

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tinjauan Pustaka

1. Tulang

Tulang adalah jaringan ikat yang terdiri atas sel, substrat dan substansi dasar yang mengalami kalsifikasi menjadi substansi keras yang dapat melindungi dan menyokong tubuh (Bloom & Don W, 2002). Tulang juga berfungsi sebagai tempat penyimpanan kalsium dan mineral lainnya dalam tubuh yang dapat diambil sesuai kebutuhan (Gartner & L. Hiant, 2007).

a. Matriks Tulang

Matriks tulang terbentuk dari elemen ekstraseluler yang berasal dari jaringan tulang. Matriks tulang tersusun atas komponen organik dan garam-garam anorganik (Bloom & Don W, 2002). Sekitar 35% dari berat kering matriks tulang terdiri dari komponen organik, terutama kolagen tipe I. Kolagen sendiri menyusun 95% dari komponen organiknya. Garam-garam anorganik menyusun sekitar 65% dari berat kering. Komponen utama dari garam organik adalah kalsium dan fosfat yang membentuk kristal hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Garam mineral lainya yaitu bikarbonat, sitrat, magnesium, natrium dan kalium (Gartner & L Hiant, 2007). Komponen organik akan menentukan kekerasan dari tulang sedangkan komponen garam-

garam anorganik akan menentukan kekuatan dan kelenturan dari tulang (Bloom & Don W, 2002).

b. Sel-sel pada tulang

Sel-sel pada tulang dapat dibedakan menjadi empat tipe sel diantaranya sel osteoprogenitor, osteoblas, osteosit, dan osteoklas. Ketiga jenis sel pertama dapat bertransformasi dari jenis sel satu ke jenis sel lainnya, namun transformasi ini berbeda dengan diferensiasi. Osteoklas sendiri memiliki asal yang berbeda dengan ketiga sel diatas, yaitu berasal dari prekursor sumsum tulang ((Bloom & Don W, 2002).

Sel-sel osteoprogenitor, sel yang berasal dari sel mesekim embrionik yang mempunyai kemampuan untuk melakukan mitosis dan berdiferensiasi menjadi osteoblast dan sel-sel kondrogenik (Gartner & L Hiant, 2007). Sel ini aktif membelah selama proses pertumbuhan kemudian menetap di permukaan bebas tulang sehingga dapat diaktifkan kembali ketika tulang mengalami cedera (Bloom & Don W, 2002). Sel-sel ini biasanya ditemukan pada permukaan tulang di lapisan dalam periosteum (Leeson & Paporo, 1995).

Osteoblas berasal dari sel-sel progenitor yang berkembang dibawah pengaruh *bone morphogenic protein* (BMP) dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) (McChance & Sue, 2006). Sel ini berperan dalam produksi matriks tulang termasuk kolagen tipe I serta bertanggung jawab terhadap mineralisasi jaringan (Katagiri & Takahashi, 2002).

Osteosit merupakan osteoblas yang dikelilingi oleh matriks tulang dan terjebak didalam lakuna. Sel ini disebut juga sel tulang yang matang yang berhubungan satu sama lain melalui kanalikuli (Gartner dkk, 2011). Kanalikuli mengandung cairan ekstra seluler yang berfungsi sebagai alat komunikasi, transport nutrisi dan metabolit. Selain itu kalsium juga dilepaskan dari tulang memasuki cairan ekstraseluler melalui kanalikuli. (Gartner & L Hiant, 2007).

Osteoklas, merupakan agen resorpsi tulang yang berasal dari progenitor granulosit makrofag. Sel ini terdapat pada permukaan tulang, seringkali dalam lekukan dangkal yang dikenal sebagai *lacuna how-ship*. Osteoklas mengeluarkan kolagenase dan enzim proteolitik lain yang menyebabkan matriks tulang melepaskan bagian substansi dasar yang mengapur. Setelah proses resorpsi selesai, osteoklas menghilang, mungkin berdegenerasi atau berubah lagi menjadi sel asalnya (Leeson & Paporo, 1995).

c. Remodeling dan Regenerasi tulang

Tulang adalah jaringan paling keras namun dinamis yang selalu mengalami proses remodeling yang berlangsung seumur hidup tanpa mengubah bentuk dan ukuran tulang (Soysa dkk, 2012). Remodeling tulang merupakan proses aktif dan dinamis yang bergantung pada keseimbangan antara resorpsi tulang oleh osteoklas serta deposisi tulang oleh osteoblas (Krishnan & Davidovitch, 2006). Proses ini dilakukan oleh unit remodeling tulang yang terletak pada permukaan

tulang dan menyesuaikan terhadap perubahan stress dalam lingkungan sepanjang hidup (Gartner dkk, 2011).

Proses remodeling tulang terdiri dari 3 fase dimana tulang yang teresorpsi akan digantikan oleh tulang yang baru. Fase I (aktivasi) adalah dimana stimulus, baik hormon atau vitamin, mengaktifkan sel prekursor di area yang terlokalisir untuk membentuk osteoklas. Selanjutnya pada fase II (resorpsi), osteoklas akan meresorpsi tulang sehingga terbentuk *resorption cavity*. Pada tahap ini osteoklas meresorpsi tulang sejajar dengan aksis dari sistem haversian. Kemudian pada fase III (formasi), osteoblas yang terbentuk akan melapisi permukaan kavitas membentuk tulang sekunder (McChance & Sue, 2006).

2. *Bone Tissue Engineering*

Pengertian rekayasa jaringan secara resmi dinyatakan dalam *National Science Foundation workshop* pada tahun 1988, “Rekayasa jaringan merupakan pengaplikasian prinsip dan metode dari teknik serta ilmu pengetahuan kehidupan terhadap pemahaman dasar dari hubungan antara struktur dan fungsi dalam jaringan normal dan patologi mamalia dan perkembangan bahan pengganti biologis untuk mengembalikan, memperbaiki atau meningkatkan fungsi jaringan”.

Tiga bahan utama untuk membuat rekayasa jaringan adalah a) sel, b) molekul aktif biologi c) perancah atau *scaffold* 3 dimensi (Chen, 2008). Material yang cocok digunakan dibidang rekayasa jaringan tulang harus

mempunyai 3 kondisi penting, diantaranya: a) osteokonduktif, merupakan kemampuan suatu bahan yang dapat merangsang sel-sel untuk melakukan diferensiasi menjadi sel osteoblas dewasa (Kamath dkk, 2014); b) osteoinduktif, merupakan kemampuan untuk membantu sel melakukan adhesi, proliferasi dan membentuk matrix ekstraseluler pada permukaan dan porus dari suatu material c) osteointegrasi, dapat berintegrasi baik secara structural dan fungsional dengan jaringan tulang sekitar ketika diimplankan (Serra, 2014).

3. Perancah

Perancah merupakan biomaterial pengganti tulang yang bersifat sementara. Menurut Wiliam (2012), biomaterial adalah substansi yang sudah direkayasa sedemikian rupa menyerupai lingkungan aslinya dengan meniru matriks ekstra selular sehingga bisa digunakan untuk keperluan diagnostik dan terapeutik pada manusia maupun hewan coba. Beberapa desain perancah 3-dimensi yang harus diperhatikan diantaranya; a) biofungsional, kemampuan perancah untuk menggantikan fungsi dari jaringan yang akan tumbuh; b) biokompabilitas, perancah dapat mendukung aktivitas sel, dapat diterima baik oleh tubuh dan tidak akan menimbulkan penolakan dari respon imun tubuh; c) biodegradabel, kemampuan perancah untuk terurai secara terkontrol sehingga dapat memberi ruang pada jaringan baru untuk tumbuh; d) porusitas, perancah 3-dimensi berporus memfasilitasi sel

untuk berproliferasi dan mentransfer nutrisi, oksigen dan produk metabolit dari jaringan (Velasco dkk, 2015).

Biomaterial yang digunakan dalam rekayasa jaringan diantaranya metal, keramik dan polimer. Metal dan keramik tidak lagi digunakan karena tidak bersifat biodegradabel dan ketersediaan bahan yang terbatas. Biomaterial yang saat ini digunakan secara luas di bidang rekayasa jaringan adalah polimer (Chen dkk, 2002). Perancah berbahan polimer berdasarkan kemampuan *cell carrier* dibedakan menjadi 2 tipe yaitu: *poly(α -hydroxy ester)* dan hidrogel. Hidrogel memiliki sistem *hydrophilic polimer network* sehingga memiliki beberapa keuntungan diantaranya; a) material bersifat fleksible dan mirip dengan matriks ekstra selular; b) porus-porus diantara network memberikan ruang bagi sel untuk berproliferasi membentuk jaringan tulang baru dan memberi suplai nutrisi serta oksigen bagi sel tersebut; dan mampu mengontrol volume air yang diserap pada ruang-ruang kosong dan porous. (Meyer, Meyer, Handsche, & Wiesman, 2009).

Polimer sendiri terdiri dari 2 yaitu; polimer alami dan polimer sintetik. Polimer alami lebih sering digunakan di bidang rekayasa jaringan karena komponennya mirip dengan matrix ekstraselular. Contoh dari polimer alami tersebut adalah gelatin, kolagen, alginate, fibrin dan asam hialuronik (O'Brien, 2011). Gelatin merupakan polimer berbentuk hidrogel yang diturunkan dari kolagen melalui proses hidrolisis, kolagen sendiri merupakan komponen organik yang utama dalam tulang (Meyer

dkk, 2009). Gelatin yang digunakan sebagai material dasar dibuat dengan sedemikian rupa melalui proses gelasi dan *lyophilized* sehingga menghasilkan perancah yang ber-porus (Rodriguez dkk, 2014).

4. PRP

Platelet-rich Plasma (PRP) merupakan volume plasma autologous minimal yang kaya akan platelet, dimana terdapat 1.000.000/ μ l konsentrasi platelet dalam 5 ml volume plasma. (Marx). Konsentrasi platelet dalam darah normal adalah sekitar 150.000/ μ l hingga 3.50.000/ μ l (Marx, 2001). Terdapat lebih dari 300 molekul biologi aktif di dalam platelet yang dihasilkan selama proses aktivasi platelet. Beberapa diantara molekul biologi aktif penting yang terdapat dalam PRP adalah faktor pertumbuhan beberapa protein darah dan faktor penjendalan darah (Sell dkk, 2012).

Platelet dalam PRP yang teraktivasi akan melepas granula α yang mengandung sejumlah faktor pertumbuhan sehingga menyebabkan proliferasi, kemotaksis dan diferensiasi dari sel. Faktor pertumbuhan tersebut diantaranya: *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor-beta* (TGF-b), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *insulin-like growth factor I*, *epidermal growth factor* (EGF) dan *growth factor* sel epitel (Nikolidakis, 2008). Granula α juga melepas TGF-b1 dan TGF-b2 dimana keduanya berperan sangat penting untuk menstimulasi kemotaksis dari fibroblas, memproduksi kolagen dan fibrinogen sel dan menghambat degradasi, kolagen dengan menaikkan

inhibitor dari enzim protease. Peningkatan TGF- β 2 akan mempercepat regenerasi dari tulang dengan mengontrol aktivitas dari osteoblas dan osteoklas (Rose, 2001).

Protein darah yang terkandung dalam PRP diantaranya fibrinogen, albumin dan beberapa imunoglobulin (Sell dkk, 2012). Fibrinogen dalam PRP juga berperan penting terutama dalam hal pembentukan matriks ekstraseluler. Fibrinogen dalam PRP berasal dari granula α yang dihasilkan dari aktivasi platelet. Fibrinogen yang dilepaskan kemudian berubah menjadi zat fibrin yang akan mengalami proses polimerisasi menjadi fibrin *clot*. Fibrin merupakan protein berserat yang tidak larut dalam plasma (Dohan Ehrenfest dkk, 2009). Saat ini fibrin banyak dimanfaatkan dalam bidang rekayasa jaringan, diantaranya sebagai *fibrin glue* atau bahan adesif jaringan pada tindakan operasi. Aplikasi *fibrin glue* dalam rekayasa jaringan dapat dibagi menjadi 3 yaitu: fibrin sebagai pengganti matriks ekstraseluler atau sebagai material perancah, namun perancah fibrin ini kurang stabil dan cepat terdegradasi; fibrin yang dikombinasikan dengan perancah polimer; fibrin sebagai *system delivery* untuk faktor pertumbuhan dan molekul biologi lain untuk mengontrol adesi, proliferasi, migrasi dan diferensiasi sel serta produksi dari matriks ekstraseluler (Eyrich, 2006)

Penelitian lain tentang manfaat PRP dilakukan oleh Liu (2014) yang menyatakan bahwa PRP terbukti dapat mengurangi iritasi pada area peng-implanan dengan menurunkan level IL-1. Pada perancah yang

diinkorporasikan PRP konsentrasinya IL-1 menurun sedangkan perancah tanpa inkorporasi PRP menunjukkan adanya penebalan di garis permukaan yang menunjukkan reaksi inflamasi. IL-1 β merupakan indikator dari reaksi inflamasi yang disebabkan oleh tindakan operasi dan implan.

Salah satu metode pembuatan PRP adalah metode yang dibuat oleh Yasuhiko Tabata dan Makoto Matsui (2011). Darah yang diambil dari sampel dimasukkan ke dalam *tube* yang mengandung larutan antikoagulan *acid-citrat-dextrose* kemudian di sentrifugasi selama 7 menit dengan kecepatan 450 *ref/g* pada suhu 4°C . Plasma berwarna kuning dengan *buffy coat* dipisahkan untuk dilakukan sentrifugasi kedua dengan kecepatan 1600 *ref/g* selama 5 menit pada suhu 4°C kemudian lapisan *buffy coat* yang terbentuk diambil dan selanjutnya kita sebut dengan PRP.

5. Pemuatan PRP

Inkorporasi PRP dan perancah terbukti dapat meningkatkan regenerasi dari jaringan tulang baru. Penelitian yang dilakukan Lee (2012) secara *in-vitro* menggunakan perancah gelatin *poly (ethylene glycol)-tryamine*, untuk menjaga pelepasan dari PRP, menunjukkan adanya peningkatan proliferasi pada kondrosit ketika di inkorporasikan dengan PRP dibandingkan dengan tanpa inkorporasi PRP. Hasil penelitian tersebut secara *in-vivo* pada tulang kartilago kelinci yang mengalami defek juga memperlihatkan perancah inkorporasi PRP dan sel kondrosit membentuk kartilago dalam waktu 4 minggu.

Liu (2014) menyatakan bahwa inkorporasi PRP pada perancah PCL/Gelatin nanofiber memberikan beberapa keuntungan diantaranya adalah: peningkatan signifikan dari sifat mekanik perancah, prp dapat dimuat dalam berbagai bentuk dan ukuran ketika diinkorporasikan dengan perancah, sehingga dapat diimplankan ke area tulang yang mengalami defek dengan bentuk tertentu; inkorporasi dan perilsian faktor pertumbuhan dapat membuat *micro-vironment* di area defek.

6. Degradasi Perancah

Perancah yang diimplan kedalam tubuh harus bersifat biodegradabel, dimana perancah harus dapat terdegradasi secara sempurna setelah jaringan tulang yang baru terbentuk. Molekul air akan berdifusi kedalam perancah polimer kemudian mengubahnya menjadi molekul polimer dengan memutus ikatannya. Hal ini menyebabkan berat dari molekul dan modulus elastisitasnya berkurang. Ketika berat dari molekul polimer ini sudah mencapai ambang batasnya, perancah akan terdegradasi dengan sempurna (Velasco dkk, 2015).

7. Proses *Weight Loss*

Rata-rata degradasi pada perancah polimer yang mempunyai struktur berporus cenderung lebih lambat dibandingkan perancah polimer dengan struktur yang solid karena pada perancah polimer yang solid produk pendegradasi asam akan terjebak, hal ini menyebabkan timbulnya efek *autokatalitik*. Berbeda dengan perancah yang memiliki porositas tinggi dimana proses degradasi lebih lambat, hal ini disebabkan karena produk

pendegradasi asam akan mudah terlepas dan keluar dari perancah (Wu & Ding, 2005). Pelepasan faktor pertumbuhan dari gelatin baru dapat terjadi ketika hidrogel terdegradasi, sehingga laju degradasi dari perancah harus seimbang dengan dengan laju pembentukan jaringan baru (Isaac, 2014).

Proses degradasi pada perancah berporus dibedakan menjadi tiga tingkat. Tingkat I *quasi-stable* dimana ditandai dengan meningkatnya sifat mekanik tetapi terjadi penurunan dimensi dari perancah; tingkat II penurunan sifat mekanik terjadi secara dramatis dan tingkat III yaitu penurunan berat atau *weight loss* dan penurunan dimensi perancah Difusi dari produk degradasi asam pada tahap III atau tahap *weight loss* akan menyebabkan penurunan berat yang signifikan serta penurunan dimensi dari perancah, sehingga perancah menjadi lebih rapuh. Efek autokatalitik pada perancah berporus lebih sulit terjadi karena produk asam pendegradasi mudah terlepas dari perancah sehingga laju degradasi pada perancah berporus lebih lambat. (Wu & Ding, 2005).

Weight loss yang terjadi selama proses degradasi dapat dihitung dari perubahan berat kering specimen sebelum dan sesudah dilakukan inkubasi. Penelitian yang dilakukan Sera (2014) menunjukkan adanya perubahan *weight loss* pada perancah selama 6 minggu inkubasi. Material yang hilang selama degradasi dapat dihitung dari perubahan berat kering perancah sebelum dan setelah inkubasi menggunakan persamaan berikut:

$$\%W = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100\%$$

W_0 merupakan berat kering dari perancah sebelum dilakukan perendaman dan W_t merupakan berat kering perancah setelah dilakukan perendaman. Kecepatan weight loss rata-rata dipengaruhi oleh pH dari larutan perendaman PBS, semakin rendah pH dari PBS maka akan semakin tinggi kecepatan degradasi dan sebaliknya (Wu & Ding, 2005).

B. Landasan Teori

Tulang merupakan jaringan yang memiliki kemampuan untuk memperbaiki diri melalui proses remodeling. Proses remodeling ini dapat terjadi seumur hidup, namun pada kerusakan tulang yang berat menyebabkan proses remodeling ini tidak akan terjadi, oleh karena itu dibutuhkan pengobatan atau terapi untuk memperbaiki kerusakan tulang yang berat. Berbagai pengobatan dibuat untuk memperbaiki kerusakan berat pada tulang termasuk transplantasi tulang, akan tetapi metode ini mempunyai kekurangan dalam hal tertentu. Teknologi dibidang rekayasa jaringan hadir sebagai pengobatan alternatif untuk memperbaiki kehilangan atau malfungsi dari jaringan dan organ. Tiga komponen utama dalam rekayasa jaringan adalah sel, molekul biologi aktif dan perancah 3 dimensi.

Perancah 3-dimensi berporus merupakan biomaterial pengganti matriks ekstraseluler sementara yang mempunyai peran penting diantaranya memberi bentuk pada jaringan atau organ dan petunjuk bagi sel-sel untuk berproliferasi, kriteria penting untuk perancah 3-dimensi adalah biokompatibel dan biodegradabel. Biokompatibel adalah perancah diterima

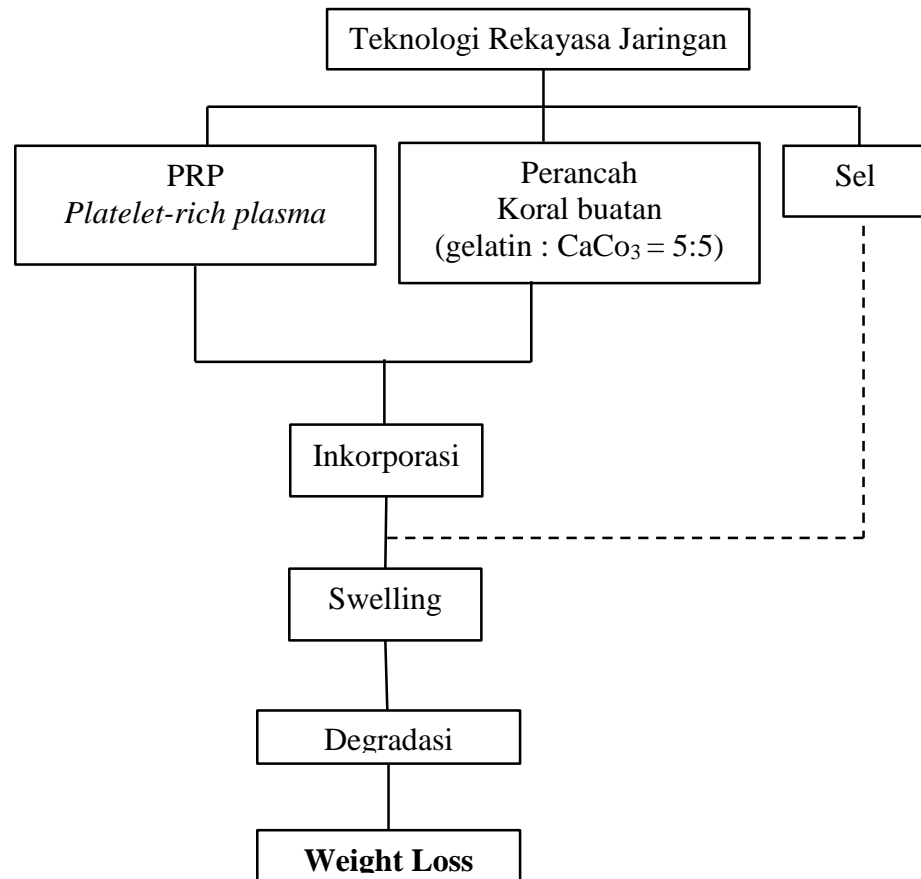
baik oleh tubuh dan tidak akan menimbulkan penolakan dari respon imun tubuh. Biodegradabel adalah yaitu kemampuan suatu material untuk mendegradasi suatu bahan, baik melalui degradasi kimia pasif atau dissolusi, maupun aktivasi seluler aktif. Biomaterial perancah yang sering digunakan salah satunya adalah biomaterial polimer alami yaitu gelatin hidrogel.

Platelet-rich plasma adalah sejumlah platelet yang terdapat dalam volume plasma minimum. Terdapat kurang lebih sekitar 1.000.000/1 L konsentrasi platelet dalam 5 ml volume plasma. Platelet yang teraktivasi mengandung sejumlah faktor pertumbuhan yang berperan dalam proliferasi dan kemotaksis sel. Hidrogel yang di inkorporasikan dengan PRP mempunyai tingkat keberhasilan yang tinggi dalam rekayasa jaringan tulang. Hidrogel akan mengontrol pelepasan faktor pertumbuhan melalui proses degradasi. Selain faktor pertumbuhan dalam PRP terkandung juga protein darah, salah satunya adalah fibrinogen. Fibrinogen dalam plasma akan teraktivasi menjadi fibrin yang ikut berperan dalam mengontrol adhesi, proliferasi, migrasi, diferensiasi sel dan memproduksi matriks ekstraseluler.

Laju degradasi dari perancah hidrogel harus seimbang dengan pertumbuhan jaringan tulang baru karena jika laju degradasi terlalu cepat perancah akan terurai sebelum jaringan tulang baru terbentuk, sehingga terapi dengan rekayasa jaringan tulang akan gagal. Salah satu faktor yang harus diperhatikan dari proses degradasi adalah hilangnya berat molekul pada tahap *weight loss*. Tahap *weight loss* menyebabkan penurunan berat yang signifikan

dan penurunan dimensi dari perancah. Hal ini membuat perancah 3-dimensi menjadi lebih rapat dan mudah terdegradasi.

C. Kerangka Konsep



Gambar 1. Kerangka Konsep

D. Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, hipotesis dalam penelitian ini adalah terdapat pengaruh inkorporasi PRP pada perancah koral buatan dengan konsentrasi gelatin dan CaCO₃ 5:5 terhadap profil *weight loss*.