

Regenerasi pada Massive Bone Defect dengan Bovine Hydroxyapatite sebagai Scaffold Mesenchymal Stem Cell

(Regeneration of Massive Bone Defect with Bovine Hydroxyapatite as Scaffold of Mesenchymal Stem Cells)

Ferdiansyah*, Djoko Rushadi*, Fedik Abdul Rantam**, Aulani'am***

ABSTRACT

Massive bone defect caused by various diseases and disorders, until now is still a major problem in the field of Orthopedics and Traumatology, because if not handled properly can cause permanent disability in patients. Massive bone defect reconstruction need big graft size, and the ideal graft must have characteristics of osteoconductive, osteoinductive, and osteogenesis. This study aimed to prove that there will be bone regeneration process take place in massive bone defect which being treated with bovine hydroxyapatite as scaffold of mesenchymal stem cells. This was a post test only control group design study. Experimental unit was male New Zealand white rabbit, which in this research will be underwent cutting of ulna osteoperiosteal as critical sized bone defect, then reconstruction was performed using a bovine hydroxyapatite (control group) and composite of bovine hydroxyapatite with mesenchymal stem cells. After 8 weeks, the reconstructed ulna has been were taken and being analyzed. Analysis results from control and treatment group were: no difference on radiological examination ($p = 0.133$), histopathological examination showed difference in total matrix formed ($p = 0.00$), difference in union distal and proximal ($p = 0.000$ and $p = 0.015$), matrix in graft also showed to be different ($p = 0.000$), difference in bone matrix ($p = 0.010$). Immunohistochemistry examination showed difference in collagen type I and osteocalcin ($p = 0.000$ and $p = 0.000$). Correlation was found between collagen type I bone matrix ($p = 0.039$ dan $p = 0.049$). Multivariate analysis showed correlation between osteoblast product and massive bone defect regeneration ($p = 0.797$). The conclusion of this research was regeneration occur in the reconstruction of massive bone defects using a composite graft of bovine hydroxyapatite with mesenchymal stem cells.

Key words: Regeneration, massive bone defect, bovine hydroxyapatite, mesenchymal stem cells

PENDAHULUAN

Bone defect akibat trauma, tumor, kelainan kongenital, degenerasi dan akibat penyakit lainnya sampai saat ini masih merupakan problem besar di bidang ilmu orthopaedi dan traumatologi. Dalam penanganan kondisi di atas diperlukan pemberian (pencangkokan) tulang. Tulang merupakan jaringan kedua terbanyak yang di transplantasikan setelah darah, lebih dari 2,2 juta cangkok tulang setiap tahun dilakukan di seluruh dunia. Di Amerika lebih dari 500.000 cangkok tulang telah dilakukan pada defect tulang akibat trauma, tumor, degenerasi dan penyakit lain di bidang orthopaedi dan traumatologi. Komposisi graf yang digunakan adalah 60% menggunakan autograf, 34% menggunakan alograf dan sisanya 6% menggunakan

material lain (Greenwald *et al.*, 2002; Joyce *et al.*, 2002; Vaccaro, 2002; Betz, 2002). Besarnya dana yang dibelanjakan untuk biomaterial orthopaedi di Amerika Serikat mencapai U\$ 550 milyar, sedangkan di Eropa mencapai U\$ 240 milyar (Medical Devices & Surgical Technology Week. 2007). Di Indonesia sejak tahun 1997 sampai 2001 tercatat adanya peningkatan kebutuhan biomaterial sebanyak 4 kali dan kebutuhan graf tulang akan terus bertambah seiring meningkatnya kasus kerusakan tulang akibat trauma, tumor, kelainan kongenital, infeksi, dan resorpsi tulang akibat komplikasi pemasangan protesa sendi (Abdurrahman, 2002, Betz, 2002).

Terdapat 2 kelompok defect pada tulang. Pertama adalah defect tulang yang kecil dan kedua defect tulang yang

* Departemen Orthopedi dan Traumatologi RSU Dr. Soetomo Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

** Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

*** Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

berukuran besar (*Massive bone defect*). Dalam penanganan *defect* tulang yang berukuran kecil ada beberapa pilihan yang dapat dilakukan seperti: cangkok tulang kecil, pemberian *bone material substitute*, pemberian faktor-faktor pertumbuhan, injeksi darah sumsum tulang dan dewasa ini telah mulai diteliti dengan pemberian *stem cells* (Minamide et al., 2001; Ferdiansyah, 2007; Hernigou et al., 2005). Pada *massive bone defect* dengan gap lebih besar dari 2 kali diameter tulang, penanganannya lebih kompleks karena memerlukan operasi yang besar untuk rekonstruksi tulang yang hilang dengan tujuan mengembalikan fungsi anggota gerak (Bruder et al., 1998; Arinze et al., 2003; Bensaid W et al., 2005; Bakker et al., 2008)

Sampai saat ini material untuk graf tulang yang ideal adalah yang berasal dari tubuh sendiri yang dikenal dengan autograf. Autograf sebagai graft tulang yang ideal memiliki 3 sifat biologi. Pertama, osteogenesis di mana autograf mengandung sel osteoblas yang mempunyai kemampuan untuk memproduksi matrik tulang. Kedua, osteoinduktif dimana autograf mengandung berbagai sitokin seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β), *platelet derived growth factor* (PDGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *bone morphogenetic protein* (BMP) yang berfungsi menarik, menstimuli osteoprogenitor sel untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi osteoblas yang selanjutnya akan memproduksi tulang yang baru. Ketiga, osteokonduktif di mana autograf memiliki matrik yang berfungsi sebagai *scaffold* tempat deposisi tulang yang baru. Walaupun autograf tulang merupakan graf yang paling ideal, tetapi autograf tidak dapat digunakan untuk rekonstruksi pada *massive bone defect*, karena pengambilan tulang dengan ukuran yang besar akan menimbulkan morbiditas yang besar (kecacatan) pada tempat tulang tersebut diambil.

Evolusi rekonstruksi pada *massive bone defect* berkembang melalui beberapa tahapan sesuai dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan sampai saat ini masih terus berkembang. Tahapan pertama adalah rekonstruksi dengan menggunakan biomaterial (*material based therapy*) yang sampai sekarang masih digunakan. Biomaterial yang paling sering digunakan adalah tulang alograf dan atau implan (*endoprosthesis*) yang terbuat dari kombinasi logam dan polimer. Tulang alograf yang didapat dari donor, sebelum digunakan diproses terlebih dahulu untuk mengurangi resiko penularan penyakit dan menurunkan potensi imunogeniknya. Pemerosesan ini mengakibatkan berubahnya sifat biologi tulang alograf. Tulang alograf hanya memiliki sifat osteokonduktif dan sedikit osteoinduktif karena masih mengandung faktor-faktor pertumbuhan yang

terdapat di dalam komponen organik tulang, sedangkan sifat osteogenesis menjadi hilang sama sekali karena seluruh sel-sel tulang alograf telah mati. Aplikasi klinis tulang alograf untuk rekonstruksi *massive bone defect* pada umumnya memberi hasil yang baik. Terjadi union antara alograf dengan resipien, walaupun prosesnya berjalan lebih lambat daripada penyembuhan normal (*delayed union*). Kelemahan utama transplantasi tulang alograf adalah pada bagian tengahnya tetap merupakan benda mati, sehingga dalam jangka waktu panjang akan mengalami perlemahan yang mempunyai resiko terjadi fraktur. Disamping itu adanya benda mati yang besar didalam tubuh juga meningkatkan resiko timbulnya infeksi (Burchardt, 1983; Friedlander, 1983; Pelker et al., 1983; Ferdiansyah & Abdurrahman, 1997; Ferdiansyah, 1998). Sementara itu biomaterial yang berasal dari logam bisa dirancang untuk menerima beban yang diterima tulang, tetapi tidak mempunyai sifat biologi yang diinginkan, sehingga tidak bisa inkorporasi dengan tubuh, akibatnya pemakaian jangka panjang akan terjadi *metal fatigue* (perlemahan logam karena menerima beban terus menerus) dan harus dilakukan penggantian implan dengan yang baru.

Tahapan kedua dalam penanganan *massive bone defect* adalah dengan menggunakan faktor pertumbuhan atau sitokin (*factor based therapy*) untuk mempercepat inkorporasi antara graf dengan resipien. Metode ini dipelopori oleh Marshal R. Urist pada tahun 1982 yang menemukan *low molecular bone morphogenetic protein fraction* (BMP), merupakan faktor pertumbuhan yang diekstrak dari komponen organik tulang dengan cara mengambil seluruh mineral tulang (*Demineralized bone matrix* – DBM). BMP inilah yang mempunyai peran memberikan sifat osteoinduktif pada tulang. Seiring dengan perkembangan ilmu pengetahuan lebih lanjut ditemukan berbagai sitokin yang juga mempunyai mempunyai sifat osteoinduksi seperti TGF- β , PDGF, FGF, IGF dan lain-lain. Penemuan ini menambah efektivitas pemberian graf pada tulang. Penggunaan faktor pertumbuhan dalam aplikasi klinis berjalan lambat, bahkan untuk penanganan *massive bone defect* belum dapat digunakan.. Hal ini disebabkan BMP yang dihasilkan dari ekstraksi tulang relatif sangat sedikit, dan pengambilan mineral tulang mengakibatkan kekuatan mekanik tulang menjadi sangat menurun sehingga hanya bisa digunakan pada *defect* tulang yang kecil. Upaya melakukan protein rekombinan untuk mendapatkan jumlah yang banyak dari BMP dan sitokin lainnya terbentur pada berbagai hal seperti kemurnian produk, mahal, takaran dosis yang diinginkan, dan memerlukan biomaterial (*scaffold*) sebagai pembawa serta waktu pelepasan sitokin dari

biomaterial (*scaffold*) (Urist et al., 1982; Friedlander, 1983; Guo et al., 1991; Termaat et al., 2005; Vogens et al., 2005).

Tahapan ketiga adalah dengan menggunakan sel (*cell based therapy/tissue engineering*). Dasar pemikiran penggunaan sel dalam penanganan *massive bone defect* adalah mendapatkan graf tulang yang mempunyai sifat ideal yakni memiliki sifat osteogenesis, osteoinduktif dan osteokonduktif. Sel yang digunakan adalah *mesenchymal stem cells* yang berasal dari berbagai sumber didalam tubuh manusia, dalam hal ini yang paling banyak diteliti adalah yang berasal dari sumsum tulang. Pada rekonstruksi *massive bone defect* maka *stem cells* membutuhkan *scaffold* untuk tempat melekat, proliferasi dan diferensiasi menjadi osteoblas yang nantinya juga menjadi tempat deposisi matrik tulang yang baru (Bruder et al., 1998; Bruder & Scaduto, 2005; Goldberg & Caplan, 2004; Bensaid et al., 2005).

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan regenerasi tulang pada *massive bone defect* dengan menggunakan mineral *bovine hydroxyapatite* (BHA) sebagai *scaffold* *mesenchymal stem cells* (BM-MSCs) sehingga dapat menjadi model pada penyembuhan tulang.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan penelitian eksperimental murni yang dilakukan pada binatang coba menggunakan rancangan penelitian *Post test only control group design* dengan kelompok sebagai berikut; kelompok perlakuan; BHA yang di *seeding* dengan BM-MSCs, dan kelompok kontrol; hanya BHA saja.

Unit Eksperimen adalah *New Zealand White Rabbit* jenis kelamin jantan (Penggunaan Hewan Model telah dimintakan sertifikat Laik Etik Penelitian). **Replikasi**, karena pada penelitian akan dilakukan uji banding setiap 2 kelompok tidak berpasangan, maka rumus besar sampel.

$$r \geq 2 \left[\frac{(Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})S}{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} \right]^2$$

Sehingga didapatkan jumlah replikasi minimal 12 per kelompok. Dilakukan koreksi jumlah replikasi untuk mengantisipasi unit eksperimen yang *drop out* selama proses penelitian dengan $f = 25\%$ (0,25) sehingga jumlah replikasi yang diambil dari penelitian ini adalah 16 ekor untuk masing-masing group. Kriteria inklusi adalah sebagai berikut : *New Zealand White Rabbit*, **kelamin jantan**, **usia**

6-9 bulan, **mata merah**, **haemoglobin > 90 mg%**, **platelet > 180 × 10⁹/L**. Kriteria eksklusi adalah sebagai berikut: ada luka kulit, kecepatan pernafasan > 60x/menit, suhu rektal > 40° C, lekosit > 15 × 10⁹/L. Kriteria *drop out* adalah sebagai berikut: infeksi luka operasi, meninggal. Randomisasi dilakukan dengan simpel random.

Variabel Penelitian

Klasifikasi Variabel Penelitian

Dalam penelitian ini melibatkan 3 variabel yaitu: Variabel bebas; jenis graf yang digunakan adalah hanya *bovine hydroxyapatite* saja dan komposit *bovine hydroxyapatite* dengan *mesenchymal stem cells* (BM-MSCs). Variabel kendali; ras kelinci, jenis kelamin, usia, berat badan, dan status kesehatan. Variabel tergantung; matrik tulang dalam graf, kadar kolagen type I (COL I), osteoklasin (OC), dan derajat inkorporasi diukur dengan skor radiologi dan histologi.

Pemeriksaan matrik tulang di lakukan pengecatan dengan hematoxilin-eosin dinilai dengan 2 cara yaitu: semikuantitatif dengan sistem skor Lane dan Sandhu (Tabel 1) untuk menilai semua matrik tulang baru dan kuantitatif dengan menghitung luas tulang baru.

Collagen type I (COL1), diperiksa dengan metode immunohistokimia menggunakan *Mose Monoclonal Antibody to Collagen Type I* (Acris Antibody GmbH), kemudian diukur ketebalan serabut kolagen tipe 1 dengan menggunakan mikrometer yang telah dikalibrasi. Pemeriksaan dilakukan pada seluruh lapangan pandang. *Osteocalcin* (OC) diperiksa dengan metode immunohistokimia menggunakan *Mouse Monoclonal Antibody anti-Osteocalcin* (Novus Biologicals), kemudian dihitung jumlah sel osteoblas yang positif sel dibagi dengan total osteoblas pada seluruh lapangan pandang. Evaluasi radiologi dilakukan setelah 8 minggu dan di nilai dengan sistem skor modifikasi ISOLS (International Society of Limb Salvage Surgery) (Santoni BG) (Tabel 2).

Lokasi dan Jadwal Waktu Penelitian

Penelitian dikerjakan di Instalasi Pusat Biomaterial-Bank Jaringan RSU Dr. Soetomo untuk pembuatan hidroksiapatit, di Laboratorium *Stem cells* Lembaga Penyakit Tropik UNAIR untuk kultur *stem cells* dan *seeding stem cells* pada biomaterial dan di Bagian Bedah Fakultas Kedokteran Hewan, di mana semua tindakan prabedah, sewaktu pembedahan dan pascabedah sampai proses mematikan hewan coba di bawah pengawasan Dokter hewan yang berpengalaman.

Tabel 1. Sistem skor histopatologi Lane dan Shandu modifikasi oleh Heiple *et al.*

Union (distal dan proksimal)	Tidak terjadi union	0
	Union fibrosa	1
	Union osteochondral	2
	Union tulang	3
	Organisasi komplrit tulang	4
Tulang kanselous	Tidak ada aktivitas sel tulang	0
	Aposisi awal tulang baru	1
	Aposisi aktif tulang baru	2
	Reorganisasi tulang kanselous	3
	Komplit reorganisasi tulang kanselous	4
Tulang kortikal	Tidak terbentuk	0
	Gambaran awal	1
	Formasi tulang dalam pembentukan	2
	Hampir semua reorganisasi	3
	Terbentuk komplrit	4
Sumsum tulang (marrow)	Tidak ada	0
	Mulai terlihat	1
	Ada pada lebih dari setengah celah	2
	Kolonisasi komplrit oleh sumsum tulang merah (<i>red marrow</i>)	3
	Sumsum lemak matur	4
Nilai total per kategori	Union proksimal	4
	Union distal	4
	Tulang kanselous	4
	Kortek	4
	Sumsum tulang	4
	Nilai maksimal	20

Tabel 2. Sistem skor radiologi modifikasi dari ISOLS (International Society of Limb Salvage Surgery)

Union	Garis fraktur tidak kelihatan	4
	Garis fraktur terisi $\geq 75\%$	3
	Garis fraktur terisi 25–75%	2
	Garis fraktur terisi $< 25\%$	1
Resorpstion	No resorption, formasi tulang baru	4
	$< 25\%$, tidak ada fraktur	3
	25–50% no fraktur	2
	$> 50\%$	1
Nilai total per kategori	Union	8
	Resorpsi	4
Total skor		12

Aspirasi *bone marrow* dilakukan dengan tehnik steril menggunakan spuit 10 cc yang telah diisi sebelumnya dengan heparin sebanyak 1 cc. sebelum aspirasi dilakukan, kelinci dibius terlebih dahulu dengan pemberian injeksi ketamin 20 mg/kg BB intramuskular dan xylazin 3 mg / kg BB intramuskular. Regio trokanter femur pada ekstremitas belakang dicukur. Spuit di masukan menuju medulla femur dan dilakukan aspirasi *bone marrow* sebanyak 4–5 cc.

Isolasi, kultur dan ekspansi BM-MSCs

Bahan-bahan yang dipersiapkan untuk kultur sel adalah α MEM, *Ficol*, dan FBS. Sumsum tulang yang diperoleh dituang kedalam tabung disposibel 15 ml yang steril dan ditambahkan PBS 10 cc, kemudian lakukan resuspensi. Siapkan 5 cc *ficol* ke dalam tabung disposibel 15 ml yang steril, secara perlahan melalui dinding tabung tuangkan campuran marrow dan PBS. Lakukan sentrifugasi pada

temperature 20° C selama 25 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Dari hasil sentrifugasi akan diperoleh 4 lapisan yaitu sel darah merah, *ficol*, *buffy coat*, dan plasma. Dengan menggunakan pipet, *buffy coat* diambil dan diletakkan pada tabung disposibel 15 ml yang steril. Tambahkan PBS 10 cc tujuannya adalah untuk mencuci *buffy coat* yang diperoleh. Kemudian dilakukan sentrifugasi kembali dengan suhu 20° C selama 10 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Dari hasil sentrifugasi diperoleh pelet, pelet ini kemudian ditambahkan medium penumbuh α MEM sebanyak 2 cc kemudian lakukan resuspensi. Hasil resuspensi dipindahkan kedalam piring petri diameter 10 cc dan ditambahkan 10 cc medium penumbuh α MEM. Inkubasi pada incubator 37° C dengan kadar CO₂, dan pertumbuhan sel akan diamati setiap harinya.

Pertumbuhan sel terus diamati setiap harinya, pada hari kedua dilakukan pencucian sel, dengan cara medium lama diambil dan dicuci dengan menggunakan PBS, lalu diganti dengan medium baru. Hal ini dilakukan karena pada sumsum tulang didapatkan lemak, sisa sel darah merah dan *stem cells* hematopoietik. Sel yang diharapkan tumbuh adalah *stem cells* mesensimal yaitu sel yang melekat pada dinding Petri. Pada hari ke tujuh bila pertumbuhan sel telah konfluen 80% dilakukan *splitting*. Medium lama diambil dan ditambahkan tripsin 2 cc, kemudian tripsin diambil dan dibuang lalu tambahkan lagi 2 cc tripsin kemudian inkubasi 5 menit pada incubator. Penambahan tripsin yang pertama dilakukan untuk mencuci sel dan yang kedua dilakukan untuk merontokkan sel. Setelah 5 menit ditambahkan medium penumbuh α MEM sebanyak 2 cc kemudian dilakukan resuspensi untuk memisahkan sel yang rontok agar menjadi sel tunggal. Lalu hasil resuspensi dipindahkan ke dalam tabung disposibel 15 ml yang steril untuk kemudian dilakukan sentrifugasi. Pelet yang diperoleh ditambahkan medium penumbuh α MEM diresuspensi dan dipindahkan ke dalam 2 piring petri diameter 10 cc, masing-masing ditambahkan 10 cc medium penumbuh α MEM. Inkubasi kembali ke dalam incubator. Pertumbuhannya diamati setiap hari, passase yang dilakukan sampai dengan passase 4 di mana biasanya jumlah yang diinginkan telah tercapai dan ideal untuk diaplikasikan.

Karakterisasi BM-MSCs

Untuk melakukan pemeriksaan imunohistokimia sel dibuat menjadi sel tunggal. Pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan monoklonal antibodi FITC anti-human CD45 dan FITC anti-Human CD105 (BioLegend). Sampel yang akan diperiksa disentrifuge dengan kecepatan 9100 rpm selama 5 menit pada suhu 23° C. Supernatan yang

diperoleh dibuang dan tambahkan 200 mikro PBS kemudian resuspensi, dipindahkan pada tabung disposibel 15 ml yang steril dan ditambahkan PBS 10 cc. sentrifugasi dilakukan kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit dengan suhu 20° C. Pelet yang diperoleh ditambahkan medium penumbuh α MEM sebanyak 1 cc. *Object glass* disiapkan dan *object glass* yang akan digunakan dibersihkan dengan kapas alkohol terlebih dahulu, lalu sel tunggal ditanam @ 20 mikro, kemudian inkubasi pada inkubator selama 1 jam. Setelah itu masing-masing ditambahkan 5 mikro CD45/CD105, disimpan di lemari es selama 1 jam dan dijauhkan dari cahaya. Pengamatan CD45/CD105 dilakukan dengan menggunakan mikroskop flouoresen. *Mesenchymal stem cells* akan menunjukkan ekspresi positif pada CD105 berupa pendaran berwarna hijau, sedangkan pada CD 45 akan bereaksi negatif.

Pembuatan hidroksiapatit dari tulang sapi (Bovine hydroxyapatite-BHA)

Dibuat dengan pembersihan secara kimiawi terlebih dahulu kemudian diikuti dengan proses pemanasan (*furnacing*) tulang sapi sampai suhu 1000° C sehingga seluruh kandungan organik tulang sapi menguap. Proses ini dilakukan dengan menggunakan mesin *furnace Nabertherm P320 (Mb1)* 30–3000° C.

Karakterisasi BHA dilakukan untuk melihat kemiripan mikrostruktur dan komposisi BHA dibandingkan dengan tulang manusia. Karakterisasi dilakukan dengan JEOL JSM-T100 Scanning Microscope untuk melihat porositas dan mikrostruktur dan XRD (X-ray Diffractometer) Bruker.AXS Diffraktometer D8 untuk melihat komposisi hidroksiapatit.

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

MTT Assay dilakukan untuk memeriksa viabilitas sel terhadap paparan suatu zat, dengan menggunakan garam tetrazolium MTT. Pemeriksaan dilakukan pada *mesenchymal stem cells* dengan cara sebagai berikut. Dilakukan tripsinasi untuk melepas lapisan sel *stem cells* pada piring petri. Dibuat suspensi *mesenchymal stem cells* dengan penambahan CCM 20% sebanyak 5 mililiter. Suspensi sel dimasukkan kedalam *plate 96 well* sebanyak 50 μ l/*well* dengan kisaran jumlah sel 2×10^4 sel. Kemudian pada setiap *well* ditambahkan CCM 20% sebanyak 100 μ l/*well*. *Plate 96 well* yang telah berisi *mesenchymal stem cells* di inkubasi dalam incubator CO₂ dengan suhu 37° C selama 24 jam. Setelah 24 jam dimasukkan biomaterial yang telah disiapkan. Pada uji ini biomaterial yang dipakai adalah BHA, tulang *bovine* dan tulang alograf. *Plate 96 well*

yang telah berisi *mesenchymal stem cells* dan biomaterial di inkubasi lagi selama 19 jam. Setelah 19 jam diberikan larutan MTT sebanyak 25 $\mu\text{l/well}$. Kemudian diinkubasi kembali selama 5 jam. Setelah 5 jam medium diambil dan diganti dengan DMSO 200 $\mu\text{l/well}$. Di inkubasi selama 5 menit kemudian dibaca dengan elisa reader.

Implantasi (seeding) BM-MSCs ke dalam BHA

Proses implantasi (seeding) BM-MSCs ke dalam BHA dilakukan dengan tahapan sebagai berikut. BHA direndam dengan medium yang berisi α -MEM dan FBS, kemudian dimasukkan kedalam inkubator CO₂ selama 4 jam. Selanjutnya BHA diletakkan di dalam tabung dan dimasukkan *mesenchymal stem cells*. Tabung yang berisi komposit BHA dan *mesenchymal stem cells* dimasukkan ke dalam inkubator selama 16 jam. Secara periodik tabung digoyang untuk meratakan suspensi *stem cells*.

Implantasi komposit BM-MSCs dan BHA ke hewan coba

Operasi implantasi komposit BHA dan BM-MSCs ke hewan coba dilakukan di kamar operasi RS Hewan Fakultas Kedokteran Hewan. Prosedur dilakukan sebagai berikut. Kelinci dibius terlebih dahulu dengan pemberian injeksi ketamin 20 mg/kg BB intramuskular dan xylazin 3 mg/kg BB intramuscular kemudian bulu pada ekstremitas depan kanan dicukur. Insisi dilakukan lapis demi lapis sampai mencapai tulang ulna, kemudian tulang ulna berikut periosteumnya di potong sepanjang 1 cm. Pada kelompok perlakuan dilakukan implantasi komposit graf BHA dan BM-MSCs, sedangkan pada kelompok kontrol hanya diberi BHA saja untuk mengganti tulang ulna dan difiksasi dengan benang nylon 0,1. Luka operasi dijahit dan displint dengan gips. Hewan coba selama penelitian diletakkan dan bebas bergerak di dalam kandang.

Pemeriksaan Radiologi

Pemeriksaan dilakukan pada hari pertama operasi dan 8 minggu setelah operasi. Pemeriksaan menggunakan alat radiologi seri CH0028908-98 buatan RRC dengan film *fuji medical X-ray 100 NIF*. Hasil pemeriksaan radiologi di baca oleh 2 orang ahli radiologi.

Pemeriksaan histopatologi untuk matrik tulang

Spesimen penelitian berasal dari tulang ulna yang dipotong sepanjang 0,5 cm dibagian proksimal dan distal dengan graf terletak ditengahnya. Proses yang dilakukan sebelum pemeriksaan terdiri dari: dekalsifikasi yaitu dengan cara merendam spesimen penelitian ke dalam larutan EDTA jenuh dengan volume 50 kali bahan. Amati perubahannya jika ada gelembung udara berarti proses dekalsifikasi

berjalan baik. Larutan dekalsifikasi harus diganti setiap hari agar proses berjalan dengan baik. Jika gelembung udara sudah tidak tampak maka kemungkinan bahan keras sudah menjadi lunak. Untuk meyakinkan bahan bisa ditusuk dengan jarum. Setelah proses dekalsifikasi selesai dilanjutkan dengan pemrosesan bahan. Pertama sekali dilakukan dehidrasi untuk penarikan air secara bertahap dengan menggunakan formalin 10% kemudian alcohol 76%. Kemudian dilakukan penjernihan dengan tujuan agar di dapatkan spesimen yang transparan serta mengganti larutan alcohol yang ada dalam spesimen. Proses ini menggunakan xylol. Setelah selesai penjernihan dilakukan impregnasi untuk menyamakan spesimen dengan bahan pengeblok (*embedding*). pemrosesan bahan, penyayatan bahan dan pewarnaan jaringan. Proses ini dilakukan dengan merendam spesimen kedalam paraffin cair selama 4 jam. Proses selanjutnya adalah pengeblokan (*embedding*) untuk mempermudah penyayatan dengan mikrotom. Proses ini dilakukan dengan merendam spesimen paraffin cair sampai paraffin mengeras. Setelah proses pengeblokan selesai spesimen disayat dengan mikrotom secara longitudinal, dan selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan hematoxilin eosin. Hasil pemeriksaan histopatologi dibaca oleh dua orang ahli.

Pemeriksaan imunohistokimia untuk kolagen tipe I dan osteokalsin

Pemeriksaan menggunakan *Mouse Monoclonal Antibody to Collagen Type I (Acris Antibody GmbH)* untuk kolagen tipe I dan *Mouse Monoclonal Antibody anti-Osteocalcin (Novus Biologicals)* untuk osteokalsin. Preparat histology yang diperoleh dilakukan deparafinisasi yaitu dengan menggunakan xylol, alcohol absolut, alcohol 96%, dan alcohol 70%. Kemudian dicuci dengan menggunakan PBS sebanyak 2 kali masing-masing 3 menit. Inkubasi dengan *citrate buffer* 10 mM pH 6 pada *oven microwave*, lalu didinginkan kurang lebih 20 menit. Dicuci kembali dengan PBS dan inkubasi dengan tripsin 0,025% kurang lebih 15 menit pada suhu 37° C. Pencucian kembali dilakukan dengan PBS dan inkubasi dengan H₂O₂ 3% selama 10 menit. Cuci kembali dengan PBS dan tambahkan mAb yang akan digunakan (Osteocalcin/Collagen type I) selama 30 menit sampai 1 jam. Setelah itu cuci kembali dengan PBS dan inkubasi dengan *secondary Ab* selama 30 menit. Cuci dengan PBS dan inkubasi dengan streptavidin-HRP selama 30 menit. Cuci dengan PBS dan inkubasi dengan CAB-Chromogen (1:50) selama 10 menit. Pencucian kembali dilakukan dengan PBS dan Aquadest, lalu diinkubasi dengan hematoxilin selama 10 menit. Terakhir cuci dengan

air mengalir sampai berwarna biru lalu angin-anginkan hingga kering dan akhiri dengan proses mouting entelen.

Analisis Data

Data yang terkumpul terdiri dari 2 jenis data, yaitu data semi kuantitatif untuk pemeriksaan radiologi dan histopatologi serta data kuantitatif untuk pemeriksaan immunohistokimia kolagen tipe I dan osteoklasin. Analisis statistik yang dilakukan adalah: *one way Anova* untuk MTT Assay, uji reliabilitas 2 pemeriksa, uji normalitas pada semua data, uji komparasi data semikuantitatif hasil pemeriksaan radiologi dan histopatologi, uji komparasi data semikuantitatif union bagian distal dan proksimal dari hasil pemeriksaan histopatologi, uji komparasi data semikuantitatif matrik pada graf komposit, uji komparasi data kuantitatif hasil pemeriksaan immunohistokimia kolagen tipe I dan osteokalsin, uji data kuantitatif komparasi matrik tulang, uji korelasi antara matrik tulang dengan kolagen dan osteokalsin, uji korelasi antara histopatologi dengan osteokalsin dan kolagen, dan uji pengaruh produk osteoblas terhadap regenerasi *massive bone defect* dengan sem (*structural equation model*) PLS (*parsial least square*).

HASIL DAN DISKUSI

Dalam penelitian ini digunakan 32 ekor kelinci yang terbagi dalam 2 kelompok (kelompok kontrol dan perlakuan), masing-masing 16 ekor. Selama proses penelitian, terdapat masing-masing 4 ekor unit eksperimen yang hilang atau *drop out*, sehingga pada akhir perlakuan terdapat masing-masing 12 ekor unit eksperimen yang dapat diamati.

Hasil MTT assay

Tabel 3. Analisis one way anova pada periksaan MTT assay

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig
Between Groups	.028	3	.009	1.158	.337
Within Groups	.351	44	.008		
Total	.378	47			

Dari uji *one way Anova* didapatkan nilai signifikansi 0,337 ($> 0,05$) di mana tidak didapatkan perbedaan antara variable (*Tabel 3*).

Hasil pemeriksaan radiologi

Tabel 4. Analisis hasil pemeriksaan radiologi

Kelompok	N	Skor Gambaran Radiologi			Wilcoxon-Mann Whitney tes
		Median	Min	Maks	
Kontrol	12	10,5	6	12	p = 0,133
Perlakuan	12	11,0	9	12	

Hasil analisis dengan *Wilcoxon-Mann Whitney test* didapatkan nilai $p = 0,133$ ($p > 0,05$) yang berarti tidak ada perbedaan gambaran radiologi antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (*Tabel 4*).

Hasil pemeriksaan matrik tulang (histopatologis)

Hasil penilaian total matrik yang terbentuk dengan analisis semikuantitatif

Tabel 5. Analisis hasil pemeriksaan total matrik yang terbentuk

Kelompok	N	Skor Gambaran Histopatologi			Wilcoxon-Mann Whitney test
		Median	Min	Maks	
Kontrol	12	8,0	4	13	p = 0,000
Perlakuan	12	15,5	10	18	

Hasil analisis dengan *Wilcoxon-Mann Whitney test* didapatkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan gambaran histopatologi antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (*Tabel 5*).

Hasil penilaian union bagian distal dan proksimal graf dengan analisis semikuantitatif

Tabel 6. Analisis hasil pemeriksaan union distal

Kelompok	N	Skor Gambaran Radiologi			Wilcoxon-Mann Whitney tes
		Median	Min	Maks	
Kontrol	12	2,00	1	3	p = 0,000
Perlakuan	12	3,00	2	4	

Hasil analisis dengan *Wilcoxon-Mann Whitney test* didapatkan nilai $p = 0,001$ ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan gambaran union secara histopatologi pada bagian distal antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (*Tabel 6*).

Tabel 7. Analisis hasil pemeriksaan union proksimal

Kelompok	N	Skor Gambaran Radiologi			Wilcoxon-Mann Whitney tes
		Median	Min	Maks	
Kontrol	12	2,00	1	4	p = 0,015
Perlakuan	12	3,50	2	4	

Hasil analisis dengan *Wilcoxon-Mann Whitney test* didapatkan nilai $p = 0,015$ ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan gambaran union histopatologi pada bagian proksimal antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (Tabel 7).

Tabel 8. Analisis hasil penilaian matrik dalam graf

Kelompok	N	Skor Gambaran Radiologi			Wilcoxon-Mann Whitney tes
		Median	Min	Maks	
Kontrol	12	3,00	1	7	p = 0,000
Perlakuan	12	8,00	6	10	

Hasil analisis dengan *Wilcoxon-Mann Whitney test* didapatkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan gambaran union histopatologi pada bagian proksimal antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (Tabel 8).

Hasil penilaian matrik tulang dengan cara kuantitatif

Table 9. Analisis hasil pemeriksaan matrik tulang

Kelompok	N	Skor Gambaran Radiologi				Independent t-test
		Mean	SD	Min	Maks	
Kontrol	12	62,75	10,5	6	12	p = 0,133
Perlakuan	12	123,25	11,0	9	12	

Hasil analisis dengan *independent t-test* didapatkan nilai $p = 0,010$ ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan jumlah matrik antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (Tabel 9).

Hasil pemeriksaan kolagen tipe I

Tabel 10. Analisis hasil pemeriksaan kolagen tipe I

Kelompok	N	Kolagen				Independent t-test
		Mean	SD	Min	Maks	
Kontrol	12	338,98	64,06	237,22	459,0	t = 6,120 p = 0,000
Perlakuan	12	543,98	86,42	432,90	739,20	

Hasil analisis dengan *independent t-test* didapatkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan jumlah kolagen antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (Tabel 10).

Hasil pemeriksaan osteokalsin

Tabel 11. Analisis hasil pemeriksaan osteokalsin

Kelompok	N	Osteokalsin				Independent t-test
		Mean	SD	Min	Maks	
Kontrol	12	3,62	1,22	1,16	7,69	t = 5,417 p = 0,000
Perlakuan	12	10,78	4,55	4,84	19,15	

Hasil analisis dengan *independent t-test* didapatkan nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang berarti ada perbedaan jumlah osteokalsin antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (Tabel 11).

Korelasi antara pemeriksaan matrik semikuantitatif dengan kolagen tipe I

Untuk mengetahui korelasi antara pemeriksaan histopatologi dan kolagen tipe I dilakukan uji korelasi *Spearman's* dengan hasil sebagai berikut:

Dari uji korelasi *spearman* diketahui nilai signifikansi kurang dari 0,05 yaitu 0,00 berarti ada korelasi antara kadar kolagen dengan gambaran Histopatologi. Dengan koefisien korelasi 0,818 (Tabel 12).

Korelasi antara matrik semikuantitatif dengan osteokalsin

Dari uji korelasi *spearman* diketahui nilai signifikansi kurang dari 0,05 yaitu 0,00 berarti ada korelasi antara kadar osteokalsin dengan gambaran Histo PA. Dengan koefisien korelasi 0,788 (Tabel 13).

Korelasi antara pemeriksaan matrik kuantitatif dengan osteokalsin

Dari uji korelasi *pearson* diketahui nilai signifikansi kurang dari 0,05 yaitu 0,049 berarti ada korelasi antara kadar osteokalsin dengan matrik. Dengan koefisien korelasi 0,406 (Tabel 14).

Korelasi antara pemeriksaan matrik kuantitatif dengan kolagen tipe I

Dari uji korelasi *Pearson* diketahui nilai signifikansi kurang dari 0,05 yaitu 0,039 berarti ada korelasi antara kadar kolagen tipe I dengan matrik. Dengan koefisien korelasi 0,423 (Tabel 15).

Table 12. Analisis korelasi antara matrik semikuantitatif dengan kolagen tipe I

			Hasil_Kolagen	Hasil_HistoPA
Spearman's rho	Hasil_Kolagen	Correlation Coefficient	1,000	,818 (**)
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	24	24
	Hasil_HistoPA	Correlation Coefficient	,818 (**)	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	24	24

Tabel 13. Analisis korelasi matrik semikuantitatif dengan osteokalsin

			Hasil_HistoPA	Hasil_osteokalsin
Spearman's rho	Hasil_HistoPA	Correlation Coefficient	1,000	,788 (**)
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	24	24
	Hasil_osteokalsin	Correlation Coefficient	,788 (**)	1,000
		Sig. (2-tailed)	,000	.
		N	24	24

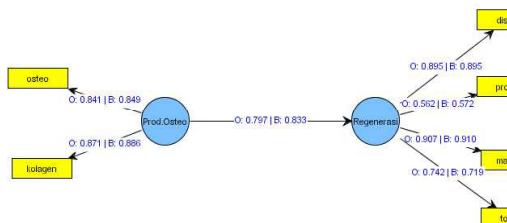
Table 14. Analisis korelasi antara matrik kuantitatif dengan osteokalsin

			Luas_Matrix	Hasil_osteokalsin
Luas_Matrix	Pearson Correlation		1	,406(*)
		Sig. (2-tailed)	.	,049
		N	24	24
Hasil_osteokalsin	Pearson Correlation		,406(*)	1
		Sig. (2-tailed)	,049	.
		N	24	24

Table 15. Analisis korelasi antara matrik kuantitatif dengan kolagen tipe I

			Luas_Matrix	Hasil_Kolagen
Luas_Matrix	Pearson Correlation		1	,423(*)
		Sig. (2-tailed)	.	,039
		N	24	24
Hasil_Kolagen	Pearson Correlation		,423(*)	1
		Sig. (2-tailed)	,039	.
		N	24	24

Pengaruh Produk Osteoblas terhadap Regenerasi Massive Bone Defect

**Gambar 1.** Gambar analisis korelasi antara produk osteoblas dengan regenerasi massive bone defect.

Dari analisis SEM menggunakan PLS, produksi osteoblas berpengaruh (0,797) terhadap regenerasi massive bone defect, dengan indikator yang paling kuat adalah variabel matrik dalam graf diikuti dengan union distal, total matrik (luas) dan union proksimal.

Isolasi, Kultur dan Karakterisasi mesenchymal stem cells

Darah sumsum tulang mengandung 2 jenis stem cells yaitu mesenchymal stem cells dan stem cells hematopoietik dengan jumlah yang sangat sedikit hanya 0,001–0,01% (1 cc

darah sumsum tulang mengandung 40 juta sel mononukleus dan didalamnya hanya terdapat 2000 stem sel). Pada penelitian ini yang digunakan adalah stem mesensimal, oleh karena itu sebelum digunakan diperlukan isolasi dan ekspansi untuk memperbanyak jumlah *mesenchymal stem cells*. Proses ini bisa dilakukan dengan metode *direct plating* atau dengan metode *ficoll gradient density*. Ekspansi *stem cells* dapat dilakukan sampai 500 kali jumlah semula dalam waktu 3 minggu. *Passage* sel dapat dilakukan sampai 20 kali, tetapi *passage* sel yang optimal untuk digunakan adalah sel hasil *passage* 2–4, di mana pada *passage* ini potensi sel masih sangat tinggi, dengan morfologi sel berbentuk spindle tipe RS (*rapidly self-renewing*) dan bukan berbentuk rhomboid tipe SR (*slowly replicating*). Sel yang digunakan pada penelitian ini berasal dari sel *passage* 4. (Chen et al., 2007; Gregory & Prockap, 2007; Rantam et al., 2009).

Jumlah sel yang digunakan tergantung dari jenis sel yang digunakan dan besar dan jenis *scaffold* yang digunakan. Sampai saat ini belum ada acuan baku untuk menghitung jumlah sel yang dibutuhkan. Dari penelitian terdahulu didapatkan bila memakai darah sumsum tulang diperlukan jumlah sel yang sangat besar mencapai $6-8 \times 10^7$, bila menggunakan *mesenchymal stem cells* berkisar $2-5 \times 10^7$ sel dan bila menggunakan sel yang telah berdiferensiasi berkisar 10^6 sel. Pemakaian jumlah sel yang terlalu banyak akan menimbulkan kematian sel yang besar karena pada saat awal implantasi akan terjadi kompetisi di antara sel untuk mendapat nutrisi dari pembuluh darah, sedangkan penggunaan sel yang terlalu sedikit akan menyebabkan proses penyembuhan tidak optimal karena produk *stem cells* yang telah berdiferensiasi juga sedikit. Alasan ini yang membuat peneliti menggunakan *mesenchymal stem cells* dengan jumlah 4×10^7 sel (Kadiyala et al., 1987; Bruder et al., 1998; Marcacci et al., 2007; Cuomo et al., 2009).

Stem cells yang berasal dari sumsum tulang terdiri dari *mesenchymal stem cells* dan *stem cells* hematopoitik. Pada kultur *stem cells* pada piring petri maka *mesenchymal stem cells* akan melekat sedangkan *stem cells* hematopoitik dan sel mononukleus lainnya tidak melekat. Dengan melakukan pencucian berulang diharapkan semua *stem cell* hematopoitik dan sel mononukleus lainnya dapat disingkirkan. *International Society for Cell Therapy* telah memberikan pedoman untuk mengetahui kemurnian *mesenchymal stem cells* yang di dapatkan dari hasil kultur yaitu *mesenchymal stem cells* harus memberikan hasil negatif terhadap penanda sel hematopoitik CD45, CD34,

CD14, CD11b dan penanda hematopoitik lainnya, dan memberikan hasil positif terhadap CD105 dan CD90. Pada penelitian ini penanda yang digunakan adalah CD45 dan CD105 (Gregory & Prockap, 2007). Hasil pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop fuoresen didapatkan *stem cells* yang dikultur memberikan hasil yang positif terhadap monoklonal antibodi FITC anti-Human CD105 (BioLegend) (berpendar hijau) dan negatif terhadap monoklonal antibodi FITC anti-human CD45 (tidak berpendar), yang berarti sel yang di kultur adalah *mesenchymal stem cells*.

Pembuatan dan Karakterisasi Bovine Hydroxyapatite (BHA)

Penelitian ini menggunakan hidroksiapatit yang diproduksi sendiri di Pusat Biomaterial – Bank Jaringan Dr. Soetomo. Mineral hidroksiapatit (mineral *bovine hydroxyapatite* (BHA) diproses melalui kombinasi proses kimiaawi dan *sintering/furnacing* sebagai berikut. Pertama, dilakukan pengambilan semua kotoran dan darah yang masih melekat pada tulang dengan metode kemikal, kedua, dilakukan pengambilan semua sisa kotoran beserta lemak dengan metode kemikal, ketiga, dilakukan pengeringan dengan menggunakan mesin *lyophilizer* sampai kadar air pada tulang di bawah 7%, keempat, dilakukan *sintering/furnacing* untuk menguapkan semua kandungan organik tulang dengan mesin *furnace Nabertherm P320 (Mb1) 30–3000° C* dengan kenaikan suhu $10^{\circ} C$ setiap 10 menit dan bila telah mencapai $1000^{\circ} C$ dipertahankan selama 1 jam, dan yang keempat mineral yang sudah terbentuk dicuci untuk menghilangkan semua gas toksik yang masih tertinggal dan dipanaskan kembali dengan suhu $150^{\circ} C$ untuk sterilisasi. Hasil akhir dari proses di atas adalah *bovine hydroxyapatite* (BHA) yang tidak mengandung unsur organik tulang. Untuk mengetahui apakah BHA yang dihasilkan sesuai atau menyerupai tulang manusia dilakukan pemeriksaan untuk mengukur pori-pori dan interkoneksi pori serta komposisi BHA. Hidroksiapatit yang baik harus dapat memfasilitasi pertumbuhan pembuluh darah baru dan deposisi tulang baru yang terbentuk, untuk ini diperlukan hidroksiapatit dengan ukuran pori-pori sebesar $150-500 \mu m$ (Muschler et al., 2004). Pemeriksaan dengan mikroskop elektron (JEOL JSM-T100 Scanning Microscope) untuk menentukan mikoarsitektur didapatkan pori-pori BHA mempunyai ukuran $200-500 \mu$ yang merupakan ukuran ideal untuk tumbuhnya osteoblas dan deposisi tulang baru serta infiltrasi pembuluh darah. Pemeriksaan untuk melihat komposisi mineral BHA dengan menggunakan X-ray difraktometer (BrukerAXS Diffraktometer D8)

menunjukkan komposisinya sama dengan tulang manusia. Pemeriksaan di atas menunjukkan bahwa BHA mempunyai mikroarsitektur dan komposisi sama dengan tulang.

Dalam pengembangan dan pembuatan biomaterial (scaffold) sangat penting untuk mengetahui apakah biomaterial ini dapat menopang kehidupan dan pertumbuhan sel yang akan di *seeding* di dalamnya. Salah satu metode yang banyak digunakan untuk melihat toksisitas biomaterial terhadap sel adalah dengan *MTT assay*. *MTT* [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay dilakukan dengan mengukur perubahan warna (kolorimetrik) menggunakan *Elisa reader* untuk mengetahui aktifitas metabolik sel. Pemeriksaan ini pertamakali diperkenalkan oleh Mosmann pada tahun 1983. Mitokondria sel yang hidup akan merubah *MTT* yang berwarna kuning menjadi formazan yang berwarna biru. Perubahan ini terjadi karena kemampuan enzim dehidrogenase mitokondria untuk memutus cincin tetrazolium *MTT*. Sel yang hidup akan memproduksi formazan secara proporsional bila diberi *MTT* (Canton *et al.*, 2007; Vannet *et al.*, 2007). Pada penelitian *MTT assay* yang telah dilakukan sebelumnya *mesenchymal stem cells* yang telah di kultur dipapar dengan berbagai biomaterial dari Pusat Biomaterial-Bank jaringan RSU Dr. Soetomo yaitu; *freeze-dried human bone*, *freeze-dried tulang bovine* dan mineral BHA dengan kelompok kontrol *stem cells* yang tidak diberi biomaterial. Hasil kolorimetrik dengan menggunakan *Elisa reader* yang didapatkan adalah tidak terdapat perbedaan antara kelompok biomaterial dengan kelompok kontrol yang berarti biomaterial tidak bersifat toksik terhadap *mesenchymal stem cells*, dan dapat menjadi tempat tumbuhnya *mesenchymal stem cells*.

Seeding Mesenchymal stem cells Kedalam BHA

Proses ini dilakukan untuk meletakan *stem cells* ke dalam pori BHA. BHA tidak mengandung protein terutama fibronectin yang sangat penting agar sel dapat melekat, oleh karena itu sebelum dilakukan seeding BHA di rendam di dalam media yang berisi α -MEM dan FBS selama 4 jam. Karena BHA mempunyai afinitas yang tinggi maka protein-protein yang ada di dalam media termasuk fibronectin akan terikat pada BHA. Pada saat *mesenchymal stem cells* dimasukkan ke dalam BHA maka *stem cells* akan melekat dan mendapat nutrisi dari suspensi medium. Komposit BHA dan *mesenchymal stem cells* dimasukkan kedalam inkubator selama 16 jam dan secara periodik di goyang dengan *shaker* agar media dan *stem cells* dapat terdistribusi secara merata. *Stem cells* yang digunakan berjumlah 4×10^7 sel.

Proses Penyembuhan

Implantasi komposit graf BHA dan BM-MSCs dilakukan dengan terlebih dahulu memotong tulang ulna hewan coba sesuai dengan kriteria *critical sized defect* yaitu sepanjang 2 kali diameter tulang. Pada penelitian ini tulang ulna hewan coba dipotong osteoperiosteal sepanjang 1 cm. Pemotongan tulang juga disertai dengan pengambilan periosteum untuk menghilangkan peran *mesenchymal stem cells* yang banyak berada di dalam periosteum.

Pada kelompok kontrol yang di implantasikan pada *massive bone defect* hewan coba hanya BHA saja. Karena mikrostruktur dan komposisi BHA menyerupai tulang manusia maka BHA mempunyai sifat osteokonduktif. Pada rekonstruksi *Massive bone defect* dengan menggunakan BHA maka proses penyembuhan sama dengan yang terjadi pada rekonstruksi menggunakan alograf. Pada kelompok perlakuan rekonstruksi dilakukan dengan memberikan komposit graf BHA dan BM-MSCs, karena komposit mempunyai sifat osteokonduktif, osteoinduktif dan osteogenesis maka penyembuhan yang terjadi sama dengan pemberian autograf.

Pada fase awal penyembuhan akan terjadi proses inflamasi karena adanya kerusakan tulang yang pada penelitian ini terjadi karena pemotongan tulang ulna. Kerusakan endotel pembuluh darah yang juga terjadi pada pemotongan tulang akan mengaktifkan kaskade komplemen, agregasi platelet dan melepas isi granul α . Degranulasi platelet akan melepas faktor pertumbuhan seperti PDGF, TGF- β dan sinyal-sinyal kemotaktik. Sel-sel polimorfonuklear, limfosit, monosit dan makrofag jaringan akan melepas sitokin yang akan merangsang angiogenesis, selanjutnya pembuluh darah yang baru terbentuk akan menginfiltrasi BHA. Hematom yang terbentuk merupakan sumber molekul-molekul sinyal yang akan memulai proses seluler pada penyembuhan tulang. Kerusakan pada matrik tulang resipien akan menyebabkan BMP yang terdapat di dalamnya akan terlepas. BMP ini mempunyai peran yang sangat penting dalam proses penyembuhan. Fase reparatif dimulai dalam beberapa hari pertama sebelum fase inflamasi berakhir, dan berlangsung sampai beberapa minggu. Hasil dari fase ini adalah terbentuknya jaringan kalus reparasi di dalam dan di sekitar tempat fraktur, yang akhirnya akan diganti oleh tulang. Salah satu peranan kalus adalah meningkatkan stabilitas fraktur. *Mesenchymal stem cells* mulai berdiferensiasi menjadi fibroblas, kondroblas, dan osteoblas. Sel ini bisa berasal dari jaringan yang mengalami trauma dan juga berasal dari tempat lain yang migrasi melalui pembuluh darah. Pada fase ini kalus terdiri

dari jaringan ikat, pembuluh darah, kartilago, tulang *woven*, dan osteoid.

Pada kelompok kontrol akan terjadi migrasi *mesenchymal stem cells* resipien mengikuti pembuluh darah yang masuk kedalam BHA. Sumber *mesenchymal stem cells* yang utama adalah periosteum di mana pada penelitian ini periosteum ikut diambil sehingga peran *mesenchymal stem cells* resipien menjadi berkurang, walaupun begitu masih ada *mesenchymal stem cells* dari donor yang ikut berperan dalam proses penyembuhan yang berasal dari periosteum terdekat dan jaringan disekitarnya. Karena terlepasnya sitokin seperti PDGF, BMP, IGF, FGF, TGF- β pada daerah *defect* tulang, maka akan terjadi proliferasi dan diferensiasi *mesenchymal stem cells* resipien menjadi fibroblas, kondroblas dan osteoblas. Pada BHA infiltrasi pembuluh darah hanya terjadi pada ujung distal, proksimal dan tepi graf saja, tidak mencapai seluruh mineral, oleh karena itu migrasi stem mesensimal juga hanya terjadi pada daerah tersebut. Pada fase reparatif ini *mesenchymal stem cells* dari resipien yang telah berproliferasi dan berdiferensiasi akan mulai memproduksi matrik tulang yang baru dan meletakkannya (deposisi) pada BHA. Oleh karena *mesenchymal stem cells* resipien hanya mencapai tepi BHA saja maka deposisi matrik tulang yang baru hanya terjadi pada daerah tepi BHA saja terutama ujung distal dan proksimal yang kontak langsung dengan tulang resipien dan proses ini berlangsung lebih lama daripada proses penyembuhan normal (*delayed union*).

Keadaan yang berbeda terjadi pada kelompok perlakuan. Pada rekonstruksi *massive bone defect* menggunakan komposit BHA dengan *mesenchymal stem cells* proses penyembuhan yang terjadi merupakan kontribusi *mesenchymal stem cells* resipien dan *mesenchymal stem cells* yang ada di dalam BHA. Pada fase inflamasi proses angiogenesis tidak hanya terjadi oleh karena pelepasan sitokin (VEGF) dari resipien saja, tetapi *stem cells* yang terdapat di dalam BHA juga menghasilkan VEGF yang berperan dalam pembentukan pembuluh darah baru. Mikroarsitektur BHA yang mempunyai pori-pori dan interkoneksi pori akan memfasilitasi masuknya pembuluh darah baru kedalam BHA lebih jauh kedalam oleh karena *stem cells* yang berada di dalamnya memproduksi VEGF. Pembuluh darah baru akan membawa nutrisi dan juga berbagai sitokin (PDGF, BMP, IGF, FGF, TGF- β) yang berperan dalam proses proliferasi dan diferensiasi *mesenchymal stem cells*. Pada fase reparatif stem mesensimal yang berasal dari resipien dan yang ada dalam BHA akan berproliferasi dan diferensiasi menjadi fibroblas, kondroblas dan osteoblas. Sel-sel ini akan mulai

memproduksi matrik tulang yang baru yang terdiri dari jaringan ikat fibrous, pembuluh darah, kartilago, tulang *woven* dan osteoid yang disebut sebagai kalus lunak (*soft callus*). Pori dan interkoneksi pori BHA dengan ukuran 200–500 μ menjadi tempat peletakan (deposisi) matrik tulang yang baru ini. Karena seluruh BHA mengandung sel maka peletakan (deposisi) matrik tulang yang baru terjadi di seluruh bagian BHA. Selain protein pembentuk matrik tulang, sel osteoblas juga akan memproduksi sitokin PDGF, BMP, IGF, FGF, TGF- β . Sitokin ini selanjutnya akan merangsang *mesenchymal stem cells* untuk berproliferasi dan diferensiasi menjadi osteoblas sekaligus merangsang osteoblas untuk memproduksi matrik tulang.

Dari uraian diatas terlihat bahwa *mesenchymal stem cells* yang terdapat di dalam BHA membawa dampak positif kepada lingkungannya dengan cara; pertama, VEGF yang dihasilkan *mesenchymal stem cells* akan menyebabkan terbentuknya pembuluh darah baru di dalam BHA yang mempunyai peran penting untuk nutrisi, kedua, sitokin yang dihasilkan oleh *mesenchymal stem cells* yang telah berdiferensiasi menjadi osteoblas akan mempunyai efek autokrin dengan merangsang dirinya sendiri untuk memproduksi matrik dan efek parakrin yang merangsang *stem cells* dan osteoblas disekitarnya. Dengan demikian maka komposit BHA dengan *mesenchymal stem cells* mempunyai sifat osteokonduktif, osteoinduktif dan osteogenesis.

Pada pemeriksaan radiologis data deskriptif menunjukkan bahwa hasil pemeriksaan radiologis kelompok perlakuan lebih baik daripada kelompok kontrol, tetapi hasil uji statistik menunjukkan tidak ada perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Pemeriksaan radiologi bertujuan untuk memberikan pencitraan secara keseluruhan pada daerah yang diinginkan secara makros. Gambaran radiologis yang dihasilkan tulang merupakan gambaran mineral yang ada didalamnya. Pemeriksaan radiologis pada penelitian ini dilakukan untuk menilai union pada bagian proksimal, distal, resorpsi graf dan pembentukan tulang baru. Dari hasil pemeriksaan radiologis baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan terjadi penyambungan antara graf dengan resipien dengan skor yang bervariasi. Pada penyembuhan fraktur pemeriksaan radiologi tidak memberikan hasil pada fase inflamasi dan fase reparatif awal, karena pada saat itu yang terbentuk adalah kalus lunak (*soft callus*) yang merupakan komponen organik matrik tulang dan belum mengandung mineral. Bila telah terjadi mineralisasi pada kalus (*hard callus*) pada fase reparatif lanjut maka pemeriksaan radiologis akan memberikan gambaran terbentuknya tulang baru (radio opak). Seperti

telah diuraikan di atas proses penyembuhan tulang pada pada kelompok kontrol juga terjadi walaupun berlangsung lebih lambat. Proses penyembuhan pada kelompok kontrol ini merupakan kontribusi *mesenchymal stem cells* resipien dan hanya terjadi pada tepi BHA (terutama pada kedua ujungnya). Berbeda halnya dengan kelompok perlakuan dimana proses penyembuhan terjadi karena kontribusi *mesenchymal stem cells* dari resipien dan donor, di mana proses penyembuhan terjadi pada seluruh bagian BHA.

Hasil pemeriksaan radiologis yang tidak berbeda antara kelompok kontrol dan kelompok penelitian disebabkan; Pertama, pada kedua ujung graf baik proksimal dan distal dari kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan terjadi proses penyembuhan fraktur. Pemeriksaan radiologi hanya memberikan gambaran makros proses penyembuhan, sehingga tidak dapat menilai seberapa jauh proses penyembuhan telah terjadi. Kedua, bila sejak awal dari gambaran radiologis tidak terdapat celah antara graf dengan resipien akan menimbulkan bisa pada saat di evaluasi 8 minggu setelah implantasi. Ketiga, pada pemeriksaan radiologi, BHA akan memberikan bayangan radio opak, sehingga gambaran pembentukan tulang baru di dalam mineral BHA pada kelompok perlakuan akan tertutup oleh bayangan mineral hidroksiapatit.

Pada penelitian terdahulu dengan menggunakan komposit hidroksiapatit sintetis dengan *mesenchymal stem cells* (Arinzeh et al., 2003; Bruder et al., 1998; Bakker et al., 2008) didapatkan penyembuhan bagian ujung graf yang kontak dengan resipien baik pada kelompok kontrol dengan *stem cells* maupun kelompok perlakuan dengan stem sel. Pada bagian tengah graf deposi tulang baru sulit dilihat karena tertutupi oleh radiopasitas hidroksiapatit. Perbedaan yang didapatkan adalah pada kecepatan terjadinya union dan deposisi tulang baru pada tepi graf. Petite (2000) menggunakan hidroksiapatit dari koral yang diberi *fresh bone marrow* (FBM) dan *mesenchymal stem cells* (BM-MSCs), hasil penelitian kelompok yang menggunakan FBM didapatkan pertumbuhan tulang ke dalam graf tetapi tidak sampai di tengah dan graf mengalami resorpsi, sedangkan pada kelompok dengan BM-MSCs didapatkan penyembuhan pada seluruh graf tetapi pada gambaran radiologis opasitasnya lebih rendah dari tulang resipien yang menunjukkan resorpsi hidroksiapatit terjadi dengan cepat. Pada pemakaian *massive* alograf untuk rekonstruksi *massive bone defect*, evaluasi radiologi didapatkan penyembuhan pada kedua ujung alograf yang kontak pada resipien, hanya saja penyembuhan lebih lambat dari normal (*delayed union*) (Ferdiansyah, 2002; Cara et al., 1994; Delloye et al., 2007).

Penilaian matrik tulang yang baru yang terlihat dari hasil pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan 2 metode yaitu semikuantitatif dengan sistem skor Lane dan Shandu dan kuantitatif dengan cara menghitung luas matrik yang terbentuk.

Pada proses penyembuhan fraktur tulang yang normal akan terjadi pembentukan matrik tulang dengan komposisi yang berbeda sesuai dengan fase-fase penyembuhan. Pembentukan matrik tulang baru ini diawali dengan terbentuknya pembuluh darah baru dan jaringan ikat hasil dari hematoma yang mengalami reorganisasi dan juga produksi dari *stem cells* yang berproliferasi menjadi fibroblas. Kemudian pada fase reparatif diikuti dengan pembentukan jaringan tulang rawan, pembuluh darah, jaringan ikat, *bone marrow*, tulang *woven* dan osteoid yang dihasilkan oleh *mesenchymal stem cells* yang telah berproliferasi dan diferensiasi menjadi fibroblas, kondroblas dan osteoblas. Pada fase reparatif lanjut akan terjadi endokondral osifikasi disertai dengan mineralisasi matrik. Pada fase *remodelling* terjadi penggantian tulang *woven* menjadi tulang lamela dan resorpsi kalus yang tumbuh berlebihan. Pada kelompok kontrol yang tidak mengandung *stem cells* maka pembentukan tulang baru tergantung dari *stem cells* resipien. Mineral hidroksiapatit (BHA) hanya mempunyai sifat osteokonduktif saja, karena tidak mengandung sel maupun faktor-faktor pertumbuhan. Hal ini bisa disamakan dengan transplantasi alograf yang besar (*massive allograft*). Pada transplantasi tulang alograf yang besar (*massive*) akan terjadi *delayed union* pada kedua ujung graf yang kontak dengan resipien, sedangkan bagian tengah tetap merupakan tulang mati atau bila ada proses pembentukan tulang walaupun minimal hanya terjadi pada bagian tepi graf yang kontak dengan jaringan lunak resipien. Pada kelompok kontrol, matrik yang terbentuk sebagian besar terdapat pada daerah ujung graf daerah kontak antara BHA dengan resipien, di mana *mesenchymal stem cells* dapat bermigrasi mencapai ujung mineral BHA dan meletakkan matrik tulang pada daerah tersebut dan sebagian kecil terjadi pada tepi graf. Pada kelompok perlakuan proses penyembuhannya sama dengan proses penyembuhan normal, karena komposit *bovine hydroxyapatite* (BHA) mengandung *mesenchymal stem cells* (BM-MSCs) di dalamnya. Mineral hidroksiapatit (BHA) mempunyai sifat osteokonduktif dengan struktur pori (200–500 μ), interkoneksi pori serta komposisi yang sama dengan tulang normal. Pori-pori ini merupakan tempat melekatnya *mesenchymal stem cells*, memungkinkan tumbuhnya pembuluh darah baru, dan akan menjadi tempat meletakkan matrik tulang yang baru, Pada saat terjadinya kerusakan tulang akan terjadi pelepasan

sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan oleh sel platelet, makrofag, osteoblas dan juga dari matrik tulang seperti PDGF, IGF, FGF TGF- β dan BMPs. Mineral hidroksiapatit mempunyai afinitas yang tinggi untuk mengikat sitokin-sitokin yang bersifat osteoinduktif ini, sehingga sitokin yang terikat dengan mineral hidroksiapatit akan menstimuli *mesenchymal stem cells* yang terdapat pada pori-pori mineral BHA untuk berdiferensiasi menjadi fibroblas, kondroblas dan osteoblas. Ketiga sel tadi akan memulai melakukan proses penyembuhan tulang sekunder. Akan diproduksi matrik tulang yang sesuai dengan fase penyembuhan tulang. Pemeriksaan histopatologi kelompok perlakuan menunjukkan berbagai jenis matrik penyembuhan tulang seperti jaringan ikat, jaringan tulang rawan, pembuluh darah, *bone marrow*, tulang *woven* dan tulang berlamela yang tersebar di seluruh bagian BHA. Pada pemeriksaan histopatologi ini juga bisa dibuktikan bahwa BHA tidak menimbulkan reaksi imun (inert) pada hewan coba. Baik pada kelompok kontrol maupun kelompok resipien tidak ditemukan sel-sel radang baik berupa sel polimorfonukleus maupun sel mononukleus, hal ini disebabkan BHA tidak mengandung protein dan matrik organik lainnya yang telah dihilangkan pada saat proses *sintering*.

Pada penelitian terdahulu dengan menggunakan komposit hidroksiapatit sintetis dengan *mesenchymal stem cells* terjadi pembentukan matrik tulang. **Kadiyala** (1997), **Bruder** (1998) mendapatkan pembentukan matrik tulang distribusinya tidak sesuai dengan tulang normal oleh karena hidroksiapatit sintetis tidak memiliki interkoneksi pori. **Bensaid** (2005) melakukan penelitian menggunakan komposit hidroksiapatit koral dan *mesenchymal stem cells* hanya satu dari tujuh hewan coba yang sembuh, hal ini disebabkan resorpsi hidroksiapatit koral yang terlalu cepat, dengan menggunakan modifikasi *porous coralline – based hydroxyapatite* dia mendapatkan penyembuhan 5 dari tujuh hewan coba, pada pemeriksaan histopatologi pembentukan tulang baru terutama terjadi pada tepi graf. **Marcacci** (2007) melakukan evaluasi pada 4 pasien yang diberi komposit hidroksiapatit sintetis dan *mesenchymal stem cells* dengan masa evaluasi 1–7 tahun. Evaluasi hanya dilakukan secara radiologi, didapatkan inkorporasi pada keempat pasien dan tidak ada tanda resorpsi dari hidroksiapatit.

Berbeda dengan penilaian secara radiologis, dengan penilaian histopatologi untuk melihat penyembuhan pada kedua ujung graf (distal dan proksimal) maka didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, di mana kelompok perlakuan memberikan hasil yang lebih baik. Penilaian union secara histopatologi didasarkan pada jaringan yang terbentuk

pada *defect* antara resipien dan graf. Pada kedua kelompok penelitian *defect* telah terisi jaringan, bisa berupa jaringan fibrosa, osteokondral, tulang atau komplis terisi oleh tulang. Pada kelompok kontrol matrik yang terbentuk pada *defect* antara graft dan resipien sebagian besar adalah jaringan fibrosa dan jaringan osteokondral. Jaringan yang terbentuk ini merupakan hasil deposisi oleh sel dari resipien. Pada kelompok perlakuan, pemeriksaan histopatologi pada *defect* antara graf dan resipien sebagian besar berisi jaringan tulang. Perbedaan jaringan yang terbentuk menunjukkan adanya perbedaan kecepatan penyembuhan, di mana kelompok perlakuan proses penyembuhan berlangsung lebih cepat. Perbedaan antara kedua kelompok ini disebabkan proses penyembuhan pada kelompok kontrol merupakan hasil kontribusi *stem cells* resipien dan donor, sehingga memberikan hasil yang lebih baik.

Penilaian pembentukan matrik secara kuantitatif dalam graf dilakukan hanya memeriksa matrik yang terbentuk di dalam mineral BHA dan tidak menilai daerah ujung-ujung mineral, sehingga dapat meminimalkan peran *mesenchymal stem cells* resipien. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan di mana hasil kelompok perlakuan lebih baik. Pada bagian tengah kelompok kontrol matrik yang terbentuk di dalam pori-pori BHA sebagian besar adalah jaringan ikat padat. Pada kelompok perlakuan karena adanya *mesenchymal stem cells* di dalamnya terdapat matrik tulang berupa jaringan fibrosa longgar dengan matrik mikroid, tulang rawan, tulang *woven* dan tulang lamella, di samping itu juga didapat banyak terlihat pembuluh darah baru yang terbentuk pada pori mineral disertai kelompok sumsum tulang baru.

Pada penilaian matrik secara kuantitatif ditujukan pada matrik yang telah menjadi tulang. Luas matrik tulang baru diukur dengan satuan mikron. Pada penilaian didapatkan perbedaan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, di mana kelompok perlakuan hasilnya lebih baik. sesuai dengan penjelasan yang telah diuraikan di atas, di mana pada kelompok kontrol hanya sedikit matrik tulang yang terbentuk dan lokasinya sebagian besar adalah pada kedua ujung graf. Sedangkan pada kelompok perlakuan matrik tulang yang terbentuk lebih banyak dan tersebar di seluruh graf.

Komposisi tulang terdiri dari terdiri dari 40% komponen organik dan 60% komponen inorganik. Komposisi komponen organik terdiri dari kolagen (80–90%) dan protein non kolagen (10–20%). Pada penelitian ini peneliti memakai kolagen tipe I sebagai variabel karena kolagen tipe I merupakan kolagen terbanyak pada tulang (80%) sedangkan selebihnya adalah kolagen tipe III dan X.

Kolagen diproduksi oleh osteoblas pada fase reparatif. Kolagen mempunyai peran utama memberikan kekuatan tarik pada tulang (*tensile strength*), selain itu serabut kolagen akan tersusun memanjang longitudinal berselang-seling (*overlapping*) dan dicelahnya akan terjadi deposisi mineral hidroksiapatit yang baru. Jumlah serabut kolagen yang tinggi pada kelompok perlakuan merupakan hasil dari produksi *mesenchymal stem cells* pada BHA yang telah berdiferensiasi menjadi osteoblas.

Osteokalsin merupakan protein spesifik yang hanya di produksi oleh osteoblas. Osteokalsin mempunyai peran penting dalam regulasi pembentukan kristal hidroksiapatit (mineralisasi), oleh karena itu osteoklasin baru bisa di deteksi pada fase reparatif lanjut dimana telah mulai terbentuk mineralisasi kalus (*hard callus*). Pada kelompok perlakuan didapatkan sel yang mengekspresikan osteokalsin lebih banyak daripada kelompok kontrol, hal ini menunjukkan bahwa *mesenchymal stem cells* yang terdapat di dalam mineral hidroksiapatit telah berproliferasi menjadi osteoblas dan mempunyai kemampuan memproduksi osteokalsin.

Pada analisis multivariat menunjukkan produk osteoblas yaitu kolagen tipe I dan osteoklasin berpengaruh terhadap regenerasi *massive bone defect*. Variabel yang memberikan kontribusi terbesar adalah matrik yang terbentuk dalam komposit graf. Seperti telah diterangkan di atas penyembuhan pada komposit graf juga dipengaruhi oleh sel-sel yang berasal dari resipien, kecuali pada bagian tengah komposit graf. Penetrasi sel resipien tidak bisa mencapai bagian tengah komposit graf, sehingga matrik tulang yang terbentuk pada bagian tengah merupakan kontribusi *mesenchymal stem cells* yang dicangkokkan.

Temuan baru

Penelitian ini telah menghasilkan beberapa temuan baru yaitu:

1. Menemukan metode pembuatan BHA, sehingga didapatkan BHA yang bersifat tidak toksik, *inert* (tidak menimbulkan reaksi imunologi) karena tidak mengandung protein, mempunyai mikroarsitektur dan mempunyai komposisi yang sama dengan tulang manusia.
2. Membuat komposit graf yang baru yaitu BHA dan *mesenchymal stem cells* dimana *scaffold* BHA dapat menjadi tempat tumbuh dan diferensiasi *mesenchymal stem cells* menjadi osteoblas, memfasilitasi tumbuhnya pembuluh darah baru, dan menjadi tempat deposisi matrik tulang baru yang terbentuk sehingga terjadi regenerasi pada *massive bone defect*.

Implikasi hasil

Temuan penelitian ini menambah alternatif baru bahan graf pengganti tulang (*bone material substitute*). BHA sendiri dapat digunakan pada *defect* tulang yang kecil, karena pada *defect* tulang kecil umumnya potensi penyembuhan tulang masih normal dan hanya membutuhkan *scaffold* untuk tempat tumbuhnya tulang yang baru sehingga proses penyembuhan tulang dapat dipercepat. Pada *massive bone defect* komposit BHA dengan *mesenchymal stem cells* dapat menjadi alternatif *massive* alograf.

SIMPULAN

Simpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Terdapat produksi matrik pada *massive bone defect* yang telah direkonstruksi dengan menggunakan komposit graf BHA dan *mesenchymal stem cells* yang lebih baik daripada kelompok kontrol baik secara semikuantitatif ($p = 0,000$) dan kuantitatif ($p = 0,010$), yang merupakan hasil produksi *mesenchymal stem cells* yang telah berdiferensiasi menjadi osteoblas.
2. Terdapat produksi serabut kolagen tipe I pada *massive bone defect* yang telah direkonstruksi dengan menggunakan komposit graf BHA dan *mesenchymal stem cells* yang lebih baik dari kelompok kontrol ($p = 0,000$), yang merupakan hasil produksi *mesenchymal stem cells* yang telah berdiferensiasi menjadi osteoblas.
3. Terdapat ekspresi osteokalsin pada *massive bone defect* yang telah direkonstruksi dengan menggunakan komposit graf BHA dan *mesenchymal stem cells* yang lebih baik dari kelompok kontrol ($p = 0,000$).
4. Terjadi inkorporasi antara komposit graf BHA dan *mesenchymal stem cells* dengan resipien dengan analisis histopatologis pada bagian proksimal ($p = 0,015$) dan distal ($p = 0,000$), tetapi dengan pemeriksaan radiologis tidak didapatkan perbedaan ($p = 0,133$).
5. Produk osteoblas berupa kolagen dan osteokalsin berpengaruh terhadap regenerasi *massive bone defect*, di mana pada analisis multivariat didapatkan angka 0,797.

Dari uraian tersebut, ternyata bahwa dengan menggunakan komposit graf mineral BHA dengan *mesenchymal stem cells* terjadi regenerasi pada *massive bone defect*, oleh karena itu komposit graf ini dapat menjadi alternatif graf untuk rekonstruksi *massive bone defect*.

SARAN

1. Temuan ini dapat dikembangkan untuk melengkapi variable yang belum diteliti karena membutuhkan waktu yang lebih panjang seperti kekuatan mekanik dari komposit BHA dan BM-MSCs yang telah mengalami regenerasi, dan waktu reabsorpsi dari mineral hidroksiapatit.
2. Mineral hidroksiapatit (BHA) yang telah dibuat dapat diteliti pada manusia untuk aplikasi klinis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurrahman**, 2002. Indonesian Tissue Banking: Progress on Tissue Production and Development of Quality Assurance, the 9th International Conference on Tissue Banking-Asia Pacific Association of Surgical Tissue Bank. Seoul.
- Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, et al**, 2003. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Regenerate Bone in Critical-Sized Canine Segmental Defect. *J Bone Joint Surg*. Vol. 85-A(10): 1927–1935.
- Bensaid W, Oudina K, Viateau V, et al**, 2005. De Novo Reconstruction of Functional Bone by Tissue Engineering in the Metatarsal Sheep Model. *Tissue. Eng*, 11(5/6); 814–824.
- Bakker A, Schrooten J, Van Ceynenbreugel T et al**, 2008. Quantitatif Screening of Engineered Implants in a Long Bone Defect Model in Rabbits. *Tissue Engineering*. Vol. 14–3: 251–200.
- Betz RB**, 2002. Limitation of Autograf and Alograf: New Synthetic Solutions. *Orthopaedics*. Vol. 25(5). S561-s570.
- Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S**, 1998. The Effect of Implant Loaded with Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Healing of Canine Segmental Bone Defects. *J Bone Joint Surg*. Vol. 80-A (7): 985–996.
- Bruder SP, Kurth AA, Shea M, et.al**, 1998. Bone Regeneration by Implantation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res*. Vol. 16(2): 155–162.
- Bruder SP, Scaduto TS**, 2005. Cell Based Strategies for Bone Regeneration from Development Biology to Clinical Therapy. In (Lieberman JR, Friedlander GE, eds). *Bone Regeneration and Repair Biology and Clinical Applications* Humana Press, New Jersey: 67–92.
- Burchadt H**, 1983. The Biology of Bone Graf. *Clin Orthop*, 174; 28–40.
- Cara JA, Lacleriga A, Canadel J**, 1994. Intercalary Bone Allografts 23 Tumor Cases Followed 3 Years. *Acta Orthop Scand*. 65(1): 42–46.
- Canton I, Sarwar U, Kemp H, et al.**, 2007. Real-Time Detection of Stress in 3D Tissue-Engineered Constructs Using NF-kB Activation in Transiently Transfected Human Dermal Fibroblast Cells. *Tissue Engineering*, Vol. 13-5: 1013–1026.
- Chen FH, Song Li, Mauck RI, Li WJ, et al**, 2007. Mesenchymal Stem Cells. In (Lanza R, Langer R, Vacanti J, eds). *Principles of Tissue Engineering*. 3rd Edition. Elsevier Academic Press, London: 823–843.
- Cuomo AV, Virk M, Petrigliano F et al.**, 2009. Mesenchymal Stem Cell Concentration and Bone Repair: Potential Pitfalls from Bench to Bedside. *J. Bone Joint Surg (Am)*. Vol. 91-A, No. 5: 1073–1083.
- Delloye C, Cornu O, Druetz V, et al.**, 2007. Bone Allograft What They can Offer and What They Cannot. *J. Bone Joint Surg (Br)*, Vol. 89-B: 574–579.
- Ferdiansyah, Abdurrahman**, 1997. Pengalaman Transplantasi Allograf untuk Rekonstruksi Celah pada Tulang di RSUD Dr. Soetomo Surabaya. *Majalah Orthopaedi Indonesia*. Vol. XXV. No. 1. 26–33.
- Ferdiansyah**, 1998. Comparison of The Biomechanical Study Between Fresh-Frozen Bone and Fresh-Frozen Pasteurized Bone. 7th International Conference on Tissue Banking, Asia Pacific Association of Surgical Tissue Bank, Kuala Lumpur-Malaysia.
- Ferdiansyah**, 2002. Massive Alograf Reconstruction for Bone Tumor. The 9th International Conference on Tissue Banking, Asia Pacific Association of Surgical Tissue Banking, Seoul–Korea.
- Ferdiansyah**, 2007. Use of Freeze-Dried Irradiated Bones in Orthopaedic Surgery. In (Nather A, Yusof N, Hilmy N, eds). *Radiation in Tissue Banking Basic Science and Clinical Applications of Irradiated Tissue Alografts* World Scientific, Singapore: 317–326.
- Friedlander GE**, 1983. Immune Responses to Osteochonfral Alografts, Current Knowledge and Future Direction. *Clin Orthop*, 174; 56–68.
- Goldberg VM, Caplan AI**, 2004. Principles of Tissue Engineering and Regeneration of Skleetal Tissue. In (Goldberg VM, Caplan AI, eds). *Orthopaedic Tissue Engineering Basic Science and Practice*. Marcel Dekker Inc, New York: 1–10.
- Gregory CA, Prockop DJ**, 2007. Fundamental of Culture and Characterization of Mesenchymal

- Stem/Progenitor Cells (MSC) from Bone Marrow Stroma. In (Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM, eds). Culture of Specialized Cells Culture of Human Stem Cells. Jhon Wiley & Sons, Inc. New Jersey; 207–232.
- Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, et al**, 2002. Bone Graf Substitute: Facts, Fictions & Applications. Committee on Biological Implants. American Academy of Orthopaedic Surgeons. 69th Annual Meeting. Dallas, Texas.
- Guo MZ, Xia ZS, Lin AB**, 1991. The Mechanical and Biological Properties of Demineralized Cortical Bone Alografts in Animal. J Bone Joint Surg (Br). 73-B. 791–794.
- Hernigou PH, Poignard A, Beaujean F, Rouard H**, 2005. Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting For Nonunions; Influence of the Number and Concentration of Progenitor Cells. J. Bone Joint Surg; Vol. 86-A(7): 1430–1437.
- Joyce MJ, Greenwald AS, Mowe J, et al.**, 2002. Musculoskeletal Alograf Tissue Safety. Committee on Biological Implants. American Academy of Orthopaedic Surgeons. 69th Annual Meeting. Dallas, Texas.
- Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP**, 1997. Culture Expanded Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Can Generate a Critical Sized Segmental Bone Defect. Tissue Engineering, Vol. 3–2: 173–185.
- Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al.**, 2007. Stem Cells Associated with Macroporous Bioceramics for Long Bone Repairs: 6 to 7 Year Outcome of a Pilot Clinical Study. Tissue Engineering. Vol. 13–5: 947–955.
- Muschler GE, Nakamoto C, Griffith LG**, 2004. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. J.Bone Joint Surg; Vol. 86-A(7): 1542–1558.
- Pelker RR, Froedlander GE, Markham TC**, 1983. Biomechanical Properties of Bone Alografts. Clin Orthop, 174; 55–57.
- Petite H, Viateau V, Bensaid W et al.**, 2000. Tissue Engineered Bone Regeneration. Nature Biotechnology, Vol. 19: 959–963.
- Rantam FA, Ferdiansyah, Nasronudin, et al.**, 2009. Stem Cell Exploration Methods of Isolation and Culture. Airlangga University Press. Surabaya.
- Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, et al.**, 2005. Current Concept Review Bone Morphogenetic Protein Development and Clinical Efficacy in the Treatment of Fractures and Bone Defects. J Bone Joint Surg. 87-A. No. 6. 1367–1378.
- Urist MR, Litze A, Mizutani H, et al.**, 1982. A Bovine Molecular Weight Bone Morphogenetic Protein (BMP) Fraction. Clinical Orthopaedics and Related Research. Vol. 162, Jan-Feb. 219–232.
- Vaccaro AR**, 2002. The Role of the Osteoinductive *Scaffold* in Synthetic Bone Graf. Orthopaedics; Vol. 25(5): s571-s578.
- Vannet BV, Hanssens JL, Wehrbein H**, 2007. The Use of Three-dimensional Oral Mucosa Cell Cultures to Assess the Toxicity of Soldered and Welded Wires. European Journal of Orthodontics. Vol.29: 60–66.
- Vogens E, Jones NF, Huang JI, et al.**, 2005. Healing of Citical Sized Defect in the Rat Femur with Use of a Vasvularized Periosteal Flap, a Biodegradable Matrix, and Bone Morphogeneric Poteins. J Bone Joint Surg. 87,6. 1323-1331.