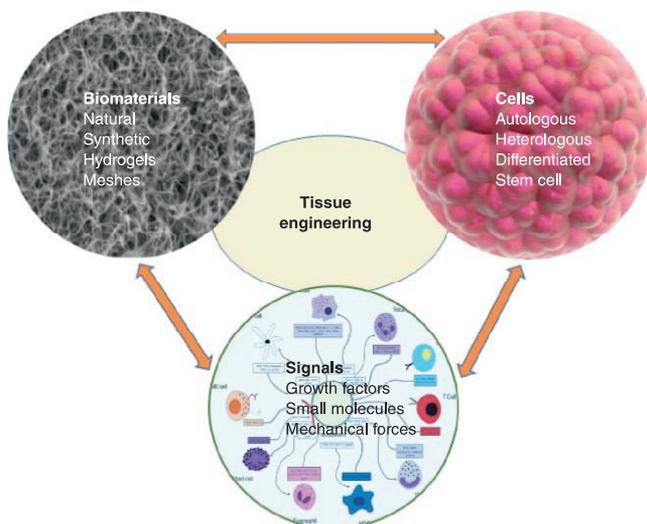
Strategi pertama, yaitu terapi sel (*cells based therapy*) terutama digunakan untuk terapi organ-organ yang sel-selnya berperan besar dalam menjalankan fungsi tubuh. Pada terapi sel, diharapkan sel yang diberi akan menggantikan kerusakan sel-sel organ yang rusak dan bisa menghasilkan serangkaian protein yang berperan vital



Gambar 1.2 Strategi pendekatan terapi pada Kedokteran Regeneratif. Terapi sel (*cells based therapy*) digunakan untuk memperbaiki fungsi sel dari organ yang mengalami kerusakan, sedangkan rekayasa jaringan (*tissue engineering*) digunakan terutama untuk memperbaiki kerusakan struktur pada tubuh manusia⁵

dalam regulasi fungsi tubuh. Penyakit-penyakit seperti Parkinson, *Alzheimer*, stroke, diabetes melitus diterapi dengan terapi sel. Sebaliknya, pada jaringan atau organ dengan fungsi utama sebagai bagian dari struktur sistem di tubuh manusia seperti traktus respiratorius, traktus digestivus, sistem pembuluh darah, dan tulang sebagai kerangka tubuh manusia maka dilakukan terapi dengan strategi yang berbeda. Bila defek atau area yang rusak kecil bisa digunakan strategi terapi sel, sedangkan bila defek atau area yang rusak besar dibutuhkan terapi rekayasa jaringan (*tissue engineering*) dengan biomaterial saja atau kombinasi antara biomaterial dengan sel punca atau dengan sekretom sel punca.

Rekayasa jaringan (*tissue engineering*) merupakan salah satu komponen dari ilmu kedokteran regeneratif. Pada rekayasa jaringan, pendekatan dasar yang dilakukan meliputi struktur sel saja, sel dengan *scaffolds*, dan hanya *scaffolds* saja^{6,7}. Walaupun begitu kombinasi-kombinasi dari 3 pilar utama, yaitu sel, protein (sinyal), dan *scaffolds* merupakan kunci sukses dari aplikasi rekayasa jaringan. Kemajuan terkini rekayasa jaringan melibatkan pengembangan 3 pilar di atas untuk menciptakan jaringan dan organ baru yang fungsional.⁸



Gambar 1.3 Triad rekayasa jaringan terdiri dari sel, sinyal (kimia berupa faktor-faktor pertumbuhan atau fisik dengan bioreaktor), dan *scaffold* yang berfungsi sebagai pola untuk pembentukan jaringan yang memungkinkan sel untuk migrasi, melekat, dan menghasilkan jaringan fungsional.^{7,8}

Tabel 1.2 Milestone sejarah rekayasa jaringan.³

Tahun	Pencapaian Teknologi
3000 BCE	Graf kulit yang diuraikan dalam teks bahasa sansekerta di India
1794	Graf kulit autologous di Eropa oleh Bunker, Reverdin, dan Baronio
1881	Alograf kulit dari jenazah oleh Girdner
1944	Alograf kulit yang ditinginkan oleh Webster
1949	Penyimpanan sel secara beku dengan suhu di bawah nol yang dikembangkan oleh Polge
1952	Penyimpanan sel kulit secara beku dikembangkan oleh Billingham
1962	Pengembangan <i>Ivalon sponge</i> sebagai pengganti kulit sintesis oleh Chardack
1975	Pengolahan sel keratinosit secara in vitro oleh Rheinwald dan Green
1979	Kultur epitel autologous, yang kemudian dikomersialisasikan sebagai <i>Epicel</i> oleh Genzyme
1981	Komposit kulit hidup dikembangkan oleh Bell, kemudian dikomersialisasikan sebagai <i>Apligraf</i> oleh Organogenesis
1982	<i>Collagen-glycosaminoglycans (GAG)-based dermal matrix</i> oleh Yannas, Kemudian dikomersialisasikan sebagai <i>Dermal Regeneration Template</i> oleh Integra Lifesciences
1987	Diperkenalkan istilah " <i>Tissue engineering</i> "
1988	Transplantasi sel pada polimer sintetik yang biodegradabel
1994	Kultur kondrosit dan transplantasi oleh Brittberg, dikomersialisasi sebagai <i>Carticel</i> oleh Genzyme
2006	Kultur kandung kemih bioartifisial secara in vitro dan diimplantasikan secara in vivo
2008	Rekayasa trakea dari matrik deselularisasi yang di-seeded dengan sel manusia yang berasal dari sel punca

BAB 2

Biologi Jaringan Muskuloskeletal

TULANG

Tulang memiliki berbagai jenis bentuk, ukuran, dan pola organisasi internal, yang sesuai dengan peran fisiologis sebagai penyangga, pengungkit, dan proteksi jaringan serta organ. Tulang juga memiliki peran penting sebagai tempat penyimpanan kalsium dan fosfat untuk mendukung menjaga homeostasis mineral. Kekuatan mekanik yang tinggi, ketahanan terhadap fraktur, rasio permukaan dan volume yang tinggi, pola arsitektur tulang yang spesifik berhubungan erat dengan fungsinya. Hubungan antara bentuk dan fungsi tulang sangat kompleks karena arsitektur tulang juga bisa berubah dinamis. Tulang memiliki kemampuan untuk mengubah strukturnya sebagai respons terhadap stimulus mekanik dan metabolik.⁹

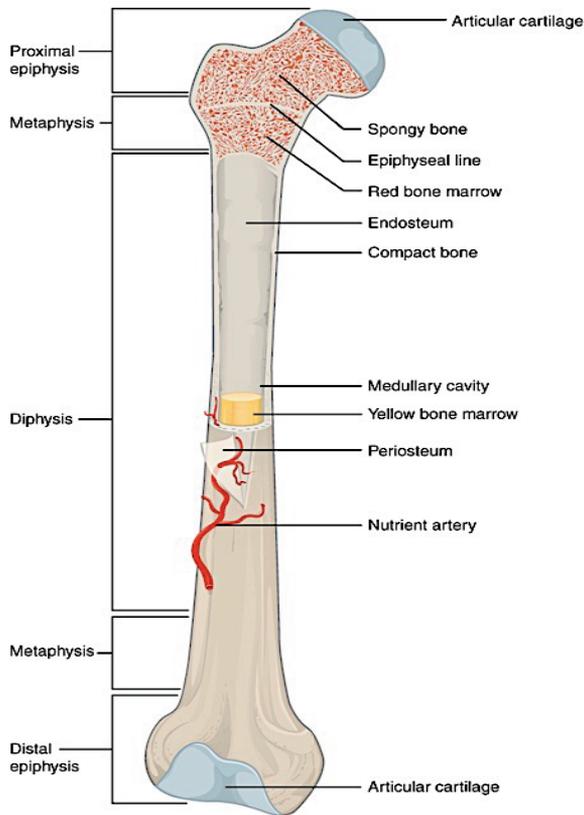
Anatomi

Tulang terdiri dari kelompok besar, yaitu tulang panjang dan tulang pipih. Tulang panjang meliputi tulang apendikular seperti humerus, femur, dan tibia,

umumnya terbentuk melalui proses endokondral. Tulang pipih, seperti tulang kalvaria terbentuk melalui proses osifikasi intramembran. Semua tulang terdiri dari lapisan luar tersusun padat (tulang kortikal) yang mengelilingi jaringan trabekula tipis (tulang kancellus) dan ruangan dalamnya diisi oleh *bone marrow*. Seperti pada bentuk dan ukuran tulang, distribusi tulang kortikal, kancellus, dan *bone marrow* bisa sangat berbeda. Perbedaan ini umumnya menunjukkan perbedaan fungsi (seperti untuk menahan beban atau mendukung hematopoiesis). Tulang kortikal kira-kira 80% dari berat keseluruhan tulang, dominan pada tulang apendikular seperti (lengan, tungkai, dan jari-jari), dengan jumlah yang lebih sedikit pada tulang aksial (kranial, tulang belakang), memiliki fungsi penting sebagai penyangga tubuh karena memiliki kekuatan mekanik serta melindungi jaringan dan organ. Tulang kancellus terdiri dari kisi-kisi tabekula yang organisasi dan orientasinya menunjukkan lingkungan mekanik di sekitarnya. Tulang kancellus memiliki permukaan yang relatif besar dibandingkan tulang kortikal (lebih kurang 20:1 berbanding 4:1) dan karena aktivitas sel tulang terutama pada permukaan tulang, *turns over* tulang kancellus 3-5 kali lebih cepat. Tulang kortikal dan kancellus sering memberi respons yang berbeda terhadap perubahan fisik dan kimia. Sebagai contoh penurunan massa tulang (*bone loss*) akibat umur atau penurunan steroid gonad bisa berbeda antara tulang kortikal dan kancellus, juga pada tulang yang berbeda lokasi anatominya (seperti tulang belakang versus panggul).

Tulang femur merupakan prototipe tulang panjang, berbentuk silindris dengan kedua ujungnya melebar (*flute end*). Bagian tengah (diafisis) diapit oleh metafisis dan epifisis. Diafisis terdiri dari lapisan tebal padat tulang kortikal yang mengelilingi *marrow cavity* (medulla) dengan sedikit atau tanpa tulang kancellus. Pada daerah metafisis dan epifisis, tulang kortikal menipis dan mengelilingi jaringan tulang kancellus yang banyak. *Marrow* menempati ruang kosong di dalam tulang. Lempeng pertumbuhan (*growth plate/phyisis*) memisahkan epifisis dan metafisis pada masa pertumbuhan tulang, tetapi regio ini akan menghilang setelah fase pertumbuhan selesai.

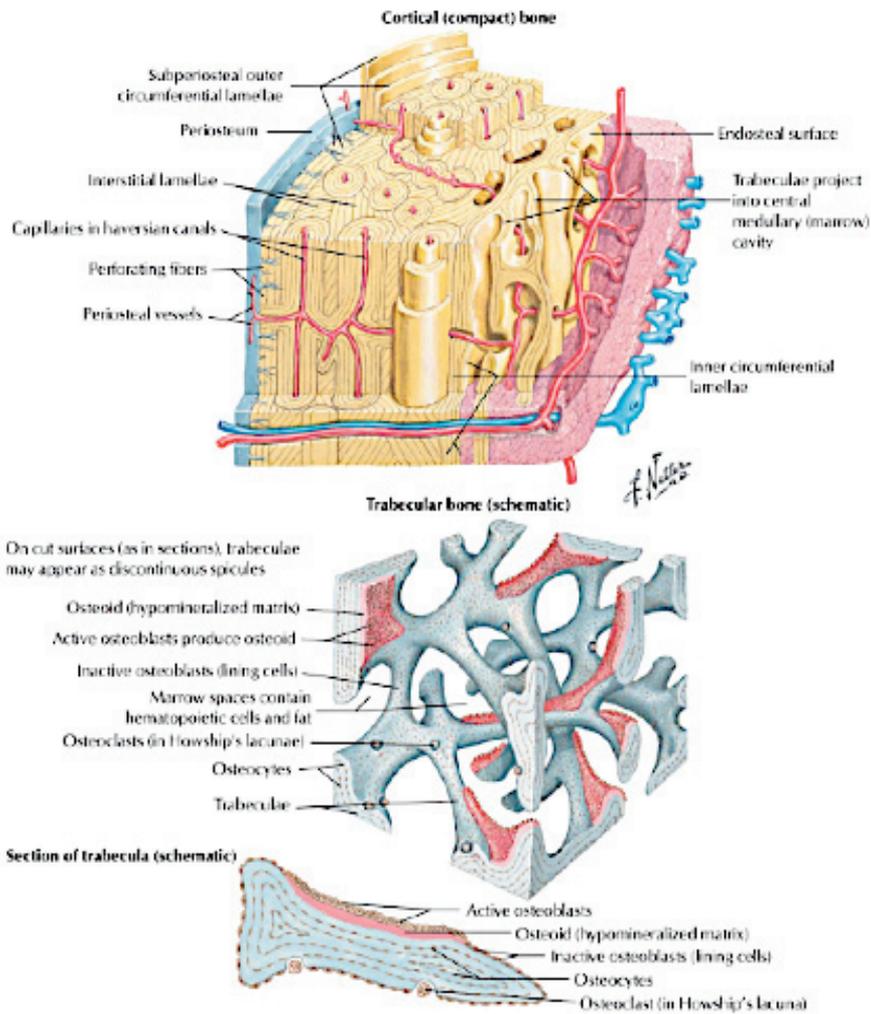
Permukaan internal dan eksternal (*marrow*) tulang dilapisi oleh jaringan ikat nonmineralisasi. Di luar, kedua ujung tulang membentuk permukaan sendi yang dilapisi oleh kartilago persendian, sedangkan sisi lainnya dilapisi oleh periosteum yang merupakan pembungkus elastik terdiri dari jaringan



Gambar 2.1 Ilustrasi tulang femur mewakili tulang panjang.

ikat fibrosa yang padat. Periosteum meliputi lapisan sel di dekat permukaan tulang (*cambium layer*) yang berisi sel-sel progenitor dan memiliki kemampuan membentuk tulang dan kartilago baru bila dibutuhkan, misalnya pada masa pertumbuhan atau respons terhadap cedera. Di dalam, permukaan tulang kortikal dan kanelos dilapisi oleh stroma *bone marrow*, merupakan jaringan ikat fibrosa yang lebih longgar dibandingkan periosteum. Sel-sel pada stroma *marrow* terdiri dari sel yang heterogen dan memiliki peran penting dalam memelihara sistem hematopoitik dan jaringan ikat. Sel punca hematopoitik (HSCs) yang merupakan asal dari semua tipe sel darah terdapat di dalam dan sekitar stroma, sedangkan populasi sel-sel jaringan ikat di dalam stroma *marrow* memproduksi berbagai faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam menyokong sel punca hematopoitik

dan diferensiasinya. Selain itu, stroma *marrow* berisi populasi sel punca dewasa non hematopoitik (sel punca mesenkimal atau *bone marrow mesenchymal stem cells/ MSCs*) yang memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi tulang, tendon, sel-sel otot, dan lain-lain. Oleh karena itu, *bone marrow stroma* telah menjadi fokus penelitian yang menarik untuk menjadi sumber sel yang digunakan pada rekayasa jaringan (*tissue engineering*) dan kedokteran regeneratif (*regenerative medicine*).



Gambar 2.2 Struktur dan histologi tulang.¹⁰

Seperti juga pada semua jaringan, tulang memiliki pembuluh darah dan saraf. Pembuluh darah dan saraf lebih banyak terdistribusi pada periosteum dan *bone marrow* daripada tulang sendiri. Pembuluh darah dan saraf yang menyuplai *marrow* melalui tulang kortikal memiliki titik masuk terbatas (*foramina nutrisi*). Pembuluh darah kecil dan saraf yang terdistribusi ke seluruh tulang kortikal melewati kanal pada jaringan yang disebut sebagai kanal *Haversian* dan kanal-kanal *Volkman*. Pembuluh darah baik pada periosteum dan *marrow* bertugas untuk memelihara tulang kortikal. Sepertiga tulang kortikal disuplai oleh pembuluh darah periosteum sedangkan pada bagian dalam disuplai oleh pembuluh dalam kompartemen *marrow*. Pembuluh darah *marrow* juga melayani trabekula tulang yang tidak memiliki pembuluh darah. Sistem sirkulasi kedua adalah pergerakan cairan ekstraseluler dan larutannya melalui ruangan periseluler di antara osteosit, lakuna tulang, dan dinding kanalikuli. Cairan di dalam ruangan ini bergerak karena dorongan tekanan darah dan gaya mekanik.

Matriks Ekstraselular (Extracellular Matrix/ECM)

Mayoritas massa dan volume tulang adalah matriks ekstraselular yang sangat memengaruhi sifat material dan mekanikal tulang. Selanjutnya, sebagai tempat penyimpanan utama kalsium dan fosfat, matriks ekstraselular tulang juga berkontribusi terhadap metabolisme mineral sistemik. Matriks ekstraselular tulang merupakan material komposit yang terdiri dari matriks organik tersusun terutama oleh serabut-serabut fibrosa dan sedikit material organik nonfibrosa, kemudian matriks inorganik terdiri dari kristal mineral yang diendapkan di dalam dan di sekitar serabut-serabut organik. Material organik tulang memiliki berat lebih kurang 20-25% dari berat total tulang, sedangkan material inorganik lebih kurang 60-70%, sisanya adalah air. Matriks fibrosa berpengaruh terhadap sifat *tensile* dan ketahanan terhadap fraktur, sedangkan mineral membuat tulang menjadi kaku dan memiliki kekuatan terhadap gaya kompresi.

Matriks Organik

a. Kolagen

Kolagen tipe I merupakan unsur utama matriks organik tulang, jumlahnya lebih kurang 90% dari material organik tulang dan merupakan komponen eksklusif serabut matriks tulang. Tipe kolagen lain yang terdapat pada

tulang dengan jumlah cukup banyak dan bukan merupakan bagian dari matriks tulang, tetapi milik tipe jaringan tertentu seperti sisa kartilago dari osifikasi endokondral (terutama tipe II dan X), jaringan fibrosa periosteum dan *marrow* (tipe III), pembuluh darah (tipe IV). Kolagen tipe lain dengan jumlah sedikit meliputi kolagen tipe III, V, dan XI.

b. Protein Nonkolagen

Kolagen tipe I, walaupun merupakan unsur utama matriks organik tulang, kolagen tipe I tidak berdiri sendiri dalam membentuk kerangka struktur baik jaringan non mineralisasi (dermis, tendon, ligamentum) dan jaringan mineralisasi (dentin). Berbagai jenis protein kolagen juga merupakan bagian dari matriks ekstraselular tulang. Struktur matriks tulang yang unik merupakan fenomena kombinasi, bergantung dari seluruh unsur matriks yang mana tidak ada satupun molekul yang memiliki peran dominan dan spesifik.

Protein nonkolagen tulang meliputi berbagai varian struktur, fungsi, dan asal sel. Secara struktur, mereka mewakili beberapa kelompok molekul di antaranya proteoglikan, glikoprotein, *SIBLING* (*Small, Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins*), dan protein-protein *vitamin K-dependent* (*gla*). Fungsi dari protein ini adalah sebagai elemen struktur, enzim-enzim, dan sinyal (sitokin). Fungsi-fungsi tersebut bisa saling tumpang tindih. Sebagai contoh, matriks ekstraselular berisi informasi yang bisa ditafsirkan sel-sel residennya dan komposisi matriks serta organisasinya bisa diregulasi oleh perilaku sel. Protein-protein non kolagen tulang dihasilkan oleh berbagai sumber sel, bisa berasal dari sel di dalam maupun di luar tulang. Beberapa protein disintesis dan disekresi oleh osteoblas sebelum terjadi deposisi mineral, sementara protein lainnya diproduksi oleh osteosit setelah fase mineralisasi. Protein-protein lain pada matriks tulang seperti serum albumin dan *A2HS glycoprotein* diproduksi oleh hepar, mencapai tulang melalui sirkulasi cairan ekstraselular tulang dan kemudian diserap ke dalam matriks.

Tabel 2.1 Berbagai protein penyusun matriks ekstraselular tulang.^{9,10}

Matriks Ekstraselular Tulang	
Kolagen²⁹ <ul style="list-style-type: none"> • <i>Type I</i> • <i>Type V, type III (trace)</i> 	Vitamin K-Dependent Proteins (gla-proteins) <ul style="list-style-type: none"> • Osteocalcin • Matrix gla-protein

Matriks Ekstraselular Tulang

Proteoglikan

- Biglycan
- Decorin
- Fibromodulin
- Perlecan
- Osteoglycin/mimecan
- Osteoadherin

SIBLING Proteins

- Osteopontin (2ar, spp1)
- Bone sialoprotein
- DMP-1 (dentin matrix protein-1)
- Dentin sialophosphoprotein
- MEPE

Glikoprotein

- BAG-75
- Alkaline phosphatase
- Osteonectin
- Tetranectin

Serum Protein

- Serum albumin
- I2HS-glycoprotein

RGD-Containing Proteins

- Fibronectin
- Thrombospondins
- Fibrillins (1 and 2)

Enzim Ekstraselular

- Lysyl oxidase
- Alkaline phosphatase ("tissue-nonspecific" isoenzyme, TNSALP)
- Matrix metalloproteinases PHEX

Growth Factors/Sitokin

- Bone morphogenetic proteins (BMPs)
 - BMP antagonists (noggin, chordin)
 - Insulin-like growth factors (IGF-1, IGF-2, and IGF-binding proteins)
 - TGF- β s and binding proteins
 - Fibroblast growth factors
 - Sclerostin
 - Wnts, coactivators (eg, LRP5) and antagonists (eg, Dkk1)
-

Sifat biologi dari protein-protein nonkolagen pada matriks ekstraselular tulang adalah kemampuannya berinteraksi secara simultan dengan berbagai reseptor. Reseptor-reseptor ini meliputi makromolekul matriks lainnya, ion-ion yang terlarut (terutama Ca^{2+}), dan permukaan kristal-kristal mineral. Kemampuan ini sebagian ditentukan secara genetik, berdasarkan pada adanya *multiple binding motifs encoded* pada struktur primernya (seperti *the arg-gly-asp sequence recognized by certain integrins*) atau adanya regio yang diperkaya dengan residu asam amino (asp, glu) yang memudahkan ikatan dengan kation atau permukaan yang bermuatan positif. Faktor-faktor non genetik memiliki perbedaan pada sumber dan derajat modifikasi post translasional, juga membantu kapasitas interaksi molekul matriks ekstraselular tulang. Modifikasi yang nyata meliputi fosforilasi, glikolisasi dan *the vitamin K-dependent gamma-carboxylation of glutamate residues* pada osteokalsin. Modifikasi post translasional tergantung pada banyak faktor meliputi umur dan status metabolik. Konsekuensinya satu molekul matriks ekstraselular bisa menunjukkan *polydispersity* dan beberapa fungsi.^{9,10}

Matriks Inorganik (Mineral)

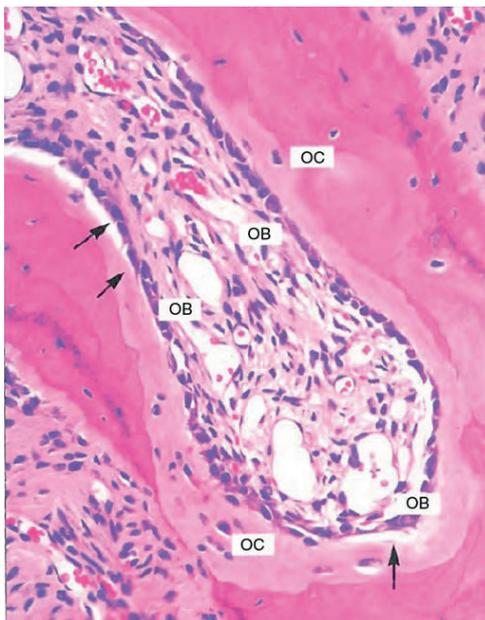
Matriks inorganik tulang terdiri dari kristal-kristal mineral hidroksiapatit [$\text{Ca}^{2+}_{10}(\text{PO}_4^{3-})_6(\text{OH}^-)_2$] dan varian penggantinya oleh berbagai ion terutama Mg^{2+} dan CO_3^{2-} . Kation-kation lain seperti aluminium, timbal, dan stronsium (begitu juga isotop-isotop berat lainnya seperti torium, plutonium, dan barium) dan anion seperti F^- juga bisa inkorporasi ke dalam mineral tulang bisa berasal dari diet atau paparan lingkungan, kristal mineral pertama yang terbentuk pada kondisi fisiologis kemungkinan besar berbeda dengan struktur dan komposisi hidroksiapatit. Lebih lanjut lagi, besarnya kristal dan kesempurnaannya dapat bergantung pada kondisi metabolik (seperti *bone turnover*). Mineral tulang terdistribusi merata pada matriks organik tulang, tidak hanya di antara serabut-serabut fibril tetapi juga di dalam area-area yang berongga. Akumulasi mineral pada jumlah besar belum terjadi sampai beberapa waktu deposisi matriks organik, pada jarak tertentu dari permukaan tulang serta di dekat osteoblas aktif. Proses terbentuknya mineral tulang, deposisi komplisit di dalam celah serabut-serabut kolagen, organisasinya yang konsisten belum seluruhnya diketahui. Syarat minimum untuk presipitasi garam mineral adalah konsentrasi yang cukup dari setiap unsur-unsurnya sehingga bisa berinteraksi dengan orientasi yang tepat untuk membentuk nukleus kristal. Pertumbuhan berikutnya melalui penambahan molekul-molekul ke dalam pola yang sudah ada membutuhkan energi yang sedikit. Pembentukan dan pertumbuhan kristal bisa difasilitasi melalui peningkatan konsentrasi masing-masing unsurnya (secara langsung atau dengan mengambil *inhibitor* yang bisa menghambat ikatan ion sehingga menurunkan konsentrasi efektif) atau melalui *heterogeneous nucleation – provision* dari entitas molekul terpisah (seperti katalisator) pada permukaan nukleus kristal yang memungkinkan ion-ion untuk terikat dengan susunan regular dan tumbuh pada susunan kristalin. Mineralisasi tulang terjadi melalui beberapa mekanisme di atas.^{9,10}

Sel-Sel Tulang

Sel-sel tulang diklasifikasikan berdasarkan hubungannya dengan matriks tulang. Osteoblas berfungsi memproduksi matriks tulang sedangkan osteoklas melakukan resorpsi. Osteosit dan *bone-lining cells* yang terdapat di dalam dan di permukaan tulang berperan dalam memelihara jaringan tulang sepanjang hidup.

Sel-sel tulang berasal dari dua turunan yang berbeda. Turunan osteoblas meliputi osteosit dan *lining cells* disebut juga sebagai *retired* osteoblas yang telah berhenti memproduksi matriks tulang dan terpendam di dalam matriks (osteosit) atau menyebar menutupi permukaan tulang (*lining cells*), berasal dari sel punca mesenkimal. Sebaliknya, osteoklas berasal dari sel punca hematopoietik, turunan dari keluarga *myeloid* (monosit-makrofag). Sel-sel tersebut datang ke tempat tulang yang direposisi dari sekelompok progenitor monosit-makrofag pada *marrow* atau sirkulasi darah.

Osteoblas, merupakan turunan sel punca mesenkimal yang menyintesis matriks tulang. Gambaran morfologi osteoblas ditandai oleh lokasinya pada permukaan tulang dan gambaran sekresinya. Osteoblas merupakan sel mononuklir, berbentuk kuboid dengan nukleus eksentrik yang menjauhi permukaan tulang dan mesin sintesis protein (*rough endoplasmic reticulum*, *Golgi apparatus*, *secretory vesicles*) di dekatnya. Molekul spesifik osteoblas meliputi ekspresi (pada mRNA dan protein) protein matriks tulang (kolagen tipe 1, osteopontin, osteonektin, sialoprotein tulang, osteokalsin) dan juga enzim ALP, yang berkaitan dengan osteoblas dan sel-sel lain yang terlibat langsung dalam biomineralisasi (kondrosit hipertrofi, odontoblas).



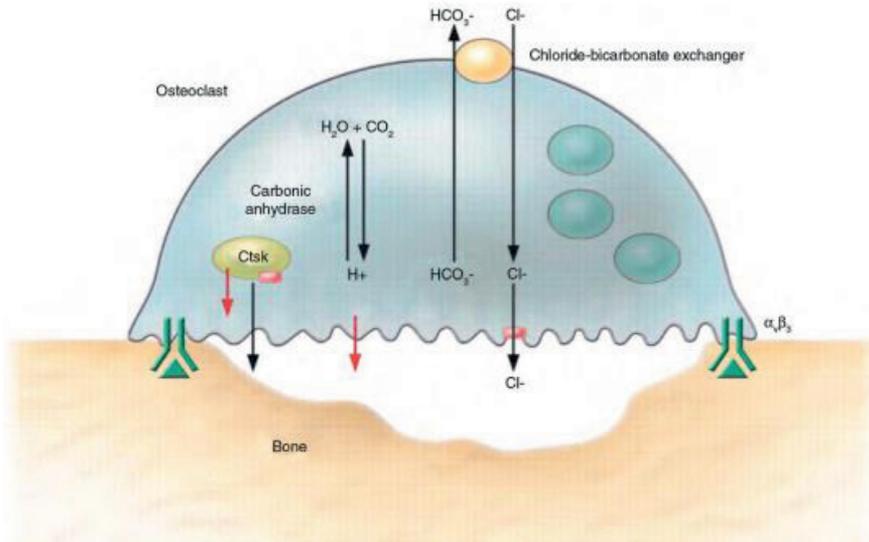
Gambar 2.3 Pengecatan histologi pada *bone multi-cellular unit* menunjukkan osteoblas (OB) pada permukaan terbentuknya tulang, beberapa terbenam di dalam matriks membentuk osteosit (OC).¹⁰

Setelah osteoblas terbentuk, mereka memiliki umur (*lifespan*) lebih kurang 100 hari selanjutnya osteoblas akan mejadi satu dari tiga kemungkinan: 1) terkubur di dalam matriks tulang yang diproduksi dirinya sendiri atau sel di dekatnya dan disebut osteosit; 2) pasif (*quiescence*) sebagai sel-sel *bone-lining* pada permukaan tulang di ujung fase pembentukan tulang, atau 3) mengalami apoptosis. Sebagian besar osteoblas (60-80%) akan mengalami apoptosis, 10-20% osteoblas menjadi osteosit dan dalam jumlah yang sama menjadi sel-sel *bone-lining*.

Osteoklas, merupakan pasangan katabolik dari osteoblas, yang berfungsi melakukan resopsi tulang pada daerah tertentu. Osteoklas merupakan sel multinuklear besar dengan ciri morfologi dan biokimia bervariasi yang dirancang untuk melakukan fungsi ekskavasi. Resopsi merupakan proses fagositosis khusus yang menyebabkan terjadinya penyerapan mineral dan degradasi matriks organik secara simultan. Fungsi osteoklas khusus ini terlihat dengan jelas pada permukaan yang berinteraksi dengan matriks tulang. Area ini terdiri dari *ruffled border* yang dikelilingi area yang ditutup oleh perlekatan osteoklas. Pada *ruffled border*, membran plasma memiliki beberapa lipatan dan sitoplasma yang berdekatan berisi sejumlah lisosom dan organela vesikular yang menunjukkan aktivitas membran sebagai bagian aktif eksositosis dan endositosis.

Osteoklas berasal dari sel progenitor di dalam sistem hematopoetik, yang merupakan turunan dari monosit/makrofag. Proses diferensiasi meliputi fusi dari sel-sel mononuklir untuk membentuk osteoklas multinukleus. Setelah datang ke tempat resopsi tulang, progenitor osteoklas mulai mengalami perubahan fenotip, meliputi ekspresi TRAP, multinukleasi yang terjadi pada fase akhir proses diferensiasi membentuk fusi sel-sel mononuklir, bukan dari pembelahan nukleus.

Osteoklas bukan sel permanen, mereka dibentuk sesuai dengan kebutuhan dan bila resopsi dibutuhkan. Pembentukan osteoklas dan selanjutnya resopsi tulang dicetuskan oleh berbagai stimulus fisik dan kimia. Stimulus ini meliputi inflamasi, hiperparatiroid, defisiensi steroid gonad dan gaya tekan yang berlebihan (menyebabkan kerusakan fisik dari matriks) serta gaya tekan yang suboptimal. Pembentukan osteoklas baru membutuhkan aktivasi sel-sel progenitor monosit dengan kontrol yang sangat ketat. Dua reseptor utama adalah *receptor activator of nuclear factor κ B ligand* (RANKL) dan *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), dibutuhkan dan bisa menstimulasi diferensiasi prekursor monosit menjadi osteoklas.^{9,10}



Gambar 2.4 Diagram ilustrasi proses perlekatan osteoklas pada tulang melalui ikatan *RGD-containing proteins* (segitiga biru) ke intergrin dan proses reopsi oleh osteoklas.¹⁰

Osteosit, merupakan tipe sel yang paling banyak pada tulang *mature* dan juga memiliki usia yang paling panjang dibanding sel tulang lainnya. Tidak seperti osteoblas dan osteoklas yang memiliki masa hidup beberapa hari sampai minggu, osteosit merupakan sel residen permanen dan bisa hidup sampai beberapa dekade, juga berbeda dengan sel-sel tulang lainnya, osteosit terletak di dalam matriks tulang kortikal maupun kancellus. Gambaran morfologi, sel osteosit jauh lebih kecil dari progenitornya (osteoblas), memiliki beberapa tonjolan kecil melewati matrik yang berhubungan dengan sel-sel di sekitarnya seperti osteosit di dekatnya atau sel-sel *bone-lining* atau osteoblas di daerah permukaan tulang. Pada titik kontak dengan sel tetangganya terbentuk *gap junction* antara dua tonjolan sel membran yang memungkinkan pergerakan ion-ion dan molekul-molekul kecil di antara sitoplasma sel-sel yang terhubung. Kemampuan komunikasi secara langsung melalui transfer sinyal sitoplasmik melalui *gap junction* merupakan konsep komunikasi antara osteosit yang terintegrasi dan koordinasi terhadap sinyal-sinyal dari lingkungannya. Selain itu juga terdapat komunikasi tambahan

melalui difusi atau konveksi melalui sistem *lacunar-canaliculi*, melewati perjalanan cairan dan larutannya pada tulang di luar dari pembuluh darah.^{9,10}

Sel-Sel Lapisan Tulang (Bone-Lining Cells)

Permukaan normal *quiescent* tulang (tulang yang tidak mengalami proses pembentukan maupun resorpsi) ditutupi oleh lapisan matriks yang tidak termineralisasi (*lamina limitans*) setebal 1-2 μm . Pada lapisan ini terdapat sel yang pipih dan memanjang yang disebut sebagai *bone lining-cells* yang berasal dari osteoblas. Sel-sel ini secara metabolik kurang aktif dibanding dengan osteoblast. Volume sel dan sintesis protein sel keduanya berkurang. Diperkirakan sel ini berfungsi dalam berkomunikasi dengan lingkungan. Sel ini terletak di antara tulang dan membran fibrosa periosteum dan stroma *bone marrow*. Ruang yang berisi cairan di bawah sel-sel lapisan ini berdampingan dengan sistem *lacunar-canaliculi*. Walaupun peran sel ini belum sepenuhnya dimengerti, diduga sel ini berfungsi vital pada sinyal untuk osteoklas pada daerah tulang yang membutuhkan resorpsi, sebab lapisan sel ini terhubung dengan kompartemen *marrow*. Osteoklas sulit melekat pada permukaan lapisan matriks tulang yang tidak termineralisasi. Oleh karena itu, diperkirakan *bone-lining cells* mensekresi kolagenase (MMP-1) yang dibutuhkan untuk membantu proses ini. Sel ini juga dapat mengalami diferensiasi menjadi osteoblas pada kondisi tertentu.^{9,10}

KARTILAGO

Pada tubuh manusia terdapat tiga jenis kartilago yang dibedakan berdasarkan komposisi, struktur, dan sifat mekanik. Kartilago hialin merupakan jaringan yang dapat ditemukan pada sendi-sendi diartrodial, juga disebut sebagai kartilago sendi yang menutupi permukaan sendi tulang panjang. Pada sendi sinovial kartilago hialin menghadap ke rongga sendi (ruangan yang berisi cairan sinovial) pada satu sisi dan sisi lainnya berhubungan dengan lempeng tulang subkondral yang diperantarai oleh lapisan kartilago terkalsifikasi. Kartilago hialin membentuk kesatuan sendi bersama-sama dengan tulang, meniskus, ligamentum, tendon, dan sinovium. Jaringan ini berasal dari sel punca mesenkimal dan pada kondisi *mature* merupakan jaringan kompleks terstratifikasi. Pada kondisi *immature*, kartilago sendi lebih tebal dan belum terstratifikasi, dengan sel-sel (kondrosit) tersebar dalam pola yang acak. Kartilago hialin juga membentuk daerah lempeng

pertumbuhan (*growth plate*) yang merupakan tempat tumbuhnya tulang panjang pada masa anak-anak.

Fungsi utama kartilago sendi adalah meneruskan gaya beban melalui permukaan sendi, memungkinkan terjadi pergerakan yang halus di dalam sendi dengan pelumasan dan gesekan yang rendah serta menyerap gaya tekan. Dalam melakukan fungsi utamanya, kartilago harus memiliki kekuatan *tensile* yang tinggi dan elastis yang didapatkan dari komposisi matriks ekstraselular. Ketebalan kartilago bervariasi mulai kurang dari satu milimeter pada sendi tangan sampai 5-7 milimeter pada sendi lutut. Secara umum kartilago lebih tebal pada sendi besar dan sendi yang menerima gaya relatif tinggi. Kartilago sendi merupakan jaringan avaskular, tidak memiliki saraf dan limfa serta memiliki potensi perbaikan yang terbatas. Kartilago sendi menerima nutrisi melalui cairan sendi yang dikontrol oleh muatan listrik, ukuran dan konfigurasi dari molekul-molekul serta larutan yang terdifusi.

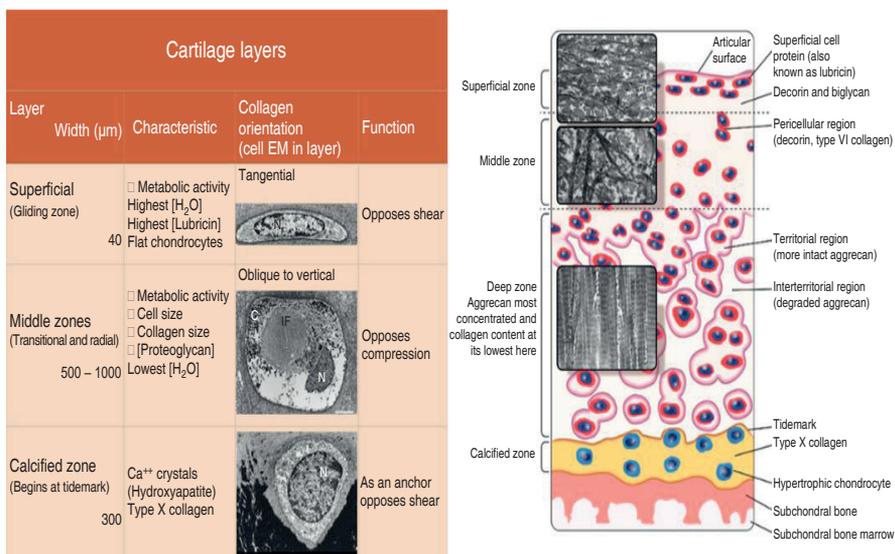
Fibrokartilago merupakan jaringan transisi antara jaringan ikat padat dan kartilago atau tulang yang bersifat sementara pada daerah fraktur. Fibrokartilago permanen terdapat pada tiga lokasi di tubuh, yaitu diskus intervertebralis, kondilus mandibula pada sendi temporomandibular, dan meniskus.

Kartilago elastik (berwarna kekuningan dan opak, lebih fleksibel daripada kartilago hialin), terdapat pada epiglotis dan tuba eustaki. Organisasi dasar menyerupai kartilago hialin, berisi kondrosit di dalam lakuna, kelompok sel dan lapisan perikondral, perbedaan utama di antara kedua kartilago ini adalah pada kartilago elastik berisi elastin dalam jumlah yang banyak.^{11,12}

Mikrostruktur Kartilago Sendi

Morfologi kartilago sendi manusia dapat dijelaskan sebagai jaringan dengan satu tipe sel (kondrosit) terkubur di dalam matriks yang banyak dan matriks ini terdiri dari jaringan kolagen tipe II, proteoglikan dengan berat molekul tinggi, agregkan, dan air. Molekul agregkan terdiri dari protein inti di mana rantai kondroitin sulfat dan keratan sulfat melekat. Pada homeostasis normal, kartilago sendi mengalami *turnover*, dengan kondrosit yang bertanggung jawab terhadap produksi, organisasi, dan memelihara matriks ekstraselular. Kartilago dewasa terdiri dari empat zona, yaitu zona superfisial, 10-20% ketebalan kartilago; zona transisional, 40-60% ketebalan kartilago; zona dalam (*deep*) 30% ketebalan kartilago; dan zona kalsifikasi yang memisahkan kartilago dengan tulang subkondral di bawahnya.

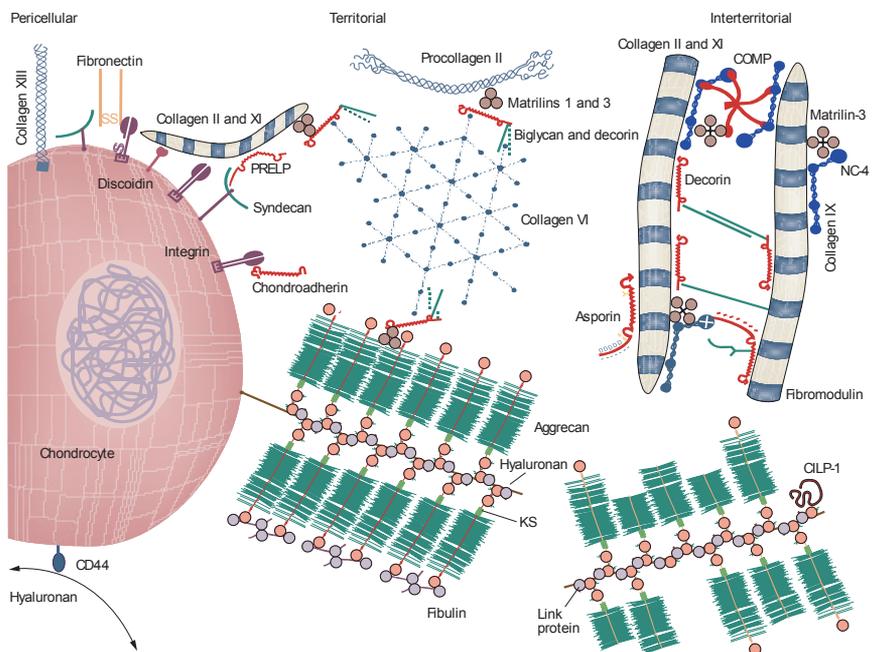
Pertemuan antara lapisan kalsifikasi dan dalam (*deep*) merupakan *smoothly undulating tidemark*, garis basofilik yang merupakan daerah kritis untuk menyalurkan gaya dari kartilago ke tulang. Setiap lapisan memiliki orientasi serabut kolagen, komposisi komponen matriks, dan sifat kondrosit yang berbeda. Pada zona superfisial, serabut-serabut kolagen tersusun paralel dengan permukaan kartilago sendi dan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan zona lainnya. Kondrosit pada zona ini memiliki bentuk memanjang, kecil, jumlahnya banyak dan terdistribusi paralel dengan permukaan sendi sebagai sel tunggal. Zona tengah kartilago ditandai dengan serabut-serabut kolagen tersusun acak, kurang padat oleh karena konsentrasi serabut kolagen berkurang dan dengan jumlah agregkan dan air yang tinggi. Kondrosit pada zona tengah secara acak tersebar ke seluruh matriks dengan bentuk sel bulat. Pada zona dalam, serabut-serabut kolagen tersusun radial, tegak lurus dengan permukaan sendi, melewati *tidemark* masuk ke zona kalsifikasi dan mengikat dengan stabil antara jaringan lunak dan keras. Pada zona dalam, kadar air relatif rendah sedangkan konsentrasi dan kepadatan proteoglikan relatif tinggi. Sel-sel kondrosit pada area ini bundar tersusun dalam kolom-kolom dengan arah



Gambar 2.5 Lapisan kartilago, karakteristik, dan fungsi. C, Cytoplasm; EM, electron micrograph; IF, intermediate filaments; N, nucleus.¹³

vertikal sama dengan serabut-serabut kolagen. Kondrosit zona dalam membentuk fungsional struktur yang disebut sebagai *chondrons*.^{11,12}

Organisasi kolagen juga tersusun berbeda di dalam masing-masing lapisan. Serabut kolagen di dekat sel membentuk jaringan kompak padat (terutama terdiri dari kolagen tipe IV) seperti sangkar yang mengelilingi setiap kondrosit, yang disebut sebagai matriks periselular. Pada matriks teritorial (lebar 5-10 μm tepat di luar matriks selular), serabut-serabut kolagen menebal dan membentuk anyaman radial. Matriks teritorial mengelilingi sel kondrosit tunggal atau grup/kolum sel-sel kondrosit. Matriks interteritorial ditandai dengan serabut-serabut kolagen besar dengan organisasi yang kompak dengan susunan radial, yang disebut sebagai *arcades by Benninghoff*. Matriks interteritorial menempati hampir seluruh volume kartilago sendi dan mengisi ruang di antara matriks masing-masing sel atau grup sel. Matriks interteritorial disebut juga sebagai matriks ekstraselular. Kondrosit



Gambar 2.6 Organisasi molekular kartilago artikular normal. Matriks kartilago mengelilingi kondrosit pada kartilago sehat yang disusun dalam beberapa zona tergantung jaraknya dari sel; matriks peri, matriks periselular, dan matriks teritorial.¹⁴

artikular dikelilingi oleh lingkungan mikro periselular yang kompleks **di mana** pada zona intermedial dan dalam terintegrasi dengan matriks interteritorial, terpisah dari teritori di dekatnya oleh matriks interteritorial. Struktur organisasi kartilago ini memberikan sifat biomekanik jaringan dan kondrosit yang merupakan kunci regulasi baik katabolik maupun anabolik bila diperlukan pada kartilago homeostasis.

Kondrosit Artikular

Kondrosit memiliki tanggung jawab terhadap pertumbuhan dan memelihara kartilago. Pada kondisi *mature*, jumlah kondrosit lebih kurang 5% dari volume kartilago dan sel ini mengontrol fungsi multipel meliputi sintesis dan degradasi matriks. Pada jaringan dan sel-sel lain, fungsi ini dilakukan oleh berbagai tipe sel (sebagai contoh, osteoblas bertanggung jawab terhadap sintesis matriks tulang sedangkan osteoklas mengontrol degradasi tulang). Formasi, degradasi, *remodelling*, dan regenerasi jaringan kartilago membutuhkan regulasi proliferasi sel, pertumbuhan, sintesis protein matriks, produksi dan aktivasi enzim degradasi matriks dan pada beberapa kasus matriks kalsifikasi dan kematian sel. Hanya sel kondrosit yang mengontrol proses ini dan sebaliknya, sejumlah besar sinyal meregulasi aktivitasnya.

Komposisi Biokimia Kartilago Matriks

Sifat biomekanik kartilago artikular yang baik merupakan hasil dari organisasi molekular yang unik dan karakter spesial dari unsur penyusunnya. Pada kartilago sehat, susunan dan distribusi molekul matriks ekstraselular bervariasi sesuai dengan matriks di sekitar kondrosit. Matriks kartilago dibagi dalam tiga area yaitu; matriks periselular, teritorial dan interteritorial yang memiliki organisasi yang unik pada setiap area.

Tabel 2.2 Berbagai komponen kolagen, proteoglikan, non kolagen protein yang menyusun kartilago.¹¹

Matriks Protein Kartilago	
<p>Kolagen</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tipe II (75% dari total fetus, 90% pada kolagen dewasa) • Tipe III (>10% pada kartilago manusia dewasa) 	<p>Protein non kolagen</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Fibronectin</i> • <i>Thrombospondins, terutama thrombospondin 5 (COMP)</i>

Matriks Protein Kartilago

- Tipe IX (*covalently fibril-associated collagen*; 10% pada fetus, 1% pada dewasa)
- Tipe X (hanya pada kartilago hipertrofik)
- Tipe XI (bagian dari fibril; 10% pada fetus, 3% pada dewasa)
- Tipe VI (*chondron, microfilaments*; < 1%)
- Tipe XII/XIV
- Tipe XIII (transmembran)
- *Matrilin 1* (sebelumnya disebut sebagai protein matriks kartilago)
- *Matrilin 2*
- *Matrilin 3*
- *Anchoring*
- *Tenascin-C*
- *Thrombomodulin*
- *Chondroadherin*
- *Cartilage intermediate layer protein (CILP)*
- *Fibulin*

Proteoglikan

- Aggrecan (95% of total proteoglycan)
- Biglycan
- Decorin
- Fibromodulin
- Lumican
- Asporin
- Chondroadherin
- Osteoadherin
- Prolargin (PRELP)

Membran Protein

- Syndecan
- CD44
- Integrins ($\alpha 1, 2, 3, 5, 6, 10; \beta 1, 3, 5$)

Air

Kartilago normal memiliki kandungan air sekitar 65% (zona dalam) sampai 80% (permukaan) dari berat basahnya. Aliran air melalui jaringan diatur melalui hukum mekanika dan fisikokemikal, dan aliran air memungkinkan transportasi nutrisi melalui jaringan avaskular ini dan juga memberikan sifat biomekanik kartilago. Kartilago artikular menahan air melalui kontak dengan makromolekul mayor, kolagen tipe II, dan proteoglikan.

Kolagen

Bentuk kartilago artikular dan kekuatan materialnya tergantung pada *cross-linked* jaringan kolagen dan karakteristik organisasi fibril, yang bervariasi dengan kedalaman jaringan dan jarak dari sel.

Kolagen tipe II, merupakan kolagen utama kartilago artikular, komposisi *triple helix* dari tiga rantai α identik berasal dari gen COL2A1. Terdapat dua

varian sambungan prokolagen, tipe IIA dengan karakter kondroprogenitor dan tipe IIB merupakan kolagen tipe II yang utama pada kartilago dewasa. Pada saat biosintesis, tiga rantai α identik berputar satu dengan lainnya untuk membentuk molekul-molekul kolagen kemudian tersusun berpilin membentuk serabut pita panjang dan tidak bercabang dan memberikan *tensile strength*. Pencitraan TEM (*transmission electron microscopy*) menunjukkan pola orientasi serabut-serabut. Pada zona superfisial (0-2 mm), serabut tipis dan berjalan paralel dengan permukaan sendi. Pada zona tengah, diameter serabut lebih besar dan tersusun acak. Serabut paling tebal berada pada zona dalam yang arahnya tegak lurus permukaan kartilago dan terikat dengan tulang subkondral.^{11,12}

Kolagen-kolagen lain. Serabut-serabut kolagen tipe II berisi tipe-tipe kolagen yang lain di dalam serabut atau di sekitarnya. Kolagen ini sering disebut sebagai kolagen-kolagen minor sebab jumlahnya relatif kecil, tetapi fungsinya cukup penting. Kolagen tipe II, IX, dan XI membentuk serabut-serabut heterotipik *cross-link* yang diletakkan sebagai *template* utama jaringan kolagen pada fase perkembangan kartilago artikular. Setelah kartilago *mature*, kerangka kolagen terdiri terutama kolagen tipe II. Sejalan dengan umur, kondrosit mulai memproduksi kolagen tipe III, yang akan melapisi dengan jumlah bervariasi pada jaringan kolagen yang asli. Molekul-molekul kolagen tipe III dengan *unprocessed N-propeptides* akan melakukan *cross-linked* ekstensif dengan kolagen tipe II pada sendi yang menua. Karena kolagen

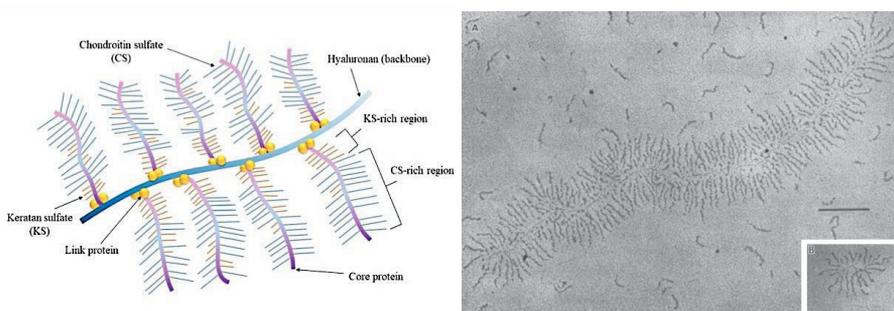
Tabel 2.3 Fungsi kolagen tipe III, VI, IX, XI

	Fungsi Kolagen tipe III, VI, IX, XI
Kolagen Tipe IX	Membentuk permukaan serabut kolagen tipe II dan membentuk jembatan dengan molekul lain pada matriks ekstraselular seperti <i>fibronectin</i> . Berkontribusi pada pembentukan matriks.
Kolagen Tipe XI	Membentuk cetakan yang membatasi pertumbuhan ke lateral dari kolagen tipe II heterofibril
Kolagen Tipe III	Berperan pada respon dari kartilago artikular terhadap kerusakan matriks, bisa memadukan kerangka kolagen tipe II yang lemah (pada penuaan dan osteoarthritis)
Kolagen Tipe VI	Mikrofilamen ini membentuk jaringan yang rapat yang menutupi masing-masing kondrosit yang disebut sebagai <i>chondron</i> , selanjutnya berfungsi sebagai komunikasi antar sel dan lingkungan mikronya.

tipe III juga diketahui banyak pada daerah penyembuhan dan reparasi kulit dan jaringan lainnya, diperkirakan kolagen tipe III bertindak sebagai *covalent modifier* yang menambah kohesi pada serabut kolagen tipe II yang melemah sebagai bagian respons penyembuhan pada kerusakan matriks.^{11,12}

Agrekan

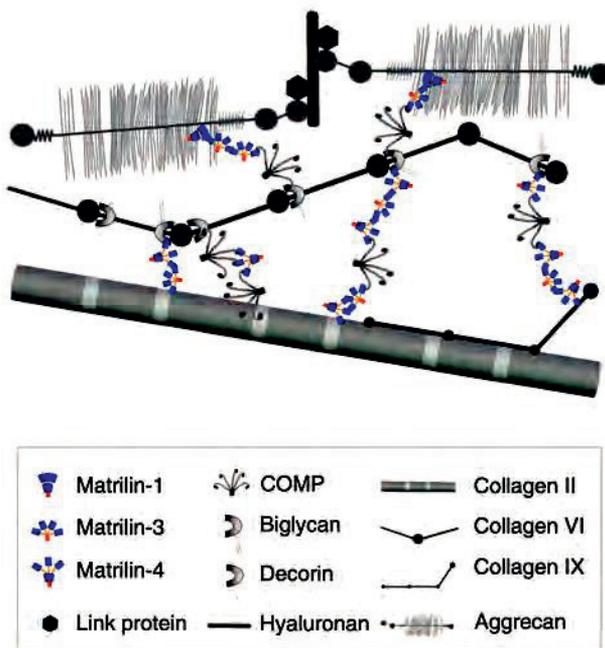
Sifat hidrofilik proteoglikan memberi kartilago memiliki sifat afinitas terhadap air. Proteoglikan utama pada kartilago adalah agrekan yang terdiri dari 220–250 kDa inti protein, berisi tiga domain globular, G1, G2, dan G3 semuanya dekat dengan *N terminus* dan dipisahkan oleh domain globular pendek. Kekuatan konstrain di dalam jaringan kolagen dikelilingi agregat proteoglikan menjamin kekuatan dan matriks kohesif yang menahan air dengan kuat. Jeli agrekan selanjutnya melindungi serabut-serabut kolagen kartilago dari degradasi oleh kolagenase. Pada penelitian kartilago tanpa agrekan akan mengalami degradasi komplet setelah inkubasi dengan *matrix metallo-proteinase* (MMP)-1, sedangkan kolagen pada kartilago dengan agrekan tidak terjadi degradasi. Lebih lanjut lagi, *inhibitor* agrekanase selektif yang tidak dapat menghambat aktivitas MMP melindungi agrekan terhadap degradasi dan juga menahan kolagenolisis pada kartilago yang terekspos sitokin. Data di atas menunjukkan peran protektif agrekan dalam mencegah degradasi patologi serabut-serabut kolagen.^{11,12}



Gambar 2.7 (A) Struktur proteoglikan kompleks tipe agrekan¹⁵, (B) Gambar mikroskop elektron proteoglikan kartilago artikular bovine.¹⁶

Molekul-Molekul Matriks Lain

Molekul-molekul nonkolagen lain pada matriks kartilago membentuk jaringan dan memelihara sifat kartilago. Pembentukan atau perakitan jaringan kolagen tipe IV pada periselular matriks diregulasi oleh *small leucine-rich proteoglycans* (SLRPs) seperti dekorin, biglikan, lumikan, dan fibromodulin. Proteoglikan-proteoglikan kecil *nonaggregating* dan memiliki inti protein lebih pendek daripada agrekan, tidak seperti agrekan, protein ini tidak mengisi volume besar pada kartilago. Biglikan merupakan glikosilasi dengan dua rantai kondroitin atau dermatan sulfat. Dekorin adalah glikolisasi dengan rantai tunggal kondroitin atau dermatan sulfat dan fibromodulin dengan lebih 5 rantai keratan sulfat. Dekorin dan fibromodulin dapat mengikat kolagen tipe I dan II serta memiliki peran pada organisasi dan stabilisasi *meshwork* kolagen. SLRPs juga berinteraksi dengan molekul-molekul lain meliputi *oligomeric matrix protein* (COMP) dan matrilin. Matrilin 1-4 membentuk keluarga protein yang terdistribusi luas berisi domain *von Willebrand Factor A* (vWFA) yang banyak berinteraksi dengan protein-protein. Pada kartilago, terutama *matrilin 1-3* berikatan dengan berbagai tipe



Gambar 2.8 Berbagai protein nonkolagen dalam membentuk organisasi kartilago.¹¹

kolagen berbeda dan juga agrekan, jadi molekul ini penting sebagai pendukung penyusun matriks dengan menghubungkan komponen serabut-serabut dan memantapkan interaksi antara jaringan kolagen dan agrekan. COMP (juga dikenal sebagai trombospondin 5) juga bagian dari penyusunan matriks. Pada osteoarthritis, level COMP sangat meningkat sehingga molekul COMP tunggal akan menempati semua ikatan pada satu molekul kolagen, sehingga menghambat pembentukan serabut-serabut dan secara efektif menghambat reparasi.^{11,12}

Selain penyusunan matriks, molekul-molekul matriks (atau fragmennya) memiliki peran kunci dalam modulasi respons perilaku sel meliputi metabolisme sel, diferensiasi, dan kehidupannya. Pada dekade terakhir, banyak pendapat baru tentang peran anggota keluarga gen SLRP sebagai molekul sinyal. SLRPs bisa berikatan berbagai reseptor permukaan sel, meliputi reseptor *insulin like growth factor-1* dan reseptor *epidermal growth factor* yang mencetuskan berbagai sinyal untuk meregulasi perilaku sel. Selanjutnya glikoprotein ini akan mengikat dan menampung berbagai sitokin, faktor pertumbuhan, dan morfogen (seperti *transforming growth factor*) melibatkan berbagai jalur pensinyalan. Pada matriks periselular, molekul matriks berinteraksi dengan reseptor permukaan sel, seperti fibronektin bisa berikatan dengan integrin dan proteoglikan heparan sulfat seperti sindekan, kolagen berikatan dengan reseptor diskoidin, dan CD44 bertindak sebagai reseptor hialuronan. Berbagai molekul yang bisa mengikat reseptor permukaan kondrosit juga berinteraksi dengan molekul-molekul matriks teritorial, memantapkan komunikasi di antara matriks (kadang-kadang dengan sel yang letaknya jauh) dan kondrosit. Kondrosit bisa merasakan apa yang terjadi pada matriks dan memberi respons yang sesuai. Dewasa ini diyakini bahwa *matrilin* pada matriks periselular bisa mengubah sensitivitas mekanik kondrosit. Protein lain pada matriks kartilago memiliki peran penting dan beberapa menjadi subjek penelitian. Fibulin berperan penting dalam organisasi supramolekular matriks kartilago, melalui ikatan dengan domain G3 agrekan. Beberapa protein lain seperti *Tenascin C* terdapat dalam jumlah yang kecil, tetapi ekspresinya meningkat secara dramatis pada osteoarthritis.

Saat matriks mengalami perubahan sebagai bagian dari proses patologi penuaan (arthritis), interaksi-interaksi molekul dan respons seluler berikutnya bisa terjadi perubahan yang dramatis, menghasilkan perubahan lingkungan metabolik, selanjutnya dapat mengganggu fungsi jaringan kartilago. Molekul-

molekul yang dilepas dari matriks secara biologi menjadi aktif dan berhubungan dengan inflamasi melalui sedikitnya dua mekanisme. *Pertama*, molekul-molekul matriks seperti fibromodulin dan COMP bisa mengaktifkan komplemen dan berkontribusi terhadap inflamasi yang selanjutnya menimbulkan degradasi matriks. *Kedua*, komponen-komponen matriks seperti *tenascin-C*, fibronektin, dan fragmen asam hialuronik akan mengaktifkan *toll-like receptor*, yang diekspresikan oleh berbagai sel seperti kondrosit, sinoviosit, dan makrofag yang selanjutnya melepas sejumlah sitokin dan kemokin.

TENDON DAN LIGAMENTUM

Tendon dan ligamentum merupakan jaringan ikat kompleks dan merupakan komponen esensial dari sistem muskuloskeletal yang membantu pergerakan dan stabilisasi statis maupun dinamik sendi. Tendon dan ligamentum sering didiskusikan bersama sebab memiliki banyak persamaan walaupun keduanya berbeda. Keduanya memiliki sifat elastik dan viskoelastik yang berkontribusi kepada kemampuannya menahan berbagai jenis gaya. Perilaku ini sebagai hasil dari karakteristik komposisi dan struktur kompleks pada setiap level organisasi sebagai respons terhadap fungsi sendi.

Tendon

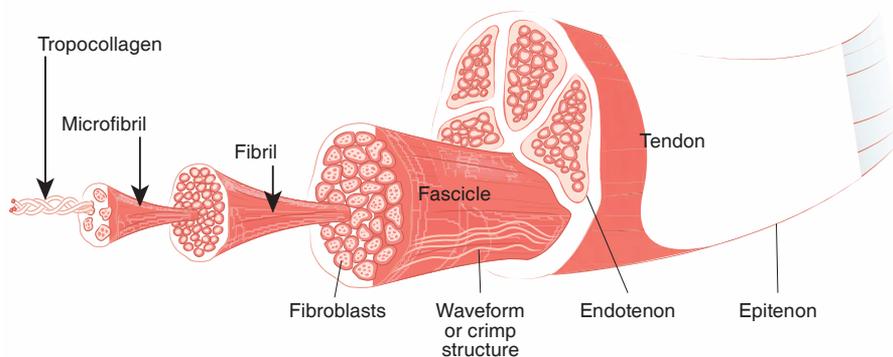
Tendon bisa diklasifikasikan dalam beberapa tipe, yaitu menurut anatomi, bentuk spesifik (bundar atau datar), lokasi anatomi (intra atau ekstraartikular) serta jaringan ikat yang mengelilinginya (paratenon atau *synovium*, yang berfungsi mengurangi friksi dan memungkinkan *gliding* tendon).

Morfologi, Histologi, Mikroanatomi, dan Biologi Sel

Koneksi antara tendon dengan otot dan origo atau insersi pada tulang membutuhkan karakteristik morfologi dan anatomi yang kompleks, selanjutnya begitu juga pada level selular dan molekular. Koneksi berfungsi memungkinkan transfer gaya dari otot ke tulang dan memungkinkan gerakan spesifik oleh sistem muskuloskeletal. Tendon memberikan keuntungan mekanik untuk otot dengan memusatkan dan mengubah gaya, memperpanjang *lever arm* atau bekerja di dalam *pulley* (seperti pada tendon fleksor halusis longus). Bentuk tendon bulat atau pipih dihubungkan dengan fungsi spesifik. Contoh klasik tendon bulat adalah

tendon fleksor digitorum pada anggota gerak atas dan bawah, tendon pipih pada tendon *rotator cuff* dan tendon *achilles*. Sebagian besar tendon bulat memiliki sifat sama dan secara biomekanik bekerja pada lingkungan yang konsisten. Tendon ini dirancang untuk gaya *tensile* tinggi dan memiliki kemampuan untuk gerakan yang luas atau *gliding*. Tendon pipih lebih susah dikategorikan. Umumnya lebih sedikit *gliding* tetapi memiliki kemampuan untuk menanggung gaya *tensile* tinggi (seperti pada tendon kuadrisep) dan juga gaya yang lebih kompleks seperti kompresi dan *shear*. Konsekuensi dari perbedaan fungsi tampak pada struktur tendon tersebut. Penelitian lebih lanjut tentang tendon menunjukkan komposisi kompleks dengan implikasi fungsional yang luas. Pada level dasar, komposisi tendon diorganisasi secara konsisten di seluruh tubuh, meskipun sering memiliki perbedaan superstruktur. Semua jaringan ikat komponen fungsional utama tendon adalah air dan kolagen. Air merupakan unsur utama penyusun 50–60% berat tendon. Kolagen merupakan 75% berat kering tendon dengan 95% adalah kolagen tipe I dan sisanya kolagen tipe III serta kolagen-kolagen lainnya. Tendon juga berisi sel-sel tendon yang disebut sebagai tenosit dan proteoglikan. Proteoglikan terdiri dari ikatan kovalen protein inti dari satu atau lebih rantai glikosaminoglikan (GAG). GAG diduga memiliki peran penting pada mekanik, terutama sifat viskoelastik dan berhubungan dengan air. Proteoglikan utama pada tendon adalah dekorin dan biglikan anggota dari *the small leucine-rich proteoglycan family* (SLRPs). Molekul ini mengikat kolagen dan menyusun serabut-serabut pada tendon dan jaringan lainnya. Pada beberapa penelitian diduga protein ini berperan pada tendinopati, walaupun mekanismenya masih belum jelas.¹⁷

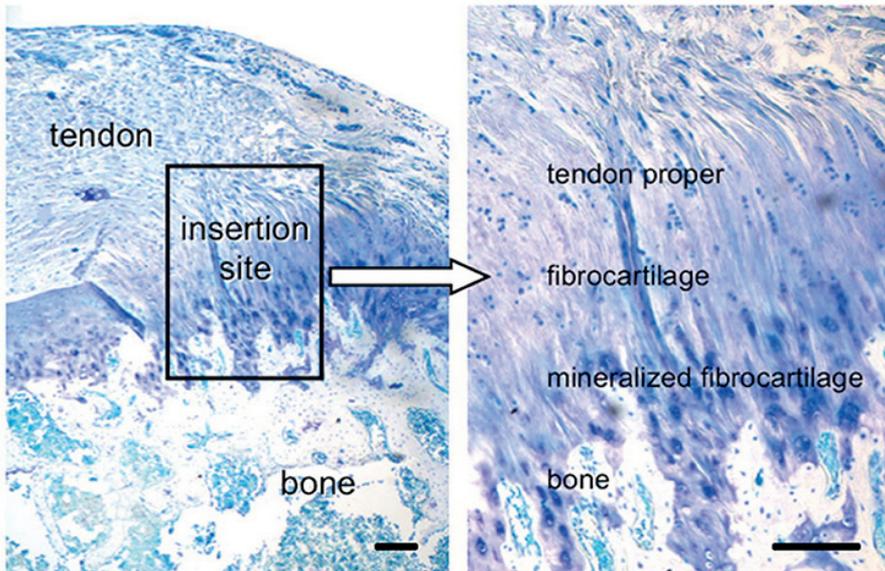
Pada level molekular, tendon tersusun dalam hierarki dimulai dari kolagen *triple helix*, serabut-serabut mikro, serabut-serabut, fasikulus-fasikulus, dan akhirnya membentuk tendon. Rangkaian yang terbentuk dan kolagen *triple helix* di dalam serabut-serabut mikro merupakan faktor kritis yang memengaruhi kekuatan mekanik jaringan. Proses ini sangat bergantung pada keluarga SLRPs ekstraselular, yang bisa mengatur ketebalan dan kualitas rangkaian serabut-serabut. Elemen penting lain pada rangkaian dan struktur kolagen adalah *crimp*. *Crimp* adalah ultrastruktur yang terbentuk dan terlihat sebagai garis *crimped* pada tendon bila dilihat dengan mikroskop. *Crimping* ini berasal dari orientasi spesifik serabut-serabut mikro pada tendon dan mempunyai kontribusi penting pada sifat mekanik.¹⁷



Gambar 2.9 Hierarki struktur tendon, rangkaian molekul-molekul kolagen ke dalam rangkaian yang lebih besar sampai mencapai tendon. Endotenon (mengelilingi fasikulus-fasikulus) dan epitenon (mengelilingi tendon) berisi jaringan neurovaskular.¹⁷

Tendon superstruktur adalah organisasi serabut-serabut yang progresif menjadi fasikulus-fasikulus yang lebih besar yang membentuk grup dan akhirnya membentuk tendon fungsional, juga merupakan jaringan ikat penunjang yang memelihara anatomi dan fungsi fisiologi. Kelompok-kelompok fasikulus dipisahkan dan diikat bersama oleh lapisan tipis jaringan ikat yang disebut sebagai endotenon. Sebagai kelanjutan endotenon adalah epitenon yang membungkus seluruh tendon. Beberapa tendon dibungkus oleh paratenon (seperti tendon *achilles*) dan beberapa dibungkus oleh *synovium* (seperti tendon fleksor) tergantung besarnya *gliding* yang dibutuhkan. Endotenon dan paratenon memiliki pembuluh darah, limfatik, dan saraf untuk tendon.

Sisi lain dari morfologi dan hubungan fungsional tendon adalah origo dan insersi (tempat tendon terhubung). Sebagai jaringan yang menghubungkan otot ke tulang, tendon memiliki 2 regio penghubung; *myotendinous junction* yang merupakan daerah transisi otot menjadi tendon dan *bone-tendon junction* yang merupakan daerah transisi tendon ke tulang. *Myotendinous junction* tersusun dari interdigitasi ujung sarkomer elemen jaringan ikat. Pada bagian ujung sarkomer yang disebut sebagai garis Z, yang tersusun dalam organisasi *staggered* dengan sarkomer di dekatnya, terpisah dan membentuk rangkaian miofilamen yang berinsersi langsung ke serabut-serabut kolagen. Susunan ini meminimalkan stres pada *myotendinous junction* pada saat kontraksi kuat. Pada *bone-tendon junction*



Gambar 2.10 Bone-tendon junction.¹⁸

disebut juga sebagai entesis, dua susunan khusus dengan dua peran biomekanik; insersi langsung atau tidak langsung. Insersi langsung atau fibrokartilago memiliki empat lapis transisi dari tendon ke tulang; tendon, fibrokartilago, mineralisasi fibrokartilago, dan tulang. Insersi ini merupakan daerah spesifik tempat unit tendon-tulang akan menerima gaya *tensile* tinggi (seperti pada *rotator cuff*). Pada insersi langsung, tidak sebanyak insersi langsung, serabut-serabut tendon secara langsung berinsersi pada periosteum. Serabut-serabut yang interdigitasi dengan jaringan periosteum disebut sebagai serabut-serabut *Sharpey*. Transisi ini banyak dijumpai pada daerah dengan gaya *tensile* pada insersi tendon tidak besar (contoh pada kaput distal rektus femoris).¹⁷

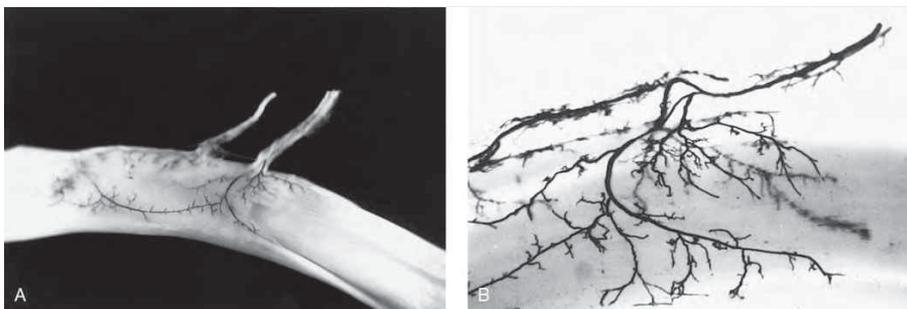
Pada level selular juga menjadi pertimbangan yang memengaruhi struktur dan fungsi. Tendon diklasifikasikan sebagai jaringan yang relatif hipovaskular. Tenosit memelihara *milieu* ekstraselular yang memungkinkan fungsi normal tendon dengan menyekresi matriks ekstraselular, sintesis kolagen, dan proteoglikan. Mereka memiliki tonjolan selular panjang yang membungkus dan interdigitasi serabut-serabut kolagen dan tonjolan tenosit lain serta badan sel. Mereka membei respons terhadap gaya mekanik dan bisa berkomunikasi dengan

tenosit di dekatnya melalui *gap junction* pada daerah *interface*, begitu juga produksi mediator-mediator inflamasi saat menerima stres.

Aliran Darah dan Inervasi

Walaupun tendon sebagian besar hipovaskular, aliran darah memiliki dampak penting pada tendon baik sehat maupun sakit. Aliran darah dan inervasi tendon yang utama melalui endotenon dan epitenon. Tendon mendapat nutrisi utama melalui pembuluh darah yang masuk melalui paratenon atau pada insersi tulang, tempat aliran darah masuk melalui mesotenon pada *vincula* disebut sebagai *redundancies* sinovium yang mengikat tendon ke selubungnya pada beberapa lokasi, yang dianalogikan sama dengan mesenterium pada peritoneum. Selubung tendon juga menerima nutrisi melalui difusi cairan sinovial. Selanjutnya pada tendon hipovaskular, daerah spesifik yang relatif avaskular di antara zona vaskular yang diperkirakan memiliki risiko untuk ruptur. Daerah hipovaskular ini terdapat pada tendon supraspinatus, tendon bisep kaput panjang, dan tendon patela yang cenderung lebih mudah untuk ruptur.

Inervasi tendon meliputi beberapa tipe akhiran saraf dengan fungsi yang berbeda. Tendon diinervasi oleh saraf yang sama dengan ototnya. Variasi organ khusus meliputi *Golgi organs*, yang memberikan informasi bila mendapat stimulus jangka panjang, *Pacini corpuscles*, yang sensitif, mekanoresptor adaptasi cepat, dan *Ruffini endings*, yang juga sangat sensitif dan juga bisa meneruskan informasi untuk waktu yang lama sama dengan *golgi organs*. Organ-organ ini secara khusus



Gambar 2.11 (A) Tendon fleksor digitorum profundus manusia, menunjukkan kontribusi *vinculum* (struktur seperti pita menghubungkan tendon fleksor dan jari-jari). (B) Gambar diperbesar menunjukkan ekstensi aliran darah *vinculum*.¹⁷

terletak pada daerah *myotendinous*. Ujung saraf bertanggung jawab terhadap nosisepsi dan sebaliknya cenderung mengelompok pada *enthesis*.¹⁷

Ligamentum

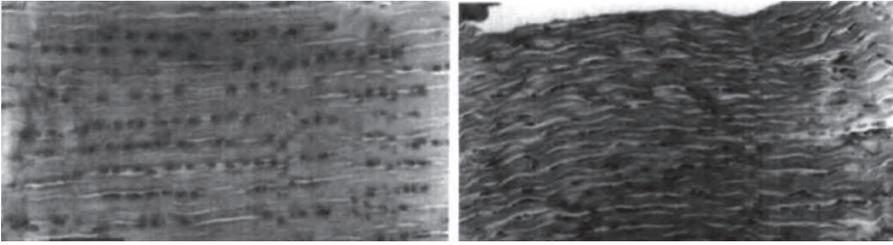
Klasifikasi dan Anatomi

Seperti tendon, ligamentum diklasifikasikan sebagai pita padat jaringan ikat fibrosa yang ditandai dengan serabut-serabut kolagen yang solid. Meskipun tampaknya sama, ligamentum dan tendon berbeda dalam fungsi, sifat mekanik, dan komposisi biokemikal. Ligamentum memiliki origo dan insersi pada tulang, sedangkan tendon menghubungkan otot dengan tulang. Ligamentum juga memiliki sifat berbeda berdasarkan fungsi dan lokasi anatominya. Secara umum, fungsi dasar ligamentum adalah mengarahkan kinematik sendi, memelihara stabilitas sendi, dan mencegah pergeseran abnormal tulang. Secara anatomi, ligamentum diklasifikasikan sesuai dengan tempat melekat pada tulang, yang penting pada distribusi dan menyerap gaya sendi. Ligamentum kapsular berlokasi di dalam kapsul artikular yang mengelilingi sendi sinovial, yang secara anatomi berbeda dengan ligamentum ekstrakapsular tetapi keduanya berfungsi untuk stabilisasi sendi.

Morfologi, Histologi, Mikroanatomi, dan Biologi Sel

Ligamentum terdiri dari susunan jaringan ikat kolagen dengan pola hierarki sama dengan tendon. Umumnya ligamentum relatif avaskular. Lapisan tipis jaringan ikat (epiligamentum) mengelilingi ligamentum dan analog dengan epitenon. Sama halnya dengan tendon, epiligamentum membawa saraf, pembuluh darah, dan limfa. Struktur ini memiliki peran dalam penyembuhan ligamentum. Morfologi, interaksi serabut-serabut kolagen pada ligamentum memiliki *cross-linked* yang lebih tinggi daripada tendon dan orientasinya *intertwined* dibandingkan orientasi paralel pada serabut-serabut tendon. Ligamentum juga berisi sel-sel fibroblas yang secara metabolik lebih aktif dan inkorporasi di antara serabut-serabut kolagen. Ligamentum memiliki lebih banyak kolagen tipe III daripada tendon, tetapi total kolagen lebih rendah.

Ligamentum memiliki perbedaan sifat dan struktur sesuai dengan lokasi anatomi, berdasarkan interaksinya dengan cairan sendi (apakah intra atau ekstraartikular). *Anterior cruciate ligament* (ACL) intrartikular memiliki sel lebih



Gambar 2.12 Perbedaan morfologi sel-sel intrartikular ACL (A) dan sel-sel ekstra-artikular MCL (B) pada kelinci putih New Zealand. Sel-sel ACL berbentuk kondroit sementara sel-sel MCL berbentuk memanjang.¹⁷

kondroit dan diklasifikasikan sebagai sel yang kurang aktif dibanding *medial collateral ligament* (MCL) yang ekstra-artikular.¹⁷

Di dalam ligamentum, juga terdapat daerah berbeda dalam orientasi serabut-serabut kolagen, komposisi, dan bentuk sel di antara bagian tengah dan tempat insersi pada tulang. Morfologi insersi ada dua bentuk yang berbeda, langsung dan tidak langsung. Seperti pada tendon, insersi langsung paling banyak dan ditandai oleh empat area; ligamentum, fibrokartologi, kalsifikasi fibrokartilago, dan tulang. Insersi tidak langsung, seperti insersi MCL pada tibia, ditautkan langsung ke tulang oleh serabut-serabut kolagen kalsifikasi (*sharpey fibers*) yang menyatu dengan periosteum dan tulang. Pada daerah tengah ligamentum, sel-sel berbentuk memanjang sedangkan pada daerah insersi, sel-sel terlihat lebih bulat. Transisi perubahan komposisi kolagen menggambarkan distribusi dan penyerapan stres pada saat menerima beban.

Komposisi ligamentum sama dengan tendon. Unsur-unsur utama adalah air, kolagen, elastin, proteoglikan, dan sel-sel. Kandungan air lebih kurang 60-70% berat total sedangkan kolagen kira-kira 80% berat kering ligamentum. Kolagen tipe I merupakan kolagen utama pada ligamentum (lebih kurang 90%). Kolagen lain dengan jumlah yang lebih kecil adalah kolagen tipe III dengan tambahan kolagen lainnya meliputi kolagen tipe V, VI, XI, dan XIV. Proteoglikan lebih kurang 1% dari berat kering ligamentum dan memiliki fungsi untuk hidrasi ligamentum dan sifat viskoelastik. Proporsi relatif proteoglikan bervariasi sesuai dengan lokasi anatomik dan fungsi, secara spesifik berkaitan tanggung jawabnya terhadap beban kompresi dan fungsi beban *tensile*. Komponen lain dalam jumlah kecil (1% berat kering) adalah serabut protein elastin. Fungsi

elastin adalah untuk elastisitas ligamentum dan panjangnya kembali ke panjang semula setelah tertarik memanjang. Sel primer pada ligamentum adalah fibroblas yang berorientasi longitudinal di dalam kerangka serabut-serabut kolagen. Sel-sel ini menyintesis kolagen dan matriks ekstraselular yang merupakan unsur-unsur struktur ligamentum.

Aliran Darah dan Inervasi

Vaskularisasi merupakan faktor yang sangat penting untuk nutrisi dan penyembuhan ligamentum. Meskipun secara umum vaskularisasi ligamentum jarang, ligamentum memiliki organisasi sistem mikrovaskular. Pleksus epiligamentum yang mengelilingi ligamentum merupakan tempat utama vaskular ligamentum, menunjukkan perbedaan kepadatan tergantung lokasi, dan paling padat pada insersinya. Saraf memiliki kemampuan sebagai sensor nyeri nosisepsi begitu juga sensor propioseptif yang keduanya berkontribusi pada stabilitas sendi.¹⁷

Problem Penyembuhan Jaringan Muskuloskeletal

TULANG

Tulang merupakan jaringan yang istimewa dengan sifat penyembuhan yang berbeda dengan seluruh jaringan tubuh manusia. Pada kondisi normal, penyembuhan tulang dari cedera membentuk jaringan seperti tulang aslinya tanpa membentuk jaringan ikat. Tetapi, bila terjadi gangguan penyembuhan maka akan terbentuk jaringan ikat di antara dua fragmen tulang yang mengalami cedera sehingga akan menurunkan fungsi tulang.

Penyembuhan Fraktur Tulang

Fraktur tulang merupakan salah satu cedera yang sering terjadi dan dihubungkan dengan biaya terapi lebih dari miliaran dolar Amerika, kehilangan produktivitas sosial, dan kecacatan individu. Meningkatnya transportasi bermotor di negara berkembang sejalan dengan meningkatnya cedera dan fraktur-fraktur tulang panjang secara dramatis yang mengancam jiwa. Penyembuhan

fraktur merupakan koordinasi yang rumit berbagai jenis sel dan proses-proses mekanoreseptor. Kira-kira 10% dari fraktur berakhir dengan *non union* dan/atau penyembuhan *incomplete*.^{9,19}

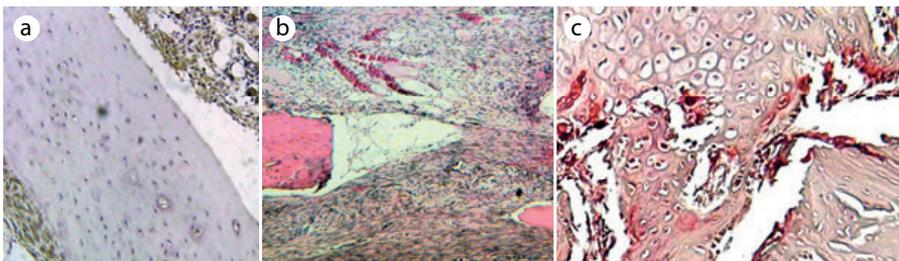
Cedera pada tulang sembuh melalui dua proses yang berbeda, yaitu penyembuhan secara langsung (primer) dan tidak langsung (sekunder). Penyembuhan primer melibatkan transisi langsung sel punca mesenkimal menjadi osteoblas pembentuk tulang baru (osifikasi intramembranos). Penyembuhan primer terjadi bila terdapat stabilitas absolut pada permukaan tulang dengan kontak kurang dari 0,15 mm dan minimal *strain* interfragmental kurang dari 2%. Hal ini hanya bisa dicapai dengan *compression lag screw* atau *compression plating*. Penyembuhan sekunder berjalan melalui fase kartilago sebelum terbentuknya tulang oleh osteoblas (osifikasi endokondral) yang difasilitasi oleh stabilitas relatif pada daerah fraktur. Sel-sel dan faktor-faktor molekular yang bekerja sama membentuk kalus kemudian mengalami resolusi merupakan orkestrasi yang kompleks dan rumit.^{9,20}

Proses penyembuhan tulang memiliki berbagai komponen yang dibutuhkan dalam proses penyembuhan tulang. Sel-sel inflamasi (seperti sel-sel T, B, sel mast, makrofag, eosinophil, dan neutrofil) merupakan komponen selular awal pada lingkungan fraktur, diikuti oleh sel-sel progenitor mesenkimal, endotelial, kondrosit, osteoblas, dan akhirnya osteoklas. Proses penyembuhan fraktur dibedakan dalam beberapa fase yang bersifat sementara, tetapi harus dimengerti bila fase-fase ini saling tumpang tindih begitu juga dengan berbagai jenis sel-sel yang tampak. Konsep ini penting untuk dipahami sebab sinyal antara sel memiliki pola heterotopik (melewati beberapa tipe sel). Sebagai contoh, baik kondrosit dan osteoblas bisa mempromosikan pertumbuhan pembuluh darah melalui kemampuan keduanya memproduksi *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Sebaliknya, sel-sel endotelial mempromosikan pembentukan tulang produksi *bone morphogenetic protein* (BMP) dan data terbaru juga menunjukkan peran dalam mengarahkan pembentukan pembuluh darah di dalam kartilago dan stimulasi konversi kondrosit hipertropik menjadi osteoblas.^{9,20}

Fase-fase pada penyembuhan fraktur. Penyembuhan fraktur dan jaringan skeletal diawali dengan fase anabolik ditandai dengan meningkatnya volume jaringan yang berhubungan dengan merekrut dan diferensiasi sel punca pembentuk jaringan tulang dan vaskular. Di dekat garis fraktur akan terbentuk kalus kartilagenos. Di tepi dari daerah sentral, di ujung dari jaringan kartilago baru, periosteum akan membengkak dan memulai pembentukan tulang

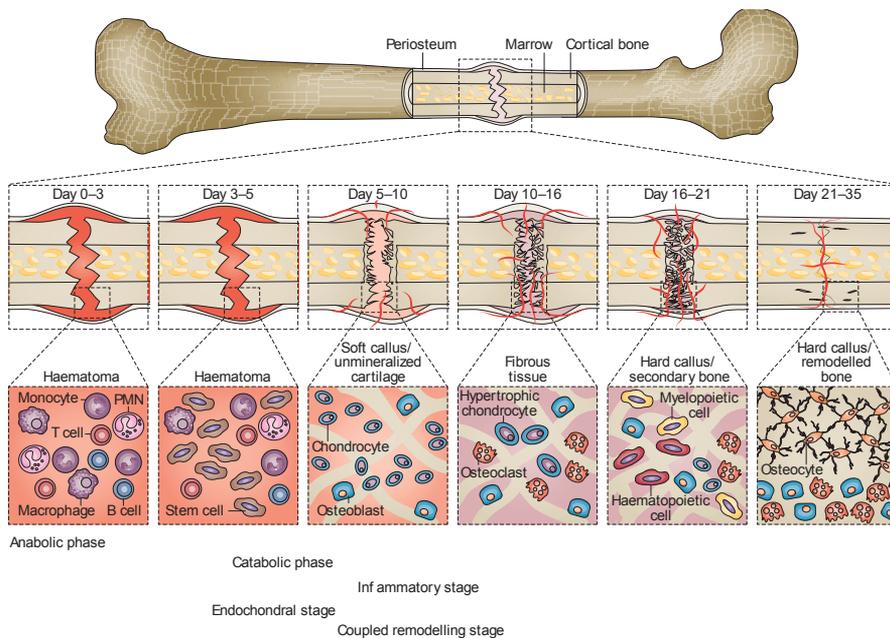
primer. Bersamaan dengan pembentukan jaringan kartilago, sel-sel yang akan membentuk pembuluh darah dan tulang baru direkrut dan berdiferensiasi di sekeliling selubung otot. Peningkatan *vaskular bed* yang mengelilingi dan tumbuh ke dalam kalus menunjukkan peningkatan aliran darah ke dalam area jaringan yang mengalami perbaikan. Pada saat diferensiasi kondrosit berlangsung, matriks ekstraselular mengalami mineralisasi dan fase anabolik penyembuhan fraktur berakhir dengan apoptosis kondrosit.^{9,21}

Fase anabolik diikuti pemanjangan fase yang didominasi oleh aktivitas katabolik dan ditandai dengan berkurangnya volume jaringan kalus. Pada fase ini aktivitas katabolik dominan seperti resorpsi kartilago, proses anabolik spesifik terus berjalan, pembentukan tulang sekunder dimulai dengan resorpsi kartilago dan berlanjutnya *angiogenesis* primer pada tempat pembentukan tulang menggantikan kartilago. Selanjutnya saat *remodeling* tulang dimulai, matriks mineralisasi yang pertama terbentuk pada saat pembentukan tulang primer akan diresorpsi oleh osteoklas dan kemudian tulang sekunder yang terbentuk pada periode kartilago juga akan diresorpsi. Kalus yang terbentuk akan terus diresorpsi, periode ini ditandai dengan siklus berpasangan aktivitas osteoblas dan osteoklas yang mengakibatkan jaringan kalus akan mengalami *remodeling* menjadi struktur tulang kortek aslinya (*coupled remodeling*). Pada periode ini,



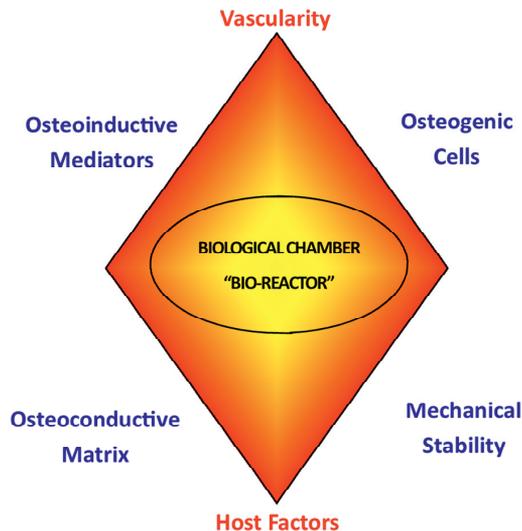
Gambar 3.1 Histologi fase awal penyembuhan fraktur femur pada tikus. (A) fase inflamasi 24 jam setelah cedera. Pada spesimen terlihat imunoreaktif terhadap antibodi *tumor necrosis factor* (TNF) yang menunjukkan respons imun *inate* terhadap cedera baik pada periosteum dan populasi sel *marrow* (cokelat) dengan pengecatan hematoksilin. (B) Fase inflamasi lanjut 3 hari setelah cedera. Tampak kelompok sel-sel fibrosa dan sel-sel *angiogenic* membentuk pembuluh darah kecil pada daerah fraktur. (C) Fase endokondral lanjut, 14 hari setelah cedera. Spesimen dicat dengan *tartrate-resistant acid phosphatase* menunjukkan osteoklas resorpsi (merah terang).²¹

ruang *marrow* terbentuk kembali dan terjadi regenerasi struktur *marrow* jaringan hematopoitik dan tulang seperti aslinya. Pada periode akhir fase katabolik, terjadi *remodeling* vaskuler yang ekstensif di mana peningkatan *vaskular bed* akan regresi dan aliran darah yang tinggi kembali kepada level sebelum cedera. Walaupun proses terjadi berurutan, terdapat tumpang tindih pada fase-fase penyembuhan tulang dan populasi sel terus berubah begitu juga proses sinyal di dalam jaringan yang mengalami regenerasi.^{9,21}



Gambar 3.2 Penyembuhan fraktur femur dengan model fraktur femur tikus yang difiksasi dengan *rod intramedular*. Fase metabolik mayor (batang biru) penyembuhan fraktur tumpang tindih dengan fase biologi (batang coklat). Fase metabolik primer (anabolik dan katabolik) penyembuhan fraktur ditampilkan sebagai tiga fase biologi mayor (inflamasi, pembentukan tukang endokondral, dan *coupled remodeling*). Tipe sel-sel primer yang terdapat pada masing-masing *stage* dan rentang waktu mereka timbul disebutkan daftar singkatan; BMP, *bone morphogenetic protein*; BMPR, *bone morphogenetic protein receptor*; DKK1, *Dickkopf-related protein 1*; LRP, *LDL-receptor-related protein*; MSC, *mesenchymal stem cell*; PMN, *polymorphonuclear leukocyte*; PTH, *parathyroid hormone*; PTHrP, *parathyroid-hormone-related protein*; RANKL, *receptor activator of nuclear factor κ B ligand*.²¹

Penyembuhan fraktur dan *Diamond concept*. Keberhasilan respons penyembuhan tulang tergantung pada lingkungan biologi di tempat fraktur (ketersediaan mediator-mediator molekular, sel-sel progenitor dan matriks, sel-sel imunoregulatori dan lain-lain) dan lingkungan mekanik optimal yang memberikan stabilitas pada tempat fraktur, memfasilitasi proses fisiologi agar respons penyembuhan berhasil baik. *Diamond concept* merupakan kerangka konsep untuk respons keberhasilan penyembuhan fraktur, di mana stabilitas mekanik dan lingkungan biologi memiliki peran yang sama. Selanjutnya vaskularisasi tulang yang adekuat status fisiologis pasien juga memiliki peran penting dalam penyembuhan fraktur. Kekurangan atau gangguan pada lingkungan biologi dan lingkungan mekanik, atau kegagalan dalam menilai komorbiditas pasien dan gangguan vaskularisasi semuanya akan mengganggu penyembuhan fraktur (*non-union*). Secara keseluruhan *diamond concept* merujuk kepada ketersediaan mediator-mediator osteoinduktif, sel-sel osteogenik, matriks osteokonduktif (*scaffold*), lingkungan mekanik yang optimal, vaskularisasi adekuat dan menilai setiap komorbiditas pasien.²²



Gambar 3.3 Ilustrasi *Diamond concept* yang memengaruhi keberhasilan penyembuhan fraktur. Terdiri dari: vaskularisasi, sel-sel osteogenik, stabilitas mekanik, matriks osteokonduktif, mediator-mediator osteoinduktif, dan faktor-faktor pasien.²²

Gangguan Penyembuhan Tulang

Tulang skeletal memiliki kapasitas regenerasi yang besar. Penyembuhan tulang setelah fraktur merupakan fenomena yang timbul dari hubungan yang kompleks faktor-faktor biologis dan mekanik serta faktor status pasien sendiri. Orkestrasi sempurna faktor-faktor ini akan menghasilkan penyembuhan fraktur dalam 3 bulan dan mengembalikan fungsi ekstremitas. Gangguan pada salah satu faktor akan menimbulkan kegagalan penyembuhan tulang yang disebut sebagai *non-union*.

Walaupun sulit didefinisikan, *non-union* adalah terhentinya secara komplit proses penyembuhan tulang. Parameter-parameter waktu, klinik, radiologis juga digunakan dalam mendefinisikan dan mendiagnosis kondisi ini. *American Food and Drug Administration* mendefinisikan diagnosis *non-union* ditegakkan bila minimal 9 bulan sejak dari terjadinya cedera dan fraktur tidak menunjukkan tanda-tanda progres penyembuhan dalam 3 bulan terakhir.^{9,22,23}

Insiden *non-union* dilaporkan dari literatur sangat bervariasi, bergantung pada besarnya penelitian, demografi pasien, lokasi cedera, tingkat *severity* serta metode terapi. Data yang didapat dari berbagai literatur di Amerika, di antara 2-30% dengan perkiraan kasus *non-union* 100.000 per tahun. Studi terakhir di Australia, dari 853 pasien terdapat 8% komplikasi penyembuhan tulang. Studi dengan data yang lebih besar dilakukan di Skotlandia yang menunjukkan angka insiden lebih rendah daripada yang dilaporkan sebelumnya pada populasi dewasa, dengan insiden *non-union* untuk fraktur femur dan pelvis 13 dari 1000 kasus, humerus 30 dari 1000 kasus dan tibia 55 dari 1000 kasus, insiden tertinggi pada grup umur 25-44 tahun.²²

Risiko *non-union* terdiri dari faktor pasien lokal dan sistemik dan beberapa yang bisa memengaruhi penyembuhan fraktur.

Tabel 3.1 Faktor-faktor risiko *non-union*.²²

Faktor yang dipengaruhi oleh pasien		Faktor yang tidak dipengaruhi oleh pasien
Dapat dimodifikasi	Tidak bisa dimodifikasi	
Merokok	Umur	Reposisi terbuka (kualitas yang jelek)
Alkohol		
Defisiensi nutrisi (termasuk vitamin D)	Jenis Kelamin	Fraktur terbuka (kehilangan tulang yang besar dan trauma jaringan lunak)

Faktor yang dipengaruhi oleh pasien		Faktor yang tidak dipengaruhi oleh pasien
Dapat dimodifikasi	Tidak bisa dimodifikasi	
	Predisposisi genetic	Pola fragmen fraktur yang <i>multiple</i> (kominutif)
	Diabetes (Penyakit darah tepi)	Pergeseran fragmen fraktur
	Osteoporosis	Sindrom Kompartemen
	Inflamasi kronis	Tulang yang terlibat: paling tinggi pada tibia
	Gagal ginjal	Tempat fraktur dihubungkan dengan zona vaskularisasi
	Insulin	Adanya celah fraktur setelah pembedahan
	Opiat	Stabilitas mekanik yang jelek setelah pemasangan implant
	NSAID Steroid Antibiotik Antikoagulan Kemoterapi	Infeksi

Dua tipe *non-union* yang dapat diidentifikasi melalui pencitraan radiologi, ditentukan oleh jumlah tulang yang terbentuk pada tempat fraktur, yaitu atrofik dan hipertrofik. Atrofik *non-union* berhubungan dengan faktor-faktor biologi yang tidak adekuat dan terjadi pada fase awal penyembuhan fraktur. Atrofik *non-union* secara radiologi diidentifikasi dengan jumlah pembentukan kalus yang sedikit pada tempat fraktur. Kedua ujung fraktur atrofi dan tidak ada potensi untuk sembuh. Dahulu, diyakini bahwa *non-union* atrofi menunjukkan avaskular pada kedua ujung fraktur, tetapi hasil penelitian dewasa ini melaporkan bahwa *non-union* atrofi bisa memiliki vaskularisasi yang baik.^{9,23}

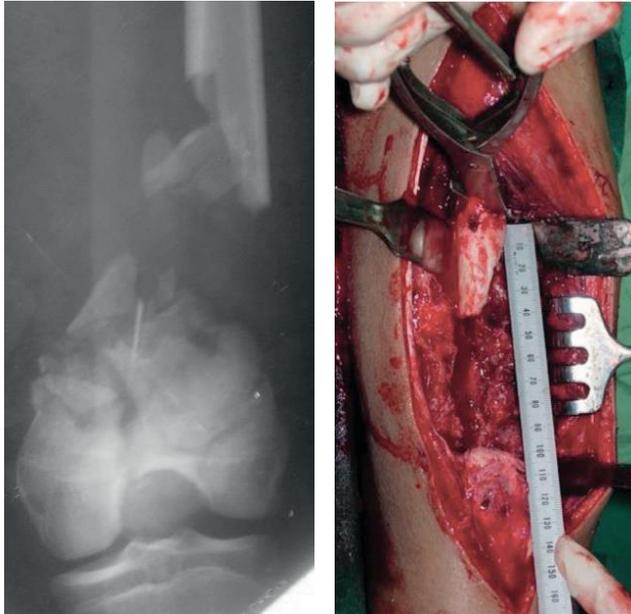
Sebaliknya, *non-union* hipertrofik adalah *non-union* yang terlihat gambaran kalus yang sangat banyak pada radiologi, tetapi formasi kalus tidak terorganisasi dengan baik dan di luar daerah fraktur sehingga tidak terjadi *union* pada fraktur.



Gambar 3.4 (A) Atrofik non-union pada tulang tibia dan fibula di mana tidak tampak pembentukan kalus. (B) Hipertrofik non-union pada tibia, tampak kalus yang sangat banyak tetapi tidak melewati area fraktur sehingga terjadi non-union.⁹

Kondisi ini terjadi karena stabilitas mekanik yang tidak adekuat dan terjadi pada fase lanjut penyembuhan tulang. Gerakan yang berlebihan pada awalnya menimbulkan *strain* yang tinggi pada sel-sel prekursor lokal, yang selanjutnya didesensitasi oleh mediator-mediator biokimia sehingga terjadi aktivasi dan proliferasi sel-sel tersebut. *Non-union* hipertrofik pada gambaran radiologi menunjukkan tiga gambaran klasik yang bergantung pada derajat gerakan mekanik pada tempat fraktur. Konfigurasi *elephant-foot* merupakan konsekuensi fiksasi yang tidak stabil, imobilisasi yang tidak adekuat, dan prematur *weight-bearing*. Osifikasi yang timbul pada tepi ujung fraktur memberi gambaran *elephant foot*. Konfigurasi *horse-shoe* kurang hipertrofik dengan jumlah kalus yang lebih sedikit. Pada konfigurasi ini gerakan mekanik lebih besar daripada konfigurasi *elephant foot*. *Non-union* oligotrofik memiliki minimal kalus pada area fraktur akibat pergerakan yang signifikan pada daerah fraktur sebagai dampak fiksasi atau imobilisasi yang tidak adekuat.^{9,23}

Critical-size defect. Defek segmental besar pada tulang atau yang disebut sebagai *critical-sized defect* adalah kondisi ekstrem yang sangat memengaruhi penyembuhan tulang. Kondisi ini dapat disebabkan oleh cedera dengan energi yang tinggi, penyakit-penyakit tulang, deformitas akibat pertumbuhan, pembedahan revisi, reseksi tumor, dan osteomyelitis. Kehilangan tulang yang besar pada defek



Gambar 3.5 Critical-size defect akibat cedera pada tulang femur.⁹

ini akan secara langsung berdampak pada revaskularisasi dan diferensiasi jaringan dan berlanjut pada *non-union* bila tanpa intervensi. Definisi klasik dari *critically sized segmental bone defect* adalah defek tulang terkecil pada tulang tertentu dan spesies hewan tertentu yang tidak akan sembuh secara spontan sepanjang hidup hewan tersebut atau kurang dari 10% regenerasi tulang selama hidup hewan. Walaupun parameter besarnya defek tulang bukan satu-satunya faktor penyebab, ukuran minimum besarnya defek pada tulang adalah 2–2,5 kali diameter tulang. *Non-union* oleh karena kondisi ini sangat memengaruhi kualitas hidup pasien karena terapi yang lama, biaya tinggi, membutuhkan operasi besar dan akhirnya memengaruhi kondisi sosial ekonomi pasien.⁹

KARTILAGO

Cedera dan Reparasi Endogen

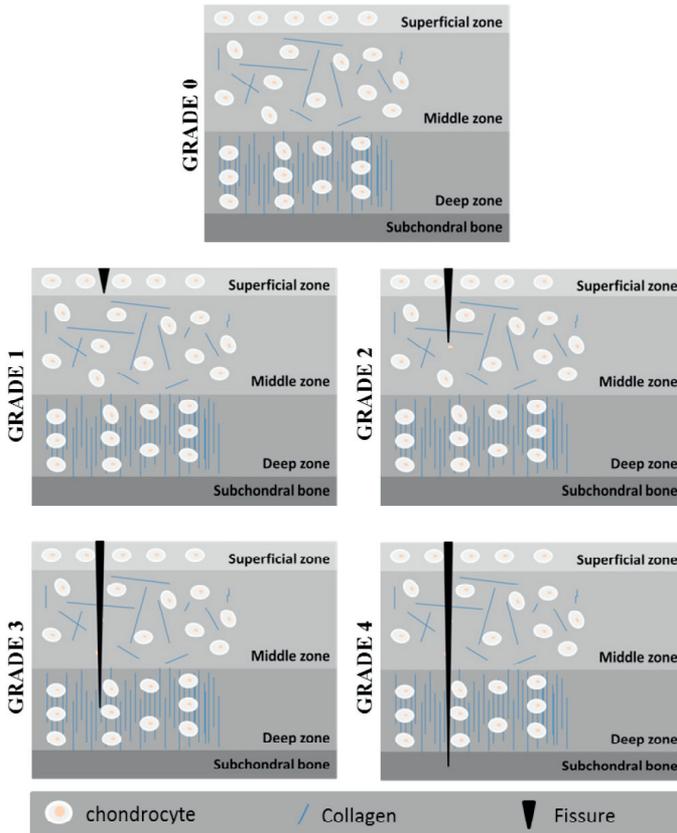
Insiden cedera kartilago artikular bervariasi tergantung umur, lokasi anatomik dan faktor-faktor risiko lain. Pada populasi dewasa, 9% cedera kartilago

terjadi pada usia 30 tahun dan pada usia yang lebih tua menderita osteoarthritis lutut dan panggul, dengan biaya yang ditimbulkan diperkirakan 28,6 miliar dolar dan lebih 200.000 *knee replacement* dilakukan setiap tahun hanya di Amerika Serikat saja. Studi pada dewasa ini yang dilakukan prosedur artroskopi pada lutut menunjukkan lebih dari 60% memiliki berbagai bentuk kerusakan dan degenerasi kartilago, dengan lebih dari 10% memiliki defek yang membutuhkan prosedur reparasi kartilago. Pada janin, kartilago mengalami regenerasi jika cedera timbul pada masa awal kehamilan, tetapi penyembuhan defek kartilago tidak terjadi pada dewasa. Studi pada hewan dan manusia memperlihatkan bahwa defek kecil pada permukaan jarang bisa membaik dan faktanya sebagian besar akan menjadi defek besar atau menjadi lesi yang lebih serius. Walaupun dari obeservasi tidak semua kerusakan akan menjadi osteoarthritis dengan gejalanya, bahkan defek kecil saja bisa menurunkan kualitas hidup dengan menurunnya level aktivitas. Lebih lanjut lagi walaupun terapi lesi kartilago bisa memperbaiki fungsi lutut sampai 5 tahun ke depan, fungsi lutut umumnya tetap lebih inferior dibanding fungsi sebelum cedera dan dapat diperkirakan akan menurunkan level aktivitas. Secara alami, reparasi kartilago menunjukkan perbaikan bila lesi mencapai tulang subkondral dan juga bila lesinya kecil.¹²

Kartilago merupakan jaringan yang sulit karena kemampuannya yang jelek dalam reparasi pasca cedera. Penyebab utamanya adalah kartilago tidak memiliki pembuluh darah, saraf, dan jaringan limfa. Ada tiga tipe kerusakan kartilago²⁴:

1. defek karena cedera dengan kartilago sehat atau kurang sehat di sekitarnya;
2. lesi degenerasi setelah cedera berulang di mana kartilago di sekitar kualitasnya kurang baik; dan
3. hilangnya kartilago karena patologi sel-sel dan matriks seperti pada osteoarthritis.

Kerusakan kartilago akan menurunkan produksi komponen-komponen matriks ekstraselular, tetapi jumlah kondrosit tidak dipengaruhi oleh degenerasi. Cedera kartilago merupakan problem klinis yang serius di bidang Ortopedi. *International Cartilage Repair Society (ICRS)* mengklasifikasikan derajat kerusakan kartilago menjadi lima tingkat/*grade*.



Gambar 3.6 Ilustrasi lesi kartilago menurut *International Cartilage Repair Society (ICRS)*.²⁵

Grade 0 : kartilago normal

Grade 1 : Lesi superfisial (fisura atau retakan)

Grade 2 : Fisura kurang dari setengah tebal kartilago

Grade 3 : Fisura lebih dari setengah tebal kartilago

Grade 4 : Fisura mencapai tulang subkondral

Dari *grade 1* sampai *grade 3*, lesi tidak mencapai tulang subkondral. Lesi ini hanya melibatkan kartilago saja dan tidak akan terjadi penyembuhan karena tidak melibatkan pembuluh darah. Sebaliknya, pada lesi *grade 4* mencapai tulang subkondral yang memiliki vaskularisasi. Pada lesi ini akan terjadi penyembuhan

spontan karena adanya perekrutan sel-sel kondroprogenitor dan menginvasi lesi untuk membentuk kartilago. Jaringan yang baru terbentuk merupakan fibrokartilago yang sifat-sifatnya berbeda dengan kartilago hialin. Hubungan antara kekakuan (*stiffness*) kartilago dan klasifikasi ICSR memprediksi kekakuan (*stiffness*) akan timbul kira-kira 25% pada setiap *grade* ICSR.²⁵

Hambatan Biologi dan Mekanikal untuk Reparasi

Apa yang menyebabkan kartilago dewasa tidak bisa mengalami penyembuhan sendiri? Beberapa hambatan biologi merupakan predisposisi yang menimbulkan terjadinya respons penyembuhan yang buruk. Pada janin, bisa terjadi penyembuhan, sel-sel yang aktif dalam biosintesis memiliki kepadatan tinggi, sedangkan matriks ekstraselular kurang padat dibandingkan dewasa. Oleh karena integritas kartilago membutuhkan populasi sel aktif pada daerah defek dan deposisi matriks, kepadatan sel yang rendah (sebagian besar *senescent* atau memiliki aktivitas biosintetik menurun) merupakan predisposisi jaringan mengalami akumulasi kerusakan yang progresif. Begitu juga keberadaan faktor-faktor inflamasi pada sendi bisa menghambat formasi jaringan. Selain lingkungan biologi yang tidak mendukung, faktor lain yang menghambat reparasi kartilago adalah beban gaya yang intensif pada sendi normal aktif. Tidak jarang pada kartilago sendi besar ekstremitas bawah mengalami gaya kompresi beberapa kali dari beban badan, menerima stres sekitar 5-10 MPa. Degenerasi yang menyebar pada permukaan artikular menyebabkan deformasi pada kartilago yang tersisa, yang akan menyebabkan proses katabolik meningkat di dalam jaringan. Bila proses reparasi jaringan terjadi, sering sifat jaringan yang terbentuk inferior dibanding jaringan aslinya sehingga tidak bisa menerima beban. Konsekuensinya daerah di sekitarnya akan menerima beban tambahan dan terjadi degenerasi progresif yang dipresipitasi defek fokal pada kartilago. Stres kontak yang berjalan radial pada daerah defek lebih besar daripada stres yang dialami kartilago normal. Pada kondisi ini akan terjadi kecenderungan meningkatnya fraktur pada tepi defek, pada reparasi jaringan terjadi *dehiscence* (menggaug) pada tepi defek dan akhirnya timbul kegagalan.¹²

Osteoarthritis Pasca Trauma (Post Traumatic Osteoarthritis - PTOA)

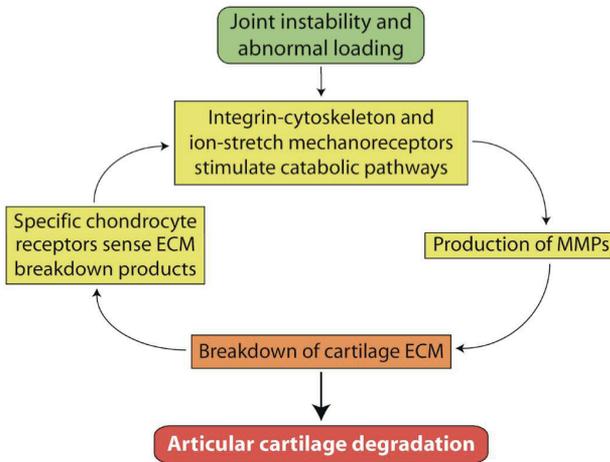
Osteoarthritis pasca trauma (PTOA) merupakan kondisi klinik yang sering terjadi pada sendi diartrodial akibat kerusakan kartilago, tulang subkondral,

permukaan sendi yang tidak rata dan instabilitas karena trauma akut. Fraktur intrartikular, robekan meniskus, trauma ligamentum, dan trauma kondral merupakan penyebab utama terjadinya PTOA. Berbeda dengan osteoarthritis idiopatik yang cenderung mengenai pasien tua, PTOA terjadi pada dewasa muda, sering berkembang, dan progresif lebih cepat akibat trauma sendi.^{12,26,27}

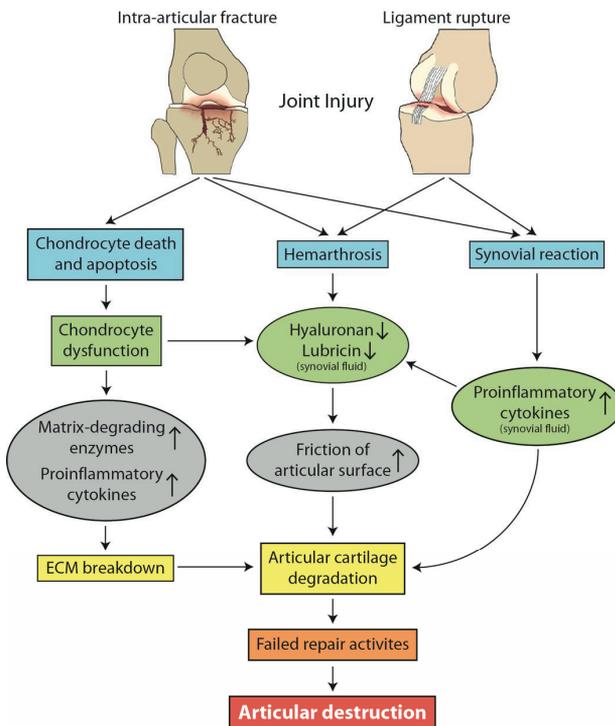
Proses patogenesis setelah trauma. Proses patogenesis setelah trauma sendi bervariasi tergantung beratnya dampak mekanikal dan kerusakan jaringan. Trauma dengan energi rendah seperti kontusio sendi, dislokasi, trauma ligamentum dan meniskus, penyebab tersering kerusakan permukaan sendi tanpa fraktur tulang *displaced*, walaupun bisa terjadi fraktur mikro pada daerah kartilago kalsifikasi dan/atau tulang subkondral. Proses patogenesis setelah trauma secara temporer bisa dipisahkan kepada fase pasca trauma akut dengan inflamasi pada sendi dan fase kronis.

Pada fase pasca trauma akut, trauma pada sendi akan mengakibatkan kerusakan struktur jaringan sendi, hemartrosis, dan kematian kondrosit. Sifat lubrikasi cairan sendi akan terganggu akibat dilusi cairan sendi oleh perdarahan intra dan ekstrasvasasi plasma, yang selanjutnya akan menurunkan konsentrasi asam hialuronik dan *lubricant*. Trauma sendi akan menekan sintesis kolagen dan proteoglikan pada kartilago. Sel-sel hidup yang tersisa bisa memberi respons terhadap trauma dengan meningkatkan aktivitas sintesis dan over ekspresi enzim-enzim degradasi matriks serta mediator-mediator inflamasi. Awal nekrosis sel diikuti lebih lanjut dengan penyebaran kematian sel dimediasi oleh mekanisme apoptosis, yang terjadi melampaui area terjadinya trauma ke daerah sekitar yang tidak mengalami trauma.

Pada fase kronik, perubahan metabolik pada kartilago artikular dan sendi lainnya berkembang perlahan dengan waktu yang panjang melalui periode tanpa gejala menjadi fase dengan gejala seperti nyeri dan disfungsi akibat kerusakan sendi. Sebagian besar pasien dengan PTOA tidak terdiagnosis sebagai arthritis secara klinis sampai terjadinya fase dengan gejala atau keluhan. Bila kerusakan sendi telah terjadi, opsi pembedahan adalah artroplasti, osteotomi, dan artrodesis. Dalam rangka mendapatkan strategi terapi yang efektif melalui pembedahan dan intervensi farmakologi, sangat penting untuk mengetahui perubahan metabolik di dalam jaringan sendi pada level selular dan molekular pada fase akut pasca trauma dan periode tanpa gejala pada fase kronik dengan perubahan struktur osteoarthritis minimal. Perubahan-perubahan yang terjadi pada awal PTOA meliputi mekanobiologi, selular, dan biologi molekular.^{12,26,27}



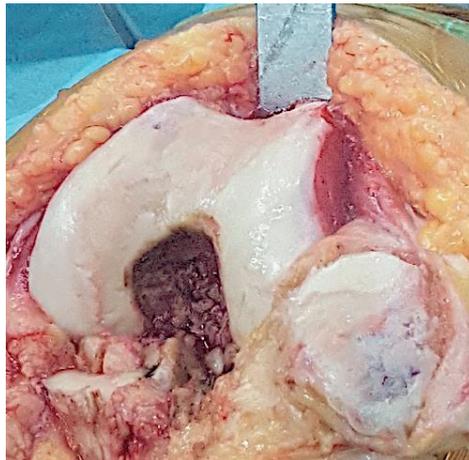
Gambar 3.7 Beban abnormal akan mengaktifkan mekanoreseptor kondrosit dan jalur katabolik, menimbulkan degradasi kartilago melalui siklus *mechanoreceptor-MMP-ECM breakdown*.²⁶



Gambar 3.8 Mekanisme patogenesis terjadinya PTOA. Walaupun perubahan patologi awal bervariasi tergantung dari kerusakan jaringan spesifik sendi, perubahan ini akhirnya akan menimbulkan degradasi kartilago articular dan destruksi sendi. Sinovium dan kartilago articular bisa saling berinteraksi melalui mediator-mediator spesifik pada cairan sinovial yang disekresi oleh kondrosit dan sinoviosit.²⁶



Gambar 3.9 Radiografi berbagai *grade* PTOA pasca rekonstruksi ACL.²⁷



Gambar 3.10 Osteoarthritis degeneratif (dokumentasi pribadi).

TENDON DAN LIGAMENTUM

Tendinopati merupakan kondisi kelemahan tendon dan ligamentum yang akan menimbulkan nyeri signifikan, kecacatan, dan kehilangan hari kerja serat produktivitas pasien. Spektrum penyakit ini meliputi ruptur pada bagian tengah tendon dan ligamentum, pada daerah hubungan tendon ke tulang, dan hubungan otot ke tendon. Trauma ini bisa terjadi akut (laserasi atau trauma olahraga) atau setelah terjadi degenerasi kronis tendinitis, tendinosis atau penggunaan yang berlebihan). Setiap disrupsi fungsi tendon dan ligamentum akan menyebabkan menurunnya kemampuan menyalurkan beban dari otot ke tulang, mengurangi gerakan dan melemahkan fungsi sendi.²⁸

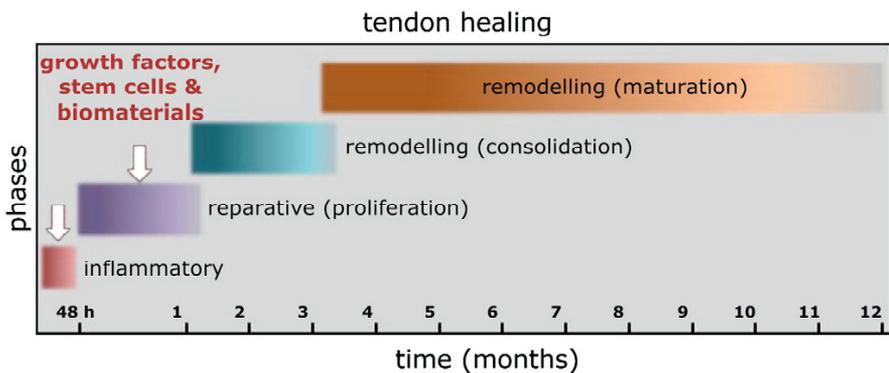
Biologi Tendon dan Penyembuhan Intrasinovial versus Ekstrasinovial

Tendon intrasinovial merupakan tendon atau sebagian dari tendon terbungkus di dalam selubung sinovial yang berisi cairan sinovial sebagai pelicin. Struktur yang unik ini secara efektif menurunkan gesekan, mengurangi abrasi, dan menghindari keausan. Tendon fleksor pada zona II tangan merupakan tendon intrasinovial yang khas. Tendon ekstrasinovial tidak memiliki mekanisme pelicin. Tendon ekstrasinovial meliputi tendon asiles dan patella.

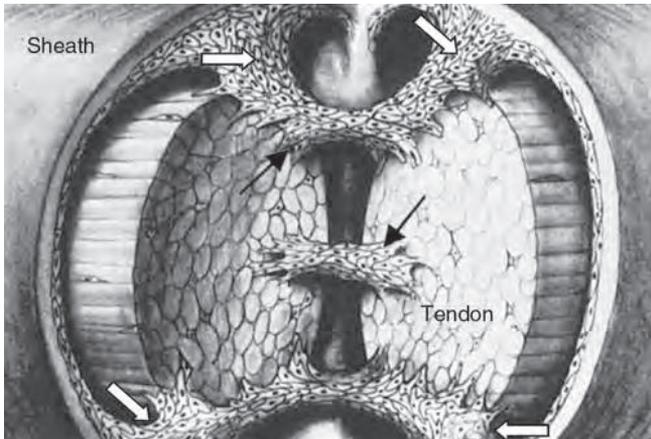
Penelitian terakhir memberikan pemahaman lebih baik tentang respons reparasi tendon fleksor intrasinovial. Penyembuhan tendon seperti cedera pada jaringan lainnya memiliki tiga fase penyembuhan, yaitu inflamasi, proliferasi, dan *remodelling*. Setelah terjadinya transeksi dan reparasi tendon, terbentuk bekuan darah di antara ujung tendon dan ruangan di antara permukaan luncur dan selubung tendon. Elemen-elemen selular di dalam bekuan darah melepas faktor-faktor pertumbuhan yang menginduksi perekrutan netrofil-netrofil dengan monosit serta makrofag untuk membersihkan material nekrosis dan sel-sel apoptosis. Respons inflamasi awal ini beberapa hari kemudian diikuti fase proliferasi penyembuhan tendon, beberapa faktor pertumbuhan terlibat dalam fase ini seperti *transforming growth factor-β* (TGF-β), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Karena tendon fleksor hipovaskular dan hiposelular, fase proliferasi bisa mencapai 6 minggu. Selama fase proliferasi dan awal fase reparatif, fibroblas migrasi ke daerah trauma dan mensintesis kolagen tipe 1, membentuk matriks jaringan granulasi *immature*.

Hari ke-17, pembuluh darah intrinsik pertama sekali sampai ke daerah reparasi, memanjang 3 cm melalui zona avaskular tendon. Fase *remodelling*, yang dimulai tiga minggu setelah reparasi, merupakan fase yang penting untuk fungsi regenerasi jaringan. Pada fase ini faktor-faktor seperti *matrix metalloproteinases* dan beban mekanik akan menurunkan proliferasi dan meningkatkan sintesis kolagen. Kolagen akan tersusun sepanjang arah gaya tarik otot dan permukaan lurus terbentuk yang memungkinkan tendon meluncur (*gliding*).

Tendon fleksor sembuh melalui mekanisme intrinsik dan ekstrinsik. Penyembuhan intrinsik tergantung pada proliferasi dan migrasi sel-sel di dalam tendon yang mengalami trauma untuk menjembatani laserasi tendon secara langsung. Karena sel-sel endotenon memiliki kapabilitas terbatas dalam proliferasi dan diferensiasi, keterlibatan sel-sel dari permukaan tendon (sel-sel epitenon) merupakan hal yang kritikal pada penyembuhan intrinsik. Kontras dengan penyembuhan intrinsik, penyembuhan ekstrinsik tergantung pada invasi sel-sel di sekitar jaringan untuk menjembatani tendon secara bersama-sama. Oleh karena itu, penyembuhan ekstrinsik mengakibatkan terbentuknya perlekatan antara tendon dengan jaringan di sekitarnya dan akan mengganggu peluncuran (*gliding*) tendon. Pada tendon fleksor penyembuhan ekstrinsik lebih cepat dan lebih banyak produk matriksnya dibanding dengan penyembuhan intrinsik sebab jaringan lunak di sekitar tendon lebih kaya pembuluh darah dan mengandung lebih banyak sel.



Gambar 3.11 Proses reparasi tendon pada manusia. Penyembuhan ruptur tendon melalui tiga fase utama yang berisi kaskade sel dan molekular tersendiri.²⁹



Gambar 3.12 Penyembuhan tendon intrasinovial terutama melalui infiltrasi fibroblas dari sisi luar dan dalam permukaan tendon (panah hitam). Perlekatan terbentuk antara permukaan luar tendon dan selubung tendon (panah putih) bisa membatasi ekskursi tendon.²⁸

Proses penyembuhan tendon ekstrasinovial sama dengan tendon intrasinovial. Karena kemampuan meluncur tendon ekstrasinovial umumnya tidak begitu penting dibandingkan tendon intrasinovial, penyembuhan ekstrinsik bisa menambah kekuatan reparasi tendon ekstrasinovial tanpa menimbulkan efek negatif pada gerakan sendi. Waktu penyembuhan juga lebih cepat pada ekstrasinovial tendon dibanding intrasinovial tendon, hal ini disebabkan lebih banyak vaskularisasi, selularitas, dan kemampuan proliferasi. Pada ligamentum krusiatum anterior, cairan sinovial bisa mengurangi kemampuan fibroblas tendon intrasinovial mendukung penyembuhan dibandingkan fibroblas tendon ekstrasinovial.

Penyembuhan bagian tengah tendon (*midsubstance*) versus daerah hubungan tendon ke tulang. Reparasi fungsional pada beberapa tendinopati (seperti ruptur tendon asiles, robekan kronis *rotator cuff* dan avulsi tendon fleksor) berbeda antara bagian tengah tendon dengan daerah melekatnya tendon ke tulang. Penelitian pada model hewan coba menunjukkan penyembuhan tendon ke tulang membentuk jaringan ikat fibrovaskular daripada regenerasi transisi fibrokartilagenos. Dampaknya, struktur, komposisi, sifat mekanikal penyembuhan tendon, dan insersi pada tulang tidak menyerupai jaringan normal,

bahkan dengan penelitian yang waktunya panjang. Pada model *rotator cuff* tikus, perbaikan struktural mencapai 66% dari normal setelah 8 minggu penyembuhan sifat material (kualitas jaringan) masih sangat rendah dibandingkan jaringan normal. Jaringan yang terbentuk diameternya lebih besar daripada jaringan normal tetapi disorientasi organisasi serabut kolagen tanpa terbentuknya kembali zona transisi fibrokartilagenos. Penelitian pada reparasi tendon fleksor ke distal falang anjing menunjukkan penyembuhan pada tempat insersi hanya terjadi perbaikan minimal dan mengalami ruptur 42 hari setelah reparasi. Pada semua model hewan, semua penyembuhan tidak terbentuk jaringan transisi fibrokartilagenos dan yang terbentuk adalah jaringan parut fibrosa. Hal ini kontras dengan penyembuhan pada daerah tengah tendon yang hanya membutuhkan serabut-serabut kolagen yang tersusun baik agar bisa mengembalikan fungsinya.²⁸

Hilangnya tulang setelah trauma merupakan komplikasi lanjut reparasi tendon ke tulang. Menurunnya densitas mineral tulang terlihat pada humerus pasien 9 tahun setelah ruptur *rotator cuff* dan reparasi. Perubahan ini terjadi hanya pada pasien yang fungsinya tidak kembali sepenuhnya, menunjukkan kehilangan tulang akibat berkurangnya beban pada sendi. Kehilangan tulang yang signifikan juga terlihat pada model tendon fleksor anjing. Menurunnya densitas mineral tulang terlihat pada distal falang hari ke-10, 21, dan 42 setelah trauma dan reparasi, menunjukkan bahwa respsi tulang merupakan faktor kontribusi pada kegagalan kekuatan di tempat reparasi. Keterlambatan antara trauma dan reparasi akan menyebabkan penyembuhan tendon ke tulang yang inferior, akibat menurunnya densitas tulang.

Cedera akut versus tendinopati kronis. Tendinopati dikategorikan menjadi cedera akut dan kronis. Pendekatan terapi tendinopati tergantung pada patogenesis cedera. Cedera akut biasanya merupakan laserasi tajam (seperti laserasi pada tendon fleksor intrasinovial) atau trauma olahraga (seperti ruptur tendon *achilles*). Cedera kronik (seperti robekan *rotator cuff*) terjadi setelah degenerasi yang timbul beberapa tahun sebelumnya, degenerasi ini bisa terjadi karena beberapa faktor etiologis intrinsik, ekstrinsik, dan pemakaian berlebihan (*overuse*). Faktor-faktor intrinsik meliputi beban tendon yang berlebihan, degenerasi intrinsik atau gangguan lain. Faktor-faktor intrinsik meliputi kerusakan karena kompresi dari jaringan sekitarnya (degenerasi *rotator cuff* akibat *impingement* tendon di bawah arkus korakoakromial). Beban yang berlebihan juga bisa menimbulkan akumulasi kerusakan mikro dan degenerasi pada tendon.

Cedera akut memiliki prognosis lebih baik daripada cedera kronis. Pendekatan terapi dilakukan dengan reparasi jahitan yang kuat. Kemampuan untuk kembalinya kekuatan setelah reparasi dengan jahitan sangat baik pada cedera tendon akut dalam beberapa minggu setelah pembedahan. Sebaliknya, pada trauma kronis sering terjadi problem. Pada *rotator cuff*, keberhasilan reparasi setelah pembedahan tergantung pada beberapa faktor meliputi kronisitas dari cedera.

Rekayasa Jaringan

Seperti telah diuraikan secara singkat pada pendahuluan Rekayasa Jaringan (*Tissue Engineering-TE*) adalah ilmu yang menggunakan kombinasi sel-sel hidup, biomaterial yang kompatibel sebagai struktur (*scaffold*) dan biokimia (misalnya, *growth factors*) serta kondisi fisik (misalnya, *cyclic mechanical loading*) yang sesuai untuk membentuk struktur jaringan atau organ yang normal.³ Tujuan rekayasa jaringan adalah mengembangkan pengganti organ dan jaringan untuk memelihara, memperbaiki, dan memperkuat fungsi organ dan jaringan yang rusak akibat trauma atau penyakit.

Sebagian besar rekayasa jaringan menggunakan sel-sel hidup dan menyediakan sel-sel dalam jumlah yang cukup merupakan hal yang sangat penting. Sel-sel bisa berasal dari jaringan donor yang ketersediaannya sangat terbatas atau dari sel punca serta sel progenitor. Sel punca memiliki dua sifat utama, yaitu kemampuannya berproliferasi dan diferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Penggunaan sel punca embrionik memiliki dampak etik dan di beberapa negara, termasuk Indonesia, tidak diizinkan. Perkembangan yang pesat penelitian dan penggunaan sel punca dewasa, sel-sel IPs (*induced pluripotent stem cells*), sel

punca plasenta, dan darah tali pusar merupakan sumber utama sel punca untuk menggantikan sel punca embrionik.

Kebutuhan kunci dalam menentukan efektivitas rekayasa jaringan adalah lingkungan selular yang memungkinkan sel-sel untuk berfungsi seperti di jaringan aslinya. Kemiripan lingkungan mikro menjadi aspek yang kritis pada penggunaan *in vivo* dan dilakukan dengan kontrol material, mekanikal, lingkungan kimiawi yang sesuai. *Scaffold* atau biomaterial yang digunakan pada rekayasa jaringan memiliki peran sebagai:

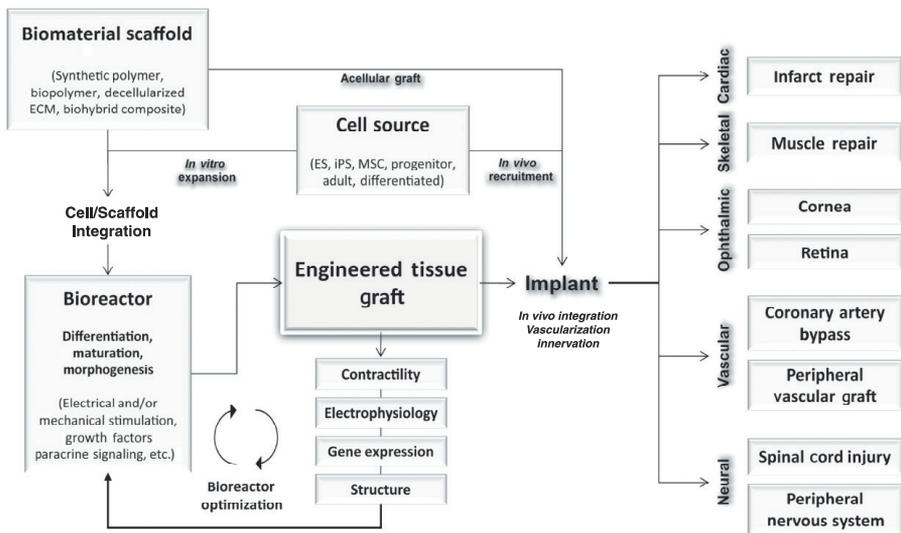
1. tempat melekatnya sel dan juga migrasi;
2. mengumpulkan dan menyediakan faktor-faktor biokimia;
3. lingkungan berpori untuk difusi nutrisi, produksi protein, dan pembuangan sampah; dan
4. secara mekanik bersifat kaku atau fleksibel tergantung kebutuhan.

Banyak biomaterial sintetis telah digunakan dalam rekayasa jaringan, terutama dengan bahan dasar material kolagen dan keluarga polimer seperti polilaktik, poliglolikolik, dan polikaprolakton, telah banyak dikenal dalam komunitas medis, digunakan sebagai benang jahit yang dapat diserap. Pada awalnya material sangat atraktif karena telah mendapat registrasi dari regulator, tetapi mereka masih jauh dari optimal untuk penggunaan pada rekayasa jaringan, terutama karena biodegradasi hidrolisis akan melepaskan asam yang toksik terhadap sel-sel.³⁰

Scaffolds natural menggunakan matriks ekstraselular (*extracellular matrix* - ECM) yang sudah tersedia telah digunakan secara ekstensif, meliputi material dengan bahan dasar protein (seperti kolagen dan fibrin) material-material dengan bahan dasar polisakarida (seperti kitosan, alginate, glikosaminoglikan, dan asam hialuronik). Bahan *cross-linking* (*glutaraldehyde*, *water-soluble carbodiimide*) bisa digunakan pada material ini untuk mengurangi laju degradasi. Walaupun biokompatibilitas material natural sangat baik, masih ada isu pada beberapa kasus tentang potensi imunogenik. Dewasa ini penggunaan matriks jaringan yang telah dideselularasi dari jaringan donor jenazah mulai menarik perhatian. Pendekatan untuk membuat *scaffold* rekayasa jaringan dengan teknik di atas telah menghasilkan beberapa keberhasilan seperti pada transplantasi total trakea dan sekarang berkembang dengan pesat pada jantung, hati, dan paru-paru.³⁰

Faktor lain yang juga diperlukan dalam konstruksi rekayasa jaringan adalah adanya stimulus kimiawi dan mekanikal seperti faktor-faktor pertumbuhan dan diferensiasi yang terlarut begitu juga gaya mekanik (beban mekanik siklik, *fluid shear*). Di antara faktor-faktor kimiawi yang banyak dan telah digunakan adalah *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *basic fibroblast growth factor* (bFGF or FGF-2), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan *transforming growth factor-β* (TGF-β). Walaupun molekul di atas merupakan protein yang terlarut, mereka bisa bergabung ke dalam ECM. Salah satu fungsi kunci nonstruktural ECM natural *in vivo* adalah kemampuannya untuk mengikat, menahan, dan menyediakan faktor-faktor pertumbuhan untuk melekatnya sel ke ECM.^{3,30,31}

Engineered tissue graft adalah kombinasi antara material dan sel-sel secara struktur diorganisasi seperti jaringan *in vivo* untuk memperbaiki bentuk dan fungsi organ. *Scaffold* baik sintetik maupun natural dimanipulasi untuk mengontrol struktur, komposisi, mekanikal, dan/atau sifat degradasi. Tiga strategi dasar untuk membuat *engineered tissue graft*, pertama, implantasi *scaffold in vivo* yang merekrut sel-sel endogen dari tuan rumah; kedua, integrasi sel ke dalam *scaffold in vitro* sebelum diimplantasikan, dan ketiga, kombinasi keduanya.³²



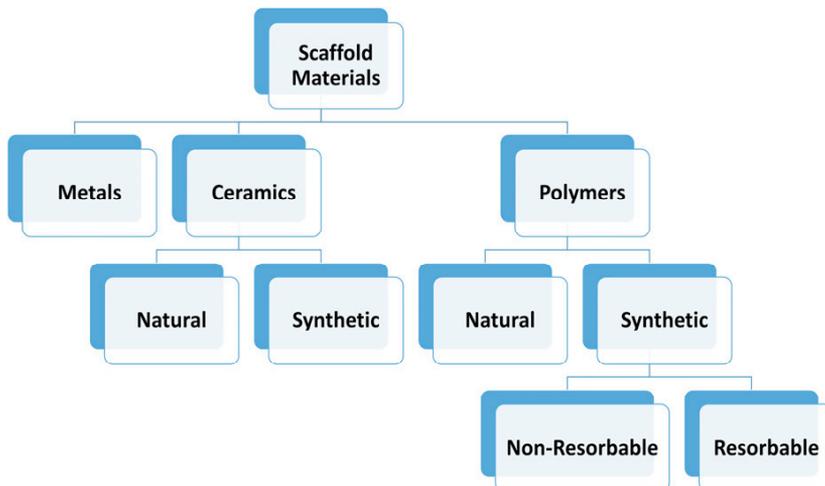
Gambar 4.1 Skema pendekatan dasar untuk membuat *engineered tissue graft* untuk aplikasi kedokteran regeneratif.³²

BIOMATERIAL/SCAFFOLD

Definisi biomaterial oleh *European Society for Biomaterials* (ESB) adalah material yang ditujukan untuk berhubungan dengan sistem biologi untuk evaluasi, terapi, memperkuat atau mengganti jaringan, organ atau fungsi tubuh (*material intended to interface with biological systems to evaluate, treat, augment or replace any tissue, organ or function of the body*). Kegunaan biomaterial bergeser dari yang tadinya hanya untuk berinteraksi dengan tubuh menjadi memengaruhi proses biologi ke arah tujuan dari rekayasa jaringan.⁷

Scaffold untuk rekayasa jaringan dibagi dalam tiga kelas, yaitu metal, keramik, dan polimer. Lebih lanjut lagi menurut sumbernya dibagi menjadi natural dan sintetik, menurut kemampuan degradasi dibagi menjadi dapat degradasi dan non-degradasi.

Setiap kelompok biomaterial memiliki keuntungan dan mungkin juga kekurangan sehingga kombinasi *scaffold* dari beberapa jenis biomaterial saat ini makin sering dilakukan. *Scaffold* keramik walaupun tidak digunakan untuk regenerasi jaringan lunak, tetapi digunakan secara luas untuk regenerasi tulang. Contoh keramik ini adalah mineral hidroksiapatit (HA) dan trikalsium fosfat (TCP).³⁴ Karakter keramik *scaffold* adalah memiliki kekakuan mekanik yang tinggi (*Young's modulus*), sangat tidak elastis, dan memiliki permukaan keras yang rapuh.



Gambar 4.2 Berbagai tipe *scaffold*, sumber, dan sifat degradasinya.³³

Pada tulang, keramik menunjukkan biokompatibilitas yang sangat baik karena komposisi kimia dan struktur memiliki kesamaan dengan fase mineral tulang asli. Interaksi antara sel-sel osteogenik dengan keramik sangat penting untuk regenerasi tulang karena keramik diketahui bisa meningkatkan diferensiasi dan proliferasi osteoblas.³⁵ Berbagai jenis keramik telah digunakan pada kedokteran gigi dan bedah ortopedi untuk mengisi defek tulang juga sebagai pelapis permukaan implan metal untuk meningkatkan integrasi dengan tulang tuan rumah. Tetapi penggunaan aplikasi klinis keramik untuk rekayasa jaringan terbatas hanya pada tulang karena kerapuhannya, sulit untuk dibentuk dan tulang baru yang terbentuk tidak dapat menahan tekanan mekanik dan memerlukan *remodelling* tulang. Hidroksiapatit merupakan komponen primer dari tulang sehingga ideal digunakan untuk bahan pengganti tulang (*bone graft substitute*).^{7,34}

Berbagai polimer sintetik telah digunakan dalam penelitian untuk menghasilkan *scaffold* meliputi *polystyrene*, *poly-l-lactic acid* (PLLA), *polyglycolic acid* (PGA), dan *poly-lactic-co-glycolic acid* (PLGA). Material ini cukup berhasil karena dapat difabrikasi dengan arsitektur tertentu dan karakter degradasi dapat dikontrol dengan berbagai sifat polimer atau komposisi dari polimer, tetapi polimer memiliki kelemahan meliputi risiko reaksi penolakan karena bioaktivitasnya yang kurang baik. Tambahan lagi adalah produk proses degradasi dari PLLA dan PGA yang didegradasi dengan proses hidrolisis, menghasilkan karbondioksida sehingga akan menurunkan pH lokal yang bisa mengakibatkan nekrosis jaringan dan sel.^{4,7}

Biomaterial berikutnya yang sering digunakan sebagai *scaffold* adalah material biologis. Material biologis seperti kolagen, berbagai jenis proteoglikan, substrat dari alginat dan kitosan semuanya telah digunakan dalam produksi *scaffold* untuk rekayasa jaringan. Tidak seperti *scaffold* yang berasal dari polimer sintetik, polimer natural secara biologi bersifat aktif dan memfasilitasi perlekatan dan pertumbuhan sel. Lebih lanjut lagi material biologi memiliki sifat biodegradasi dan memungkinkan sel tuan rumah untuk memproduksi matriks ekstraselular untuk menggantikan *scaffold* yang mengalami degradasi. Tantangan dari *scaffold* yang berasal dari material biologis adalah fabrikasi untuk mendapatkan produk yang homogen dan dapat direproduksi, selain itu *scaffold* ini memiliki sifat mekanik yang lemah, sehingga ada keterbatasan dalam penggunaannya, misal pada daerah yang menerima beban pada aplikasi di bidang ortopedi.^{4,7}

Problem yang diuraikan di atas terjadi bila menggunakan *scaffold* yang difabrikasi dari biomaterial fase tunggal. Karena sekarang banyak penelitian yang

mengembangkan biomaterial yang terdiri dari beberapa fase yang merupakan kombinasi dari berbagai jenis biomaterial, misalnya kombinasi *scaffold* polimer dengan keramik, sementara peneliti lain mengembangkan kombinasi sintetik polimer dengan polimer natural. Komposit *scaffolds* ini memberikan harapan, tidak seperti biomaterial fase tunggal yang menjadi benda asing di tubuh dan menimbulkan problem biokompatibilitas, biodegradasi atau keduanya.⁷

Persyaratan Scaffolds

Berbagai *scaffolds* yang diproduksi dari berbagai jenis biomaterial dan difabrikasi dengan berbagai macam teknik telah digunakan untuk mencoba melakukan regenerasi berbagai jenis jaringan serta organ tubuh. Dari manapun sumber *scaffold*, beberapa pertimbangan kunci perlu dilakukan saat merancang dan menentukan kesesuaian *scaffold* yang digunakan untuk rekayasa jaringan.^{7,34}

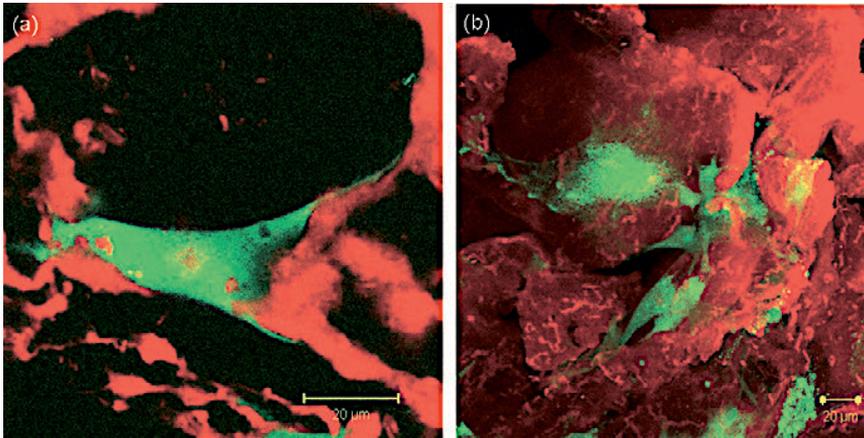
Biokompatibilitas. Kriteria pertama yang paling penting pada setiap *scaffold* yang digunakan untuk rekayasa jaringan adalah *scaffold* harus kompatibel, sel-sel harus bisa melekat, berfungsi normal, migrasi pada permukaan sel ke dalam *scaffold* dan mulai proliferasi serta akhirnya memproduksi dan meletakkan matriks jaringan baru ke dalam *scaffold*. Setelah implantasi, konstruksi *scaffold* atau rekayasa jaringan harus tidak atau minimal menimbulkan reaksi imun untuk mencegah respons inflamasi yang dapat menimbulkan kegagalan penyembuhan atau menimbulkan reaksi penolakan tubuh.

Biodegradabilitas. Tujuan dari rekayasa jaringan adalah untuk memungkinkan sel tubuh, dengan berjalannya waktu, akhirnya bisa menggantikan konstruksi *scaffold* atau rekayasa jaringan. *Scaffold* dan konstruksi tidak ditujukan sebagai implan permanen. *Scaffold* harus bisa mengalami proses degradasi sehingga memungkinkan sel untuk memproduksi ekstraselular matriksnya sendiri. Degradasi produk seharusnya juga tidak toksik dan bisa dikeluarkan tubuh tanpa mengganggu fungsi organ. Agar degradasi bisa terjadi sejalan dengan formasi jaringan baru, dibutuhkan respons inflamasi dikombinasi dan respons sel seperti makrofag yang terkontrol. Saat ini strategi rekayasa jaringan mulai banyak digunakan dalam praktik klinik, oleh karena itu bidang imunologi memainkan peranan penting.

Sifat Mekanikal. Idealnya, sifat mekanik *scaffold* sama dengan sifat mekanik tempat *scaffold* diimplantasikan pada tubuh manusia. *Scaffold* harus cukup kuat

sehingga memungkinkan ditangani saat pembedahan untuk implantasi. Sifat mekanik penting pada semua jaringan dan menjadi tantangan pada aplikasi ortopedi dan kardiovaskular, walaupun pada beberapa kasus tertentu hal ini tidak terlalu penting misalnya bila *scaffold* digunakan sebagai pengisi (*filler*). Membuat *scaffold* dengan kekuatan mekanik yang adekuat merupakan tantangan besar pada rekayasa tulang dan kartilago. Pada jaringan ini, *scaffold* yang diimplantasikan harus memiliki kekuatan mekanik yang cukup mulai dari saat implantasi sampai proses *remodelling* terjadi secara komplit. Tantangan lainnya adalah masa penyembuhan yang bervariasi sesuai dengan usia, pada pasien muda normalnya penyembuhan fraktur sampai mulai bisa menerima beban bertahap (*weight-bearing*) lebih kurang 6 minggu, dan kekuatan mekanik komplit lebih kurang 1 tahun, pada pasien tua waktu penyembuhan memanjang. Kondisi ini harus diperhatikan dalam merancang *scaffold* untuk ortopedi dengan fokus untuk mengembangkan *scaffold* dengan sifat mekanik sama dengan tulang atau kartilago. Beberapa material telah dibuat dengan sifat mekanik yang baik, tetapi terbentur dengan porositas material, material yang kuat umumnya memiliki porositas yang kecil sehingga bisa menimbulkan kegagalan saat implantasi karena vaskularisasi yang tidak baik. Keseimbangan antara kekuatan mekanik dengan arsitektur porous yang cukup merupakan kunci sukses pada beberapa *scaffold*.

Arsitektur Scaffold. Merupakan faktor yang penting pada rekayasa jaringan. *Scaffold* harus memiliki interkoneksi pori dan pori-pori yang cukup besar agar penetrasi sel dan difusi nutrisi ke sel di dalamnya adekuat dan juga cukup ruang untuk sel memproduksi dan meletakkan ekstraselular matriks. Struktur interkoneksi pori juga dibutuhkan untuk difusi produk sampah keluar dari *scaffold*, dan produk hasil degradasi *scaffold* harus bisa keluar dari tubuh tanpa mengganggu jaringan dan organ di sekitarnya. Topik tentang degradasi pada bagian inti dari *scaffold* menjadi perhatian besar karena kurangnya vaskularisasi dan pengambilan sampah metabolit dari bagian tengah konstruksi. Komponen kunci lainnya adalah rata-rata besaran pori-pori. Sel berinteraksi dengan *scaffold* terutama melalui grup kimia (*ligands*) pada permukaan material. *Scaffold* yang disintesis dari natural ekstraselular matriks memiliki *ligand* dalam bentuk *Arg-Gly-Asp* (RGD) *binding sequences*, sedangkan *scaffold* dari material sintetik membutuhkan inkorporasi yang dirancang dengan *ligand* melalui misalnya absorpsi protein. Kepadatan *ligand* dipengaruhi oleh area spesifik pada permukaan, yaitu permukaan yang tersedia di dalam pori-pori tempat sel akan melekat. Hal ini tergantung pada rata-rata



Gambar 4.3 Mikroskop konvokal memperlihatkan sel-sel osteoblas (hijau) melekat pada *scaffold* kolagen-GAG berpori (merah). Mekanisme melekatnya sel ke biomaterial dan *scaffold* untuk rekayasa jaringan merupakan kunci sukses rekayasa jaringan.⁷

besar pori-pori pada *scaffold*. Pori-pori harus cukup besar untuk memungkinkan sel migrasi ke dalam struktur, sehingga sel akhirnya akan berikatan dengan *ligand* di dalam *scaffold*, tetapi pori-pori harus cukup kecil agar permukaan cukup spesifik, yang mengarah pada minimal kepadatan *ligand* agar jumlah sel yang terikat efisien (tidak terlalu banyak atau terlalu sedikit). Oleh karena itu, pada berbagai *scaffold* pori-pori merupakan hal yang penting, tergantung jenis sel dan jaringan yang akan diregenerasi.

Teknologi Manufaktur. Agar *scaffold* atau konstruksi rekayasa jaringan bisa sampai menjadi produk komersial, maka produk tersebut harus *cost effective* dan dimungkinkan untuk dibuat dalam skala besar, yang awalnya dibuat dalam skala kecil laboratorium untuk riset pengembangan. Pengembangan proses manufaktur skala besar dengan standar *good manufacturing practice* (GMP) sangat penting untuk menjamin suksesnya penelitian translasional rekayasa jaringan hingga ke aplikasi klinis. Faktor lain adalah bagaimana produk rekayasa jaringan dapat dikirim dan tersedia bagi para dokter. Hal ini ditentukan oleh bagaimana konstruksi rekayasa jaringan atau *scaffold* disimpan. Para dokter lebih memilih ketersediaan *off-the-shelf* (siap pakai) tanpa prosedur ekstra untuk mengambil sel beberapa minggu untuk kultur *in vitro* sebelum implantasi. Tetapi pada sebagian

besar jaringan prosedur ini tidak mungkin dilakukan dan dibutuhkan rekayasa *in vitro* sebelum implantasi.

Sumber Scaffold

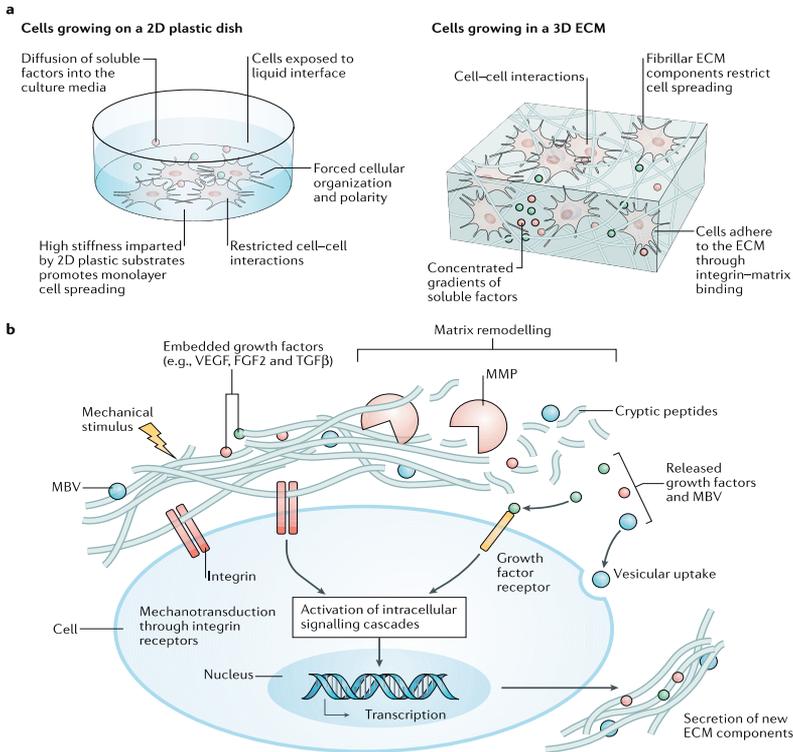
Secara umum *scaffold* bisa berasal dari alam (natural) dan juga bisa dibuat dari bahan sintetis. Masing-masing bahan memiliki kelebihan dan kekurangan.

Scaffold Natural

Kemampuan membentuk jaringan dan organ fungsional untuk mengganti kerusakan akibat penyakit telah berkembang dengan pesat. Ahli biologi sel telah melakukan isolasi dan kultur sel dari jaringan hidup sejak awal abad 20, kultur sel-sel monolayer ini memiliki konfigurasi dua dimensi. Organisme multiselular membutuhkan kerangka tiga dimensi tidak hanya memberikan integritas struktural untuk organisme tetapi juga jaringan fungsional dengan lingkungan mikro spesifik. Oleh karena itu, pada rekayasa jaringan dan organ sangat diperlukan integrasi prinsip-prinsip sel biologi dengan ilmu material dan menumbuhkan sel-sel dan jaringan dalam lingkungan tiga dimensi. Perkembangan yang pesat pada rekayasa jaringan dan ilmu kedokteran regeneratif pada dekade terakhir ini ditujukan untuk mengembangkan rancangan biomaterial dengan penekanan pada mekanikal dan sinyal biokimia yang mengarahkan sifat sel, dengan strategi menggunakan kombinasi *scaffold* tiga dimensi yang bisa degradasi sebagai pengganti jaringan.

Langkah kunci proses evolusi multiselular adalah keberadaan kode gen untuk struktural dan molekul fungsional yang disekresi oleh sel-sel dan disusun ke dalam matriks ekstraselular (ECM) 3 dimensi. ECM tidak hanya memberikan sifat fisik *scaffold* untuk memelihara integritas struktural organisme multiselular tetapi juga sebagai tempat penyimpanan sinyal biokimia dan biofisik untuk mendukung kehidupan sel, organisasi, dan diferensiasi.

Diferensiasi dan migrasi akan mengarahkan sel-sel untuk membelah dan berintegrasi ke dalam jaringan dengan fungsi yang berbeda disertai dengan *remodelling* ECM yang dinamis dan kontinu menjadi jaringan 3 dimensi dengan arsitektur dan komposisi yang spesifik. Sel-sel residen dari masing-masing jaringan bertanggung jawab dan responsif terhadap ECM dalam proses yang disebut sebagai *dynamic responsive* atau *bidirectional crosstalk* antar sel dan lingkungan.³⁶



Gambar 4.4 Interaksi sel-ECM dan *remodelling* matriks. **(A)** Substrat plastik dua dimensi (kiri) membatasi perlekatan sel pada bidang datar dan gaya sel-sel ke arah polaritas *apical-basal*, tetapi memungkinkan difusi faktor-faktor sekresi terlarut pada medium kultur. Sebaliknya, pada ECM tiga dimensi (kanan) memungkinkan sel-sel melekat baik pada bidang datar maupun tegak lurus tanpa pembatasan polaritas sel. Serabut-serabut fibril mencegah penyebaran sel dan berkontribusi terhadap terkumpulnya sekresi faktor-faktor pertumbuhan di dalam matriks. **(B)** Sel-sel berinteraksi dengan lingkungannya melalui integrin dan reseptor faktor-faktor pertumbuhan. Sel-sel mengubah stimulus mekanik dari ECM menjadi aktivitas biokimia melalui ikatan dan aktivasi reseptor integrin, menghasilkan aktivasi jalur-jalur sinyal intraselular, aktivasi transkripsi gen dan sintesis serta sekresi komponen ECM. Saat *remodelling* matriks, degradasi proteolisis diinduksi oleh *matrix metalloproteinases* (MMPs), akan melepaskan faktor-faktor pertumbuhan dan *matrix-bound nanovesicles* (MBVs), dan juga produksi *cryptic peptides*. Pelepasan komponen-komponen bioaktif ini bisa berinteraksi dengan sel-sel yang mempromosikan berbagai fungsi sel seperti proliferasi, migrasi, dan diferensiasi. FGF2, *fibroblast growth factor 2*; TGF- β , *transforming growth factor- β* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.³⁶

Sel-sel akan memodifikasi produksi ECM yang disekresi sebagai respons terhadap berbagai stimulus, meliputi sinyal-sinyal mekanik, oksigen, konsentrasi nutrisi, dan faktor-faktor lain yang merupakan bagian dari *niche* lingkungan mikro. Berikutnya ECM akan mengirim sinyal mekanik dan biokimia ke sel-sel residen melalui ikatan dengan reseptor-reseptor permukaan sel, yang selanjutnya mengaktifkan kaskade sinyal intraselular dan terutama ekspresi gen dan fenotip sel. Sintesis dan sekresi molekul-molekul ECM oleh berbagai sel residen berlanjut selama kehidupan baik pada kondisi sehat maupun adanya penyakit, dan mengatur sejumlah proses biologis, meliputi diferensiasi sel punca, *angiogenesis*, invasi, dan penyembuhan luka. Oleh karena secara evolusi komposisinya dan dampaknya terpelihara baik pada perkembangan embriologis dan homeostasis selular dan organ, ECM merupakan material ideal tidak hanya sebagai substrat induksi untuk reparasi kerusakan jaringan di dalam tubuh juga sebagai *scaffold* untuk rekayasa seluruh organ dan jaringan pada penelitian (*benchtop*).^{30,36,37}

Fungsi Matriks

ECM merupakan kerangka fibrosa protein-protein, proteoglikan, dan glikosaminoglikan yang tersusun dalam arsitektur spesifik jaringan tiga dimensi yang menjadi tempat sel-sel dan jaringan yang berfungsi memberikan sinyal topografi, struktur, sifat elastis, medium untuk difusi serta konveksi nutrisi dan oksigen. Selain memiliki struktur dan fungsi mekanik, ECM juga berperan sebagai substrat untuk melekatnya dan migrasi sel serta penyimpanan faktor-faktor pertumbuhan dan morfogen, sehingga membentuk lingkungan mikro lokal spesifik yang berkontribusi terhadap diferensiasi, memelihara fenotip spesifik dan fungsi sel. Sinyal-sinyal mekanik dan biokemikal yang diberikan ECM melalui berbagai reseptor permukaan sel, di antaranya reseptor ECM yang paling banyak diteliti adalah integrin. Interaksi integrin-ECM menjadi pencetus kaskade sinyal intraselular yang akan menghasilkan ekspresi gen-gen untuk regulasi kehidupan, proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis sel. Sebaliknya, sel-sel residen secara konstan memediasi pembentukan dan *remodelling* ECM melalui sintesis, modifikasi biokimia, degradasi, dan melepas molekul-molekul bioaktif juga menyusun komponen-komponen ECM. Proses ini diregulasi secara akurat selama fase embrionik dan perkembangan jaringan, homeostasis, dan penuaan serta untuk respons terhadap trauma. Disregulasi dari proses ini akan mengawali

kondisi-kondisi patologis dan berkembangnya penyakit. Sebagai contoh deposisi ECM yang berlebihan akan menimbulkan fibrosis, degradasi abnormal ECM yang berhubungan dengan disfungsi jantung, osteoarthritis, dan penyakit paru obstruksi kronis.^{30,37}

Komposisi Matriks Ekstraselular (ECM)

ECM secara umum terdiri dari tiga molekul utama yaitu; protein-protein fibrosa (kolagen, elastin, fibrilin dan fibulin), glikoprotein *adhesive* (laminin, fibronectin, tenasin, trombospondin dan integrin), dan glikosamiglikan.

Kolagen, pada tubuh manusia kolagen merupakan protein terbanyak, membentuk 25-30% massa protein total. Kolagen juga merupakan kontributor utama ECM dan terdiri dari keluarga protein yang tidak terlarut. Total terdapat 28 kolagen *isoforms* yang telah teridentifikasi dan semua anggota keluarga kolagen berisi domain *triple-helical*. Menurut domain struktur dan organisasi suprastruktural, keluarga besar kolagen dibagi dalam beberapa sub keluarga berikut.

1. *Fibril-forming collagens (fibrillar collagens)* meliputi kolagen tipe I, II, III, V, XI, XXIV, dan XXVII.
2. *Fibril-associated and fibril-associated-like collagens* dengan *triple helix* terinterupsi meliputi kolagen tipe IX, XII, XIV, XVI, XIX, dan XXII.
3. *Network-forming collagens* meliputi kolagen tipe IV, VI, VII, VIII, dan X.
4. *Transmembrane collagens*, meliputi kolagen tipe XVII, XXIII, XXV, gilomedin, dan ektodisplasin.
5. *Multiplexin collagens* meliputi endostatin tipe XV dan XVIII dan molekul protein lain dengan domain kolagen.

Meskipun sangat bervariasi baik dari sisi molekular dan organisasi supramolekular, setiap kolagen *isoform* bisa menyusun dan deposisi ke dalam superstruktur fungsional kompleks dengan makromolekul non kolagen lainnya. Dengan jalan ini, kolagen menyusun arsitektur molekular dan sifat mekanikal ECM dan berpartisipasi dalam memelihara kekuatan, fleksibilitas, dan homeostasis tubuh.^{30,37}

Elastin. Merupakan makromolekul yang bertanggung jawab terhadap sifat elastik ECM dan diproduksi serta disekresi sebagai prekursor monomer protein

60-70 kDa (tropoelastin) oleh berbagai sel seperti fibroblas, endotelial, sel-sel otot, kondrosit, dan keratinosit. Pada tahap pertama elastogenesis, molekul-molekul tropoelastin beragregasi melalui proses *self association (coacervation)* pada permukaan sel untuk membentuk *protein-dense spherules*, kemudian *cross-linking monomer* akan mengurangi peregangan, meningkatkan integritas struktural jaringan dan akan membentuk struktur elastin *mature*. Elastin *mature*, bersama-sama fibrilin, fibulin, kolagen tipe VIII, emilin, dan protein-protein lain menyusun dan membentuk seluruh struktur menjadi serabut elastik yang tumbuh dan berkembang. Elastin berkontribusi terhadap elastisitas, mengisi dan sifat lentur ECM, memberikan integritas mekanikal pada jaringan dan regulasi perilaku sel.

Fibrilin. Selain elastin, fibrilin merupakan salah satu unsur utama serabut elastik. Unsur pembentuk fibrilin secara struktur berhubungan dengan keluarga glikoprotein yang melibatkan *latent TGF-binding proteins* dan fibulin. Terdapat 4 *isoform* keluarga fibrilin di antaranya fibrilin-1, fibrilin-2, fibrilin-3, dan fibrilin-4, berisi *repeating calcium-binding epidermal growth factor-like domains interspersed between unique 8-cysteine domains*. Di antara 4 isoform tersebut, fibrilin-1, glikoprotein besar disekresi oleh fibroblas dengan berat molekul 350kDa, merupakan yang terbanyak. Fibrilin-1 juga berperan penting dalam pembentukan serabut-serabut elastik. Polimerisasi monomer fibrilin-1 dalam pola *head-to-tail* dan tersusun dengan sendirinya ke dalam kerangka struktural serabut mikro ekstraselular, yang berfungsi sebagai *scaffold* dan memberi integritas struktural dan mekanikal. *Scaffold* serabut mikro selanjutnya ditambah dengan elastin amorfos untuk membentuk serabut-serabut tiga dimensi. Serabut elastik berhubungan satu dengan lainnya, membentuk jaringan *lamellae* berpori yang berperan dalam peregangan dan/atau kemampuan membengkok (*bending*) ECM.^{30,37}

Fibulin. Merupakan keluarga glikoprotein yang disekresi dan terikat erat dengan membran basalis, serabut elastin, dan komponen ECM lainnya. Keluarga fibulin terdiri 7 anggota. Semua anggota keluarga, kecuali fibulin-6 dan fibulin-7 diekspresikan dalam jaringan elastin. Semua keluarga fibulin memiliki *homologous carboxy-terminal fibulin-type domains of 120-140 amino acid residues* dan *tandem repeats of epidermal growth factor-like domains*, sementara itu setiap anggota keluarga fibulin memiliki sejumlah domain *epidermal growth factor-like* berbeda. Domain

epidermal growth factor-like berisi berbagai tempat melekatnya protein. Melalui ikatan langsung fibulin berinteraksi dengan tropoelastin, fibrilin, fibronectin, proteoglikan, dan beberapa protein membran basalis, oleh karena itu berperan penting pada organisasi dan stabilisasi supramolekular struktur ECM, seperti serabut-serabut elastin dan membran basalis. Selain efek ikatan struktural, fibulin juga memengaruhi secara luas proses fisiologi dan patologi seperti pertumbuhan sel, diferensiasi, *angiogenesis*, dan pertumbuhan tumor.

Laminin. Multi-domain, glikoprotein *heterotrimer* terdiri dari rantai α , β , dan γ dihubungkan oleh ikatan disulfida. Pada vertebra terdapat 5 rantai α , 3 rantai β , dan 3 rantai γ . Melalui globular besar laminin *N-terminal domain*, rantai α , β , dan γ berkombinasi dan membentuk 18 isoform laminin, dengan berat molekul berkisar dari 500–800 kDa. Laminin, melalui laminin N-terminal domainnya mengalami polimerasi sendiri membentuk *nascent scaffold*, yang kemudian berpasangan dengan komponen lain seperti kolagen IV, integrin, nidogen, agrin, dan perlekan, membentuk membran basalis. Laminin pada membran basalis menjadi tempat melekatnya substrat untuk homeostasis jaringan. Selama fase berkembangnya organ dan penyembuhan luka, laminin secara aktif memodulasi perilaku sel-sel, regulasi laju proliferasi, diferensiasi, perlekatan dan migrasi sel, mendorong re-epitelisasi dan *angiogenesis* dan memainkan peran penting pada morfogenesis jaringan.

Fibronectin. Fibronectin merupakan multi-domain glikoprotein yang tersebar luas dengan berat molekul 440 kDa. Laminin merupakan *dimer* protein yang disusun oleh dua monomer yang mirip dan diikat oleh pasangan ikatan disulfida pada C-terminus. Berdasarkan perbedaan kelarutannya, fibronectin dibagi dalam 2 kelas; fibronectin terlarut dan tidak terlarut. Fibronectin terlarut diproduksi terutama di dalam hepatosit hati dan terdapat dalam plasma darah. Fibronectin tidak terlarut disekresi oleh berbagai sel seperti sel epitel, sel-sel mesenkimal dan fibroblas, disebut sebagai fibronectin selular. Fibronectin tidak terlarut berisi beberapa fungsi dan domain struktur berbeda yang bisa mengikat permukaan sel serta ECM, mengarahkan penyusunan komponen-komponen ECM, meliputi kolagen I dan III, fibrilin-1, fibulin-1, fibrinogen, trombospodin-1, tenascin-C, dan sitokin-sitokin. Fibronectin berperan signifikan dalam konstruksi dan organisasi ECM dan disebut sebagai *master organizer*. Selain memiliki peran penting dalam organisasi jaringan, fibronectin meningkatkan

kemampuan sel melekat dan menyebar, memengaruhi migrasi sel, dan berdampak pada berbagai proses biologi seperti morfologi selular, organisasi skeletan, fagositosis, hemostasis, diferensiasi embrionik dan penyembuhan luka.

Tenascin. Merupakan keluarga glikoprotein *multimeric* dengan berat molekul 150 dan 380 kDa. Terdapat 4 anggota keluarga tenascin; tenascin-C, tenascin-R, tenascin-X, dan tenascin-W. Berbagai tenascin isoform terdistribusi ke seluruh jaringan dan organ pada setiap fase perkembangan organ. *Isoform-isoform* ini memiliki struktur umum, meliputi *amino-terminal heptad repeats*, *epidermal growth factor-like repeats*, *fibronectin type III domain repeats*, dan *a carboxyl-terminal globular domain* sama dengan di dalam fibrinogen, walaupun pengulangan jumlah berbeda pada berbagai tenascin isoform. Selain berfungsi menjaga sifat mekanikal, tenascin memediasi perlekatan dan penyebaran sel-sel. Terdapat beberapa kontroversi efek tenascin pada beberapa tipe sel atau pada lingkungan mikro yang berbeda. Sebagai contoh tenascin memengaruhi penyebaran *fibronecting-mediated* fibroblas melalui perlekatan langsung ke fibronektin, sehingga pada tumor meningkatkan pertumbuhan-pertumbuhan sel tumor tetapi menekan proliferasi sel normal. Pada trauma jaringan, tenascin menunjukkan efek melepas ikatan dan berpartisipasi dalam reorganisasi dan pemulihan jaringan musklotendinos.

Trombospodin. Merupakan keluarga glikoprotein yang mengikat kalsium, terdiri dari 2 subgrup. Subgrup A berisi 2 *homotrimers*; trombospodin 1 dan trombospodin 2, sementara subgrup B berisi 3 *homopentamers*; trombospodin 3, trombospodin 4, dan trombospodin 5 (disebut juga *cartilage oligomeric matrix protein*). *Isoforms* ini memiliki kesamaan dalam strukturnya. Semua anggota keluarga trombospodin berisi *carboxy-terminal domain* sama dengan *L-type lectin domain*, *calcium-binding type 3 repeats* begitu juga beberapa *epidermal growth factor-like repeats*. Setelah sekresi selular, trombospodin mengikat sejumlah molekul ECM seperti fibrinogen, kolagen fibrillar, kolagen IX, matrilin-3, integrin, dan proteoglikan heparin sulfat. Ikatan trombospodin berfungsi sebagai jembatan molekular untuk memfasilitasi inkorporasi molekul ECM, regulasi organisasi, dan metabolisme ECM, mediasi interaksi sel ke sel dan sel ke matriks dan berefek pada berbagai aktivitas biologis seperti migrasi sel, *angiogenesis*, *remodeling* jaringan dan pertumbuhan tumor.

Integrin. Merupakan glikoprotein *heterodimeric* yang terdiri dari subunit α dan β . Integrin subunit α dan β secara berurutan memiliki *amino-acid long*

polypeptides ~1000 dan ~750. Terdapat 18 subunit α dan β integrin pada mamalia dan subunit ini dengan kombinasi ikatan non-kovalen membentuk 24 anggota keluarga integrin. Integrin melalui ekor sitoplasma melekat pada ECM *ligand* dan berfungsi sebagai penghubung transmembran untuk menjembatani interaksi antara ECM dengan sitoskeleton intraselular. Selain memiliki peran perlekatan, integrin juga berfungsi sebagai sinyal reseptor transduksi untuk mediasi jalur sinyal sel transmembran protein kinase (seperti reseptor tirosin kinase), untuk transduksi sinyal dari matriks ekstraselular ke sel dan memengaruhi pertumbuhan sel, pembelahan, diferensiasi, kehidupan, dan apoptosis. Integrin juga berperan dalam berbagai interaksi biologi, seperti perkembangan jaringan, hemostasis, *angiogenesis*, inflamasi, dan reparasi jaringan.

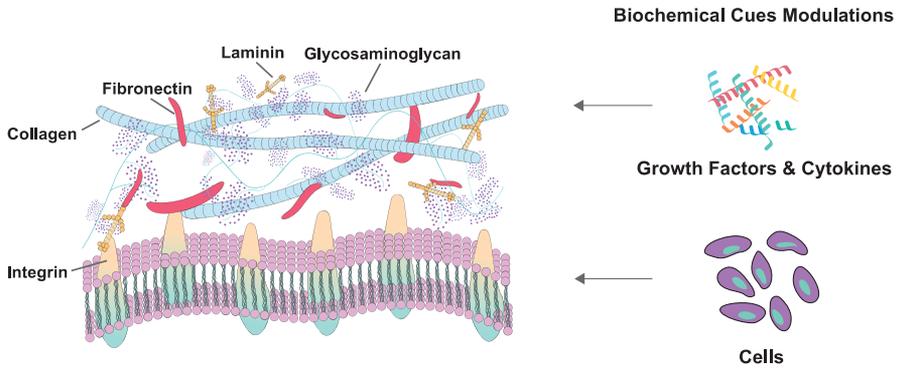
Glikosaminoglikan. Merupakan heteropolisakarida paling banyak di tubuh dan kelas biomolekul utama di dalam ECM. Glikosaminoglikan merupakan polisakarida linier dengan muatan negatif yang tinggi dan terdiri dari unit-unit disakarida gula asam amino (*N-acetyl-D-glucosamine* or *N-acetyl-D-galactosamine*) dan asam uronik (*D-glucuronic* or *L-iduronic acid*). Berdasarkan inti struktur disakarida, glikosaminoglikan bisa diklasifikasikan menjadi heparin/heparan sulfat, kondroitin/dermatan sulfat, keratin sulfat, asam hialuronik, dan dermatan sulfat. Heparin/heparan sulfat diawali oleh komposisi unit-unit *N-acetyl-D-galactosamine* dan *D-glucuronic acid disaccharide*. Kondroitin sulfat disusun oleh *sulfated N-acetyl-D-glucosamine* dan *D-glucuronic acid*. Keratin sulfat disusun oleh rantai *highly sulfated poly-N-acetyllactosamine*. Asam hialuronik disusun oleh *nucleotide-activated sugars*, *UDP- N-acetyl-D-glucosamine*, dan *UDP-D-glucuronic acid*. Dermatan sulfat disusun oleh *N-acetyl-D-glucosamine* dan *GalNAc L-iduronic*.

Mayoritas glikosaminoglikan dengan ikatan kovalen dihubungkan dengan protein inti untuk membentuk proteoglikan (disebut juga sebagai *mucopolysaccharides*), seperti agrekan, brevicin, dekorin, keratikan, lumikan, neurokan, perlekan, sindecan, dan versikan. Glikosaminoglikan dan proteoglikan tidak hanya mengisi ruang kosong pada ECM yang berperan terhadap sifat fisik, tetapi juga berpartisipasi pada interaksi sel ke sel dan sel ke matriks, proliferasi dan migrasi sel, begitu juga penyembuhan luka dan *remodeling* jaringan.

Keuntungan Aplikasi Scaffold ECM pada Rekayasa Jaringan

Konstruksi *scaffold* rekayasa jaringan yang mampu membentuk jaringan artifisial dan organ yang berfungsi merupakan isu paling penting pada rekayasa jaringan dan kedokteran regeneratif. *Scaffold* jaringan yang direkayasa berfungsi memelihara dukungan mekanikal adekuat untuk rekayasa jaringan, inkorporasi dengan sinyal-sinyal biokimia, pertumbuhan sel langsung serta *remodeling* jaringan, dan menyiapkan lingkungan mikro untuk reparasi jaringan dan regenerasi. *Scaffold* yang ideal memerlukan berbagai persyaratan meliputi sifat biomekanik, karakteristik permukaan, biokompatibilitas, biodegradabilitas, dan permeabilitas. Dewasa ini *scaffold* rekayasa jaringan yang terbuat dari biomaterial natural dan biopolimer sintetik telah banyak digunakan karena biomaterial ini menunjukkan sifat fisikokemikal yang optimal. *Scaffold* artifisial memiliki beberapa keterbatasan seperti tidak bisa menyediakan *niche* selular spesifik begitu juga struktur anatominya tidak sesuai dengan target organ dan jaringan. Banyak *scaffold* berbasis biomaterial tidak mampu mengorganisasi integrasi selular dan sinyal molekular. Untungnya penelitian terakhir yang berkembang telah menunjukkan *scaffold* ECM sesuai sebagai alternatif rekayasa jaringan.

Scaffold ECM umumnya berasal dari *allogeneic* dan/atau *xenogeneic* jaringan atau organ dan difabrikasi melalui proses deselularisasi serta proses manufaktur lainnya. *Scaffold* ECM mempertahankan geometri aslinya dan fleksibilitas, memiliki kekuatan mekanikal, dan kelebihan sifat fisik. *Scaffold* ECM dengan struktur dimensi yang utuh juga bisa mengatasi kelemahan *scaffold* sintetik. Sifat kekakuan ECM tidak hanya memberikan penunjang mekanik bagi sel-sel yang dilingkupinya juga berpengaruh pada migrasi sel, perkembangan siklus sel, dan akhir dari perkembangan sel. Selain memainkan peran penting pada mekanotransduksi, komposisi serabut-serabut ECM secara *reversible* bisa berkombinasi dengan faktor-faktor pertumbuhan dan sitokin-sitokin, memiliki efek terhadap aktivitas makrofag dan memediasi migrasi sel serta perekrutannya. Sejumlah protein ECM juga mengikat reseptor sel permukaan melalui integrin dan berefek terhadap serial sinyal selanjutnya. Pada jalur ini ECM akan memberikan sinyal biomekanik dan biokimia untuk pertumbuhan sel dan reparasi jaringan, membentuk *niche* lingkungan mikro natural, membantu mempertahankan dan mendukung tempat yang sesuai untuk fenotip sel sehingga memiliki keuntungan untuk regenerasi jaringan.^{30,37}



Gambar 4.5 Diagram skema scaffolds ECM. Scaffold ECM masih menjadi komponen utama matriks ekstraseluler, menyerupai struktur asli jaringan dan organ target, dan memberikan penunjang fisik dan sinyal biomekanik untuk regenerasi jaringan. Modifikasi konstruksi scaffold ECM dengan sel-sel, faktor-faktor pertumbuhan, dan sitokin-sitokin serta sinyal biokimia akan membentuk konstruksi niche dengan lingkungan mikro alami.³⁷

Seperti telah didiskusikan sebelumnya, *scaffold* yang ideal sebaiknya bisa mengalami degradasi di tubuh sesuai dengan laju pertumbuhan regenerasi jaringan dan produk degradasi diharapkan tidak toksik. Sebagai contoh implantasi *scaffold* ECM *xenogenic porcine* dari submukosa usus halus dan submukosa vesika urinaria akan mengalami degradasi dan diresorpsi komplis dalam waktu 30 sampai 60 hari dan diganti oleh jaringan regenerasi, di mana produk degradasi *scaffold* diekskresikan melalui urine dan tidak diproses oleh jaringan dan organ lain. Degradasi cepat ECM natural dilakukan oleh aktivitas enzim dan selular begitu juga terlepasnya komponen-komponen molekular dari ECM. Molekul-molekul yang terlepas secara signifikan berdampak pada proses *remodeling* jaringan selanjutnya. Sebagai contoh produk degradasi *scaffold* ECM dari usus halus dan vesika urinaria *porcine* memfasilitasi perekrutan sel-sel dari *marrow* ke tempat *remodeling*, sehingga mempromosikan proses reparasi. Harus dicatat bahwa deselularisasi *xenoscaffold* ECM secara signifikan memperpanjang waktu degradasi *in vivo* dan mempromosikan respons *angiogenic* yang efisien terhadap transplantasi.

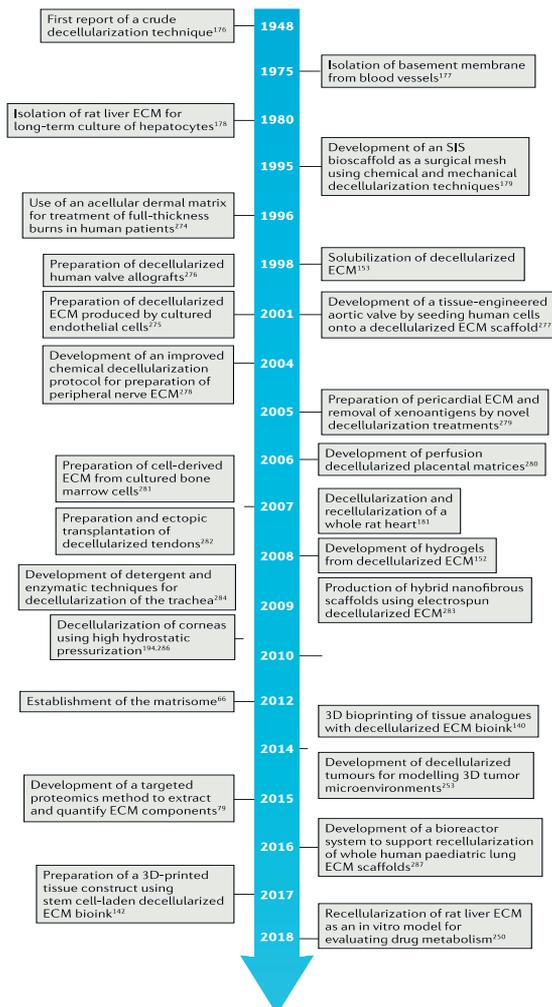
Keuntungan lain yang penting pada *scaffold* ECM adalah memiliki sifat imunogenik yang rendah. Konsekuensi umum pada implantasi *allogeneic* dan *xenogeneic* adalah bisa mencetuskan respons inflamasi akut dan kemudian

menjadi kronis. Penolakan imunologik yang berat akan menimbulkan *graft* nekrosis, sehingga membatasi aplikasi klinis transplantasi *allogeneic* dan *xenogeneic* material. Komponen-komponen fungsional dan struktural ECM merupakan protein dengan perbedaan minimal di antara spesies, sehingga tidak mudah mengalami reaksi penolakan. Tahapan deselularisasi mengambil populasi sel sehingga menurunkan imunogenisitas. Hasilnya *scaffold* berbasis ECM tidak menginduksi respons imun.^{37,38}

Deselularisasi ECM Scaffold

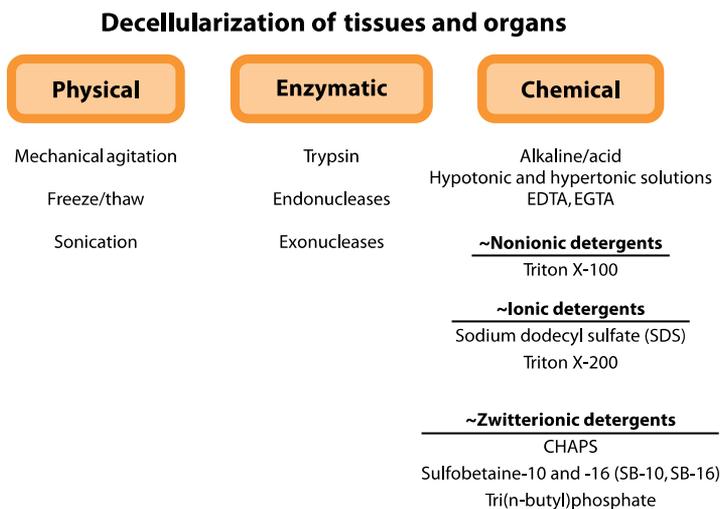
Kompleksitas dan pengetahuan yang belum komplit tentang komposisi dan struktur ECM, menyebabkan rancang bangun dan fabrikasi *scaffold* ECM yang menyerupai komposisi biokimia serta arsitektur ECM jaringan seperti aslinya saat ini tidak mungkin dilakukan. Deselularisasi seluruh jaringan dan organ dengan menghilangkan semua komponen selular menjadi metode alternatif dalam mengambil ECM beserta dengan morfologi tiga dimensi spesifik jaringan, arsitektur mikro, dan komposisi molekularnya. Laporan ilmiah pertama tentang teknik deselularisasi dipublikasikan tahun 1948. Pada penelitian awal ini peneliti menunjukkan bahwa *homogenates* aselular bisa disiapkan dengan membuat bubuk jaringan otot pada suhu -70°C untuk menghilangkan komponen selular. Selanjutnya dilaporkan tentang metode deselularisasi untuk isolasi membran basalis pembuluh darah dan isolasi ECM hati. Pada tahun 1990, teknik mekanikal dan kemikal deselularisasi telah dikembangkan untuk memproduksi *scaffold* ECM dari jaringan seperti kulit dan usus kecil untuk aplikasi biomedik. Sebagai contoh, penelitian pendahuluan preklinikal pada model hewan coba anjing menunjukkan *scaffold* ECM dari deselularisasi submukosa usus kecil bisa digunakan sebagai biomaterial untuk reparasi kerusakan tendon *achilles*. Begitu juga matriks aselular dermis dari proses deselularisasi kulit menunjukkan hasil yang menjanjikan sebagai substrat induksi untuk reparasi jaringan pada terapi luka bakar. Penelitian pionir ini menunjukkan bahwa deselularisasi *scaffold* ECM bisa digunakan sebagai biomaterial untuk memperbaiki fungsi dan konstruksi *remodeling* jaringan setelah implantasi *in vivo*. Teknik deselularisasi yang dikembangkan untuk memproses jaringan planar seperti dermis, submukosa usus halus menjadi dasar pengembangan teknik deselularisasi, seperti untuk deselularisasi perfusi yang mempertahankan tidak hanya morfologi 3 dimensi tetapi juga percabangan vaskular yang intak, sehingga menjadi rute untuk

menanamkan sel-sel spesifik. Deselularisasi perfusi pertama sekali didemostrasikan pada tahun 2008 dengan deselularisasi dan reselularisasi seluruh jantung tikus, kemudian paru-paru, ginjal, dan hati. Bidang ini juga sekarang melakukan eksplorasi teknik proteomik target untuk memetakan berbagai komponen ECM yang ada di dalam *scaffold* ECM yang dideselularisasi dan nantinya digunakan untuk rancang bangun biomaterial yang mirip ECM aslinya.^{30,36,37}



Gambar 4.6 Milestone teknologi deselelurasi. ECM: extracellular matrix; SIS: small intestine submucosa.³⁶

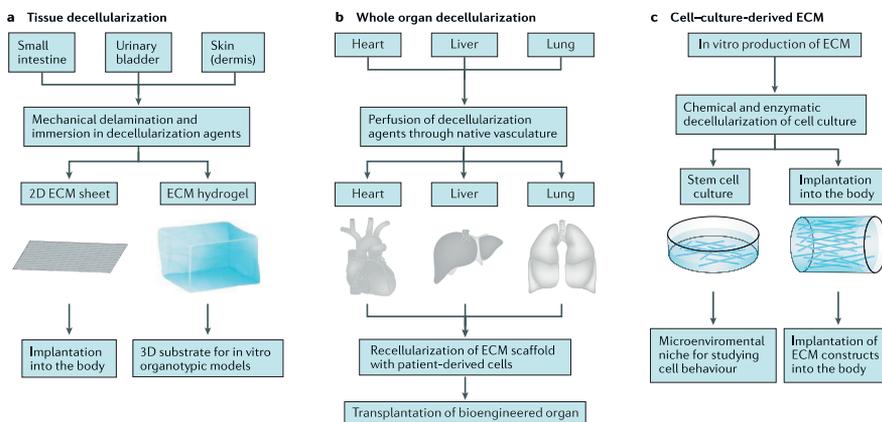
Metode deselularisasi. Tujuan deselularisasi adalah mengambil dan menghilangkan semua sel-sel dan material genetik dari ECM dan mempertahankan struktural, biokemikal, dan sifat biomekanikal ECM. Umumnya teknik deselularisasi disesuaikan untuk mempertahankan karakter fisik dan biokemikal jaringan yang spesifik, meliputi ketebalan, densitas ECM, dan konfigurasi 3 dimensi. Protokol deselularisasi telah banyak dijelaskan pada semua bagian tubuh dan biasanya meliputi kombinasi proses fisik, kimia, dan enzimatik. Teknik fisik meliputi proses *freeze-thaw*, tekanan hidrostatik, delaminasi mekanikal lapisan jaringan spesifik. Bahan kimia seperti asam parasetik, natrium hidroksida, cairan hipotonik dan hipertonik, bahan *chelating* dan deterjen seperti *sodium deoxycholate* dan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) digunakan untuk merusak (*lysis*) sel membran, mengambil semua material sitosol dan genomik. Alkohol seperti metanol dan aseton digunakan untuk delipisasi. Enzim-enzim seperti protease (tripsin, dispase, dan termolisin) dan nuklease (RNase dan DNase) akan menghancurkan debris dan asam nukleat. Penting untuk dipertimbangkan pemilihan reagen untuk deselularisasi dan aplikasinya



Gambar 4.7 Teknik yang digunakan untuk deselularisasi pada jaringan dan organ. *Abbreviations:* CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid.⁴⁰

tergantung dari karakter jaringan. Sebagai contoh deselularisasi *scaffold* ECM bisa berasal dari berbagai jaringan seperti esofagus, tendon, katup jantung, otot skeletal dan trakea, dilakukan dengan merendam dan agitasi jaringan dalam reagen deselularisasi. Kontras dengan perfusi *luminal* reagen deselularisasi ke dalam jaringan berongga seperti pada vena umbilikalis dan vesika urinaria dan perfusi *retrograde* ke dalam sistem pembuluh darah organ kompleks seperti jantung, paru, hati, dan ginjal untuk mengambil sel dari ECM. Alternatif lain menggunakan *supercritical carbon dioxide* dan *non-thermal irreversible electroporation* telah dieksplorasi untuk deselularisasi jaringan.^{30,39}

Setiap metode deselularisasi tidak bisa dihindari menimbulkan gangguan yang bervariasi pada ECM. Deselularisasi yang tidak efisien juga bisa menimbulkan



Gambar 4.8 Strategi deselularisasi. (A) Jaringan bisa dideselularisasi untuk menghasilkan *scaffold* ECM untuk regenerasi jaringan. Delaminasi mekanikal dan zat deselularisasi kemikal bisa digunakan untuk deselularisasi berbagai jaringan, seperti usus halus, vesika urinaria, dan dermis, untuk membuat lembaran ECM yang diproses lebih lanjut menjadi hidrogel ECM. (B) Organ utuh bisa dideselularisasi untuk *bioengineering* organ yang dapat ditransplantasikan. Perfusi zat untuk deselularisasi melalui pembuluh darah organ seperti jantung, hati, dan paru-paru menghasilkan *scaffold* ECM 3 dimensi yang bisa direpopulasi dengan sel-sel dari pasien untuk rekayasa organ manusia yang dapat ditransplantasikan. (C) Kultur sel di piring petri atau *template* sintetik 3 dimensi menghasilkan molekul-molekul ECM *in vitro*, yang bisa dipanen dengan teknik deselularisasi. kultur sel menggunakan ECM bisa diimplantasikan ke tubuh untuk reparasi kerusakan jaringan, atau bisa digunakan sebagai substrat untuk membentuk *niche* lingkungan mikro untuk mempelajari perilaku sel.³⁶

dampak buruk pada konstruksi *remodeling* jaringan setelah implantasi. Oleh karena itu, harus dipertimbangkan keseimbangan antara mempertahankan struktur asli dan komposisi ECM dengan pengambilan material selular dan antigenik seperti asam nukleat, membran lipid, dan protein sitosol, sebab residu komponen selular bisa mencetuskan respons inflamasi berlebihan dan menghambat *remodeling* rekonstruksi. Selanjutnya metode pengolahan bisa digunakan untuk menambah kekuatan mekanikal deselularisasi ECM seperti *crosslinking* kemikal, bisa mencegah degradasi material ECM *in vivo*, yang akan menimbulkan formasi jaringan parut. Kriteria standar deselularisasi jaringan belum memiliki standar tetap, tetapi secara umum diterima parameter untuk menilai deselularisasi meliputi pengecatan *haematoxylin & eosin* (H&E) dan *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) untuk memastikan tidak adanya sel dan inti sel dan untuk menilai penurunan jumlah dan panjang pasangan basa *double-stranded genomic DNA*.

Matriks deselularisasi untuk reparasi jaringan lunak. *Scaffold* ECM deselularisasi pertama sekali dikembangkan dan diregulasi sebagai material *surgical mesh* dan telah disetujui oleh Food and Drug Administration (FDA) untuk aplikasi klinis, meliputi reparasi hernia, rekonstruksi muskuloskeletal, rekonstruksi oesofagus, penggantian duramater, rekonstruksi payudara, dan reparasi jantung. Implantasi *scaffold* ECM deselularisasi menghasilkan *remodeling* rekonstruksi yang minimal akan memperbaiki sebagian fungsi pada jaringan yang direkonstruksi. *Scaffold* ECM deselularisasi biasanya *xenogenic* dan bisa difabrikasi sebagai lembaran tunggal atau multilaminasi digunakan sebagai *surgical mesh* atau *patch graft*. Sebagai alternatif *scaffold xenogenic* ini bisa juga dibentuk sebagai graf tubular, bubuk atau hidrogel. *Scaffold xenogenic* tidak mencetuskan respons imun adaptif maupun *inate*. Beberapa faktor yang menentukan hasil klinik transplantasi *scaffold* ECM meliputi teknik operasi, seleksi *scaffold* ECM untuk kondisi klinik spesifik, usia dari donor *xenogenic* atau *allogenic* dan komorbiditas dari pasien. Hasil klinik umumnya ditentukan oleh respons resipien terhadap *scaffold* ECM setelah implantasi, meliputi *angiogenesis*, invasi, perekrutan sel punca, aktivitas antimikroba, dan modulasi respons imun *inate*. Penentu utama *remodeling* fungsional adalah respons imun sementara resipien terhadap *scaffold* ECM dan terhadap produk degradasinya, yang melakukan reparasi langsung melalui respons sel anti inflamasi *M2-like macrophage* dan *T helper 2* (T_H2) di hubungkan dengan menurunnya inflamasi lokal dan *crossstalk* konstruktif dengan sel punca dan sel-sel progenitor.^{30,36}

Bank Jaringan

Transplantasi adalah proses pencangkokan sel, jaringan, dan organ dari donor ke resipien untuk memperbaiki fungsi. Transplantasi jaringan berbeda dengan transplantasi organ, di mana pada transplantasi organ prosesnya lebih kompleks dan mahal serta biasanya untuk menyelamatkan kehidupan. Transplantasi organ seperti ginjal, hati, paru-paru, dan lain-lain memerlukan donor yang sehat dan organnya berfungsi baik untuk dicangkokkan ke resipien. Konsekuensinya sumber donor organ harus donor hidup atau donor pasien dengan mati batang otak yang telah disaring dengan pemeriksaan laboratorium di mana organ yang ditransplantasikan masih berfungsi dengan baik. Setelah pengambilan jaringan dari donor maka transplantasi harus dilakukan segera untuk mencegah kematian sel-sel organ. Pada transplantasi jaringan, donor bisa dari jenazah karena pada transplantasi jaringan tidak dibutuhkan sel-sel hidup tetapi hanya matriks dari jaringan. Oleh karena itu tidak perlu melakukan transplantasi segera dan jaringan yang diambil dapat diproses dan disimpan baik pada suhu ruangan maupun pada *deep freezer* -70°C .³⁰

Tempat untuk menyimpan jaringan donor disebut sebagai Bank Jaringan. Bank Jaringan adalah institusi yang memberikan atau berhubungan dengan pelayanan jaringan yang berasal dari donor hidup atau jenazah untuk kegunaan transplantasi. Pelayanan Bank Jaringan meliputi penyaringan calon donor, pengambilan jaringan, pengolahan jaringan, sterilisasi, penyimpanan, pemberian label, dan distribusi. Bank Jaringan menjadi penghubung atau menjembatani antara resipien yang membutuhkan jaringan dengan donor yang menyumbangkan jaringan tubuhnya. Fungsi utama bank jaringan adalah menyediakan berbagai tipe jaringan yang berkualitas dan aman untuk resipien.³⁰

Untuk mendapatkan jaringan yang berkualitas dan aman maka dilakukan serangkaian proses penyaringan calon donor dan pengolahan jaringan dari donor. Proses ini meliputi riwayat medis pasien, pemeriksaan fisik, hasil otopsi bila dilakukan dan pemeriksaan laboratorium serta tes *swab* jaringan. Selama menunggu hasil pemeriksaan maka jaringan yang diambil disimpan di ruang karantina pada suhu -20°C . Jaringan bisa diambil dari donor hidup dan donor jenazah. Pada donor hidup jaringan yang diambil terbatas pada jaringan yang dipakai lagi setelah prosedur pembedahan seperti tulang dari operasi penggantian sendi panggul atau sendi lutut, traumatik amputasi, dan kraniotomi. Jaringan lain

yang bisa diambil dari donor hidup adalah membran amnion plasenta dari ibu yang melahirkan. Sedangkan jaringan yang diambil dari donor jenazah jenisnya sangat banyak, seperti tulang, tendon, ligamentum, fascia, sendi, perikardium, duramater, katup jantung, dan kulit. Jaringan bisa diambil dengan teknik aseptik (steril) dan teknik bersih non steril. Teknik aseptik dilakukan dengan standar pembedahan, semua prosedur harus memenuhi standar kamar operasi. Teknik bersih non steril dilakukan di ruangan yang sudah distandarisasi dan pada akhir pengolahan jaringan akan dilakukan sterilisasi untuk eliminasi bakteri patogen.³⁰

Pengolahan jaringan bertujuan untuk mencegah degradasi jaringan, eliminasi kontaminasi dan mempertahankan struktur serta komposisi jaringan seperti aslinya. Enzim yang berperan besar terhadap degradasi adalah enzim proteolitik. Lipid peroksidase juga memiliki potensi besar merusak matriks jaringan. Aktivitas di atas sangat tergantung terhadap ketersediaan air. Oleh karena itu menurunkan kandungan air melalui proses *freeze-drying* (*lyophilization*) atau imobilisasi air menggunakan teknik *deep-freezing* pada suhu -80°C sangat penting dalam mengawetkan jaringan. Metode pengawetan dan penyimpanan jaringan tergantung dari jenis jaringan yang diproses. Proses lain yang penting adalah dengan menurunkan sifat antigen jaringan dengan mengambil semua sel-sel yang mati dan produknya.³⁰

Tulang bisa diproses dengan *deep-freezing* dan sterilisasi akhir menggunakan bahan kimia atau radiasi sinar γ , *cryopreservation* tanpa radiasi, *freeze-dried* dan demineralisasi dengan radiasi sinar γ . Tulang yang didapat dari donor hidup maupun jenazah di proses sesuai dengan metode di atas. Pada proses *deep-freezing* tulang akan disimpan pada suhu -80°C . Metode ini tidak akan mengurangi kekuatan tulang sehingga bisa digunakan pada tulang *allograft* ukuran besar yang akan digunakan sebagai graf struktural besar untuk rekonstruksi defek tulang yang besar. Setelah semua hasil pemeriksaan negatif, tulang dikemas dan dimasukkan ke dalam *deep-freezer*. Sel tulang dan jaringan lunak akan mengalami nekrosis dan menghilang dilihat dengan mikroskop setelah 2 minggu. Proses ini secara signifikan akan mengurangi sifat antigen jaringan. Saat terbaik untuk penggunaan jaringan adalah setelah 1 bulan di dalam *deep-freezer* untuk memastikan seluruh proses telah berjalan dengan komplit. Sebaliknya pada metode *freeze-drying* proses pengurangan air dilakukan dengan sublimasi di mana

air akan diuapkan secara langsung dari kondisi beku tanpa melalui kondisi cair. Tujuan proses ini adalah mendapatkan *scaffold* biologi dengan kerangka kolagen berisi mineral hidroksiapatit, menurunkan antigen, mengurangi jumlah mikroba, dan memudahkan sterilisasi. Proses ini menurunkan kadar air sampai tinggal hanya 5-8% dengan sublimasi. *Freeze-drying* menurunkan kekuatan tulang dan jaringan lunak secara signifikan. Oleh karena itu, proses ini digunakan untuk allograf tulang dengan ukuran kecil untuk defek tulang kecil sebagai *filler* untuk memfasilitasi penyembuhan tulang. Jaringan *freeze-dried* bisa disimpan pada suhu kamar.³⁰

Demineralisasi tulang adalah rangkaian proses di mana semua jaringan lunak, darah, lemak, dan mineral hidroksiapatit diambil dari tulang. Proses akan dihentikan bila kadar kalsium mencapai 8% dan disebut sebagai *demineralized bone matrix* (DBM). DBM terdiri dari kolagen (paling banyak kolagen IV dan sedikit kolagen IV dan IX), protein nonkolagen, berbagai faktor-faktor pertumbuhan dan residu mineral kalsium fosfat (1-6%). DBM bersifat osteoinduktif sehingga lebih baik dalam induksi penyembuhan tulang daripada tulang yang tidak didemineralisasi. Proses akhir dari DBM adalah *freeze-drying* sehingga bisa disimpan pada suhu kamar. Sama halnya dengan tulang, allograf jaringan lunak termasuk jaringan muskuloskeletal seperti ligamentum, tendon, fascia, dan meniskus diproses dan disimpan dengan metode *deep-freezing* dan *freeze-drying*. Deselularisasi dengan detergen dilakukan terlebih dulu sebelum kedua proses tersebut.³⁰

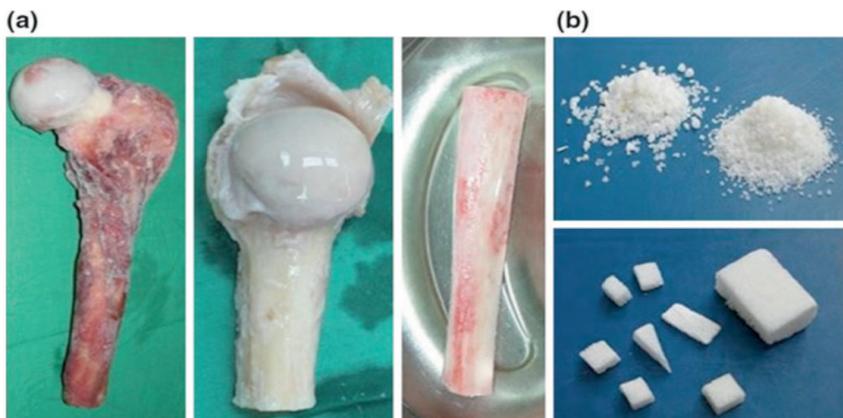
Sterilisasi jaringan diperlukan untuk menjamin tidak terjadi penyebaran penyakit dari donor ke resipien. Sterilisasi dilakukan untuk meyakinkan tidak terjadi proliferasi mikroorganisme dan menurunkan jumlah mikroorganisme sampai level yang dapat diterima dan disebut sebagai *sterility assurance level* (SAL). Sterilisasi jaringan bisa dilakukan baik dengan proses kimiawi maupun radiasi sinar γ . Sterilisasi kemikal dilakukan dengan menggunakan *ethylene oxide*, *glutaraldehyde*, dan *peracetic acid*. Masing-masing zat kimia ini memiliki beberapa dampak negatif terhadap jaringan sehingga seleksi penggunaan membutuhkan pengetahuan tentang karakter dan fungsi bahan kimia dan untuk memastikan tidak ada residu yang tertinggal setelah proses sterilisasi. Sterilisasi menggunakan radiasi sinar γ biasanya dilakukan dengan dosis 25 kGy. Radiasi sinar γ bekerja secara langsung menimbulkan kerusakan struktur DNA

mikroorganisme dan secara tidak langsung membentuk radikal bebas yang akan menyebabkan kerusakan protein, enzim, dan material inti sel. Radiasi sinar γ bisa menurunkan kekuatan tulang dan jaringan lunak *allograft*. Untuk mengatasi hal ini, pengambilan tulang dan jaringan lunak dilakukan dengan teknik aseptik dan monitor yang menyeluruh untuk mencegah penyebaran dan kontaminasi terutama pada jaringan yang dibutuhkan kekuatannya pada saat rekonstruksi.³⁰

Spektrum produk yang dihasilkan oleh bank jaringan sangat tergantung dari ketersediaan tenaga, fasilitas, dan tujuan dari bank jaringan didirikan. Bank jaringan generasi pertama biasanya menghasilkan produk dengan pengolahan standar, sedangkan bank jaringan generasi berikutnya menghasilkan produk dengan teknologi pengolahan canggih. Produk bank jaringan bisa berupa jaringan muskuloskeletal (seperti tulang, sendi, fasia, tendon, dan ligamentum) jaringan kardiorespiratori (trakea, bronkus, katub jantung, perikardium), kornea, kulit, dan produk lainnya. Pada bank jaringan generasi maju, produknya bertambah meliputi sel punca dengan derivatnya, produk darah, serta protein-protein yang didapat dari pemrosesan lebih lanjut.

RSUD Dr. Soetomo memiliki bank jaringan yang diberi nama Instalasi Bank Jaringan dan Sel yang telah berdiri sejak tahun 1990. Pada fase awal disebut bank tulang karena hanya memproduksi jaringan tulang yang berasal dari donor hidup dan jenazah. Dengan tambahan sumber daya manusia dan sarana serta prasarana bank tulang mulai memproduksi jaringan lunak manusia seperti tendon, ligamentum, duramater, dan membran amnion. Oleh karena itu sejak tahun 2000 berubah nama menjadi Pusat Biomaterial – Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo. Pada tahun 2008 kultur pertama sel punca mesenkimal berhasil dilakukan dan tahun 2011 berkolaborasi dengan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Lembaga Penyakit Tropik membentuk Pusat Kedokteran Regeneratif dan Sel Punca. Untuk menyesuaikan dengan perkembangan yang terjadi, Pusat Biomaterial – Bank Jaringan berubah nama menjadi Instalasi Bank Jaringan dan Sel. Instalasi Bank Jaringan dan Sel RSUD Dr. Soetomo memproduksi berbagai jenis jaringan tubuh manusia seperti jaringan *deep-frozen* meliputi tulang, sendi, membran amnion, fasia, duramater tendon, dan ligamentum, begitu juga jaringan *freeze-dried* seperti membran amnion, tulang, *demineralized bone matrix* (DBM), dan tendon. Karena keterbatasan jumlah donor dari manusia juga telah dikembangkan biomaterial yang berasal dari hewan, dalam hal ini

dari *bovine*. Biomaterial dari hewan yang telah digunakan luas adalah tulang kansasel dan hidroksiapatit *bovine*, sedangkan yang masih dalam pengembangan adalah kartilago, membran amnion, fasia, perikardium, dan lain-lain. Sejak tahun 2011, instalasi ini mulai memproduksi sel punca mesenkimal berserta turunannya untuk penelitian dan akhir-akhir ini juga mengembangkan produk metabolit sel punca.



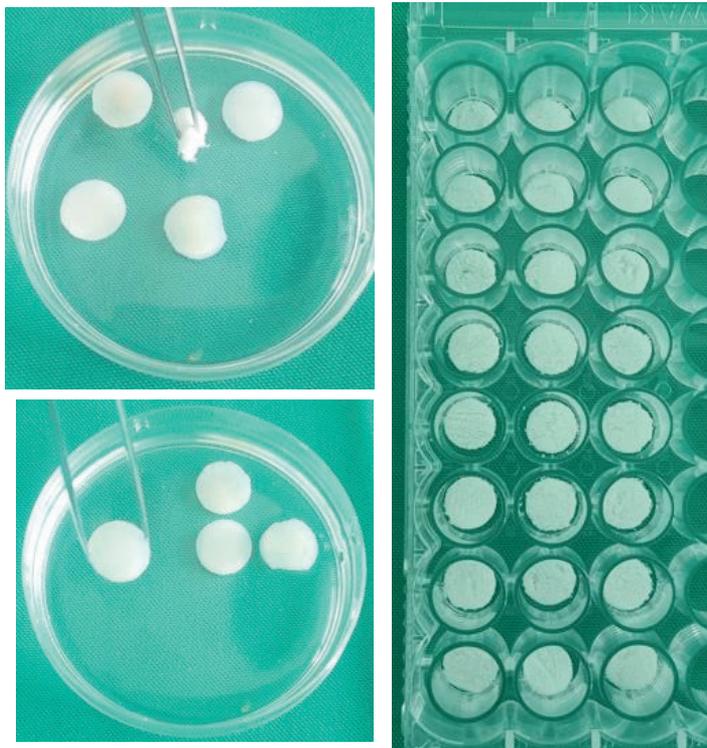
Gambar 4.9 (A) Kiri dan tengah, *deep-frozen* tulang osteoartikular proksimal femur dan proksimal humerus untuk rekonstruksi tulang *allograft* osteoartikular, kanan *deep-frozen* tulang tibia untuk rekonstruksi tulang interkalari. (B) Berbagai ukuran dan bentuk *freeze-dried* tulang *allograft*.³⁰



Gambar 4.10 Berbagai bentuk *demineralized bone matrix (DBM) allograft*.³⁰



Gambar 4.11 (A) Plasenta manusia, (B) Pengolahan membran amnion, (C) produk akhir.³⁰



Gambar 4.12 Produk scaffold kartilago yang berasal dari bovine (dokumentasi Bank Jaringan).



Gambar 4.13 Produk sel punca mesenkimal manusia untuk penelitian dan aplikasi klinis (dokumentasi Bank Jaringan).

Scaffold Sintetik

Biomaterial/*scaffold* sintetik merupakan alternatif bagi biomaterial natural sebagai *scaffold* untuk kultur sel punca. *Scaffold* ini memiliki keuntungan seperti *reproducibility* sesuai dengan komposisi kimianya, juga memiliki kemampuan untuk mengontrol kekuatan mekanik, laju degradasi, dan bisa dibentuk sesuai kebutuhan. Biomaterial sintetik bisa untuk memfasilitasi restorasi struktur dan fungsi jaringan yang mengalami kerusakan karena penyakit. Polimer sintetik sangat berguna untuk biomaterial karena sifatnya bisa disesuaikan untuk aplikasi spesifik. Polimer sintetik sering lebih murah daripada polimer natural dan bisa diproduksi seragam dalam jumlah yang besar. Polimer sintetik yang paling banyak digunakan pada rekayasa jaringan adalah asam polilaktik (PLA), asam poliglikolid (PGA), dan asam polilaktitkoglikolik (PLGA). PLGA adalah kopolimer yang terdiri monomer asam glikolik dan asam laktat yang di hubungkan oleh ikatan ester. Keramik bioaktif seperti hidroksiapatit, trikalsium fosfat, alumina, beberapa komposisi silikat, gelas fosfat (*bioactive glasses*), dan gelas keramik bereaksi dengan cairan fisiologis dan melalui aktivitas selular membentuk ikatan *inflexible* terhadap jaringan lunak dan keras. Banyak material sintetik tidak memiliki tempat melekatnya sel membutuhkan modifikasi kimia dengan menambahkan beberapa sinyal untuk melekat dan kultur sel. Semua aspek tentang biokompatibilitas, kesesuaian untuk transplantasi *in vivo*, kemungkinan penggunaannya yang bisa mencetuskan respons imun perlu menjadi pertimbangan.⁴¹

Tabel 4.1 Perbandingan sifat *scaffold* natural dengan sintetik pada rekayasa jaringan/⁴¹

Sifat	<i>Scaffold Biologis</i>	<i>Scaffold Sintetis</i>	References
Penyimpanan jangka panjang	Terjadi degradasi pada penyimpanan yang lama	Ketahanan dan stabilitas pada penyimpanan semakin baik	Bhattari et al. (2006); Fernandes et al. (2010)
Imunogenisitas	Antigen telah diambil pada saat deselularisasi	Berisi substansi yang bervariasi dan tidak diketahui dan tergantung dari asal material	He et al. (2009); Nicholas et al. (2013)
Reproduksibilitas	Arsitektur aslinya bisa dipertahankan, sangat bervariasi tergantung dari asal donor	Arsitektur sangat kompleks, besar kemungkinan untuk dapat dikontrol	Berkland et al. (2002); Chen et al. (2009); He et al. (2009)
Diferensiasi	Tempat <i>integrin-binding</i> masih dipertahankan	Tergantung dari rekayasa <i>scaffold</i> karena memiliki kelemahan spesifik pada tempat <i>integrin binding</i>	Adelow et al. (2008)
Biokompatibilitas	Bervariasi (tergantung dari sumber material)	Kompatibilitas sangat jelek	Souza et al. (2009)
Biodegradabilitas	Laju degradasi tidak bisa ditentukan	Degradasi jelek; Produk degradasi berpotensi menjadi toksik	Souza et al. (2009)

Scaffold biokeramik sintetik. Keramik ini dibuat khusus untuk reparasi dan rekonstruksi kerusakan bagian tubuh manusia. Pada penggunaan klinis umumnya

bisa berbentuk serbuk dan granula, *scaffold* berpori, berbentuk padat, dan semen tulang. Biokeramik diklasifikasikan menjadi 3 grup berdasarkan respons jaringan terhadapnya, yaitu bioaktif, keramik yang bisa diserap dan *nearly inert* (seperti alumina dan zirkonia). β -TCP dan α -TCP merupakan contoh keramik bioaktif dan keramik yang bisa diserap. Keramik bioaktif dan keramik yang bisa diserap digunakan secara luas sebagai *scaffold* rekayasa jaringan daripada yang bersifat *nearly inert* karena kemampuannya membuat ikatan stabil dengan jaringan resipien dan juga mengalami degradasi bertahap pada periode waktu tertentu dan diganti oleh jaringan resipien. Sifat ini tidak ada pada biokeramik *nearly inert* dan akan mengaktivasi pembentukan kapsul proteksi yang tebal pada permukaan implan.

Keramik bioaktif telah diketahui dapat meningkatkan diferensiasi osteoblas dan juga pertumbuhan osteoblas, tetapi aplikasi klinisnya masih terbatas sebab sulit untuk dibentuk, rapuh (*brittle*) dan laju degradasi yang lambat seperti pada hidroksiapatit. Keramik ini juga menunjukkan kekurangan dalam hal kemiripan dan kurang meyakinkan serta tidak mampu membentuk formasi tulang baru pada pori *scaffold* keramik sehingga tidak dapat menahan beban mekanik yang dibutuhkan pada tulang *weight bearing*. Kelemahan ini telah diamati oleh Fielding *et al* pada fabrikasi *scaffold* TCP menggunakan teknologi pencetakan tiga dimensi komersial. Mereka mengamati bahwa sifat mekanikal jauh di bawah tulang *weight bearing* (*fracture toughness*: 2–12 MPa m^{1/2}; *compressive strength*: 130–180 MPa) pada tubuh manusia.⁴² Grup riset berusaha mengatasi tantangan tersebut dengan mengajukan penggunaan alternatif keramik gelas. Penelitian menggunakan gelas bioaktif CEL2 (45SiO₂-26CaO-15Na₂O-3P₂O₅-4K₂O-7MgO mol.%) untuk fabrikasi *foam-like glass-ceramic scaffolds* menunjukkan kekuatan kompresi mencapai 1 MPa (porositas 70 % dari volume) dan biokompatibilitas biologi yang baik dengan osteoblas. Optimasi proses parameter menggunakan eksperimen di atas mendapatkan *scaffold* dengan kekuatan yang tinggi (5–6 MPa).⁴¹

Scaffold Metalik. Beberapa material metalik biokompatibel sering digunakan sebagai material implan pada kedokteran gigi dan ortopedi untuk mendorong penyembuhan tulang dan defek tulang. *Stainless steel 316 L* (*American Society for Testing Material* – ASTM F138), *Co-based alloys* (ASTM F75 dan ASTM F799) dan *titanium alloys* merupakan contoh material implan pembedahan standar dan Ti-6Al-4V (ASTM F67 dan F136) merupakan yang paling sering digunakan sebagai biomaterial metal. Temuan sifat biologi permukaan material

yang jelek merupakan kendala utama yang ditemukan pada biomaterial metalik, melapisi permukaan atau memodifikasi permukaan untuk mengatasi masalah ini. Keterbatasan lainnya pada biomaterial metalik saat ini adalah kemungkinan terlepasnya ion-ion metal yang toksik dan/atau partikel melalui korosi atau keausan yang bisa menimbulkan kaskade inflamasi dan reaksi alergi, selanjutnya menurunkan biokompatibilitas dan menyebabkan kerusakan jaringan.

Scaffold metalik yang memiliki porositas tinggi dan area permukaan untuk aplikasi *load-bearing* telah dikembangkan menggunakan berbagai teknik fabrikasi. *Scaffold* material metalik yang dibuat dengan teknik ini memiliki porositas tinggi untuk perlekatan sel, vaskularisasi dan aliran nutrisi. Kekuatan dan kelenturan bentuk porositas tinggi ini tergantung pada densitas akhir, tipe material, parameter fabrikasi, dan ukuran pori-pori. Pemilihan teknik yang digunakan tergantung pada aplikasi akhir dan kesuksesan menggunakan fabrikasi *scaffold* pada kedokteran regeneratif tergantung pada material dan rancangan *scaffold*, metode rekonstruksi *scaffold* dan penambahan modifikasi permukaan yang tepat.⁴¹

SEL-SEL

Strategi pada rekayasa jaringan dan kedokteran regeneratif bergantung pada keberadaan sel-sel dari luar dan sel-sel tersebut memberikan kontribusi dalam reparasi kerusakan atau penyakit jaringan yang efektif, dengan waktu yang lama dan stabil. Agar bisa memenuhi harapan di atas terdapat beberapa kriteria yang harus dipertimbangkan berikut ini.

1. Jumlah sel yang cukup agar memiliki kemampuan untuk reparasi, walaupun jaringan yang dibutuhkan sedikit atau kecil tetapi bisa membutuhkan jutaan sel. Metode terbaik untuk proliferasi dan ekspansi sel serta apakah harus dilakukan *in vitro* dan/atau setelah implantasi harus dipertimbangkan dengan baik.
2. Kemudahan untuk di akses, seberapa mudah sampel diambil dari jaringan yang sesuai untuk diisolasi. Diferensiasi sel sesuai dengan sel yang dibutuhkan dan memastikan sel agar berfungsi sesuai dengan yang diinginkan seperti sekresi protein ECM, hormon, sitokin-sitokin, dan lain-lain.
3. Memastikan sel dapat menyesuaikan dengan organisasi 2-3 dimensi dan arsitektur jaringan yang secara struktural dan mekanikal sesuai dengan kebutuhan jaringan aslinya.

4. Dapat berintegrasi dengan sel-sel asli dan jaringan (meliputi vaskularisasi dan inervasi bila dibutuhkan) dan mengatasi atau meminimalkan risiko penolakan sistem imun.
5. Pengiriman atau memasukan sel. Apakah sel dimasukkan langsung atau kombinasi dengan *scaffold* dan bagaimana mereka memengaruhi faktor-faktor lain harus dipertimbangkan.

Pada sisi lain kemampuan untuk memenuhi kriteria di atas bergantung pada kualitas dan sumber sel-sel. Beberapa sumber sel yang berbeda bisa dan telah digunakan untuk reparasi dan regenerasi jaringan berikut.

1. Sel *mature*, merupakan sel yang telah mengalami diferensiasi berasal dari tubuh pasien sendiri seperti kartilago dan kulit.
2. Sel punca dewasa (*adult stem cells*) yang diisolasi dari jaringan atau kompartemen tertentu dari pasien atau donor seperti sel punca mesenkimal (*mesenchymal stem cells* - MSCs) dan sel punca hematopoietik (*haematopoietic stem cells* - HSCs) yang berasal dari *bone marrow*, kelompok sel-sel ini merupakan sel yang paling banyak digunakan.
3. Sel-sel yang diisolasi dari fetus yang mengalami aborsi seperti sel-sel *embryonic germ* (EG) berasal dari regia gonad yang sedang berkembang pada fetus trimester pertama atau berasal dari jaringan fetus tertentu. Kelompok sel ini sangat jarang digunakan karena sumbernya sangat terbatas.
4. Sel-sel yang diisolasi dari perkembangan paling awal embrio seperti sel punca embrionik (*embryonic stem cells* - ES) yang berasal dari blastosit. Kelompok sel ini pada beberapa negara tidak diizinkan untuk digunakan karena kontroversi di bidang etik dan agama.
5. *Induced pluripotent stem cells* (iPSCs), merupakan sel yang berasal dari sel somatik seperti fibroblas yang diproses menggunakan *cocktail of four transcription factors*, yaitu OCT4, SOX2, KLF4 dan MYC disebut juga *Yamanaka factors* dan memiliki sifat seperti sel punca embrionik.

Sel Mature atau Primer

Sel *mature* atau primer diisolasi dari biopsi jaringan, memiliki potensi untuk direimplantasi kepada donor yang sama atau keluarga atau resipien yang *matching* secara imunologi, sehingga bisa mengatasi atau membatasi problem

imunokompatibilitas, walaupun begitu sel ini bukan merupakan sumber yang baik untuk reparasi jaringan. Secara umum sel-sel yang telah berdiferensiasi atau sedang diferensiasi memiliki potensi rendah untuk proliferasi, sehingga untuk mendapatkan jumlah sel yang cukup untuk reparasi jaringan relatif sulit. Lebih lanjut lagi, sel-sel ini biasanya merupakan sel *mature* jenis sel tertentu seperti sel kulit atau kartilago sehingga hanya bisa digunakan pada jaringan yang sesuai saja dan tidak bisa digunakan untuk jaringan yang berbeda. Sumber sel juga dipengaruhi kemudahan akses untuk pengambilannya. Sebagai contoh biopsi dari kulit bisa dengan mudah dilakukan dengan risiko minimal bagi pasien sedangkan bila kita mengambil jaringan atau sel dari jantung atau otak memiliki risiko yang tinggi untuk pasien.

Meskipun potensinya terbatas terdapat beberapa contoh pemakaian klinis di mana sel-sel diisolasi dari pasien dan digunakan untuk mempromosikan reparasi pada jaringan sendiri. Contoh yang baik adalah produk *Carticel[®] autologous chondrocyte* untuk reparasi kartilago. Prosesnya diawali dengan biopsi kecil pada jaringan kartilago normal dari pasien, kemudian sampel dikirim ke perusahaan di mana kondrosit akan diisolasi dan kultur beberapa minggu untuk meningkatkan atau menambah jumlah sel, selanjutnya bila jumlah sel sudah mencukupi maka sel dikirim kembali ke ahli bedah untuk direimplantasikan pada jaringan kartilago yang mengalami trauma dan rusak. Sistem ini bekerja dengan baik, terutama pada kerusakan articular yang sementara ini hampir tidak bisa diperbaiki, tetapi bukan kasus yang mengancam jiwa, sehingga pembedahan dapat direncanakan dengan baik dan dilakukan dengan teknik pembedahan minimal invasif *keyhole*. Terdapat beberapa lagi produk ortopedi yang digunakan berdasarkan variasi pendekatan atau teknik ini.

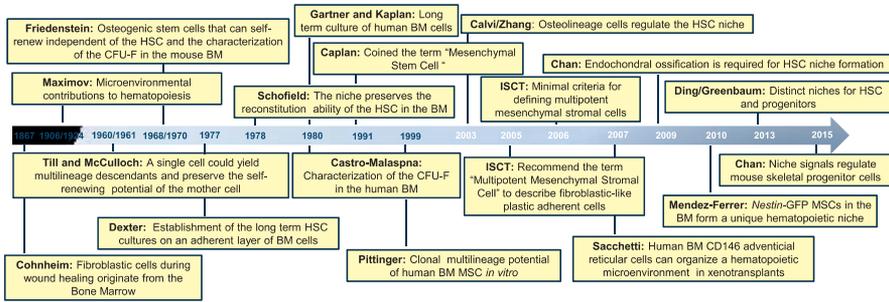
Tujuan dari rekayasa jaringan adalah menyediakan jaringan fungsional yang siap pakai. Sebagai contoh di mana sel *mature* digunakan untuk menghasilkan jaringan yang dibentuk di laboratorium dan yang dikirim sebagai produk siap pakai. Contoh dari pendekatan ini adalah rekayasa kulit seperti *Apligraf* yang merupakan jaringan kulit hidup terdiri dari sel kulit (keratinosit dan fibroblas) yang diisolasi dari *foreskin* bayi dan diinkorporasikan dengan *scaffold* natural (kolagen I) dan digunakan untuk terapi luka bakar serta ulkus kronik. Produk ini stabil untuk beberapa minggu sehingga bisa digunakan “*off the shelf*”, sangat menguntungkan bagi pasien yang membutuhkan terapi segera. Faktor yang

menarik lagi adalah produk ini tidak menimbulkan respons imun yang signifikan dan mungkin berhubungan bagaimana produk dibuat dengan mengambil sel-sel dendrit, makrofag, dan sel-sel repons imun lainnya dan fakta menunjukkan sel-sel keratinosit dan fibroblast yang digunakan untuk produk ini tidak menunjukkan molekul-molekul HLA.

Sel Punca Mesenkimal (*Mesenchymal Stem Cells/MSCs*)

Sel punca dewasa bisa berasal dari berbagai jaringan dan organ, serta dibagi menjadi 2 tipe, yaitu sel punca hematopoitik (*hematopoietic stem cells/HSCs*) dan sel punca mesenkimal (*mesenchymal stem cells/MSCs*). Pada rekayasa jaringan sel punca yang paling banyak digunakan adalah sel punca mesenkimal.

Keberadaan sel punca non hematopoitik pada *bone marrow* pertama sekali diobservasi oleh ahli patologi Jerman Cohnheim 130 tahun yang lalu. Penelitiannya menunjukkan bahwa *bone marrow* bisa merupakan sumber fibroblas yang akan mendeposisi serabut-serabut kolagen sebagai proses normal dari penyembuhan luka. Bukti bahwa *bone marrow* berisi sel-sel yang bisa berdiferensiasi menjadi sel mesenkimal lainnya seperti fibroblas, dimulai oleh penelitian Friedenstein dan kolega. Mereka meletakkan *bone marrow* pada piring plastik kultur dan mengambil sel-sel yang tidak melekat setelah 4 jam, sehingga membuang hampir semua sel punca hematopoitik. Mereka melaporkan bahwa sel-sel yang melekat menunjukkan gambaran yang heterogen, tetapi yang paling melekat erat adalah sel-sel yang berbentuk *spindle* dan membentuk fokus-fokus 2-4 sel, yang tetap tidak aktif selama 2-4 hari kemudian mulai multiplikasi dengan cepat. Setelah beberapa kali *passage* pada kultur, sel-sel yang melekat menjadi lebih homogen dengan gambaran fibroblastik. Mereka juga menemukan bahwa sel-sel bisa berdiferensiasi menjadi koloni-koloni yang menyerupai deposit tulang atau kartilago. Observasi Friedenstein dilanjutkan oleh grup lain sepanjang tahun 1980 dan membuktikan bahwa sel-sel yang diisolasi dengan metode Friedenstein bersifat multipoten dan bisa berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondroblas, adiposit bahkan mioblas. Saat ini sel tersebut dikenal sebagai sel punca mesenkimal (*mesenchymal stem cells/MSCs*) sebab memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi beberapa jenis sel mesenkimal atau sel-sel *marrow* stromal sebab mereka berasal dari dari susunan kompleks dari struktur penunjang pada *marrow*.^{30,43,44}



Gambar 4.14 Timeline penemuan utama yang membentuk pengertian tentang lingkungan mikro MSCs dan HSCs.⁴⁵

Karakterisasi In Vitro MSCs

MSCs manusia diisolasi dari lapisan mononuklir *bone marrow* setelah dipisah dengan *density gradient centrifugation*. Sel-sel mononuklir dikultur pada medium dengan 10% *fetal calf serum* dan MSCs melekat pada plastik kultur jaringan. Beberapa sel-sel hematopoitik juga melekat, tetapi bersama dengan berjalannya waktu pada kultur akan tercuci dan meninggalkan sel-sel melekat dengan bentuk seperti fibroblas. Setelah melalui fase *lag*, sel-sel akan membelah dengan cepat, dengan populasi waktu berganda (*doubling time*) bergantung pada donor dan kepadatan sel-sel di awal. MSCs dan sel-sel seperti MSCs saat ini bisa diisolasi dari berbagai jaringan tubuh selain *bone marrow* meliputi jaringan adiposa, cairan amnion, periosteum, dan jaringan fetus. Sel-sel seperti MSCs diisolasi dari jaringan patologi seperti rematoid arthritis sendi dan mengekspresikan reseptor BMP. Diyakini bahwa MSCs ada pada semua jaringan dan organ. MSCs telah diisolasi dan kultur dari berbagai spesies meliputi mencit, tikus, kucing, kelinci, babi, dan babon dengan kesuksesan bervariasi, pada beberapa spesies seperti mencit agak sulit untuk menghilangkan kontaminasi sel-sel hematopoietik. Meskipun demikian, pengayaan MSCs pada beberapa spesies dapat dilakukan dengan ekspansi dan *passage* pada medium tertentu untuk menghilangkan kontaminasi. Hasil dari kultur secara morfologi masih heterogen, berisi sel-sel dengan variasi bentuk *narrow spindle-shaped cells* sampai *large polygonal cells*, dan pada kultur yang *confluent* sel-sel berbentuk agak kuboid.^{44,46,47}

Secara fenotip, MSCs mengekspresikan sejumlah *marker*, dan sayangnya tidak ada yang spesifik untuk MSCs. The Mesenchymal and Tissue Stem Cell

Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) telah memberikan pedoman minimal 4 kriteria untuk menentukan MSCs yaitu:

1. MSCs akan melekat di plastik bila dilakukan kultur dengan kondisi yang standar;
2. MSCs memiliki kapasitas diferensiasi menjadi sel-sel osteogenik, adipogenik, dan kondrogenik;
3. MSCs mengekspresikan CD73, CD90, dan CD105; dan
4. MSCs tidak atau lemah mengekspresikan penanda sel hematopoietik seperti c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79, dan *human leukocyte antigen-DR*.

Terdapat variasi ekspresi *marker* di atas karena variasi sumber jaringan, metode isolasi dan kultur, serta perbedaan spesies. Jaringan lemak manusia merupakan sumber sel punca multipoten disebut sel-sel *processed lipoaspirate* (PLA) yang mirip dengan MSCs *bone marrow*, secara *in vitro* bisa berdiferensiasi menjadi beberapa turunan sel-sel mesenkimal. Sel ini memiliki perbedaan ekspresi pada penanda tertentu, CD49 diekspresikan oleh sel-sel PLA tetapi tidak oleh MSCs, dan CD106 diekspresikan MSCs tetapi tidak oleh sel-sel PLA. CD106 pada *bone marrow* secara fungsi dikaitkan dengan *bone marrow*, oleh karena itu tidak adanya ekspresi CD106 pada sel-sel PLA konsisten dengan lokalisasi sel yang terletak pada jaringan nonhematopoietik.^{44,47}

Blood-derived mesenchymal precursor cells (BMPCs) terdapat pada darah individu normal, dan bisa mengekspresikan banyak penanda MSCs *bone marrow*, juga berdiferensiasi menjadi osteoblastik dan adipogenik. Sel ini kelihatannya berbeda populasi dengan fibrosit yang merupakan sel prekursor mesenkimal dalam sirkulasi darah dan migrasi ke dalam jaringan. Fibrosit mengekspresikan CD34 dan CD45 serta bisa berdiferensiasi menjadi miofibroblas, sedangkan BMPCs tidak mengekspresikan CD34.

MSCs juga bisa diisolasi dari darah fetus manusia trimester pertama dan kedua, hati, limfa, dan *bone marrow*. Walaupun fenotipnya sama, kultur ekspansi MSCs menunjukkan heterogen dalam potensi diferensiasi yang berhubungan dengan sumber jaringan. Secara bersama-sama contoh ini menunjukkan bahwa sel-sel prekursor mesenkimal secara fenotip heterogen dan hubungan antara MSCs dari *bone marrow* dan populasi MSCs lainnya belum semuanya dimengerti.

MSCs manusia dewasa dilaporkan mengekspresikan pada level *intermediate* antigen *major histocompatibility complex* (MHC) *class I* tetapi tidak mengekspresikan *human leukocyte antigen* (HLA) *class II* pada permukaan sel. Ekspresi HLA *class I* pada fetus rendah. Le Blanc dan kolega mendeteksi HLA *class II* dengan Western blot pada *lysate* MSCs manusia dewasa yang tidak distimulasi, menunjukkan adanya deposit antigen intraselular dan didapatkan ekspresi permukaan sel bisa diinduksi dengan terapi sel menggunakan interferon- γ untuk 1-2 hari. Tidak seperti MSCs manusia dewasa, MSCs manusia dari liver fetus tidak memiliki MHC kelas II intraselular atau pada permukaan sel, menunjukkan adanya perubahan ekspresi antigen MHC dari fetus ke kehidupan dewasa.^{43,44,47}

Tabel 4.2 Kelebihan dan kelemahan MSCs dari berbagai sumber jaringan.

Tipe Sel Punca	Kelemahan	Kelebihan
Bone marrow-derived MSCs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Proses pengambilan menimbulkan nyeri 2. Kemampuan proliferasi rendah 3. Risiko infeksi pada tulang 4. Risiko kontaminasi dengan sel-sel ganas 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Stabilitas tinggi pada kultur 2. Kemudahan pengambilan sel 3. Afinitas yang tinggi untuk diferensiasi menjadi osteoblas dan kondroblas 4. Preparasinya mudah 5. Paling banyak diteliti dan digunakan untuk <i>clinical trial</i>, dan dipertimbangkan sebagai <i>gold standar</i>
Adipose tissue-derived MSCs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tidak dapat diekstraksi dari kasus atrofi lemak berat 2. Kecenderungan tinggi spontan diferensiasi menjadi <i>adiposity</i> 3. Pengambilan dan pemrosesan lebih lama daripada <i>bone marrow</i> MSCs 4. Potensi osteogenik dan kondrogenik lebih inferior dari <i>bone marrow</i> MSCs 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Jumlah sel punca lebih banyak 1000 kali pada 1 g lemak dibandingkan 1 g <i>bone marrow</i> 2. Pada saat pengambilan lebih tidak nyeri dibandingkan <i>bone marrow</i> 3. Risiko infeksi rendah 4. Mudah diekstraksi 5. Viabilitas sel lebih tinggi 6. Efek immunosupresan lebih kuat daripada MSCs <i>bone marrow</i> 7. Sekresi beberapa <i>angiogenic</i> dan <i>antiapoptotic cytokines</i>

Tipe Sel Punca	Kelemahan	Kelebihan
Umbilical cord-derived MSCs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Akses MSCs ini paling mudah dibanding yang lain 2. Diperlukan tes genomik dan kromosom untuk memeriksa genom yang sehat 3. Potensi osteogenik lebih lemah dibandingkan dengan <i>bone marrow</i> MSCs 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Setelah injeksi IV MSCs darah tali pusat lebih cepat berada di paru-paru dari MSCs <i>bone marrow</i> dikarenakan ekspresi molekul <i>adhesive</i> dan <i>glycolipid carbohydrate epitopes</i> 2. Prosedur pengambilan tidak nyeri 3. <i>Self-renewal</i> lebih cepat daripada MSCs <i>bone marrow</i> 4. Memiliki kemampuan unik untuk diferensiasi ke 3 lapisan germinal 5. Hipoimunogenik 6. Ketersediaan banyak
Peripheral blood MSCs	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bukti tentang efikasi tidak banyak 2. Hanya bisa diambil dengan jumlah sedikit dari darah 	<ol style="list-style-type: none"> 1. MSCs mudah dan aman diambil dari darah 2. Secara simultan bisa mengambil <i>plasma-rich protein</i>

Klasifikasi Potensi Sel Punca Mesenkimal

Sel punca bisa diklasifikasikan berdasarkan kemampuannya berdiferensiasi menjadi tipe sel yang berbeda. Ada 5 klasifikasi, yaitu *totipotent*, *pluripotent*, *multipotent*, *oligopotent*, dan *unipotent*.^{46,47}

1. *Totipotent*. Memiliki kemampuan untuk membelah dan berdiferensiasi menjadi sel-sel seluruh organisme. Totipotensi memiliki potensi diferensiasi tertinggi dan memungkinkan sel membentuk baik struktur embrio maupun ekstra-embrio. Contoh dari sel *totipotent* adalah zigot yang dibentuk setelah fertilisasi sperma sel telur. Sel ini kemudian bisa membentuk baik 3 lapisan germinal atau membentuk plasenta. Setelah 4 hari *inner cell mass* blastosit menjadi pluripotent. Struktur ini menjadi sumber sel-sel *pluripotent*.
2. *Pluripotent*. Memiliki kemampuan membentuk semua lapisan germinal tetapi tidak bisa membentuk struktur ekstraembrionik seperti plasenta. Sel punca embrio (*embryonic stem cells/ESCs*) merupakan contoh tipe sel ini.

ESCs merupakan turunan dari *inner cell mass* embrio preimplantasi. Contoh lain adalah *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) berasal dari lapisan *epiblast* embrio yang telah implantasi. Kemampuan *pluripotent*-nya berlanjut, diawali sel *pluripotent* seperti ESCs dan iPSCs dan berakhir dengan potensi yang menurun seperti sel-sel multi, oligo atau *unipotent*. Salah satu metode untuk memeriksa aktivitas dan spektrum adalah pemeriksaan formasi teratoma. iPSCs artifisial dibuat dari sel somatik dan fungsi mereka sama PSCs. Kultur dan utilitasnya menjanjikan untuk kedokteran regeneratif sekarang dan masa mendatang.

3. *Multipotent*. Memiliki spektrum lebih sempit dibandingkan PSCs, tetapi mereka bisa menjadi sel spesifik tertentu. Sebagai contoh sel punca hematopoietik yang bisa berkembang menjadi berbagai jenis sel darah. Setelah diferensiasi, sel punca hematopoietik menjadi sel oligopoten. Kemampuan berdiferensiasi ini kemudian terbatas menjadi sel-sel turunannya saja. Tetapi beberapa sel-sel *multipotent* memiliki kemampuan menjadi tipe sel yang tidak berhubungan dan mereka disebut sel-sel *pluripotent*.
4. *Oligopotent*. Sel-sel ini bisa berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel. Sel punca *myeloid* sebagai contoh yang bisa membelah menjadi sel-sel darah putih tetapi tidak bisa menjadi sel-sel darah merah.
5. *Unipotent*. Memiliki karakter kemampuan diferensiasi yang paling sempit dan sifat khusus untuk membelah berulang. Sifat ini membuat sel menjadi kandidat untuk digunakan pada kedokteran regeneratif. Sel ini hanya mampu membentuk satu tipe sel saja.

Mekanisme Aksi MSCs

Pada saat MSCs melakukan aktivitas mengatasi kerusakan jaringan, maka kita perlu mengetahui bagaimana potensi mekanisme kerja mereka dalam melakukan aksi terapinya. Dari beberapa laporan sebelumnya yang telah dipublikasikan tentang mekanisme kerja MSCs dalam menjalankan perannya sebagai penjaga homeostasis jaringan begitu juga sebagai komponen untuk kedokteran regeneratif. Walaupun ada bukti tentang diferensiasi dan penggantian sel, penelitian terakhir menunjukkan dengan kuat bahwa mekanisme aksi MSCs dikaitkan dengan kapasitas migrasi dan efek parakrin serta imunomodulasi.

Migrasi dan Homing MSCs. *Homing* MSCs tergantung pada sumber asalnya, apakah eksogen (injeksi) atau endogen yang berasal dari salah satu tempat penampungannya. MSCs bisa diberikan dengan cara eksogen baik sistemik maupun lokal. Pemberian lokal berarti tidak melalui pembuluh darah di mana MSCs langsung diberikan ke target organ. Sebaliknya pemberian sistemik MSCs akan melalui 3 fase *homing*, yaitu (i) pemberian langsung melalui pembuluh darah, (ii) ekstravasasi di sekitar lesi, dan (iii) migrasi intersisial ke tempat target. Ekstravasasi dan migrasi intersisial disebut dengan terminologi *transendothelial migration*. Dari mana pun berasal, MSCs cenderung akan masuk ke dalam sistem vaskular agar mudah mencapai tempat yang dituju, tetapi MSCs menunjukkan kecenderungan kuat menuju jaringan non spesifik seperti mikrovaskular dan jaringan kapiler, tanpa atau adanya trauma spesifik dan reseptor permukaan *leukocyte-like*, yang menghalangi *homing* MSCs. MSCs harus mencapai jaringan yang rusak melalui sistem vaskular dan melewati dinding endotel agar bisa mencapai lesi.⁴⁸

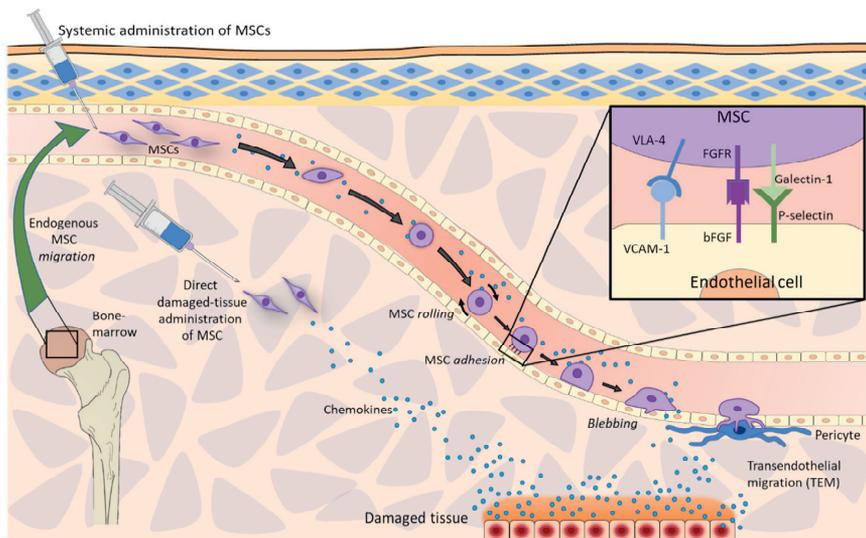
Ekstravasasi MSCs dipicu oleh kemokin pro inflamasi dari daerah trauma seperti TNF- α atau histamin, yang bisa mengaktivasi sel endotel. Selanjutnya menginduksi aktivasi *P-selectin*, *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1), dan ekspresi *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) pada permukaan endoluminal. Kemudian MSCs mulai bergulir pada permukaan endotel dan endotelium mulai *upregulate ligand* lokal untuk ekstravasasi seperti CD44 (*homing cell adhesion molecule/HCAM*), *CD49d*, dan *very late antigen 4* (VLA-4). Bila MSCs melekat pada ligand endotelium, pola ekspresi sinyal akan dilepas untuk memastikan perlekatan yang kuat. Ekstravasasi meliputi pertama sekali membentuk permukaan kontak pada MSCs yang memiliki kemampuan melekat ke sel endotel.

Melekatnya MSCs tergantung pada pola *adhesion* molekul pada permukaannya, yang dibentuk oleh *galectin-1* dan variasi *integrin* yang besar seperti VLA-4. Molekul-molekul ini berinteraksi dengan *P-selectin* dan VCAM-1 secara berurutan pada permukaan endotelium. Di samping itu, MSCs mengekspresikan molekul-molekul berasal dari platelet dan netrofil seperti *fibroblast growth factor receptors* (FGFR), yang berinteraksi dengan *basic fibroblast growth factor* (bFbF) dari sel endotel dan memediasi perlekatan *galectin-1* ke *P-selectin*.

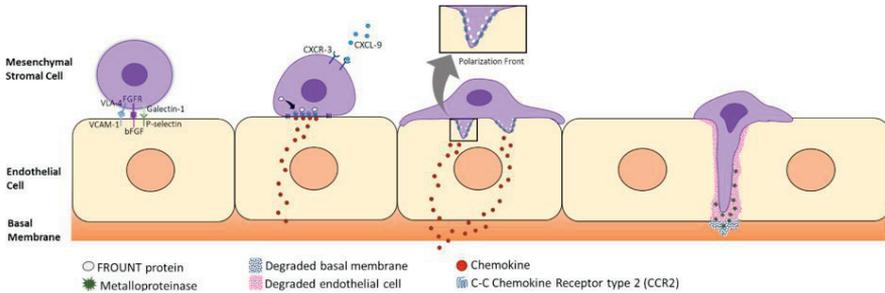
Proses-proses molekular dimulai dengan pengenalan sitokin-sitokin proinflamasi seperti *interleukin-8* (IL-8), yang mengaktivasi *phospholipase C*

(PLC), menghasilkan peningkatan level kalsium (Ca^{2+}). Peningkatan level Ca^{2+} mencetuskan aliran sinyal di mana *guanine-exchange factors* (GEF), *GTPases* (*Rho* dan *Rap1*), dan *tailin* (*an intracellular adapter protein*) akan tampak. VLA-4 akan mengarah pada posisi lurus di mana *binding pocket* diekspos dan terjadi tarikan dengan integrin. Tarikan yang kuat bisa dicapai oleh cara PLC-*Rho/Rap1-independent* yang melibatkan *phosphokinase C* (PKC), *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/Act, dan protein *adapter* lainnya seperti *integrin-linked kinase* (ILK).

Segera sesudah MSCs melekat pada endotelium, mereka membentuk *filopodia* dengan stimulasi *chemokine ligand 9*, memungkinkan MSCs melewati ruang intraluminal menggunakan protease seperti *metalloproteases*. Pada saat yang bersamaan, MSCs terpolarisasi membentuk *front pole* oleh aksi protein *adaptor* intraselular yang disebut FROUNT, yang terhubung dengan *C-C chemokine Receptor type 2* (CCR2). Saat CCR2 mulai mengelompok, hasilnya di dalam reorganisasi sitoskeletal yang meliputi peningkatan *actin polymerization*. *C-C chemokine receptors* lain (bagian dari CCR2) diekspresikan oleh MSCs, seperti



Gambar 4.15 Homing dan migrasi transedotelial MSCs. MSCs bisa beraksi baik endogenos maupun eksogenos, melakukan proses *homing*, di mana mereka bergerak ke daerah lesi mengikuti sinyal kemotaktik untuk reparasi atau berkontribusi dalam pemulihan jaringan yang rusak. bFGF: *basic fibroblast growth factor*; FGFR: *fibroblast growth factor receptors*; VLA- 4: *very late antigen 4*; VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule 1*.⁴⁸



Gambar 4.16 Migrasi transotelial melalui sel-sel endotelial dari endotelium.

MSCs membentuk *front pole* melalui aksi bersama protein FROUNT dan C-Chemokine receptor type 2 (CCR2) untuk degradasi sel-sel endotel dan membran basalnya untuk mencapai jaringan yang rusak.⁴⁸

CCR1, CCR4, CCR7, CCR8, CCR19, CXCR1, CXCR3, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, dan CXCR4, diduga berperan pada *homing* MSCs, tetapi *chemokine* yang dominan pada *homing* MSCs masih belum diketahui.

MSCs dan Sistem Imun. Respons MSCs setelah stimulasi dikondisikan oleh sinyal yang mereka terima dari lingkungan mikro di sekitarnya, seperti sitokin-sitokin inflamasi atau faktor-faktor hipoksi. Setelah stimulus, MSCs akan menyekresi faktor-faktor immunoregulator yang akhirnya akan menekan atau meningkatkan respons imun berdasarkan pada kondisi fisiologis.

Produksi faktor-faktor ini oleh MSCs juga tergantung pada fenotipnya, yang terjadi sebagai hasil interaksi antara faktor-faktor parakrin dari lingkungan mikro di sekitarnya dengan reseptor pada permukaan MSCs seperti *Toll-Like Receptors* (TLR). Menurut Waterman dan kolega, terdapat dua fenotip MSCs yang berbeda, yaitu fenotip pro-inflamasi MSCs (MSCs1, dilakukan oleh interaksi TLR4 dengan *ligand*-nya), dan fenotip MSCs anti-inflamasi (MSCs2, dilakukan oleh ikatan TLR3 dengan *ligand*-nya). Baik MSC1 dan MSC2 memproduksi 2 tipe faktor-faktor immunomodulator, yaitu faktor-faktor pro-inflamasi dan anti-inflamasi (dikenal juga sebagai faktor-faktor immunosupresan).

Status pro-inflamasi atau immunosupresif ditentukan oleh efek yang dihasilkan oleh sel-sel imun. Dengan demikian MSCs bisa *immunomodulate* aktivasi dan fungsi beberapa sel-sel imun, baik sel-sel *innate* maupun adaptif, seperti limfosit T, makrofag, *natural killer*, limfosit B, netrofil, dan sel dendrit. MSCs sangat dibutuhkan untuk *survival* sel T. Pada fase inflamasi akut, sel-sel T efektor

mulai menyekresi sejumlah besar sitokin-sitokin pro-inflamasi (IFN- γ , TNF, IL-1, dan IL-17) yang mengaktivasi MSCs. Kemudian MSCs mulai melakukan imunomodulasi dengan melepaskan sejumlah besar prostaglandin E2 (PGE2), IL-10, *Human Leukocyte Antigen-G* (HLA-G), *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), dan kemokin-kemokin seperti CXCL9, CXCL10, dan CXCL11 (ligand reseptor kemokin *T cell-specific*, CXCR3). Sama halnya MSCs menyekresi CXCL12 (atau *stromal cell-derived factor 1 alpha/SDF-1 α*) dan CXCR4. Kemokin-kemokin ini menarik sel T mendekat ke MSCs yang diaktivasi, di mana IDO dikatabolik dan kataboliknya menghambat sel T akhirnya menimbulkan apoptosis sel T.

Selanjutnya proliferasi sel T dan diferensiasinya menjadi sel-sel T *helper* seperti Th1 dan Th17 bisa dihambat oleh sekretom MSC yang meliputi HLA-G, *galectins*, IDO, dan molekul lainnya, yang memungkinkan makrofag untuk menghasilkan *transforming growth factors*- β (TGF- β) dan mempromosi diferensiasi *T regulatory cells* (Treg). HLA-G bisa mempromosikan apoptosis baik limfosit T dan B, menghalangi sitolisis sel-sel *antigen-activated* CD8+, promosi aktivasi sel-sel *CD4+CD25+FoxP3+regulatory T* dan mengganggu sitolisis, perlekatan, dan kapasitas migrasi sel-sel NK. Oleh karena itu, HLA-G bekerja dengan menurunkan respons imun yang berlebihan pada penyakit auto imun.

Molekul-molekul lain yang dihasilkan MSCs disebut sebagai *galectins*, memiliki efek immunosupresif yang penting. *Galectin-1* yang berasal dari MSC mengganggu pelepasan sitokin inflamasi seperti TNF α , IFN γ , IL-2, dan IL-10. *Galectin-3* akan meregulasi proliferasi, perlekatan dan migrasi sel T. *Galectin-3* memediasi penurunan stimulasi limfosit T dan B bersama-sama *galectin-1* dan *galectin-9*. Produksi IDO berhubungan dengan level sitokin anti-inflamasi seperti TGF- β , di mana penurunan level TGF- β sesuai dengan penurunan level IDO, deaktivasi efek MSC terhadap sel-sel imun dan mempromosikan respons imun. Oleh karena itu, peran IDO adalah sebagai sistem *on-off switch* pada imunomodulasi, karena dia menentukan *plasticity* MSC terhadap sel-sel T.

MSC juga bisa melakukan aksi imunomodulasi terhadap sel imun adaptif lainnya seperti sel-sel B. Aktivasi MSC telah dilaporkan menghambat proliferasi sel B, diferensiasi sel plasma dan juga pelepasan imunoglobulin (Ig) E dan IgG dari sel B yang teraktivasi melalui interaksi langsung antara sel, sementara itu MSC yang tidak terstimulasi, tidak menekan proliferasi sel B bahkan mempromosikan proliferasi sampai level tertentu.

Pada sisi lain *adipogenic-differentiated* MSCs bisa mempromosikan proliferasi sel-sel B teraktivasi dengan sekresi *B cell activating factor* (BAFF), sementara efek yang berlawanan diobservasi pada MSCs. MSCs dengan sekresiIDO akan mempercepat *survival* dan proliferasi sel-sel B CD5+. Sel-sel dipertimbangkan sebagai subpopulasi sel B dengan kemampuan utama imunoregulasi dengan sekresi IL-10 dan induksi diferensiasi *Tregs*.

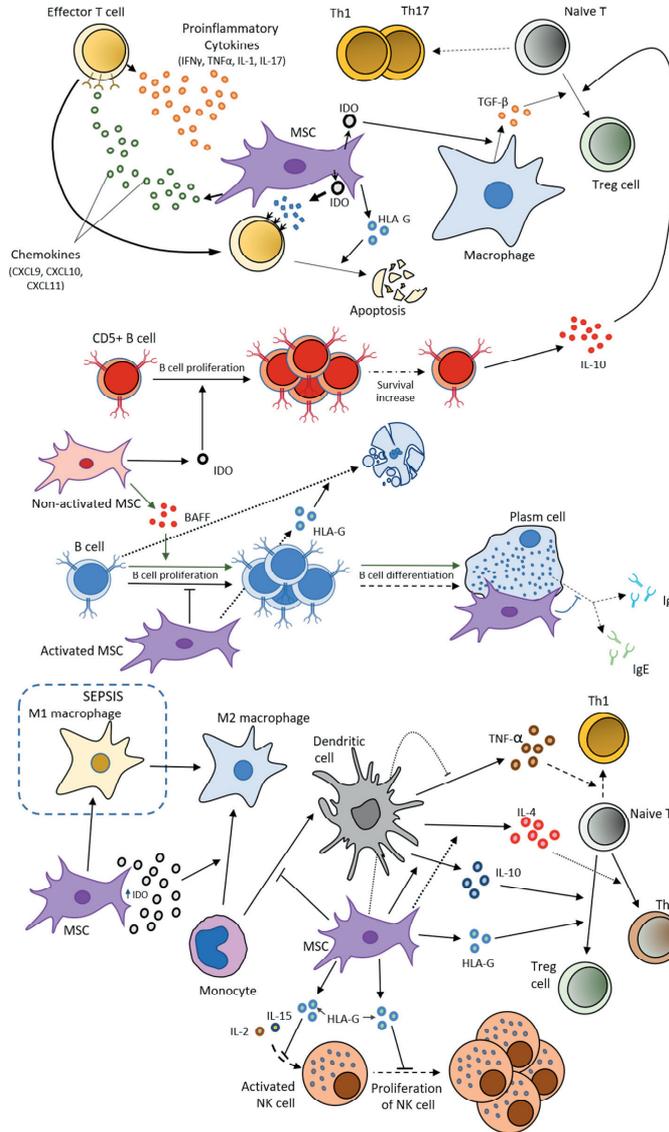
MSCs tidak hanya dihubungkan dengan sel-sel imun adaptif tetapi juga sel-sel imun *innate*. Konkretnya, sel-sel NK teraktivasi bisa dikenal oleh MSCs dan sebagai konsekuensinya, MSCs memiliki kemampuan untuk menghambat proliferasi sel NK dengan cara menurunkan aktivasinya melalui IL-2 dan IL-15. Sel-sel dendritik (DC) juga bisa dipengaruhi MSCs, dengan menghambat diferensiasi monosit CD14+ menjadi sel dendritik. MSCs menghambat sel dendritik menyekresi TNF α tetapi mempromosikan sekresi IL-10 dan IL-4 yang menghambat diferensiasi sel T menjadi sel-sel Th1, juga diferensiasi sel ini menjadi sel-sel Treg dan Th2.

Makrofag juga berinteraksi dengan MSCs. Telah dilaporkan bahwa ekspresiIDO yang tinggi, sebagai interaksi sitokin-sitokin pro-inflamasi, mengarahkan monosit berdiferensiasi menjadi immunosupresif dan fenotip anti-inflamasi makrofag (M2). Abumaree dan kolega membuktikan bahwa *switching* fenotip *MSC-dependent macrophage* ini bisa terjadi dari fenotip makrofag pro-inflamasi tipe 1 menjadi fenotip anti-inflamasi tipe 2 pada terapi sepsis.

MSCs juga menunjukkan aktivitas antimikroba melalui sekresi *antimicrobial peptides* (AMPs), seperti *cathelicidin peptide LL-37*, *hepcidin*, β -*defensin 2*, *lipocalin 2*, dan *Hepcidin*. AMPs ini bekerja menghancurkan bakteri dengan mengubah integritas membran mikroba atau dengan mendorong pelepasan sitokin pro-inflamasi yang selanjutnya mendukung perekrutan sel-sel imun.

Aktivitas antimikroba MSCs kadang kala kontraproduktif. MSCs bisa mendukung tuan rumah dengan immunosupresif lingkungan melalui: (i) mengurangi intensitas gejala patologi, (ii) membantu penyembuhan kerusakan jaringan dan organ, dan (iii) memungkinkan formasi lingkungan imun toleran. Tetapi supresi imun berlebihan bisa menyebabkan efek yang benar-benar berbeda menghambat tuan rumah dalam menyingkirkan infeksi, malah sebaliknya mendukung penyebaran infeksi.

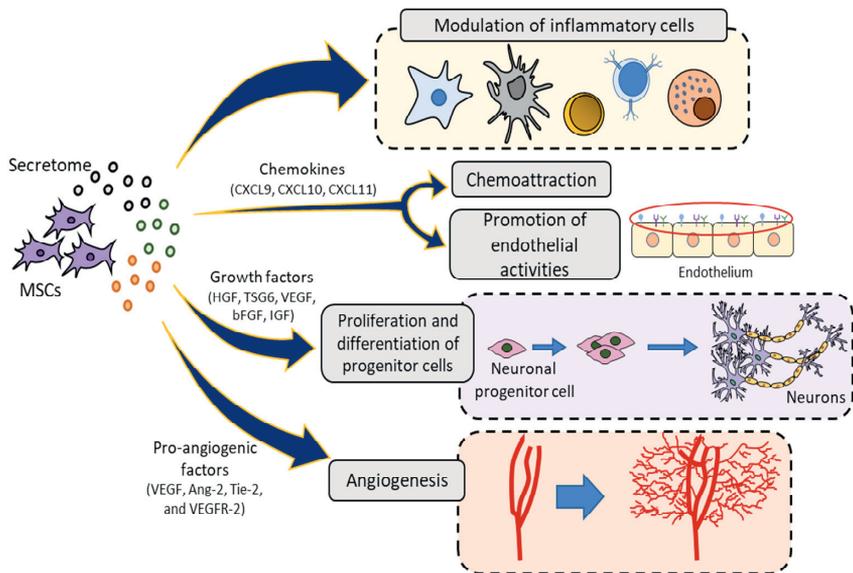
Sekretom. Meskipun terdapat fakta bahwa aktivitas homeostatik dan immunomodulator MSCs didasarkan atas jumlah sel MSC, tetapi dari data saat ini



Gambar 4.17 Interaksi imun (imunomodulasi) MSCs. MSCs telah terbukti memengaruhi baik sel-sel adaptif seperti sel B dan T dan sel-sel imun innate seperti sel dendritik, sel NK, manosit dan makrofag dengan sekresi beberapa faktor-faktor molekuler seperti indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) dan sitokin lainnya. BAFF: B cell activating factor.⁴⁸

aktivitas tersebut lebih bergantung pada faktor-faktor parakrin yang disekresi oleh sel-sel ini, yang dikenal sebagai sekretom (*secretome*) yang diproduksi segera setelah MSCs diaktivasi. Selanjutnya proses *angiogenic*, promosi endotelial, aktivitas fibroblas, fasilitasi proliferasi dan faktor-faktor parakrin akan meningkatkan regenerasi kerusakan jaringan.

Faktor-faktor yang diproduksi oleh MSCs meliputi faktor-faktor pertumbuhan seperti *hepatocyte growth factor* (HGF), *tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein* (TSG6), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), bFGF, *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL-2), *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), juga IL-6, TGF- β , *prostaglandin E2*, IDO, dan SDF-1. Secara bersama-sama faktor-faktor yang disekresi ini bisa menghambat respons inflamasi, memicu proses *angiogenic*, promosi endotelial,



Gambar 4.18 Aktivitas parakrin mesenchymal stromal cells (MSCs). Faktor-faktor yang disekresi MSCs bisa berinteraksi langsung proses selular yang berbeda seperti imunomodulasi, *chemoattraction*, proliferasi sel-sel progenitor, *angiogenesis* dan diferensiasi, semua di atas esensial untuk fungsi yang tepat dari sel punca di dalam tubuh. HGF: *hepatocyte growth factor*; IGF: *insulin-like growth factor 1*; TSG6: *tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*.⁴⁸

aktivitas fibroblast, dan fasilitasi proliferasi serta diferensiasi sel-sel progenitor ke dalam jaringan *in situ*.

Aktivasi MSCs merupakan hal yang esensial dalam memproduksi semua faktor-faktor ini. Stimulus inflamasi dan/atau *cross-talk* dengan sel-sel yang mengalami trauma bisa meningkatkan sekresi dan efek terapi MSCs, yaitu MSC yang tidak teraktivasi tidak menginduksi secara signifikan peningkatan faktor-faktor parakrin yang diperlukan dalam penggunaan terapi. Segera sesudah MSCs diaktivasi, produksi faktor-faktor pertumbuhan meningkat sampai level optimal sehingga bisa memberikan respons yang efisien. Kemokin-kemokin dilepas oleh MSCs bila sel menerima berbagai stimulasi, dan mulai menyekresi molekul-molekul *chemoattractant*.⁴⁸

Bila jaringan mengalami kerusakan, maka akan terjadi proses inflamasi akut. Pada saat fase pertama proses akut inflamasi, sitokin-sitokin pro-inflamasi diekspresikan dengan tinggi dan berkontribusi mengaktivasi sejumlah besar MSCs untuk memberikan respons immunosupresif. Berbagai prosedur dipertimbangkan untuk mengobati inflamasi akut, di antaranya pemberian sitokin-sitokin pro-inflamasi, atau menggunakan *inhibitor* anti-inflamasi sebelum terapi MSC.

Kontras dengan inflamasi akut, pada inflamasi kronik, selama remisi atau terapi immunosupresan, produksi pro-inflamasi berkurang sedangkan konsentrasi sitokin-sitokin anti-inflamasi seperti TGF- β akan meningkat. Di samping itu, pada kasus produksi IDO di bawah ambang immunosupresif, begitu juga kemokin-kemokin dapat menyebabkan limfosit T terlepas sehingga mereka akan mempromosikan respons imun.

Faktor-faktor immunosupresan yang disekresi MSCs tidak berguna sebagai *coadjuvants* obat-obatan immunosupresif konvensional. Meskipun keduanya memiliki efek yang hampir sama, baik immunosupresan dan MSCs menghambat respons inflamasi melalui penekanan sel-sel T efektor. Faktanya telah diobservasi bahwa efek immunosupresan MSCs dapat dikembalikan oleh pemberian obat immunosupresan seperti siklosporin A dan deksametason. Tidak hanya faktor-faktor endogen saja yang berdampak terhadap migrasi dan *homing*, tetapi juga dipengaruhi oleh berbagai faktor *in vitro*, yaitu faktor-faktor kultur seperti umur dan jumlah *pasage* sel, metode pengiriman, dan kondisi kultur. Sebagai contoh jumlah *passage* yang tinggi, maka efisiensi *engraftment* MSCs akan berkurang. Perlekatan MSC bisa dipengaruhi oleh prosedur *in vitro*, karena pola ekspresi $\alpha 4$ subunit of *VLA-4* bisa berbeda tergantung isolasi dan pengambilan dan juga tergantung donor dan spesies.

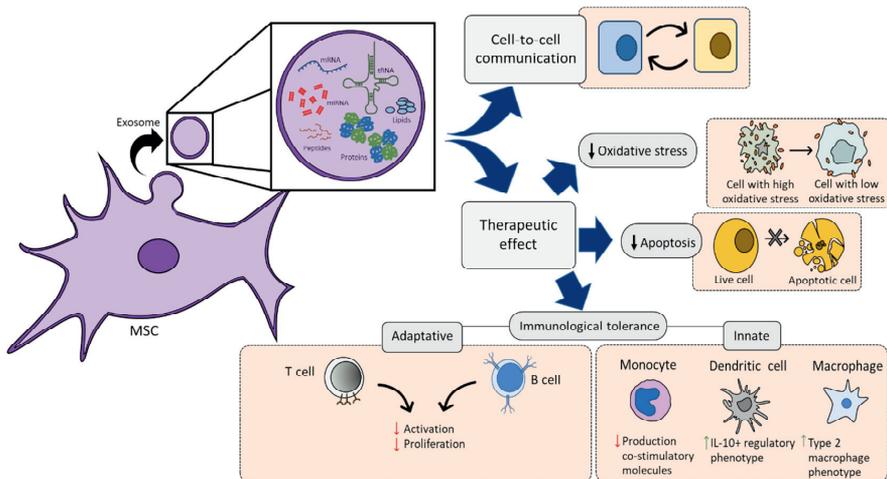
Tabel 4.3 Faktor-faktor parakrin yang disekresi oleh MSCs.⁴⁹

Faktor-faktor yang disekresi	Fungsi
<i>Basic fibroblast growth factor</i> (bFGF)	Proliferasi dan
<i>Granulocyte/macrophage colony stimulating factor</i> (G/M-CSF)	Mempertahankan Kehidupan Sel
<i>Insulin-like growth factor</i> (IGF)	
<i>Secreted frizzled-related protein-1</i> (SFRP1)	
<i>Secreted frizzled-related protein-2</i> (SFRP2)	
<i>Stanniocalcin-1</i> (STC-1)	
<i>Transforming growth factor b</i> (TGF-b)	
<i>Metalloproteinase-1</i> (MMP1)	Remodeling dari matriks ekstraselular
<i>Metalloproteinase-2</i> (MMP2)	
<i>Metalloproteinase-9</i> (MMP9)	
<i>Plasminogen activator</i> (PA)	
<i>Tumor necrosis factor-a</i> (TNF- a)	
<i>Angiopoietins</i> (ANGs)	Angiogenesis
<i>Fibroblast growth factor-2</i> (FGF-2)	
<i>Transforming growth factor- b</i> (TGF- b)	
<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	
<i>Hepatocyte growth factor</i> (HGF)	Immunomodulasi
<i>Human leukocyte antigen-G5</i> (HLA-G5)	
<i>Indoleamine 2,3-dioxygenase</i> (IDO)	
<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (iNOS)	
<i>Interleukin-6</i> (IL-6)	
<i>Interleukin-10</i> (IL-10)	
<i>Leukemia inhibitory factor</i> (LIF)	
<i>Prostaglandin E2</i> (PGE2)	
<i>Transforming growth factor- b</i> (TGF-b)	

Vesikel-vesikel ekstraselular MSC. Selain faktor-faktor yang disekresi, mekanisme protektif parakrin MSCs, meliputi produksi *extracellular vesicles* (EVs), yang terdiri dari eksosom (*exosomes*) dan mitokondria transfer. Dewasa ini telah diketahui bahwa EVs dari MSCs berisi muatan molekul-molekul vesikular yang meliputi *messenger RNA*, *transfer RNA*, *microRNA*, dan peptida/protein. EVs yang terbungkus lipid memiliki kemampuan untuk mediasi komunikasi sel ke sel dan bisa digunakan sebagai terapi pada berbagai trauma jaringan melalui perlemahan aktivasi sel imun, memperbaiki stres oksidatif, dan menurunkan apoptosis.

Eksosom diduga dinilai memainkan peran penting pada komunikasi antara MSCs dan sel di sekitarnya. Sebagai contoh ditunjukkan pada kultur *in vitro* sel mononuklir darah tepi, eksosom MSCs yang berasal dari *bone marrow* memiliki kemampuan menekan sekresi faktor-faktor pro-inflamasi TNF- α dan IL-1 β , di samping meningkatkan konsentrasi faktor anti-inflamasi TGF- β .

Beberapa penelitian mengindikasikan bahwa eksosom bisa berperan sebagai mekanisme baru dalam transfer miRNA di antara sel-sel untuk meregulasi ekspresi gen yang memiliki efek terapi pada hati, fibrosis, stroke, dan penyakit kardiovaskular. Lebih lanjut lagi efek terapi MSC-EVs juga telah diuraikan memberi respons imun adaptif dan *innate*. Berbagai penelitian telah menilai fungsi imunoregulator MSC-EVs pada model penyakit autoimun seperti model autoimun pada *murine* untuk diabetes tipe 1, eksperimental autoimun uveoretinitis, artritis yang diinduksi kolagen, sinovitis, dan sklerosis multipel. Pada model ini meningkatkan minat untuk menggunakan MSC-EVs pada penyakit autoimun manusia sebagai alternatif sel terapi.



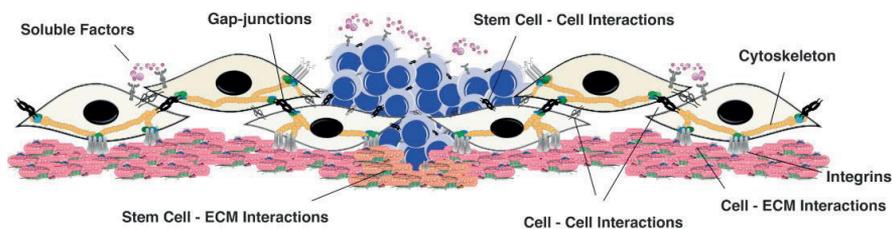
Gambar 4.19 Eksosom yang disekresi sel stromal menseskimal berperan dalam komunikasi antara sel, mencetuskan efek terapi dengan menurunkan stres oksidatif, meningkatkan perkiraan hidup sel dan menunjukkan toleransi imunologi melalui penurunan aktivasi dan proliferasi sel-sel imun adaptif dan diferensiasi sel-sel *innate* menuju regulasi fenotip.⁴⁸

Mengenai transfer mitokondria dari MSCs EVs, telah didemonstrasikan bahwa terjadi peningkatan aktivitas fagosit setelah transfer mitokondria dari MSC ke sel-sel imun *inate*. Contohnya pada terapi makrofag alveolar *murine* dengan EVs dari MSC akan menurunkan trauma paru oleh karena menginduksi fenotip makrofag anti-inflamasi dan fagosit melalui *EV-mediated* transfer mitokondrial.

Oleh karena MSC-EVs dikelilingi dua lapis fosfolipid, mereka lebih stabil bila dibekukan dan *thawing* daripada MSCs, sehingga lebih mudah disimpan. EVs memiliki beberapa keuntungan meliputi imunogenitas rendah, potensi formasi tumor tidak ada, stabilitas *in vivo* dan efisien dalam pengiriman. Dosis injeksi EVs dan rute pemberian akan berpengaruh pada pola biodistribusinya. Penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk menambah pengetahuan tentang fungsi MSC-EVs.

Niches Sel Punca

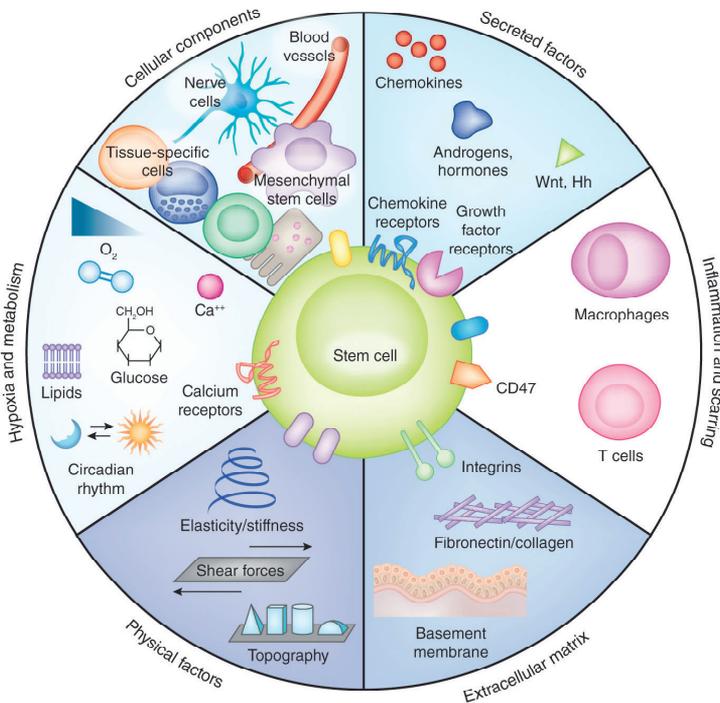
Definisi *niches* sel punca adalah lingkungan mikro lokal khusus yang sangat penting untuk fungsi normal sel punca seperti *self-renewal*, proliferasi, dan diferensiasi. Berbagai eksperimen telah menunjukkan dampak yang sangat besar dari lingkungan sel punca terhadap nasib sel punca. *Niches* sebagai rumah sel punca dan sel progenitor merupakan konstruksi tiga dimensi yang terdiri dari sel-sel stromal tetangga yang akan meregulasi populasi sel punca melalui interaksi antara sel, faktor-faktor terlarut endogen maupun eksogen, ECM khusus dengan sifat fisik, struktural, dan mekanikal sebagai tempat tinggalnya.^{44,46,50}



Gambar 4.20 Skema kondisi lingkungan mikro yang mengoordinasikan keseimbangan antara *self-renewal* sel punca dan diferensiasi menjadi sel *mature* yang fungsional.⁵⁰

Secara alami, *niches* memiliki sifat yang unik dan spesifik pada interaksinya dengan populasi sel punca yang asalnya sama, tetapi penting untuk diketahui banyak faktor-faktor pembentuk yang sama (walaupun tidak semuanya) pada sel punca.^{44,46,50}

1. Interaksi antara sel-sel yang heterogen selalu ada dan sering menampilkan sinyal kompleks dua arah yang tergantung keketatan regulasi dan kontak antara sel dengan sel. Sebagai contoh kelebihan dan kekurangan sinyal Wnt di dalam *niche* endosteal bisa menimbulkan konsekuensi yang jelek terhadap HSCs. *Niches* sel punca berisi baik populasi sel jaringan spesifik (osteoblas) dan jaringan yang sifatnya umum (endotel atau stromal) yang memiliki peran khusus.



Gambar 4.21 *Niches* sel punca sangat kompleks, heterotopik, struktur dinamis yang meliputi komponen-komponen selular yang berbeda, faktor-faktor yang disekresi, kontrol imunologik, ECM, parameter-parameter fisik, dan kontrol metabolik.⁵¹

2. Sekresi dan faktor-faktor yang melekat di membran sel seperti Wnt, SCF, Notch, dan kemokin-kemokin langsung berikatan dengan reseptor permukaan sel punca untuk meregulasi perjalanan sel punca, regulasi, dan polaritas.
3. Sel-sel imunologi memberikan regulasi dinamik *niche* selama inflamasi dan kerusakan jaringan, dan hal ini diatur dengan ketat melalui adanya *immune privilege* dan penyingkiran dari *privilege* ini.
4. Protein-protein ECM berperan besar terhadap orientasi dan pemeliharaan struktur *niche*, juga berperan penting dalam memberi sinyal intruksi melalui interaksi *ligand* dengan ekspresi integrin pada sel punca dan bertindak sebagai penyimpanan faktor-faktor terlarut.
5. Parameter fisik seperti bentuk, kekakuan atau kelenturan dan aliran darah langsung untuk pemeliharaan dan diferensiasi sel punca.
6. Banyak *niches* sel punca memiliki karakter lingkungan yang berubah seperti hipoksia dan membutuhkan regulasi metabolik yang ketat untuk mempertahankan status *quiescence* yang lama dan *self-renewal* populasi sel punca.

BIOREAKTOR

Rekayasa jaringan bertujuan mengembangkan metode dan teknologi untuk menciptakan konstruksi jaringan *in vitro* yang memiliki morfologi jaringan spesifik, biologi, kimia, dan sifat mekanik juga fungsi yang sama dengan jaringan *in vivo*. Pada lingkungan asli, jaringan merupakan lingkungan makro dan mikro yang kompleks, memberi informasi ke seluruh organisme, yang menentukan fungsi spesifik jaringan. Lingkungan *in vitro* untuk rekayasa jaringan harus mirip dengan kondisi *in vivo*. Sesuai dengan paradigma rekayasa jaringan, regenerasi jaringan meliputi beberapa tahapan proses dimulai dari isolasi sel dari biopsi, ekspansi sel *in vitro*, generasi, dan maturasi konstruksi tiga dimensi dan penggunaan konstruksi baik untuk sistem percobaan maupun graf. Dalam proses ini ada beberapa sistem bioreaktor berbeda yang bisa digunakan untuk memperbaiki ketahanan, reliabilitas, efisiensi tahapan proses tertentu atau untuk seluruh siklus rekayasa jaringan.^{30,52}

Selama ekspansi sel, bioreaktor memiliki potensi menurunkan biaya dan meningkatkan efisiensi proses daripada bila menggunakan teknisi laboratoris.

Kondisi kultur sel yang dinamis dan terkontrol dapat mengatasi kendala kondisi kultur sel statis. Sebagai contoh perfusi kontinyu sistem kultur selama ekspansi menghasilkan perbaikan yang konsisten terhadap distribusi nutrisi dan produk sampah. Area dengan konsentrasi produk metabolik yang tinggi di sekitar sel akan secara aktif diganti dengan media kultur segar. Sebagai pembanding pada proses kultur manual komposisi kultur media tidak berubah karena media diganti secara periodik, tidak kontinyu.

Pada fase *seeding* jaringan dengan sel, kondisi kultur diubah dari 2 dimensi ke 3 dimensi. Pada saat rekayasa jaringan dimulai, kultur sel konvensional berakhir. Lingkungan 3 dimensi lebih realistis dalam membantu proses pengembangan jaringan seperti pola yang berulang. Seperti pembentukan *in vivo*, pembentukan jaringan *in vitro* tidak terpisahkan dengan prinsip organisasi spasial dan temporal. Pada proses ini pola molekul-molekul aktif secara biologi akan mengarahkan pengembangan jaringan yang dibentuk oleh proses biologi dan fisik, seperti sintesis molekul, transpor masa, pengikatan, konsumsi, dan degradasi. Sebaliknya pada kultur sel *monolayer* konvensional, transpor molekul bioaktif berbeda sehingga pola pembentukan menjadi bias. Pada kasus kultur sel konvensional substansi *messenger* yang disintesis bisa ditransportasi pada bagian encer dari fase cair. Bahkan pada sistem yang lebih kompleks dan realistis seperti plasma darah, koefisien difusi protein-protein seperti urea, kreatinin, dan asam urat kira-kira 30% lebih rendah dari air pada suhu 37°C. Selanjutnya yang dipertimbangkan adalah struktur fungsional, seperti komponen ekstraselular matriks (ECM), yang menunjukkan level kompleksitas lain karena mekanisme tambahan seperti ikatan protein. Sebagai contoh kapasitas ikatan VEGF-A yang terdapat daerah ikatan, terdapat pada struktur ECM sangat penting untuk percabangan pembuluh darah. Percabangan pembuluh darah ini sangat penting untuk formasi jaringan pembuluh darah yang padat. Sebagai hasil, kultur sel pada 2 dimensi sangat terlalu artifisial dan lemah dalam parameter-parameter yang penting untuk reproduksi akurat struktur dan fisiologi jaringan.

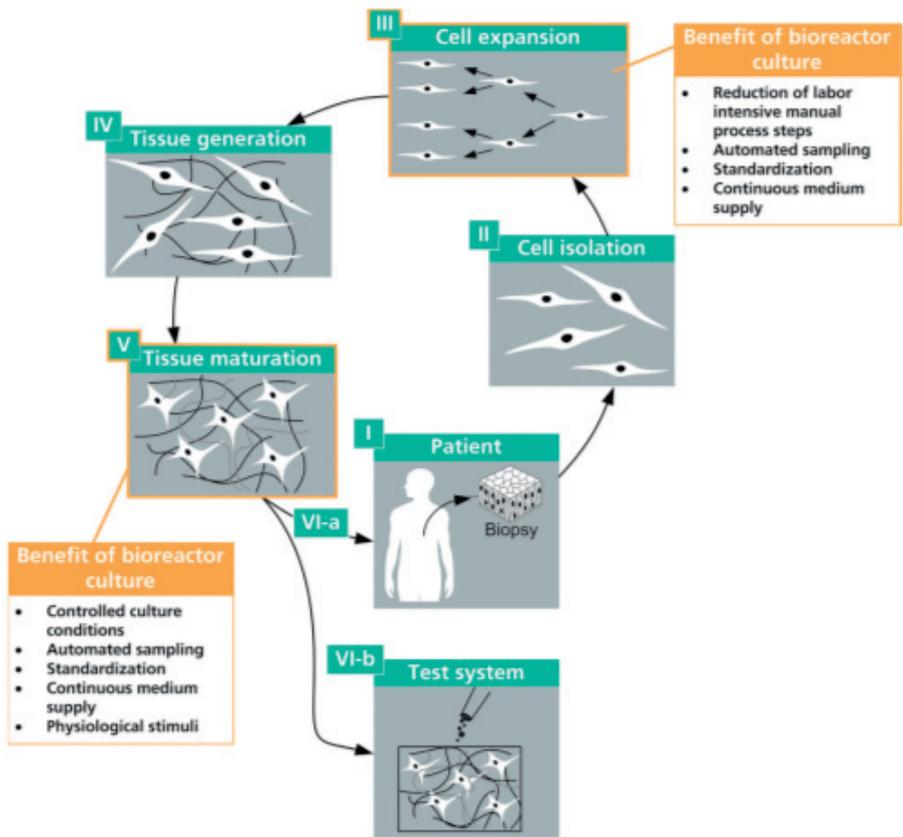
Bila dapat melakukan lingkungan kultur 3 dimensi, mekanisme transpor masa dan *cross talk* selular sama dengan *in vivo*. Transpor nutrisi juga terpengaruh. Suplai nutrisi yang cukup ke struktur 3 dimensi merupakan tantangan besar pada rekayasa jaringan dan hal ini merupakan faktor yang membatasi pengembangan konstruksi dan implantasi jaringan bioartifisial. *In vivo viability* sel-sel dipelihara

oleh jaringan vaskular yang rapat dengan lebar jarak 100-200 μm . Sebagai konsekuensinya pembuatan jaringan dengan aktivitas metabolik tinggi tidak hanya tergantung pada transpor masa pasif berdasarkan difusi, tetapi mekanisme aktif seperti perfusi dan konveksi. Jadi pergeseran dari jaringan 2 dimensi menjadi 3 dimensi juga membutuhkan perubahan dari kultur statik menjadi kultur dinamik pada hampir semua jaringan.

Setelah *seeding* populasi sel yang sudah diekspansikan ke *scaffold* spesifik, konstruksi jaringan yang dibuat memerlukan fase maturasi. Pada saat ini sel-sel bisa adaptasi ke lingkungan 3 dimensi, menghasilkan ECM dan terjadi interaksi antar sel. Selama fase ini pengembangan jaringan diarahkan oleh berbagai sinyal. Terlepas dari interaksi antar sel, sel ke matriks dan faktor terlarut, stimulus fisik seperti sinyal mekanikal, elektrik, dan elektromagnetik sangat penting untuk membentuk fungsi jaringan. Sebagai contoh stres *shear* penting untuk *remodeling* sistem vaskular atau beban mekanik memengaruhi adaptasi struktur skeletal. Lebih lanjut lagi medan elektrik telah diidentifikasi sebagai salah satu pencetus terbesar untuk mengarahkan penyembuhan kulit.

Mempertimbangkan seluruh persyaratan, kunci objektif bioreaktor adalah suplai nutrisi dan oksigen yang cukup begitu juga pengambilan produk sampah, dan satu hal lagi adalah mirip dengan kondisi *in vivo*. Selain aspek yang berhubungan dengan sains, sistem bioreaktor bisa menjadi faktor untuk suksesnya komersialisasi proses rekayasa jaringan. Kebutuhan lebih lanjut seperti operasional yang mudah atau memenuhi regulasi GMP juga diperlukan oleh sistem bioreaktor.

Bioreaktor didefinisikan sebagai alat yang memberikan kebutuhan fisiologis sel-sel (nutrisi, faktor-faktor pertumbuhan dan lingkungan mekanik) untuk penelitian selular dan meningkatkan produksi sel dan produk-produknya. Sistem bioreaktor memberi kondisi kultur fisikokemikal terkontrol yang diperlukan untuk menunjang rekayasa jaringan. *Seeding* sel yang seragam adalah penting dan paling sering menggunakan metode meneteskan sel suspensi melalui pipet ke dalam *scaffold* berpori. Metode ini kurang terkontrol. Bioreaktor *stirred-flask* bisa meningkatkan kontrol *seeding* bila *scaffold* relatif tipis dan berpori, tetapi kepadatan sel yang tinggi sering timbul pada permukaan (*donut effect*), karena penetrasi yang kurang atau sel *survival* di interior. *Dynamic laminar flow in rotating wall vessels* dihubungkan dengan menurunnya *shear* dan meningkatnya keseragaman *seeding*

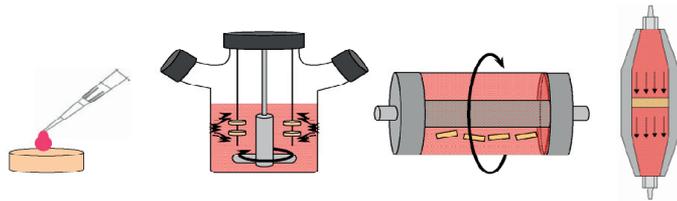


Gambar 4.22 Paradigma rekayasa jaringan: keuntungan kultur bioreaktor.⁵²

sel dan transpor masa. Bioreaktor perfusi efektif dan *reproducible* untuk *seeding* seragam dan membuat lingkungan kultur fisikokemikal yang baik, penting untuk formasi model penyakit rekayasa jaringan dengan ukuran klinik yang relevan.

Bioreaktor yang menerapkan beban mekanik dinamis untuk stimulasi stres beban fisiologis pada sendi *load-bearing* bisa digunakan untuk membuat model jaringan rekayasa *in vitro* pada kartilago dan tulang manusia. Setiap sendi osteokondral secara *in vivo* terus menerus menerima stres siklik intermiten. Stres ini bisa diklasifikasikan dalam 2 kategori: stres kompresi dan stres *shear*. Pada jaringan asli, stres kompresi didukung oleh komponen cairan *incompressible*, sedangkan stres *shear* didukung oleh arsitektur matriks. Efek dramatis pada

perkembangan jaringan kartilago dan tulang telah ditunjukkan sebagai respons terhadap stres dinamis, tetapi respons tergantung besar dan frekuensi respons spesifik, begitu tahapan perkembangan jaringan. Dinamik kompresi bisa meningkatkan produksi ECM kartilago, sedangkan *fluid flow-induced shear* juga terlihat mempromosikan ekspresi gen osteokalsin dan osteopontin pada MSC. Model *in vitro* kondrosit manusia telah digunakan untuk menunjukkan bahwa kompresi dinamis bisa membalikan IL-1 menginduksi pelepasan *nitric oxide* dan prostaglandin (PGE2). Oleh karena itu aplikasi beban mekanik bisa menjadi model *in vitro* untuk lingkungan sendi dan besar beban yang sesuai untuk menstimulasi penyakit sendi bisa memberikan gambaran tentang patologi penyakit.



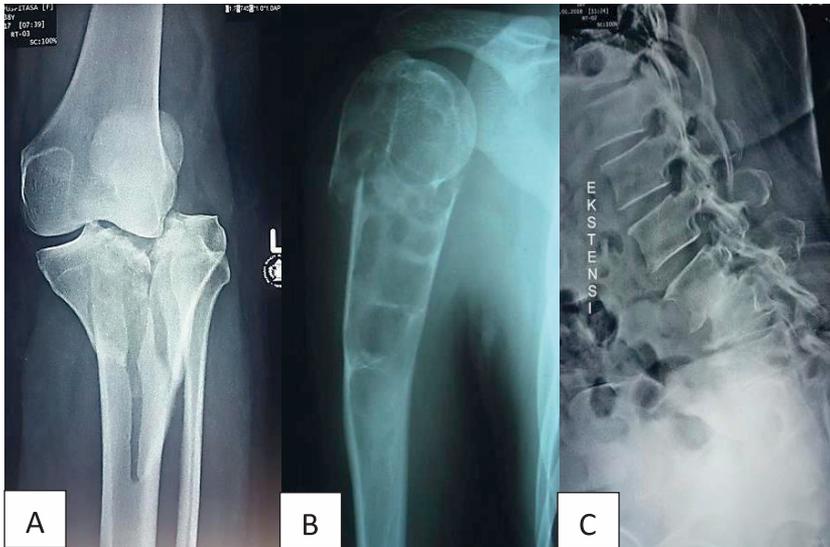
	Static cell seeding method	Stirrer Flask Bioreactor	Rotating wall Vessel Bioreactor	Perfusion Bioreactor
Cell seeding uniformity	User dependent High variability	Improved uniformity than static	Improved uniformity than stirred flask	Improved uniformity than other systems
Fluid flow pattern	None-Gravitational settling	Turbulent flow-around the scaffold	Laminar flow-around the scaffold	Laminar flow-through the scaffold
Mass transfer	Molecular diffusion	Turbulent convection	Convection	Convection due to continuous recirculation
Medium exchange	Batch wise	Batch wise	Batch wise	Continuous recirculation

Gambar 4.23 Keuntungan dan kerugian *seeding* statik dan dinamik: *seeding* dinamik bisa membentuk lingkungan mikro jaringan yang seragam.

Rekayasa Jaringan Tulang (*Bone Tissue Engineering*)

Gangguan penyembuhan tulang disebabkan oleh trauma dan komplikasinya, seperti fraktur tertutup kominutif, fraktur terbuka dengan hilangnya tulang (*bone lose*), *delayed union*, *non-union*, begitu juga penyakit pada tulang yang menimbulkan defek pada tulang, seperti osteomielitis, kelainan kongenital, tumor ganas maupun jinak, degeneratif, dan kehilangan tulang (*bone loosening*) sebagai komplikasi artroplasti yang memerlukan berbagai opsi terapi utamanya dengan *graft* tulang. Transplantasi tulang (*bone grafting*) merupakan metode pembedahan yang paling banyak digunakan untuk rekonstruksi dan memfasilitasi regenerasi tulang dalam bidang ortopedi, kedokteran gigi, dan bedah maksilofasial. Tulang merupakan jaringan tubuh kedua terbanyak yang ditransplantasikan pada tubuh manusia setelah transfusi darah, lebih kurang 3,5 juta prosedur *graft* tulang dilakukan setiap tahun di seluruh dunia.

Dalam penanganan gangguan penyembuhan akibat fraktur, komplikasi fraktur maupun penyakit tulang, problem dasar dari terjadinya gangguan



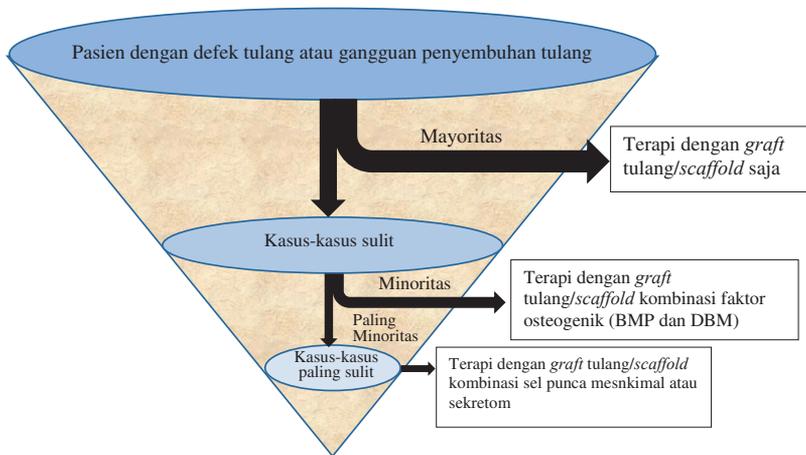
Gambar 5.1 Trauma dan penyakit pada tulang yang membutuhkan *graft* tulang. Keterangan: (A) Fraktur tibial plateau (trauma), (B) *aneurysmal bone cyst* (ABC) dengan komplikasi fraktur patologis (tumor), dan (C) Spondilolistesis VL4–5 (degeneratif).⁹

tersebut harus dianalisis dengan cermat untuk mendapatkan solusi yang tepat. Pada fraktur terdapat beberapa faktor yang harus menjadi pertimbangan. Lokasi fraktur berdampak terhadap penyembuhan fraktur. Tulang kanelos (metafisis) dan tulang kortikal (diafisis) memiliki struktur yang berbeda. Tulang kanelos memiliki area permukaan yang luas, aliran darah yang baik, dan memiliki jumlah sel punca yang banyak. Sebaliknya, aliran darah dan sel punca lebih sedikit pada tulang kortikal, sehingga tergantung pada sel punca dari luar tulang dan area permukaan yang sempit. Pada fraktur tulang kanelos, misalnya fraktur tibial plateau, sebagian besar fungsi *graft* tulang adalah sebagai pengisi ruang kosong setelah dilakukan rekonstruksi permukaan sendi. Hal ini dikarenakan tulang kanelos banyak mengandung sel punca dan kaya akan aliran darah, maka pemilihan *graft* tulang cukup dengan yang hanya memiliki sifat osteokonduktif saja baik dalam bentuk pasta, granul, maupun blok. Graf tulang yang memiliki kekuatan mekanis yang jarang dibutuhkan, sebab telah digunakan implan sebagai penopang fraktur sampai mengalami penyembuhan.⁹

Lain halnya dengan tulang kortikal (diafisis), yang membutuhkan evaluasi yang adekuat untuk mengetahui prognosis penyembuhan fraktur. Evaluasi vaskularisasi yang berkaitan dengan tipe fraktur sangat memengaruhi pemilihan *graft* tulang. Fraktur tulang kortikal simpel dengan energi trauma rendah sebagian besar tidak membutuhkan *graft* tulang atau bila ada defek kecil, maka digunakan *graft* tulang yang memiliki sifat osteokonduktif. Kondisi klinis yang paling menantang adalah trauma pada diafisis, terutama pada tibia dengan energi trauma yang besar. Kondisi ini biasanya diikuti dengan fraktur terbuka, tipe fraktur kominutif dan dapat disertai dengan defek tulang besar, serta kerusakan jaringan lunak yang hebat. Gangguan vaskularisasi dan kurangnya jumlah sel yang dapat memproduksi tulang, berpotensi menghambat penyembuhan tulang. Tujuan terapi pada fraktur ini adalah untuk memperbaiki vaskularisasi dan memberikan *graft* tulang yang bersifat osteoinduktif dan osteokonduktif. Selain itu, akan lebih baik lagi apabila memiliki sifat osteogenesis. Pilihan *graft* tulang dapat berupa kancellor *autograft*, *graft extender* yang merupakan kombinasi antara *graft* yang bersifat osteoinduktif (mineral alami maupun sintesis) dengan *graft* yang bersifat osteoinduktif (DBM), osteogenesis (*bone marrow*), maupun yang memiliki ketiganya (kancellor *autograft*).⁹

Critical sized defect (defek tulang berukuran lebih besar dari 2,5 kali diameter tulang) memerlukan rekonstruksi yang kompleks untuk mengembalikan fungsi anatomi dan fungsi anggota gerak. Beberapa opsi yang tersedia, yaitu rekonstruksi biologi seperti distraksi osteogenesis, *massive bone allograft*, *graft* tulang dengan vaskularisasi dan teknik *induced membrane*, serta rekonstruksi menggunakan implan. Opsi tersebut memerlukan modifikasi dan penambahan untuk memperkuat efektivitas terapi pada beberapa kondisi gangguan penyembuhan tulang yang berat. Dalam hal ini, sel punca dengan produk metabolitnya, memiliki potensi yang besar sebagai solusi.

Mayoritas terapi defek pada tulang akibat trauma beserta komplikasinya atau akibat penyakit pada tulang bisa diatasi dengan pemberian *graft* tulang/*scaffold* saja. *Graft* tulang/*scaffold* dapat diperoleh melalui sumber natural seperti *autograft* yang berasal dari tubuh sendiri, *allograft* yang berasal dari donor, *xenograft* yang berasal dari hewan atau dari berbagai bahan sintesis seperti hidroksiapatit, trikalsium fosfat, bifasik kalsium fosfat, dan lain-lain. Terapi dengan *scaffold* saja, biasanya diberikan pada defek di daerah metafisis atau pada daerah lain di mana tidak ada faktor pemberat. Penggunaan *graft* tulang/*scaffold* bisa juga



Gambar 5.2 Skema alur dalam mengambil keputusan untuk penatalaksanaan defek tulang. Mayoritas pasien cukup mendapat terapi dengan *graft/scaffold* saja. Minoritas membutuhkan kombinasi antara *graft/scaffold* dengan faktor-faktor pertumbuhan untuk menginduksi sel-sel tuan rumah. Sisanya, sangat sedikit kasus yang membutuhkan kombinasi *scaffold* dengan sel punca mesnkimal. BMP: *bone morphogenic protein*. DBM: *demineralized bone matrix*.

dikombinasikan dengan faktor-faktor osteogenik seperti BMP maupun DBM yang berfungsi menginduksi sel tuan rumah, namun penggunaan kombinasi ini tidak banyak pengaplikasiannya dan dicadangkan untuk defek tulang dengan faktor penyulit seperti defek tulang pada diafisis dengan cedera jaringan lunak yang hebat, atropi *non-union* atau prosedur fusi pada tulang belakang. Tantangan terbesar dalam rekonstruksi terdapat pada kasus yang sangat sulit seperti *massive bone defect*. Meskipun kasusnya sangat jarang, hal ini seringkali menimbulkan problem fungsional yang besar. Dalam hal ini, kombinasi *graft tulang/scaffold* dengan sel punca menjadi solusi yang diharapkan dapat mengatasi problem ini.

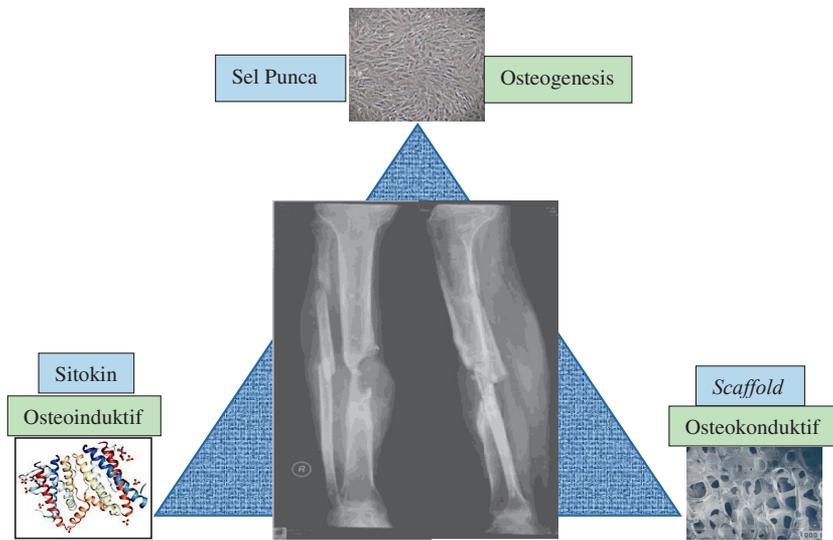
GRAFT TULANG DAN SUBTITUTES UNTUK TERAPI DEFEK TULANG

Fungsi utama *graft* tulang dan *substitute*-nya adalah sebagai penunjang mekanik dan osteointegrasi. *Graft* tulang bisa didapatkan dari berbagai sumber, baik dari tubuh sendiri (*autograft*), dari donor (*allograft*), dari hewan (*xenograft*), maupun dari berbagai bahan sintesis. *Graft* tulang yang ideal harus memiliki sifat osteogenesis, osteoinduktif, dan osteokonduktif.

Sifat osteogenesis, diinduksi oleh keberadaan sel punca mesenkim, sel-sel prekursor osteogenik, dan osteoblas di dalam *graft* tulang autologus. Sel-sel ini akan menyintesis tulang baru pada daerah resipien, yaitu tempat *graft* tulang diletakkan. Sifat osteogenesis ini dapat terganggu bila teknik pengambilan dan preparasi *graft* tidak dioperasikan dengan baik sehingga terjadi osteonekrosis. Pengambilan *graft* yang cermat dan teknik implantasi yang baik merupakan faktor yang penting, diikuti dengan waktu yang singkat antara pengambilan *graft* dan implantasi serta penyimpanan yang baik apabila diperlukan. *Graft* tulang autologus yang berasal dari krista iliaka atau tibial plateau, merupakan tulang kancellus dengan jumlah sel osteogenik yang cukup banyak, sedangkan bila berasal dari tulang kortikal, jumlah sel osteogenik lebih sedikit. Tulang *allograft* yang dibiarkan berada di luar pada saat proses pengolahan akan membuat tulang menjadi mati akibat kehilangan sifat osteogenesis.^{9,30}

Sifat osteoinduktif merupakan proses aktif, di mana *graft* tulang akan merekrut sel-sel pembentuk tulang dari tempat resipien untuk membentuk tulang baru. Osteoinduktif menunjukkan kemampuan *graft* tulang dalam mengirim sinyal-sinyal untuk merekrut, proliferasi, dan diferensiasi sel punca mesenkim atau sel progenitor menjadi sel pembentuk tulang (osteoblas) yang menghasilkan formasi tulang dengan mineralisasi yang normal. Sifat osteoinduktif tergantung pada keberadaan faktor-faktor pertumbuhan (*growth factors*). Pada *graft* tulang autologus ditemukan pada beberapa faktor pertumbuhan. Di antaranya terdapat anggota dari *transforming growth factor- β superfamily* (TGF- β); *bone morphogenetic protein* [BMP]-2, BMP-4); dan faktor angiogenesis seperti *fibroblast growth factor* (FGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), dan *platelet-derived growth factor* (PDGF), serta *insulin growth factor 1* (IGF1) yang memiliki efek untuk migrasi dan diferensiasi sel.^{9,30}

Sifat osteokonduktif merupakan proses pasif yang menunjukkan kemampuan sel-sel pembentuk tulang (osteoblas) dari resipien yang dapat masuk ke dalam *graft* tulang, secara perlahan-lahan menggantinya dengan tulang baru. Osteokonduktif material bertindak sebagai *scaffold* dalam membantu sel tulang osteoblas dan osteoklas untuk melekat, migrasi, tumbuh, dan membelah. Sifat ini tergantung pada struktur tiga dimensi dari *graft* tulang dan menentukan kecepatan osteointegrasi *graft*. Bila osteointegrasi tulang kortikal dibandingkan dengan tulang kancellus yang *porous*, maka *graft* tulang kancellus lebih cepat mengalami inkorporasi.^{9,30}



Gambar 5.3 Trias rekayasa jaringan. Terdiri dari sel punca, sitokin, dan *scaffold* (kotak biru), memiliki kesamaan dengan sifat *graft* yang ideal, yaitu osteogenesis, osteoinduktif, dan osteokonduktif.⁹

Sifat *graft* tulang yang ideal adalah *graft* yang memiliki sifat osteogenesis, osteoinduktif, dan osteokonduktif, di mana sifat *graft* yang ideal ini telah dikenal lama pada bidang ilmu ortopedi, maka jika dibandingkan dengan trias rekayasa jaringan yang dikenal kemudian, terlihat bahwa sifat-sifat *graft* tulang ini memiliki kesamaan dengan trias rekayasa jaringan.

Graft Tulang Natural

Graft Tulang Autologous

Graft tulang *autologous* (*bone autograft*) merupakan jaringan tulang yang diambil dari satu individu dan dikembalikan (transplantasi) ke individu itu sendiri dalam rangka memfasilitasi penyembuhan tulang. *Graft* tulang ini memiliki sifat osteogenesis, osteoinduktif, dan osteoinduktif sehingga bisa berintegrasi dengan cepat dan utuh dengan tulang di mana *graft* tersebut diletakkan. Oleh karena itu, *graft* tulang ini menjadi standar baku (*gold standard*) dalam penatalaksanaan defek tulang dan sebagai acuan dalam mengevaluasi *graft* tulang lain beserta *substitute*-nya. Walaupun telah menjadi standar baku, *graft* tulang ini memiliki

kelemahan yang telah dipublikasikan oleh berbagai peneliti. Kelemahan ini meliputi komplikasi pada daerah donor dan nyeri, peningkatan kehilangan darah, dan waktu operasi karena membutuhkan operasi kedua yang berpotensi menimbulkan infeksi pada darah donor serta jumlah *graft* tulang, ukuran, dan bentuk yang didapatkan terbatas.^{9,30}

Pengembangan sistem *reamer-irrigator-aspirator* (RIA) memberikan alternatif *graft* tulang konvensional yang biasanya diambil dari krista iliaka. Dengan teknik ini, *graft* tulang diambil dan dikumpulkan dari intramedula femur atau tibia selama proses *reamer* untuk persiapan pemasangan implan *nail*. Pada *review* sistematis meliputi 6000 pasien, angka komplikasi menggunakan alat RIA berkurang sampai 6% dibandingkan 19,3% dari krista iliaka, sedangkan volume tulang yang bisa diambil dari rata-rata 15-20 ml dari pengambilan krista iliaka menjadi 40 ml bila menggunakan RIA. Dengan membandingkan *graft* tulang yang diambil dari berbagai bagian tubuh pasien yang sama, level ekspresi gen yang dikaitkan dengan vaskular, jaringan skeletal dan hematopoietik lebih tinggi pada RIA dibandingkan tulang krista iliaka, sedangkan sel punca dan faktor-faktor pertumbuhan juga lebih banyak pada RIA. Komplikasi RIA yang telah didokumentasi meliputi fraktur iatrogenik, perforasi bagian anterior kortek, perdarahan, dan osifikasi heterotopik.

Autograft kancellor merupakan *graft* tulang yang paling banyak digunakan karena memiliki sedikit osteoblas dan osteosit, sebaliknya sel punca mesenkimal yang bertahan hidup berjumlah banyak sebagai akibat iskemi selama transplantasi, sehingga memelihara potensi dan kemampuan membentuk tulang baru dari *graft*. Permukaan yang besar pada *autograft* kancellor memfasilitasi revaskularisasi inkorporasi *graft* dengan tulang lokal yang lebih superior. Apabila *autograft* diproses dengan benar, protein dari *graft* yang memberi sifat osteoinduktif pada *graft* akan tetap tersedia. Pada fase awal transplantasi *autograft*, hematoma, dan inflamasi terjadi dengan cepat kemudian perekrutan MSCs yang akan diletakkan pada jaringan granulasi fibrosa. Sementara itu jaringan nekrosis akan dieliminasi oleh makrofag dan kemudian timbul vaskularisasi baru (*neovascularization*). Selanjutnya, selama inkorporasi *autograft*, lapisan osteoid diproduksi oleh osteoblas di sekitar jaringan nekrosis, proses ini bersamaan dengan terbentuknya formasi tulang baru oleh akumulasi sel-sel hematopoietik di dalam tulang yang ditransplantasikan. Proses ini akan menyebabkan resorpsi komplisit dan penggantian *graft* yang biasanya dapat terjadi dalam waktu 6-12 bulan.

Autograft kortikal memiliki integritas struktural yang sempurna dan mendukung kekuatan mekanik, tetapi memiliki keterbatasan dalam jumlah sel-sel osteoprogenitor. Berbeda dengan *graft* kancellus autologus dan *creeping substitution autograft* kortikal terutama yang dimediasi oleh osteoklas setelah respons formasi hematoma cepat dan inflamasi pada fase awal regenerasi tulang, karena arsitekturnya yang padat sehingga revaskularisasi dan proses *remodeling* sangat terbatas. Konsekuensinya, aposisi pertumbuhan tulang pada daerah nekrosis merupakan inkorporasi dominan pada *autograft* kortikal yang diikuti dengan resorpsi osteoklas. Proses ini bisa berlangsung selama bertahun-tahun tergantung besarnya *graft* dan tempat implantasi.

Graft Tulang Allogenic

Graft tulang *allogenic* (*allograft*) merupakan jaringan tulang yang diambil dari donor satu spesies. Karena keterbatasan *graft* tulang autologus, *allograft* tulang merupakan alternatif terbaik bagi *autograft* dan telah digunakan secara efektif pada praktik klinik dalam berbagai jenis kasus, terutama pada pasien dengan potensi penyembuhan yang rendah, *non-union*, dan fraktur kominitif yang berat. *Allograft* bisa dibentuk dan diproduksi dalam berbagai bentuk dan ukuran, meliputi tulang kortikal, kancellus, dan produk turunannya (seperti *demineralized bone matrix/DBM*). Dibandingkan dengan *autograft*, *allograft* dapat menimbulkan respons imunogenik dan angka kegagalan tinggi, yang disebabkan oleh aktivasi antigen *major histocompatibility complex* (MHC). Fase osteoinduksi awal bisa dirusak oleh respons imun dan sel-sel inflamasi, yang dengan cepat mengelilingi pembuluh darah baru, menyebabkan nekrosis sel-sel osteoprogenitor. Oleh karena reaksi ini, *graft* tulang *allograft* tidak boleh digunakan dalam bentuk yang masih segar tanpa diproses terlebih dahulu. Isu lain yang berkaitan dengan *graft* tulang *allograft* adalah kemungkinan bisa menimbulkan penularan penyakit. *Graft* tulang *allogenic* biasanya diproduksi oleh Bank Jaringan. Bank Jaringan akan melakukan serangkaian proses yang cermat dan teliti untuk menjamin keamanan jaringan melalui pemrosesan yang bisa menurunkan antigen pada tulang disertai sterilisasi untuk menjamin tidak terjadi penularan penyakit. Di samping itu proses di Bank Jaringan juga bisa menjaga sifat biologi tulang sehingga dapat digunakan secara efektif untuk memfasilitasi penyembuhan tulang. Dengan demikian, Bank Jaringan memproses *graft* tulang *allogenic* dengan tujuan mendapatkan *graft* yang aman dan berkualitas.^{30,53}

Allograft kancellor merupakan tipe *graft* tulang *allogenic* yang paling banyak digunakan dan umumnya didistribusikan dalam bentuk blok kubikal. Oleh karena memiliki kekuatan mekanik dan kemampuan untuk promosi penyembuhan tulang yang lebih lemah daripada autograft, *allograft* kancellor yang telah diproses utamanya digunakan untuk penguatan pada fusi tulang belakang dan sebagai material pengisi pada defek tulang. Dibandingkan dengan *autograft*, proses inkorporasi *allograft* hampir sama tetapi berjalan lebih lambat. Osteointegrasi bisa melambat karena respons imunologi yang akan menimbulkan pembentukan jaringan fibrosa di sekitar *graft*, insiden kejadian ini terjadi kurang dari 10% pada penggunaan *allograft*. Tulang *allograft* terperangkap di tengah dan tidak pernah mengalami resorpsi komplisit betahun-tahun setelah transplantasi.

Allograft kortikal memiliki sifat mekanikal yang kaku seperti kondisi aslinya dan terutama digunakan pada tulang belakang untuk mengisi defek yang besar di mana dibutuhkan kemampuan untuk menerima beban, juga digunakan untuk *graft* tulang interkalari dan osteokondral pada tulang panjang. Untuk menurunkan respons imun dan faktor keamanan, maka terlebih dahulu tulang diproses dengan baik melalui proses *deep frozen* -800°C selama minimal 3 bulan maupun *freeze-dried*, sehingga bebas dari darah dan *marrow*. Inkorporasi tulang kortikal juga dimulai dengan *creeping substitution*, yang sama dengan proses pada *autograft*. Secara umum dimulai dengan proses resorpsi osteoklas dan diikuti formasi tulang baru secara sporadis melalui proses osteoinduksi. Pada transplantasi tulang kortikal *allograft* ukuran besar (*massive bone allograft*), maka inkorporasi tulang hanya terjadi pada daerah kontak antara tulang *allograft* dengan tulang tuan rumah. Sedangkan, di bagian tengah tulang *allograft*, tulang yang mati tetap berfungsi sebagai implan, sehingga suatu saat akan mengalami *fatigue*.

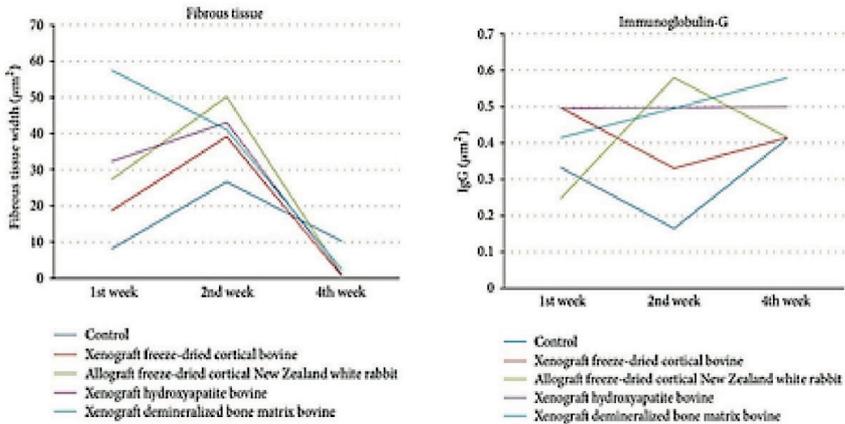
Demineralized bone matrix (DBM) adalah tulang *allograft* yang diproses dengan asam lemah untuk mengambil sebagian besar mineral tulang, sehingga masih terdapat matriks organik tulang, yaitu kolagen protein non kolagen dan faktor-faktor pertumbuhan yang memiliki sifat osteoinduktif dan osteokonduktif. Integritas struktural dan sifat mekanikal *graft* ini inferior, sehingga penerapan dari *graft* ini secara spesifik digunakan sebagai pengisi defek pada tulang. Sifat osteokonduktif DBM menjadi kerangka untuk populasi sel dan untuk regenerasi tulang setelah proses demineralisasi. Sifat osteoinduktif DBM utamanya ditentukan oleh faktor-faktor pertumbuhan yang ada dan sangat

berhubungan dengan metode pemrosesan. Sebagian besar DBM komersial yang tersedia umumnya dilakukan dengan 0,5-0,6 M asam hidroklorid sebagai bahan demineralisasi. Inkorporasi DBM sama dengan *graft autogenous*, dengan faktor-faktor pertumbuhan yang akan memicu kaskade endokondral osifikasi dan berakhir dengan pembentukan tulang baru pada tempat implantasi.

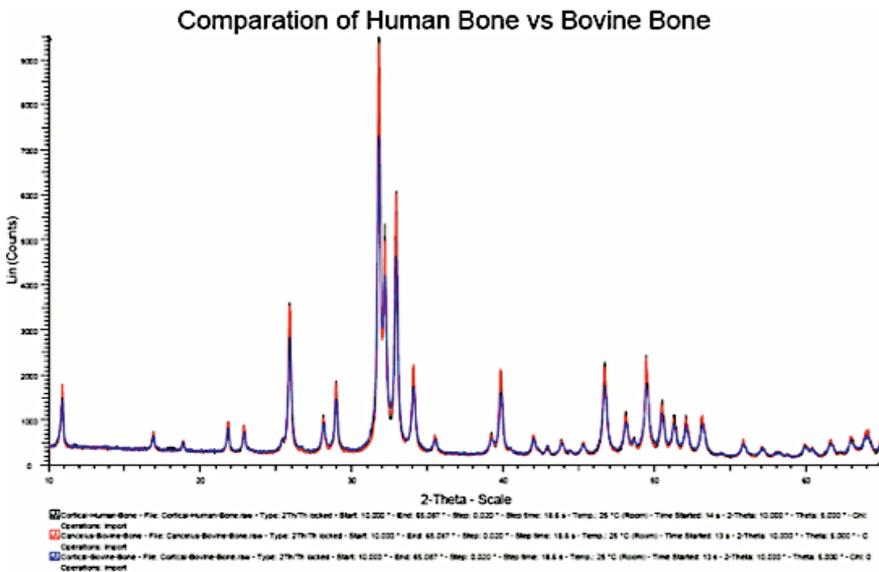
Graft Tulang Xenogenic

Material pengganti tulang *xenograft* berasal dari spesies lain selain manusia, seperti tulang sapi (*bovine*) dan babi (*porcine*). Seperti halnya tulang *allograft*, tulang *xenograft* juga memiliki risiko untuk menularkan penyakit (*zoonosis*). Guna menghindari penularan penyakit, maka harus dilakukan seleksi dan pengolahan yang ketat dan baik. Tulang tersebut diproses dengan berbagai cara, yaitu *freeze-dried*, atau demineralisasi, serta deproteinase. Tulang *freeze-dried* terdiri dari mineral hidroksiapatit dan protein yang terperangkap di dalamnya, dan memiliki sifat biologis osteokonduktif. Selain osteokonduktif, upaya yang dilakukan untuk mendapatkan sifat biologis osteoinduktif, maka dilakukan demineralisasi tulang *xenograft*. Pada proses ini, mineral tulang dihilangkan sehingga protein tulang menjadi terekspos. Protein tulang sapi yang terekspos terbukti memiliki sifat osteoinduktif sehingga dapat merekrut sel punca resipien untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas dan merangsang osteoblas resipien memproduksi tulang baru, di samping itu reaksi penolakan yang terjadi dapat diabaikan karena sangat minimal. Tulang sapi juga dapat diproses dengan pembakaran pada suhu 1000°C (*furnacing*). Pada suhu ini, semua komponen organik tulang akan menguap meninggalkan mineral hidroksiapatit dengan pori-pori yang besar yang merupakan ruang yang ditempati komponen organik tulang yang telah menguap. Analisis yang dilakukan terhadap mikrostruktur tulang sapi menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM), terlihat bahwa mikrostruktur tulang sapi menyerupai tulang manusia, serta didapatkan pori beserta interkoneksi pori, sedangkan analisis menggunakan *x-ray diffractometer* menunjukkan bahwa komposisi tulang sapi juga hampir sama dengan manusia. Mineral tulang ini memiliki sifat osteokonduktif.^{9,30,38}

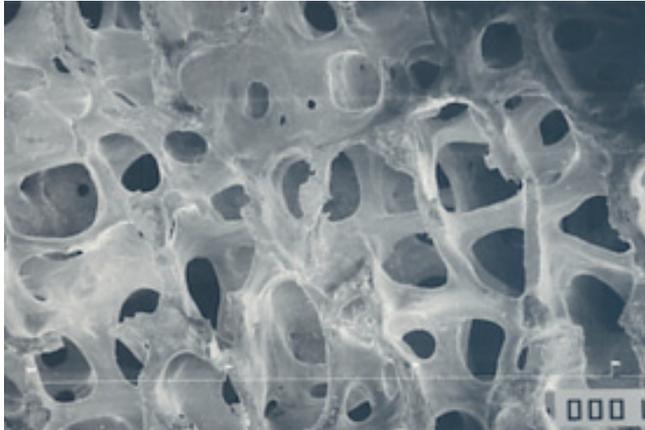
Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo telah lama memproduksi tulang sapi yang diproses dengan metode *freeze-dried*, *furnacing* (hidroksiapatit), dan saat ini sedang mengembangkan *demineralised bone matrix* (DBM). Produksi *graft* tulang di atas merupakan hasil karya almarhum dr. Abdurrahman., Sp. OT, dan Dr. dr. Ferdiansyah., Sp. OT(K) yang dibantu oleh beberapa teknisi bank jaringan.



Gambar 5.4 Analisis pembentukan jaringan ikat dan konsentrasi IgG dari berbagai macam graft tulang. Memperlihatkan bahwa demineralisasi matriks bovine xenograft menunjukkan reaksi penolakan yang minimal.^{9,34,38}



Gambar 5.5 Hasil perbandingan komposisi mineral hidroksiapatit manusia dengan bovine. Keterangan: Analisis menggunakan XRD (X-ray Diffractometer) dengan merk Bruker AXS Diffractometer D8, tampak grafik antara tulang manusia (hitam) dan BHA (merah dan biru) berhimpitan menunjukkan kemiripan komposisi unsur pembentuk tulang manusia dengan bovine.^{9,34,38}



Gambar 5.6 Hasil pemeriksaan mikroskop elektron dengan pembesaran 35 kali. Keterangan: Struktur mikroskopis BHA pada gambar menunjukkan pori-pori dan interkoneksi pori dengan ukuran 200–500 μm .



Gambar 5.7 Berbagai variasi bentuk dan metode pemrosesan *bovine xenogenic*. (A) Freeze-dried tulang bovine. (B) Deproteinized (hidroksiapatit) tulang bovine. (C) Demineralized Bone Matrix (DBM) tulang bovine.⁹

Graft Tulang Sintetik Substitutes

Seperti telah dijelaskan pada paragraf sebelumnya, keterbatasan ketersediaan *graft* tulang natural dan kebutuhan yang besar akan *graft* tulang telah memicu produksi berbagai *graft* tulang sintesis *substitutes*. Berbagai tulang sintesis *substitutes* meliputi golongan kalsium sulfat, seramik kalsium fosfat, semen CaP, gelas bioaktif, atau kombinasinya.

Kalsium Sulfat

Dikenal juga sebagai *plaster of Paris*, kalsium sulfat merupakan material seramik osteokonduktif dan biodegradasi tersusun dari CaSO_4 dan telah digunakan sebagai pengisi defek sejak tahun 1892. Material ini dibuat dengan memanaskan gipsum dengan *patented alphanemihydrate crystal structure* dan bisa dibuat dengan berbagai bentuk berbeda seperti pelet keras atau cairan kental injeksi yang secara *in vivo* bisa mengeras. Walaupun tidak memiliki struktur mikropori, kalsium sulfat diresorpsi dengan cepat dan lemah dalam kekuatan mekanik, sehingga hanya digunakan sebagai pengisi defek tulang yang kecil dengan internal fiksasi yang rigid, pertumbuhan vaskular dan pembentukan tulang baru terjadi bersamaan dengan *graft* resorpsi. Pada beberapa penelitian, kalsium sulfat tidak mampu mencapai fusi optimal pada artrodesis tulang belakang, terutama disebabkan degradasi cepat pada fase awal regenerasi tulang yang lebih cepat daripada deposisi tulang. Tetapi karena kemudahan preparasinya dan harga yang relatif murah, maka kalsium sulfat digunakan kembali dengan kombinasi material sintetik lain dengan atau faktor-faktor pertumbuhan.

Seramik Kalsium Fosfat (CaP Ceramics)

Seramik kalsium fosfat disusun oleh kalsium hidroksiapatit di mana komposisi kimianya sama dengan fase mineral jaringan terkalsifikasi. Bahan ini merupakan garam mineral sintetik dan biasanya diproduksi dengan *sintering* pada suhu tinggi untuk mengeluarkan uap air dan dibentuk dengan kepadatan tekanan tinggi. Bentuk yang tersedia adalah implan berpori, implan padat tidak berpori, dan partikel granul. Sebagai seramik yang dapat diserap dengan sifat osteokonduktif, CaP mendapat perhatian besar dan telah diteliti secara ekstensif. Tidak seperti rasio kalsium fosfat (Ca/P) bifasik kalsium fosfat (BCP), rasio Hap dan trikalsium fosfat (TCP) yang paling banyak digunakan pada bidang

ortopedi bisa diidentifikasi. Beberapa parameter kunci seramik CaP seperti laju absorpsi dan sifat mekanikal, tergantung dari rasio Ca/P, lebih lanjut lagi struktur pori dan kristal merupakan faktor yang paling dipertimbangkan dalam memilih seramik CaP.

Hidroksiapatit (HAp) merupakan mineral natural bentuk dari kalsium apatit dengan formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dan terdiri dari lebih kurang 50% berat tulang, memiliki sifat osteokonduktif dan osteointegrasi yang baik. HAp memiliki sifat mekanikal sama dibandingkan dengan kerapuhan tulang kancellor dan lemah terhadap *tension* serta *shear* tetapi resistan terhadap gaya kompresi. Dapat menurun sampai 30-40% setelah beberapa bulan diimplantasikan. Makroporositas (pori diameter >100 μm) dan interkoneksi pori HAp sintesis memungkinkan perlekatan, proliferasi, dan diferensiasi sel-sel osteoprogenitor. Begitu juga revaskularisasi dan selanjutnya pertumbuhan tulang baru ke dalam bila diimplankan secara *in vivo*. Rasio Ca/P yang relatif tinggi dan kristalisasi dapat memperlambat proses laju resorpsi HAp yang dilakukan oleh *giant cells* dan makrofag. Telah didemonstrasikan bahwa bila silinder hidroksiapatit berpori diimplankan pada tulang kancellor kelinci, volumenya berkurang hanya 5,4% setelah 6 bulan, sedangkan seramik trikalsium fosfat berkurang 85,4% di bawah kondisi yang sama. Konsekuensinya, *graft* hidroksiapatit tetap ada di dalam tulang tuan rumah yang akan berdampak terhadap kekuatan intrinsik tulang pada daerah kalus oleh karena berkurangnya kekuatan mekanik. Lebih lanjut lagi, HAp sendiri sering digunakan untuk melapisi implan dan pin eksternal fiksasi atau pada daerah dengan stres mekanik rendah.

Kelemahan ini sebagian diatasi dengan pengembangan HAp nanokristal, dengan memberikan rasio permukaan lebih besar dengan volume yang sama. Permukaan yang besar ini tidak hanya secara signifikan meningkatkan temperatur *sintering* seramik HAp, tetapi juga meningkatkan laju resorpsi.

Trikalsium fosfat (TCP), terutama *rhombohedral b-form*, *b-tricalcium phosphate (b-TCP)*, telah menarik perhatian sejak pertama kali dilaporkan oleh Albee tahun 1920. Dengan formula kimia $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, b-TCP memiliki rasio Ca/P 1,5 yang lebih rendah dari hidroksiapatit serta dapat mempercepat degradasi dan absorpsi. Seperti HAp, TCP memiliki lebih banyak struktur interkoneksi pori yang secara langsung memberikan keuntungan untuk invasi fibrovaskular dan pengantian tulang, tetapi pada saat yang sama memperlemah kekuatan mekanik.

Oleh karena secara termodinamik tidak stabil dalam PH fisiologis, sebagian TCP akan berubah menjadi HAp setelah implantasi sehingga secara parsial akan menghambat degradasi TCP. Mayoritas TCP diresorpsi oleh fagositosis setelah 5-24 bulan, sedangkan sisanya butuh waktu tahunan. Hal ini membuat TCP efektif dalam mengisi defek tulang oleh karena trauma dan tumor jinak tetapi kurang baik digunakan sebagai *substitute graft* tulang karena degradasinya tidak bisa diperkirakan.

Bifasik kalsium fosfat (*biphasic calcium phosphate/BCP*) komersial seramik yang juga banyak terdapat di pasaran yang didapatkan dengan mencampur hidroksiapatit dan trikalsium fosfat dengan berbagai konsentrasi dengan tujuan mendapat keuntungan dari sifat kedua garam kalsium. Dengan mengatur formula, laju kelarutan dan sifat mekanik bisa dikontrol dan selanjutnya bisa digunakan langsung atau sebagai pelapis implan.

Semen Kalsium Fosfat (*Calcium Phosphate Cement/CPC*). CPC berbeda dengan seramik CaP, di mana CPC merupakan gabungan 2 komponen salah satunya cairan untuk penguapan sehingga hasil akhirnya adalah CPC yang mengeras. CPC ditemukan oleh Brown dan Chow tahun 1980 dengan tujuan agar material ini bisa beradaptasi dan dicetak sesuai dengan kebutuhan. CPC telah disetujui oleh US Food and Drug Administration (FDA) pada tahun 1996. CPC dengan mudah dapat diinjeksikan untuk mengisi defek dengan berbagai bentuk dan selanjutnya akan mengeras dengan mencampur fase cairan melalui proses isotermik. CPC yang mengeras sendiri umumnya memiliki mikropori, biokompatibel, dan memiliki kekuatan mekanik dengan kekuatan tekuk (*bending*) yang lemah. CPC hanya bisa terdegradasi lapis demi lapis oleh proses pelarutan fisiologis dan aktivitas osteoklas, selanjutnya pertumbuhan vaskularisasi dan jaringan tulang secara teoritis akan terhambat bila dibandingkan dengan seramik CaP yang memiliki makropori interkoneksi. Sesuai dengan komposisinya, *apatitic* CPCs dan *brushite* CPCs bisa diidentifikasi, sifat CPCs seperti kemudahan, reaksi pada saat *setting* dan laju biodegradasi sangat tergantung pada komposisinya. *Apatitic* CPCs konsistensinya kental (*viscous*), sehingga relatif sulit untuk diinjeksikan, tetapi reaksi *setting* bisa terjadi pada pH fisiologis dan sifat mekanik sedikit lebih tinggi dari *brushite* CPCs. Oleh karena struktur kristal yang sedikit dari hidroksiapatit, menyebabkan defisiensi kalsium setelah mengeras dan laju degradasi yang tinggi walaupun masih tidak komplis. *Brushite* CPCs

mudah diinjeksikan dan dengan cepat mengeras pada pH rendah (<6). Material ini memiliki degradasi tinggi, tetapi degradasinya tidak dapat diprediksi oleh karena bisa transformasi menjadi hidroksiapatit. Berdasarkan sifatnya, CPCs secara klinik digunakan untuk penggantian tulang, terutama perkutaneus vertebroplasti dan kifoplasti, tetapi tidak untuk *substitutes* tulang.⁹

FAKTOR-FAKTOR PERTUMBUHAN UNTUK REGENERASI TULANG

Sebagian besar *substitutes graft*, terutama seramik sintetik dan semen tidak memiliki sifat osteoinduktif. Kemampuan meningkatkan penyembuhan tulang terutama hanya tergantung pada sifat osteokonduktif. Secara umum sifat osteokonduktif *substitutes* bisa memfasilitasi migrasi dan perlekatan sel-sel progenitor, yang kemudian menyekresi faktor-faktor pertumbuhan untuk menstimulasi pembentukan tulang, tetapi lingkungan ideal untuk pembentukan formasi kalus terganggu, sekresi faktor-faktor pertumbuhan akan menghilang dan akan terjadi *delayed* ataupun *non-union*. Kebutuhan akan adanya faktor-faktor pertumbuhan pada tempat fraktur saat terjadinya penyembuhan tulang sangat penting. Oleh karena itu, aplikasi langsung faktor-faktor pertumbuhan dengan beberapa yang terlibat dalam proses penyembuhan tulang juga telah diteliti secara ekstensif dan telah diterima sebagai strategi klinik dalam terapi. Hanya sedikit faktor-faktor biologi seperti BMPs, *fibroblast growth factors* (FGF), *vascular endothelial growth factors* (VEGF), PTH dan *platelet-rich plasma* (PRP) yang telah dilakukan penelitian, baik uji preklinik maupun uji klinik. Ada banyak kendala dalam aplikasi klinis faktor-faktor pertumbuhan di antaranya adalah, dalam setiap proses penyembuhan dibutuhkan orkestrasi dari banyak faktor-faktor pertumbuhan sehingga pemberian hanya 1 atau 2 faktor pertumbuhan diragukan efektivitasnya. Faktor-faktor pertumbuhan akan aktif pada fase tertentu dari proses penyembuhan, dosis yang tepat dari faktor-faktor pertumbuhan sangat sulit dipastikan dan harganya relatif mahal.

Bone morphogenetic proteins (BMPs), terutama BMP-2 (termasuk *recombinant human BMP-2*, rhBMP-2) dan BMP-7 (termasuk *recombinant human BMP-7*, rhBMP-7), merupakan anggota *transforming growth factor beta superfamily* (TGF- β) dengan sifat osteoinduktif yang superior dan mungkin merupakan faktor pertumbuhan yang paling banyak diteliti untuk mengobati defek tulang. BMP-2 mampu menginduksi diferensiasi osteoblas dari sel punca mesenkimal dan

Tabel 5.1 Faktor-faktor pertumbuhan tertentu dan fungsinya pada penyembuhan fraktur.⁵⁴

	Sumber	Target Sel	Fungsi	Aplikasi klinis pada ortopedi
BMP	Sel osteoprogenitor, osteoblas, matriks ekstraselular tulang	Reseptor <i>serine/threonine kinase</i> , sel punca, dan kondrosit	Mempromosikan diferensiasi sel punca mesenkimal/ sel-sel osteoprogenitor menjadi kondrosit dan osteoblas, mempengaruhi pola formasi tulang	rhBMP-2 digunakan untuk terapi pada anterior <i>lumbar spine fusion</i> dan fraktur tibia terbuka, dan rhBMP7 digunakan untuk <i>posterolateral lumbar spine fusion</i>
FGF	Makrofag, sel mesenkimal, kondrosit, osteoblas	Reseptor <i>tyrosine kinase</i>	Mitogen untuk sel punca mesenkimal, kondrosit, dan osteoblast. Meningkatkan deposisi kolagen dan angiogenesis	
VEGF	Platelet, kondrosit pada callus	Sel-sel endotel vaskular	Meningkatkan angiogenesis dan pembentukan vascular	
PTH	Glandula paratiroid	Sel punca, kondrosit, dan osteoblas	Meningkatkan volume <i>callus</i> , masa tulang, dan mineral tulang	Digunakan untuk meningkatkan masa tulang kanelos dan mengurangi resiko fraktur vertebra dan non-vertebra pada pasien dengan osteoporosis
PRP	Darah	Berbagai jenis sel	Campuran <i>Growth Factor</i>	Terutama digunakan pada ortopedi dan kedokteran olahraga untuk membantu homeostasis dan penyembuhan muskuloskeletal

BMP-7 bisa secara langsung mempromosikan angiogenesis. Penelitian terbesar pada penggunaan BMP adalah untuk terapi fraktur terbuka tibia, dengan judul *the BMP-2 Evaluation in Surgery for Tibial Trauma* (BESTT), yang merupakan penelitian multisenter. Pada penelitian dengan 450 pasien yang secara acak dibagi menjadi 3 grup, satu grup mendapat BMP-7 0,75mg/ml, grup kedua mendapat 1,5 mg/ml, dan grup ketiga sebagai kontrol. Untuk internal fiksasi digunakan *nail intramedular*. Sekitar 12 bulan setelah pembedahan, pasien yang mendapat 1,5mg/ml rhBMP-2 menunjukkan pembentukan kalus tulang yang paling cepat dan penyembuhan luka dengan angka infeksi rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol, menunjukkan efisiensi BMP-2 dalam terapi fraktur terbuka tibia tetapi efeknya tergantung pada dosis. Penelitian awal yang dilakukan oleh Friedlander dan kolega, 124 pasien *non-union* tibia yang difiksasi dengan *rod* intramedular diacak mendapatkan masing-masing rhBMP-7 dalam *sponge* kolagen atau krista iliaka *autograft* pada operasi revisi. Sekitar 9 bulan kemudian, 81% pasien grup rhBMP-7 dan 85% grup *autograft* mampu menahan beban penuh tanpa nyeri yang signifikan. Pada evaluasi akhir 2 tahun setelah pembedahan, tidak didapatkan perbedaan bermakna di antara kedua grup. Penggunaan rhBMP-2 atau rhBMP-7 direndam dalam *sponge* kolagen untuk terapi *non-union* tibia menunjukkan hasil yang ekuivalen dengan penggunaan *autograft* krista iliaka, yang juga mengurangi nyeri persisten. Setelah diuji pada sejumlah model hewan dan uji klinik, rhBMP-2 (INFUSETM, Medtronic, US) telah disetujui oleh FDA dan *European Medicines Evaluation Agency* (EMA) untuk aplikasi fusi anterior tulang lumbal dan fraktur terbuka tibia, sementara itu rhBMP-7 (OP-1TM, Stryker, US) telah mendapat persetujuan untuk terapi fusi posterolumbal. Karena tidak memiliki sifat osteokonduktif bentuk komersial BMPs selalu dikombinasikan dengan pembawa osteokonduktif seperti kolagen, *allograft* bahkan *graft* tulang autologus untuk meningkatkan efisiensi.

Dipicu oleh bukti klinik bahwa BMPs menstimulasi pembentukan tulang dengan cepat, penggunaan *off-label* meningkat secara dramatis, dilaporkan pada tahun 2008 digunakan pada 85% prosedur fusi lumbal. Selain disetujui untuk aplikasi *non-union* tibia, penelitian pada terapi *non-union* tulang panjang lain seperti pseudoartrosis humerus, anggota gerak bawah, klavikula, dan ulna telah dilaporkan secara sporadis dengan hasil yang jelek atau dengan bukti (*evidence*) yang sangat kecil. Pada penelitian prospektif dan uji klinis yang dilaporkan oleh

Ekrol dan kolega, 30 pasien dengan *malunion* simtomatik distal radius dilakukan osteotomi korektif, masing-masing grup mendapat *graft* tulang krista iliaka (16 pasien) atau aplikasi langsung rhBMP-7 (tanpa pembawa, pada 14 pasien) dilakukan secara acak.⁵⁵ Oleh karena kegagalan fiksasi, digunakan eksternal fiksasi pada 4 pasien dari grup rhBMP-7 dan 6 pasien dari grup *autograft*, internal fiksasi digunakan pada sisa pasien lainnya. Walaupun perubahan ini menyebabkan evaluasi menjadi sulit, persentase penyembuhan dan *union* yang inferior didapatkan pada grup yang mendapat terapi rhBMP-7 dan hal ini diyakini hasilnya akan sangat berbeda bila digunakan pembawa (*carrier*). Beberapa penelitian menggunakan BMPs untuk memperbaiki fusi arthrodesis *ankle* dan kaki dan mendapatkan hasil yang jelek.

Secara umum, dapat diterima bahwa hasil klinik yang sama bisa didapat bila menggunakan BMPs untuk terapi defek tulang kompleks seperti fusi tulang belakang dan fraktur terbuka tibia, bila dibandingkan dengan *graft* tulang autologus dari krista iliaka, di mana angka komplikasi yang tinggi menjadi perhatian. BMPs adalah protein terlarut dan memiliki kecenderungan untuk menghilang atau keluar dari tempat mereka diletakkan dan mengakibatkan beberapa komplikasi. Seperti yang dilaporkan dari beberapa literatur sebelumnya, efek aplikasi BMPs bergantung terhadap dosis yang diberikan. Hilangnya protein bisa karena dilusi konsentrasi lokal dan akan berdampak terhadap efisiensinya. BMPs juga bisa memengaruhi beberapa tipe sel dan organ sehingga bisa menimbulkan osifikasi heterotopik. Boraiah dan kolega melaporkan 10 dari 17 di kasus fraktur tibia proksimal kompleks yang diterapi dengan rhBMP-2 mengalami osifikasi heterotopik dan 4 di antaranya memerlukan ekstra pembedahan untuk eksisi. Pada kondisi yang lebih ekstrem, seperti satu kasus yang dilaporkan oleh Ritting dan kolega, penggunaan BMP-2 pada kasus *non-union* ulna pada anak umur 9 tahun menimbulkan respons inflamasi persisten dan akhirnya menyebabkan osteolisis. Isu penting lain yang berkaitan dengan penggunaan BMPs adalah *cost effectiveness*.^{9,54}

GRAFT TULANG EXTENDER

Graft tulang *extender* adalah kombinasi dari beberapa jenis *graft* untuk tujuan tertentu. Bila menggunakan *graft* tulang *extender* ahli bedah harus memikirkan 2 pertimbangan utama. *Pertama*, fungsi *extender* yang diinginkan. Kadang kala

tujuannya adalah untuk meningkatkan volume *autograft* atau mengganti seluruh *autograft*, bisa juga *extender* digunakan untuk meningkatkan bioaktivitas *graft* dan membuat *graft* lebih poten. Banyak jenis *extender* dan semuanya memiliki sifat bervariasi tergantung tujuan pembedahan. Pertimbangan kedua adalah lokasi di mana *graft* diberikan, metafisis versus diafisis dan jenis defek *contained* atau *uncontained*. Material yang diperkuat harus cocok secara biologis, mekanikal, dan kebutuhan anatomi dari lokasi patologi *graft*. Satu jenis *graft* tidak bisa digunakan untuk semua jenis situasi, sehingga berbagai jenis *graft* yang tersedia dapat dikombinasikan yang akhirnya akan menyembuhkan defek tulang melalui berbagai jalur biologi.

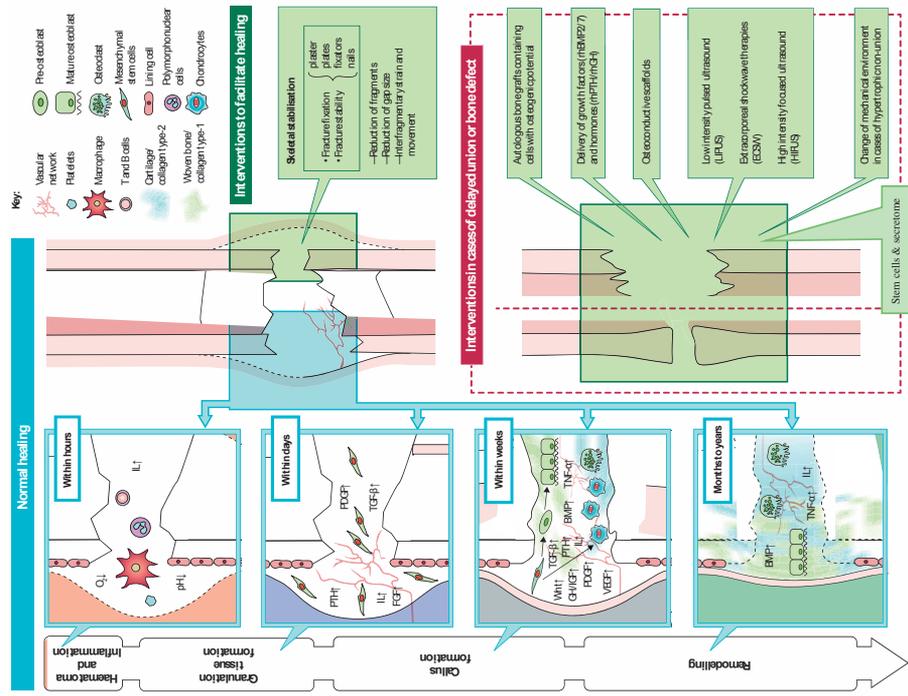
Kalsium fosfat *substitutes* seperti hidroksiapatit memiliki sifat osteokonduktif tetapi tidak memiliki sifat osteoinduktif kecuali ditambahkan material osteoinduktif atau osteopromotif. Dengan menambahkan bahan osteoinduktif maka secara teori *graft* komposit akan meningkatkan kemampuan pembentukan tulang. Banyak pemakaian klinik menggunakan kombinasi seramik *graft* dengan elemen-elemen biologis untuk stimulasi proliferasi dan diferensiasi sel-sel. Material kombinasi ini memiliki laju osteointegrasi yang bervariasi, kekuatan kompresi berdasarkan ukuran kristalnya, stoikiometri, dan berpori. Bila dilakukan kombinasi dengan *graft* autologus dari krista iliaka maka *graft* seramik berfungsi sebagai *graft extender*, hasil yang didapatkan sebanding dengan *autograft* itu sendiri.

DBM memiliki sifat osteoinduktif tinggi yang merupakan sifat bawaannya, luas permukaan yang luas dan arsitektur tiga dimensi yang kompleks. Faktor-faktor pertumbuhan osteoinduktif meliputi BMPs dan faktor-faktor induktif lainnya juga tersedia. Sifat material ini sangat dibutuhkan sebagai *extender* bila dicampur dengan *autograft* atau aspirasi *bone marrow*. Berbagai penelitian yang telah dilakukan menunjukkan DBM yang diperkaya dengan *bone marrow* memiliki efek yang sama dengan *autograft* untuk terapi fraktur tulang panjang dan *non-union*. Penggunaan *autograft* dengan DBM akan menurunkan jumlah *autograft* yang diambil, tanpa kehilangan efikasi dari *graft*, sehingga DBM dapat digunakan sebagai *graft* tulang *extender*.^{9,56}

Tabel 5.2 Potensi sifat biologis, kekuatan mekanis, inkorporasi, dan *remodeling* dari berbagai jenis *graft*.⁹

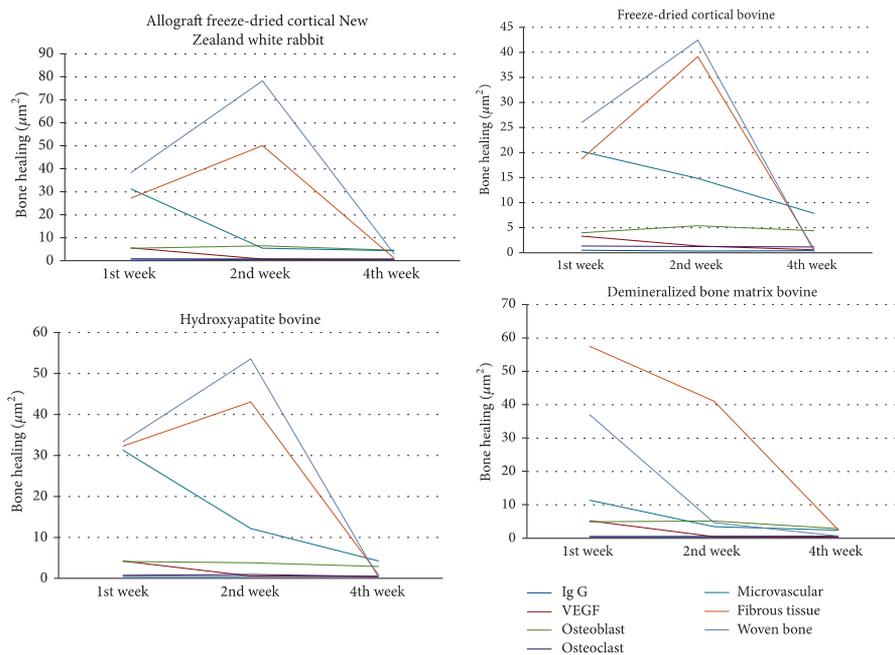
Jenis graf	Osteogenesis	Osteoinduktif	Osteokonduktif	Kekuatan	Inkorporasi	Remodelling
Autograf						
Kortikal	++	++	++	+++	++	++
Kanselos	+++	+++	+++	-	+++	+++
Kortikal kanselos	+++	+++	+++	++	+++	++
Vascularized	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Alograf						
Kortikal	-	-	++	+++	++	-
Kanselos	-	+	++	-	++	+
Kortikal kanselos	-	+	++	++	++	+
DBM		++	++		+++	++
Senograf						
Kanselos	-	-	++	-	++	+
Hidroksiapatit	-	-	++	+	++	+
DBM/Kolagen		-/+	++		++	++
Sintetik						
HA, TCP, dan Kalsium karbonat.			++	+	+	-/+
Polimer	-	-	++	-	++	++
Kombinasi keramik dan polimer			++		++	+
Growth factors						
rhBMP	-	+++	-	-	-	-
PRP	-	-	-	-	-	-

Penelitian pada hewan coba kelinci telah dilakukan penulis beserta tim untuk mengevaluasi efikasi penyembuhan pada defek tulang kecil. Penelitian ini menggunakan berbagai jenis *graft*, yaitu *Xenograft Freeze-Dried Cortical Bovine*, *Allograft Freeze-Dried Cortical New Zealand White Rabbit*, *Xenograft Hydroxyapatite Bovine*, dan *Xenograft Demineralized Bone Matrix Bovine* yang merupakan model dari seluruh produk Instalasi Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Evaluasi dilakukan dengan pemeriksaan imunohistokimia, histologi, dan reaksi penolakan (*rejection*). Hasil yang didapatkan adalah terjadi



Gambar 5.8 Perjalanan penyembuhan fraktur. Terdiri dari fase tumpang tindih dan saling memengaruhi antara pembentukan jaringan dan resorpsi serta perkembangan lainnya meliputi hematoma dan inflamasi, diikuti dengan proses reparasi, pembentukan tulang intramembranor dan endokondral, *remodeling* (sisi kiri, atas ke bawah). Respons pro-inflamasi awal hematoma ditandai oleh hipoksia dan PH rendah serta melibatkan beberapa tipe sel inflamasi di tempat fraktur. Proses berikutnya adalah perekrutan sel punca mesenkimal ke tempat fraktur oleh faktor-faktor pertumbuhan dan sitokin-sitokin. Sel-sel ini terutama berasal dari periosteum, tetapi bisa juga direkrut dari sistemik dan berasal dari jaringan sekitar (seperti otot). Awal pertumbuhan jaringan vaskular penting untuk vaskularisasi celah fraktur. Sel-sel punca mesenkimal mulai proliferasi dan diferensiasi menjadi osteoblas yang akan membentuk tulang woven (kolagen tipe I) dan kondroblas yang membentuk kartilago (kolagen tipe II). Fase akhir *remodeling* ditandai dengan keseimbangan resorpsi kalus keras (*hard callus*) oleh osteoklas dan deposisi tulang oleh osteoblas. Sisi kanan adalah daftar intervensi klinik yang ada saat ini dengan mekanisme target berbeda selama reparasi tulang, gangguan penyembuhan tulang, dan tata laksana *critical bone defects*.⁵⁷

penyembuhan tulang pada semua grup, tetapi penyembuhan tulang terbaik terdapat pada grup *demineralized bone matrix*. Hasil evaluasi berbagai variabel adalah sebagai berikut.³⁴



Gambar 5.9 Evaluasi penyembuhan tulang dengan variabel histologi, imunohistokimia, dan imunologi.³⁴

SEL PUNCA MESENKIMAL (MESENCHYMAL STEM CELLS/MSCS) UNTUK REGENERASI TULANG

Telah dijelaskan pada paragraf sebelumnya bahwa sebagian besar defek pada tulang dapat diterapi dengan *graft* tulang/*scaffold* saja atau kombinasi *graft* tulang dengan faktor-faktor pertumbuhan. Pada kondisi yang berat maka kedua opsi di atas tidak bisa membantu penyembuhan tulang. Kondisi-kondisi yang menjadi tantangan saat ini adalah defek tulang yang besar disebut juga sebagai *critical-sized defect*. Defek tulang besar ini bisa terjadi akibat nekrosis, tumor tulang, degeneratif, dan trauma dengan energi yang tinggi. Keadaan ini bila diterapi bahkan dengan metode terapi yang adekuat masih sering berakhir dengan *delayed* dan

non-union. Komplikasi *delayed* dan *non-union* biasanya disebabkan kehilangan tulang sehingga tidak ada jembatan yang menghubungkan antara fragmen fraktur dan diperberat oleh gangguan vaskularisasi oleh karena kerusakan berat jaringan lunak di sekitar fraktur.

Pada *critical sized defect* dan komplikasi penyembuhan fraktur, dibutuhkan *graft* tulang yang memiliki seluruh sifat *graft* yang ideal, yaitu osteogenesis, osteoinduktif, dan osteokonduktif. Hanya *autograft* yang memiliki seluruh sifat *graft* yang ideal, tetapi sayangnya penggunaan *autograft* memiliki risiko komplikasi akibat operasi untuk pengambilannya, di samping jumlah dan ukuran yang diambil terbatas. Dewasa ini sel punca mesenkimal merupakan inovasi terbaru yang dapat digunakan dalam mengatasi problem di atas karena memiliki kemampuan untuk proliferasi dan diferensiasi menjadi sel-sel osteoblast, serta bisa memproduksi berbagai macam faktor-faktor pertumbuhan yang dibutuhkan dalam proses penyembuhan tulang.

Mekanisme Aksi MSCs pada Penyembuhan Tulang

Karakterisasi MSCs

MSCs merupakan sel-sel stromal multipoten yang terdapat di sebagian besar jaringan ikat dewasa. Sel ini telah diteliti secara ekstensif karena kemampuannya untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Friedenstein dan kolega menunjukkan populasi sel yang jarang dan melekat pada plastik berasal dari *bone marrow* (lebih kurang 1 dari 10.000 sel-sel nukleat) yang secara morfologi berbentuk sel *spindle-shaped* dan koloni-koloni *round-shaped*.⁵⁸ Sel ini mengkloning dirinya menjadi koloni-koloni *round-shaped fibroblastoid* yang disebut sebagai *colony-forming unit-fibroblasts* atau CFU-Fs. Beberapa koloni bisa berdiferensiasi menjadi tulang, kartilago, dan jaringan lemak. Grup riset lain memperluas observasi awal ini melalui penelitian tentang kemampuan proliferasi dan karakteristik fenotif CFU-Fs. MSCs secara luas telah digunakan untuk transplantasi sel, rekayasa jaringan, terapi gen, dan imunoterapi. Sel mengekspresikan CD105, CD73, dan CD90, dan tidak bisa mengekspresikan CD45, CD34, CD14 atau CD11b, CD79 α atau antigen CD90. Sel ini juga memiliki kemampuan berdiferensiasi *in vitro* paling sedikit menurun menjadi 3 sel meliputi kondroblas, osteoblas, dan sel lemak. MSCs bisa migrasi ke defek tulang dan memfasilitasi regenerasi tulang, tetapi bagaimana proses dasarnya masih belum jelas. Pada kedokteran regeneratif, dari semua jenis sel punca,

MSCs merupakan sel punca yang paling banyak digunakan karena sifatnya yang menguntungkan. Populasi MSCs dan pemeliharaan homeostasis terjadi di dalam *niches* MSCs. *Niches* merupakan lokasi anatomi spesifik yang meregulasi regenerasi jaringan, pemeliharaan, dan reparasi oleh MSCs. *Niches* memiliki dua peran yang melindungi cadangan MSCs dan juga memproteksi tuan rumah dari proliferasi MSCs yang berlebihan. *Niches* secara ketat mengontrol respons keseimbangan MSCs dalam memenuhi kebutuhan tubuh, juga mencegah penyimpangan fungsi MSCs atau target lain yang akan menyebabkan malfungsi. *Niches* MSC lokasinya berdekatan dengan pembuluh darah, pada permukaan endosteum tulang trabekula, darah tali pusar, jaringan gigi (*dental pulp*, *exfoliated deciduous teeth*, *periodontal ligament*, *apical papilla*, *dental follicle*, dan *periapical cyst-MSCs*), jaringan lemak, dan sinovium (*sinovial membrane* dan *fluid*).^{44,46}

MSCs dan Efek-Efek Imunomodulasi

Pembekuan darah dan reaksi inflamasi merupakan 2 respons segera bila terjadi fraktur tulang. Inflamasi mengawali kaskade dan jalur regenerasi tulang dengan memproduksi faktor-faktor kemotaktik. Pada fase kedua inflamasi (fase kronik), sel-sel inflamasi kronik terutama makrofag dan limfosit masuk ke tempat trauma. Peran Makrofag dan Th limfosit harus menjadi fokus utama. Makrofag memiliki banyak peran penting dalam penyembuhan tulang, mereka tidak hanya melakukan fagosit jaringan nekrosis, mikroorganisme, dan hematoma tetapi juga melepaskan beberapa sitokin yang menguntungkan dan faktor-faktor pertumbuhan yang memfasilitasi transisi dari fase inflamasi ke fase reparasi dari penyembuhan tulang. Paling sedikit 2 perilaku inflamasi yang penting sebagai respons terhadap sel eksogen/*graft/scaffold*/implantasi matriks. Pada respons tipe I, sel-sel Th limfosit tipe I akan memicu sel-sel makrofag tipe 1, yang menyebabkan timbulnya reaksi inflamasi. Tipe ini akan menimbulkan rejeksi *graft* dan sel. Sebaliknya pada respons tipe II, Th limfosit tipe II memicu aktivitas makrofag tipe II, menimbulkan reaksi *remodeling* yang menyebabkan diterimanya *graft* dan sel di dalam tubuh. Penelitian terakhir menunjukkan bahwa MSCs *allogenic* mempromosi polarisasi monosit menjadi fenotip M2 anti-inflamasi. Diferensiasi M2 ini oleh MSCs *allogenic* bisa timbul melalui NF- κ B dan jalur STAT-3.

Walaupun respons inflamasi memainkan peran penting dalam regenerasi tulang, inflamasi yang berkepanjangan /atau berlebihan bisa berbahaya dan

menghambat proses penyembuhan tulang. Begitu juga bagaimana efek sistem imun *innate* dan adaptif beserta produknya pada penyembuhan tulang masih belum jelas. Beberapa sitokin dilaporkan mempromosikan penyembuhan tulang, sementara yang lainnya menghambat proses penyembuhan tulang. Transplantasi MSCs tidak hanya memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi osteoblas, tetapi sel ini juga diketahui memiliki efek imunomodulasi melalui berbagai mekanisme. MSCs bisa dipolarisasikan menjadi pro-inflamasi atau fenotip immunosupresif berdasarkan *toll-like receptors* (TLRs). Mereka dipolarisasikan menjadi fenotip pro-inflamasi oleh stimulasi TLR4, sedangkan stimulasi TLR3 bisa mempolarisasi MSCs menjadi fenotip immunosupresif ditentukan oleh MSC1 dan MSC2. MSC1 memiliki efek signifikan menurunkan level IL-6, TNF- α , dan IL-1 β , 3 hari setelah fraktur. Proses ini mengarah ke regenerasi yang lebih baik dengan membatasi trauma jaringan dan menghambat pembentukan fibrosis. Produksi sitokin inflamasi meliputi TNF- α , IL-6, IL-12p70, dan IFN- γ oleh makrofag secara signifikan ditekan oleh MSCs, sementara itu produksi sitokin anti-inflamasi seperti IL-10 dan IL-12p40 meningkat. PGE2 merupakan mediator kunci pada proses ini. Efek anti-apoptosis MSCs bisa mempercepat proses penyembuhan tulang. Percepatan penyembuhan tulang dengan transplantasi MSCs terutama berhubungan dengan level ekspresi TNF- α yang rendah pada kalus. Hal ini akan mempermudah penyembuhan tulang karena telah dilaporkan bahwa TNF- α bisa memiliki efek pro-apoptosis pada osteoblas.⁵⁹

MSCs dan Angiogenesis

Seperti kita ketahui, angiogenesis adalah faktor yang sangat penting untuk formasi tulang dan juga memberikan kontribusi pada reparasi dan regenerasi tulang. Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk melakukan inkorporasi faktor-faktor angiogenik, meliputi *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor*, *insulin-like growth factor*, *platelet-derived growth factor*, dan *bone morphogenetic proteins* (BMPs) ke dalam *scaffold* untuk memperbaiki proses penyembuhan tulang. Proses angiogenesis merupakan proses interaksi yang kompleks antara sel endotel dan lingkungan mikro meliputi ketahanan hidup (*survival*), proliferasi, migrasi, formasi pembuluh darah, dan maturasi sel endotel. Pada penelitian sebelumnya, aktivitas angiogenik MSCs telah diyakini berkontribusi pada kemampuan regenerasinya. Angiogenesis bisa meningkat dengan bantuan sinyal parakrinnya. Lingkungan mikro jaringan yang rusak akan

berubah karena angiogenesis, yang selanjutnya memberi manfaat osteogenesis. Beberapa biomatrik seperti *platelet-rich fibrin* (PRF), memainkan peranan penting sebagai *niche* biologi dalam stimulasi MSCs residen pada proses angiogenesis. PRF (*fibrin sealant* atau *fibrin glue*) merupakan generasi kedua *plasma-rich plasma* (PRP), merupakan versi perbaikan dari PRP tradisional. PRF secara signifikan meningkatkan penyembuhan jaringan lunak dan keras dan telah digunakan secara luas di bidang kedokteran gigi. PRF tidak hanya meningkatkan proses penyembuhan melalui penurunan resorpsi tulang, tetapi juga mempromosikan neoangiogenesis pada daerah defek. Telah ditunjukkan bahwa aktivitas angiogenik PRF terjadi karena terlepasnya faktor-faktor pertumbuhan seperti VEGF dengan lambat dan stabil, yang bertanggung jawab terhadap proliferasi sel endotel melalui aktivasi ekstraseluler *signal-regulated kinase*.⁵⁹⁻⁶¹

Homing dan Perekrutan MSC ke Defek Tulang

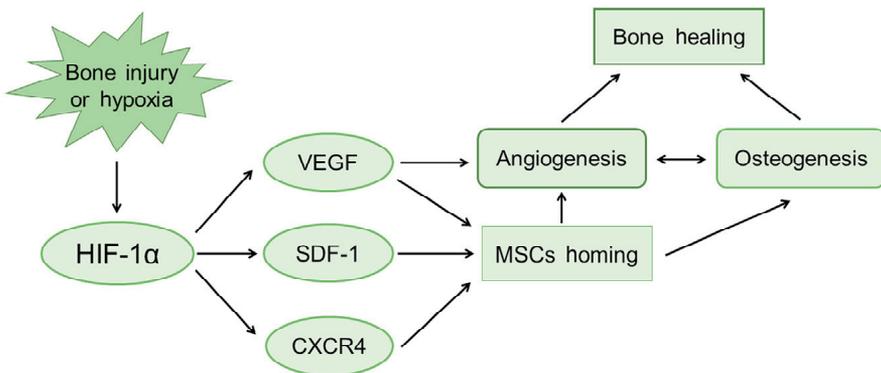
Banyak tantangan yang harus dihadapi dalam penyembuhan *critical-sized defects* (CSDs). Pada tulang CSD adalah setiap defek tulang dengan ukuran tertentu yang tidak dapat sembuh tanpa intervensi dan akhirnya akan berakhir dengan *non-union*. Pada dasarnya ada 4 alasan utama terjadinya *non-union*, terdiri dari kurangnya jumlah atau tidak ada sel MSC yang migrasi ke daerah defek,



Gambar 5.10 *Critical sized defect* pada tulang tibia. (Kiri) Osteosarcoma pada tulang tibia. (Kanan) Defek yang terjadi setelah reseksi tumor (dokumentasi Tim MST RSUD Dr. Soetomo – FK UNAIR).

jumlah sel-sel progenitor osteoblas (MSCs) tidak mencukupi, kegagalan atau kesalahan diferensiasi MSCs, dan tidak ada *scaffold* yang menjembatani fragmen fraktur. Sebagai langkah pertama dari rangkaian terapi pada *non-union* adalah perekrutan MSCs ke daerah defek. Mekanisme pasti bagaimana *homing* MSC ke daerah lesi masih belum jelas, tetapi faktor-faktor kemotaktik yang dilepaskan dari daerah defek memiliki peran penting dalam *homing* dan perekrutan MSCs.^{31,62}

Diketahui bahwa MSCs mengekspresikan paling sedikit 19 reseptor kemokin. Reseptor spesifik kemokin (seperti CCR1, CCR7, CCR9, CXCR4, CXCR5, dan CXCR6) dalam *homing* merupakan mediator yang penting, dan di antara mereka CXCR4 dan ligannya (CXCL12 atau *stromal-derived factor 1*; SDF1) merupakan mediator yang paling banyak diteliti pada proses perekrutan MSC. Kondisi hipoksi lokal terjadi pada fase awal fraktur karena kerusakan vaskular yang berperan dan berguna sebagai faktor perekrutan dan regulasi stimulus bagi MSCs dan sel-sel progenitor lain. Juga telah diyakini bahwa pembentukan tulang baru terjadi dalam kondisi hipoksi. Hipoksi bisa mengekspresikan gen khusus yang meningkatkan *survival* sel pada kondisi tekanan oksigen rendah dan menginduksi kembali terbentuknya pembuluh darah untuk transportasi oksigen. Hipoksi dengan ekspresi

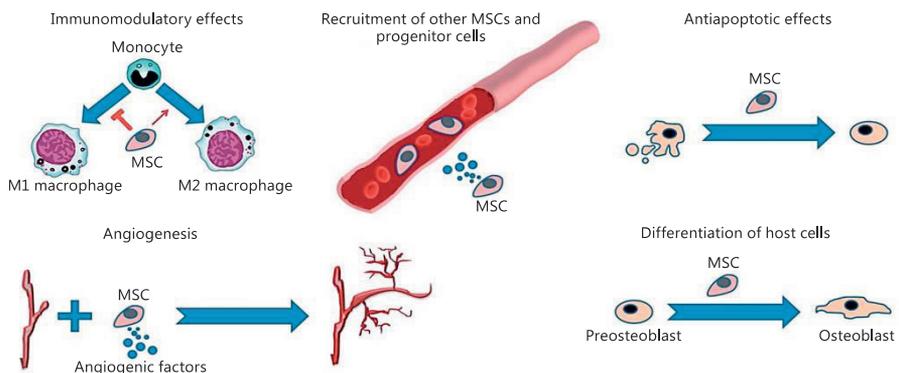


Gambar 5.11 Regulasi penyembuhan tulang melalui jalur sinyal *Hypoxia-inducible factor (HIF)-1-dependent*. Segera setelah trauma tulang atau terjadi hipoksia terjadi aktivasi dan stabilisasi HIF-1 α . *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*, *stromal cell-derived factor (SDF)-1*, dan *CXC chemokine receptor (CXCR) 4* secara langsung diregulasi oleh HIF-1 α . Peningkatan ekspresi VEGF, SDF-1, dan CXCR4 menstimulasi *homing* sel punca mesenkimal, VEGF merupakan faktor yang penting untuk angiogenesis. Peningkatan *homing* MSC terlibat dalam osteogenesis dan proangiogenesis, yang berperan vital dalam penyembuhan tulang.⁶³

hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α) *subunit transcription factor* bisa menginduksi *upregulation* SDF1 dan terutama meregulasi *homing* sel-sel progenitor. Aksis SDF1/CXCR4 (CXC *chemokine receptor R4*) diduga merupakan mediator utama perekrutan dan migrasi MSC. Oleh karena kondisi hipoksi pada daerah trauma, hal ini memungkinkan ekspresi kemokin seperti SDF1 diregulasi oleh hipoksia dan HIF-1 α . Leukosit *homing* dan perannya dalam transportasi prekursor hematopoietik pada jaringan sangat mirip dengan mekanisme yang mengatur migrasi MSC. Telah ditemukan bahwa mobilisasi MSCs ke tempat fraktur, di mana mereka berkontribusi untuk regenerasi tulang, terutama difasilitasi melalui dukungan parakrin faktor angiogenik (seperti VEGF dan EGF). Lebih lanjut lagi sekresi faktor-faktor angiogenik pada jaringan trauma terjadi karena aktivasi HIFs. MSCs juga merekrut MSCs dan sel-sel progenitor lain ke arah tempat trauma melalui efek parakrin.^{59,62}

MSC dan Diferensiasi Sel Tuan Rumah

Walaupun MSCs memiliki potensi besar untuk berdiferensiasi menjadi berbagai tipe sel, seperti osteoblas, juga dihipotesiskan bahwa transplantasi MSC akan menginduksi regenerasi jaringan dengan mengganti sel pada tempat trauma, insiden MSC yang dapat hidup dan bergabung dengan tuan rumah sangat rendah. Dari bukti-bukti yang terkumpul menunjukkan efek terapi MSCs adalah karena kemampuannya mendukung regenerasi lingkungan mikro daripada



Gambar 5.12 Beberapa mekanisme aksi MSC pada rekonstruksi dan reparasi tulang. Efek menguntungkan dari MSC meliputi efek imunomodulasi, stimulasi angiogenesis, efek antiapoptosis, perekrutan sel-sel progenitor dan MSC tuan rumah dan stimulasi menjadi osteoblas.⁵⁹

kemampuannya berdiferensiasi dan menyatu dengan tuan rumah. Seperti yang telah disebutkan sebelumnya, MSCs menurunkan level TNF- α pada daerah trauma. Efek penting lain TNF- α adalah blokade diferensiasi osteoblas, yang terjadi dengan menghambat ekspresi 2 faktor-faktor transkripsi penting untuk formasi tulang, yaitu Runx2 dan target selanjutnya *osterix*. Oleh karena itu MSC berkontribusi tidak langsung terhadap diferensiasi osteoblas dan regenerasi tulang. Penelitian eksperimental menunjukkan bahwa MSC yang ditransplantasikan berkontribusi terhadap penyembuhan fraktur dengan mengekspresikan BMP-2, yang menginduksi formasi tulang dan kartilago.⁵⁹

Metode Pemberian MSCs untuk Reparasi Tulang

Kedokteran regeneratif memiliki 2 strategi utama dalam aplikasinya. Strategi pertama, sel-sel diaplikasikan untuk mengganti sel-sel yang rusak di dalam jaringan untuk memperbaiki integritas dan fungsi jaringan. Pada prosedur ini disebut juga *cell therapy* suspensi sel disuntikkan ke dalam jaringan yang rusak atau ke dalam sirkulasi darah (sistemik). Pendekatan kedua disebut sebagai *tissue engineering* prosedurnya lebih kompleks. Pada pendekatan ini sel dikombinasikan dengan matriks 3 dimensi untuk membuat konstruksi seperti jaringan yang menjadi target.³¹

Pemberian Injeksi Sistemik

Injeksi sistemik MSCs telah digunakan untuk terapi osteoporosis dan penyembuhan fraktur dalam beberapa tahun terakhir. Beberapa faktor yang terlibat pada terapi sel dalam rangka mencapai hasil yang baik untuk penyembuhan tulang, yaitu pembawa dan tipe sel, konsentrasi sel, status diferensiasi sel, periode terapi, dan rute pemberian. *Bone marrow-derived* MSCs (BMSCs) dan *adipose tissue-derived* MSCs (ADMSCs) merupakan tipe MSCs yang paling banyak diaplikasikan pada regenerasi tulang. Di antara sel-sel MSCs, *stromal vascular fraction* (SVF) komponen dari jaringan adiposa, dewasa ini banyak mendapat perhatian. SVF jaringan adiposa merupakan sumber yang kaya akan preadiposit, MSCs, sel progenitor dan sel-sel inflamasi serta sitokin, yang diekstraksi dengan memproses lemak tubuh. Bukti dari beberapa penelitian eksperimental dan klinis menunjukkan SVF lebih efektif untuk penyembuhan tulang dan kartilago daripada ADMSCs. Diyakini bahwa efek yang lebih menguntungkan dari SVF merupakan refleksi dari faktor-faktor promosi pertumbuhan dan sitokin-sitokin

berbeda yang tidak hanya mendukung proliferasi, diferensiasi, dan viabilitas dari ADMSCs, tetapi juga berperan besar pada proses reparasi jaringan. SVF mudah dikoleksi dan diperkaya dengan PRP. Sama dengan penelitian obat, juga ada *effective cell dose* (ECD) pada terapi sel punca, yang didefinisikan sebagai jumlah minimum sel yang dibutuhkan untuk mendapatkan efek terapi. Pada uji klinik yang difokuskan pada regenerasi tulang, dosis MSC per orang ditentukan rata-rata $1,86 \times 10^8$ sel, atau bila berdasarkan berat badan dihitung rata-rata $6,64 \times 10^6$ sel/kg. Tetapi tidak ECD yang tepat untuk terapi defek dan penyakit tulang.

Merupakan hal yang penting untuk memilih cara pemberian yang sesuai untuk terapi MSC agar bisa memperbaiki penyembuhan tulang. Injeksi intravaskular MSC (meliputi intravenous/IV, intraarterial/IA) telah digunakan oleh banyak klinisi pada defek tulang dan beberapa hasil yang menjanjikan telah dilaporkan. Pemberian intravaskular MSC merupakan metode sistemik yang paling umum, minimal invasif dan memiliki potensi untuk distribusi sel secara luas ke seluruh tubuh. Meskipun metode injeksi IV diyakini memiliki keuntungan efektivitas pada reparasi tulang, beberapa kekurangan telah dilaporkan sebelumnya, seperti sel terjebak secara signifikan setelah melewati paru-paru dan membentuk mikroemboli vaskular. Efek pemberian MSC IV disebut *pulmonary first pass effect*. Tetapi beberapa penelitian meyakini bahwa terjebaknya MSC di dalam paru-paru bisa berpotensi memiliki efek terapi. Alternatif lain, MSCs bisa diberikan secara sistemik dengan injeksi IA yang bisa mengatasi kelemahan metode IV. *Pulmonary first pass effect* dari injeksi IV dapat diatasi dengan pemberian IA. ECD bisa berkurang dengan mengubah pemberian IV menjadi IA oleh karena tidak melalui paru dan menurunkan risiko emboli selular. Embolisme selular juga telah dilaporkan pada pemberian IA BMSCs tikus, yang berhubungan dengan dosis sel dan kecepatan infus. Secara umum, pemberian lokal untuk transplantasi MSC lebih dipilih peneliti sebab setelah infus sistemik, hampir semua MSC yang terperangkap di paru, selanjutnya sel-sel tersebut akan cepat menghilang. Kemungkinan terjadi ada beberapa sel yang terdapat di ruang ekstraselular karena kebocoran vaskular akibat trauma.

Injeksi Lokal Langsung

Pada fraktur *non-union*, MSCs biasanya diambil dengan aspirasi *bone marrow* dari daerah donor (krista iliaka, sternum, dan tibia) dan diinjeksikan pada defek tulang. Metode ini telah dikembangkan sebagai sistem yang disebut *bone marrow*

aspirate concentrate (BMAC), oleh karena aspirasi *bone marrow* merupakan campuran yang berisi banyak MSCs. Beberapa penelitian memperlihatkan efektivitas injeksi langsung dalam promosi regenerasi tulang. Pada suatu penelitian, BMAC diberikan dengan injeksi langsung dengan tujuan untuk penyembuhan fraktur *non-union* pada 20 pasien, 80% menunjukkan penyembuhan total setelah 3 bulan.⁶⁴ Penelitian lain menunjukkan korelasi positif antara mineralisasi dan kuantitas BMAC yang digunakan dengan injeksi perkutaneus pada 60 pasien dengan *non-union* tibia.⁶⁵ Konsentrasi sel optimal yang digunakan pada injeksi lokal langsung masih diperdebatkan. Beberapa peneliti meyakini bahwa ECD untuk MSCs dibutuhkan lebih dari 1 juta sel/cm³ jaringan yang efektif untuk reparasi tulang. Meskipun informasi ECD dibutuhkan untuk metode injeksi lokal, untuk induksi keberhasilan regenerasi jaringan dengan pemberian lokal MSC sebaiknya dikombinasikan dengan metode injeksi sistemik. Secara umum pemberian sistemik lebih dianjurkan untuk terapi fraktur multipel dan letaknya profunda, sementara itu pemberian lokal MSC lebih tepat untuk defek tulang tunggal dan superfisial.

Pendekatan Rekayasa Jaringan

Pada defek tulang yang besar di mana terjadi kehilangan jaringan tulang secara signifikan, penerapan metode injeksi langsung untuk pemberian MSCs tidak terbukti efektif untuk mempercepat penyembuhan tulang. Dewasa ini, dengan mengontrol pemberian MSCs dan faktor-faktor yang dapat mempromosikan penyembuhan tulang di dalam pembawa biomaterial (hidroksipatit, *allograft*, seramik lainnya) diyakini dapat meningkatkan dan mempercepat pembentukan tulang baru yang fungsional. Ada 3 pendekatan untuk sistem pemberian MSCs. *Pertama*, pemberian sel-sel di dalam injeksi atau *scaffold*. *Kedua*, *codelivery* sel-sel dengan faktor pertumbuhan osteokonduktif atau *coculture* dengan tipe sel berbeda. *Ketiga*, pemberian sel-sel di dalam lingkungan dinamis 3 dimensi.^{31,59,66}

Fungsional *scaffold* untuk tulang untuk rekayasa jaringan membutuhkan 3 elemen; *scaffold* atau pembawa (3 dimensi), faktor-faktor pertumbuhan (terutama untuk stimulasi *neovascularization* dan aliran darah), dan MSCs atau faktor-faktor pertumbuhan lainnya (stimulus osteoinduksi dan perekrutan MSCs endogen). *Scaffold* atau pembawa yang ideal sebaiknya memiliki 4 karakteristik, yaitu osteogenesis, osteoinduksi, osteokonduktif, dan osteoinkorporasi. *Scaffold* ini juga harus memiliki kemampuan sebagai tempat melekatnya sel dan mendukung

pembentukan koloni. Biokompatibilitas adalah salah satu karakter utama, di mana hal ini menunjukkan kemampuannya untuk mendukung metabolisme selular endo/eksogenos normal tanpa efek toksik. Kriteria lain yang penting adalah mikroarsitektur dan komposisi *scaffold* di mana yang paling baik adalah yang mirip dengan arsitektur dan komposisi tulang aslinya. Interkoneksi pori pada *scaffold* dengan ukuran pori minimal 100 μm , diperlukan untuk difusi nutrisi, oksigen, dan untuk membuang limbah selular. Ukuran pori yang optimal adalah 200–350 μm . Faktor lain yang penting yang harus dimiliki *scaffold* adalah sifat biodegradasi, lebih utamanya yang bisa terkontrol sehingga bisa menciptakan ruang untuk pertumbuhan tulang baru. Sumber sel pada rekayasa jaringan juga menjadi isu penting, sel tersebut harus mudah diambil, tidak mahal, dan tersedia. Sel punca yang berasal dari *bone marrow* (BMSCs) merupakan sel punca yang paling banyak diteliti, paling populer, dan telah banyak digunakan untuk reparasi dan regenerasi tulang panjang. Sumber lain yang mudah didapat adalah *dental pulp stem cells* (DPSCs) yang digunakan untuk reparasi defek tulang pada tulang mandibula, maksila, dan jaringan gigi. Karakteristik fenotip sel ini mirip dengan BMSCs, memiliki kemampuan untuk *self-renewal* dan diferensiasi menjadi berbagai jenis sel. Sumber sel lain yang mudah didapat dari *dental pulp* adalah sel punca yang berasal dari *human exfoliated deciduous teeth* (SHEDs). Sama dengan DPSCs, sel ini bisa diinduksi untuk berdiferensiasi menjadi odontoblas, osteoblas, miosit, adiposit, dan sel seperti neuron.^{30,31,44,66}

Pemberian MSC di Dalam Injeksi atau Scaffold

Metode yang paling mudah untuk pemberian MSC langsung pada daerah lesi lokal dengan efikasi yang baik adalah dengan *scaffold* atau struktur 3 dimensi khusus sebagai pembawa tanpa disertai pemberian faktor-faktor pertumbuhan eksogen. Sejumlah penelitian telah membuat formulasi dengan material natural dan sintetik. Pembawa (*carriers*) berbasis seramik injeksi terdiri dari MSCs dan hidrogel biokompatibel bisa menjadi opsi yang baik untuk regenerasi tulang, tetapi memiliki kelemahan karena tidak memiliki kekuatan sehingga tidak bisa digunakan pada defek tulang yang besar.

Sifat permukaan biomaterial memiliki pengaruh penting terhadap bioaktivitas dan memainkan peran yang besar pada selular modulasi. Berbagai usaha telah dilakukan untuk meningkatkan bioaktivitas dan biokompatibilitas dari arsitektur

scaffold melalui rekayasa dan fungsionalisasi permukaan untuk mendapatkan matriks ekstraselular yang mirip dengan lingkungan aslinya untuk mendapatkan perlekatan sel dan pertumbuhan jaringan yang lebih baik. Beberapa *nanoporous* silikon dan matriks *mesoporous* memiliki kemampuan untuk mendiferensiasikan DPSCs menjadi memiliki fenotip osteogenik.

Pemberian Sel-Sel dalam Lingkungan Dinamis 3 Dimensi

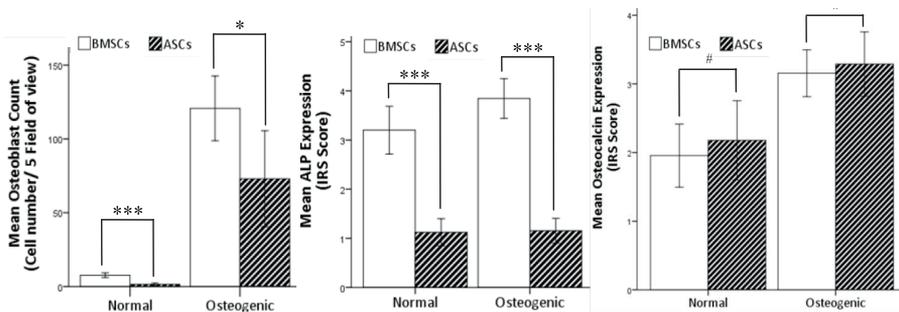
Lingkungan ekstraselular bisa meregulasi MSCs melalui ekspos mereka dengan berbagai sinyal kimia, fisik, dan mekanikal. Agar dapat menyerupai transpor secara natural dan kondisi biomekanikal pada tubuh manusia, MSCs bisa dikultur dalam lingkungan 3 dimensi. Strategi terbaru dari lingkungan dinamis 3 dimensi meliputi pembuatan lapisan bioaktif ECM pada pembawa yang *inert* untuk memberikan sinyal pada proses penyembuhan tulang. Pendekatan terbaru pada rekayasa jaringan yang mencoba untuk stimulasi ECM natural adalah hidrogel khusus dengan sifat *light-activated* imobilisasi biomolekul. Pada hidrogel ini biomolekul dilepas secara terkontrol, meliputi berbagai tipe hormon pertumbuhan dan sitokin, terjadi dengan kontrol biofaktor fotosensitif. Berbagai molekul berbeda dilepas dengan waktu yang berbeda untuk mencapai kemiripan dengan natural ECM. ECM asli terdiri atas susunan kompleks dari kolagen, glikoprotein, dan berbagai faktor-faktor pertumbuhan yang terus berubah secara dinamis pada proses regenerasi aslinya, sehingga hasil replikasi ECM yang sama dianggap hampir tidak mungkin. Dewasa ini, penelitian difokuskan pada rancangan pembawa baru dengan menggunakan matriks deselularisasi (ECM natural). Sejumlah penelitian menunjukkan efek osteogenik yang menjanjikan pada MSC yang dimasukan pada ECM deselularisasi tanpa penambahan medium kultur osteogenik atau faktor-faktor pertumbuhan. Satu penelitian menunjukkan bahwa MSCs yang di-*seeding* pada konstruksi ECM dan dikultur pada medium dengan atau tanpa deksametason menunjukkan jumlah deposisi kalsium yang sama setelah 16 hari. Terlihat juga peningkatan signifikan jumlah MSCs yang terlihat pada grup MSCs yang di-*seeding* konstruksi ECM dibandingkan dengan grup medium kultur.^{31,59,66,67}

Kekasaran permukaan dan topografi matriks/*scaffold* tulang bisa menjadi sinyal pertama pada MSCs yang di-*seeding*. Penggunaan permukaan yang berbeda bisa memodifikasi perilaku sel. Faktor-faktor fisik dari lingkungan kultur sel memiliki dampak terhadap distribusi dan bentuk sel yang diisolasi dari *dental pulp* (DPSCs) dan mampu meregulasi diferensiasinya menjadi fenotip osteogenik.

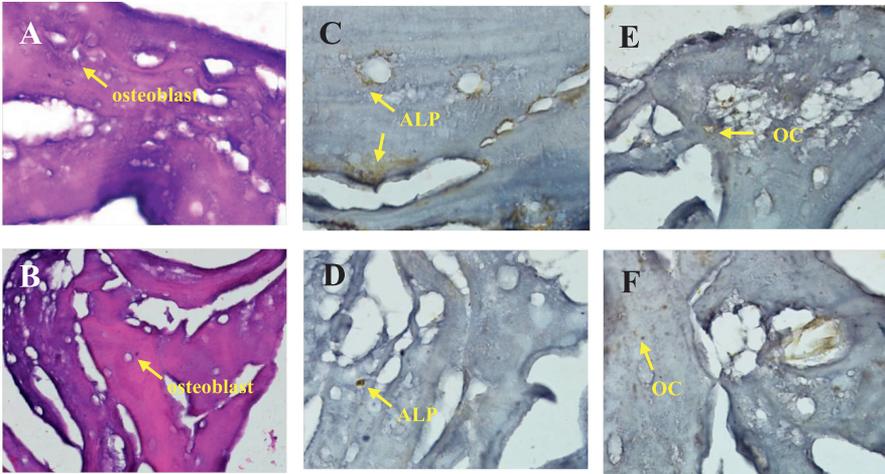
Telah dilakukan penelitian dengan menggunakan ECM natural *xenogenic bovine Demineralized Bone Matrix* (DBM) untuk mengetahui kemampuan *scaffold* ini dalam mendiferensiasikan MSCs menjadi osteoblas. Penelitian dilakukan pada 4 grup sampel; grup 1 terdiri atas *scaffold* DBM dengan *bone marrow mesenchymal stem cells* (BMSCs) pada medium kultur normal, grup 2 terdiri atas *scaffold* DBM dengan *adiposa stem cells* (ASCs) pada medium kultur normal, grup 3 terdiri atas *scaffold* DBM dengan *bone marrow mesenchymal stem cells* (BMSCs) pada medium kultur osteogenik, dan grup 4 terdiri atas *scaffold* DBM dengan *adiposa stem cells* (ASCs) pada medium kultur osteogenik. Pada penelitian ini variabel yang dinilai adalah jumlah sel osteoblas, kadar alkali fosfatase (ALP) dan osteokalsin (OC). Hasil penelitian didapatkan sebagai berikut.⁶⁶

Tabel 5.3 Diferensiasi *osteogenic* pada MSCs.

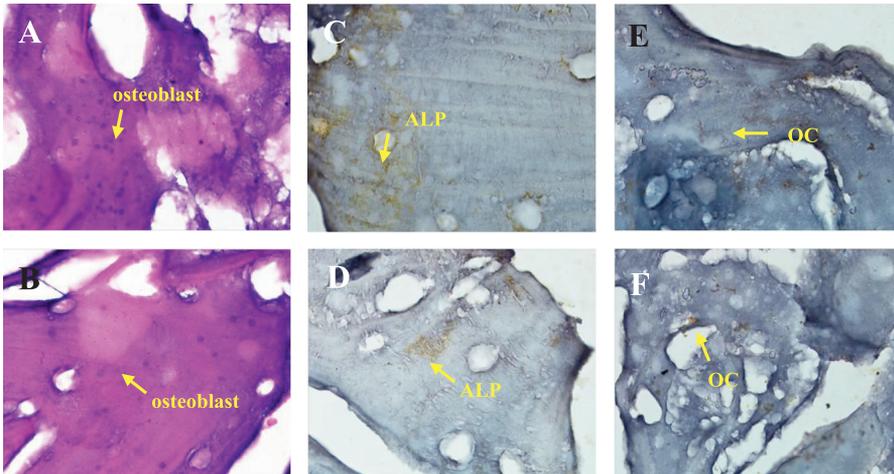
	BMSC (Rata-rata ± SD)		ASC (Rata-rata ± SD)	
	Kondisi Kultur			
	Normal	Osteogenik	Normal	Osteogenik
Jumlah Osteoblas (Jumlah sel/ 5 FV)	7.67±2.00	120.67±28.54	1.44±1.24	73.00±42.32
Ekspresi ALP (Nilai IRS)	3.20±0.63	3.84±0.53	1.12±0.36	1.16±0.33
Ekspresi Osteocalcin (Nilai IRS)	1.96±0.59	3.16±0.45	2.18±0.75	3.29±0.61



Gambar 5.13 Jumlah sel osteoblas, skor imunoreaktif ALP dan osteokalsin BMSCs dan ASCs pada kultur normal dan kultur osteogenik (*= $p < 0.05$ **= $p < 0.01$ ***= $p < 0.001$ #= $p > 0.05$).



Gambar 5.14 (A) Pengecatan HE pada kultur normal BMSCs, (B) Pengecatan HE pada kultur normal ASCs, (C) Ekspresi ALP kultur normal BMSCs, (D) Ekspresi ALP pada kultur normal ASCs, (E) Ekspresi OC pada kultur normal BMSCs dan (F) Ekspresi OC pada kultur normal ASCs.



Gambar 5.15 (A) Pengecatan HE pada kultur osteogenik BMSCs. (B) Pengecatan HE pada kultur osteogenik ASCs, (C) Ekspresi ALP pada kultur osteogenik BMSCs. (D) Ekspresi ALP pada kultur osteogenik ASCs. (E) Ekspresi OC pada kultur osteogenik BMSCs. (F) Ekspresi OC pada kultur osteogenik ASCs.

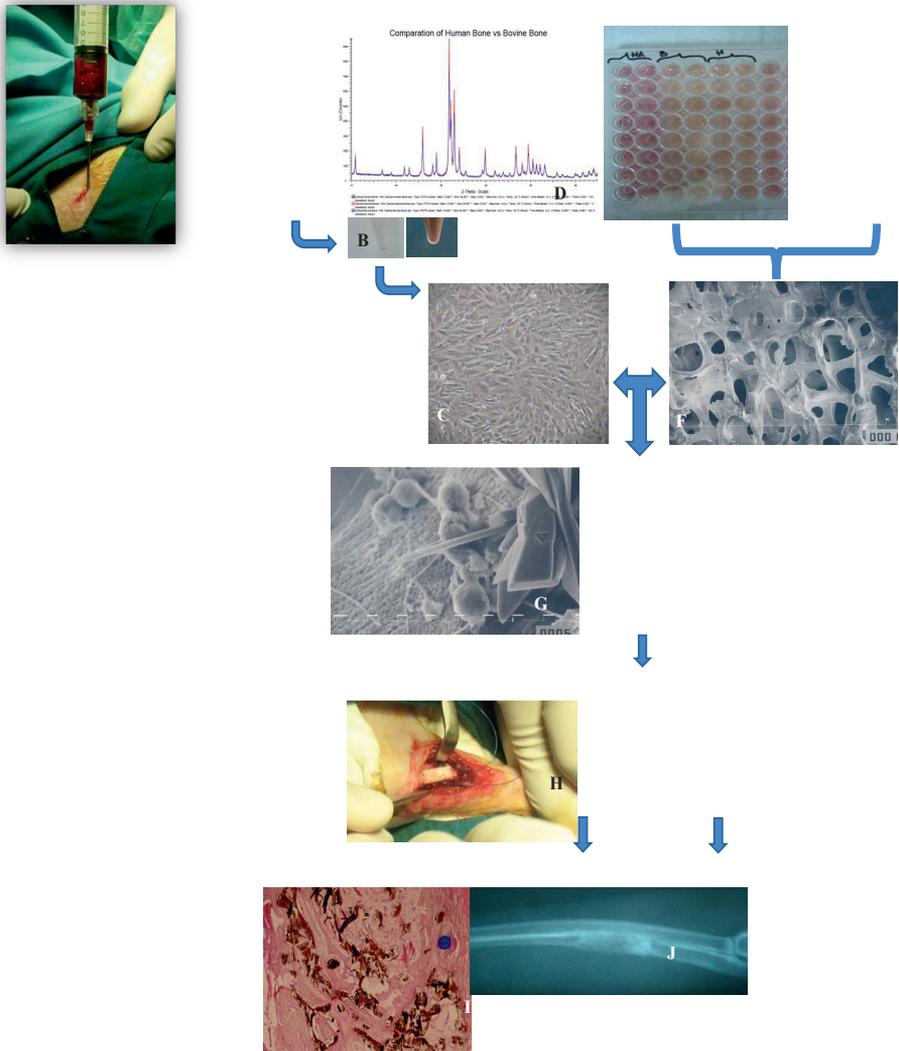
Kesimpulan penelitian ini adalah *Xenogenic bovine Demineralized Bone Matrix* (DBM) memiliki kemampuan sebagai *scaffold* di mana MSCs bisa berdiferensiasi menjadi osteoblast. Hal ini dikarenakan DBM berisi matriks organik dan beberapa faktor pertumbuhan yang bersifat osteogenik. Selain itu, juga didapatkan bahwa BMSCs memiliki kemampuan berdiferensiasi menjadi osteoblas lebih baik daripada ASCs.⁶⁶

Aplikasi Klinis MSCs untuk Penyembuhan Tulang

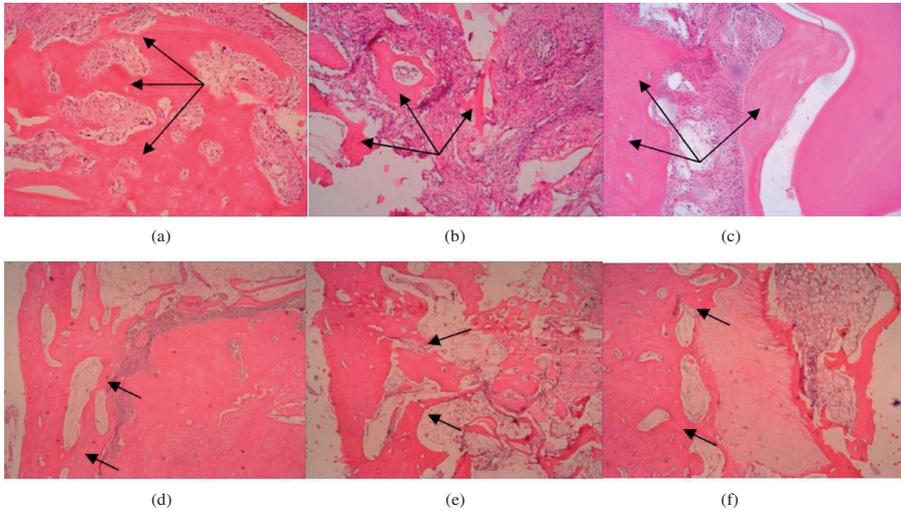
Sampai sekarang, terapi dengan MSCs di seluruh dunia masih dalam ranah penelitian dan belum ada yang menjadi terapi standar. MSCs telah digunakan pada rekayasa jaringan tulang sebagai opsi terapi untuk meningkatkan reparasi tulang. MSCs telah diteliti pada berbagai spesies seperti tikus, kelinci, anjing, dan kuda. Sama dengan manusia, MSCs bisa diisolasi dari hewan-hewan di atas, membuat model hewan yang berfungsi sebagai media pembelajaran tentang mekanisme dan pendekatan aplikasi klinis. Uji klinis yang telah digunakan pada trauma tulang dibagi dalam 2 kategori berdasarkan tempat aplikasi MSC: 1) defek oral dan maksilofasial; dan 2) Defek tulang panjang.

Penulis telah melakukan penelitian pada *critical sized defect* (CSD) tulang panjang (ulna) pada kelinci, sampel dibagi dalam dua grup, yaitu grup (1) CSD direkonstruksi dengan *bovine* hidroksiapatit dan grup (2) CSD direkonstruksi dengan komposit *bovine* hidroksiapatit dengan BMSCs. Variabel yang dinilai adalah regenerasi yang ditunjukkan oleh kadar kolagen tipe 1, osteokalsin, histologi, dan radiologi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa komposit menghasilkan regenerasi tulang CSD yang jauh lebih baik daripada hanya rekonstruksi menggunakan *bovine* hidroksiapatit saja.³¹

Penelitian berikutnya telah dilakukan pada *critical sized defect* pada mandibula. Pada penelitian ini dilakukan rekonstruksi dengan menggunakan material yang dibagi dalam 3 grup: grup 1 komposit *bovine* hidroksiapatit (BHA) dengan human amniotic MSCs (hAMSCs), grup 2 *bovine* hidroksiapatit (BHA), dan grup 3 menggunakan *autograft*. Variabel yang diperiksa untuk menilai efikasi dari regenerasi tulang pada minggu pertama dan kedua adalah histologi dan imunohistokimia yang meliputi VEGF, BMP2, Runx2, dan angiogenesis, sedangkan pada minggu ke-12 adalah ekspresi Runx2, osteokalsin, kolagen tipe 1, area trabekula dan inkorporasi tulang.



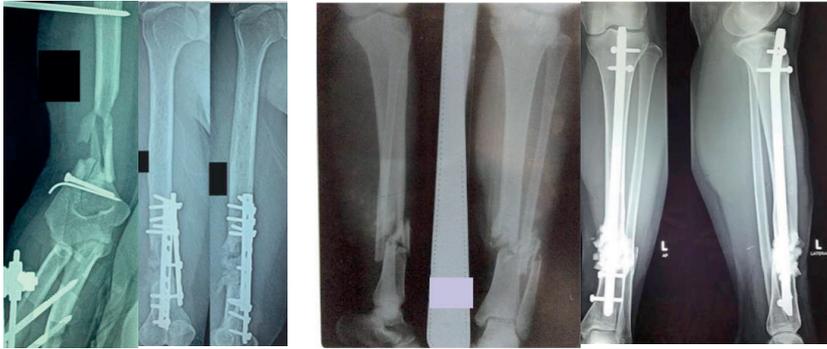
Gambar 5.16 Tahapan aplikasi rekayasa jaringan pada *critical sized defect* tulang ulna kelinci. (A) Aspirasi BMSCs. (B) Isolasi BMSCs. (C) Kultur BMSCs. (D) Uji komposisi *scaffold bovine* dengan *X-ray diffractometer*. (E) Uji toksisitas dengan *MTT assay*. (F) *Scaffold bovine* hidroksiapatit dengan uji *Scanning Electron Microscope*. (G) Komposit BMSCs dengan *bovine* hidroksiapatit. (H) Implantasi pada hewan coba. (I) Pemeriksaan histologi yang menunjukkan pembentukan tulang baru. (J) Radiologi menunjukkan *union* pada *critical sized defect* tulang ulna kelinci.³¹



Gambar 5.17 Hasil evaluasi histologi area trabekula dan inkorporasi tulang pada minggu ke 12. Rata-rata area trabekula pada komposit BHA dengan hAMSCs dan *autograft* lebih tinggi secara signifikan daripada grup BHA (atas kiri). Skor pada bagian tengah inkorporasi komposit BHA dengan hAMSCs dan *autograft* relatif lebih tinggi daripada grup BHA (kanan atas). Catatan: Foto a, b, dan c menunjukkan area trabekula pada grup komposit BHA dengan hAMSCs, BHA, dan *autograft* (panah hitam menunjukkan terabekula tulang). Foto d, e, dan f menunjukkan inkorporasi grup komposit BHA dengan hAMSCs, BHA dan *autograft* (panah hitam menunjukkan inkorporasi antara tulang baru dengan tulang resipien).

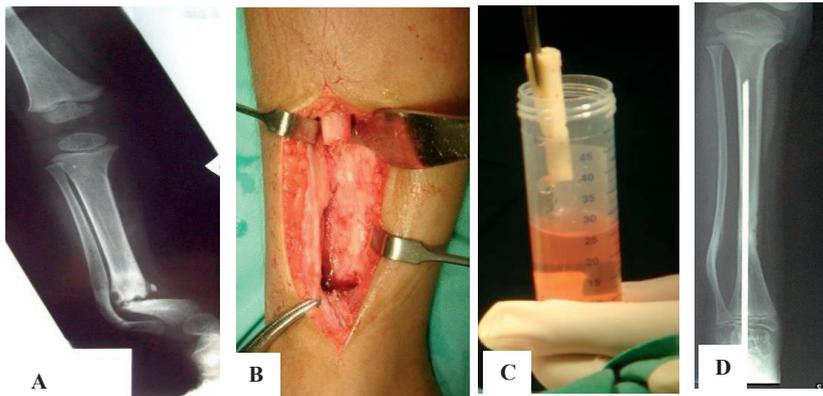
Penelitian ini menyimpulkan bahwa aktivitas penyembuhan awal CSD mandibula lebih tinggi pada *autograft* dibandingkan komposit BHA dengan hAMSCs, sementara itu aktivitas osteogenik pada fase lanjut penyembuhan tulang komposit BHA dengan hAMSCs lebih tinggi dari *autograft*. Selain itu, juga disimpulkan bahwa kapasitas osteogenik komposit BHA dengan hAMSCs sebanding dengan *autograft*.⁶⁸

Beberapa aplikasi klinis telah dilakukan di RSUD Dr. Soetomo – FK UNAIR dengan sumber *scaffold* dan sel dari Instalasi Bank Jaringan dan Sel RSUD Dr. Soetomo. Aplikasi klinis yang telah dilaporkan menggunakan kombinasi antara *scaffold* tulang kancellor dengan PRP dan *aspirate bone marrow*. Penggunaan kombinasi di atas telah dipublikasikan pada *critical sized defect* tulang humerus dan tibia, dari hasil evaluasi radiologi didapatkan *union* pada defek dan evaluasi fungsi ekstremitas yang direkonstruksi menunjukkan hasil yang baik.



Gambar 5.18 Terapi *Critical Sized Defect* menggunakan kombinasi *allograft* kancellus, PRP, dan *aspirate bone marrow*. Kiri, pada tulang humerus, dan kanan, pada tulang tibia.⁶⁹

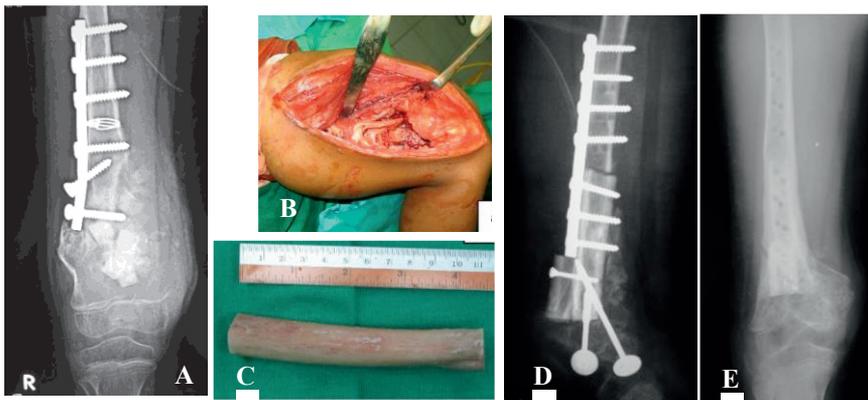
Aplikasi klinis lainnya yang telah dilakukan adalah menggunakan *massive intercalary bone allograft* pada kasus *congenital pseudoarthrosis tibia*. Kasus ini jarang ditemukan dan dikaitkan dengan neurofibromatosis tipe 1. Pada kondisi cenderung timbul fraktur spontan pada bagian tengah diafisis tibia, dan malangnya fraktur jenis ini tidak dapat sembuh spontan sehingga menimbulkan *psuedoarthrosis*. Banyak opsi yang telah dilakukan untuk terapi kasus ini dengan hasil yang jelek. Penelitian dengan menggunakan *massive intercalary bone allograft* yang dikombinasikan dengan



Gambar 5.19 (A) *Congenital pseudoarthrosis tibia*. (B) Reseksi jaringan patologis pada tulang tibia. (C) *Massive intercalary bone allograft* di-seeding dengan BMSCs. (D) Hasil evaluasi radiologi menunjukkan *union* tulang tibia dengan dan fungsi ekstremitas normal.⁷⁰

BMSCs dari 12 kasus dengan hasil yang baik pada 8 kasus, serta menunjukkan hasil ini lebih baik daripada berbagai jenis terapi yang ada saat ini.

Pada kondisi normal, anak-anak memiliki lapisan periosteum yang tebal, dan periosteum merupakan sumber utama sel punca mesenkimal selain dari jaringan *bone marrow*, sehingga anak-anak memiliki potensi penyembuhan tulang sangat besar bila terjadi fraktur. Potensi ini memberikan dampak positif pada anak dengan *critical sized defect*. Seperti telah dijelaskan pada paragraf sebelumnya bahwa rekonstruksi pada *critical sized defect* merupakan tantangan tersendiri. Beberapa problem yang ditemui adalah belum ada *graft* yang benar-benar sesuai, dan yang ada saat ini terdiri dari 2 opsi, yaitu rekonstruksi biologi menggunakan *massive intercalary bone allograft*, pada opsi ini akan terjadi inkorporasi antara tulang donor dengan resipien tetapi hanya pada daerah kontak saja, sedangkan pada bagian tengah *graft* tetap merupakan tulang mati yang suatu saat akan mengalami fraktur, sedangkan opsi kedua adalah dengan implan di mana tidak akan pernah terjadi inkorporasi dengan tulang tuan rumah. Penulis telah melaporkan hasil rekonstruksi dengan *critical sized defect* pada anak paska reseksi tumor dengan menggunakan *massive intercalary bone allograft* dan hasilnya terjadi inkorporasi sempurna termasuk pada bagian tulang. Evaluasi setelah 6 tahun terlihat *remodeling* seluruh tulang *allograft*, hal ini bisa terjadi karena peran MSCs dari jaringan sekitarnya masih sangat baik.⁷¹



Gambar 5.20 (A) Hemangioma pada femur distal. (B) Reseksi tumor. (C) *Massive intercalary bone allograft*. (D) Paska rekonstruksi. (E) 6 tahun paska rekonstruksi terlihat *remodeling* sempurna tulang *allograft*.⁷¹

BAB 6

Rekayasa Jaringan Kartilago

Kartilago artikular merupakan jaringan yang kompleks karena kemampuan reparasinya yang buruk pasca cedera, disebabkan karena tidak adanya pembuluh darah, saraf, dan jaringan limfa. Oleh karena itu, reparasi kartilago dianggap sebagai kondisi yang sangat sulit. Dewasa ini, secara global terlihat peningkatan jumlah kondisi yang menimbulkan kelemahan dan nyeri hebat yang disebabkan karena defek kartilago. Defek kartilago bisa terjadi karena cedera atau penyakit sendi yang telah menjadi problem besar bagi komunitas masyarakat. Osteoarthritis (OA) merupakan kondisi kronik yang dipicu oleh kegagalan kartilago sendi, sehingga pada kondisi yang berat terjadi artikulasi tulang dengan tulang yang bisa menimbulkan nyeri hebat. Perkiraan insiden penyakit ini adalah 9,6% pada pria dan 18% pada wanita. Penyakit ini termasuk dalam peringkat atas yang menjadi fokus utama oleh WHO, karena kerusakan kartilago artikular merupakan problem besar dengan solusi efektif yang masih sangat sedikit. Cedera langsung, degenerasi kronik (beban mekanik berlebihan), atau abnormalitas tulang subkondral di

bawahnya, merupakan faktor-faktor utama yang menimbulkan lesi kartilago. Meskipun aktivitas metaboliknya rendah dan kemampuan penyembuhan kondrosit relatif buruk, diketahui bahwa kartilago artikular merupakan jaringan yang dinamis dan responsif, serta kontribusi komponen ECM yang diproduksi oleh sel memiliki peran penting.^{24,25}

Kartilago artikular (kartilago hialin pada permukaan artikular tulang) memiliki sifat mekanik yang luar biasa (modulus elastisitas sebesar ~123MPa; *mechanical tensile strength* sebesar 17 MPa; modulus kompresi yang bervariasi antara 0.53-1.82 MPa; *compressive stress* antara 14-59 MPa) dan ketahanan yang lama (*lasting durability*), meskipun ketebalannya hanya beberapa milimeter. Kartilago merupakan struktur dan komposisi unik yang memberikan sifat permukaan sendi memiliki kombinasi gesekan yang rendah dengan lubrikasi yang tinggi, sehingga dapat menyerap beban gaya dan resistan terhadap keausan saat menerima beban berulang yang besar sepanjang hidup manusia. Jaringan avaskular ini tidak memiliki jaringan saraf dan drainase limfa yang terdiri dari hanya satu tipe sel (kondrosit) dan ECM yang sangat banyak, di mana komposisinya 75% kolagen, 17% proteoglikan dengan muatan negatif (inti protein dengan banyak pecabangan rantai glikosaminoglikan pada sisinya, terutama dibuat oleh kondrotin sulfat dan asam hialuronik), 2% DNA, dan *adhesion glycoproteins* serta elastin. Tidak adanya pembuluh darah dikombinasikan dengan potensi proliferasi kondrosit yang terbatas membatasi proses penyembuhan intrinsik dengan menghambat transpor mediator-mediator inflamasi ke daerah defek. Konsentrasi kondrosit yang rendah ini mendapatkan suplai oksigen dan nutrisi melalui kombinasi difusi dan aliran cairan pada saat sendi mendapat beban. Walaupun laju sintesis glikosaminoglikan (GAG) dan kolagen (terutama tipe II) pada pembentukan jaringan *ex vivo* tergantung dari pertukaran gas, sel masih bisa hidup dalam kondisi hipoksi, yang merupakan sifat pembawaan kartilago dewasa pada sendi artikular. Kombinasi serabut kolagen dengan GAG memberikan kartilago kekuatan tarik, kemampuan menahan beban, dan kelenturan.^{12,24,25}

Kerusakan kartilago akan menyebabkan penurunan produksi komponen-komponen ECM, tetapi jumlah kondrosit tidak dipengaruhi oleh degenerasi, sehingga kerusakan kartilago artikular merupakan salah satu problem yang serius bagi spesialis ortopedi. Menurut kondisi patologinya, ada 3 jenis kerusakan kartilago sebagai berikut.

1. Defek akibat cedera akut dan kartilago di sekitarnya dalam kondisi sehat atau sedikit terganggu.
2. Lesi degenerasi yang terlihat pada cedera berulang, di mana kualitas kartilago sekitar tidak baik.
3. Kehilangan kartilago karena proses patologi pada sel-sel dan matriks, seperti pada osteoarthritis (OA) yang merupakan penyakit organ.

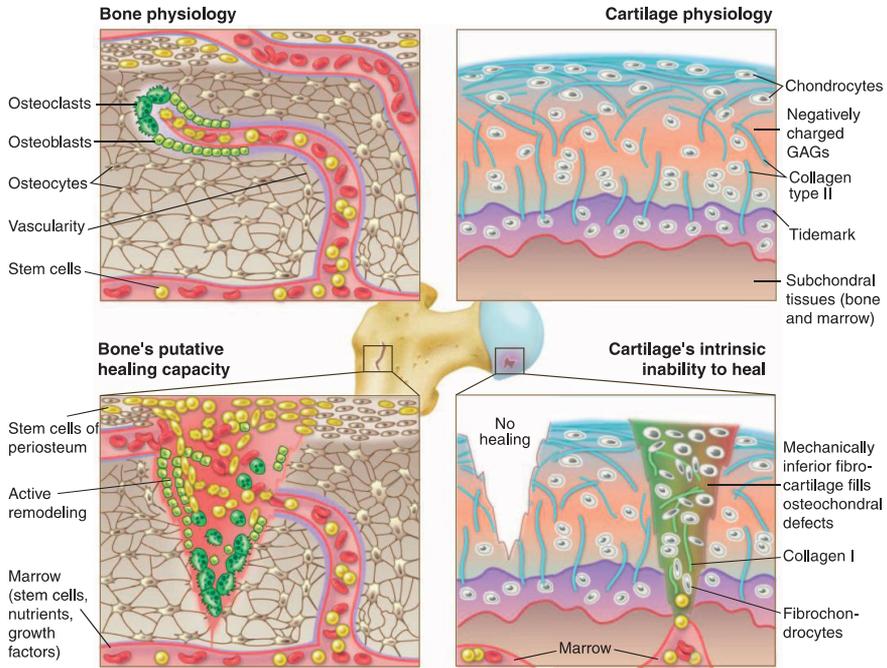
International Cartilage Repair Society (ICRS) membuat klasifikasi untuk mengetahui besarnya trauma dan memberikan pengertian tentang berat ringannya lesi, yang dibagi dalam 5 *grade level*.

1. *Grade 0* : kartilago intak
2. *Grade 1* : lesi superfisial (*fissures* atau *cracks*)
3. *Grade 2* : *fissures* kurang dari separuh ketebalan kartilago
4. *Grade 3* : *fissures* lebih dari setengah ketebalan kartilago
5. *Grade 4* : *fissures* masuk ke dalam mencapai tulang subkondral

Lesi *grade 1* sampai 3 yang tidak mencapai tulang subkondral, hanya pada kartilago saja dan tidak bisa mengalami penyembuhan karena tidak ada pembuluh darah yang terlibat. Sebaliknya pada *grade 4*, lesi masuk ke dalam mencapai tulang subkondral yang memiliki vaskularisasi, sehingga lesi akan mengalami reparasi spontan di mana sel punca mesenkimal kondroprogenitor direkrut, yang selanjutnya akan invasi lesi membentuk kartilago. Jaringan yang baru terbentuk ini merupakan jaringan fibrosa dan tidak memiliki sifat seperti kartilago hialin aslinya. Hubungan antara kekakuan kartilago dan klasifikasi ACRS diprediksi akan kehilangan kekakuan kartilago sekitar 25% untuk setiap *grade* ICRS. Berikut ini klasifikasi Bentley pada patella.

1. *Grade 1* : diameter defek $\leq 0,5$ cm
2. *Grade 2* : diameter defek $\leq 1,3$ cm
3. *Grade 3* : diameter defek $\geq 1,3$ cm
4. *Grade 4* : lesi erosi sampai ke tulang

Meskipun terdapat beberapa terapi dan pendekatan dalam mengatasi problem kartilago, sampai saat ini belum ada satu pun terapi yang ada dan diterima secara umum untuk mencegah hilangnya kartilago.



Gambar 6.1 Perbedaan lingkungan fisiologi, laju metabolik, dan selular menyebabkan tulang dan kartilago memiliki dampak besar pada potensinya untuk regenerasi jaringan ini. Gerakan artikulasi besar yang dialami kartilago (tidak pada tulang) bisa merusak jaringan yang baru terbentuk dan tidak memiliki lubrikasi yang dibutuhkan, kompresi, dan *tensile*. Tambahan lagi hialin kartilago secara alami tidak bisa melekat sehingga menghalangi integrasi, sedangkan tulang berintegrasi dengan cepat bahkan dengan logam. Melalui keberadaan sel punca pada *marrow* dan pada periosteum, begitu juga akses nutrisi yang banyak melalui vaskular, tulang memiliki kapasitas reparatif yang bisa dimanfaatkan dalam terapi regenerasi. Hiposelularitas kartilago dan kurangnya suplai nutrisi, dilengkapi dengan ketidakmampuan MSC *bone marrow* atau sel kondroprogenitor residen untuk regenerasi ECM hialin, membuat jaringan tidak mampu memberi respons penyembuhan. Kontras dengan kemampuan tulang untuk sembuh, kartilago memerlukan berbagai pendekatan terapi dari luar untuk bisa regenerasi.⁷²

SEJARAH TERAPI CEDERA KARTILAGO

Hunter melaporkan pada awal abad 18 bahwa *“From Hippocrates to the present age it is universally known that ulcerated cartilage is a troublesome thing and that when once destroyed it is not repaired”*. Pada awal sampai pertengahan abad 20, problem

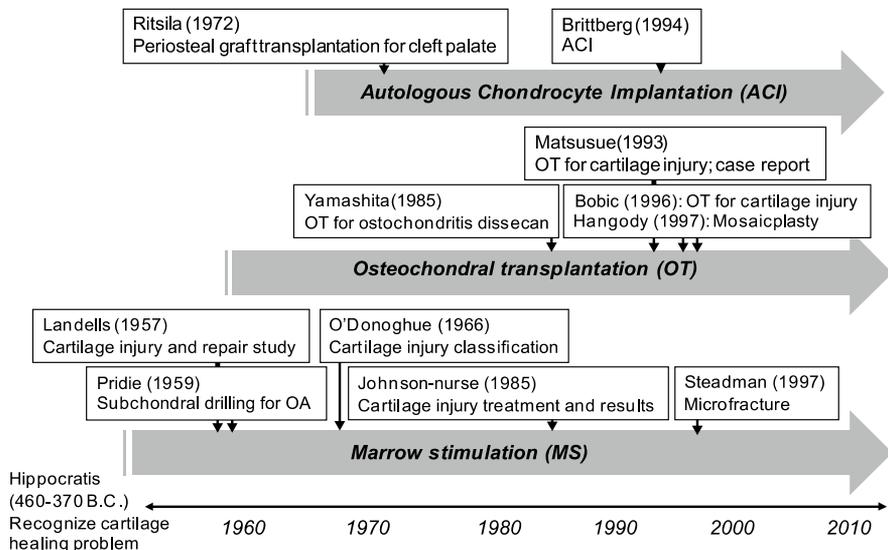
yang dialami masih tetap sama. Ilustrasi komplit cedera kartilago dan reparasi pada manusia telah dijelaskan oleh Landell pada tahun 1957. Dia mengumpulkan data dari manusia selama operasi dan *necropsy*, 3 sampai 10 tahun setelah cedera terjadi. Dia menjelaskan bahwa normal nutrisi kartilago artikular terutama berasal dari cairan sinovial. Terdapat lapisan tipis tulang yang menghalangi akses kartilago artikular ke tulang kanelos di bawahnya. Bila terjadi jaringan granulasi oleh karena cedera, jaringan ini akan diganti oleh jaringan fibrosa atau fibrokartilago. Oleh karena itu, *debridement* sendi dan akses terhadap vaskular di bawahnya pada tulang subkondral di daerah cedera pada saat itu direkomendasikan.^{73,74}

Cedera kartilago artikular oleh O'Donoghue pada tahun 1966 dibagi dalam 3 kategori berdasarkan mekanisme cedera dan tipe lesi meliputi *shear*, impaksi, dan avulsi osteokondral. Pada periode berikutnya, serial kasus dengan 76 pasien dengan lesi kondral murni telah dilaporkan oleh John Nures pada tahun 1985. Terdapat 2 pola lesi yang berbeda, lesi *full-thickness* dan *partial-thickness*. Terapi operasi yang dilaporkan bertujuan untuk mengurangi nyeri dan kecatatan sambil mempertahankan ruang gerak sendi. Lesi *full-thickness* kartilago diterapi dengan *drilling* subkondral dan *partial-thickness* diterapi dengan *debridement flap* dan mengambil semua jaringan yang terlepas. Sementara itu telah dilaporkan sejumlah artikel ilmiah yang mengeksplorasi pengetahuan tentang kartilago artikular, dan opsi pembedahan lain untuk merestorasi defek kartilago, juga penelitian pada hewan. Hal di atas memberi kontribusi pada kemajuan terapi cedera kartilago yang memberikan reparasi jaringan dengan kualitas yang lebih baik pada periode berikutnya.

Pridie mengenalkan teknik *drilling* subkondral sebagai prosedur operasi OA pada tahun 1959. Tulang subkondral dilubangi dengan *wire*. Lubang akan melepas sel-sel di dalam jaringan kanelos *bone marrow* untuk mendorong penyembuhan kartilago artikular. Jaringan granulasi subkondral mengisi defek dengan fibrosa atau fibrokartilago, bahkan bisa jadi kartilago hialin. Teknik *drilling* yang dilakukan oleh Pridie selanjutnya dilakukan sebagai prosedur operasi utama pada terapi kartilago *full-thickness*. Steadman menjelaskan prosedur operasi yang dikenal sebagai *microfracture* berdasarkan pada prinsip stimulasi *marrow* untuk terapi cedera kartilago pada tahun 1997. *Awl* yang dirancang khusus digunakan untuk membuat perforasi multipel ke dalam tulang subkondral. Portal subkondral multipel kecil dan dengan jarak yang berdekatan antara portal dapat meningkatkan *resurfacing* kondral. Teknik ini kemudian diterima untuk terapi defek kondral kecil pada praktek klinik.

Yamashita dan kolega pada tahun 1985 menguraikan 2 kasus *osteocondritis dissecans* yang diterapi dengan *graft* osteokondral *autograft*. *Graft* diambil dari area normal medial *kondilus* femur, di mana bila ekstensi tidak terdapat kontak dengan *patella* maupun meniskus. *Graft* osteokondral difiksasi dengan *AO mini-cancellous screws*. Dalam periode berikutnya, kasus pertama defek kondral *full-thickness* diterapi dengan transplantasi *graft* osteokondral multipel yang dilaporkan oleh Masusue dan kolega pada tahun 1993. *Graft* dibuat sedemikian rupa agar ukurannya pas dengan portal tulang dan kartilago femoral kondilus di sekitarnya. Pemeriksaan *arthroscopy* 2 tahun setelah pembedahan menunjukkan defek kondral donor dilapisi secara komplit oleh jaringan kondral, dan fragmen kondral yang diimplantasikan tidak bisa dibedakan dengan regenerasi jaringan osteokondral di sekitarnya. Bobic pada tahun 1996 melaporkan 12 kasus lesi kondral yang diterapi dengan transplantasi osteokondral autologus dengan lama evaluasi 2 tahun. Selanjutnya Hangody pada tahun 1997 menyampaikan tentang *mosaicplasty* yang terdiri dari transplantasi osteokondral autologus dengan *graft* kecil multipel dengan teknik *arthroscopy* satu tahap dan melaporkan hasil klinis setelah evaluasi selama 5 tahun. Sejak saat itu *mosaicplasty* telah banyak digunakan karena potensinya dalam terapi defek kondral.

Periosteum telah diketahui memainkan peran penting pada pertumbuhan tulang dan reparasi fraktur. Lapisan kambium periosteum merupakan sumber sel-sel mesenkimal yang belum berdiferensiasi menjadi kartilago dan memulai formasi tulang. Rubak dan kolega melakukan transplantasi *graft* periosteum pada defek kartilago *full-thickness* dengan hewan model kelinci, defek kartilago terisi kartilago *hyaline-like* setelah 3-4 minggu. Sementara itu hasil yang kurang baik juga didapatkan karena efek imobilisasi setelah transplantasi. Defek kartilago diisi oleh sedikit kondrosit dan tidak diisi dengan kartilago *hyaline-like*. Penelitian selanjutnya dilakukan untuk menentukan fenotip kondrosit dan ketahanan kartilago baru yang terbentuk tergantung pada stimulasi mekanik dengan mesin *continuous passive motion*. Pengembangan riset biologi saat itu meneliti kemungkinan mempertahankan fenotip kondrogenik dari kultur kondrosit primer. Progeni kondrosit memiliki kemampuan untuk mengekspresikan kembali fenotipnya dengan memproduksi kembali kolagen tipe II dan proteoglikan spesifik kartilago pada sistem kultur *monolayer*. Peran regenerasi kondrogenik dari periosteum dan potensial rediferensiasi progeni kondrosit menjadi konsep



Gambar 6.2 Perjalanan sejarah terapi trauma kartilago dan munculnya konsep baru pada abad 20.⁷³

penting untuk mendapatkan reparasi kartilago *hyaline-like* pada model animal periode berikutnya. Serial kasus pertama dari implantasi *autologous chondrocytes* telah dipublikasikan oleh Brittberg dan kolega pada tahun 1994.⁷³

Kegiatan klinik yang signifikan dari 3 konsep dasar disimpulkan pada Gambar 6.1 masing-masing konsep dikembangkan dari pengalaman yang berbeda dan didukung oleh latar belakang ilmiah berbeda. Kemajuan ilmiah saat ini membantu ilustrasi dan memperbaiki pembedahan serta teknik rehabilitasi pada masing-masing konsep. Untuk memilih jenis pembedahan tidak hanya tergantung pada karakter lesi kartilago, tetapi ketersediaan teknologi dan instrumen yang spesifik menjadi penting dalam keputusan akhir.

STRATEGI PEMBEDAHAN UNTUK DEFEK KARTILAGO SAAT INI

Strategi Terapi yang Mengeksploitasi Respons Spontan Reparasi dengan *Stimulation of The Bone Marrow*

Pendekatan terapi ini meliputi *abrasion chondroplasty*, *Pridie drilling*, dan *microfracture* (dewasa ini disebut *microdrilling*). Tujuan dari teknik ini adalah untuk mengekspos lesi jaringan kartilago terhadap *bone marrow* yang bersama-

sama dengan kompartemen di sekitarnya (seperti vaskular dan perivaskular, jaringan tulang, jaringan lemak, dan sinovium) juga terstimulasi. Pada dasarnya, intervensi ini mengarah kepada respons reparasi spontan, berdasarkan perdarahan yang diinduksi proses pembedahan dari tulang subkondral dan selanjutnya akan membentuk bekuan darah. Induksi respons reparasi spontan telah diketahui dari penelitian hewan. Tetapi respons penyembuhan sangat bervariasi dan tidak bisa direproduksi dan jaringan yang terbentuk adalah jaringan fibrosa dan tidak sekuat aslinya. Teknik ini diperkenalkan beberapa dekade yang lalu, pada saat itu tidak ada alternatif atau strategi yang lebih efektif yang tersedia, dalam beberapa tahun berikutnya pengalaman klinis memberikan keuntungan pada riset selanjutnya.^{12,75,76}

Berbagai penelitian klinis retrospektif tentang *abrasion chondroplasty* telah dilakukan. Angka keberhasilan cukup bervariasi dan tergantung banyak faktor seperti umur pasien, level aktivitas fisik, beratnya kondisi artritis, dan periode evaluasi. Satu uji klinis yang relevan telah dilakukan, pasien yang menderita OA dan kondisi nyeri pada lutut dilakukan kombinasi *abrasion chondroplasty* dan osteotomi (untuk *realignment* dan menghilangkan nyeri) atau hanya osteotomi. Individu yang mendapat kombinasi terapi ini menunjukkan jaringan reparasi kartilago *hyaline-like* yang signifikan tinggi dan insiden rendah degenerasi jaringan sampai 12 bulan setelah operasi dibandingkan dengan pasien yang hanya dilakukan osteotomi saja. Tetapi tidak ada perbedaan hasil klinik setelah 2 (dan sampai 9) tahun.

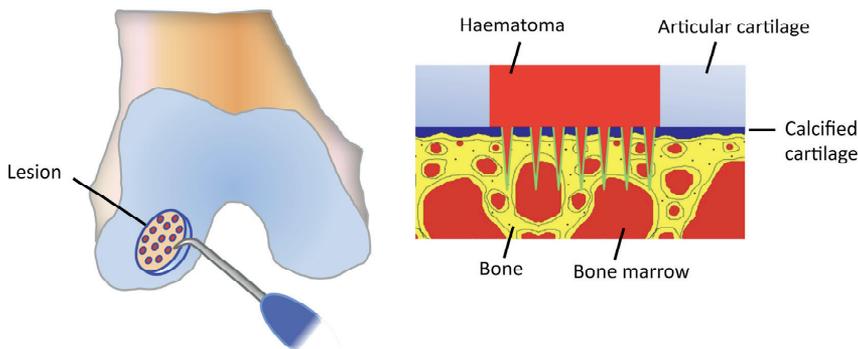
Seperti telah diuraikan dalam paragraf di atas, ide untuk melakukan lubang *drilling* pada area yang rusak dari lapisan kartilago artikular ke dalam ruang *bone marrow* subkondral dikembangkan oleh Pridie tahun 1959. Rasionalisasi di belakang konsep ini adalah stimulasi reaksi reparasi spontan, tetapi jaringan yang terbentuk memiliki komposisi, struktur, dan ketahanan yang bervariasi. Intervensi ini sekarang dilakukan terutama pada pasien muda dengan kondisi artritis seperti *osteocondritis dissecans*. Tujuannya untuk menghilangkan gejala dan memperbaiki fungsi sendi dengan mempromosikan *resurfacing* lapisan artikular dengan jaringan reparasi kartilago tipe fibrokartilago. Laporan klinis meyakini bahwa pasien yang menderita artrosis umum akan mendapat keuntungan terbesar dari *Pridie drilling*. Tetapi prosedur ini hanya menawarkan keuntungan untuk jangka pendek saja, dan hanya pada pasien usia muda, pada jangka panjang (beberapa tahun setelah pembedahan) keuntungan akan hilang.

Teknik *microfracture* merupakan modifikasi dari pendekatan Pridie yang dikembangkan oleh Steadman dan kolega. Setelah mengambil lapisan kalsifikasi kartilago, dibuat lubang multipel pada tulang subkondral, dengan diameter 1-2 mm dengan jarak 3-5 mm dengan menggunakan instrumen khusus. Proses ini dihubungkan dengan pendarahan dan formasi bekuan darah. Teknik ini telah dimodifikasi dengan memperbaiki *microdrilling* dengan kontrol yang lebih baik, lebih mudah dikerjakan dan kurang traumatik. Teknik mikrofraktur berkembang menjadi pendekatan *drilling micro-Pridie* dan berdasarkan prinsip biologi yang sama. Keuntungan teknik terakhir ini adalah menghindari nekrosis termal yang diperkirakan terjadi pada abrasi dan *drilling*. Tetapi hal ini belum terkonfirmasi baik secara eksperimental maupun klinis. *Microdrilling* sekarang dilakukan lebih luas daripada teknik stimulasi *bone marrow* lainnya. Meskipun begitu, tidak ada uji klinik prospektif yang mengonfirmasi atau menolak keuntungan metode ini dibandingkan teknik stimulasi *bone marrow*. *Microdrilling* dan *microfracture* dianjurkan terutama pada pasien muda, di mana telah dilaporkan hasil yang baik, yaitu perbaikan fungsi sendi dan mengurangi nyeri pada 60-80% kasus, kemungkinan karena besarnya jumlah dan tingginya level aktivitas cadangan sel-sel prekursor yang berpartisipasi, oleh karena itu respons reparasi lebih besar daripada pasien tua. Terdapat beberapa bukti bahwa *microdrilling* dan *microfracturing* sangat efektif pada pasien di bawah 40 tahun, alih-alih teknik ini masih menjadi suatu enigma apakah dapat digunakan pada pasien OA yang biasanya terjadi pada usia tua, di mana reparasi spontan jaringan sangat kurang serta jumlah dan ketersediaan sel punca yang berasal dari *bone marrow* juga berkurang.

Dengan mengamati perbaikan hasil klinik *microdrilling* dan *reproducibility*-nya, intervensi ini dilanjutkan dengan kombinasikan lapisan tipis, *blood-absorbing matrix* baik kolagen tipe I dan III atau kitosan gliserol fosfat, namun dari data yang tersedia hanya sedikit bukti dampak yang menguntungkan dari kombinasi pendekatan ini. Hasil yang tidak memuaskan ini menunjukkan material matriks yang diimplantasikan masih relatif tinggi *bio-incompatibility*-nya, sehingga akan mencetuskan respons inflamasi. Bila kombinasi ini digunakan, daerah defek akan berhadapan tidak hanya dengan matriks ekstrinsik tetapi juga intrinsik matriks, yaitu fibrin yang mengisi area setelah terjadi perdarahan pada defek, yang juga menstimuli inflamasi, sehingga respons inflamasi akan diperkuat oleh karena adanya matriks ekstrinsik. Untuk memperbaiki hasil reparasi maka ekstrinsik

matriks yang diberikan harus biokompatibel sehingga meminimalkan respons inflamasi. Penelitian klinis baru-baru ini telah dilakukan menggunakan membran kolagen yang memberikan hasil cukup baik. Tipe matriks kolagen ini diberikan ke daerah kosong pada defek setelah *bone marrow* distimulasi dengan *microdrilling*. Pada penerapan metode kombinasi ini, para klinisi menyebutnya sebagai *autologous matrix-induced chondrogenesis* (AMIC), di mana istilah tersebut merupakan penamaan yang salah, karena material pembawa bukan material kondrogenik. Keuntungan pendekatan AMIC adalah tidak melibatkan transplantasi sel, yang bisa dilakukan pada intervensi pembedahan tunggal dan *cost-effective*. Uji klinik acakisasi prospektif saat ini sedang dilakukan untuk membandingkan pendekatan AMIC dengan ACI dan atau *matrix-associated ACI* (MACI).⁷⁵

Dalam rangka mencapai hasil klinik yang lebih baik pada terapi berdasarkan *microdrilling*, bisa dilakukan dengan *on-the-site-prepared* sel punca autologus lokal (diisolasi atau dalam bentuk fragmen jaringan) berasal dari membran sinovial atau *bone marrow*. Pendekatan ini cukup menarik karena *on-the-site-prepared* material autologus melibatkan sedikit regulasi dan menghindari pemrosesan di laboratorium sehingga menjadi *cost-effective*. *Reproducibility* hasil reparasi bisa ditingkatkan dengan memberikan *cocktail* faktor-faktor pertumbuhan untuk menginduksi diferensiasi kondrogenik sel punca. Konsep ini didasarkan penggunaan fragmen membran sinovial yang sangat mungkin berhasil, karena



Gambar 6.3 Skema teknik *microfracturing*. Dasar dari defek kondral dilubangi di beberapa tempat menggunakan instrumen runcing atau *drill* kaliber kecil. Dengan cara ini ruang *marrow* pada tulang subkondral akan terbuka. Darah akan masuk ke daerah defek dengan membawa MSCs dari *bone marrow* dan akhirnya membentuk hematoma.⁷⁵

sel punca dari sinovial memiliki potensi kondrogenik yang tinggi dibandingkan sel punca dari *bone marrow*, periosteum, jaringan adiposa, dan otot. Lebih lanjut lagi, penggunaan sel punca lebih menguntungkan dalam bentuk fragmen jaringan daripada yang diisolasi, karena bila didukung oleh *scaffold* fisiologi, ditambah dengan faktor-faktor diferensiasi, yang diyakini menghasilkan respons yang lebih baik. Strategi terapi baru akan lebih baik bila dilakukan dengan intervensi pembedahan tunggal atau *arthroscopy* yang praktis secara klinik dan untuk mengurangi risiko infeksi serta komplikasi lain.

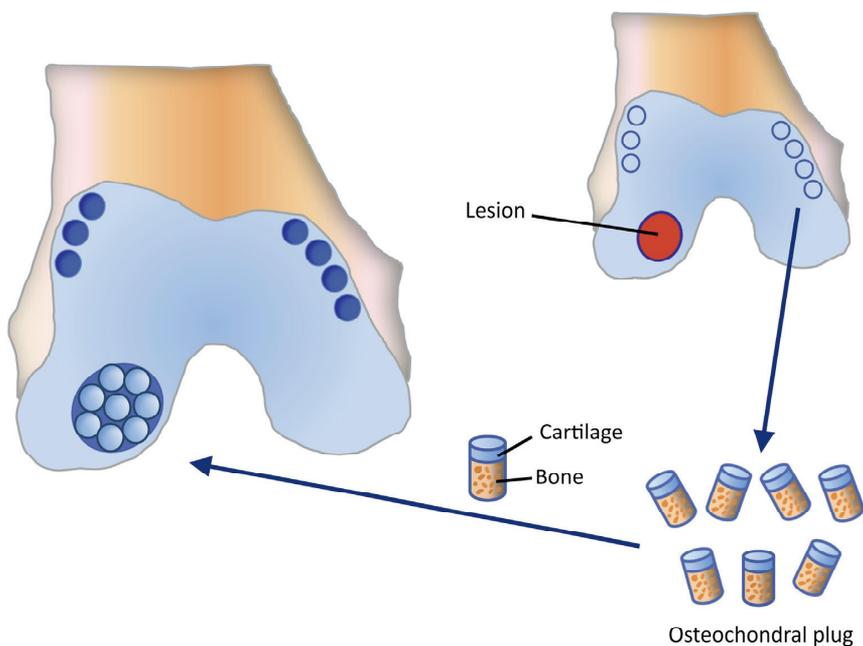
Strategi Transplantasi

Autograft Osteokondral (Mosaicplasty)

Ide implantasi jaringan kondral atau osteokondral ke dalam defek kartilago artikular telah dimulai pada akhir abad 19. Konsep ini masih menjadi dasar strategi klinik yang meliputi baik *autograft* maupun *allograft*. Dari beberapa strategi terapi osteokondral autologus yang saat ini digunakan, *mosaicplasty* merupakan prosedur yang memiliki sejarah panjang. Teknik ini digunakan pada lesi *full-thickness* besar dan dilakukan dengan memasukkan beberapa buah (*plug*) material autologus ke dalam defek kartilago. Keuntungan strategi terapi ini, yaitu dapat dilakukan dengan intervensi tunggal. Dengan membuka dan mengamati sendi yang sakit, ahli bedah ortopedi mampu segera memutuskan dari regio mana material donor autologus diambil dan segera dilakukan autotransplantasi. *Mosaicplasty* pada suatu periode menjadi teknik favorit ahli bedah ortopedi di Jepang dan Eropa, tetapi popularitasnya terbatas di Amerika Utara. Selain itu, oleh karena berbagai alasan, metode ini mulai kehilangan kredibilitasnya di semua negara.

Satu dari kekurangan yang paling serius pada implementasi metode ini berhubungan dengan kondisi daerah donor selanjutnya, yaitu di mana *plug* osteokondral autologus diambil. Pada saat mengambil jaringan, ahli bedah membuat lesi baru pada sendi yang sudah mengalami gangguan, dan hal ini akan menambah patologi pada sendi yang telah degenerasi, sehingga bukannya memperbaiki sendi malah akan memperberat situasi. Setelah *plug* osteokondral diambil, daerah donor ada kemungkinan akan gagal untuk sembuh. Untuk alasan ini beberapa ahli bedah ortopedi memberikan material matriks pada daerah donor untuk mendorong reparasi spontan. Dengan cara yang sama dilakukan pada daerah resipien dan kita belum mengetahui dengan jelas apa yang akan terjadi. Prosedur

drilling yang digunakan untuk mengambil jaringan osteokondral akan mengekspos kondrosit di dalam *plug* transplan, begitu juga pada tepi yang dibuat pada darah donor terhadap temperatur tinggi yang ekstrem dan kondisi kering, yang akan berdampak terhadap vitalitasnya. Setelah *plug* osteokondral diambil, kemudian dimasukkan secara akurat dengan dipukul menggunakan palu ke dalam dasar tulang subkondral. Proses ini kemungkinan menginduksi cedera kompresi pada kartilago yang ditransplantasikan, yang akan menimbulkan kematian populasi kondrosit dengan cepat. Selanjutnya, jika jaringan yang ditransfer dari daerah *weight-bearing* rendah ke tinggi pada sendi, jaringan ini akan mengalami kondisi beban mekanik yang tidak fisiologis sehingga bisa mempercepat degenerasi.



Gambar 6.4 Skema dari mosaicplasty. *Plug* silindris jaringan osteokondral di-drill dan diambil dari area *non-weight-bearing* sendi lutut kemudian dimasukkan ke daerah yang rusak dengan teknik *press-fitted*. Jumlah *plug* yang diambil tergantung diameter permukaan daerah resipien. Daerah donor kemudian diisi dengan jaringan osteokondral yang berasal dari resipien yang diambil saat menyiapkan lubang untuk *plug* atau dibiarkan kosong. Bila dilihat dari atas *plug* yang diberikan pada daerah resipien membentuk *mosaic* bentuk sirkular dengan diselingi oleh ruang kosong, oleh karena itu disebut *mosaicplasty*.⁷⁵

Penanaman beberapa *plug* ke dalam defek, tanpa melakukan pengukuran untuk membuat rangkaian antara *plug* juga bisa menimbulkan komplikasi, tidak adanya ikatan struktural di seluruh lingkaran masing-masing *plug* akan mengganggu nutrisi begitu juga dengan fungsional problem dari luar yang akan cenderung mempercepat degenerasi. Hanya sedikit usaha yang dilakukan sejauh ini untuk mengklarifikasi isu ini. Walaupun *mosaicplasty* masih digunakan, belum ada dasar ilmiah bahwa pasien yang menerima terapi ini akan memperoleh keuntungan jangka panjang.

Allograft Osteokondral

Dalam beberapa dekade *graft* osteokondral *allogenic* telah digunakan untuk mengisi defek kartilago artikular. Pendekatan ini bukan untuk menginduksi respons reparasi kartilago, melainkan untuk menggantikan jaringan kartilago yang hilang atau rusak dengan kartilago artikular sehat dari donor jenazah.

Rasionalisasi dari metode ini adalah berdasarkan ilmu pengetahuan defek osteokondral besar yang tidak dapat sembuh secara spontan dan sangat sulit untuk menguraikan sistem stimulasi yang sesuai untuk mempromosikan reparasi yang efektif. Oleh sebab itu, untuk mengganti jaringan yang rusak dengan *allograft* osteokondral jenazah dianggap lebih sederhana. Problem imunologi merupakan salah satu kelemahan dari metode ini. Meskipun demikian, pasien dengan defek osteokondral besar seperti akibat reseksi tumor, osteonekrosis, trauma hebat, OA atau *osteochondritis dissecans*, mendapat keuntungan besar dari strategi terapi ini.

Opsi terapi ini memberikan pengalaman klinis yang baik, di mana reaksi imunologi terlihat kurang ekstensif pada manusia dibandingkan pada hewan. *Allograft* osteokondral manusia juga bisa bertahan untuk jangka waktu panjang (beberapa tahun), bahkan setelah di-*freezing* atau *lyophilization*. Sukses klinis telah dilaporkan berkisar 65-85% setelah monitor sampai 10 tahun. Hambatan utama dalam implementasi metode ini pada praktik klinik adalah jarangny material donor dan penyimpanan jaringan beku (*frozen*). Risiko transmisi penyakit yang terjadi walaupun kecil, tetapi tetap menjadi perhatian.^{30,75}

Autologous-Chondrocyte Implantation (ACI)

Pada saat teknik ACI diperkenalkan untuk pemakaian klinis oleh Brittberg dan kolega pada tahun 1994, timbul harapan dan antusias yang sangat besar

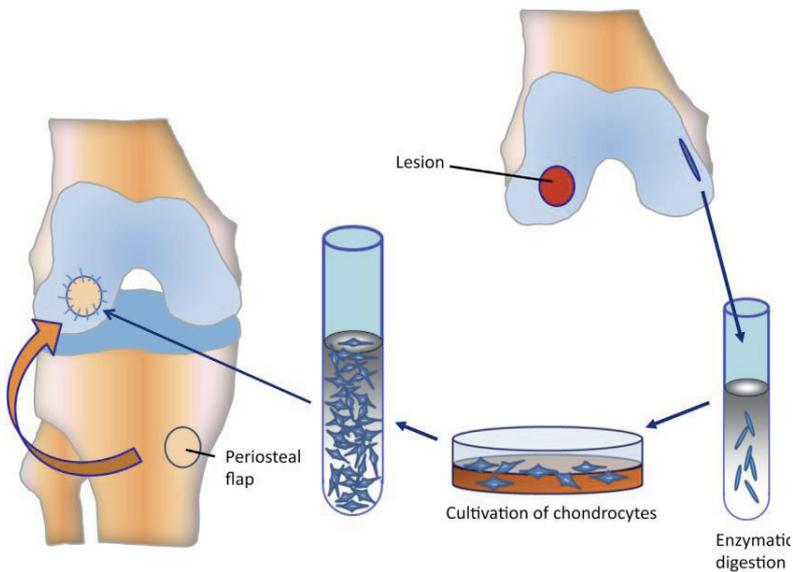
pada dunia ortopedi. Konsep ini merupakan temuan Grande dan kolega pada tahun 1989 di mana uji preklinik dilakukan pada hewan coba kelinci. Menurut teknik ACI, dilakukan biopsi terlebih dahulu pada kartilago yang sehat dengan *arthroscopy*. Biopsi dilakukan di daerah *non-load-bearing* pada sendi yang sakit. Jaringan kartilago kemudian dicerna (*digested*) dengan enzim untuk melepaskan kondrosit yang selanjutnya diekspansikan pada kultur, diperbanyak menjadi 10 juta sel dari beberapa ratus ribu sel yang terdapat pada jaringan biopsi. Suspensi sel kondrosit autologus yang telah diekspansikan dimasukkan secara langsung ke dalam defek, dan ditutup dengan flap periosteal, yang biasanya diambil dari tibia medial. Aplikasi suspensi sel saja secara teknik lebih kompleks daripada sel yang ditanamkan ke dalam matriks sebagai *graft*, karenanya dibutuhkan penempatan yang cermat dan penjahitan flap periosteal (atau material lain yang memiliki fungsi sama) untuk menjamin retensi dan integrasi yang optimal dengan kartilago artikular di sekitarnya, lebih lanjut lagi bisa terjadi pengelupasan flap pasca operasi, bahkan setelah penjahitan. Kondisi harus dicegah dengan imobilisasi temporal (sebagian atau komplet) dari sendi. Dewasa ini telah diperkenalkan metode *matrix-associated variant of the ACI* (MACI). Pada metode MACI kondrosit autologus ditanamkan ke dalam matriks (kolagen atau hialuronan) bukan suspensi sel, sehingga tidak memerlukan flap periosteal. Penggunaan matriks bisa menimbulkan problem baru, seperti biokompatibilitas, inflamasi, dan degradasi. Namun, sampai saat ini belum ada pembawa yang ideal.

Kekurangan utama strategi berdasarkan ACI adalah diperlukan 2 kali intervensi bedah, di mana kondisi ini merupakan proses yang mahal dan membutuhkan waktu yang panjang. Selain itu, kekurangan pada penerapan strategi ini adalah membuat lesi tambahan di dalam sendi pada saat pengambilan jaringan kartilago yang sehat. Walaupun hanya dilakukan biopsi kecil dan hanya fragmen kecil yang diambil dari daerah *non-weight-bearing* sendi, beberapa peneliti meyakini hal ini bisa meningkatkan risiko terbentuknya OA.

Walaupun teknik ACI masih sangat populer, prosedur ini diyakini belum tentu lebih unggul dibandingkan intervensi yang lebih sederhana seperti *microfracturing* atau *microdrilling*. Knutsen dan kolega telah mempublikasikan hasil uji klinik acakisasi prospektif, pasien dengan lesi kartilago pada *kondilus* femur yang diterapi baik secara konvensional dengan *microfracturing* atau teknik ACI. Penemuan 5 tahun pengujian menunjukkan prosedur ACI tidak lebih

menguntungkan daripada prosedur konvensional, walaupun reparasi jaringan telah dibuktikan bahwa 1 tahun setelah teknik ACI dilaporkan secara struktural lebih superior daripada *microfracturing*, tetapi hasil evaluasi klinis adalah sama. *Follow-up* jangka panjang yang sedang berjalan dianalisis dari *cohort* pasien yang sama, telah dikonfirmasi penemuan awal (5 tahun); 15 tahun setelah terapi dengan *microfracturing* atau dengan teknik ACI, hasil evaluasi klinis adalah sama untuk masing-masing grup, yang membuktikan terapi *microfracturing* lebih dipilih karena kurang traumatik, risiko rendah serta lebih murah. Penjelasan yang paling mungkin terhadap temuan jangka pendek dan jangka panjang adalah dari sisi biologi dan biomekanik kedua terapi pada dasarnya adalah sama. Pada saat dilakukan teknik ACI, dasar dan dinding defek dirapikan (*neatened*) dengan *shaving*, yang menginduksi perdarahan lokal dan respons reparasi spontan dari ruang *bone marrow*.

Baik *microfracturing/microdrilling* ataupun ACI secara klinis tidak efektif untuk pasien dengan umur di atas 50 tahun, kemungkinan penyebabnya adalah



Gambar 6.5 Skema teknik ACI. Fragmen kartilago articular diambil dari bagian tepi sendi yang mengalami lesi. Fragmen jaringan dicerna dengan enzim untuk melepaskan kondrosit dan diekspansi *in vitro* selama 11 sampai 21 hari. Flap periosteal kemudian diambil dari medial tibia dan dijahitkan di atas lesi. Suspensi sel kondrosit yang telah diekspansi diinjeksi ke bawah flap di dalam lesi.⁷⁵

sel punca mesenkimal dari *bone marrow* (teknik *microfracturing*) maupun kondrosit autologus yang ditransplantasikan (ACI), akan kehilangan potensi proliferasi dan diferensiasi karena proses penuaan. Oleh karena itu, pada orang tua dengan kecenderungan osteoarthritis, sangat diperlukan strategi terapi berdasarkan pemberian sel yang efektif.

Strategi Rekayasa Jaringan (Tissue Engineering)

Seperti telah dijelaskan pada bab sebelumnya tiga kunci utama penyusunan rekayasa jaringan adalah *scaffold* matriks, sel-sel, dan molekul sinyal (seperti faktor-faktor pertumbuhan dan gen).

Sumber Sel

Keberhasilan strategi rekayasa jaringan akan meniadakan perlunya transplantasi jaringan kartilago. Kelompok-kelompok prekursor sel berasal dari berbagai jaringan manusia, dan masing-masing memiliki potensi untuk berdiferensiasi menjadi kondrosit yang mampu memproduksi kartilago dan bisa digunakan untuk transplantasi. Sumber jaringan yang memiliki sel punca meliputi lapisan kambium dari perikondrium dan periosteum, stroma *bone marrow*, membran sinovial, otot, lemak, dan kartilago dewasa sendiri (kondrosit autologus atau *allogenic*). Oleh karena keterbatasan ketersediaan kondrosit autologus, yang menjadi fokus sekarang adalah kepada sumber *allogenic*, tetapi sel-sel *allogenic* menimbulkan problem lain seperti biokompatibilitas dan imunogenisitas.⁴⁴

Sel punca mesenkimal banyak digunakan dalam penelitian untuk rekayasa jaringan kartilago, karena kapasitasnya untuk *self-renewal* dan kemudahan pengambilannya. Di antara berbagai sumber jaringan, MSCs yang berasal dari *bone marrow* (BMSCs) telah diteliti secara luas baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, sejak pertama sekali diisolasi oleh Friedenstein pada tahun 1966. BMSCs menunjukkan kapasitas yang tinggi untuk kondrogenesis hanya bila ada faktor-faktor stimulasi yang sesuai. Pada pemakaian klinik, Kuroda dan kolega telah melakukan terapi defek kartilago artikular *full-thickness* di dalam kondilus femur atlet dengan sel-sel stromal *bone marrow* autologus. *Bone marrow* diaspirasi dari krista iliaka 4 minggu sebelum pembedahan dan sel diekspansi pada kultur. Sel-sel yang belum berdiferensiasi kemudian ditanamkan ke dalam kolagen gel yang kemudian diberikan ke dalam defek kartilago dan ditutup dengan flap periosteum autologus. Walaupun hasil skor

lutut membaik bersamaan dengan waktu, biopsi menunjukkan adanya fibrosa bukan hialin kartilago. Pada penelitian ini, tidak ada bahan eksogen yang digunakan untuk mengarahkan diferensiasi sel. Dari fakta ini diyakini formasi kartilago hialin yang dibentuk oleh MSCs membutuhkan faktor-faktor stimulasi dari luar, yang tidak ada di daerah defek atau bila ada tidak cukup untuk mengarahkan proses diferensiasi sesuai dengan yang diharapkan. MSCs telah dinyatakan oleh beberapa peneliti memiliki kemampuan memproduksi faktor-faktor pertumbuhan dan juga kapasitas imunomodulator, pengalaman penelitian yang berlangsung lebih dari 20 tahun di bidang reparasi kartilago menunjukan aktivitas ini jika memang ada, masih terlalu rendah untuk mendukung respons penyembuhan yang efektif.

Satu kelemahan BMSCs adalah potensi kondrogeniknya menurun bersama dengan bertambahnya umur. MSCs yang berasal dari sinovium, memiliki potensi yang tetap walaupun umur bertambah. Potensi kondrogenik MSCs dari sinovium lebih superior daripada MSCs yang berasal dari tulang, periosteum, adiposa, atau otot. Di samping itu, sumber jaringan MSCs yang ideal masih belum bisa ditentukan untuk reparasi klinik kartilago artikular, karena data *in vivo* yang kuat belum tersedia.

Scaffolds Matriks

Penggunaan matriks sebagai pembawa sel pada strategi reparasi kartilago dimulai pada tahun 1960-an. Berbagai tipe matriks telah diuji, tidak hanya secara *in vitro* tetapi juga pada penelitian eksperimental pada hewan dan manusia untuk mengetahui kapasitas dan promosi reparasi kartilago artikular. Matriks ini secara luas dibagi sesuai dengan bahan kimianya menjadi polimer berbasis protein, karbohidrat, material artifisial, dan kombinasi. Bahkan matriks *naked* (tidak membawa sel atau zat sinyal) yang dimasukkan ke dalam defek artikular juga termasuk di dalamnya. Bahan ini merupakan struktur 3 dimensi, sesuai dengan konfigurasi geometrinya yang khusus, atau paling sedikit memengaruhi pertumbuhan kartilago sedangkan sifat kimia dan fisik pada permukaannya merupakan tempat melekatnya sel dan mengikat faktor pertumbuhan pada lingkungan *niche*.

Tabel 6.1 Penggolongan scaffold untuk kartilago berdasarkan unsur kimianya.⁷⁵

Polimer berbasis protein	<i>Fibrin</i> <i>Kolagen</i> <i>Gelatin</i>
Protein berbasis karbohidrat	<i>Polylactic acid</i> <i>Polyglycolic acid</i> <i>Hyaluronan</i> <i>Agarose</i> <i>Alginate</i> <i>Chitosan</i>
Protein artifisial	<i>Dacron (polyethylene terephthalate)</i> <i>Teflon (polytetrafluoroethylene)</i> <i>Carbon fibres</i> <i>Polyesterurethane</i> <i>Polybutyric acid</i> <i>Polyethylmethacrylate</i> <i>Hidroksiapatit</i>
Kelas diantaranya	<i>Cross-linkage</i> <i>Chemical modulations</i> <i>Geometrical modifications</i> (untuk memproduksi fibrillar forms atau foams) <i>Kombinasi matrik</i>

Tabel 6.2 Persyaratan scaffold matriks untuk kartilago.⁷⁵

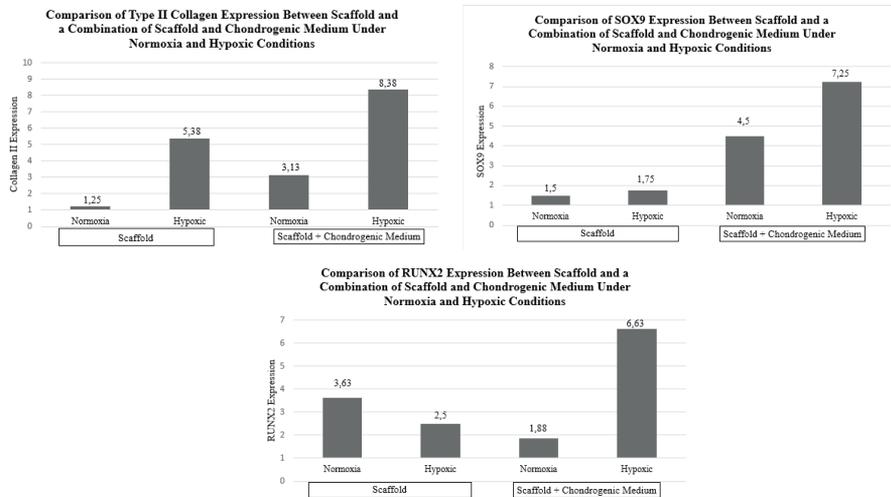
Sifat Matriks	Biological basis
1. Porositas	Migrasi Sel
2. Pembawa	Memuat dan melepaskan substansi sinyal
3. Adhesi	Pelekatan Sel
4. Biodegradabilitas	Remodelling fisiologi
5. Stabilitas volume	Kontur permukaan yang halus seperti kartilago artikular yang asli
6. Biokompatibilitas	Kontak yang baik dengan kompartemen aslinya
7. Ikatan	Meningkatkan integrasi antara serabut kolagen dalam reparasi dan kompartemen jaringan asli
8. Kohesi internal	
9. Elastisitas	Menjaga matriks tetap stabil
10. Struktur anisotropy	Kelenturan selama pada deformasi statis dan dinamis
Sifat spesifik matriks pada aplikasi pembedahan	Mempromosikan organisasi jaringan seperti aslinya
A. Keadaan cair yang selanjutnya menjadi solid di dalam (<i>in situ</i>)	
B. Kaku dan cocok untuk <i>press-fitting</i>	Implantasi <i>arthroscopic</i> <i>Arthrotomy</i> (operasi terbuka dari sendi)

Walaupun beberapa material telah digunakan dalam penggunaan klinis, sebagian besar dari mereka terutama yang berasal dari bahan sintetik masih dalam uji preklinik. Sementara itu penggunaan material *scaffold* yang telah digunakan dalam reparasi kartilago adalah kolagen, fibrin, hialuronan, dan polilaktat, di mana sekarang sedang dikembangkan dalam bentuk serabut nano dengan tujuan untuk meningkatkan porositasnya, atau dibuat dalam bentuk untuk injeksi. Tujuan utama usaha ini adalah untuk membuat material yang bisa diserap dan *biomimetic*.

Departemen Orthopaedi & Traumatologi RSUD Dr. Soetomo – FK UNAIR bersama-sama Instalasi Bank Jaringan dan Sel telah mengembangkan 2 jenis *scaffold* yang berasal dari kartilago *bovine*, yaitu *Decellularized Cartilage Bovine Scaffold* (DCBS) dan *Sponge Bovine Cartilage Scaffold* (SBCS). Pada material pertama digunakan *scaffold* yang diproses dengan melakukan deselularisasi kartilago *bovine*, kemudian dilanjutkan dengan proses *freeze-dried*. Penelitian dilakukan secara *in vitro* di laboratorium. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells* (BMSCs) dikultur pada DCBS dengan kondisi hipoksi. Penelitian dibagi dalam tiga grup berbeda, masing-masing grup dibagi dan dilakukan kultur dalam kondisi hipoksi dan normoksi dengan waktu inkubasi yang sama. BMSCs yang digunakan berasal dari *New Zealand white rabbit*. Diferensiasi sel punca menjadi kondrosit yang dianalisis dengan: produksi kolagen tipe II pada ECM yang terbentuk dengan pemeriksaan secara imunositokimia dan imunohistokimia, peningkatan kondrosit *mature* (*immunocytochemical and immunohistochemical SOX9 expression*) dan penurunan pembentukan kondrosit hipertrofi (*immunocytochemical and immunohistochemical SOX9 expression*). Hasil penelitian adalah sebagai berikut.⁷⁷



Gambar 6.6 Kiri, ekspresi kolagen tipe II, tengah, ekspresi SOX 9 dan kanan, ekspresi RUNX2 pada kultur BMSCs yang diberi perlakuan.⁷⁷

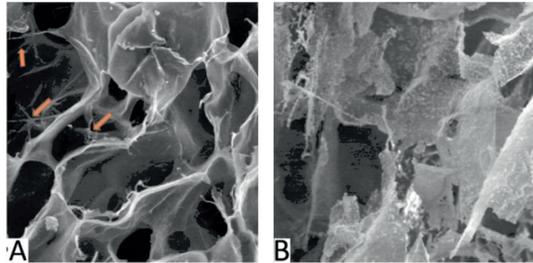


Gambar 6.7 Perbandingan kolagen tipe II, SOX 9, dan RUNX2 pada kultur BMSCs dengan berbagai perlakuan.⁷⁷

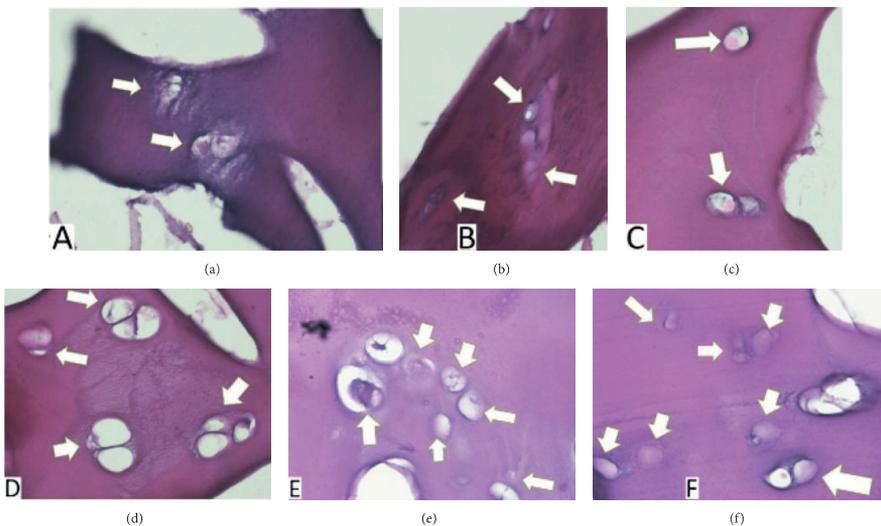
Decellularized cartilage bovine matrix merupakan material yang dapat bertindak sebagai *scaffold* dan berisi faktor-faktor pertumbuhan yang merupakan lingkungan mikro yang baik untuk menginduksi diferensiasi BMSCs menjadi kondrosit. Kondisi hipoksi meningkatkan produksi kolagen tipe II dengan menghambat diferensiasi sel punca menjadi kondrosit hipertropi yang digambarkan dengan meningkatnya jumlah ekspresi SOX9 dan menurunnya ekspresi RUNX2⁷⁷. Produk ini sedang dalam penelitian lebih lanjut agar bisa untuk produksi massal dan komersialisasi.

Penelitian kedua juga dengan menggunakan *scaffold* yang berasal dari kartilago *bovine*. Kartilago bovine diambil dari kaput dan kondilus femur, dan dibuat serbuk dengan ukuran 150 – 355 μm , kemudian dibuat *sponge* dan proses akhir adalah *freeze-dried*. Satu grup dilakukan deselularisasi. Penelitian ini dilakukan *in vitro* di mana *scaffold* dibagi dalam 2 grup, yaitu grup tanpa deselularisasi (SBCS) dan grup dengan deselularisasi (DSBCS). Dilakukan analisis fisik, karakter biokimia, biodegradabel, kemampuan menyerap air, kemampuan memfasilitasi diferensiasi BMSCs manusia.⁷⁸

Berdasarkan hasil penelitian bahwa kedua kartilago *bovine sponge scaffold* baik deselularisasi (DSBCS) maupun tanpa deselularisasi (SBCS) memenuhi



Gambar 6.8 Komponen seluler pada (A) Grup SBCS dan (B) Grup DSBCS. Panah merah menunjukkan komponen seluler grup SBCS.⁷⁸



Gambar 6.9 Pengecatan HE 4 minggu setelah *seeding* BMSCs. A-C. Grup SBCS dan D-F Grup DSBCS. Panah putih menunjukkan kondrosit.⁷⁸

persyaratan yang diperlukan baik secara fisik, biokimia, bidegradabel, dan penyerapan air. Karakter ini bisa menginduksi dan memfasilitasi proliferasi dan diferensiasi BMSCs *in vitro*.⁷⁸

Terdapat 3 kemungkinan pendekatan pada rekayasa kartilago artikular. *Pertama*, jaringan reparasi secara komplit direkayasa *in vitro*, konstruksi yang telah terdiferensiasi diimplantasikan pada defek. Keuntungan pendekatan ini berdasarkan fakta bahwa metabolisme sel dan diferensiasi lebih baik dikontrol *in vitro* daripada *in vivo* dengan menggunakan bioreaktor sistem yang sesuai,

faktor-faktor pertumbuhan dan sistem pemberian yang tersedia. Kelemahannya adalah problem yang berhubungan dengan integrasi dan fiksasi mekanik dari jaringan reparasi tidak mudah dilakukan. Stimulasi kondisi beban mekanik dari ECM mungkin tidak ideal pada tempat yang diberikan. Problem lain yang bisa timbul adalah problem biokompatibel dan imunogenik.⁷⁵

Pendekatan *kedua*, yang lebih sering digunakan, bertujuan merekayasa hanya konstruksi dasar saja, yaitu matriks *scaffold* berisi populasi sel-sel yang homogen, dan sinyal-sinyal molekuler yang terperangkap di dalamnya. Sesuai dengan pendekatan ini, diferensiasi, dan *remodeling* jaringan reparasi terjadi *in vivo* di bawah kondisi fisiologis dari beban mekanik. Jaringan reparasi yang terbentuk di tempat tersebut lebih memungkinkan untuk melekat dan berintegrasi dengan jaringan kartilago articular asli daripada yang diproduksi *in vitro*, dan jaringan ini juga bisa beradaptasi secara alami dengan bentuk sendi sinovial, yang mempromosikan pengikatan implan yang telah dikuktur. Kerugian pendekatan kedua ini adalah aktivitas sel lebih sulit dikontrol untuk jangka panjang. Selain itu, juga harus dilakukan tindakan yang sesuai untuk menghindari kontaminasi dari sel atau sinyal yang bisa terlibat dalam respons penyembuhan spontan, karena jaringan ini bisa mengurangi kualitas dan kompetensi mekanik dari komposit reparasi akhir.

Pendekatan ketiga melibatkan pemberian langsung faktor-faktor pertumbuhan eksogen (berada di dalam matriks) ke daerah defek, kemudian menstimulasi formasi intrinsik jaringan kartilago *in situ*. Matriks yang sesuai diberikan dahulu ke dalam defek untuk menentukan defek yang akan direparasi. Pemasangan konstruksi fisik ini diperlukan untuk mengarahkan pergerakan sel-sel prekursor intrinsik, yang memiliki ruang terbatas. Faktor-faktor pertumbuhan biasanya diberikan ke dalam matriks dengan dua status berbeda; zat yang mudah larut, untuk stimulasi perekrutan segera populasi intrinsik sel-sel prekursor dari tempat aslinya, mereka akan migrasi ke dalam area defek dan proliferasi di dalamnya, dan bentuk yang terikat untuk pengantaran bertahap dengan laju yang stabil akan bertahan beberapa minggu untuk stimulasi diferensiasi kondrogenik populasi sel-sel yang mengisi defek. Karenanya, matriks yang telah terprogram diberikan ke dalam defek. Substansi sinyal yang mudah terlarut yang diberikan biasanya IGF-1, β FGF atau α TGF (pada konsentrasi rendah). Faktor-faktor pertumbuhan dalam bentuk ini menstimulasi perekrutan sel-sel prekursor

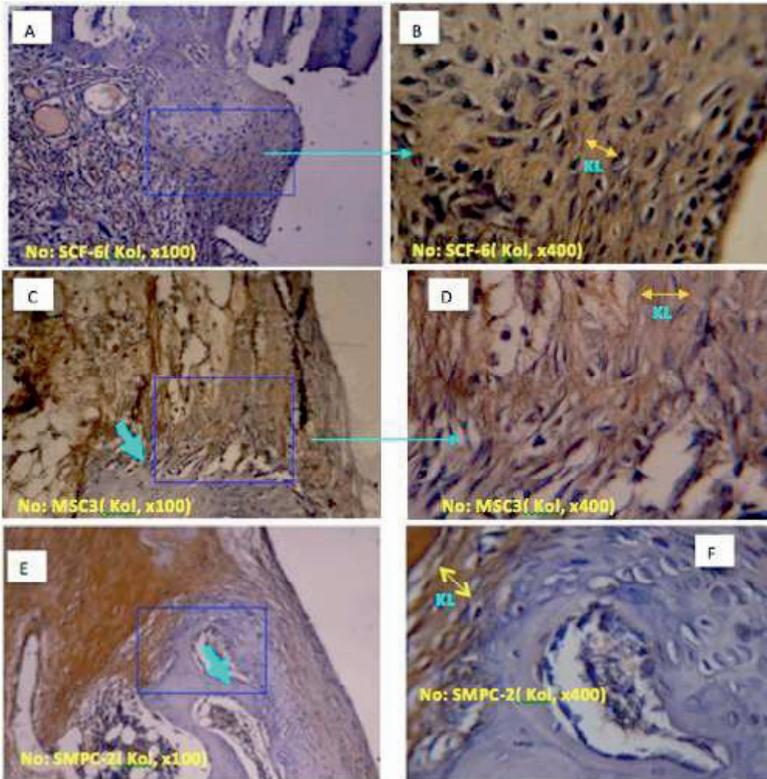
dari sinovium. Substan sinyal yang terikat yang diberikan untuk menginduksi diferensiasi kondrogenik populasi sel-sel yang mengisi defek biasanya anggota dari TGF- β *superfamily*, sebagai contoh *bone morphogenetic protein* (BMP)-2, BMP-9, BMP-13 atau TGF β 1 (pada konsentrasi tinggi).

Telah dilakukan penelitian dengan menggunakan komposit *Freeze Dried Bovine Cartilage Powder Scaffold–Mesenchymal Stem Cells–Platelet Rich Plasma Composite* (SMPC) sebagai solusi defek kartilago artikular. Konstruksi ini berisi ECM dan memiliki kemampuan menstimulasi kondrogenesis melalui aktivasi CDMP1/GDF5, selain itu juga diperkuat oleh faktor-faktor pertumbuhan yang berasal dari PRP. Tujuan penelitian adalah untuk menjelaskan mekanisme regenerasi defek kartilago *full-thickness*. Penelitian eksperimental ini menggunakan *New Zealand white rabbit* sebagai subjek penelitian. Komposit diimplantasikan defek kartilago *full thickness* dengan diameter 4 mm² yang setara dengan defek 6 cm² pada manusia. Kelinci dibagi dalam 3 kelompok perlakuan, yaitu *Freeze Dried Bovine Cartilage Powder Scaffold* (FDBC), *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs), dan komposit SMPC, evaluasi menggunakan histologi dan imunohistokimia.⁷⁹

Pada pemeriksaan histopatologi terhadap jumlah kondrosit, ketebalan kartilago, dan permukaan kartilago hasil terbaik didapatkan pada implantasi SMPC. Pemeriksaan imunohistokimia dari FGF-2R, MAPK dan SOX-9 yang ekspresi sel-sel kondroprogenitor paling banyak didapatkan pada grup SMPC.



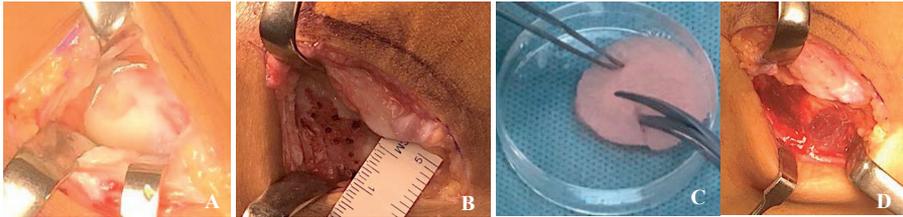
Gambar 6.10 Gambaran mikroskopik defek kartilago setelah 3 bulan implantasi. (A) Implantasi menggunakan FDBC, (B) Implantasi menggunakan MSCs, (C) Implantasi menggunakan SPMC.⁷⁹



Gambar 6.11 Ketebalan kolagen pada defek kartilago. Panah biru menunjukkan pertumbuhan kartilago sendi (kondrogenesis). Pemeriksaan menggunakan kolagen tipe II mAb, menunjukkan reaksi positif pada warna coklat. KL: menunjukkan ketebalan kolagen. (A) implantasi FDBC (pembesaran 100x), (B) pembesaran 400x, (C) implantasi MSCs (pembesaran 100x), (D) pembesaran 400x, (E) implantasi SPMC (pembesaran 100x), dan (F) pembesaran 400x.⁷⁹

Mekanisme regenerasi defek kartilago *full-thickness* pada implantasi SPMC melalui proses sinyal MSCs FGF-2R pada permukaan yang melekat ke *scaffold* selanjutnya diteruskan ke MAPK pada inti sel, yang akan menyintesis SOX9. Protein SOX akan menginduksi proliferasi MSCs dan maturase menjadi kondrosit. Kondrosit menyintesis kolagen tipe II dengan jumlah optimal sehingga terjadi regenerasi pada kartilago sendi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa SPMC bisa menjadi kandidat kuat yang dapat digunakan sebagai *scaffold* untuk untuk regenerasi kartilago.⁷⁹

Telah dilakukan juga uji klinik yang masih berlangsung pada defek kartilago menggunakan komposit *Sponge Bovine Cartilage* dengan sel punca mesenkimal dari *bone marrow*. Beberapa hasil aplikasi ditampilkan pada gambar di bawah ini.



Gambar 6.12 Rekonstruksi defek *full thickness* kartilago kondilus femur menggunakan teknik *microfracture* dan implantasi komposit *Sponge Bovine Cartilage* dengan sel punca mesensimal dari *bone marrow*. (A) Defek kartilago *Full Thickness*, (B) *Microfracture*, (C) Komposit *Sponge Bovine Cartilage* dengan sel punca mesenkimal dari *bone marrow*, dan (D) Paska implantasi (sumber: koleksi pribadi Dr. dr. Dwikora NU,Sp.OT(K)).

BAB 7

Regenerasi Jaringan Tendon

Cedera tendon dibagi menjadi tendinopati degeneratif kronis dan ruptur akut, keduanya merupakan problem klinik yang sering terjadi. Tendinopati degeneratif sering mengawali ruptur akut, tendinopati terkait dengan kegagalan respons penyembuhan yang ditandai dengan hipervaskularisasi, degenerasi mukoid, tulang ektopik, dan nodul kartilago, serta disorganisasi matriks kartilago.

Lebih kurang 300.000 pembedahan reparasi untuk tendon dan ligamentum dilakukan per tahunnya di Amerika Serikat. Walaupun dengan intervensi bedah, proses penyembuhan alami dari tendon tetap lambat, oleh karena sifatnya hiposelular dan hipovaskular, serta setelah satu tahun, struktur dan fungsi jaringan yang terbentuk lebih inferior dari tendon normal. Respons penyembuhan secara tradisional dibagi dalam tiga fase yang tumpang tindih; 1) inflamasi, 2) proliferasi/reparasi; dan 3) *remodeling*. Pada fase inflamasi, bekuan darah yang segera terbentuk setelah ruptur pembuluh darah tendon mengaktifasi pelepasan kemoatraktan dan berperan sebagai *scaffold* awal untuk diinvasi sel-sel. Sel-sel

inflamasi meliputi neutrofil, monosit, dan limfosit migrasi dari jaringan sekitar ke dalam daerah cedera, di mana debris nekrotik akan dicerna dengan fagositosis. Selanjutnya dimulai rekrutmen dan aktivasi tenosit, tetapi puncaknya pada fase berikutnya. Fase kedua, dikenal sebagai fase proliferasi dan reparasi, secara kasar dimulai dua hari setelah cedera terjadi. Fibroblas dari paratenon dan selubung sinovial sekitarnya direkrut ke area cedera dan proliferasi, terutama pada epitenon, begitu juga tenosit intrinsik yang berlokasi di endotenon dan epitenon migrasi ke daerah cedera dan mulai berproliferasi. Kedua sumber tenosit penting untuk sintesis ECM dan membentuk jaringan vaskular internal. Bersamaan dengan hal ini, level neutrofil akan menurun sementara itu makrofag tetap melepas faktor-faktor pertumbuhan yang langsung merekrut dan mengaktifasi sel. Pada awal fase penyembuhan, matriks yang disintesis oleh tenosit disusun oleh peningkatan kolagen tipe III. Kandungan air dan konsentrasi glikosaminoglikan tetap meningkat pada fase ini. Akhirnya fase *remodeling* terjadi 1-2 bulan setelah cedera. Tenosit dan serabut-serabut kolagen menjadi tersusun sesuai dengan arah stres. Proporsi lebih tinggi kolagen tipe disintesis, bersamaan dengan turunnya selularitas dan kolagen tipe III serta glikosaminoglikan. Setelah 10 minggu, jaringan fibrosa secara bertahap berubah menjadi jaringan sikatrik seperti tendon, proses berjalan beberapa tahun. Jaringan yang direparasi tidak pernah secara komplit mencapai kekuatan biomekanik seperti sebelum cedera dan karakteristik biokimia serta ultrastruktur tetap abnormal sampai 12 bulan setelah cedera.^{61,80}

Sejumlah molekul bioaktif terlibat dalam orkestrasi respons selular selama reparasi tendon. Berbagai faktor-faktor pertumbuhan akan mengalami peningkatan regulasi setelah cedera tendon dan aktif pada berbagai fase proses penyembuhan, meliputi *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), TGF- β , bFGF, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), BMP, dan *connective tissue growth factor* (CTGF). IGF-1 merupakan mediator penting selama fase inflamasi dan proliferasi penyembuhan tendon. Selain faktor-faktor pertumbuhan di atas beberapa molekul bioaktif lain terlibat secara integral sebagai mediator reparasi seperti regulator pertumbuhan dan degradasi ECM seperti *matrix metalloproteinases* (MMPs) dan penghambatnya (TIMPs), keduanya responsif terhadap cedera dan reparasi tendon.

Pemahaman yang berkembang tentang mediator molekular pada penyembuhan tendon yang menyebabkan dilakukan penambahan atau

	Inflammatory	Reparative (proliferation)	Remodeling (consolidation & maturation)
Cells & Matrix Changes	Platelets Neutrophils Monocytes Erythrocytes Circulation-derived mesenchymal stem cells	↑ Cellularity and matrix production Collagen type III Activation of local tendon stem/progenitor cells	↑ Cellularity and matrix production Collagen type III Collagen type I
Molecular Changes	Interleukin-6, -1 β bFGF IGF-1 PDGF TGF β VEGF	bFGF GDF-5, -6, and -7 IGF-1 PDGF TGF β VEGF	GDF-5, -6, and -7 IGF-1 TGF β

Gambar 7.1 Molekular kunci, perubahan selular dan matriks terjadi selama 3 fase utama reparasi tendon. Setiap fase ditandai oleh keterlibatan faktor-faktor pertumbuhan yang berbeda, aktivasi beberapa tipe sel dan produksi matriks protein yang esensial, yang secara kolektif berkontribusi untuk mengganti jaringan fibrosa awal dengan regenerasi yang lebih menyerupai tendon.²⁹

penghambatan molekul bioaktif untuk meningkatkan kualitas reparasi jaringan. Sampai sekarang kegunaan menghambat inflamasi paska trauma masih menjadi topik perdebatan. Sebagai contoh pemberian sistemik anti inflamasi NSAID selama 7 hari setelah transeksi tendon *achilles* pada tikus menghasilkan penyembuhan tendon dengan mekanikal inferior dan diameternya berkurang. Hal yang sama didapatkan bila *parecoxib* diberikan segera setelah pembedahan. Sebaliknya penyembuhan tendon akan membaik bila obat diberikan setelah 6 hari paska pembedahan. Oleh karena itu, kaskade inflamasi awal diperlukan untuk restorasi karakteristik tendon seperti aslinya, sementara itu inflamasi yang terjadi belakangan akan menimbulkan efek yang buruk.²⁹

TERAPI KLINIS SAAT INI PADA CEDERA TENDON YANG SERING TERJADI

Tendon menghubungkan setiap otot tubuh dengan tulang, cedera tendon yang paling sering meliputi tendon *rotator cuff*, tendon *achilles*, dan tendon fleksor pada tangan. Tiga tendon ini memberikan tantangan yang berbeda dalam reparasi karena mereka memiliki anatomi yang unik, fungsi, sifat biomekanik, kapasitas penyembuhan, mekanisme cedera, dan pendekatan untuk rehabilitasi.

Tendon Rotator Cuff

Tendon *rotator cuff* disusun oleh tendon 4 otot, yaitu *subscapularis*, *supraspinatus*, *infraspinatus* dan *teres minor* yang melekat pada sisi lateral kaput humerus, berperan penting dalam stabilisasi dan mobilisasi sendi bahu. Robekan *rotator cuff* merupakan penyebab utama rasa nyeri yang sangat mengganggu, menurunkan fungsi bahu, dan kelemahan, mengenai lebih dari 40% pasien dengan umur lebih 60 tahun dan dalam setahun dilakukan 30.000 sampai 75.000 reparasi tendon *rotator cuff* di Amerika Serikat. Teknik operasi terbaru bisa memperbaiki kekuatan, tetapi tidak bisa memberikan skor klinik superior dibandingkan prosedur sebelumnya. Begitu juga protokol rehabilitasi dengan menerapkan mobilisasi dini dengan harapan memperbaiki laju penyembuhan dan minimalisasi kekakuan jangka panjang. Sayangnya, pendekatan ini kurang menguntungkan dibandingkan dengan protokol konservatif.

Meskipun terdapat kemajuan di bidang teknik pembedahan dan pengetahuan tentang patologi bahu, terdapat kegagalan dalam reparasi robekan kronis yang mencapai 20-95% kasus. Terutama pada hubungan antara tendon dengan tulang yang terbentuk setelah reparasi paska operasi tidak bisa menyerupai *enthesis* aslinya, dengan terbentuknya sikatrik fibrovaskular pada tempat transisi fibrokartilago kompleks terlihat di antara tendon dan tulang. Lingkungan intraartikular juga menjelaskan sebagian dari kegagalan ini, di mana cairan sinovial, yang berisi protein *lubricin anti-adhesive* akan menghambat penyembuhan tendon ke tulang.

Tendinopati dan robekan sebagian tendon *rotator cuff* sering diterapi konservatif dengan terapi fisik dan injeksi kortikosteroid. Penelitian acakisasi terkontrol pada pasien dengan robekan *full thickness rotator cuff* yang diberikan injeksi triamsinolon dilaporkan terdapat penurunan nyeri sedikitnya 3 bulan dibanding kontrol. Tetapi sistematika pemeriksaan terakhir menyimpulkan hanya sedikit bukti yang mendukung efikasi injeksi kortikosteroid subakromion pada terapi penyakit *rotator cuff*. Penelitian lain melaporkan terjadi diferensiasi non tenogenik (misal, adipogenik, kondrogenik, osteogenik) dari sel punca yang berasal dari tendon bila diterapi dengan deksametason.

Atas dasar pengalaman dengan angka robekan kembali yang tinggi dengan pendekatan pembedahan saat ini, dirancang *scaffold* untuk memperkuat secara mekanik atau meningkatkan penyembuhan biologi yang telah diteliti baik pada manusia dan hewan. Hanya dua penelitian acakisasi terkontrol yang

telah dilakukan dengan menggunakan material yang tersedia, yaitu matriks ekstraselular deselularisasi. Satu penelitian mendapatkan perbaikan skor klinik subjektif pada pasien dengan reparasi yang diperkuat dengan *scaffold*, model hewan dengan reparasi yang sama tidak menunjukkan hubungan tendon dengan tulang sesuai aslinya. Secara bersamaan banyak ahli bedah memperkuat reparasi *rotator cuff* dengan menambah *platelet-rich plasma* (PRP), faktor-faktor pertumbuhan autologus yang dikonsentrasikan dan diketahui berperan dalam penyembuhan luka. Dari berbagai penelitian klinik prospektif, PRP tidak berdampak pada perbaikan angka robekan kembali atau skor fungsional bahu setelah reparasi *rotator cuff* dengan *arthroscopy*. Seperti ligamentum krusiatum anterior pada genu, PRP mungkin merupakan pembawa faktor-faktor pertumbuhan yang kurang baik, seperti plasmin yang didapatkan di dalam cairan sinovial bisa dengan cepat mendegradasi matriks fibrin, dengan demikian terjadi difusi faktor-faktor pertumbuhan keluar dari tempat reparasi.

Tendon Achilles

Tendon *achilles* merupakan tendon terbesar dan terkuat di tubuh, tetapi merupakan tendon yang paling sering mengalami cedera. Bila robekan *rotator cuff* angkanya meningkat bersama bertambahnya umur, ruptur *achilles* paling sering terjadi pada pria umur 30-50. Tendinopati *achilles* meningkat paling sering karena meningkatnya partisipasi pada olahraga rekreasional, dengan patologi *achilles* kira-kira 30-50% dari semua cedera yang berkaitan dengan olahraga. Meskipun demikian ruptur tendon *achilles* juga terjadi pada atlet *elite*, meskipun penelitian telah banyak dilakukan, cedera ini terkenal dengan kekurangannya dalam kualitas penyembuhan dan laju penyembuhan yang lambat.

Robekan *full-thickness* tendon *achilles* hampir selalu dimulai dengan robekan sebagian atau degenerasi tendon, tendinosis non-inflamasi, dan tendinopati kronik merupakan predisposisi tendon *achilles* menjadi ruptur komplisit. Pada pemeriksaan sampel biopsi pasien mengalami reparasi terbuka pada tendon *achilles* yang robek. Tallon dan kolega menemukan bahwa tendon ruptur secara signifikan lebih degenerasi daripada tendon tendinopati. Sehingga upaya penelitian dilakukan dalam rangka upaya promosi penyembuhan, baik pada tendinopati maupun ruptur tendon.

Terapi konservatif pada tendinopati meliputi penurunan aktivitas, *cryotherapy*, beban eksentrik, *deep friction massage*, ortotik, dan *ultrasound* terapi. Pada

tendinopati yang rekalsitran, eksisi perlekatan, mengambil *nodul degenerative*, dan *tenotomy* yang ditujukan untuk promosi *angiogenesis* bisa dilakukan. Selanjutnya pada *rupture achilles* komplet bisa diterapi dengan cara konservatif dan pembedahan dengan hasil yang memuaskan. Tetapi *Cochrane Review* terakhir mendapatkan reparasi pembedahan terbuka secara signifikan menurunkan angka ruptur kembali dibandingkan terapi non operatif. Operasi perkutaneus tidak mengurangi angka ruptur kembali dibandingkan operasi terbuka, tetapi menurunkan secara signifikan angka infeksi paska operasi.

Pasien yang menderita cedera *achilles* umumnya dewasa muda yang aktif, sehingga menarik banyak penelitian dengan fokus pada mempercepat laju penyembuhan. Kecenderungan saat ini mengarah pada pembebanan awal dan penguatan aktif memberi hasil yang sama atau lebih superior daripada imobilisasi dengan gip. Pada robekan *rotator cuff*, ahli bedah memberikan PRP pada daerah operasi untuk mempercepat reparasi. Sanchez dan kolega melaporkan percepatan kembali berolahraga dan menurunnya diameter pada penelitian *cohort* kecil pada atlet yang diberi PRP, hanya satu uji acakisasi saat ini dan tidak ada perbedaan sifat mekanikal atau skor fungsi subjektif bila dibanding pada pasien yang mendapat PRP dengan tanpa PRP. Dibutuhkan penelitian dengan tujuan memberikan pemulihan jangka panjang (9-12 bulan) dan memperbaiki sisa kelemahan setelah cedera dan reparasi.

Tendon Fleksor

Tendon fleksor polisis longus, fleksor digitorum profundus, dan fleksor digitorum superficialis yang melekat pada *phalanx* distal dan medial tangan, berfungsi melakukan fleksi sendi *interphalangeal distal* dan medial. Sebagian dari tendon fleksor terbungkus selubung sinovial, yang memadat pada lokasi tertentu membentuk *pulley* yang bertindak sebagai titik tumpu untuk tendon. Karena berlokasi langsung di bawah kulit dan fasia palmaris, tendon fleksor sering mengalami laserasi dan cedera *crush*. Ruptur tendon fleksor intrasinovial memiliki keunikan dan merupakan tantangan tersendiri dalam penyembuhan dengan 3 alasan: 1) ruptur tidak akan sembuh tanpa intervensi bedah, 2) tata laksana paska operasi yang cermat sangat diperlukan untuk mencegah perlekatan dan memperbaiki fungsi *gliding* antara tendon dengan selubungnya, tetapi mobilisasi meningkatkan risiko ruptur kembali, dan 3) hipertrofi penyembuhan tendon harus dihindari untuk meminimalkan tahanan saat *gliding*.

Laporan pertama kali tentang reparasi tendon pada tahun 1917, teknik penjahitan untuk mendapat hasil yang optimal telah secara ekstensif dieksplorasi pada hewan dan model kadaver. Dari penelitian yang ada, Kim dan kolega menekankan teknik pembedahan berikut untuk memperbaiki hasil operasi: 1) 8 helai jahitan inti, dengan material jahitan kaliber besar, 2) panjang tumpuan kira-kira 1,2 cm, 3) konfigurasi *locking-loop* dan ikatan ditempatkan di luar area reparasi, dan 4) jahitan tepi ditempatkan jauh di dalam tendon dan jauh dari ujung yang terpotong. Beberapa serial penelitian yang ekstensif untuk menilai protokol rehabilitasi pada reparasi tendon fleksor juga telah dilakukan. Baik protokol mobilisasi dini dan regimen kombinasi fleksi pasif dengan ekstensi aktif menghasilkan angka ruptur kembali yang rendah dan luas gerak yang baik setelah reparasi. Tetapi tidak pada standar baku yang diterima secara umum tentang material dan teknik menjahit, begitu juga protokol rehabilitasi. Meta-analisis terakhir menunjukkan angka re-operasi 6%, ruptur kembali 4%, dan terbentuknya perlekatan 4%. Konsekuensinya, banyak penelitian mulai mengeksplorasi pendekatan rekayasa jaringan. Beberapa strategi menunjukkan hasil yang menjanjikan dalam menurunkan formasi perlekatan dan meningkatkan kekuatan tarik pada model hewan coba dengan cedera tendon fleksor, sedangkan pendekatan rekayasa jaringan baru dimulai penelitiannya.^(75,76,77)

REKAYASA JARINGAN TENDON

Sel-Sel

Pada kasus cedera tendon berat, terapi pembedahan bisa digunakan untuk reparasi atau mengganti tendon yang rusak dengan *autograft*, *allograft*, *xenograft* atau alat prostetik. Tetapi hasil klinik masih belum merepresentasikan dampak yang memuaskan oleh karena keterbatasan meliputi morbiditas daerah donor, angka kegagalan yang tinggi, risiko cedera berulang dan keterbatasan pemulihan jangka panjang. Keterbatasan ini telah mendorong pengembangan strategi rekayasa jaringan, yang menerapkan kombinasi sel-sel, *scaffold*, dan molekul-molekul bioaktif serta stimulasi mekanik *ex vivo* untuk membuat pengganti yang fungsional atau mempercepat penyembuhan alami defek tendon. Utamanya, rekayasa jaringan bertujuan memperbaiki kualitas penyembuhan agar mempromosikan restorasi penuh fungsi tendon.

Sel-sel yang digunakan secara luas untuk rekayasa jaringan tendon meliputi fibroblas tendon (tenosit), fibroblas dermis, dan sel punca mesenkimal (MSC). Tenosit berperan dalam menyintesis komponen matriks ekstraselular seperti kolagen, proteoglikan, dan glikoprotein, serta memiliki pengaruh besar pada formasi serabut kolagen. Tenosit manusia yang diisolasi memiliki kemampuan sintesis kolagen dan meningkatkan regulasi ekspresi *Scx*, *Tnmd*, dan *Dcn* sebagai respons terhadap faktor-faktor pertumbuhan. Defek tendon dijumpai oleh autologus rekayasa tendon tenosit pada model ayam yang menunjukkan perbaikan kekuatan mekanik dan deposisi matriks dibandingkan dengan *cell-free scaffold*. Pada penelitian lain tendon fleksor deselularisasi kelinci *di-seeding* dengan tenosit autologus memiliki modulus elastisitas sama dengan tendon normal, tetapi terjadi penurunan *ultimate stress*. Tenosit yang *di-seeding* menurunkan degradasi *scaffold* kolagen yang diinkubasi pada medium kultur, mekanisme ini diduga menjelaskan sifat mekanik yang superior pada *cell-seeded scaffolds*.

Meskipun pengembangan rekayasa jaringan tendon berbasis tenosit telah banyak dilakukan, pengambilan tenosit autologus bisa menimbulkan defek sekunder pada tempat donor. Oleh karena itu, fibroblas dermis dianggap sebagai alternatif sumber sel untuk mengatasi keterbatasan ini, di mana sel ini mudah diakses dan tidak menimbulkan morbiditas mayor pada tempat donor. Penelitian *in vivo* pada model *porcine* menunjukkan bahwa fibroblas dermis dan tenosit untuk rekayasa tendon didapatkan hasil berupa morfologi, histologi, dan kekuatan tariknya yang sama. Selain itu, semakin terlihat potensi masing-masing fibroblas dermis dan tenosit untuk rekayasa tendon jaringan baru seperti jaringan tendon manusia, yang terbentuk dengan menggunakan fibroblas dermis yang diletakkan pada kondisi *strain* statis sehingga menghasilkan serabut kolagen yang tersusun longitudinal dan sel-sel *spindle-shaped*. Selanjutnya rata-rata diameter serabut kolagen dan kekuatan tarik meningkat bersama dengan waktu. Injeksi suspensi fibroblas dermis pada plasma autologus memperbaiki tendinopati patella yang refrakter, seperti yang terlihat pada uji klinik.

Sel punca mesenkimal dewasa (MSCs) merupakan sumber sel yang menjanjikan pada rekayasa jaringan tendon. Oleh karena sifatnya seperti *self-renewal* dan memiliki potensi diferensiasi menjadi berbagai jenis sel, MSCs dari berbagai jaringan, termasuk *bone marrow*, adiposa, dan tendon telah digunakan pada rekayasa jaringan tendon. Potensi tenogenik BMSCs telah diteliti secara ekstensif dan lebih sedikit dilakukan pada sel punca yang berasal dari adiposa

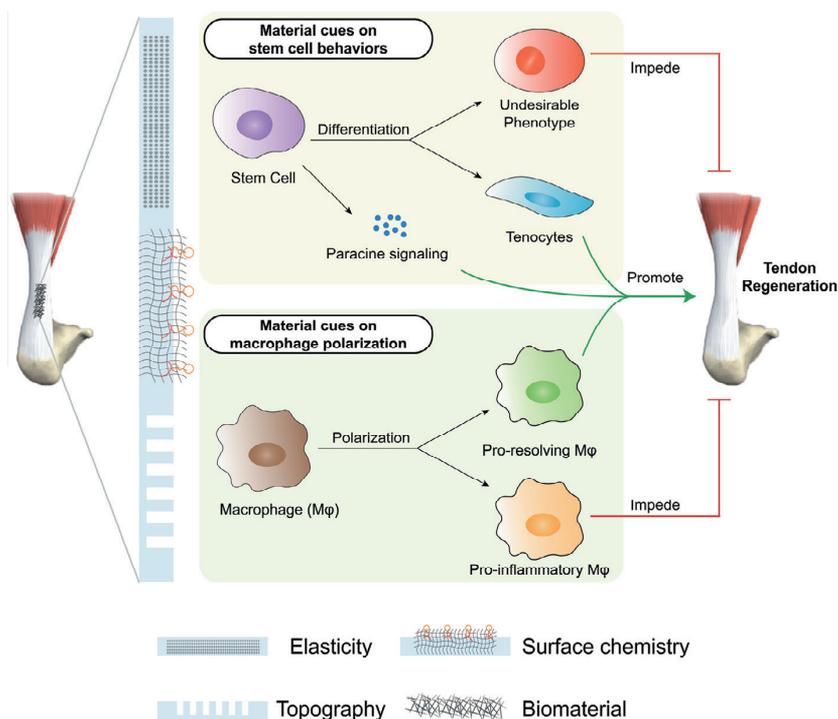
(ASCs). Dibandingkan dengan BMSCs, ASCs: 1) prosedur pengambilan kurang invasif, 2) tersedia dalam jumlah yang besar, dan 3) menunjukkan potensi yang sama untuk berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel.

Residen, jaringan spesifik, sel punca dewasa memiliki potensi regenerasi yang tinggi di mana dia tinggal. Dalam hal ini, *tendon-derived stem cells* (TDSC) telah diidentifikasi dan digunakan untuk rekayasa jaringan tendon. TDSC merupakan populasi sel yang unik pada tendon yang memiliki karakteristik sel punca universal seperti *cloning*, multipotensi, dan kemampuan *self-renewal*. Mereka juga memiliki potensi regenerasi yang tinggi yang sebanding dengan BMSCs. TDSCs di dalam *fibrin glue*, bila dibandingkan hanya dengan *fibrin glue* saja, mempromosikan reparasi tendon yang superior diukur dengan parameter histologi dan biomekanik. Meskipun TDSCs memiliki potensi yang menguntungkan, isolasi sel-sel autologus akan menimbulkan morbiditas yang sama seperti tenositis.

Scaffolds

Scaffolds merupakan salah satu faktor penting pada rekayasa jaringan. Mereka memberikan dukungan biomekanik untuk penyembuhan jaringan sampai dengan sel-sel endogen yang mendeposisikan matriks jaringan, sehingga mencegah kejadian ruptur berulang. *Scaffolds* dengan fungsi yang diinginkan bisa memperbaiki penyembuhan tendon dengan memfasilitasi proliferasi sel, promosi produksi matriks dan mengorganisasi matriks menjadi jaringan tendon fungsional. *Scaffolds* lebih lanjut bisa dimodifikasi untuk meningkatkan penyembuhan tendon, dengan pendekatan hibridisasi selular, modifikasi permukaan, perlekatan faktor-faktor pertumbuhan, dan stimulasi mekanik yang akan memediasi *remodeling* selular. *Scaffold* diklasifikasikan menjadi 3 kategori: 1) matriks tendon asli, 2) polimer sintetik; dan 3) berasal dari protein natural.

Scaffold yang berasal dari matriks tendon secara teori memiliki sifat biomekanik dan biokimia, oleh karena itu merupakan biomaterial yang ideal untuk mendukung penyembuhan tendon. Sebelum digunakan, sel-sel yang ada harus diambil untuk mencegah penularan penyakit dan respons imun. Modifikasi *allograft* dan *xenograft* bisa dikembangkan menjadi *scaffold* yang memiliki kekuatan mekanik sebagai pembawa sel-sel, vektor terapi gen, atau substansi biologis lainnya. Protokol pengolahan yang baik memungkinkan *scaffold* tendon aselular memiliki sifat mekanikal yang sama dengan jaringan tendon asli. Sejumlah protein ECM



Gambar 7.2 Regenerasi jaringan berbasis biomaterial (*scaffold*). Pada regenerasi tendon berbasis biomaterial, sel punca dan makrofag bisa berdiferensiasi menjadi fenotip yang diinginkan (*pro-solving*) atau tidak diinginkan (*pro-inflammatory*) sebagai respons terhadap sinyal material yang berbeda, yang bisa mempromosikan atau menghambat regenerasi tendon. Sinyal material juga bisa memengaruhi sekresi faktor-faktor bioaktif dari sel punca, yang menguntungkan untuk regenerasi tendon.⁸¹

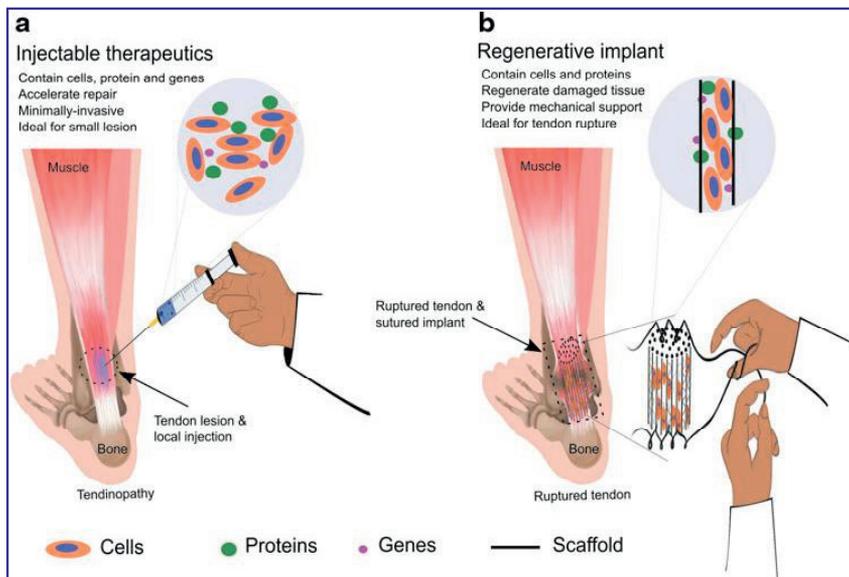
dan faktor-faktor pertumbuhan terpelihara dengan baik pada tendon aselular, sehingga memiliki biokompatibilitas dan biofungsional sama dengan aslinya. Fibroblas ekstrinsik telah berhasil dikultur *in vitro* pada *tri(n-butyl) phosphate* (TnBP)-*treated patellar tendon*, sehingga menjadi *graft* rekayasa jaringan yang hidup. Tendon semitendinosus kelinci yang diproses dengan deterjen (*sodium dodecyl sulfate*) untuk proses deselularisasi menunjukkan karakter pola berbeda dengan tendon asli, namun bisa diintegrasikan dengan fibroblas dermis autologus setelah *seeding* sel. Sejumlah polimer biodegradabel dan biokompatibel terutama α -*hydroxy-polyesters* telah digunakan untuk rekayasa jaringan tendon, meliputi

polyglycolic acid (PGA), *poly-L-lactic acid* (PLLA), dan *copolymer polylactic-co-glycolic acid* (PLGA).⁸⁰

Meskipun *polyester* memiliki kelebihan, mereka juga memiliki beberapa keterbatasan, yaitu tidak adanya sinyal biokimia untuk melekatnya sel, serta tidak punya kemampuan untuk meregulasi aktivitas sel. *Scaffold* yang dibuat dari protein natural dan turunannya bisa mengatasi masalah di atas. Karena ECM tendon terutama disusun oleh kolagen tipe I, *scaffold* yang berbasis kolagen sangat kompatibel. Derivat kolagen juga menunjukkan fungsi biologi lebih baik daripada material *polyester*. Selain sifat mekanikal, sinyal topografi dari *scaffold* juga harus diperhitungkan bila merekayasa konstruksi tendon.

Molekul-Molekul Bioaktif

Walaupun sejumlah faktor-faktor pertumbuhan terlihat aktif dalam perkembangan dan penyembuhan tendon, aplikasi faktor-faktor pertumbuhan



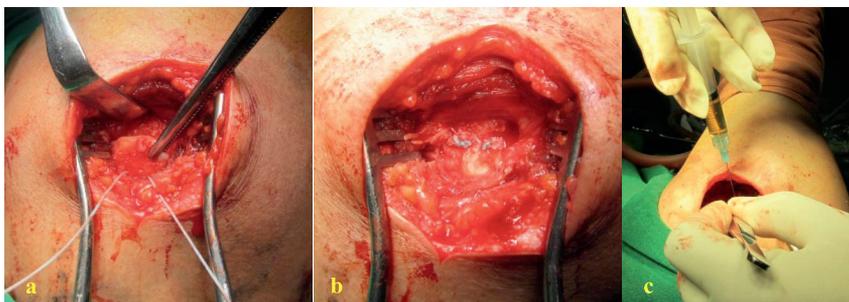
Gambar 7.3 Strategi rekayasa jaringan untuk regenerasi tendon. (A) terapi injeksi yang berisi sel-sel, protein, atau gen yang secara langsung diinjeksikan pada daerah cedera. (B) implan regeneratif berisi kombinasi sel-sel, protein, dan material *scaffold*, yang bisa langsung diimplantasikan dan dijahit pada cedera ruptur tendon.⁸²

untuk reparasi tendon masih menjadi tantangan. Hanya sedikit informasi yang diketahui tentang interaksi sinergis dan antagonis, begitu juga distribusi pada ruang dan waktu aktifnya, sehingga bisa didapatkan efek terbaik. Tantangan ini sebagian bisa diatasi dengan pemberian MSCs, di mana menurut teori terakhir mekanisme aksi utama pemberian MSCs adalah produksi sekretom yang akan memfasilitasi penyembuhan jaringan pada tempat mereka diberikan.

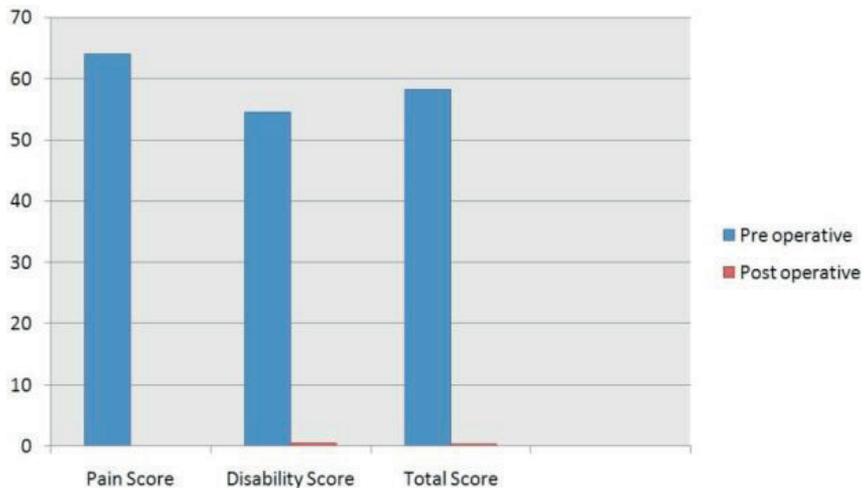
Stimulasi Mekanikal

Tendon berfungsi meneruskan gaya dari otot ke tulang, sifat mekaniknya telah diteliti secara ekstensif. Pada cedera dan penyembuhan tendon, diketahui bahwa mobilisasi terkontrol pada penyembuhan tendon diperlukan untuk meningkatkan hasil terapi, walaupun waktu yang tepat dan besarnya beban masih dalam perdebatan. Pada model hewan, penyembuhan tendon tanpa pembebanan menghasilkan sifat mekanik yang inferior, sementara peningkatan beban pada saat latihan juga bisa menimbulkan dampak yang buruk pada sifat tendon bila diberikan terlalu cepat. Walaupun bukti klinik yang kuat tentang protokol rehabilitasi yang optimal belum ada, tetapi disepakati bahwa penyembuhan jaringan yang diberi beban terkontrol memberikan *remodeling* dan hasil fungsional yang baik.

Dewasa ini, telah dilakukan eksplorasi tentang proses molekular dan selular terhadap dampak pembebanan terhadap penyembuhan tendon dan ligamentum. Peningkatan proliferasi sel, produksi kolagen dan ekspresi gen tenogenik didapatkan pada fibroblas dan sel punca mesenkimal yang diekspos dengan gaya statis atau uniaksial siklik, gaya terakhir mempromosikan efek yang lebih besar.



Gambar 7.4 (A) Reparasi Supraspinatus, (B) Augmentasi dengan membran amnion, dan (C) PRP.⁶¹



Gambar 7.5 Skor SPADI sebelum dan sesudah operasi.

Telah dilakukan uji klinik oleh tim peneliti di mana penulis ikut terlibat yang melakukan eksplorasi efektivitas PRP dan membran amnion untuk reparasi *rotator cuff*. Penelitian dilakukan pada 4 pasien dengan *impingement syndrome* dan robekan supraspinatus yang dilakukan intervensi pembedahan dekompresi akromioplasti dan reparasi supraspinatus yang diperkuat dengan pemberian PRP serta membran amnion.⁶¹



Gambar 7.6 Kiri, MRI pada tendon *rotator cuff* dengan defek 32,5 mm. Tengah dan kanan, rekonstruksi menggunakan yang diperkuat dengan komposit *freeze-dried* membran amnion yang *di-seeding* dengan sel punca alogenik dari lemak.⁸³

Pasien dievaluasi dengan skor nyeri dan skor disabilitas (*Shoulder Pain and Disability Index/SPADI*), yang hasilnya menunjukkan perbedaan yang signifikan antara hasil sebelum dan sesudah operasi, di mana setelah operasi menunjukkan hasil yang baik.⁶¹

Sebagai kelanjutan penelitian di atas dilakukan uji klinik rekonstruksi pada ruptur *full-thickness* tendon *rotator cuff* dengan menggunakan komposit membran amnion yang di-*seeding* alogenik sel punca adiposa untuk memperkuat proses penyembuhan. Penelitian dilakukan pada 21 pasien dan dibagi dalam tiga grup, yaitu: grup 1 rekonstruksi diperkuat dengan komposit *freeze-dried* membran amnion dengan sel punca alogenik adiposa; grup 2 rekonstruksi diperkuat dengan membran amnion; dan grup 3 hanya rekonstruksi saja. Hasil fungsional dilakukan dengan menggunakan skor.⁸³

Penilaian dilakukan dengan skor nyeri dan *Activity Daily Living*, dari hasil penelitian didapatkan komposit *freeze-dried* membran amnion dengan sel punca alogenik adiposa, efektif dalam meningkatkan proses penyembuhan tendon *rotator cuff*.⁸³

Daftar Pustaka

1. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. Vol. 3, Regenerative medicine. England; 2008. p. 1–5.
2. Sampogna G, Guraya S, Forgione A. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *J Microsc Ultrastruct*. 2015 May;3.
3. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2011; 2: 403–30.
4. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review. *Int J Polym Sci*. 2011; 2011(ii).
5. Saltzman WM. Tissue Engineering: Engineering Principles for the Design of Replacement Organs and Tissues. 2004.
6. Shafiee A, Atala A. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annu Rev Med*. 2017 Jan; 68(1): 29–40.
7. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today*. 2011; 14(3): 88–95.
8. Mhanna R, Hasan A. Introduction to Tissue Engineering. In: *Tissue Engineering for Artificial Organs*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2017. p. 1–34.

9. Mahyudin F. Graf Tulang & Material Pengganti Tulang Karakteristik dan Strategi Aplikasi Klinis. Utomo DN, editor. Surabaya: Airlangga University Press; 2018.
10. Kennedy OD, Majeska RJ, Schaffler MB. Form and Function of Bone. In: O'Keefe RJ, Jacobs JJ, Chu CR, Einhorn TA, editors. Orthopaedic Basic Science Foundation of Clinical Practice. Fourth. American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2013. p. 166–98.
11. Chubinskaya S, Malfait AM, Wimmer MA. Form and Function Articular Cartilage. In: O'Keefe RJ, Jacobs JJ, Chu CR, Einhorn TA, editors. Orthopaedic Basic Science Foundation of Clinical Practice. Fourth. American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2013. p. 200–14.
12. Utomo DN. Defek Kartilago Sendi Lutut Evaluasi, Diagnosis dan Tata Laksana Terkini. Mahyudin F, editor. Surabaya: Airlangga University Press; 2018.
13. McGrory BJ. Miller's Review of Orthopaedics, Mark D. Miller, MD, Stephen R. Thompson, MD, MEd, FRCSC (Eds.), Elsevier, Philadelphia (2016), p. 891, \$99.99. Elsevier; 2016.
14. Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011; 7(1): 50–6.
15. Ng HY, Lee AA, Shen KX. Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. *JSM Bone Jt Dis.* 2017; 1(2): 1010.
16. Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC. Age-Related changes in cartilage proteoglycans: Quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech.* 1994; 28(5): 398–408.
17. Reuther KE, Grey CF, Soslowsky LJ. Form and Function of Tendon and Ligament. In: O'Keefe RJ, Jacobs JJ, Chu CR, Einhorn TA, editors. Orthopaedic Basic Science Foundation of Clinical Practice. Fourth. American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2013. p. 230–45.
18. Bayrak E, Yilgor Huri P. Engineering musculoskeletal tissue interfaces. *Front Mater.* 2018; 5(April): 1–8.
19. Ghiasi MS, Chen J, Vaziri A, Rodriguez EK, Nazarian A. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Reports.* 2017; 6: 87–100.
20. Bahney CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res.* 2019; 37(1): 35–50.
21. Gerstenfeld LC. Fracture healing : mechanisms and interventions. 2014; (September).
22. Andrzejowski P, Giannoudis P V. The 'diamond concept' for long bone non - union management. *J Orthop Traumatol.* 2019;

23. Stewart SK. Fracture Non-Union : A Review of Clinical Challenges and Future Research Needs. *Malaysian Orthop J.* 2019; 13(2): 1–10.
24. Brittberg M. Clinical articular cartilage repair—an up to date review. *Ann Jt.* 2018; 3: 94–94.
25. Moura C, Santos-Rocha R, Franco S, Malça C, Galhano C, Henriques M, et al. A Brief Review on Processes for Cartilage Repair. *Appl Mech Mater.* 2019; 890: 229–36.
26. Kramer WC, Hendricks KJ, Wang J. Pathogenetic mechanisms of posttraumatic osteoarthritis: Opportunities for early intervention. *Int J Clin Exp Med.* 2011; 4(4): 285–98.
27. Chu CR. Posttraumatic Osteoarthritis. In: Chu CR, editor. *Orthopaedic Basic Science (Foundations of Clinical Practice)*. Fourth Edi. American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2013. p. 295–308.
28. Thomopoulos S, Amadio PC, Zhao C, Gelberman RH. Tendinopathy and Tendon Repair. In: Chu CR, editor. *Orthopaedic Basic Science (Foundations of Clinical Practice)*. Fourth Edi. American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2013. p. 329–40.
29. Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CH. Biologics for tendon repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015; 84: 222–39.
30. Mahyudin F, Suroto H. Tissue Bank and Tissue Engineering. In: Mahyudin F, Hermawan H, editors. *Biomaterials and Medical Devices A Perspective from an Emerging Country*. Springer; 2016. p. 207.
31. Mahyudin F, Roeshadi D, Rantam FA, Auliani'am A. Regenerasi pada Massive Bone Defect with Bovine Hydroxyapatite sebagai Scaffold Mesenchymal Stem Cell. *J Biosains Pascasarj.* 2011; 13(3).
32. Feinberg AW. Engineered tissue grafts: Opportunities and challenges in regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2012; 4(2): 207–20.
33. Tataru AM, Mikos AG. Tissue engineering in orthopaedics. *J Bone Jt Surg - Am Vol.* 2016; 98(13): 1132–9.
34. Mahyudin F, Utomo DN, Suroto H, Martanto TW, Edward M, Gaol IL. Comparative Effectiveness of Bone Grafting Using Xenograft Freeze-Dried Cortical Bovine, Allograft Freeze-Dried Cortical New Zealand White Rabbit, Xenograft Hydroxyapatite Bovine, and Xenograft Demineralized Bone Matrix Bovine in Bone Defect of Femoral Di. *Int J Biomater.* 2017; 2017: 7571523.
35. Hollister SJ. Scaffold engineering: a bridge to where? *Biofabrication.* 2009 Mar; 1(1): 12001.
36. Hussey GS, Dziki JL, Badylak SF. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat Rev Mater.* 2018;

37. Sheng Y, Fei D, Leiei G, Xiaosong G. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2017; 12(3): 233–46.
38. Ferdiansyah F, Utomo DN, Suroto H. Immunogenicity of Bone Graft Using Xenograft Freeze-Dried Cortical Bovine, Allograft Freeze-Dried Cortical New Zealand White Rabbit, Xenograft Hydroxyapatite Bovine, And Xenograft Demineralized Bone Matrix Bovine In Bone Defect Of Femoral Diaphysis White. *KnE Life Sci.* 2017; 3(6): 344.
39. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater.* 2009 Jan; 5(1): 1–13.
40. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-Organ Tissue Engineering: Decellularization and Recellularization of Three-Dimensional Matrix Scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng.* 2011; 13(1): 27–53.
41. Alaribe FN, Manoto SL, Motaung SCKM. Scaffolds from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Biologia (Bratisl).* 2016; 71(4): 353–66.
42. Fielding GA, Bandyopadhyay A, Bose S. Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds. *Dent Mater.* 2012; 28(2): 113–22.
43. Rantam FA, Purwati. Karakterisasi Fenotipe dan Genotipe Stem Cell. In: Rantam FA, Mahyudin F, Purwati, editors. *Stem Cell Mesenchymal, Hematopoetik, dan Model Aplikasi. Kedua.* Surabaya: Airlangga University Press; 2014. p. 57–77.
44. Mahyudin F. Bone Marrow Stem Cell: Sumber & Potensial Aplikasi Klinis. In: Rantam FA, Mahyudin F, Purwati, editors. *Stem Cell Mesenchymal, Hematopoetik, dan Model Aplikasi. Kedua.* Surabaya: Airlangga University Press; 2014. p. 93–102.
45. Kfoury Y, Scadden DT. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell.* 2015; 16(3): 239–53.
46. Rantam FA, Mahyudin F, Purwati, Edward M, Martanto TW. Biologi, Teknis, dan Kultur Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell (MSCs). In: Rantam FA, Mahyudin F, Purwati, editors. *Stem Cell Mesenchymal, Hematopoetik, dan Model Aplikasi. Kedua.* Surabaya: Airlangga University Press; 2014. p. 23–44.
47. Rantam FA, Mahyudin F, Nasronudin, Purwati. *Stem Cell Exploration, Methods of Isolation and Culture. First.* Surabaya: Airlangga University Press; 2009. 1–82 p.
48. Jimenez-Puerta GJ, Marchal JA, López-Ruiz E, Gálvez-Martín P. Role of Mesenchymal Stromal Cells as Therapeutic Agents: Potential Mechanisms of Action and Implications in Their Clinical Use. *J Clin Med.* 2020; 9(2): 445.

49. Fu Y, Karbaat L, Wu L, Leijten J, Both SK, Karperien M. Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells. 2017; 23(6): 515–29.
50. Votteler M, Kluger PJ, Walles H, Schenke-Layland K. Stem Cell Microenvironments - Unveiling the Secret of How Stem Cell Fate is Defined. *Macromol Biosci.* 2010; 10(11): 1302–15.
51. Lane SW, Williams DA, Watt FM. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nat Biotechnol.* 2014; 32(8): 795–803.
52. Votteler M, Layland SL, Lill G, Brockbank KGM, Horke A, Weimar T, et al. Bioreactors in tissue engineering – principles , applications and commercial constraints. 2013; 8(March).
53. Mahyudin F. Use of Freeze-Dried Irradiated Bones in Orthopaedic Surgery. In 2007.
54. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* 2017; 2(4): 224–47.
55. Ekrol I, Hajducka C, Court-Brown C, McQueen MM. A comparison of RhBMP-7 (OP-1) and autogenous graft for metaphyseal defects after osteotomy of the distal radius. *Injury.* 2008; 39: S73–82.
56. Egol KA, Nauth A, Lee M, Pape H-C, Watson JT, Borrelli JJ. Bone Grafting: Sourcing, Timing, Strategies, and Alternatives. *J Orthop Trauma.* 2015 Dec;29 Suppl 1: S10-4.
57. Balogh ZJ, Reumann MK, Gruen RL, Mayer-Kuckuk P, Schuetz MA, Harris IA, et al. Advances and future directions for management of trauma patients with musculoskeletal injuries. *Lancet.* 2012; 380(9847): 1109–19.
58. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif.* 1970; 3(4): 393–403.
59. Oryan A, Kamali A, Moshirib A, Eslaminejad MB. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs.* 2017; 204(2): 59–83.
60. Utomo DN, Mahyudin F, Hernugrahanto KD, Suroto H, Chilmi MZ, Rantam FA. Implantation of platelet rich fibrin and allogenic mesenchymal stem cells facilitate the healing of muscle injury: An experimental study on animal. *Int J Surg Open.* 2018; 11: 4–9.
61. Suroto H, Pribadi A, Utomo DN, Mahyudin F, Widhiyanto L. Effect of platelet-rich plasma and amniotic membrane in patients with rotator cuff repair. *J Biomimetics, Biomater Biomed Eng.* 2018; 39: 98–102.
62. Rantam FA, Purwati, Mahyudin F, Bumi C. Homing Mesenchymal Stem Cells (MSCs). In: Rantam FA, Mahyudin F, Purwati, editors. *Stem Cell Mesenchymal,*

- Hematopoetik, dan Model Aplikasi. Kedua. Surabaya: Airlangga University Press; 2014. p. 45–56.
63. Lin W, Xu L, Zwingenberger S, Gibon E, Goodman SB, Li G. Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. *J Orthop Transl.* 2017; 9: 19–27.
 64. Abd Elsattar T, Alseedy AI, Khalil AAE. Bone marrow injection in treatment of long bone nonunion. *Menoufia Med J.* 2014; 27(4): 632.
 65. Hernigou PH, Mathieu G, Poignard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions: surgical technique. *JBJS.* 2006; 88(1_suppl_2): 322–7.
 66. Mahyudin F, Utomo DN, Edward M, Widhiyanto L, Simanjuntak CA, Nikmatullah H. In vitro comparative study of osteogenic differentiation ability between adipose and bone marrow mesenchymal stem cell applied to bovine demineralized bone matrix. *J Biomimetics, Biomater Biomed Eng.* 2018; 38: 59–66.
 67. Sari DS, Maduratna E, Ferdiansyah, Latief FDE, Satuman, Nugraha AP, et al. Osteogenic Differentiation and Biocompatibility of Bovine Teeth Scaffold with Rat Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells. *Eur J Dent.* 2019; 13(2): 206–12.
 68. Kamadjaja DB, Purwati, Rantam FA, Ferdiansyah, Pramono DC. Healing Mechanism and Osteogenic Capacity of Bovine Bone Mineral—Human Amniotic Mesenchymal Stem Cell and Autogenous Bone Graft in Critical Size Mandibular Defect. *J Biomed Sci Eng.* 2015; 08(10): 733–46.
 69. Utomo DN, Hernugrahanto KD, Edward M, Widhiyanto L, Mahyudin F. Combination of bone marrow aspirate, cancellous bone allograft, and platelet-rich plasma as an alternative solution to critical-sized diaphyseal bone defect: A case series. *Int J Surg Case Rep.* 2019; 58: 178–85.
 70. Mahyudin F. 1st Annual Scientific Meeting of Rejaselindo The Role of Stem Cell, Tissue Engineering, Conditioned Media/Metabolite. What and How it Works as an Innovative Treatment Protocol? In: *Tissue Engineering How It's Work Latest Research & New.* 2018.
 71. Mahyudin F, Hernugrahanto KD, Andrianus J, Widhiyanto L, Edward M, Suroto H. Lengthening of Massive Intercalary Cortical Allograft After Successful Graft Incorporation in Skeletally Immature Bone with Critical-Sized Defect: A Case Report with 6-year Follow-up. *Indian J Orthop.* 2020;
 72. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou K a. Unlike Bone, Cartilage Regeneration Remains Elusive. *Science (80-).* 2012; 6933(November): 917–21.
 73. Pruksakorn D. Articular Cartilage Injury Treatment: History and Basic Science Review. *Orthop Muscular Syst.* 2012; 01(04): 1–7.
 74. Utomo DN, Mahyudin F, Rantam FA. Rekayasa Tulang Rawan Sendi (Cartilage Tissue Engineering). In: Rantam FA, Mahyudin F, Purwati, editors. *Stem Cell*

Mesenchymal, Hematopoetik, dan Model Aplikasi. Kedua. Surabaya: Airlangga University Press; 2014. p. 223–31.

75. Hunziker EB, Lippuner K, Keel MJB, Shintani N. An educational review of cartilage repair : precepts & practice e myths & misconceptions e progress & prospects. 2015; 23: 334–50.
76. Mahyudin F, Utomo DN. Seminar dan Workshop Stem Cell, Aplikasi Klinis Sel Punca (Stem Cell). In: Stem Cells Therapy for Cartilage Defect. Yogyakarta, Indonesia; 2016.
77. Mahyudin F, Utomo DN, Martanto TW, Hidayat AR, Putri LM. Effect of Decellularized Cartilage Bovine Scaffold and Hypoxic Condition on Stem Cell Differentiation to Chondrocyte: An In Vitro Study. *J Biomimetics, Biomater Biomed Eng.* 2018; 35: 67–76.
78. Utomo DN, Mahyudin F, Wardhana TH, Purwati P, Brahmana F, Gusti AWR. Physicobiochemical characteristics and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (hbm-mscs) in biodegradable porous sponge bovine cartilage scaffold. *Int J Biomater.* 2019; 2019.
79. Utomo DN, Rantam FA, Ferdiansyah, Purwati. Regeneration mechanism of full thickness cartilage defect using combination of freeze dried bovine cartilage scaffold - Allogenic bone marrow mesenchymal stem cells - Platelet rich plasma composite (SMPC) implantation. *J Biomimetics, Biomater Biomed Eng.* 2017; 31: 70–82.
80. Yang Guang , Rothrauff Benjamin B. and TRS. Tendon and Ligament Regeneration and Repair: Clinical Relevance and Developmental Paradigm. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2013; 99(3): 203–22.
81. Lin J, Zhou W, Han S, Bunpetch V, Zhao K, Liu C, et al. Cell-material interactions in tendon tissue engineering. *Acta Biomater.* 2018; 70: 1–11.
82. Walden G, Liao X, Donell S, Raxworthy MJ, Riley GP, Saeed A. A Clinical, Biological, and Biomaterials Perspective into Tendon Injuries and Regeneration. *Tissue Eng - Part B Rev.* 2017; 23(1): 44–58.
83. Suroto H, Wardhana TH, Utomo DN, Mahyudin F, Rantam FA, Soesilawati P. The use of amniotic membrane and allogeneic mesenchymal stem cell composites derived from fat tissues to strengthen the healing process in patients with complete supraspinatus rupture. Unpublished. 2019;

