



STEM CELL

MESENCHYMAL, HEMATOPOETIK,
DAN MODEL APLIKASI

Edisi Kedua

Oleh:

Fedik A. Rantam
Ferdiansyah
Purwati





© 2014 Airlangga University Press
AUP 600/31.538/08.14 (0.520)

Dilarang mengutip dan atau memperbanyak tanpa izin tertulis dari
Penerbit sebagian atau seluruhnya
dalam bentuk apapun, baik cetak, fotoprint, mikrofilm dan sebagainya.

Edisi kedua
Cetakan pertama — 2014

Penerbit:

Airlangga University Press (AUP)
Kampus C UNAIR, Mulyorejo Surabaya 60115
Telp. (031) 5992246, 5992247 Fax. (031) 5992248
E-mail: aup.unair@gmail.com

Dicetak oleh:

Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair
(PNB 037/10.14-B5E)

Perpustakaan Nasional: Katalog Dalam Terbitan (KDT)

Stem Cell : *Mesenchymal*, hematopoetik, dan model
aplikasi edisi kedua / Ed. Fedik Abdul Rantam ... [et
al.]. -- Surabaya: Airlangga University Press (AUP),
2014.

xxviii, 280 hlm.; 15,8 x 23 cm.
Termasuk bibliografi

ISBN 978-602-7924-69-7

1. Stem Cell.

I. Judul.

616.02774

14 15 16 17 18 / 9 8 7 6 5 4 3 2 1

ANGGOTA KAPRI 001 / 11 / 05

KONTRIBUTOR PENULIS BUKU

Prof. Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh.

Lab. Virologi dan Imunologi, Dep. Mikrobiologi, FKH., Lab. *Stem Cell, Institute of Tropical Disease (ITD)*., *Regenerative Medicine & Stem Cell Center* RSUD.
Dr. Soetomo/FK Universitas Airlangga Surabaya.

Dr. Ferdiansyah, dr., SpOT(K)

Dep. Ortopedi, RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Regenerative Medicine Stem Cell Center*, Bank Jaringan, RSUD. Dr. Soetomo/FK – Universitas Airlangga Surabaya

Dr. Purwati, dr., SpPD, FINASM

Devisi Tropik Infeksi, Dep. Penyakit Dalam, RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Regenerative Medicine Stem Cell Center* RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Stem Cell, Institute of Tropical Disease (ITD)* – Universitas Airlangga Surabaya

Prof. Dr. Med. Puruhito, dr., SpJTKV(K)

Dep. Bedah Jantung Thorak dan Kardiovaskular, RSUD. Dr. Soetomo/FK
Universitas Airlangga

Dr. Heri Suroto, dr., SpOT(K)

Dep. Ortopedi, RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Regenerative Medicine Stem Cell Center*, Bank Jaringan, RSUD. Dr. Soetomo/FK – Universitas Airlangga Surabaya

Dr. Dwikora Novembri Utomo, dr., SpOT(K)

Dep. Ortopedi, RSUD. Dr. Soetomo/FK, *Regenerative Medicine Stem Cell Center*, Bank Jaringan, RSUD. Dr. Soetomo/FK – Universitas Airlangga Surabaya

Dr. Hendy Hendaro, dr., SpOG(K)

Dep. Obstetrik dan Genikologi, RSUD. Dr. Soetomo/FK Universitas Airlangga

Kontributor Penulis Buku	v
Prakata	vii
Daftar Gambar	xvii
Daftar Tabel	xxvii
Bab 1	
EKSPLORASI STEM CELL DAN PERTUMBUHAN SEL SECARA UMUM	1
Eksplorasi <i>Stem Cell</i>	1
Pertumbuhan Sel	3
Kultur Sel	4
Jumlah Sel (<i>Cell Quantification</i>)	4
Viabilitas Sel	5
Pengukuran Tidak Langsung (<i>Indirect Measurements</i>) Masa Produk Sel	6
Kinetik Pertumbuhan Sel	6
1. Medium dan Nutrien	8
2. pH	9
Lingkungan Mikro Kultur Sel	10
Pentingnya Serum dalam Kultur Sel	11
Faktor Pertumbuhan (<i>Growth Factors</i>)	11
Hormon	13
Faktor Perlekatan dan Penyebaran Sel	13
1. Substrat	13
2. Pengaruh Substrat pada Sel	14
Protein Pengikat	14
<i>Lipid</i>	14
Mineral	14
<i>Ficoll</i>	15
Kulture <i>Stem Cell</i> dari <i>Bone Marrow</i>	16
Persiapan Peralatan	16
Persiapan Bahan	17
Koleksi Sampel	17
Bahan	18
Isolasi Sel Mononukleat	18
Diferensiasi Sel dan Persiapan Aplikasi	19
Bibliografi	21

* Bab 2	
BIOLOGI, TEKNIS, DAN KULTUR BONE MARROW	
MESENCHYMAL STEM CELL (MSCs) 23	
Pendahuluan.....	23
Biologi <i>Stem Cell</i>	25
<i>Stem Cell Embryonal</i>	26
<i>Stem Cell Dewasa (Adult Stem Cell)</i>	28
Mioblas Skeletal.....	32
MSCs.....	33
Potensi Diferensiasi dan Kontrol MSCs.....	34
Preparasi dan Kultur.....	35
Isolasi <i>Stem Cell</i> dari Sumsum Tulang Manusia.....	35
Prosedur Isolasi.....	36
Kultur MSCs dari Sumsum Tulang Manusia.....	38
Peralatan Kultur Jaringan Berbahan Plastik.....	38
Persiapan Aplikasi.....	40
Simpulan.....	41
Daftar Pustaka.....	41
Bab 3	
HOMING MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) 45	
Pendahuluan.....	45
Sifat <i>Stem Cell</i>	46
Mobilisasi dan Homing dari MSCs.....	47
Faktor Terjadinya Migrasi MSCs.....	49
<i>Homing Stem Cell</i>	50
Bibliografi.....	53
Bab 4	
KARAKTERISASI FENOTIPE DAN GENOTIPE STEM CELL 57	
Pendahuluan.....	57
<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	62
Isolasi <i>Ribonucleic Acid (RNA)</i>	62
Bekerja dengan RNA.....	63
Persiapan Alat-alat.....	63
<i>RNAse Inhibitor</i>	64
<i>Dithyopirocarbonat (DEPC)</i>	64
<i>RNAsin/RNAGuard</i>	64
Larutan.....	64
Persiapan Sampel.....	64

Isolasi RNA dari Mamalia.....	65
Isolasi Total RNA.....	65
Material.....	65
Isolasi RNA dari kultur Sel.....	66
Isolasi RNA dari Jaringan.....	66
Isolasi snRNA dan RNA di Sitoplasma.....	67
Material.....	67
Persiapan Sampel.....	68
Isolasi RNA Sitoplasma.....	68
Isolasi RNA.....	68
Isolasi RNA Glikoprotein dan Oligosakarida Jaringan.....	69
Prosedur Isolasi.....	69
Prinsip Dasar PCR.....	70
Proses Pelipatgandaan.....	70
Tahapan Denaturasi.....	71
Tahapan Annealing.....	71
Tahap Ekstensi.....	71
Skema Amplifikasi.....	71
Bahan Dasar.....	71
<i>PCR-Mixture</i>	72
Kondisi PCR.....	72
<i>One Step PCR</i> (untuk Praktikum Khusus CD4).....	72
Susunan Primer.....	73
Mendesain Primer.....	73
Optimasi Kondisi Primer.....	73
Penilaian Produk PCR.....	74
Protokol Ekstraksi dan PCR.....	74
Bibliografi.....	77
Bab 5	
PROTOKOL ISOLASI DAN KULTUR STEM CELL	
HEMATOPOETIK 79	
Pendahuluan.....	79
Isolasi dan Kultur <i>Stem Cell</i> Hematopoetik dari <i>Bone Marrow Stem Cell</i>	79
Alat dan Bahan.....	80
Metode.....	81
Identifikasi Pematangan limfosit.....	83
a. <i>Imunofluoresense</i> indirek.....	84
b. <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	85

Isolasi dan Kultur <i>Stem Cell</i> Hematopoetik dari PBMCs.....	87
Persiapan PBMC.....	87
Isolasi PBMC Manusia.....	88
Prosedur Kultur PBMC.....	89
Simpulan.....	90
Bibliografi.....	90
Bab 6	
BONE MARROW STEM CELL: SUMBER & POTENSIAL	
APLIKASI KLINIS	93
Pendahuluan.....	93
<i>Stem Cell</i>	93
Potensi Aplikasi Klinis <i>Stem Cell</i>	97
Aspirasi <i>Bone Marrow</i>	100
Persiapan.....	100
Teknik Aspirasi.....	100
Teknik Pertama.....	100
Teknik ke dua (<i>Parallel Technique</i>).....	101
Aspirasi <i>Bone Marrow</i> pada Kelinci.....	101
Persiapan.....	101
Teknik Aspirasi.....	102
Bibliografi.....	102
Bab 7	
TERAPI STEM CELL PADA PENYAKIT REUMATIK	103
Pendahuluan.....	103
MSCs.....	104
Biologi MSCs.....	105
Potensi dan Pengendalian Diferensiasi MSCs.....	106
Sifat Imunoregulator dari MSCs.....	108
MSCs Pada Penyakit Reumatik.....	111
MSCs dan <i>Osteoarthritis</i>	112
MSCs dan <i>Arthritis Reumatoid (RA)</i>	114
Simpulan.....	115
Daftar Pustaka.....	116

Bab 8	
MESENCHYMAL STEM CELL (MSCs) DAN APLIKASINYA PADA	
REKAYASA JARINGAN TENDON	121
Pendahuluan.....	121
<i>Freeze dried Allograft Tendon</i> sebagai <i>Scaffold</i>	125
Komposit <i>Freeze dried Tendon Allograft</i> dan MSCs.....	127
Efikasi Penggunaan Komposit <i>Freeze Dried Tendon Allograft</i>	
dan MSCs dalam Rekonstruksi Defek Tendon Fleksor pada	
Hewan Coba.....	130
Bibliografi.....	134
Bab 9	
STEM CELL DAN REGENERASI OTAK	139
Pendahuluan.....	139
Neurogenesis.....	139
Aplikasi <i>Stem Cell</i> pada Neurogenesis.....	141
Pendekatan Eksogen.....	142
Pendekatan Endogen.....	142
Simpulan.....	143
Bibliografi.....	143
Bab 10	
TRANSPLANTASI STEM CELL SUMSUM TULANG UNTUK	
PERBAIKAN FOLIKULOGENESIS PADA MENCIT MODEL	
KEGAGALAN OVARIUM DENGAN PEMBERIAN	
KEMOTERAPI	145
Pendahuluan.....	145
Materi Dan Metode.....	146
Membuat Mencit Model Kegagalan Ovarium.....	147
Isolasi <i>Stem Cell</i> Sumsum Tulang.....	147
Transplantasi <i>Stem Cell</i> Sumsum Tulang (SPST).....	147
Hasil Penelitian dan Diskusi.....	148
Ekspresi SCF.....	148
Ekspresi GDF-9.....	150
Hitung Folikel Ovarium.....	152
Daftar Pustaka.....	153

xiv	
Bab 11	
BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELL (MSCs) UNTUK REGENERASI OTOT JANTUNG (HEARTH INFARCTION)	157
Pendahuluan.....	157
Pengembangan MSCs dan Karakterisasi Fenotif.....	158
Isolasi Mononukleat Sel.....	158
Pengembangan MSCs.....	158
a. Karakterisasi MSCs.....	159
Fisiologi Otot Jantung.....	162
Uji Coba Model Infark Jantung pada Hewan.....	162
Rute Transfer Sel dan Homing MSC di Bagian Infark.....	163
Perspektif Aplikasi MSCs.....	164
MSCs Menginduksi Angiogenesis.....	166
Analisis Imunologi MSC.....	167
Daftar Pustaka.....	169
Bab 12	
POTENSIAL APLIKASI STEM CELL PADA PASIEN PERIPHERAL ARTERIAL DISEASE	173
Pendahuluan.....	173
Pengobatan Tungkai Iskemik pada POAD/PAPO dengan Menggunakan Stem Cell.....	175
Aplikasi Klinis Praktis untuk Pengobatan PAPO.....	176
Usulan/Pemikiran Pelaksanaan Kemungkinan Terapi Stem Cell pada PAPO Diabetik dan PAPO Arteriosklerotik.....	178
Pelaksanaan Teknis di FK-UNAIR/RSUD Dr. Soetomo.....	178
Perbandingan Hasil dan Monitoring Keberhasilan.....	179
Kesimpulan.....	179
Bibliografi.....	180
Bab 13	
PERSPEKTIF STEM CELL DALAM KEDOKTERAN GIGI	181
Pendahuluan.....	181
Potensi Stem Cell.....	182
Sumber Stem Cell pada Gigi.....	182
Permasalahan pada Bidang Kesehatan Gigi.....	183
Isolasi Stem Cell dari Gigi.....	190
Simpulan.....	190
Bibliografi.....	191

xv	
Bab 14	
POTENSI REGULASI HOMEOSTASIS SEL PUNCA FOLIKEL RAMBUT PADA APLIKASI KLINIS DI BIDANG DERMATOLOGI	193
Pendahuluan.....	193
Sel Punca Folikel Rambut dan Siklus Pertumbuhan Rambut.....	194
Niche Sel Punca Folikel Rambut.....	198
Regulasi Intra dan Ekstra Folikel pada Sel Punca Folikel Rambut.....	200
Potensi Sel Punca Folikel Rambut pada Aplikasi Klinis.....	201
Penyembuhan Luka.....	202
Neogenesis pada <i>Androgenetic Alopecia</i>	203
Daftar Pustaka.....	205
Bab 15	
ALLOTTRANSPLANTASI MESENCHYMAL STEM CELL (MSCs) PADA FIBROSIS GINJAL	209
Pendahuluan.....	209
Fibrosis Ginjal.....	210
Fase 1: Aktivasi Seluler dan Jejas.....	210
Fase 2: Signal Fibrogenik.....	211
Fase 3: Fase Fibrogenik.....	212
Fase 4: Destruksi.....	213
Peran <i>Transforming Growth Factor Beta 1 (TGF-β1)</i> pada Fibrosis Ginjal.....	213
<i>Allotransplantasi MSCs Menghambat Transforming Growth Factor Beta 1</i> pada Fibrosis Ginjal.....	215
Simpulan.....	218
Daftar Pustaka.....	218
Bab 16	
REKAYASA TULANG RAWAN SENDI (CARTILAGE TISSUE ENGINEERING)	223
Pendahuluan.....	223
Teknik Rekayasa Jaringan (<i>Cartilage Engineering</i>).....	225
<i>Bone Marrow MSCs – Scaffold Freeze Dried Bovine Cartilage Powder – Platelet Rich Plasma Composit (SMPC)</i>	227
Kesimpulan.....	230
Bibliografi.....	230

**RISET TRANSLASI STEM CELL SEBAGAI AKSELERASI
PENINGKATAN DAYA SAING PERGURUAN TINGGI
KELAS DUNIA**.....

Pendahuluan	233
Regenerasi dan <i>Repair</i>	233
Regenerasi dan <i>Repair</i>	234
Biologi dan Potensi <i>Stem Cell</i>	235
Biologi <i>Stem Cell</i>	235
Karakteristik <i>Stem Cell</i>	237
Homing <i>Stem Cell</i>	238
Niche <i>Stem Cell</i>	238
Siklus dan Regulasi Replikasi <i>Stem Cell</i>	239
Mekanisme dan Potensi Regenerasi	240
Mekanisme <i>Signaling</i>	240
Plastisitas <i>Stem Cell</i> dan Regeneratif	241
<i>Self Renewal</i> dan Potensi <i>Stem Cell</i>	242
Riset Translasi <i>Stem Cell</i> di Dunia dan Unair.....	244
Riset <i>Stem Cell</i> di Dunia	244
Riset <i>Stem Cell</i> di Unair	245
Model Riset Translasi	247
Akselerasi Peningkatan Daya Saing Perguruan Tinggi	249
Manfaat Pengembangan <i>Stem Cell</i> di Perguruan Tinggi	250
Strategi Pengembangan (<i>Technology Stem Cell</i>)	252
<i>Stem Cell</i> dan Daya Saing Perguruan Tinggi.....	256
Simpulan.....	258
Daftar Pustaka.....	258
Indeks.....	261

Bab 8

MESENCHYMAL STEM CELL DAN APLIKASINYA PADA REKAYASA JARINGAN TENDON

Heri Suroto

Departemen Bedah Orthopedi, RSUD. Dr. Soetomo,
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

PENDAHULUAN

Defek tendon akibat kecelakaan kerja, kecelakaan lalu lintas dan bahkan kecelakaan kriminalitas, hingga kini masih merupakan tantangan besar dibidang bedah tangan. Defek tendon fleksor yang sering dijumpai dalam praktek sehari-hari ada 2 jenis. Defek tendon fleksor yang diakibatkan bukan karena kehilangan jaringan tendon tetapi oleh karena tidak tertangani dengan baik (*neglected*) tendon fleksor yang terputus. Defek tendon fleksor jenis yang lain adalah defek yang disebabkan oleh karena kehilangan jaringan tendon. Penanganan kedua jenis defek tendon fleksor ini pada prinsipnya memerlukan jaringan pengganti. Pilihan jaringan pengganti tendon adalah tendon autograf, tendon allograft,



Gambar 8.1 Defek pada tendon fleksor pada jari telunjuk tangan kanan. Tanda menunjukkan ujung tendon FDP proksimal dan distal yang mengalami retraksi

polimer biodegradabel sintetik, dan bahkan rekayasa jaringan tendon (*tendon tissue engineering*) (Bunell *et al.*, 1918; Pulvertaft *et al.*, 1956; Verdan *et al.*, 1972; Tubiana *et al.*, 1973; Soteloet *et al.*, 2002).

Rekonstruksi defek tendon dimulai dengan penggunaan *graft* biologis. Seri *free graft* pada tendon flektor pertama, yang digunakan pada tangan telah dilaporkan oleh Lexer *et al.*, (1912). Penggunaan *graft* ini dilakukan pada putus tendon baik akut maupun kronis, pada kasus infeksi dan kontraktur iskemia (Adamson *et al.*, 1961).

Bunell *et al.*, (1918) telah menggunakan tendon palmaris longus sebagai donor *graft*. Metode pembedahan dan hasil dari *free graft* tendon flektor telah dimodifikasi oleh pakar dibidang bedah tangan dari berbagai negara seperti: Pulvertaft *et al.*, (1956) dari Inggris; Graham *et al.*, (1947), Littler *et al.*, (1947), Boyes Stark *et al.*, (1971) dan White *et al.*, (1956) dari Amerika serikat; Rank dan Wakefield (1952) dari Australia; Verdan *et al.*, (1972) dari Swiss dan Tubiana *et al.*, (1973) dari Perancis. Semuanya masih menggunakan donor tendon dari *autograft*.

Tendon *autograft* dalam rekonstruksi defek tendon flektor mempunyai peranan penting baik dalam tenogenesis, tenoinduksi, maupun dalam tenokonduksi. Tenogenesis terjadi karena didalam *intrasynovial autograft tendon* didapatkan *tenoblast* yang masih *viable*. *Tenoblast* ini baik di bagian permukaan maupun di bagian sentral, mempunyai kemampuan untuk mensintesa jaringan tendon baru setelah mendapatkan revaskularisasi (Gelbermen *et al.*, 1992; Leversedge *et al.*, 2000). Tenoinduksi terjadi karena tendon *autograft* mengandung berbagai sitokin yang berfungsi kemotaksis, menstimuli sel progenitor tendon untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi *tenoblast* yang selanjutnya akan mensintesa jaringan tendon baru. Tenokonduksi terjadi karena tendon *autograft* mempunyai mikrostruktur yang sama dengan jaringan tendon dan berfungsi sebagai *scaffold* tempat deposisi jaringan tendon yang baru. Sejahter ini tendon *autograft* merupakan *graft* yang ideal. Tendon *autograft* tidak dapat digunakan untuk rekonstruksi pada defek tendon flektor yang *multiple*, karena tidak mungkin dilakukan pengambilan tendon dalam jumlah yang banyak tanpa menimbulkan morbiditas pada tempat tendon tersebut diambil.

Tahapan berikut dalam rekonstruksi defek tendon flektor adalah penggunaan tendon *allograft*. Tendon *allograft* dalam rekonstruksi defek tendon flektor hanya berperan dalam tenokonduksi. Tenokonduksi masih dimungkinkan terjadi karena pada *freeze dried tendon allograft* ini mikrostrukturnya tidak mengalami perubahan. Tujuan utama penggunaan tendon *allograft* dengan *synovial sheath* yang masih dipertahankan adalah untuk mencegah terjadinya pembentukan *scar* perlekatan dan untuk konservasi *pulley*. Defisiensi gerakan meluncur pada

kenyataannya masih terjadi, akibat dari pembentukan kolagen yang melekat selama proses penyembuhan. Peacock dan Madden (1967) mendapatkan bahwa perlekatan hanya terjadi pada sisi penyambungan dan kanalnya tetap bebas. *Graft* diinvasi oleh sel mononuklear resipien karena semua sel fibroblast donor sudah tidak didapatkan lagi. Penerimaan *graft* dan penyembuhan diujung tendon terjadi secara bersamaan dengan invasi *fibroblast* resipien. Proses integrasi yang terjadi tidak jauh berbeda dengan tendon *autograft* yaitu: nekrosis *graft*, revaskularisasi, repopulasi sel dan remodeling. Waktu yang diperlukan pada proses integrasi tendon *allograft* lebih lama dibandingkan dengan tendon *autograft*. Hasil akhirnya dari proses degradasi *scaffold* yang tidak diimbangi dengan pembentukan jaringan tendon baru mengakibatkan terjadinya kegagalan. Faktor lainnya yang membatasi penggunaan *graft* biologis ini secara luas adalah: risiko transmisi patogen dan kesulitan penyimpanannya. (Peacock *et al.* 1959, Vamhidy *et al.*, 1990. Asencio *et al.*, 1996, Robertson *et al.*, 2006).

Evolusi selanjutnya dalam rekonstruksi defek tendon flektor adalah penggunaan polimer biodegradabel sintetik. Polimer ini biokompatibel dan sudah tersedia secara komersial. Mereka dapat dibuat menjadi *scaffold* 3 dimensi dengan berbagai struktur dan porositas serta mempunyai sifat mekanik dan degradasi. Material biodegradabel seperti *collagen*, *chitin*, *polylactic acid* (PLA), dan *polyglycolic acid* (PGA) telah digunakan untuk rekonstruksi tendon. Pemilihan polimer yang tepat untuk rekayasa jaringan, diperlukan pemahaman akan pengaruh kimiawi polimer terhadap viabilitas, pertumbuhan dan fungsi sel. Sejahter ini belum ada prinsip umum yang dapat menerangkan prediksi dari adesi, proliferasi dan kultur sel terhadap permukaan polimer yang berbeda. Ouyang *et al.*, (2002) telah mempelajari adesi, proliferasi dan morfologi sel ACL kelinci dan *mesenchymal stem cell* dari sumsum tulang (bMSC) pada beberapa polimer biodegradabel sintetik. Hasil ini memberikan informasi yang berguna untuk strategi rekayasa jaringan tendon.

Keberadaan sel yang tepat ini penting karena potensi proliferasi, *signal* sel ke sel, produksi biomolekul dan formasi matriks ekstra selular. Jumlah sel yang ditanam akan sangat berpengaruh terhadap pembentukan jaringan tendon yang dimediasi oleh sel. Caplan *et al.*, (1993) telah mempelajari nilai ambang minimum dari jumlah sel yang diperlukan pada sisi reparasi untuk pembentukan jaringan baru. Kontroversi masih saja terjadi mengenai identitas dan lokasi sel yang bertanggung jawab terhadap sintesa kolagen selama penyembuhan tendon. Pertanyaan yang masih belum terjawab hingga saat ini adalah apakah *tenocyte* yang tersedia sudah cukup atukah masih diperlukan perekrutan sel progenitor pada sisi luka. Ketidaktentuan inilah yang membuka kesempatan untuk aplikasi sel dari luar dalam memfasilitasi regenerasi jaringan tendon (Goh *et al.*, 2003).

Adanya defek pada terputusnya tendon flektor maka tendon *graft* semestinya dilakukan untuk mengembalikan keutuhan tendon tersebut. Sejauh ini rekonstruksi defek tendon flektor dengan tendon *allograft* saja belum didapatkan hasil yang fungsional baik dari keutuhan maupun sifat biomekanikanya. Rekayasa jaringan tendon menawarkan strategi potensial untuk rekonstruksi defek tendon flektor. Rekayasa jaringan tendon dengan menggunakan kombinasi *scaffold*, sel dan signal baik mekanikal stimuli ataupun *growth factor* tampaknya dapat memberikan harapan besar sebagai solusi terhadap problema tersebut di atas.

Sel yang dapat digunakan dalam rekayasa jaringan tendon adalah sel *tenocyte* dan *stem cell* mesensimal. Rasionalitas penggunaan sel *tenocyte* ini karena pada kasus ruptur tendon kronis didapati kenyataan tingginya angka apoptosis *tenocyte*. Yuan *et al.*, (2002) mendapatkan angka apoptosis *tenocyte* yang tinggi (34%) pada kasus ruptur tendon *rotator cuff* manusia. Tuoheti *et al.*, (2005) mendapatkan angka apoptosis *tenocyte* 24% pada ruptur tendon *supra spinatus* yang terjadi pada kasus *Impingement syndrome*. Abnormalitas selular pada ruptur tendon kronis ini dapat mempengaruhi kapasitas penyembuhan dan *remodeling* tendon. Pengambilan dan isolasi dari *tenocyte* yang meninggalkan morbiditas dari sisi donor inilah yang membatasi penggunaannya dalam jumlah banyak. Sumber lain yang dapat digunakan untuk mengganti kekurangan ini adalah *MSCs*.

Mesenchymal stem cell adalah salah satu dari *stem cell* dewasa yang menyediakan penggantian dan reparasi terhadap jaringan yang rusak maupun *turnover* jaringan normal. Sel ini telah berhasil di isolasi bahkan di ekspansi dalam kultur. Terapi klinis berbasis sel (*cell based therapy*) dengan menggunakan *mesenchymal stem cell* melibatkan tiga pendekatan yang berbeda. Pertama, strategi rekayasa jaringan di mana *mesenchymal stem cell* ditanamkan ke dalam tiga dimensi perancah (*scaffold*) untuk penggantian tiga dimensi defek jaringan *in vivo*, kedua, terapi penggantian sel pada cacat genetik dengan penggantian sel inang mutan oleh sel normal donor alogenik, dan ketiga, *mesenchymal stem cell* berperan sebagai sitokin/factor pertumbuhan untuk merangsang reparasi jaringan (Caplan, 2005). Pendekatan yang dilakukan pada rekonstruksi defek tendon flektor ini adalah pendekatan pertama dan sekaligus yang ketiga.

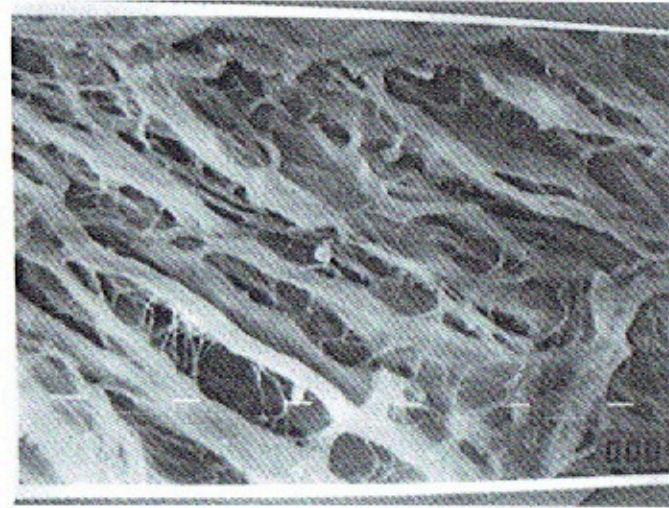
Perancah (*scaffold*) yang digunakan dalam rekayasa jaringan pada defek tendon flektor ini *freeze droid allografttendon* (FDAT). Karena sifatnya yang relatif avaskular, tendon adalah calon utama pengganti rekayasa jaringan. Tendon asli memiliki *ekstraselularmatrix* (ECM) yang terdiri dari banyak protein, glukosaminoglikan, dan proteoglikan yang mengontrol perakitan dari fibril kolagen, *unit load-bearing*, dan kontribusi pada pembentukan hierarki jaringan (Calve *et al.*, 2004). *Scaffold* yang berbasis kolagen sudah dikembangkan dalam

aplikasi rekayasa jaringan. Bozec (2007) mendapatkan bahwa materi dari serabut yang seperti tampar yaitu kolagen dari tendon yang seharusnya digunakan sebagai *scaffold* terutama pada lokasi yang mendapatkan tekanan secara mekanis. Kolagen tipe I adalah yang paling banyak digunakan secara luas sebagai material *scaffold* karena fibroblast akan menarik kolagen gel untuk membentuk struktur seperti jaringan. Kolagen tampaknya menjadi fondasi ideal untuk tendon artifisial. Tetapi sifat mekanis dari konstruksi fibroblast-kolagen *in vitro* lebih inferior dibandingkan jaringan aslinya. Percobaan sebelumnya telah dibuat untuk menciptakan tendon *in vitro*, tetapi kurang berhasil karena kesulitan dalam pembentukan konstruksi yang kompatibel baik secara mekanis maupun biologis dalam lingkungan *in vivo*. *Fibroblast* menggunakan jalur sinyal sel matriks selama perkembangan dalam pembentukan fibril dan dalam mempertahankan bentuk dan fungsinya setelah maturasi. Untuk menginduksi pembentukan struktur seperti tendon dengan sifat mekanis yang adekuat harus didasari dengan peranan dari produk biologis. Keberhasilan rekayasa jaringan tendon akan memerlukan komponen matriks ekstraselular. Matriks ekstraselular akan memberikan konstruksi dengan sifat mekanis mirip dengan tendon yang digantikannya. Sehingga mobilisasi bisa dilakukan sedini mungkin sekaligus mempercepat proses penyembuhan dari defek tendon tersebut.

FREEZE DRIED ALLOGRAFT TENDON SEBAGAI SCAFFOLD

Freeze dried allograft tendon adalah jaringan tendon yang diambil dari donor pada spesies sama namun secara genetik heterogen. Kemudian dibekukan (*cryo-preserve*) dalam suhu -80° selama 2–3 hari. Proses selanjutnya dikeringkan (*lyophilizer*) selama 12 jam hingga kadar air kurang dari 5%. Untuk mencegah transmisi penyakit, dilakukan sterilisasi dengan gamma irradiasi dengan dosis radiasi yang dipilih 25 kGy yang bisa menghancurkan bakteri, spora bakteri dan virus, sekaligus epitop yang ada pada protein di *scaffold* sehingga akan menurunkan imunogenitasnya tetapi tanpa menyebabkan kerusakan struktur jaringan dari tendon *allograft* tersebut. Hasilnya adalah jaringan asli tendon yang aselular dan avaskular, mempunyai matriks ekstra selular yang terdiri dari kolagen, glycosaminoglycans dan proteoglycan. Proteoglycans yang dapat mengontrol susunan kolagen fibril, unit *load bearing* dan bahkan berperan dalam pembentukan hierarki jaringan.

Pemrosesan *freeze dried allograft tendon* ini tidak menyebabkan kerusakan struktur jaringan dari tendon *allograft*. Interkoneksi *fiber* kolagen tipe I dan *cross link* nya masih ada. Dimensi pori terkecil dengan panjang 5,5 μ m dan



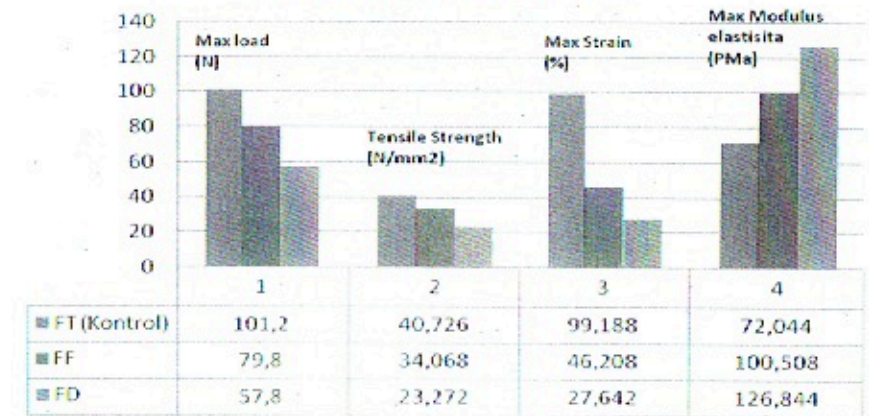
Gambar 8.2 Karakteristik *freeze dried allograft tendon* berdasarkan pemeriksaan mikroskop elektron. Struktur *scaffold* 3 dimensi dengan pori dan interkoneksi fiber kolagen tipe 1 serta *cross link* nya tidak mengalami perubahan. Berdasarkan perhitungan dimensi pori terkecil, didapatkan lebar (\longleftrightarrow): 3 μm dan panjang (\longleftrightarrow): 5,5 μm .

lebar 3 μm dari *scaffold* 3 dimensi ini, memungkinkan *mesenchymal stem cell* yang berdiameter < 3 μm dapat berpenetrasi hingga ke dalamnya (Suroto dkk., 2010). Hung *et al.*, (2002) telah melakukan teknik isolasi *mesenchymal stem cell* dengan penyaringan dengan pori 3 μm . Karakterisasi dilakukan untuk melihat mikrostruktur baik porositas maupun interkoneksi pada *scaffold freeze dried allograft tendon*. Karakterisasi dilakukan dengan pemeriksaan dengan *Scanning Electron Microscope (SEM)* pembesaran 4000 kali.

Proses *fresh freezing*, *freeze drying* atau *cryopreserve* akan secara bermakna menurunkan immunogenisitas dengan matinya *fibroblast* yang ada didalamnya. Hal ini akan menghilangkan lokus antigen mayor histokompatibilitasnya. Demikian juga gamma irradiasi digunakan untuk menurunkan risiko transmisi penyakit. Kedua teknik ini akan memberikan efek merugikan terhadap sifat biomekanikal maupun biologisnya (Robertson, 2006).

Uji biomekanik dari *freeze dried tendon* dan *fresh tendon* didapatkan bahwa proses pembuatan *freeze dried* menurunkan *maximal load* yang mampu ditanggung tendon menjadi sebesar 57,11%. Sedangkan proses pembuatan *freeze dried* menurunkan *tensile strength* tendon menjadi sebesar 57,14%, menurunkan *maximal strain* yang mampu ditanggung tendon menjadi sebesar 27,86%. Perbedaan ini bermakna secara statistik. Jadi proses dari *fresh tendon* menjadi *freeze dried tendon allograft* akan menurunkan sifat-sifat biomekanisnya.

Perbandingan rerata



Gambar 8.3 Grafik yang menggambarkan Rerata perbandingan masing-masing sifat biomekanik antara FT (*Fresh Tendon*) sebagai kontrol terhadap FF (*Fresh Frozen*) dan FD (*freeze dried*).

KOMPOSIT FREEZE DRIED TENDON ALLOGRAFT DAN MSCs

Mesenchymal Stem cell (MSCs) adalah sel progenitor multipoten yang mampu berdeferensiasi menjadi beberapa tipe sel jaringan ikat seperti *Osteocytes*, *Chondrocytes*, *Adipocytes*, *Tenocytes* dan *Myocytes* (Pittenger, 2002). Mereka dicirikan oleh petanda permukaan sel dan dalam kondisi yang cocok dapat diinduksi untuk berdeferensiasi menjadi tulang, tulang rawan, otot dan lemak. *Stem cell* dari sumsum tulang (*Bone marrow derived Mesenchymal Stem cell-BMSC*) berbagi gambaran sebagai berikut: (1) Ekspresi dari reseptor matriks seperti CD44, CD29 dan CD71. (2) Ekspresi petanda BMSC: SH2(CD105) dan SH3(CD71) (Foster 2005). (3) Komponen matriks elstraselular: collagen, proteoglycans dan fibronectin. (4) Growth factor dan reseptor cytokine untuk grup TGF- β . (5) Tidak ada ekspresi dari petanda HSC seperti CD34 dan CD14. Dengan penggunaan cairan induksi yang cocok maka MSC telah menunjukkan kemampuannya berdeferensiasi menjadi tulang, tulang rawan, otot dan jaringan lemak.

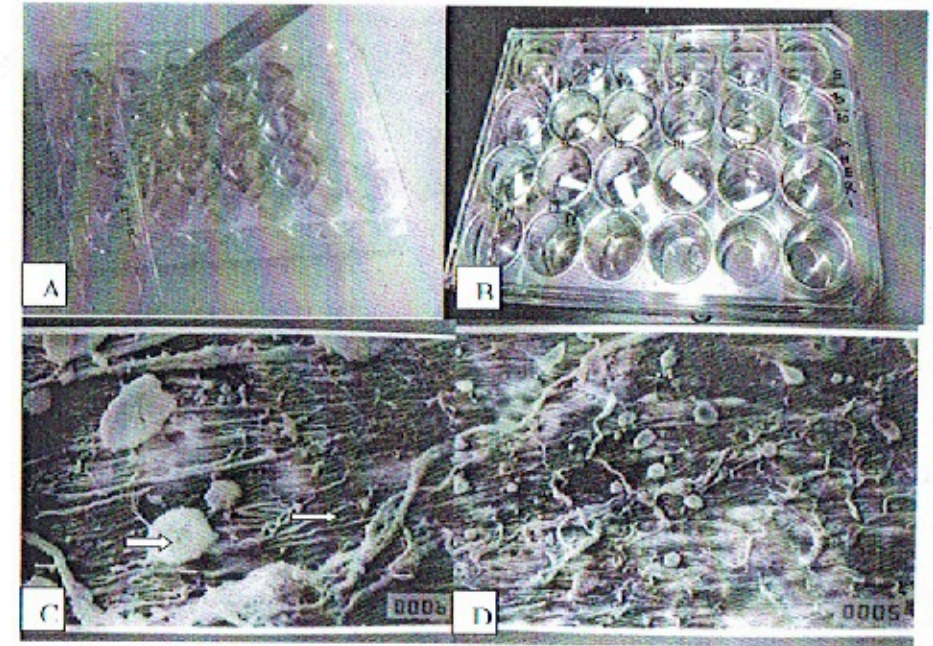
Deferensiasi chondrogenik dengan modulasi genetik telah dicoba dengan transfeksi *stem cell* dengan kontruksi recombinant DNA dan mengkode untuk ekspresi *growth factor* dan protein tertentu yang mendukung *chondrogenesis*, seperti SRY-box berisi gen (SOX)5-9, *Insulin like Growth Factor (IGF)-1* dan *Transforming Growth Factor (TGF)- β* (Li, 2005).



Gambar 8.4 Sel-sel turunan dari stem cell mesensimal manusia, melalui tahapan proliferasi hingga maturasi. Hasil akhirnya adalah jaringan. (Diambil dari Mary Murphy, Regenerative Medicine, National University of Ireland)

Beberapa studi terdahulu telah menunjukkan aplikasi potensial dari BMSC. Sebagai contoh matriks tulang tanpa mineral telah mampu menstimulasi diferensiasi tulang dan tulang rawan dari BMSC yang ditempatkan pada jaringan ikat atau stroma dari beberapa organ (Young, 1993, Young, 1995). Caplan (1991) menemukan 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 (Wakitani, 1994), tulang (Bruder, 1997, Bruder, 1998) dan akhir-akhir ini pada tendon Achilles (Young, 1997, Young, 1998). 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.

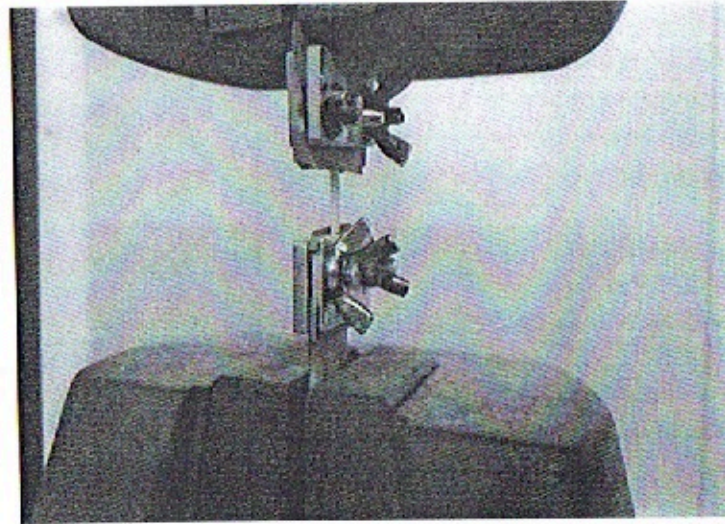
Penanaman *Mesenchymal Stem cell* dengan jumlah 2×10^6 sel ke dalam *freeze dried tendon allograft* dengan teknik penanaman statis (*static seeding*) dilakukan dengan terlebih dahulu merendam *scaffold* tersebut dalam larutan



Gambar 8.5 Penanaman stem cell mesensimal ke dalam *scaffold freeze dried tendon allograft*. A. Merendam *scaffold* tersebut dalam larutan CCM selama 4 jam. B. *Scaffold* direndam ke dalam suspensi stem cell mesensimal selama 16 jam. C dan D. Pemeriksaan dengan *Scanning Microscope* akan tampak MSCs melekat pada *scaffold* (tanda panah), juga interkoneksi sel dengan sel (tanda panah).

CCM (*complete culture medium*), kemudian direndam ke dalam suspensi MSCs selama 16 jam. Pemeriksaan dengan *JEOL JSM-T100 Scanning Microscope* akan tampak MSCs melekat pada *freeze dried tendon allograft*.

Uji biomekanik dari *freeze dried tendon* dan *fresh tendon* didapatkan bahwa proses pembuatan *freeze dried* menurunkan *maximal load* yang mampu ditanggung tendon menjadi sebesar 57,11%. Sedangkan proses pembuatan *freeze dried* menurunkan *tensile strength* tendon menjadi sebesar 57,14%, menurunkan *maximal strain* yang mampu ditanggung tendon menjadi sebesar 27,86%. Perbedaan ini bermakna secara statistik. Jadi proses dari *fresh tendon* menjadi *freeze dried tendon allograft* akan menurunkan sifat-sifat biomekanisnya. Namun pada saat *freeze dried tendon allograft* ini ditanami *mesenchymal Stem cell* secara *in vitro* akan mengalami rekonstitusi, hal ini seperti ditunjukkan oleh adanya peningkatan sifat-sifat biomekanisnya. *Maximal load* dari komposit *freeze dried tendon allograft* dan MSCs meningkat menjadi 84,98%, sementara itu *tensile strength* dari komposit ini akan meningkat menjadi 77,65%.



Gambar 8.6 Uji biomekanik komposit *freeze dried tendon allograft* dan *Mesenchymal Stem cell* dengan mesin autograf merk Shimadzu Japan, di laboratorium dasar bersama, Universitas Airlangga. Pada uji statistik *maximal load* dan *tensile strength* antara komposit tendon dengan *fresh tendon* ini tidak didapatkan perbedaan yang bermakna.

EFIKASI PENGGUNAAN KOMPOSIT *FREEZE DRIED TENDON ALLOGRAFT* DAN MSCs DALAM REKONSTRUKSI DEFEK TENDON FLEKSOR PADA HEWAN COBA

Adanya defek pada terputusnya tendon fleksor maka *graft tendon* semestinya dilakukan untuk mengembalikan keutuhan tendon tersebut. Keterbatasan dari donor tendon dan morbiditas yang dapat ditimbulkan dari pengambilannya, maka perlu dipikirkan alternatif lain yaitu tendon *allograft*. Sejauh ini belum didapatkan hasil yang fungsional pada penyambungan dengan tendon *allograft* untuk mengatasi defek tendon fleksor.

Rekonstruksi defek tendon fleksor terus mengalami perubahan seiring dengan perkembangan untuk mencapai hasil yang lebih baik. Tendon *autograft* dan *allograft* telah digunakan dengan angka keberhasilan klinis yang masih bervariasi. Saat ini polimer *biodegradable* telah digunakan sebagai *scaffold*. Material *biodegradable* ini seperti kolagen, *chitin*, *polylactic acid* (PLA) dan *polyglycolic acid* (PGA) telah digunakan dalam reparasi tendon, namun belum ada prinsip umum yang bisa menjelaskan dan memprediksi kejadian adhesi, proliferasi dan penyebaran kultur sel pada permukaan polimer yang berbeda. Karena relatif avaskular maka tendon merupakan kandidat utama dalam penggantian jaringan. Percobaan sebelumnya telah dibuat untuk menciptakan tendon *in vitro*, tetapi kurang berhasil karena

kesulitan dalam pembentukan konstruksi yang kompatibel baik secara mekanis maupun biologis dalam lingkungan *in vivo* (Birk *et al.*, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kembali keutuhan dan sifat biomekanik tendon pada defek tendon fleksor yang disambung dengan *freeze dried tendon allograft* yang telah ditanami *Mesenchymal Stem cell* dari sumsum tulang.

Jenis penelitian adalah *randomized post test only control group design*. Unit eksperimen adalah kelinci *New Zealand White Rabbit* jantan. Pada hewan coba ini dilakukan pemotongan tendon Fleksor Carpi Ulnaris (FCU) kaki kanan sebesar 1 cm kemudian dilakukan rekonstruksi berupa penyambungan dengan menggunakan tendon *autograft* (kelompok kontrol) dan komposit *freeze dried tendon allograft* dan *Mesenchymal Stem cell* dari sumsum tulang (kelompok perlakuan). Setelah 6 minggu dilakukan pengambilan tendon FCU yang telah direkonstruksi dan dianalisis dengan pemeriksaan makroskopis, histologis, imunohistokimia, dan biomekaniknya untuk menilai regenerasi jaringan tendon yang baru.

Proposal penelitian telah mendapatkan persetujuan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (*Animal Care and Use Committee/ACUC*) No: 063-KE tanggal 21 Agustus 2009. Data hasil penelitian dianalisis dengan uji komparasi *Mann-Whitney* dan *T-test* serta *One Way Anova*.

Hasil rekonstruksi defek tendon fleksor dengan komposit *freeze dried tendon allograft* dan *Mesenchymal Stem cell* lebih besar penampang melintangnya dibandingkan dengan tendon *autograft* (7,18 mm² dan 4,20 mm², $p = 0,000$). Hasil uji biomekanik terhadap jaringan rekonstruksi defek tendon fleksor ini terjadi penurunan dalam hal *maximal load* pada rekonstruksi defek tendon fleksor dengan tendon *autograft* dan komposit tendon (51,40 N +/- 15,99 dan 45,30 N +/- 3,93, $p=0,432$) demikian juga halnya dengan *tensile strength* (13,19 N/mm² +/- 3,18 dan 10,38 N/mm² +/- 1,13, $p=101$) dan *Modulus Elastisitas* (17,63 Mpa +/- 5,46 dan 12,81 Mpa +/- 2,19). Dalam hal *tensile strain* terjadi peningkatan (91,89% +/- 24,34 vs 93,69% +/- 5,72, $p=876$). Secara statistik tidak didapatkan perbedaan yang bermakna pada sifat-sifat biomekanik tendon tersebut. Hasil proses degradasi *scaffold* melalui ekspresi MMP-8 menunjukkan bahwa rekonstruksi defek tendon fleksor dengan komposit *freeze dried tendon allograft* dan *Mesenchymal Stem cell* lebih besar aktivitas MMP-8 nya dibandingkan dengan tendon *autograft* dan ini berbeda secara bermakna ($p=0,000$). Hasil proses sintesa jaringan tendon baru melalui ekspresi Scleraxis dan Kolagen - 1 menunjukkan bahwa rekonstruksi defek tendon fleksor dengan komposit *freeze dried tendon allograft* dan *Mesenchymal Stem cell* lebih banyak jumlah Scleraxis dan Kolagen - 1 nya dibandingkan dengan tendon *autograft* dan ini berbeda secara bermakna ($p = 0,000$ dan $p = 0,000$).

Proses penyembuhan defek tendon fleksor yang telah direkonstruksi dengan komposit *freeze dried tendon allograft* dan *Mesenchymal Stem cell* merupakan proses sinkronisasi antara degradasi *scaffold* dan sintesa jaringan tendon yang baru. Kecepatan proses degradasi harus secara tepat diikuti dengan proses sintesa jaringan tendon yang baru, sehingga keutuhan jaringan tendon bisa tetap terjaga. Persoalan yang selama ini dihadapi adalah: (1) sebagian besar rekayasa jaringan tendon tidak sekuat yang diharapkan dalam kondisi *in vivo*, (2) kecepatan regenerasi jaringan tendon yang terlalu lambat (Goh *et al.*, 2003).

Hasil rekayasa jaringan tendon pada rekonstruksi defek tendon fleksor ini secara makroskopis lebih besar pada potongan melintangnya pada komposit tendon dibandingkan dengan tendon *autograft*. Gambaran mikroskopisnya dapat dilihat dari aktifitas degradasi *scaffold*nya maupun sintesa jaringan tendon yang baru. *Scaffold* biologis pada *freeze dried tendon allograft* ini secara alami mempunyai struktur dan fungsi protein, glycoproteins, dan proteoglycans yang sama dengan matriks ekstraselular asli tendon. Matriks ekstraselular pada *scaffold* ini merupakan jaringan molekul 3 dimensi kompleks yang menyediakan *support* struktural dan bahkan signal biologis untuk terjadinya adhesi sel, migrasi dan proliferasi. Proses integrasi diawali dengan nekrosis *graft*, revaskularisasi, repopulasi sel dan remodeling. Sel inflamasi yaitu *neutrophil* dan *macrophage* akan melepaskan matriks metalloproteinases (MMPs) dan sitokin proinflamasi yang interaksinya akan berpengaruh pada homeostasis matriksestraselular. Degradasi molekul matriks ekstraselular akan melepaskan *matrikines* yang akan berperan penting dalam proses remodeling matriks. Beberapa studi telah menunjukkan bahwa molekul matriks ekstraselular seperti kolagen, ketika mengalami degradasi proteolitik akan melepaskan *matrikines* yang mempunyai bioaktifitas kemotaksis dan mitogenesis. Peptida yang dilepaskan dari laminin, kolagen, elastin, dan fibronectin diketahui berpartisipasi dalam modulasi aktifitas selular, ekspresi MMP dan *growth factor signaling*. Hasil degradasi matriks ekstraselular ini juga diketahui akan melepaskan molekul yang menstimulasi angiogenesis dan mempromosi migrasi sel (Belon *et al.*, 2004, Beattie *et al.*, 2009).

Regenerasi tendon yang diawali dengan proses degradasi ECM ini dimungkinkan oleh adanya angiogenesis. Angiogenesis, juga dikenal sebagai neovaskularisasi, melibatkan pembentukan kapiler dari *microvessel* yang sudah ada yaitu sebuah proses yang berpartisipasi untuk remodeling vaskuler dan maturasinya. Angiogenesis harus dibedakan dari vasculogenesis yang merupakan diferensiasisel endotel (ECs) dari *stem cell* sumsum tulang (angioblasts). Pembentukan pembuluh darah baru merupakan serangkaian peristiwa temporal yang meliputi: (1) vasodilatasi kapiler dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah yang memfasilitasi ECs adhesi dan migrasi, (2) ECs stimulasi oleh faktor-

faktor pro-angiogenik seperti VEGF, (3) pemecahan proteolitik dari membran akibat dari sekresi dan aktivasi matriks metalloproteinase (MMPs) sebagai respon dari sinyal eksogen seperti sitokin, faktor pertumbuhan dan sel-matriks interaksi, (4) migrasi dan proliferasi ECs melalui ECM bawah pengaruh faktor pertumbuhan, MMPs dan integrins, (5) pembentukan dan pematangan tabung kapiler baru yang melibatkan diferensiasi sel otot polos dan pericytes (sel perivascular pluripotential asal *mesenchymal*), dan akhirnya *remodelling* dari *vaskular bed* melalui mekanisme apoptosis (Bellon *et al.*, 2004).

Regenerasi tendon memerlukan migrasi, proliferasi dan diferensiasi sel pada sisi defek. Kontroversi seputar sumber sel berhubungan dengan kemampuan intrinsik untuk menyembuhkan versus kontribusi ekstrinsik dari jaringan sekitar atau dari *tendon sheath* atau dari epitenon. Pembuktian dengan mekanisme tidak langsung melalui ekspresi dari sel tenoblast yaitu *Scleraxis* dan sintesa kolagen tipe I yang merupakan kontribusi terbesar matriks ekstra selular tendon. Awad *et al.*, (1999) mendapatkan bahwa MSC yang diimplantasikan pada defek tendon akan menghasilkan kualitas reparasi dan integritas struktural yang lebih baik dibandingkan dengan rekonstruksi yang hanya berisi gel kolagen saja. Hasil rekonstruksi defek tendon dengan MSC tersebut lebih besar dalam hal penampang melintang (*cross sectional area*), namun pada pengamatan histologis dan morphometrik telah gagal menjelaskan peningkatan sifat biomekanik pada fase awal penyembuhan tendon. Chong *et al.*, (2007) mendapatkan bahwa terapi sel intratendinosus dengan MSC dalam penjahitan tendon primer akan meningkatkan parameter histologisnya. Struktur fiber kolagen tipe I didapati lebih padat dan terorganisasi baik. Ekspresi awal dari *Scleraxis* menandakan adanya populasi sel progenitor pada jaringan tendon. *Scleraxis* adalah factor transkripsi bHLH yang terekspresi pada tendon dari tahap progenitor awal hingga pembentukan jaringan matur tendon (Schweitzer *et al.*, 2001).

Ekspresi *Scleraxis* maupun Kolagen tipe I ini memang secara kuantitatif lebih besar pada kelompok perlakuan pada penelitian ini dibandingkan dengan kelompok kontrol dan keduanya berbeda secara signifikan. Data ini menunjukkan bahwa *Mesenchymal Stem cell* dari sumsum tulang dengan lingkungan mikro yang kondusif berdeferensiasi menjadi tenoblast dan secara aktif mensintesa kolagen tipe I untuk meregenerasi jaringan tendon yang baru. Proses regenerasi inilah yang memungkinkan penggantian *scaffold* yang terdegradasi secara enzimatik oleh MMP-8 dengan jaringan tendon baru secara bertahap sampai akhirnya tercapai keutuhan maupun sifat biomekanik dari rekonstruksi defek tendon fleksor pada penelitian ini.

Pemulihan sifat biomekanik tendon dari komposit *freeze dried allograft tendon* dan *stem cell* mesensimal baik *in vitro* maupun *in vivo* ini penting untuk rekayasa

jaringan tendon. Rekonstruksi defek tendon dengan menggunakan *freeze dried allograft* tendon saja tidak dimungkinkan karena penurunan sifat biomekaniknya. Sementara itu penggunaan komposit *freeze dried tendon allograft* dan *Mesenchymal Stem cell* dalam rekonstruksi defek tendon, memungkinkan mobilisasi dini. Mobilisasi dini ini akan memberikan sinyal mekanik bagi regenerasi tendon. Melvin *et al.*, (2006) telah meneliti bagaimana stimulasi mekanik akan mempengaruhi sifat biomekanik dan histologis konstruksi sponge kolagen dan *Mesenchymal Stem cell* yang digunakan untuk merekonstruksi defek tendon patella. Hasilnya adalah bahwa stimulasi mekanik dapat secara bermakna meningkatkan biomekanik reparasi tendon. Saber *et al.*, (2010) menggunakan bioreaktor yang dibuat untuk mengaplikasikan *cyclic mechanical loading* pada konstruksi rekayasa jaringan tendon. Hasilnya adalah *cyclic loading* pada konstruk tendon akan meningkatkan tensile strength dan modulus elastisitasnya. Stimulasi mekanik *in vitro* telah dilaporkan akan menginduksi arah dari sel dan meningkatkan proliferasi sel dan sintesa kolagen. Korelasi positif antara sifat biomekanik konstruksi rekayasa jaringan *in vitro* dengan sifat biomekanik jaringan hasil rekonstruksi *in vivo*, menunjukkan bahwa perbaikan biomekanik dapat ditingkatkan untuk memenuhi kebutuhan beban *in vivo* dengan meningkatkan sifat biomekanik dari konstruksi tersebut *in vitro* (Nirmalanandhan *et al.*, 2008).

Hasil dari penelitian ini yang menambah *stem cell* mesenchymal pada *scaffoldnya* memberikan sifat biomekanik yang lebih baik dibandingkan dengan apa yang dilakukan oleh Kato, 1991, dengan penelitiannya yaitu regenerasi tendon Achilles dengan prosthesis kolagen tendon hanya mencapai 36% dari *maximum force* normal. Sementara Awad, (1999) menunjukkan adanya *stem cell* mesenchymal dalam gel kolagen tipe I memberikan peningkatan yang bermakna antara 15–40% dalam sifat strukturnya, baik *stiffness*, *maximum force*, *strain energy* dan *maximum elongation*. Sehingga terjadi peningkatan dalam hal kualitas reparasi maupun integritas strukturnya.

Kesimpulan penelitian ini adalah terjadi kembali keutuhan dan sifat biomekanik tendon yang fungsional pada jaringan rekonstruksi defek tendon fleksor yang disambung dengan komposit *freeze dried tendon allograft* dan *Mesenchymal Stem cell*.

BIBLIOGRAFI

Amerongen MJ, Harmsen MC, Petersen AH, Kors G, Luyn MJA, 2005. The enzymatic degradation of *scaffolds* and their replacement by vascularized extracellular matrix in the murine myocardium. *Biomaterial*; 27: 2247–2257.

- Adamson JE, Wilson JN, 1961. The history of flexor tendon grafting. *J Bone Joint Surg Am.*; 43: 709–16.
- Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FNL, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI, 1999. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair tendon. *Tissue Eng*; 5(3): 267–277.
- Beattie AJ, Gilbert TW, Guyot JP, Yates AJ, Badylak SF, 2009. Chemoattraction of Progenitor Cells by Remodeling Extracellular Matrix Scaffolds. *Tissue Eng A*; 15 (5): 1119–1125.
- Bell E, Ivarsson B, and Merrill C, 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human-fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 76: 1274.
- Birk DE, Zycband E, 1994. Assembly of the tendon extracellularmatrix during development. *J. Anat.*; 184: 45.
- Bittira B, Kuang JQ, Al-Khaldi A, Shum-Tim D, Chiu RC, 2002. *in vitro* preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg*; 74: 1154–60.
- Boyer MI, Strickland JW, Engles DR, Sachar K, Leversedge FJ, 2002. Flexor tendon repair and rehabilitation. State of the art in 2002. *J Bone Joint Surg*; 84-A(9): 1684–1706.
- Boyes JH, Stark HH, 1971. Flexor tendon grafts in the fingers and thumb. A study of factors influencing results in 1000 cases. *J Bone Joint Surg Am.*; 53: 1332–42.
- Bozec L, Heijden G, Horton M, 2007. Collagen fibrils: Nanoscale ropes. *Biophys J.* 92(1); 70–75.
- Bruder S, Kurth A, Shea M, Hayes W, and Kadiyala, S, 1997. Quantitative parameters of human mesenchymal stem cell-mediated bone regeneration in an orthotopic site. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 22, 250.
- Bruder S, Kraus K, Goldberg V, and Kadiyala S, 1998. Critical-sized canine segmental femoral defects are healed by autologous mesenchymal stem cell therapy. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 23, 147.
- Bunnell S, 1918. Repair of tendons in the fingers and description of two new instruments. *Surg Gynecol Obstet*; 26: 103–10.
- Calve S, *et al.*, 2004. Engineering of functional tendon. *Tissue Eng*; 10 :755–761.
- Caplan AI, 2005. Mesenchymal Stem cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics. *Tissue Eng* 11; 7/8: 1198–1211.
- Caplan AI, Goto T, Wakitani S, Pineda S, Haynesworth S, Goldberg V, 1991. Cell based technologies for cartilage repair. In: Knee Joint Instability. AAOS Symposium Proceedings, Scottsdale, Arizona.

- Chong AKS, Ang AD, Goh JCH, Hui JHP, Lim AYT, Lee EH, Lim BH, 2007. *Bone marrow – derived mesenchymal stem cell influence early tendon healing in a rabbit Achilles tendon model. J Bone Joint Surg Am*; 89: 74–81.
- Graham WC, 1947. Flexor tendon grafts in the fingers and thumb. *J Bone Joint Surg Am*; 29: 553–9.
- Gelberman RH, Vandeberg JS, Manske PR, et al. 1985. The early stages of flexor tendon healing: A morphologic study of the 1st 14 days. *J. Hand Surg. Am.* 10, 776.
- Goh JC et al., 2003. Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Eng*, 9, S31–S44.
- Hutmacher DW, 2001. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives. *J. Biomater. Sci. Polymer ed.* 12, 107.
- Littler JW, 1947. Free tendon grafts in secondary flexor tendon repair. *Am J Surg*; 74: 315–21.
- Melvin NJ, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Sklenka AM, Butler DL, 2005. Effects of Cell-to-Collagen Ratio in Mesenchymal Stem cell-Seeded Implants on Tendon Repair Biomechanics and Histology. *Tissue Eng*; 11 (3/4): 448–457.
- Melvin NJ, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Butler DL, 2006. Effects of Cell-to-Collagen Ratio in Stem cell-Seeded Constructs for Achilles Tendon Repair. *Tissue Eng*; 12(4): 681–9.
- Nirmalanandhan VS, Melvin NJ, Shearn JT, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, Bradica G, Butler DL, 2009. Combined Effects of Scaffold Stiffening and Mechanical Preconditioning Cycles on Construct Biomechanics, Gene Expression, and Tendon Repair Biomechanics. *Tissue Eng A*; 15(8): 2103–2111.
- Nirmalanandhan VS, Melvin NJ, Shearn JT, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, Bradica G, Butler DL, 2008. Improving Linear Stiffness of the Cell-Seeded Collagen Sponge Constructs by Varying the Components of the Mechanical Stimulus. *Tissue Eng A*; 14 (11): 1883–91.
- Nurminskaya MV, and Birk DE 1998. Differential expression of genes associated with collagen fibril growth in the chicken tendon: Identification of structural and regulatory genes by subtractive hybridization. *Arch. Biochem. Biophys.* 350, 1. 37.
- Ouyang HW, Goh JCH, Thambiyah A, Teoh SH, Lee EH, 2003. Knitted Poly-lactide-co glycolide Scaffold Loaded with Bone marrow Stromal Cells in Repair and Regeneration of Rabbit Achilles Tendon. *Tissue Eng*; (3): 431–9.

- Peacock EE, 1970. Repair of tendons and restoration of gliding function. In: *Surgery and biology of wound repair*. Philadelphia: WB Saunders.
- Pulvertaft RG, 1956. Tendon grafts for flexor tendon injuries in the fingers and thumb. A study of technique and results. *J Bone Joint Surg Br*; 38: 175–94.
- Rank BK, Wakefield AR. 1952. The repair of flexor tendons in the hand. *Br J Plast Surg*; 4: 244–53.
- Saber S, Zhang AY, Ki SH, Lindsey DP, Smith RL, Riboh J, Pham H, Chang J, 2010. Flexor Tendon Tissue Engineering: Bioreactor Cyclic Strain Increases Construct Strength. *Tissue Eng A*; 16 (6): 2085–90.
- Shah M, Foreman DM, Ferguson MW, 1995. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci*; 108: 985–1002.
- Sahoo S, Ouyang H, Goh JCH, Tay TE, Toh SL, 2006. Characterization of a Novel Polymeric Scaffold for Potential Application in Tendon/Ligament Tissue Engineering. *Tissue Eng*; 12, 1: 91–99.
- Tubiana R, Results and complication of flexor tendon grafting. *Orthop Clin North Am.* 1973; 4: 877–83.
- Toritsuka Y, Shino K, Horibe S, Nakamura N. et al., 1997. Effect of freeze-drying or gamma-irradiation on remodeling of tendon allograft in a Rat Model. *J Orthop Res* 15; 2: 294–n 300.
- Verdan CE, 1972. Half a century of flexor tendon surgery. Current status and changing philosophies. *J Bone Joint Surg Am*; 54: 472–91.
- Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, and Goldberg VM, 1994. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* 76(4), 579.
- White WL, 1956. Secondary restoration of finger flexion by digital tendon grafts. An evaluation of seventy-six cases. *Am J Surg*; 91: 662–8.
- Young HE, Ceballos EM, Smith JC, Mancini ML, Wright RP, Ragan BL, Bushell I, and Lucas PA, 1993. Pluripotent mesenchymal stem cells reside within avian connective tissue matrices. *in vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 29A(9), 723.
- Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC, Jr, Reagan CR, and Lucas PA, 1995. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev. Dyn.* 202(2), 137.
- Young, R, Butler D, Weber W, Caplan A, Gordon S, and Fink D, 1998. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop. Res.* 16, 406.

- 138 Young RG, Butler DL, Weber W, Gordon SL, and Fink DJ, 1997. Mesenchymal stem cell-based repair of rabbit Achilles tendon. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 22, 249.