

Tesis

UJI TOKSISITAS *FRESH FROZEN TENDONGRAFT* DAN *FREEZE DRIED TENDONGRAFT* TERHADAP *MESENCHYMAL STEM CELL*

KK
KK. A
TMD. 12/11
San
u



Panji Sananta



**PROGRAM STUDI MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2010

Tesis

UJI TOKSISITAS *FRESH FROZEN TENDONGRAFT* DAN *FREEZE DRIED TENDONGRAFT* TERHADAP *MESENCHYMAL STEM CELL*

Panji Sananta

**PROGRAM STUDI MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

UJI TOKSISITAS *FRESH FROZEN TENDONGRAFT* DAN *FREEZE DRIED TENDONGRAFT* TERHADAP *MESENCHYMAL STEM CELL*

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister

dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar

pada Program Studi Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh:

Panji Sananta

NIM 090314987 M

PROGRAM STUDI MAGISTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2010

ii

LEMBAR PERSETUJUAN

TESIS YANG TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 25 MEI 2010

Oleh

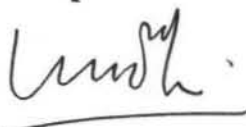
Pembimbing Ketua



Heri Suroto, dr, SpOT

NIP: 196306171985021005

Pembimbing



Prof. Dr. Indri Safitri, dr, MS

NIP: 195306141981032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi IKD



Prof. Retno Handajani, dr, MS, PhD

NIP: 194810121976032001

PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS

Tesis ini telah diuji dan disempurnakan oleh panitia penguji pada
Program Studi Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Pada tanggal 10 Mei 2010

Panitia Penguji,



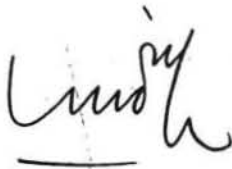
Prof. Dr. Djoko Roeshadi, dr, SpOT(K)

NIP: 19411115196701002



Heri Suroto, dr, SpOT

NIP: 196306171985021005



Prof. Dr. Indri Safitri, dr, MS

NIP: 195306141981032001



Prof. Dr. Harianto Notopuro, dr, MS

NIP: 194912131976031001



Prof. Dr. Paulus Liben, dr, MS

NIP: 130531788



Tri Martini, dr, SpBK

NIP: 194603141974122001

UCAPAN TERIMAKASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala karunia dan rahmatNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada **Heri Suroto, dr, SpOT**, Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan dan bimbingan dalam menyusun tesis ini.

Terima kasih sebesar besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada **Prof. Dr. Indri Safitri, dr, MS**, Pembimbing yang dengan penuh ketelitian memberikan koreksi, saran dan wawasan ilmu.

Terima kasih sebesar besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada **Dr.Arief Wibowo, dr, MS**, Pembimbing statistik kami yang dengan penuh ketelitian memberikan koreksi dan bimbingan.

Terima kasih sebesar besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada **Prof.Dr.Djoko Roeshadi,dr,SpOT (K)**, yang dengan penuh kesabaran memberikan masukan, saran dan gagasan dalam menyelesaikan tesis ini.

Kami ucapkan terima kasih kepada yang terhormat Rektor Universitas Airlangga **Prof .Dr. Fasichul Lisan, Apt**, Dekan Universitas Airlangga **Prof.Dr. Muhammad Amin,dr,SpP(K)**, Direktur Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga , Kepala Bagian Departemen / SMF Orthopaedi dan Traumatologi **Erwin Ramawan,dr,SpOT**, Ketua Program Studi Orthopaedi dan Traumatologi **Ferdiansyah,dr,SpOT**, Sekretaris Program Studi Orthopaedi Traumatologi Dwikora **Novembri Utomo,dr, SpOT** dan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar **Prof.Retno Handajani,dr,MS,PhD**, yang telah memberikan kami kesempatan dalam mengikuti dan menyelesaikan program studi Ilmu Kedokteran Dasar ini dengan baik.

RINGKASAN

UJI TOKSISITAS *FRESH FROZEN TENDONGRAFT* DAN *FREEZE DRIED TENDONGRAFT* TERHADAP *MESENCHYMAL STEM CELL*

Angka kejadian trauma muskuloskeletal cukup tinggi, di *United States of America (USA)* diperkirakan terdapat 33 juta kejadian setiap tahun, dan hampir 50 % merupakan trauma yang melibatkan jaringan lunak termasuk dalam hal ini tendon. Kerusakan tendon yang terjadi sering merupakan cedera yang kompleks, dan sering membutuhkan *graft* tendon bila terdapat defek dari tendon tersebut. Saat ini pilihan dalam penanganan defek tendon adalah *autograft*, *allograft* dan *prosthesis* sintetik, namun banyak kerugian dalam penggunaan *autograft*, *allograft* maupun *prosthesis* sintetik. Adanya berbagai keterbatasan di dalam metode penggunaan *autograft*, *allograft* maupun *prosthesis* sintetik membuat para ahli merasa perlu untuk melakukan eksplorasi tehnik rekayasa jaringan seperti aplikasi *growth factor* dan juga penggunaan *stem cell* yang ditanamkan pada *scaffold*, dalam hal ini adalah *tendongraft*.

Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo mampu memproduksi tendon *allograft* baik berupa *freeze dried tendon graft* maupun *fresh frozen tendon graft*. *Freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft* merupakan *non living tissue* yang bisa mempunyai efek toksik terhadap *living tissue*, sehingga satu hal yang masih menjadi masalah adalah apakah ada efek toksik *freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft* produk dari Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo terhadap *mesenchymal stem cell*. Oleh karena itu pada

penelitian ini diteliti efek toksik *freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft* terhadap *mesenchymal stem cell*.

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium eksperimental dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Pada penelitian ini kultur *mesenchymal stem cell* dibagi secara random menjadi 3 kelompok yaitu (1) kelompok pertama dilakukan pemberian *fresh frozen tendongraft*, (2) kelompok kedua dilakukan pemberian *freeze dried tendongraft* dan (3) kelompok ketiga hanya kultur *mesenchymal stem cell* saja yang berfungsi sebagai kontrol. Pada ketiga kelompok tersebut dilakukan uji viabilitas *mesenchymal stem cell* menggunakan *MTT Assay*. Hasil yang didapat dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan uji statistik mulai dari statistika deskriptif, uji normalitas, uji Anova dan *post hoc significancy test*. Unit penelitian adalah kultur *mesenchymal stem cell* yang didapat dari bank *stem cell Institute of Tropical Disease (ITD)*, dipilih secara random untuk masing – masing kelompok. Pada penelitian ini menggunakan replikasi unit penelitian sebanyak 15 untuk masing – masing kelompok. Variabel bebas adalah penanaman *fresh frozen tendongraft* dan *freeze dried tendongraft* pada kultur *mesenchymal stem cell* sedangkan variabel tergantung adalah viabilitas *mesenchymal stem cell* yang diukur secara kuantitatif dengan *MTT Assay*. Lokasi dan waktu penelitian ini dilakukan di *Institute of Tropical Disease Universitas Airlangga* pada bulan Maret sampai dengan April 2009.

Pada penelitian ini didapat hasil viabilitas *mesenchymal stem cell* didalam *fresh frozen tendongraft* adalah 98,84% sedangkan viabilitas *mesenchymal stem cell* didalam *freeze dried tendongraft* adalah 98,86%. Uji Anova dan *post hoc significancy test* menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol sehingga bisa ditarik

kesimpulan bahwa tidak didapatkan efek toksik dari *fresh frozen tendongraft* dan *freeze dried tendongraft* terhadap *mesenchymal stem cell*.

Penelitian yang kami lakukan ini sifatnya adalah penelitian *invitro*, sehingga masih perlu pembuktian tidak adanya toksisitas dari *fresh frozen tendongraft* dan *freeze dried tendongraft* terhadap *mesenchymal stem cell* bila diuji *invivo* pada hewan coba sebelum dapat kita lakukan penelitian pada manusia untuk dapat memberikan solusi terhadap penanganan defek tendon pada manusia.

SUMMARY

Toxicity Test of Fresh Frozen Tendongraft and Freeze Dried Tendongraft to the Mesenchymal Stem Cell

The incidence of musculoskeletal trauma is relatively high, in USA approximately there are 33 million case a year, and almost 50% were soft tissue trauma including tendon injury. Tendon damage often is a complicated injury, which need tendon graft if there is a tendon defects. The choices for the treatment of tendon defect are autograft, allograft, and prostheses. There are several downsides of the autograft, allograft and synthetic prostheses. Since the usage of synthetic prosthesis and graft are still showing unsatisfying results, lately same explorations on the field of tissue engineering like the application of growth factor as well as the usage of stem cell seeded on scaffold-in this case, tendon graft- has been done. Tendon graft (scaffold) that is given stem cell can cause the regeneration or natural tissue replacement and afterward the scaffold slowly dissolves over time.

Tissue bank of Soetomo General Hospital is capable to produce tendon allograft either freeze dried tendongraft or fresh frozen tendon graft. Freeze dried tendongraft and fresh frozen tendongraft is a non living tissue that could be has a cytotoxic effect to the mesenchymal stem cell. This study want to know about the cytotoxic effect of fresh frozen tendongraft and freeze dried tendongraft to the mesenchymal stem cell.

This was an experimental laboratory study with post-test-only control group design. In this study we divided the mesenchymal stem cell culture into three group, (1) for the first group we gave fresh frozen tendongraft, (2) for the second group we gave freeze dried tendongraft and (3) for the third group as a control. Each group was tested for it's viability using MTT

Assay. The result was analyzed quantitatively by statistic test. The experimental unit was a mesenchymal stem cell culture from Institute of Tropical Disease that had been divided into three group, each group had fifteen experimental unit. This study has been done at Institute of Tropical Disease on March-April 2009.

The results of mesenchymal stem cell viability within fresh frozen tendongraft was 98,84%, and mesenchymal stem cell viability within freeze dried tendongraft was 98,86%. Statistical analysis using Anova and post hoc significancy test show that there were no statistical difference between control and treatment group. The conclusion of this study was fresh frozen tendon graft and freeze dried tendongraft proven to be not toxic to the mesenchymal stem cell in vitro.

Abstract

Toxicity Test of Fresh Frozen Tendongraft and Freeze Dried Tendongraft to the Mesenchymal Stem Cell

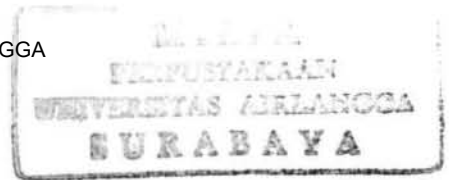
Background: Surgical tendon repair is limited by the availability of viable tissue for transplantation so, the need for tissue engineered tendon material exists. One approach to tendon engineering utilizes a stem cell-scaffold construct (tendongraft) and then is grafted onto the defect, but the cytotoxic effect of the tendongraft is still unknown. The purpose of this study is to determine the cytotoxic effect of fresh frozen tendongraft and freeze dried tendongraft to the mesenchymal stem cell.

Method: This laboratory experimental study using the post test only control group design, done in Institute of Tropical Disease Airlangga University. The viability test using MTT Assay (Elisa). The data analyzed by Anova and post hoc significance test.

Result: The viability of mesenchymal stem cell on fresh frozen tendongraft was 98,84% and the viability of mesenchymal stem cell on freeze dried tendongraft was 98,86%. From post hoc significance test show that those two group compare with control was $>0,05$, it means there were no significance between group and control.

Conclusion: There were no toxicity effect of fresh frozen tendongraft and freeze dried tendon graft to the mesenchymal stem cell.

Keyword: cytotoxic effect, mesenchymal stem cell, fresh frozen tendongraft, freeze dried tendongraft, MTT Assay



DAFTAR ISI

Sampul Depan	
Sampul Dalam	i
Prasyarat Gelar	ii
Lembar Persetujuan	iii
Penetapan Panitia Penguji	iv
Ucapan terima kasih	v
Ringkasan	vi
Summary	ix
Abstract	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR SINGKATAN	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan umum	3
1.3.2 Tujuan khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat teoritis	4
1.4.2 Manfaat praktis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Anatomi	5
2.2 Biologi Penyembuhan Tendon	7
2.3 <i>Stem Cell</i>	12
2.4 Tendon <i>Allograft</i>	17
2.5 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT Assay)	20
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual	22
3.2 Hipotesis Penelitian	23

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian	24
4.2 Unit Penelitian, Replikasi dan Teknik Pengambilan Sampel	25
4.2.1 Unit penelitian	25
4.2.2 Replikasi	26
4.3 Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel Penelitian	26
4.4 Bahan Penelitian	28
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	28
4.6 Kerangka Operasional Penelitian	29
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	
5.1 Data Hasil Penelitian	31
5.2 Analisis Hasil Penelitian	32
BAB 6 PEMBAHASAN	35
BAB 7 PENUTUP	38
DAFTAR PUSTAKA	39
DAFTAR LAMPIRAN	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Gambaran Histologis Jaringan Tendon	5
Gambar 2.2	Struktur Tendon	6
Gambar 2.3	Fase pada Penyembuhan Tendon	9
Gambar 2.4	Proses Integrasi Tendongraft	10
Gambar 2.5	<i>Attachment Stem Cell</i> pada <i>Tendongraft</i>	11
Gambar 2.6	Hirarki <i>Stem Cell</i>	13
Gambar 2.7	Deferensiasi <i>Stem Cell</i> Manusia	14
Gambar 2.8	Deferensiasi <i>Hematopoetic Stem Cell</i> dan <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	15
Gambar 2.9	Gambaran Mikroskopis <i>Mesenchymal Stem Cell</i>	15
Gambar 2.10	Gambaran Mikroskop Elektron dari (<i>Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell</i>)	16
Gambar 2.11	Reaksi Kimia Enzim <i>Dehidrogenase</i> Mitokondria untuk Memutuskan Cincin <i>Tetrazolium MTT</i>	21
Gambar 3.1	Kerangka konseptual	22
Gambar 4.1	Skema Rancangan Penelitian	25
Gambar 4.2	Kerangka Operasional Penelitian	29

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran <i>Optical Density</i> Kultur <i>Mesenchymal Stem Cell</i> .	31
Tabel 5.2 Persentase Viabilitas <i>Mesenchymal Stem Cell</i> .	32

DAFTAR SINGKATAN

AATB	: <i>American Association of Tissue Bank</i>
BMSC	: <i>Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cell</i>
CCM	: <i>Cell Culture Medium</i>
DMSO	: <i>Dimethyl Sulphoxide</i>
FD	: <i>Freeze Dried Tendongraft</i>
FF	: <i>Fresh Frozen Tendongraft</i>
HSC	: <i>Haemopoietik Stem Cell</i>
ITD	: <i>Institute of Tropical Disease</i>
MMPs	: <i>Matriks Metalloproteinases</i>
MSC	: <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
MTT	: <i>[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]</i>
PBS	: <i>Phospate Buffer Saline</i>
USA	: <i>United State of America</i>

BAB I

PENDAHULUAN



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Angka kejadian trauma muskuloskeletal cukup tinggi, di *United States of America (USA)* diperkirakan terdapat 33 juta kejadian setiap tahun, dan hampir 50 % merupakan trauma yang melibatkan jaringan lunak termasuk dalam hal ini tendon. Kerusakan tendon yang terjadi sering merupakan cedera yang kompleks, dan sering membutuhkan *graft* tendon bila terdapat defek dari tendon tersebut. Bila defek yang terjadi tidak terlalu banyak terdapat sumber *autograft* seperti tendon *palmaris longus*, namun pada kasus-kasus dengan defek yang sangat luas dan multipel, perlu dipikirkan hal lain untuk mengatasi masalah tersebut. (Calve, 2004)

Saat ini pilihan dalam penanganan defek tendon adalah *autograft*, *allograft* dan *prosthesis* sintetik, namun banyak kerugian dalam penggunaan *autograft*, *allograft* maupun *prosthesis* sintetik. Beberapa faktor yang membatasi penggunaan *autograft* secara luas ialah: *morbidity* sisi donor, dan keterbatasan sumber donor, sedangkan dengan penggunaan *allograft* perlu dipikirkan mengenai transmisi patogen dan kesulitan penyimpanan. Penggunaan *prosthesis* sintetik seperti *Dacron Graft*, *Carbon Sheets*, *Silastic Fiber* memiliki keterbatasan yaitu fungsi tendon menjadi kurang optimal dan kecenderungan terjadi degradasi *prosthesis* sintetik tersebut. (Calve, 2004; Muschler, 2004)

Adanya berbagai keterbatasan di dalam metode penggunaan *autograft*, *allograft* maupun *prosthesis* sintetik membuat para ahli merasa perlu untuk melakukan eksplorasi teknik rekayasa jaringan seperti aplikasi *growth factor* dan juga penggunaan *stem cell* yang ditanamkan pada *scaffold*, dalam hal ini adalah *tendonraft*. *Tendonraft (scaffold)* yang diberi *stem cell* memungkinkan terjadinya regenerasi atau penggantian jaringan secara alami, kemudian *scaffold* tersebut secara berangsur akan menghilang setelah periode waktu tertentu (Sahoo, 2006; Hania, 1999). *Tendonraft* yang berongga ini akan disambungkan pada defek tendon sehingga terjadi kontinuitas struktur jaringan tendon tersebut. Sementara *mesenchymal stem cell* sumsum tulang yang telah ditanam secara *ex vivo* pada *scaffold* tersebut akan direkrut dan distimulasi dalam lingkungan mikro defek tendon untuk berkembang menjadi pretenoblast. Proses ini yang disebut sebagai tenokonduksi dan tenoinduksi (Cao 2006; Garvin, 2003; Baar, 2008).

Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo mampu memproduksi tendon *allograft* baik berupa *freeze dried tendon graft* maupun *fresh frozen tendon graft*. *Fresh frozen tendon graft* adalah jaringan tendon steril dalam bentuk beku segar (*fresh frozen tendon*) yang disimpan pada *deep freezer -80° C*, dan memerlukan waktu minimal 3 bulan sebelum dimanfaatkan. *Freeze dried tendon allograft* adalah jaringan tendon dalam bentuk kering (*freeze dried*) yang pembuatannya melalui proses pencucian, *defatting*, pengeringan dan sterilisasi dengan *gamma irradiasi* (Ouyang 2006 ; Garvin 2003). *Freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft* merupakan *non living tissue* yang bisa

mempunyai efek toksik terhadap *living tissue* , sehingga satu hal yang masih menjadi masalah adalah apakah ada efek toksik *freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft* produk dari Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo terhadap *mesenchymal stem cell*. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dilakukan uji toksisitas *fresh frozen tendon graft* dan *freeze dried tendon graft* terhadap *mesenchymal stem cell*.

1.2. Rumusan Masalah

1. Bagaimanakah efek toksik *fresh frozen tendongraft* terhadap *mesenchymal stem cell* secara *invitro* ?
2. Bagaimanakah efek toksik *freeze dried tendongraft* terhadap *mesenchymal stem cell* secara *invitro* ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum :

Mengetahui efek toksik *tendongraft* terhadap *mesenchymal stem cell* secara *invitro*.

1.3.2. Tujuan khusus :

1. Mengetahui efek toksik *fresh frozen tendon graft* terhadap *mesenchymal stem cell* secara *invitro* .
2. Mengetahui efek toksik *freeze dried tendongraft* terhadap *mesenchymal stem cell* secara *invitro*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini akan memberikan informasi mengenai efek toksik *fresh frozen tendongraft* dan *freeze dried tendongraft* terhadap *mesenchymal stem cell* secara *invitro*.

1.4.2 Manfaat praktis

Hasil penelitian ini memberikan data yang berguna untuk penelitian selanjutnya terutama penelitian mengenai pendekatan rekayasa jaringan untuk menangani masalah penanganan defek tendon pada manusia.

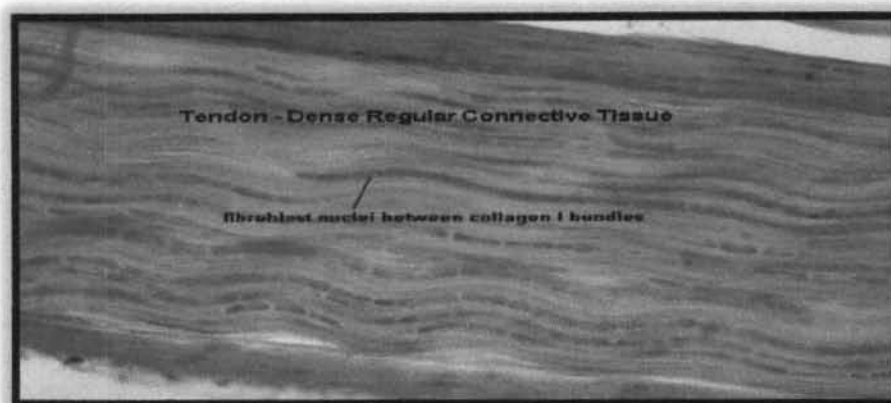
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Anatomi

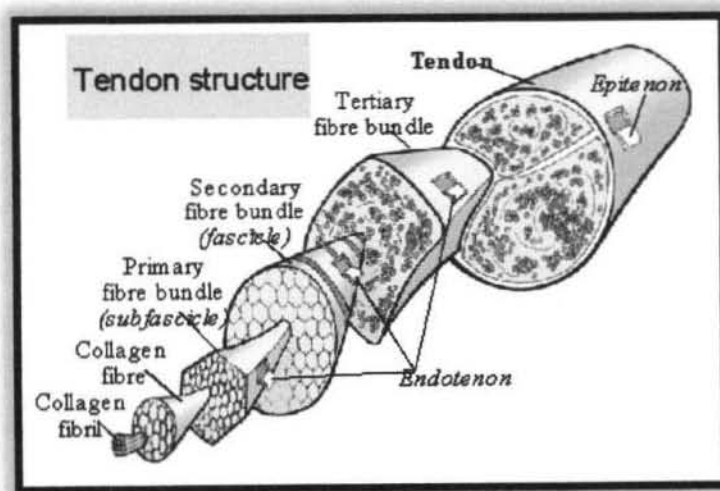
Tendon menghubungkan otot ke tulang dan memungkinkan terjadinya perpindahan gaya dari otot ke tulang sehingga terjadilah pergerakan sendi.

Tendon yang normal memiliki warna putih mengkilap dan bertekstur fibroelastis. Pada jalinan *matriks ekstraseluler* tendon, tenoblas dan tenosit menyusun 90%-95% dari elemen seluler. Tenoblas adalah sel tendon yang belum matang, berbentuk spindel, mengandung beragam organel sitoplasmik yang menunjukkan kemampuan metabolik yang tinggi. Tenosit memiliki rasio inti dan sitoplasma yang lebih kecil dibanding pada tenoblas dan aktifitas metabolisme yang berkurang. Sisa elemen seluler tendon sebesar 5%-10% terdiri atas kondrosit, sel sinovial pada selubung tendon (*tendon sheath*), serta sel vaskuler meliputi sel endotel kapiler dan sel otot polos pada arteriol (Beredjikian, 2003; Gelberman, 1992).



Gambar 2.1 Gambaran Histologis Jaringan Tendon (Gelberman, 1992)

Kolagen tersusun berjenjang sesuai dengan tingkat kerumitannya, dimulai dari tropokolagen, berupa rantai *triple-helix polipeptide* yang kemudian menyatu menjadi fibril, fiber (bundel primer), *fascicle* (bundel sekunder), bundel tersier, kemudian tendon itu sendiri. Molekul tropokolagen yang mudah larut membentuk jalinan silang untuk menyusun molekul kolagen tak larut yang beragregasi membentuk fibril-fibril kolagen. Sebuah fibril kolagen adalah unit terkecil tendon yang dapat diuji secara mekanik dan terlihat dengan mikroskop cahaya (Beredjikian, 2003).



Gambar 2.2 Struktur Tendon (Gelberman, 1992)

Epitenon merupakan selubung jaringan ikat yang longgar dan halus dan meliputi suplai saraf, pembuluh darah dan limfe ke tendon yang akan menyelubungi seluruh tendon dan berlanjut ke *profundus* di antara bundel

tersier sebagai endotenon. Endotenon adalah jalinan retikuler tipis yang terdiri atas jaringan ikat yang menghubungkan tiap serabut tendon. Pada bagian superfisial, epitenon dikelilingi oleh paratenon, suatu jaringan ikat penghubung longgar yang terdiri atas serabut kolagen tipe I dan tipe III, beberapa serabut elastis, dan sekelompok sel sinovial. Selubung sinovial tendon dapat dijumpai pada area yang khusus untuk menerima regangan mekanis lebih tinggi, seperti pada tendon di tangan dan kaki dimana sangat diperlukan pelumasan yang memadai. Selubung sinovial terdiri atas lapisan fibrotik di sebelah luar, dan lapisan sinovial di sebelah dalam, yang tersusun atas lembaran viseral dan parietal. Selubung sinovial sebelah dalam menyelubungi badan tendon dan berfungsi sebagai membran ultra-filtrasi untuk menghasilkan cairan sinovial. Selubung fibrosa membentuk kondensasi, katrol yang berfungsi sebagai fulkrum untuk membantu fungsi tendon (Beredjiklian, 2003).

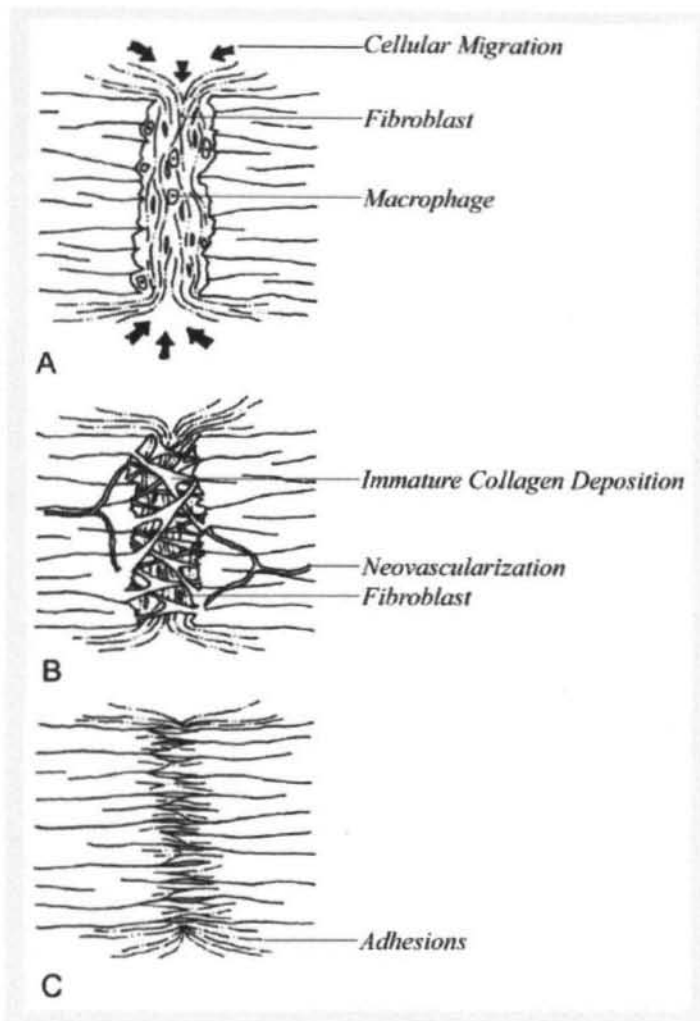
2.2 Biologi Penyembuhan Tendon

Riset biologi dari penyembuhan tendon telah memberikan pemahaman dasar proses tendon sembuh setelah cedera. Respon reparatif ini mempunyai 3 fase yang berurutan: inflamasi, fibroblastik dan remodeling. Pada fase inflamasi, sel-sel inflamasi yang berasal dari jaringan sekitar migrasi ke sisi yang cedera. Sel-sel tersebut akan memfagosit jaringan nekrosis dan bekuan darah. Pada fase fibroblastik, terjadi proliferasi fibroblast disekitar sisi cedera dan sintesa kolagen serta komponen lain dari matriks ekstraselular. Fibroblast adalah sel utama pada reaksi penyembuhan fibrotik dan bertanggung jawab dalam deposisi kolagen dan

pembentukan parut. Akhirnya pada fase remodeling serabut kolagen yang baru diproduksi akan mengarah secara longitudinal sepanjang sumbu tendon (Beredjiklian, 2003).

Terdapat 2 mekanisme dalam penyembuhan tendon yaitu mekanisme ekstrinsik *fibroblast* dan sel inflamasi dari jaringan sekitar menginvasi sisi penyembuhan untuk mempromosi reparasi. Mekanisme kedua yaitu mekanisme intrinsik fibroblast dan sel inflamasi dari dalam tendon dan epitenon menginvasi sisi penyembuhan. Perbedaan diantara mekanisme ekstrinsik dan intrinsik adalah asal sel penyembuhan. Mekanisme ekstrinsik tampaknya aktif pada awal penyembuhan, sementara mekanisme intrinsik aktif pada tahap lanjut. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa respon proliferaatif dan inflamasi dari selaput sinovial itu lebih besar dibanding dengan endotenon dan tendon itu sendiri. Studi lain menunjukkan sel fibroblast sinovial lebih reaktif terhadap sitokin dan mempunyai kapasitas lebih besar untuk mendegradasi matriks ekstra selular (Beredjiklian, 2003).

Dominasi mekanisme ekstrinsik menyebabkan peningkatan isi kolagen pada sisi cedera, namun disertai penurunan organisasi kolagen dan sifat material jaringan reparatif tendon. Oleh sebab itulah mekanisme ekstrinsik menyebabkan pembentukan parut dan perlekatan antara tendon dengan struktur *peritendinous* sekitarnya (Beredjiklian, 2003).

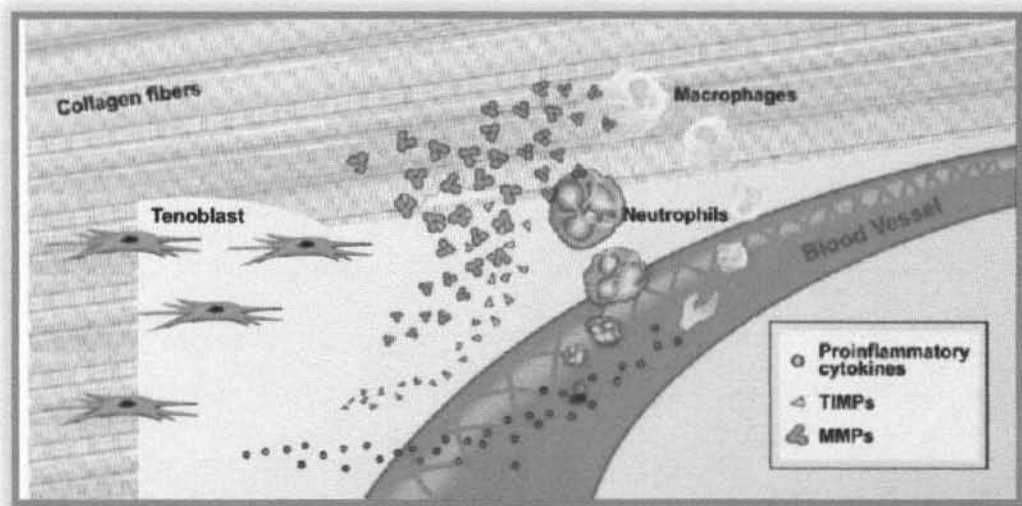


Gambar 2.3 Fase pada penyembuhan tendon yaitu inflamasi, fibroblastik dan remodelling. (Beredjikian, 2003)

Modulasi proses penyembuhan dengan meningkatkan jalur intrinsik (memperkuat penyembuhan ujung dengan ujung tendon) dan menekan jalur ekstrinsik (mengurangi perlekatan dari tendon dengan jaringan sekitarnya) akan dapat memperbaiki penanganan cedera tendon ini (Beredjikian, 2003).

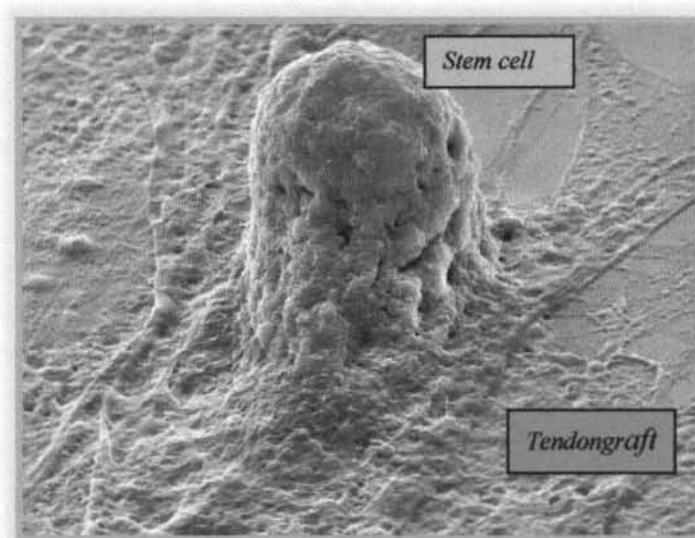
Pada proses penyembuhan tendon dengan menggunakan *tendongraft* disertai dengan implantasi *stem cell* mempunyai mekanisme penyembuhan yang

tidak terlalu jauh berbeda. *Tendon allograft* adalah tendon *allogenik* yang aselular. Pada kenyataannya transplantasi *tendon allograft* akan mengalami *remodeling* secara bertahap oleh revaskularisasi yang disertai invasi *stem cell*. Selanjutnya sel tersebut akan berproliferasi dan berdeferensiasi yang diikuti proses sintesa kolagen dan matriks ekstra selular lainnya untuk menggantikan *graft* tendon. Proses integrasi diawali dengan nekrosis *graft* yang terekspresikan oleh peningkatan *matriks metalloproteinases* (MMPs) dan selanjutnya akan diikuti oleh revaskularisasi, repopulasi sel dan remodeling. Sepanjang proses penyembuhan tendon terdapat keseimbangan dinamis antara pembongkaran dan pembentukan kolagen (Cho, 2003; Cao, 2006). Demikian juga yang terjadi pada rekayasa jaringan tendon.



Gambar 2.4 Proses integrasi diawali dengan nekrosis graft, revaskularisasi, repopulasi sel dan remodeling (Cho, 2003).

Aplikasi *tendon allograft* sebagai *scaffold* yaitu tempat untuk pertumbuhan jaringan tendon yang baru inilah yang dimaksud dengan tenokonduksi. *Freeze dried tendon allograft* yang berongga ini akan disambungkan pada defek tendon sehingga terjadi kontinuitas struktur jaringan tendon tersebut. Sementara *stem cell* sumsum tulang yang telah ditanam secara *ex vivo* pada *scaffold* tersebut akan direkrut dan distimulasi dalam lingkungan mikro defek tendon untuk berkembang menjadi pretenoblast. Diawali dengan revaskularisasi yang ditindak-lanjuti dengan repopulasi sel akan terjadi proses pembentukan jaringan tendon yang baru, inilah yang disebut dengan tenoinduksi (Cao, 2006; Garvin, 2003; Baar, 2008).

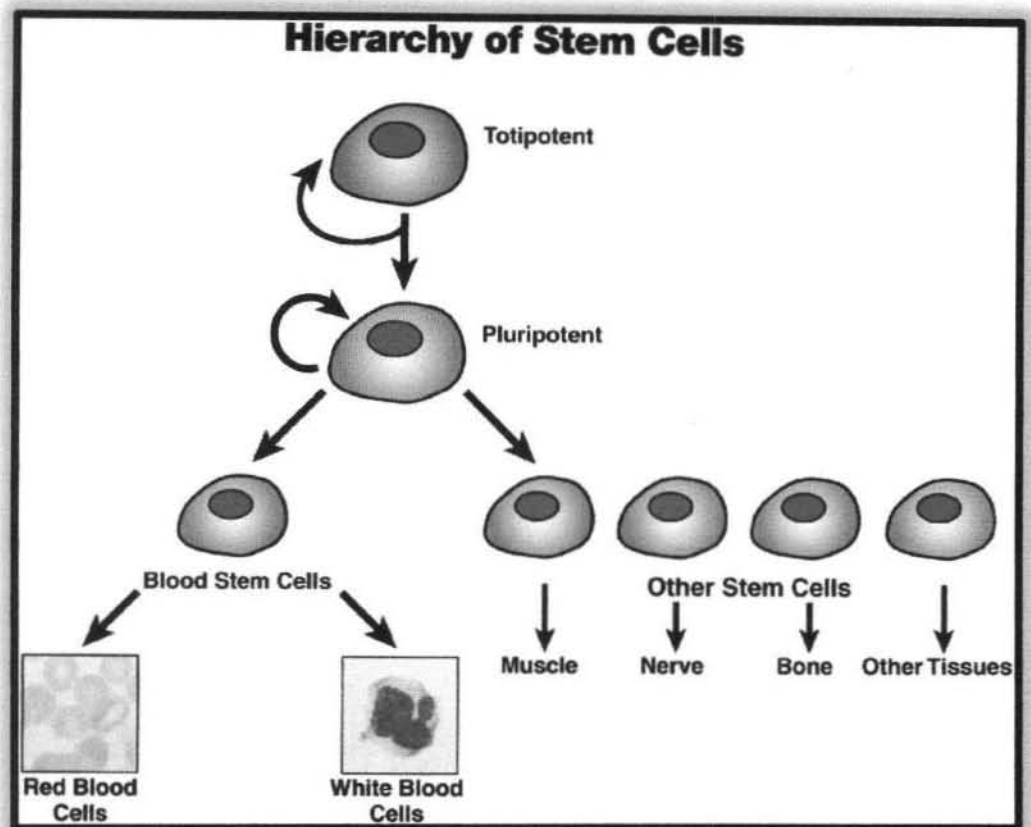


Gambar 2.5 Gambaran Mikroskopis Elektron *Attachment Stem Cell* pada *Tendongraft* (Cavanagh, 2006)

2.3. *Stem Cell*

Stem cell adalah sel yang mempunyai kapasitas untuk memperbaharui diri sendiri menjadi lebih banyak *stem cell*, dan kemampuan untuk berdeferensiasi menjadi jaringan dari berbagai turunan sesuai kondisi lingkungannya. Mereka mungkin *pluripotent* atau *multipotent* tergantung pada tipenya. Hanya embrio yang *totipotent*. *Stem cell* embrio adalah *pluripotent* karena mereka mampu berdeferensiasi menjadi beberapa tipe jaringan, sementara itu *stem cell* dewasa hanya berdeferensiasi terbatas pada jaringan dimana mereka berasal, seperti *hepatocyte* pada liver dan *stem cell hematopoietik* dalam darah. Namun dalam kondisi tertentu beberapa sel dapat berdeferensiasi menjadi *multilineage* sehingga menjadi *multipotent*. Hal ini terjadi pada *mesenchymal stem cell*, yang ditemukan dalam sumsum tulang, kulit, jaringan lemak dan beberapa jaringan lainnya. Sel-sel tersebut mampu berdeferensiasi menjadi tulang, tulang rawan, tendon, ligamen, lemak dan beberapa jaringan lainnya (Caplan, 2005; Lee, 2006).

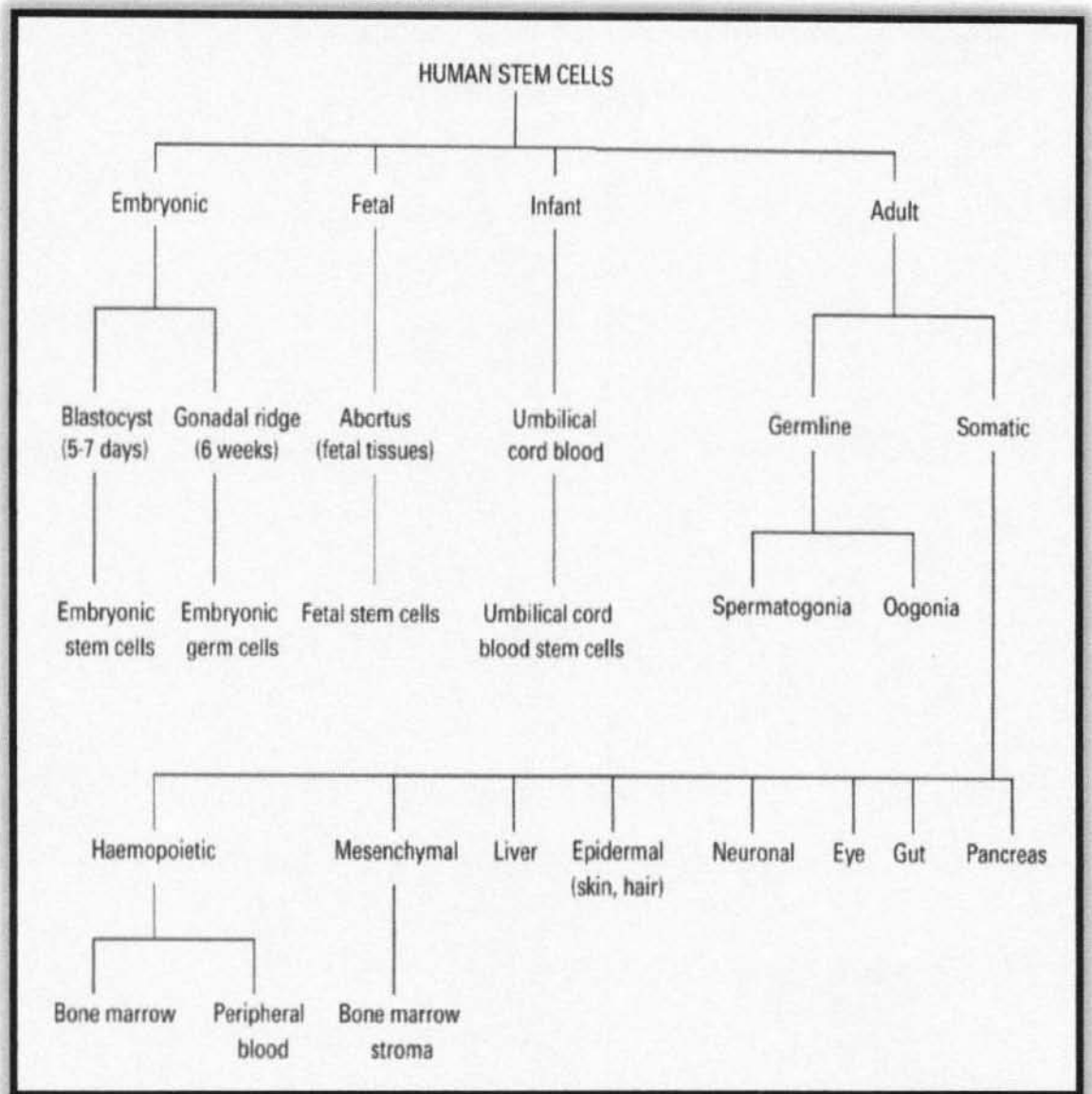
Stem cell dewasa secara hierarki lebih rendah dan lebih terbatas kemampuannya dalam berdeferensiasi menjadi beberapa jenis jaringan, namun mempunyai keunggulan tidak menimbulkan masalah etika maupun problem imunogenisitas. Terdapat 2 jenis *stem cell* dewasa yang mempunyai potensi klinis yaitu *haemopoietik stem cell* (HSC) dan *mesenchymal stem cell* (MSC) (Caplan, 2005).



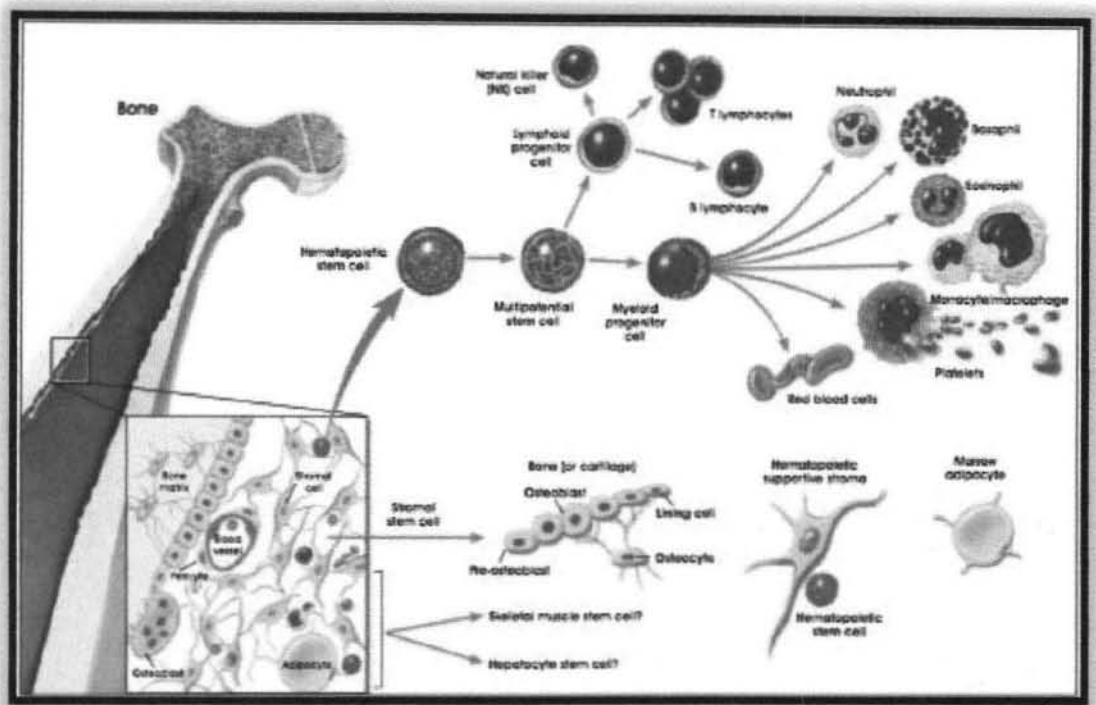
Gambar 2.6 Hirarki *Stem Cell* (Caplan, 2005)

HSC telah digunakan secara klinis untuk penanganan *leukemia*, *thalasemia* dan *multiple myeloma*. MSC adalah sel progenitor multipoten yang mampu berdeferensiasi menjadi beberapa tipe sel jaringan ikat seperti *osteocytes*, *chondrocytes*, *adipocytes*, *tenocyte* dan *myocytes*. MSC ditemukan secara *postnatal* dalam *stroma* sumsum tulang *non haemopoietik* meliputi suatu populasi heterogen dari sel retikular, sel lemak, sel osteogenik, sel otot polos, sel endothelial dan makrofag. MSC dapat juga diturunkan dari *periosteum*, lemak dan kulit. Mereka adalah sel-sel *multipotent* yang mampu

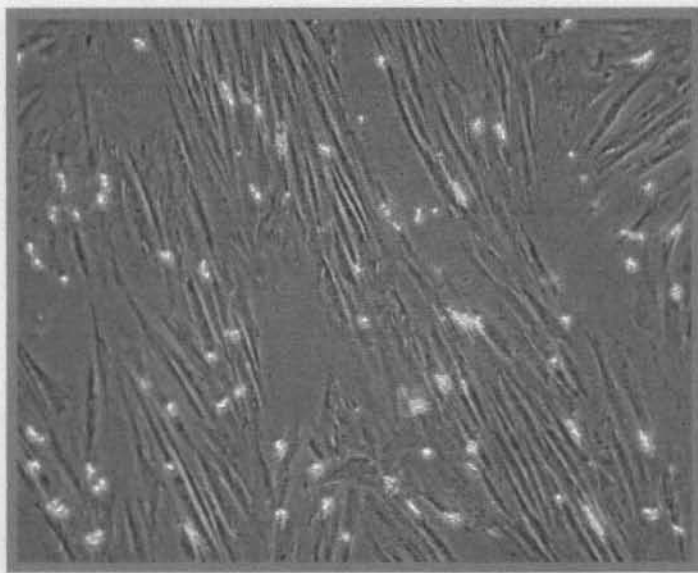
berdeferensiasi menjadi tulang, tulang rawan, otot, tendon, ligamen dan lemak (Caplan, 2005; Aliza, 2006; Natallia, 2005).



Gambar 2.7 Deferensiasi *stem cell* manusia. (Lee EH, 2006)

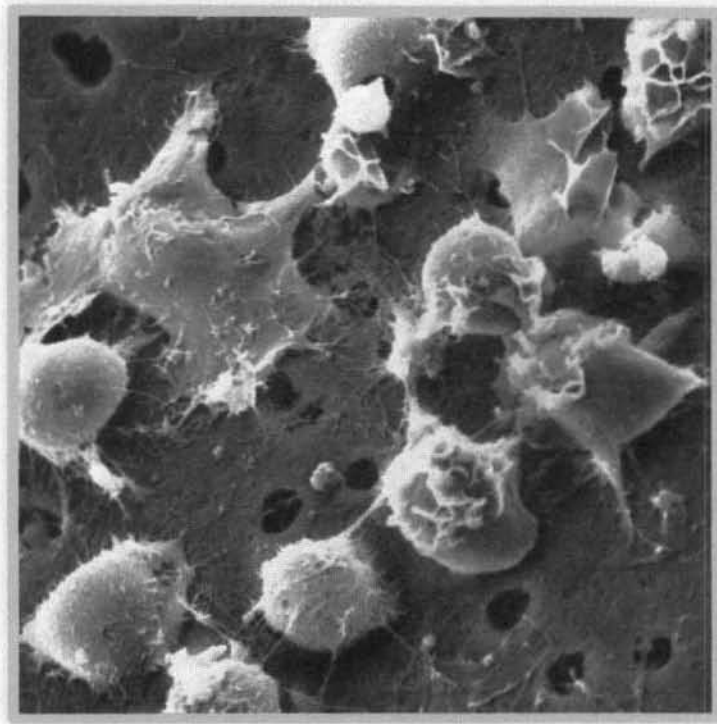


Gambar 2.8 Deferensiasi *Hematopoetic Stem Cell* dan *Mesenchymal Stem Cell* (Winslow, 2001)



Gambar 2.9 Gambaran Mikroskopis *Mesenchymal Stem Cell* (Nasef, 2005)

Stem cell dari sumsum tulang (*Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cell-BMSC*) dengan menggunakan cairan induksi yang cocok telah menunjukkan kemampuannya berdeferensiasi menjadi tulang, tulang rawan, otot dan jaringan lemak (Caplan, 2005; Pacini, 2007).



Gambar 2.10 Gambaran Mikroskop Elektron dari *Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cell* (Leonard, 2009)

Beberapa studi terdahulu telah menunjukkan aplikasi potensial dari *Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cell* (BMSC). Sebagai contoh matriks tulang tanpa mineral telah mampu menstimulasi deferensiasi tulang dan tulang rawan

dari BMSC yang ditempatkan pada jaringan ikat atau *stroma* dari beberapa organ, juga ditemukan bahwa BMSC yang diisolasi dari sumsum tulang mempunyai potensi untuk membentuk tulang dan tulang rawan saat diinkorporasikan kedalam kubus keramik berongga dan diimplantasikan ke jaringan subkutan *in vivo*. Konsep perekrutan BMSC untuk mempercepat reparasi dan regenerasi jaringan telah diuji cobakan *in vivo* di tulang rawan tulang dan akhir-akhir ini pada tendon Achilles. Studi tersebut telah mendemonstrasikan adanya peningkatan pada hasil reparasi. Sehingga BMSC sebagai terapi potensial bukan tidak mungkin dilakukan, walau masih tetap perlu riset ilmiah dasar lebih lanjut sebelum digunakan dalam praktek klinis (Caplan, 2005; Liu, 2006).

2.4. Tendon Allograft

Tendon *allograft* yang biasa digunakan ada 2 jenis yaitu *freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft*. *Fresh frozen tendon graft* adalah jaringan tendon steril dalam bentuk beku segar (*fresh frozen tendon*) yang disimpan pada *deep freezer* -80°C , dan memerlukan waktu minimal 3 bulan sebelum dimanfaatkan. Waktu penyimpanan minimal 3 bulan merupakan waktu yang paling efektif untuk dapat menurunkan imunogenisitas dan transmisi patogen. *Freeze dried tendon allograft* adalah jaringan tendon dalam bentuk kering (*freeze dried*) yang pembuatannya melalui proses pencucian sisa darah dan disterilkan dengan *ultrasonic pasteurization shaker* (suhu 60°C selama 1 jam) untuk membunuh mikroorganisme dalam bahan donor.

Selanjutnya dilakukan pencucian kembali dan *defatting*. Proses *freeze drying* (*lyophilisation*) untuk mencegah *autolisis* yang dikatalisir oleh enzim sel lisosom. Proses ini merupakan pengeringan jaringan dengan sublimasi sehingga kadar air optimal tersisa 5 - 7%. Setelah dipindahkan ke *laminair air flow*, *tendongraft* dibungkus 3 lapis plastik *polietilen*. Untuk mencegah transmisi penyakit, dilakukan sterilisasi dengan *gamma irradiasi* dengan dosis radiasi yang dipilih yang bisa menghancurkan bakteri, spora bakteri dan virus, sekaligus *epitop* yang ada pada protein di *scaffold* sehingga akan menurunkan imunogenitasnya tanpa menyebabkan kerusakan struktur jaringan tendon *allograft* tersebut (Ouyang 2006 ; Garvin 2003).

Kelemahan dari penggunaan *fresh frozen tendongraft* adalah masalah transmisi patogen dan imunogenisitasnya sedangkan pada *freeze dried tendongraft* setelah melalui proses sterilisasi, *defatting* dan *lyophilisation* dapat mengurangi transmisi patogen dan imunogenisitasnya, akan tetapi pembuatan *freeze dried tendongraft* memerlukan proses yang lebih rumit dan harga yang lebih mahal. Sifat biomekanis *fresh frozen tendongraft* tetap sama sedangkan sifat biomekanis *freeze dried tendongraft* sedikit berkurang. Baik *fresh frozen tendongraft* maupun *freeze dried tendongraft* sering digunakan pada operasi dibidang orthopaedi meskipun dalam pengalaman klinis sering didapatkan resorpsi dari jaringan tersebut sehingga fungsi sebagai pengganti jaringan tidak akan tercapai. Oleh karena itu diharapkan dengan dikembangkannya pendekatan rekayasa jaringan maka proses penggantian jaringan tersebut akan bisa mencapai hasil yang maksimal (Garvin 2003).

Serangkaian prosedur perlu dilakukan sebelum suatu *tendongraft* dapat dimanfaatkan. Pusat Biomaterial Bank Jaringan Dr. Soetomo Surabaya menggunakan kriteria *American Association of Tissue Bank (AATB)*. Prosedur tersebut adalah (Ferdiansyah, 2001) :

1. Seleksi donor

Meliputi pemeriksaan fisik, riwayat penyakit dan evaluasi laboratorium.

2. Pengambilan jaringan donor

Dikerjakan dalam kamar operasi steril atau kamar bedah mayat.

3. Karantina

Dilakukan dalam *freezer* sambil menunggu kesimpulan pemeriksaan, bila donor terkontaminasi maka harus dimusnahkan.

4. *Processing*

Jaringan steril dalam bentuk beku segar (*fresh frozen tendon*) yang disimpan pada *deep freezer* -80°C , dan memerlukan waktu minimal 3 bulan sebelum dimanfaatkan. Jaringan yang akan digunakan dalam bentuk kering (*freeze dried tendon*) pembuatannya melalui proses pencucian sisa darah dan disterilkan dengan *ultrasonic pasteurization shaker* (suhu 60°C selama 1 jam) untuk membunuh mikroorganisme dalam bahan donor. Selanjutnya dilakukan pencucian kembali dan *defatting*. Proses *freeze drying (lyophilisation)* untuk mencegah *autolisis* yang dikatalisir oleh enzim-enzim dari sel lisosom. Proses ini merupakan pengeringan jaringan dengan sublimasi sehingga kadar air optimal tersisa

5 - 7%. Setelah dipindahkan ke *laminair air flow*, graft dibungkus 3 lapis plastik *polietilen*.

5. Sterilisasi

Memanfaatkan radiasi sinar gamma pada *freeze dried tendongraft*.

6. Penyimpanan dan distribusi

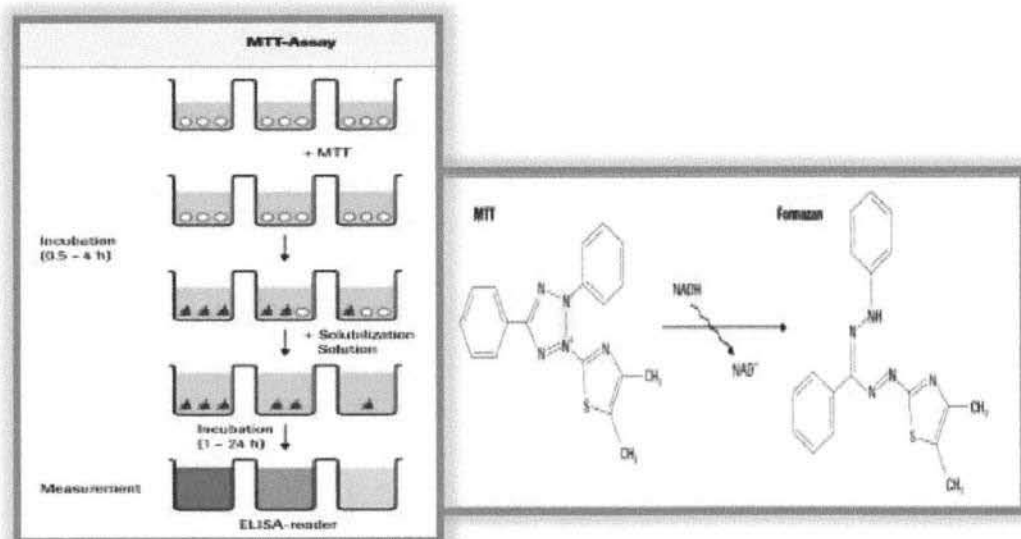
Freeze dried allograft dapat disimpan dalam suhu kamar, berukuran kecil, sifat biomekanik sedikit berkurang, mudah didistribusikan, sedang *fresh frozen* harus disimpan dalam suhu -80°C sehingga sulit didistribusikan, biasanya berukuran besar dan sifat biomekaniknya tetap.

2.5 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT Assay)

Pemeriksaan *MTT Assay* pertama kali diperkenalkan oleh Mosmann pada tahun 1983. *MTT assay* merupakan salah satu parameter yang digunakan sebagai dasar pemeriksaan kolorimetri aktifitas metabolik sel yang *viable*. Sebagai contoh, sebuah cawan penilaian mikrotiter yang menggunakan garam *tetrazolium MTT* [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] saat ini banyak digunakan untuk mengukur kuantitas proliferasi sel dan sitotoksisitas (ATCC, 2001; Fazwishni, 2000; Meizarani, 2005).

MTT yang berwarna kuning diubah menjadi *formazan* yang berwarna ungu oleh enzim *dehidrogenase* mitokondria yang berada dalam sel yang hidup. Pemeriksaan ini memanfaatkan kemampuan enzim *dehidrogenase* mitokondria yang melalui serangkaian reaksi mampu untuk memutuskan cincin *tetrazolium MTT* sehingga berubah menjadi *formazan*. Sel yang hidup mengandung banyak

enzim *dehidrogenase* dalam mitokondria. Aktivitas enzim *dehidrogenase* ini dapat diukur dengan *MTT Assay* karena MTT akhirnya akan direduksi oleh hidrogen (H^+ dan e^-) yang dilepas oleh enzim *dehidrogenase*. Apabila aktivitas enzim *dehidrogenase* berkurang maka warna ungu yang terbentuk akan berkurang juga. Kristal *formazan* yang terbentuk harus ditambahkan pelarut terlebih dulu agar kristal menjadi *soluble* sehingga dapat diukur menggunakan pemeriksaan kolorimetri sederhana. Saat ini pelarut yang sering digunakan adalah *dimethyl sulphoxide* (DMSO). Hasil dapat dibaca dengan menggunakan *scanning multiwell spectrophotometer* (*Elisa Reader*). (Fazwishni, 2000; Meizarini, 2005; Riss, 2003).

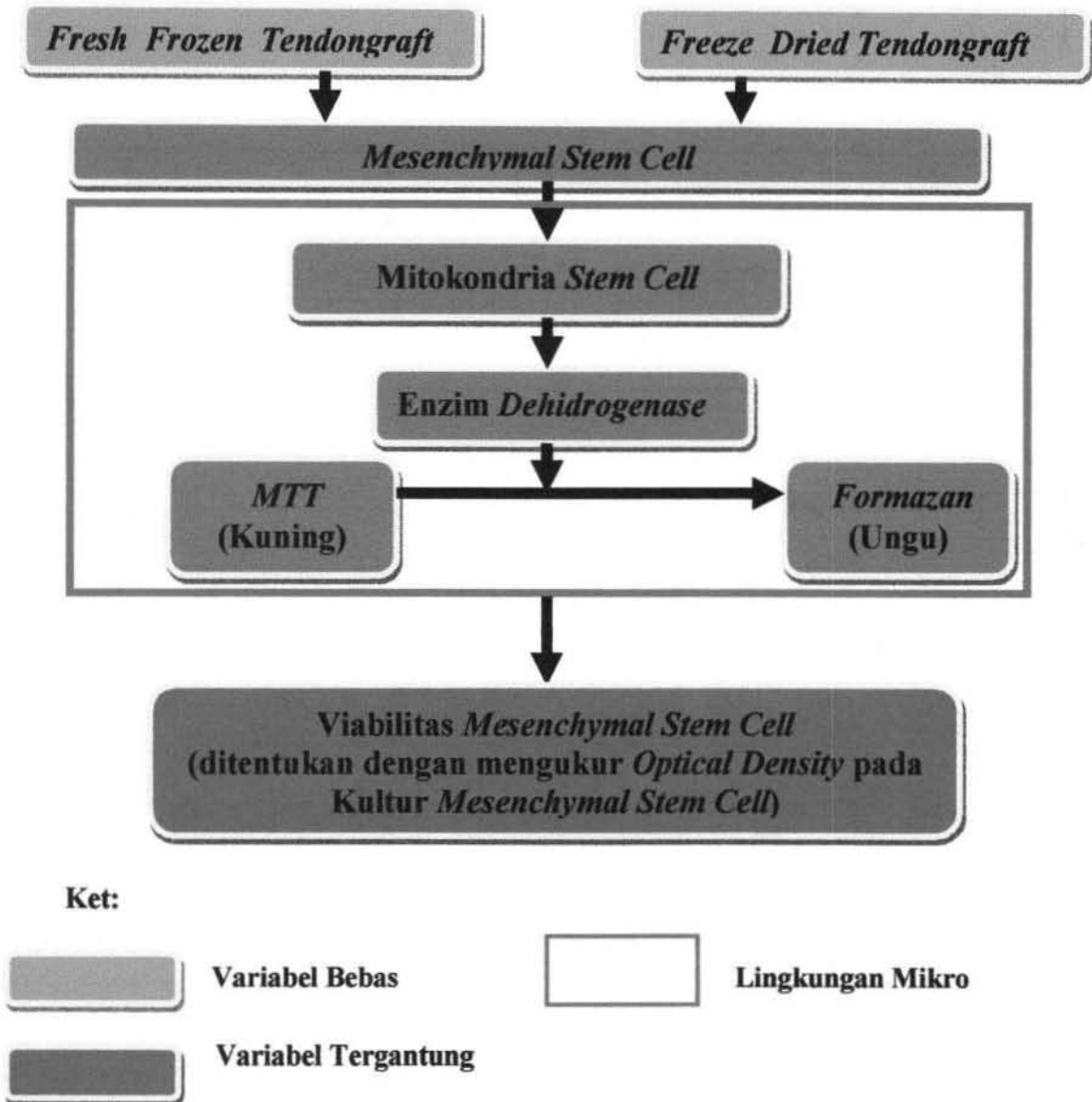


Gambar 2.11 Reaksi kimia enzim *dehidrogenase* mitokondria untuk memutuskan cincin *tetrazolium* MTT (Riss, 2003)

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Kerangka Konseptual

Pemberian *fresh frozen tendongraft* dan *freeze dried tendongraft* yang merupakan *non living tissue* pada kultur *mesenchymal stem cell* akan memberikan dua kemungkinan, apakah *mesenchymal stem cell* tersebut tetap *viable* ataukah menjadi *nonviable*. *Mesenchymal stem cell* mempunyai enzim *dehidrogenase* mitokondria yang akan mampu mengubah *MTT* yang berwarna kuning menjadi *formazan* yang berwarna ungu. Sel yang hidup mengandung banyak enzim *dehidrogenase* dalam mitokondria. Aktivitas enzim *dehidrogenase* ini dapat diukur dengan *MTT Assay* karena *MTT* akhirnya akan direduksi oleh hidrogen (H^+ dan e^-) yang dilepas oleh enzim *dehidrogenase*. Perubahan warna yang terjadi mengakibatkan terjadinya peningkatan *optical density* dari kultur *mesenchymal stem cell* yang dapat diukur dengan menggunakan *scanning multiwell spectrophotometer* (*Elisa Reader*). Apabila bersifat toksik, *tendongraft* akan menyebabkan kematian dari *mesenchymal stem cell* sehingga tidak ada enzim *dehidrogenase* mitokondria yang mampu mengubah *MTT* yang berwarna kuning menjadi *formazan* yang berwarna ungu.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Tidak didapatkan efek toksik pada kultur *mesenchymal stem cell* setelah pemberian *fresh frozen tendongraft* secara *in vitro*.
2. Tidak didapatkan efek toksik pada kultur *mesenchymal stem cell* setelah pemberian *freeze dried tendongraft* secara *in vitro*.

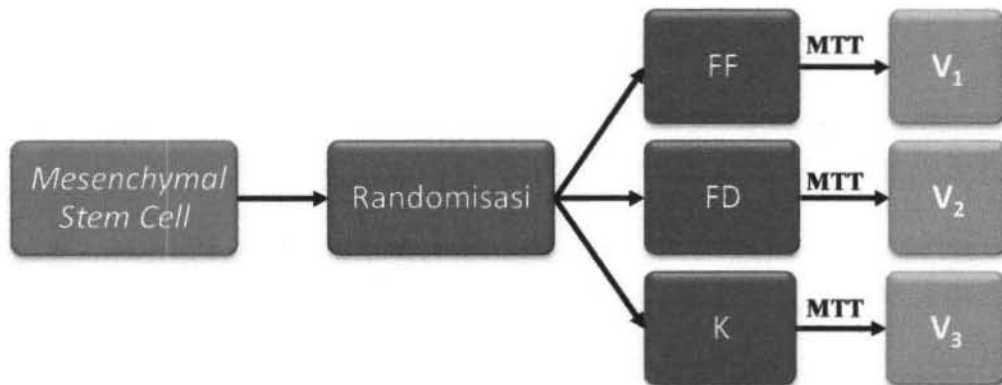
BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium eksperimental dengan rancangan penelitian *the post test only control group design* dan memenuhi kriteria sebagai penelitian experimental murni (*true experimental*) karena terdapat perlakuan, kelompok perlakuan dan kontrol, replikasi serta randomisasi. Pada penelitian ini kultur *mesenchymal stem cell* dibagi secara random menjadi 3 kelompok yaitu kelompok pertama dilakukan pemberian *fresh frozen tendongraft* kelompok kedua dilakukan pemberian *freeze dried tendongraft* dan kelompok ketiga hanya kultur *mesenchymal stem cell* saja yang berfungsi sebagai kontrol. Pada ketiga kelompok tersebut dilakukan uji viabilitas *mesenchymal stem cell* menggunakan *MTT Assay*. Hasil yang didapat dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan uji statistik mulai dari statistika deskriptif, uji normalitas, uji Anova dan *post hoc significancy test*.

Skema rancangan penelitian dapat digambarkan sebagai berikut



Keterangan

FF : *Fresh Frozen Tendongraft*

FD : *Freeze Dried Tendongraft*

K : *Kontrol*

V₁ : *Viabilitas Mesenchymal Stem Cell Fresh Frozen Tendongraft*

V₂ : *Viabilitas Mesenchymal Stem Cell Freeze Dried Tendongraft*

V₃ : *Viabilitas Mesenchymal Stem Cell Kontrol*

Gb.4.1 Skema Rancangan Penelitian

4.2. Unit Penelitian , Replikasi, dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1. Unit penelitian adalah kultur *mesenchymal stem cell* yang didapat dari bank *stem cell Institute of Tropical Disease (ITD)*, dipilih secara random untuk masing – masing kelompok.

4.2.2. Replikasi tiap kelompok

Perhitungan besar replikasi yang dikutip dari buku Zainuddin (2000)

$$(k-1)(r-1) \geq 20$$

$$(3-1)(r-1) \geq 20$$

$$2(r-1) \geq 20$$

$$(r-1) \geq 10$$

$$r \geq 11$$

k: jumlah macam perlakuan

r: jumlah replikasi tiap kelompok

dari perhitungan di atas didapatkan replikasi unit penelitian minimal adalah 11. Pada penelitian ini menggunakan replikasi unit penelitian sebanyak 15 untuk masing – masing kelompok.

4.3. Variabel Penelitian dan Definisi Operasional Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel penelitian

1. Variabel bebas

Penanaman *fresh frozen tendongraft* dan *freeze dried tendongraft* pada kultur *mesenchymal stem cell*.

2. Variabel tergantung

Viabilitas *mesenchymal stem cell* yang diukur secara kuantitatif dengan *MTT Assay*.

3. Variabel Kendali

Kultur *mesenchymal stem cell* disimpan dan dirawat pada kondisi yang sama.

4.3.2. Definisi operasional variabel penelitian

1. *Fresh Frozen Tendongraft* adalah jaringan tendon manusia dalam bentuk beku segar (*fresh frozen*) yang dipotong-potong dengan ukuran yang sama (3x3x3mm)
2. *Freeze Dried Tendongraft* adalah jaringan tendon manusia yang akan digunakan dalam bentuk kering (*freeze dried*) yang dipotong-potong dengan ukuran yang sama (3x3x3mm).
3. Kultur *mesenchymal stem cell* adalah proliferasi dari kultur *stem cell* yang berasal dari bank *stem cell* di *Institute of Tropical Disease* (ITD) dengan jumlah sel per *well* adalah 2×10^5 .
4. Viabilitas *mesenchymal stem cell* adalah jumlah *mesenchymal stem cell* yang masih *viable* setelah pemberian *fresh frozen tendongraft* dan *freeze dried tendongraft*. Viabilitas pada kultur *mesenchymal stem cell* diukur secara kuantitatif dengan *MTT Assay*.

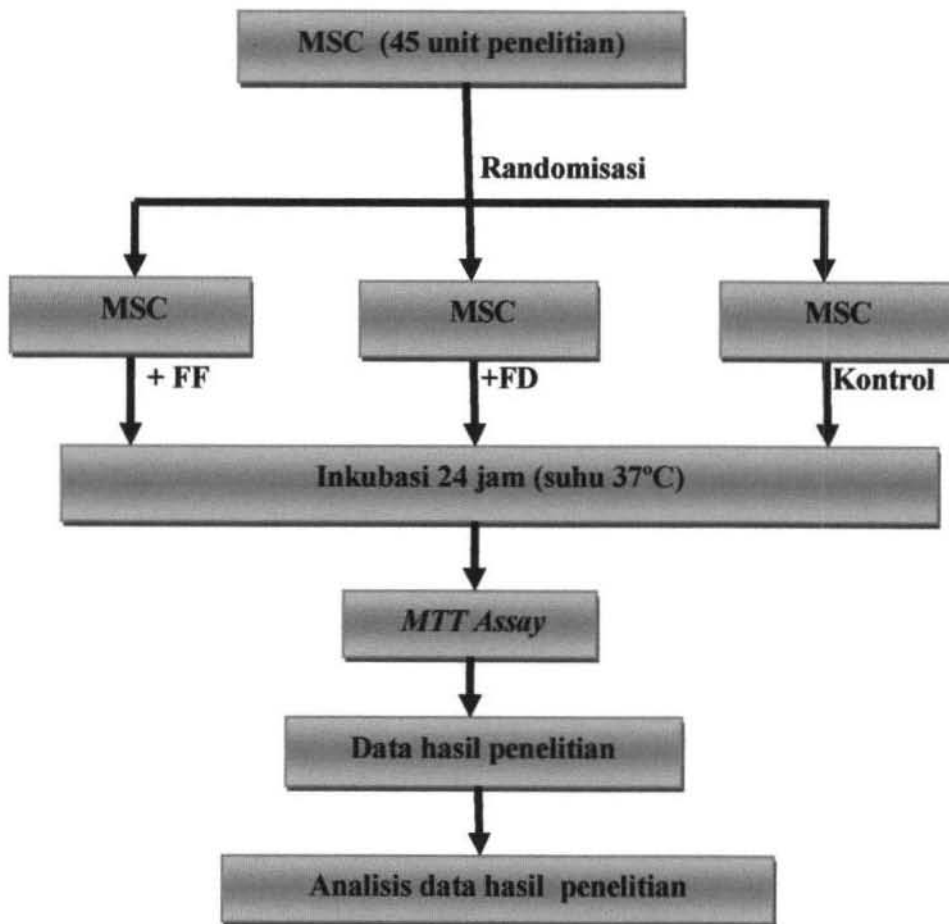
4.4 Bahan Penelitian

Mesenchymal stem cell yang merupakan proliferasi dari kultur *stem cell* yang berasal dari bank *stem cell Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga (ITD) dan bahan produk dari bank jaringan RSU Dr Soetomo Surabaya (*freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft*).

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga pada bulan Maret sampai dengan April 2009.

4.6 Kerangka Operasional Penelitian



Ket:

FF: *fresh frozen tendongraft*

FD: *freeze dried tendongraft*

MSC: *mesenchymal stem cell*

Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian

Penelitian ini dimulai dengan menggunakan bahan kultur *mesenchymal stem cell* yang terdapat pada ITD . Kultur *mesenchymal stem cell* tersebut dibagi secara random menjadi 3 kelompok , kelompok I ditambahkan *fresh frozen tendongraft* , kelompok II ditambahkan *freeze dried tendongraft* dan kelompok III merupakan kontrol. Tiap kelompok diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C kemudian dilakukan uji viabilitas *mesenchymal stem cell* menggunakan *MTT Assay*. Pemeriksaan ini memanfaatkan kemampuan enzim *dehidrogenase* mitokondria yang akhirnya dapat terjadi pemutusan cincin *tetrazolium MTT* sehingga akan mengubah *MTT* yang berwarna kuning menjadi *formazan* yang berwarna ungu . Warna yang terjadi pada kultur *mesenchymal stem cell* , diukur *optical density*nya menggunakan *scanning multiwell spectrophotometer (Elisa Reader)* pada panjang gelombang 630 nm. Semakin tinggi *optical density* yang terjadi menunjukkan semakin banyak *mesenchymal stem cell* yang *viable*. Data hasil penelitian kemudian dianalisis menggunakan uji statistika.

4.4 Cara Analisis Data

Data hasil penelitian akan dianalisis menggunakan statistika deskriptif. Kemudian dilakukan uji normalitas dan bila data hasil pengukuran mempunyai distribusi yang normal akan dilakukan uji Anova dan *post hoc signficancy test*.

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Hasil Penelitian

Hasil pengukuran *optical density* kultur *mesenchymal stem cell* menggunakan pembaca elisa (*elisa reader*) spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm untuk masing-masing kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran *Optical Density* Kultur *Mesenchymal Stem Cell*

NO	FF	FD	KONTROL
1	1,7960	1,8030	1,8072
2	1,8040	1,8102	1,8128
3	1,8200	1,8210	1,8224
4	1,8412	1,8300	1,8240
5	1,8290	1,8200	1,8250
6	1,8300	1,8288	1,8790
7	1,8300	1,8316	1,8802
8	1,8380	1,8412	1,8850
9	1,8440	1,8440	1,8810
10	1,8235	1,8268	1,8792
11	1,8273	1,8149	1,8248
12	1,8296	1,8456	1,8200
13	1,8231	1,8359	1,8113
14	1,8338	1,8239	1,8080
15	1,8125	1,8148	1,8240
MEAN	1,8261	1,8263	1,8475

Ket: FF: *Fresh Frozen Tendongraft*

FD: *Frezee Dried Tendongraf*

5.2 Analisis Hasil Penelitian

Penghitungan persentase jumlah sel yang hidup menggunakan rumus :

$$\% \text{ sel hidup} = \frac{\text{perlakuan}}{\text{kontrol}} \times 100\%$$

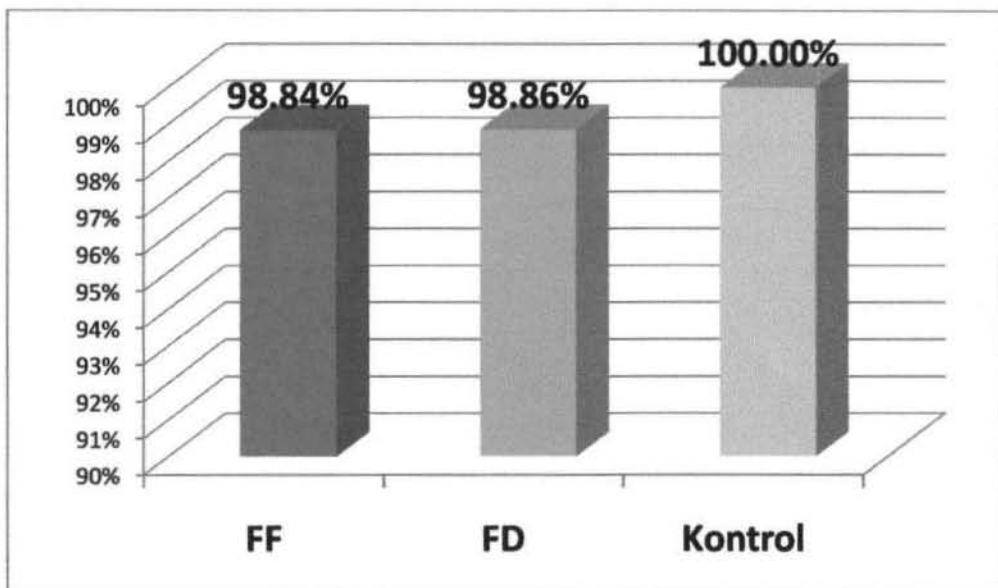
keterangan :

- % sel hidup : persentase jumlah sel yang hidup setelah pemberian material
- perlakuan : nilai densitas optik *formazan* pada setiap sampel setelah pemberian material
- kontrol : nilai densitas optik *formazan* pada kontrol sel

Tabel 5.2 Persentase Viabilitas *Mesenchymal Stem Cell*

NO	FF	FD
1	97,22	97,68
2	97,69	97,99
3	98,51	98,58
4	99,38	99,06
5	98,99	98,57
6	99,06	98,99
7	99,06	99,35
8	99,52	99,58
9	99,82	99,65
10	98,86	98,84
11	98,91	98,53
12	99,34	99,78
13	98,69	99,38
14	99,27	98,74
15	98,12	98,24
MEAN	98,84	98,86

Dari perhitungan diatas didapatkan bahwa viabilitas *mesenchymal stem cell* didalam *fresh frozen tendongraft* adalah 98,84% sedangkan viabilitas *mesenchymal stem cell* didalam *frezee dried tendongraft* adalah 98,86%. Dapat dilihat bahwa viabilitas *mesenchymal stem cell* didalam *frezee dried tendon graft* sedikit lebih baik dibandingkan viabilitas *mesenchymal stem cell* didalam *fresh frozen tendon graft*. (Grafik 5.1)



Grafik 5.1 Grafik Persentase Viabilitas *Mesenchymal Stem Cell*

Data hasil penelitian dianalisis dengan statistika deskriptif, kemudian dilakukan uji normalitas dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov test* untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis ini berdistribusi normal atau tidak, karena pengujian dengan menggunakan statistika parametrik mensyaratkan data yang digunakan harus berdistribusi normal. Dari uji *Kolmogorov Smirnov*

didapatkan nilai signifikansi lebih dari 0,05, dengan demikian data tersebut diatas berdistribusi normal.

Setelah diketahui bahwa data berdistribusi normal, dilakukan uji parametrik *one way anova*. Dari uji *one way anova* diketahui nilai signifikansi 0,101. Dengan nilai signifikansi lebih dari 0,05 dapat disimpulkan minimal dua variabel didalam penelitian ini tidak didapatkan perbedaan bermakna. Untuk mengetahui secara detail variabel mana yang berbeda dan variabel mana yang tidak berbeda perlu dilakukan *post hoc significancy test*. Dari *post hoc significancy test* yang telah dilakukan didapatkan nilai signifikansi antara kontrol dengan *fresh frozen tendongraft* mempunyai nilai signifikansi 0,062 sedangkan antara kontrol dengan *frezee dried tendongraft* mempunyai nilai signifikansi 0,064.

Dengan hasil diatas, nilai signifikansi kedua perlakuan yang dibandingkan dengan kontrol tersebut, semua mempunyai nilai lebih dari 0,05 maka dapat disimpulkan tidak ada perbedaan bermakna antara kontrol dan kedua perlakuan diatas.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris menggunakan rancangan penelitian *Post Test-Only Control Group Design* pada kultur *mesenchymal stem cell*. Material *freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft* ditanamkan pada kultur *mesenchymal stem cell* dan kemudian setelah 24 jam dievaluasi persentase jumlah sel yang *viabel* dalam kultur menggunakan *MTT assay*.

MTT Assay adalah metode untuk mengetahui viabilitas suatu sel dengan dasar pemeriksaan kolorimetri aktifitas metabolik sel yang *viable*. Data hasil penelitian eksperimental mengenai efek sitotoksik *freeze dried tendon graft* dan *fresh frozen tendon graft* pada kultur *stem cell* didapatkan dengan cara kuantitatif yaitu dengan melihat persentase jumlah *mesenchymal stem cell* yang *viabel* dalam kultur yang didapat dari hasil pengukuran *optical density* pada kultur *mesenchymal stem cell* pada masing-masing kelompok. Pemeriksaan kuantitatif dengan menggunakan *MTT assay* berdasarkan pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning menjadi *formazan* garam tetrazolium yang berwarna ungu. Produksi *formazan* dapat dihitung dengan mengukur *optical density* larutan yang dihasilkan. Reaksi warna keunguan digunakan sebagai ukuran jumlah sel hidup. Semakin pekat warna keunguannya semakin tinggi nilai absorpsinya menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang *viabel*. (Fazwishni, 2000; Meizarini, 2005; Riss, 2003)

Penggunaan *MTT Assay* sebagai metode untuk melihat viabilitas *mesenchymal stem cell* telah banyak diaplikasikan. Ahmadian (2009) menggunakan *MTT Assay* untuk melihat viabilitas dari *mesenchymal stem cell* setelah pemberian *nanogenomedicine*, demikian juga penelitian dari Heng (2009) yang menggunakan *MTT Assay* untuk melihat viabilitas *mesenchymal stem cell* setelah pemberian *enzym free dissociation buffer*.

Untuk menentukan toksik tidaknya pemberian *tendonraft* terhadap *mesenchymal stem cell* ditentukan dengan membandingkan viabilitasnya terhadap kontrol yang dianggap viabilitasnya 100 %. Hasil yang didapat kemudian dianalisis dengan uji statistika. (Shetty 1996, Vannet 2007) Pada penelitian ini didapat hasil viabilitas *mesenchymal stem cell* didalam *fresh frozen tendonraft* adalah 98,84% sedangkan viabilitas *mesenchymal stem cell* didalam *freeze dried tendonraft* adalah 98,86%. Uji Anova dan *post hoc significancy test* menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol sehingga bisa ditarik kesimpulan bahwa tidak didapatkan efek toksik dari *fresh frozen tendonraft* dan *freeze dried tendonraft* terhadap *mesenchymal stem cell* .

Kesimpulan yang didapat pada penelitian ini sesuai dengan penelitian dari Ouyang (2006) yang mengatakan bahwa *mesenchymal stem cell* dapat tumbuh baik pada *bone graft* maupun *tendon graft*. Kryger (2009) juga menyatakan bahwa *mesenchymal stem cell* masih tetap *viabel* pada *tendonraft* pada penelitian yang membandingkan *tenocyte* dan *mesenchymal stem cell* pada *flexor tendon tissue engineering*. Penelitian dari Chong (2007) tentang

efek pemberian *mesenchymal stem cell* pada proses penyembuhan tendon achilles kelinci, menunjukkan bahwa *mesenchymal stem cell* masih tetap viabel setelah ditanamkan pada *fibrin carrier*.

Penelitian yang kami lakukan ini sifatnya adalah penelitian *invitro*, sehingga masih perlu pembuktian tidak adanya toksisitas dari *fresh frozen tendongraft* dan *freeze dried tendongraft* terhadap *mesenchymal stem cell* bila diuji *invivo* pada hewan coba sebelum dapat kita lakukan penelitian pada manusia untuk dapat memberikan solusi terhadap penanganan defek tendon pada manusia.

BAB 7

PENUTUP

7.1. Kesimpulan :

Dari hasil penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa secara *in vitro*:

1. *Fresh frozen tendon graft* terbukti tidak toksik terhadap *mesenchymal stem cell*.
2. *Freeze dried tendongraft* terbukti tidak toksik terhadap *mesenchymal stem cell*.

7.2. Saran :

Perlu dilakukan penelitian *in vivo* (pada hewan coba) sebelum dapat kita lakukan penelitian pada manusia untuk dapat memberikan solusi terhadap penanganan defek tendon pada manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmadian S, Barar J, Amir S, Omid Y.2009. Cellular Toxicity of Nanogenomedicine in MCF-7 Cell Line: MTT assay. *Journal of Visualized Experiments* 1191, doi: 10.3791/1191.
- Aliza M, 2006. Tissue Engineering of Flexor Tendons: Optimization of Tenocyte Proliferation Using Growth Factor Supplementation. *Tissue Engineering* © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 12, Number 7.
- ATCC, 2001. MTT Cell Proliferation Assay-Instructions. Catalog, American Type Culture Collection, Manassas, VA 20108
- Baar K, 2008. New dimensions in tissue engineering: possible model for human physiology. *Exp Physiol* 90.6 pp 799–806.
- Beredjikian PK, 2003. Biologic Aspects of Flexor Tendon Laceration and Repair. *J Bone Joint Surg Am.* 85:539-550.
- Calve SBS, 2004. Engineering of Functional Tendon. *Tissue Engineering* © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 10, Number 5/6.
- Cao D , 2006. In Vitro Tendon Engineering with Avian Tenocytes and Polyglycolic Acids: A Preliminary Report. *Tissue Engineering* © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 12, Number 5.
- Caplan AI, 2005. Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics. *Tissue Engineering* © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 11, Number 7/8.
- Cavanagh A, 2006. Stem cell in Medicine-Too Fast too soon?. www.wellcome.ac.uk (9/14/2009)
- Cho J, Goh H, 2003. Tissue-Engineering Approach to the Repair and Regeneration of Tendons and Ligaments. *Tissue Engineering* © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 9, Suppl. 1.
- Chong A, Hui J, Aymeric L, LeeEH, Lim BH. 2007. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Influence Early Tendon-Healing in a Rabbit Achilles Tendon Model. *J Bone Joint Surg Am.* 89:74-81.
- Fazwishni S, Hadijono BS, 2000. Uji Sitotoksisitas dengan Esei MTT. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*;7 (edisi Khusus)

- Garvin J, 2003 . Novel System for Engineering Bioartificial Tendons and Application of Mechanical Load. *Tissue Engineering* © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 9, Number 5.
- Gelberman RH , Chu CR, Williams CS, Seiler JG, Amiel DL, 1992. Angiogenesis in healing autogenous flexor-tendon grafts. *J Bone Joint Surg Am.* 74:1207-1216. hal 28 – 32.
- Hania A, 1999. Autologous Mesenchymal Stem Cell-Mediated Repair of Tendon. *Mary Ann Liebert, Inc* Volume 5, Number 3.
- Heng BC, Cowan CM, Basu S. 2009. Comparison of Enzymatic and Non-Enzymatic Means of Dissociating Adherent Monolayers of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biological Procedure* pages 161-169.
- Kryger G, Chong A, Costa M, Pham H, Bates S, Chang J. 2009. A Comparison of Tenocytes and Mesenchymal Stem Cells for Use in Flexor Tendon Tissue Engineering. *The Journal of Hand Surgery*, Volume 32, Issue 5, Pages 597-605.
- Lee EH, 2006. The potential of stem cells in orthopadic surgery. *J Bone Joint Surg*, 88-B; 841-51.
- Leonard A, 2005. Epigenetics and The Future of Stem Cell. www.alpimicro.com (9/14/2009)
- Meizarini A, 2005. Sitotoksisitas Bahan Restorasi Cyanoacrylate pada Variasi Perbandingan Powder dan Liquid Menggunakan MTT assay. *Majalah Kedokteran Gigi (Dental Journal)*. Vol. 38 No 1 hal 20-24.
- Mosmann T, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, Volume 65, Pages 55-63.
- Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG, 2004. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 86:1541-1558.
- Nasef A, Lopez M, 2005. Human Bone Marrow – Derived Stem Cell. *Libyan J Med AOP*.
- Natallia J, 2005. Effects of Cell-to-Collagen Ratio in Mesenchymal Stem Cell-Seeded Implants on Tendon Repair Biomechanics and

Histology. Tissue Engineering © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 11, Number ¾.

- Ouyang HW, Cao T, Zou X, Heng BC, Wang L, Song X, Huang HF. 2006. Mesenchymal Stem Cell Sheets Revitalize Nonviable Dense Grafts: Implications for Repair of Large-Bone and Tendon Defects. Wolter Kluwert@ Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Volume 82 - Issue 2 - pp 170-174.
- Pacini S, 2007. Suspension of Bone Marrow-Derived Undifferentiate Mesenchymal Stromal Cells for Repair of Superficial Digital Flexor Tendon in Race Horses. Tissue Engineering© Mary Ann Liebert, Inc. Volume 13, Number 12.
- Riss T, 2003. Choosing The Right Cell-Based Assay For Your Research. Cell Notes Issue 6 .
- Sahoo S, 2006 . Characterization of a Novel Polymeric Scaffold for Potential Application in Tendon/Ligament Tissue Engineering. Tissue Engineering © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 12, Number 1.
- Shetty SS, Kaushik S, Chaukar AP, 1996. Viability testing of homograft valves using methyl thiazol tetrazolium assay. JPGM. Volume 42 Page 72-75.
- Vannett BV, Hanssens JL, Wehrbein H, 2007. The use of three-dimensional oral mucosa cell cultures to assess the toxicity of soldered and welded wires. The European Journal of Orthodontics 29(1):60-66
- Wei L, 2006. Repair of Tendon Defect with Dermal Fibroblast Engineered Tendon in a Porcine Model. Tissue Engineering © Mary Ann Liebert, Inc. Volume 12, Number 4.
- Winslow T, Kibiuk L, 2001. Stem Cell Information. The National Institutes of Health Resources for Stem Cell Research . [www. stem cell.nih.gov](http://www.stemcell.nih.gov) (9/14/2009)
- Zainudin M, 2000. Metodologi Penelitian Surabaya. Universitas Airlangga. Hal 38-57

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Uji Statistika

Frequencies

		Statistics		
		FRESH_FROZEN	FRESH_DRY	KONTROL
N	Valid	15	15	15
	Missing	30	30	30
Mean		1.8261	1.8263	1.8475
Median		1.8290	1.8200	1.8250
Mode		1.83	1.82	1.82 ^a
Std. Deviation		.02092	.01974	.03354
Variance		.000	.000	.001
Percentiles	10	1.7980	1.8030	1.8072
	20	1.8040	1.8102	1.8128
	30	1.8200	1.8110	1.8224
	40	1.8212	1.8200	1.8240
	50	1.8290	1.8200	1.8250
	60	1.8300	1.8298	1.8790
	70	1.8300	1.8316	1.8802
	80	1.8380	1.8412	1.8818
	90	1.8640	1.8640	1.8850

a. Multiple modes exist. The smallest value is shown

1. Hasil Analisa Statistika Deskriptif

Explore

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
FRESH_FROZEN	.176	15	.200*	.967	15	.804
FRESH_DRY	.132	15	.200*	.957	15	.638
KONTROL	.185	15	.179	.884	15	.054

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

2. Hasil Uji Normalitas

Oneway**ANOVA**

JUMLAH_CELL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	2	.002	2.426	.101
Within Groups	.027	42	.001		
Total	.030	44			

3. Hasil Uji One Way Anova**Post Hoc Tests****Multiple Comparisons**

Dependent Variable: JUMLAH_CELL

LSD

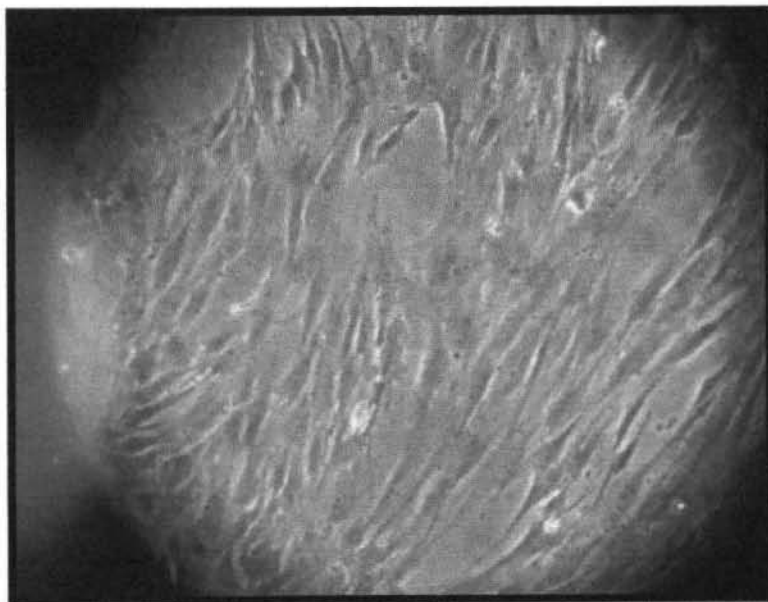
(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
FRESH FROZEN	FRESH DRY	-.00013	.00919	.988	-.0187	.0184
	KONTROL	-.01760	.00919	.062	-.0361	.0009
FRESH DRY	FRESH FROZEN	.00013	.00919	.988	-.0184	.0187
	KONTROL	-.01747	.00919	.064	-.0360	.0011
KONTROL	FRESH FROZEN	.01760	.00919	.062	-.0009	.0361
	FRESH DRY	.01747	.00919	.064	-.0011	.0360

4. Hasil Post Hoc Significance Test

Lampiran 2. Prosedur Penelitian



1. Pemeriksaan *Mesenchymal Stem Cell* Dengan Mikroskop



2. Gambar Mikroskopis *Mesenchymal Stem Cell* (Pembesaran 200x)



3. Penanaman Kultur *Mesenchymal Stem Cell* Pada *Well Plate*



4a. *Elisa Reader*



b. Hasil Pembacaan dengan *Elisa Reader*

Lampiran 3. MTT Assay (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*)

Prinsip: *MTT* yang berwarna kuning diubah menjadi *formazan* yang berwarna ungu akibat aktivitas enzim *dehidrogenase* mitokondria yang berada dalam sel yang hidup. Hasil dapat dibaca dengan menggunakan *scanning multiwell spectrophotometer* (*Elisa Reader*).

Cara kerja:

1. *Mesenchymal stem cell* yang sudah monolayer, buang mediumnya.
2. Cuci dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sekali, buang PBSnya.
3. Tambahkan tripsin EDTA 1 ml, goyang sampai rata lalu masukkan ke dalam inkubator CO₂, 37 ° C selama 5 menit.
4. Keluarkan petri, tambahkan medium CCM (*Cell Culture Medium*) 20% sebanyak 5 ml lalu resuspensi.
5. Masukkan resuspensi sel tadi ke dalam *plate 96 well* sebanyak 50 µl/*well* dengan kisaran jumlah sel per *well* adalah 2×10^5
6. Tambahkan CCM 20% sebanyak 100µl/*well*.
7. Inkubasi lagi kedalam inkubator CO₂, 37 ° C selama 24 jam.
8. Setelah selesai masa inkubasi keluarkan *plate*, lalu masukkan *tendongraft* kedalam *well*.



9. Inkubasi lagi kedalam inkubator CO₂, 37 ° C selama 19 jam.
10. Buat larutan MTT 5 mg/ml dalam PBS, lalu masukkan kedalam *plate* sebanyak 25 µl/*well*.
11. Inkubasi lagi ke dalam inkubator CO₂, 37 ° C selama 5 jam.
12. Ambil medium dari dalam *well* dan tempatkan pada *plate* lain, lalu tambahkan DMSO (*Dimethyl Sulphoxide*) 200 µl/*well*, resuspensi.
13. Inkubasi lagi kedalam inkubator CO₂, 37 ° C selama 5 menit.
14. Buang sampel dari dalam *well*, baca di *elisa reader* dengan panjang gelombang 630 nm.