



UNMAS DENPASAR

BUKU AJAR

Nano Chitosan Mempercepat Regenerasi Tulang Alveolar Pasca Apekreseksi Melalui Sel Osteoblas, Sel Osteoklas, Mast Cell dan Growth Factor



Dr. drg. Dewa Made Wedagama

***Nano Chitosan* Mempercepat Regenerasi Tulang Alveolar Pasca Apekreseksi**

Disusun Oleh:

Dewa Made Wedagama

ISBN :

Editor :

Ria Koesoemawati

Ida Bagus Ari Arjaya

Penerbit : Universitas Mahasaraswati Press

Redaksi : Universitas Mahasaraswati Denpasar

Jln Kamboja 11 A Denpasar 80233

Telp/fax (0361) 227019

unmaspress@gmail.com

web.www.unmas.ac.id

Cetakan pertama: Januari 2018

Hak Cipta © 2018, pada penulis

Hak Publikasi pada Unmas Press

Dilindungi Undang-undang Dilarang memperbanyak karya tulis ini dalam bentuk dan nama apapun tanpa ijin penerbit

KATA PENGANTAR

Atas segala puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa pencipta Alam semesta, dan segala berkat serta rahmat-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan buku ajar ini sesuai dengan rencana-Mu Tuhan.

Kerusakan tulang alveolar yang disebabkan oleh kelainan sistemik, fraktur dan pengambilan dengan sengaja, sehingga menyebabkan terjadinya ruangan pada struktur tulang alveolar. Untuk mengembalikan keadaan tulang tersebut seperti semula, Osteoblas, Osteosit dan Osteoklas merupakan faktor penunjang dalam proses *bone healing*. Jenis cangkok tulang terdiri dari *autograft*, *allograft*, *xenograft* dan *alloplast*, memiliki potensial untuk mempertahankan sel hidup yang diganti oleh *host* dan tidak menimbulkan reaksi imunologi. *Nano chitosan* dan PRP merupakan substansi yang sinergi, *nano chitosan* berfungsi sebagai *scaffold* tetapi rapuh, sedangkan PRP merupakan *growth factor* yang akan memperkuat *nano chitosan* sehingga *scaffold* tidak menjadi rapuh. Atas dasar itu maka kombinasi penggunaan *nano chitosan* dan PRP sangat menguntungkan dalam memperoleh *scaffold* secara fungsional yang maksimal

Tujuan buku ajar ini dapat memberikan manfaat bagi para dokter gigi praktisi, dosen, mahasiswa kedokteran/kodokteran gigi untuk meningkatkan kualitas pelayanan dan perawatan tulang yang mengalami kelainan.

Terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setulus-tulusnya saya ucapkan kepada Prof. Dr.dr.Edi Widjajanto,MS.,SpPK(K), Prof.Dr.dr.Bambang Pardjianto.SpB.,SpBP(K), Prof Sutiman, Dr.dr.Ketut Muliarta,SpPA atas masukan dan bimbingan sehingga buku ajar ini bisa terselesaikan, semoga Tuhan Yang Maha Esa senantiasa melimpahkan rahmat dan anugrah-Nya kepada kita sekalian.

God bless you all

Denpasar,

Daftar Isi

UCAPAN TERIMA KASIH.....	Error! Bookmark not defined.
Kata Pengantar.....	Error! Bookmark not defined.
Daftar Isi	II
BAB I.....	1
Pengobatan Granuloma dan Kista Dengan Cara Apekreseksi	1
1. Pendahuluan.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Permasalahan	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	2
2. Pembahasan.....	3
2.1 Definisi dan Etiologi.....	3
2.2 Etiologi.....	3
2.3 Patogenesis Granuloma dan Kista Periapikal	4
2.4. Teknik Apekreseksi	9
3. Kesimpulan dan saran	16
3.1 Kesimpulan	16
3.2 Saran	16
Daftar Pustaka.....	17
BAB II.....	20
Proses <i>Nano Chitosan</i> Dari Limbah Kulit Udang Sebagai Pendukung	20
Pada Regenerasi Tulang Alveolar.....	20
1. Pendahuluan.....	20
1.1 Latar Belakang.....	20
1.2 Permasalahan	21
1.3 Tujuan	21
1.4 Manfaat	21
2. Pembahasan.....	22
2.1 Pembuatan <i>Chitosan</i>	23
2.2 Karakteristik Kitin dan <i>Chitosan</i>	24
2.3 Manfaat <i>Chitosan</i>	25
2.4 Proses Regenerasi Tulang alveolar	32
3. Kesimpulan dan Saran	34
3.1 Kesimpulan	34
3.2 Saran	35
Daftar Pustaka.....	35
BAB III	39
Peran Osteoblas, Osteosit, Osteoklas dan bahan cangkok tulang dalam proses regenerasi tulang.....	39
1. Pendahuluan.....	39
1.1 Latar Belakang.....	39
1.2 Permasalahan	40
1.3 Tujuan	40
1.4 Manfaat	40
2. Pembahasan.....	41
2.1 Struktur Tulang.....	41
2.2 Histologi Tulang	42
2.3 Cangkok Tulang.....	46
2.4 Bahan Cangkok Tulang.....	46
2.5 Perkembangan bahan cangkok tulang.....	47
2.6 Formasi Osteoblas dan Tulang.....	47
2.7 Remodeling Tulang.....	49
3. Kesimpulan dan saran.....	49

3.1 Kesimpulan	49
3.2 Saran	50
Daftar Pustaka	50
BAB IV	53
Pengaruh Makrofag Terhadap Respon Inflamasi Lokal dan Sistemik Pada Proses Regenerasi Tulang Alveolar	53
1. Pendahuluan	53
1.1 Latar Belakang	53
1.2 Permasalahan	54
1.3 Tujuan	54
1.4 Manfaat	54
2. Tinjauan Pustaka	55
2.1 Respon tubuh terhadap trauma	55
2.2 Respon inflamasi	58
2.3 Sitokin pasca trauma	63
2.4 Regenerasi tulang alveolar	67
3. Kesimpulan dan Saran	72
3.1 Kesimpulan	72
3.2. Saran	72
Daftar Pustaka	73
BAB V	78
Pengaruh <i>Platelet-Rich Plasma</i> Terhadap Kultur Osteoblas	78
Yang Mengandung <i>Nano Chitosan</i>	78
1. Pendahuluan	78
1.1 Latar Belakang	78
1.2 Rumusan Masalah	80
1.3 Tujuan	80
1.4 Manfaat	80
2. Tinjauan Pustaka	80
2.1 Rekayasa Jaringan (<i>Tissue Engeneering</i>)	80
2.2 Tulang	82
2.3 Fisiologi Tulang	82
2.4 Massa Tulang	82
2.5 Hubungan Osteoblas dan Oteoklas	85
2.6 Kultur Sel Tulang	87
2.7 Mekanisme Regenerasi dan Augtimensi Tulang	87
2.8 Aktivitas Seluler Proses Regenerasi Tulang-Graft V	88
2.9 Nano Chitosan	89
2.10 Platelet-Rich Plasma	90
2.11 Perhitungan Platelet	92
2.12 Platelet-Rich Plasma, Osteoblas Dengan <i>Nano Chitosan</i>	92
3. Kesimpulan dan Saran	95
3.1 Kesimpulan	95
3.2 Saran	96
Daftar Pustaka	96
BAB VI	99
Teknik Menentukan Tingkat Proliferasi Sel Osteoblas, <i>Mast cell</i> Pada	99
Kultur Sel Osteoblas	99
1. Pendahuluan	99
1.1 Latar Belakang	99
1.2 Rumusan Masalah	100
1.3 Tujuan	101
1.4 Manfaat	101
2. Tinjauan Pustaka	101
2.1 Kultur Sel	101

2.1.2 Perkembangan Implementasi Teknologi Kultur Sel	103
2.2 Struktur Tulang	103
2.3 Sel Tulang	104
2.4 Macam-macam Teknik Proliferasi Sel.....	109
3. Kesimpulan dan Saran	114
3.1 Kesimpulan	114
3.2 Saran	115
Daftar Pustaka.....	115

BAB I

Pengobatan Granuloma dan Kista Dengan Cara Apekreseksi

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Kelainan periapikal disebabkan oleh karena adanya kontaminasi bakteri, yang dapat bersumber dari karies gigi, kontaminasi saliva pada gigi yang fraktur, tambalan yang tidak bagus, ataupun kontaminasi yang berasal dari perawatan endodontik. Infeksi bakteri ini pada akhirnya akan menyebabkan nekrosis pada pulpa, dan lingkungan endodontik akan menyediakan habitat yang baik bagi polimikroba sehingga mereka dapat hidup pada bagian apikal saluran akar. Produk-produk mikrobial akan dihasilkan dan mengakibatkan aktivasi sistem pertahanan tubuh. Reaksi yang dinamis pada periapiks antara mikroba dan faktor pertahanan ini dapat menghasilkan berbagai kategori lesi periodontitis apikal. Keseimbangan reaksi pertahanan tubuh terhadap invasi pada periapiks, apakah mendukung pertahanan tubuh atau melemahkan pertahanan tubuh, menentukan gambaran histologis dari lesi periapikal (Nair 2004; Ørstavik 2004)

Suatu pertimbangan dalam menentukan perawatan inflamasi pada jaringan pulpa gigi ialah jika sesudah perawatannya gigi masih dapat direstorasi sehingga fungsinya normal kembali secara estetik , mastikasi dapat diterima dengan baik. Beberapa macam restorasi dapat dilakukan untuk mempertahankan dan melindungi gigi yang dirawat (Bence 2000)

Adanya perubahan patologis yang terjadi pada pulpa mengakibatkan sistem saluran akar menjadi tempat berkumpulnya beberapa iritan . Perluasan iritan ini dari saluran akar yang terinfeksi menuju jaringan periradikuler dapat menginisiasi terbentuknya lesi periradikuler. Penelitian menunjukkan bahwa 59,3% lesi periradikuler merupakan granuloma, 22% kista, 12% jaringan parut apikal, dan 6,7% patosis lainnya (Torabinejab 2002)

Granuloma periapikal berkembang menjadi kista periapikal sehingga memiliki gambaran histologis yang mirip kecuali pada kista terdapat kavitas sentral yang berisi cairan eosinofil atau material semisolid dan dibatasi oleh epitel skuamous berlapis (Squamous stratified epithelium). Granuloma periapikal sendiri merupakan suatu massa jaringan granulasi yang terinflamasi kronis terdiri dari jaringan granulomatososa yang disusupi oleh sel mast, makrofag, sel plasma, leukosit PMN, limposit-T dan limposit-B, osteoklast, osteoblast, dan dikrlilingi oleh kapsul jaringan fibrous padat. Sering pula ditemukan sel datia dengan inti banyak, sel busa, celah kolesterol, dan epitel (Regizi 2003)

Secara radiografis granuloma dan kista periapikal memiliki gambaran yang identik. Meski dikatakan granuloma berukuran kecil, mulai dari yang sukar dilihat hingga yang lebih dari 2 centimeter dan mayoritas kista cenderung berukuran kurang dari 1,5 centimeter, banyak peneliti tidak dapat membedakan antara granuloma periapikal dengan kista periapikal hanya berdasarkan ukuran dan tampilan radiografis (Neville *at al.* 2002)

Jika granuloma atau kista periapikal terjadi pada gigi yang masih dapat direstorasi, masih dapat berfungsi kembali dan dapat dipertahankan selama mungkin di dalam rahang, maka perawatan endodontik merupakan indikasi bagi gigi tersebut. Secara garis besar perawatan endodontik dibagi dalam dua bagian yaitu perawatan konvensional dan bedah (Tarigan 2006)

Granuloma dan kista periapikal dapat dirawat dengan endodontik konvensional, namun ada juga yang menetap setelah perawatan tersebut. Bedah endodontik, dalam hal ini apekreseksi, diterapkan jika perawatan dan perawatan ulang endodontik untuk kasus ini telah dilakukan namun tidak memberikan hasil yang memuaskan, yang ditandai dengan tidak sempurnanya penyembuhan tulang alveolar atau tidak adanya pengurangan radiolusensi pada apikal gigi yang telah dirawat. Perlu diingat bahwa indikasi apekreseksi harus selalu dikaitkan dengan tujuan untuk kebaikan pasien dan sesuai dengan tingkat keahlian dan pengetahuan dokter gigi (Gutman 2004; Nair 2004)

Untuk mengatasi kelainan patologis periapikal granuloma dan kista secara apekreseksi akan berhasil apa bila ditegakkannya prosedur bedah yang benar, dengan pengisian saluran akar untuk mendapatkan penutupan apikal yang baik. Pada kasus ini, prognose perawatan saluran akar cukup baik, bila dilakukan sesuai prosedur yang benar pada teknik perawatannya, sedangkan penanganan perawatan bedahnya dibutuhkan pengetahuan, ketrampilan serta kemauan untuk melakukan perawatan (Grossman *at al.*2008)

1.2 Permasalahan

Bagaimana cara memperbaiki kondisi granuloma dan kista apikalis melalui pengobatan apekreseksi

1.3 Tujuan

Ingin memahami pengobatan khususnya granuloma dan kista dengan cara apekreseksi

1.4 Manfaat

1. Mengatasi kelainan granuloma dan kista dengan cara apekreseksi
2. Sebagai pedoman sebagai praktisi bila ada kelainan granuloma dan kista dengan cara apekreseksi

2. Pembahasan

2.1 Definisi dan Etiologi

Granuloma periapikal adalah lesi granulomatosa yang berkembang lambat dan berbentuk bulat yang berhubungan dengan ujung akar gigi, biasanya timbul akibat komplikasi pulpitis, yang terdiri dari massa proliferasi jaringan peradangan kronik yang dibungkus dengan kapsul fibrosa yang berisi sel mast, makrofag, sel plasma, leukosit PMN, limfosit-T dan limfosit-B osteoklast, osteoblast, fibroblast yang merupakan pelebaran ligamentum periodontal (Dorland 2005)

Granuloma periapikal merujuk pada suatu massa jaringan granulasi yang terinflamasi kronis pada apek gigi yang *non-vital*. Menurut penelitian, granuloma merupakan lesi periapikal yang paling sering terjadi yaitu 59,3% (Kaneko *at al*, 2008). Menurut kamus kedokteran Dorland, kista periapikal adalah suatu rongga

(kavitas) yang patologis berisi sel-sel epitel Malassez (*cell rest of Malassez*), sitokin IL-1 β dikelilingi stratified squamous epithelium. Kista ini terletak di atau mengelilingi apek gigi". Karena itu kista periapikal berarti kista yang terletak di atau mengelilingi akar gigi. Kista ini merupakan kista rahang tersering dan merupakan lanjutan dari periodontitis apikal kronis, meski tidak setiap lesi kronis berkembang menjadi kista (Nair 2002; Regezi 2003)

Gambaran histologis kista periapikal sangat mirip dengan granuloma kecuali adanya kavitas sentral yang berisi cairan eosinofil atau material semisolid dan dibatasi oleh epitel skuamous berlapis (squamous stratified epifhelium). Kista periapikal ini dibagi menjadi dua katagori yaitu (1) yang kavitasnya tertutup sempurna oleh epitel, disebut dengan kista sejati periapikal dan (2) yang kavitasnya terbuka menuju saluran akar, disebut kista poket periapikal. Secara histopatologis terdapat empat komponen utama pada kista sejati periapikal yaitu (1) kavitas kista, (2) dinding epitel kista, (3) jaringan ekstraepitel, dan (4) kapsul kolagen (Nair 2002; Torabinejad 2008)

2.2 Etiologi

Lesi periradikuler akan terjadi apabila terkontaminasi bakteri, yang merupakan etiologi utama periodontitis apikal (Ørstavik 2004) dan penelitian oleh Kakehashi dan rekan juga menunjukkan bahwa penyakit pulpa dan periradikuler tidak dapat berkembang tanpa adanya kontaminasi bakteri (Baumgartner *at al*.200)

Infeksi bakteri dapat berupa karies gigi, kontaminasi saliva pada gigi yang fraktur, retak atau adanya kebocoran pada tambalan, ataupun melalui kontaminasi pada saluran akar melalui perawatan endodontik. Dengan meningkatnya kedalaman dan durasi infeksi pulpa, susunan mikroorganisme juga berubah dari yang mulanya didominasi oleh mikroorganisme gram positif dan fakultatif anaerob menjadi mikroorganisme yang hampir anaerob atau anaerob obligat (Gulabivala 2004) dan kebanyakan berupa mikroorganisme gram negative. Beberapa menyebutkan bahwa organisme yang dominan (68%) pada saluran akar yang terinfeksi 5 milimeter daerah apek adalah obligat anaerob (Tanomaru 2008). Kelompok yang biasanya ditemukan pada gigi dengan lesi periradikuler adalah

Fusobacterium, Prevotella, Porphyromonas, Peptostreptococcus, Veillonella, dan Spirochaeta, yang memerlukan adanya spesies-spesies lain yang sinergis untuk keberlangsungan hidup mereka (Orstavik 2004)

Infeksi pulpa tersering tempat mikroorganisme dapat masuk dan mencapai pulpa adalah bukan pada dinding jaringan karies gigi yang diakibatkan oleh karies, prosedur klinis, atau fraktur dan retak akibat trauma. Infeksi pulpa juga dapat terjadi akibat terbukanya tubulin dentin pada permukaan servikal akar akibat adanya celah pada selubung sementum (Nair 2004)

Penyebaran proses radang ini dari pulpa ke daerah periapikal mengakibatkan suatu massa perdarangan kronis yang disebut granuloma periapikal. Pada granuloma terdapat sisa-sisa epitel malassez yang dapat berproliferasi sehingga terbentuk kista periapikal (Sudiono 2004). Proliferasi sisa-sisa epitel malassez pada jaringan periapikal ini, selain disebabkan oleh infeksi saluran akar, juga dapat disebabkan akibat instrumentasi dan pengisian saluran akar berlebih melewati apek gigi (Lin 2007)

2.3 Patogenesis Granuloma dan Kista Periapikal

2.3.1 Patogenesis Granuloma Periapikal

Pembentukan granuloma periapikal adalah karena adanya reaksi hipersensitivitas tipe IV (tipe lambat/ *delayed hypersensitivity*) yang sifatnya kronis. Reaksi hipersensitivitas tipe IV terjadi karena limfosit-T berkontak dengan makrofag yang telah tersensitisasi dan kemudian melepas limfokin yang bertindak sebagai mediator reaksi hipersensitivitas tipe lambat. Jika sistem pertahanan tubuh tidak mampu mengatasi serangan bakteri yang bereplikasi, akan terjadi reaksi hipersensitivitas yang sifatnya kronis. Akibatnya limfokin akan melepas terus menerus sehingga terjadi akumulasi sejumlah besar makrofag dan juga sel epiteloid yang bersatu membentuk sel raksasa (Roeslan 2002)



Gambar 1. 1 Infeksi daerah apikal dan lokasi dari granuloma apikal(Valderhaug1974)

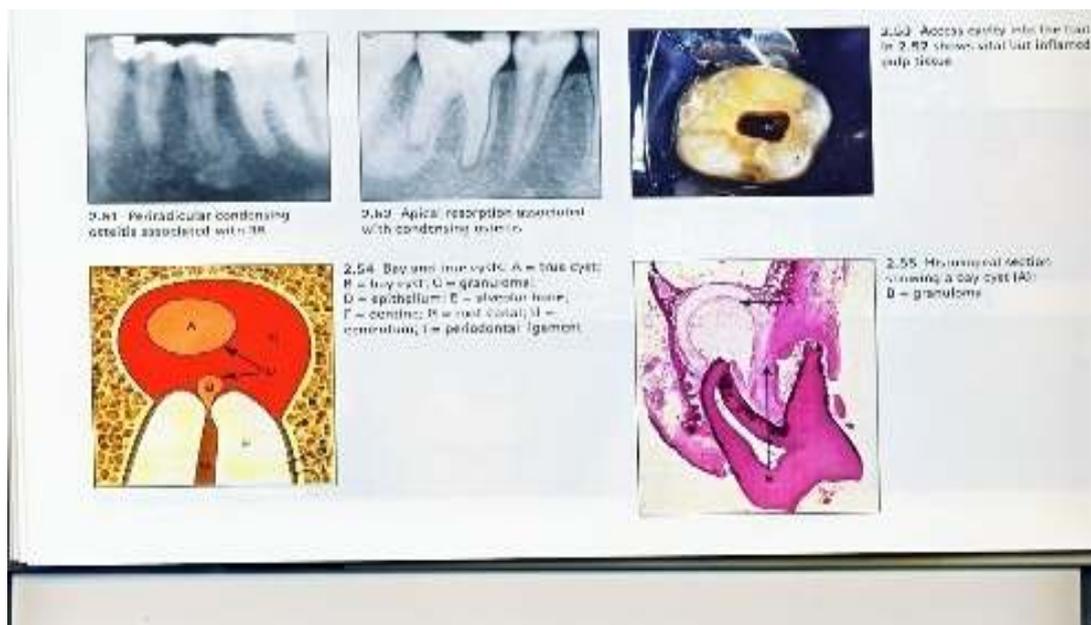
Sejumlah besar makrofag dan sel-T teraktivasi ini lalu melepaskan sitokin (IL-1,IL-6,dan TNF- α) yang menekan aktivitas osteoklast dan mengurangi resorpsi tulang. Disisi lain sitokin derivat sel-T menaikkan regulasi produksi growth factor yang memiliki efek stimulatif, proliferaatif pada fibroblast dan mikrovaskulator. Adanya penurunan regulasi proses destruktif ini menjelaskan mengapa pada lesi kronis resorpsi tulang tidak terjadi atau melambat disertai pembentukan kembali jaringan ikat kolagen. Pelepasan mediator-mediator ini merupakan respon cell-mediated immune yang sifatnya kronis untuk melokalisasi antigen akibat sistem pertahanan tubuh kesulitan mengeliminasi antigen (Nair 2002)

2.3.2 Patogenesis Kista Periapikal

Kista ini terjadi dalam tiga tahap. Tahap pertama adalah terjadinya proliferasi sisa-sisa epitel Malassez (*cell rest of Malassez*) yang dorman merupakan akibat langsung dari inflamasi, kemungkinan karena *growth factor* yang dilepaskan oleh berbagai sel dalam lesi. Pada tahap kedua kavitas berbatas epitel akan terbentuk. Tahap kedua teori mengenai pembentukan kista : (1) teori defisiensi nutrisi yang menyatakan bahwa sel-sel sentral pada garis epitel tidak mendapatkan nutrisi sehingga mengalami nekrosis dan degenerasi likuefaksi. Akibatnya granulosit neutrofilik bergerak menuju area nekrotik. Mikrokavitas yang terdiri dari sel epitel yang berdegenerasi, infiltrasi leukosit, dan eksudat jaringan bersatu membentuk kavitas kista, dibatasi oleh *stratified squamous epithelium*; (2) teori abses yang menyatakan bahwa proliferasi epitelium disekitar abses terjadi karena adanya lisis dan nekrosis jaringan. Hal ini terjadi akibat sifat dasar sel-sel epitel yang cenderung menutup permukaan jaringan ikat yang terbuka. Pada tahap 02; Latoo ketiga kista bertumbuh, namun mekanismenya belum jelas (Nair *et al.* 2009)

Meski tidak terdapat bukti langsung, dinamika jaringan dan komponen seluler menunjukkan adanya jalur molekuler terbentuknya kista. Neutrofil yang dihancurkan dalam lumen kista merupakan sumber prostaglandin yang dapat berdifusi melalui dinding epitel menuju jaringan sekitar. Neutrofil atau PMN ini merupakan lini pertama melawan mikroba sehingga konsentrasinya tinggi pada fase akut periodontitis apikal. Selain itu PMN juga dapat menyebabkan kerusakan berat pada jaringan pejamu yaitu mendegradasi elemen struktural sel-sel dan matriks ekstraseluler yang diakibatkan oleh enzim dalam granula sitoplasmik. Prostaglandin secara khusus diasosiasikan dengan resorpsi tulang periapikal. (Nair 2004; Torabinejad 2002)

Populasi sel yang berada pada daerah ekstraepitel terdiri dari banyak limfosit-T dan makrofag yang diketahui memproduksi sitokin, terutama IL-1 β yang merupakan sitokin paling aktif untuk menstimulasi resorpsi tulang *in vitro*. Prostaglandin dan sitokin mengaktifkan osteoklast, dan mengakibatkan terjadinya resorpsi tulang. Molekul efektor (MMP-1, MMP-2) juga terdapat pada kista periapikal. MMP (*Matrix Metalloproteinase*) bertanggung jawab terhadap degradasi sebagian besar matriks jaringan pada kolagen, fibronectin, laminin, gelatin dan protein berinti proteoglikan dan berperan pada patogenesis periodontitis apikal. (Nair 2002)



Gambar 1. 2 : kondisi periradikuler, osteitis apikal resorpsi, jaringan periodontal granuloma dan kista ,histologi granuloma dan kista (Stock 2004)

2.3.3 Patogenesis Kista Poket Periapikal

Kemungkinan, kista ini diinisiasi oleh akumulasi neutrofil di sekitar foramen apikal akibat adanya bakteri pada saluran akar. Mikroabses yang terbentuk dapat dikelilingi oleh proliferasi epitelium membentuk lingkaran epitel dengan "perlekatan epitel" pada permukaan akar yang memisahkan saluran akar terinfeksi dan mikroabses dengan lingkungan periapikal (*Periapical milieu*). Saat neutrofil eksternal berdisintegrasi, tempat neutrofil ini menjadi saku mikrokistik. Adanya bakteri pada apeks saluran akar, produknya dan sel nekrotik dalam lumen kista menarik lebih banyak neutrofil. Seiring dengan berakumulasinya sel-sel nekrotik, lumen seperti-saku membesar dan membentuk suatu *diverticulum* pada ruangan saluran akar, yang kemudian meluas ke daerah periapikal. Resorpsi tulang dan degradasi matriks yang terjadi berkaitan dengan membesarnya poket terjadi sesuai jalur molekuler pada kista sejati periapikal. (Nair 2002).

2.3.4 Granuloma dan Kista Periapikal yang persisten setelah perawatan Endodontik,kompensional

Granuloma dan kista poket periapikal dapat diatasi dengan perawatan endodontik konvensional karena pada perawatan ini iritan dalam saluran akar dibersihkan oleh instrumentasi kemomekanis lalu ditutup dengan bahan pengisi saluran akar. Namun ada beberapa keadaan tertentu yang mengakibatkan suatu lesi periapikal menetap/persisten setelah perawatan endodontik konvensional. Keadaan-keadaan tersebut antara lain akibat kontrol infeksi yang tidak adekuat, desain akses kavitas yang buruk, instrumentasi dan obturasi tidak adekuat, saluran yang tidak terdeteksi, dan adanya kebocoran koronal. Kegagalan perawatan ini juga dapat disebabkan oleh adanya flora endodontik

pada saluran akar yang telah dirawat, aktinomikosis ekstraradikuler, dan adanya reaksi benda asing. Jika kegagalan perawatan ini tidak dapat dirawat ulang akibat (1) adanya saluran akar yang tidak dapat dinegosiasi, saluran akar yang sangat bengkok; (2) adanya patahan instrumen, terbentuknya birai, perforasi, obturasi yang sangat berlebih; (3) adanya pasak atau dowel atau material obturasi yang tidak dapat dikeluarkan dari saluran akar, maka bedah periradikuler (apekreseksi) diindikasikan (Nair 2004; Torabinejad 2008).

Pada daerah periapikal dan saluran akar gigi yang telah dirawat namun memiliki radiolusensi persisten yang asimtomatik ditemukan adanya beberapa spesies mikroba yang didominasi dengan bakteri gram-positif bentuk kokus, batang dan filamen. Spesies-spesies yang ditemukan dalam saluran akar termasuk dalam kelompok *Actinomyces*, *Enterococcus*, dan *Propionibacterium*. Penemuan berulang dari spesies *Enterococcus faecalis* dalam saluran akar gigi yang telah dirawat saluran akar layak mendapat perhatian, karena spesies ini resisten terhadap kebanyakan penggunaan medikamen intrakanal, khususnya bahan *dressing* yang memiliki kandungan kalsium hidroksida, dan juga dapat bertindak sebagai monoinfeksi dalam saluran akar tanpa hubungan sinergis dengan bakteri lain. Selain itu juga telah diisolasi organisme seperti *yeast* dalam saluran akar yang telah diisi namun masih terdapat periodontitis apikal, sehingga mengimplikasikan fungi sebagai organisme potensial pada gigi yang resisten terhadap perawatan saluran akarnya. Yang sering ditemukan adalah spesies *Candida albicans*. (Baumgartner 2002; Nair 2002).

Aktinomikosis merupakan penyakit infeksius granulomatous kronis pada manusia dan hewan yang disebabkan genera *Actinomyces* dan *Propionibacterium*. *A. israelii* dan *P. propionicum* telah diisolasi secara konstan dari jaringan periapikal gigi yang tidak berespon terhadap perawatan endodontik konvensional. Hal ini disebabkan karena organisme aktinomikotik mampu hidup secara ekstraradikuler sehingga dapat memperburuk inflamasi periapiks bahkan setelah perawatan saluran akar ortograd. (Nair 2004)

Benda asing baik endogen maupun eksogen dapat mengakibatkan menetapnya periodontitis apikal setelah perawatan saluran akar dengan menginisiasi reaksi benda asing pada periapiks sehingga mengakibatkan lesi periodontitis apikal menetap bahkan menjadi lebih buruk. Material endogen yaitu kristal kolesterol sedangkan material eksogen dapat berupa guttapercha yang terisi berlebihan, material endodontik yang mengandung selulosa seperti *paper point* yang tersangkut dan mendorong ke jaringan periapikal. (Nair 2004)

Pada kista sejati periapikal, perawatan endodontik konvensional tidak dapat diterapkan. Hal ini disebabkan karena selain faktor iritan dalam saluran akar, iritan lain seperti kolesterol atau kemungkinan adanya antigen tak teridentifikasi, juga terdapat dalam kista sehingga tidak dapat dibersihkan. (Nair 2004)

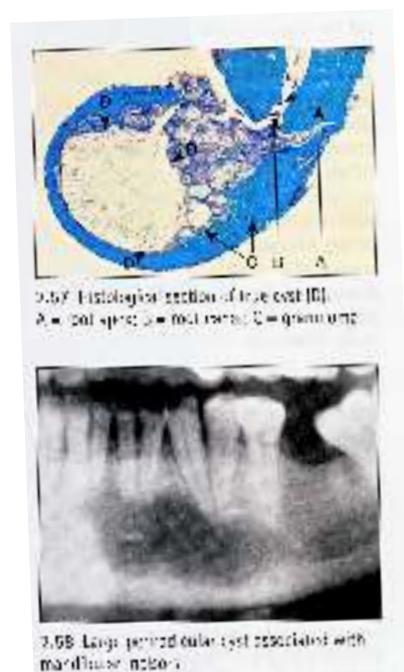
Kolesterol merupakan lipid steroid yang berada dalam jumlah banyak pada semua sel binatang "kaya-membran". Kristal kolesterol terbentuk akibat dilepaskannya kolesterol oleh (1) disintegrasi eritrosit pada pembuluh darah yang stagnan dalam lesi, (2) limfosit, sel plasma, dan

makrofag akan mati dalam jumlah besar dan berdisintegrasi pada lesi periapikal kronis, dan (3) sirkulasi plasma lipid. Meski demikian, sel-sel inflamasi lokal yang mati merupakan sumber utama kolesterol, dimana kolesterol ini dilepaskan oleh disintegrasi membran sel-sel tersebut pada lesi yang persisten. (Nair 2004; Linn 2007)

Akumulasi kristal kolesterol pada lesi periodontitis apikalis dapat menyulitkan penyembuhan jaringan periapikal. Akumulasi kristal kolesterol ini juga dapat menghambat penyembuhan jaringan periapikal setelah perawatan saluran akar konvensional karena perawatan ini tidak dapat menghilangkan kristal kolesterol yang berada diluar sistem saluran akar. (Nair 2002)

Granuloma periapikal berasal dari pulpa yang nekrotik (Torabinejad 2002) sehingga gigi yang bersangkutan tidak berespon terhadap tes vitalitas. Begitu pula dengan kista periapikal, namun pada lesi ini pasien mengeluh adanya pembengkakan yang lambat. Jika kista membesar dan mengerosi tulang, maka fluktuasi akan terjadi. (Lattoo 2009)

Secara radiografis granuloma dan kista periapikal memiliki gambaran yang identik. Pada granuloma terlihat hilangnya lamina dura apikal dan resorpsi akar tidak biasanya terjadi, sedangkan pada kista periapikal resorpsi akar gigi yang terlibat dapat terjadi. Meski dikatakan granuloma berukuran kecil, mulai dari yang sukar dilihat hingga yang lebih dari 2 cm dan mayoritas kista cenderung berukuran kurang dari 1,5 cm hingga mencapai lebih dari 200 mm², banyak peneliti tidak dapat membedakan antara kista periapikal dengan granuloma periapikal hanya berdasarkan ukuran dan tampilan radiografis sehingga untuk membedakan antara granuloma dan kista periapikal, pemeriksaan mikroskopis dibutuhkan. (Neville *at al.* 2002; Regezi 2003)



Gambar 1. 3 Histologi granuloma, kista, saluran akar, apek akar dan radiografis kista Mandibular insisor (Nair 1987)

2.4. Teknik Apekreseksi

2.4.1. Tinjauan Umum

Perawatan endodontik mencakup prosedur perawatan secara konvensional dan bedah. Perawatan bedah diterapkan jika gigi tidak dapat dirawat dengan perawatan endodontik konvensional, dengan tujuan untuk menghilangkan agen penyebab patosis periradikuler dan untuk mengembalikan keadaan periodontium pada keadaan sehat secara biologis dan fungsional. (Morrow 2002)

Apikoektomi/reseksi apeks/reseksi ujung akar merupakan bagian dari bedah periradikuler dan didefinisikan menurut *American Association of Endodontists* sebagai eksisi bagian apikal akar gigi dan jaringan lunak cekat saat bedah periradikuler berlangsung. Kasus bedah endodontik dilakukan oleh Abulcasis pada abad ke 11. Reseksi ujung akar untuk mengatasi gigi dengan pulpa nekrotik dan abses alveolar dicatat pada tahun 1871 dan reseksi ujung akar dengan preparasi dan pengisian retrograd dengan amalgam pada tahun 1890. Beberapa peneliti menganggap Claude Martin sebagai penemu reseksi ujung akar pada tahun 1881. (Chandler 2002; Morrow 2002).

2.4.2. Indikasi dan Kontraindikasi Apekreseksi

Tarigan (2006) menyatakan bahwa indikasi apekreseksi sebagai bagian dari bedah periradikuler adalah sebagai berikut: 1. Saluran akar yang melengkung sehingga sulit dipreparasi dan pulpa nekrosis yang sudah sampai apeks. 2. Adanya obstruksi saluran akar (gigi tiruan, instrument yang patah, pengapuran) setelah dilakukan pemeriksaan klinis maupun foto rontgen tentang keadaan apeks. 3. Tidak mungkin mengeringkan saluran akar karena sekresi terjadi terus-menerus. 4. Tidak ada penyembuhan pada daerah apikal (granuloma, kista) walaupun telah dilakukan pengisian saluran akar yang sempurna. 5. Pengisian saluran akar secara berlebihan diikuti dengan gejala akut. Dalam hal ini, fistulasi apikal sebagai tindakan darurat diizinkan. 6. Resorpsi akar apikal yang berlanjut terus setelah pengisian saluran akar.

Indikasi-indikasi apekreseksi di atas dapat dirangkum menurut faktor biologis dan faktor teknis. Faktor biologis tersering adalah adanya gejala yang persisten dan menetapnya lesi periradikuler sedangkan faktor teknis paling sering yang mengindikasikan apikoektomi dilakukan adalah adanya pasak interadikuler, gigi yang sudah dipasang mahkota (*crown*) tanpa pasak, material pengisi saluran akar tidak dapat dikeluarkan, dan kecelakaan prosedur (Morrow 2002).

Apekreseksi termasuk dalam bagian bedah endodontik sehingga kontraindikasinya terbatas pada tiga area berikut: 1. Pasien (faktor psikologis dan sistemik). 2. Dokter gigi (faktor pengalaman dan keahlian). 3. Pertimbangan anatomis (konfigurasi tulang atau gigi yang tidak biasa, dan/atau akses pembedahan yang sulit)

Faktor-faktor sistemik pasien, yang biasanya memerlukan konsultasi medis antara lain: hipertensi, infeksi endokarditis, asma, epilepsi, ketidakcukupan adrenal, penyakit aterosklerotik koroner, infark miokard, penyakit pulmonar obstruktif kronis, diabetes, terapi steroid, cacat fungsi renal atau hepatic. Selain itu faktor-faktor lokal yang perlu dipertimbangkan berkaitan dengan

prognosis perawatan biasanya menyangkut penatalaksanaan jaringan lunak dan keras. Hasil yang lebih baik didapatkan jika sistem saluran akar telah dirawat sebelum prosedur bedah dilaksanakan. Pemeriksaan radiografis sebelum pembedahan juga merupakan faktor yang utama, baik sebelum maupun setelah pembedahan. Struktur anatomis yang dapat mengganggu akses ke daerah bedah harus diidentifikasi dalam radiografis, termasuk foramen mental, prosesus zygomatikus, *anterior nasal spine*, dan lingir oblik eksternal (Gutmann 2004).

2.4.3.Cara Kerja Apekreseksi

2.4.3.a Anestesi dan Hemostasis

Injeksi agen anestetik lokal yang mengandung vasokonstriktor memiliki dua tujuan utama: (1) untuk mendapatkan anestesi yang dalam dan lama dan (2) untuk memperoleh hemostasis yang baik selama dan setelah pembedahan (Morrow 2002). Lidokain (*Xylocaine*) merupakan agen anestetik pilihan untuk bedah periradikuler karena tingkat kesuksesan klinisnya yang tinggi dan jarang menimbulkan reaksi alergi sementara untuk vasokonstriktornya digunakan Epinephrine, yang merupakan vasokonstriktor paling efektif dan paling banyak digunakan dalam anestetik dental. Anestesi dapat diperoleh dengan injeksi pada daerah yang jauh dari daerah bedah (injeksi blok) sementara hemostasis tidak sehingga untuk mendapatkan efek hemostasis diperlukan injeksi tambahan pada sekitar daerah bedah.

Beberapa studi menunjukkan bahwa Lidokain 2% dengan konsentrasi epinephrine 1:200.000 hingga 1:100.000 dapat mengakibatkan efek anestesi yang dalam. Namun bukti klinis menyatakan bahwa dengan konsentrasi 1:50.000 dapat diperoleh keadaan hemostasis yang lebih baik. Pada pasien sehat, dosis yang digunakan adalah 2-4 ml (Gutmann 2004)

Untuk mendapatkan anestesi dan hemostasis pada rahang atas dibutuhkan injeksi multipel, mendepositkan anestetik melalui daerah bedah superfisial dari periosteum setinggi apeks akar. Bevel jarum harus menghadap ke tulang dan, setelah aspirasi, depositkan 0,5 ml obat secara perlahan. Setelah itu gerakkan jarum ke daerah perifer (mesial dan distal) untuk mendepositkan obat dalam jumlah yang sama. Kecepatan injeksi direkomendasikan 1 ml/menit dan maksimal 2 ml/menit karena kecepatan injeksi ini berpengaruh pada derajat hemostasis. Untuk rahang bawah, lakukan injeksi infiltrasi seperti di atas setelah injeksi blok nervus alveolar inferior.

2.4.3.b Desain Flep

Prinsip-prinsip umum pada desain flep yaitu (Jostes 2002; McDonald 2008):

1. Flep harus memberikan akses dan daerah pandang yang adekuat
2. Desain flep harus menyediakan pasokan darah yang adekuat pada jaringan yang dibuka
3. Desain flep harus memungkinkan penutupan jaringan lunak menutupi tulang yang padat

4. Flep yang digunakan pada bedah periapikal harus melibatkan pengangkatan mukosa dan periosteum.
5. Hindari melakukan insisi di atas defek tulang atau di atas lesi periradikuler.
6. Hindari pembuatan sudut tajam pada flep.
7. Jangan menginsisi melalui papila interdental
8. Lakukan insisi vertikal agar retraktor dapat bertumpu pada tulang dan tidak merusak flep.
9. Minimalkan flep; flep harus melibatkan paling sedikit satu gigi di sisi kiri-kanan gigi yang akan dibedah

Terdapat dua kategori utama flep untuk bedah periradikuler yaitu flep mukoperiosteal penuh dan flep mukoperiosteal terbatas. Lokasi komponen horizontal menjadi karakteristik pembeda dari masing-masing flep. Semua flep mukoperiosteal penuh melibatkan insisi intrasulkular horizontal dengan refleksi jaringan margin gingiva dan interdental (*papillary*) sedangkan flep mukoperiosteal terbatas memiliki insisi horizontal submarginal (subsulkular) atau insisi berorientasi-horizontal, dan flep ini tidak termasuk jaringan margin atau interdental. (Morrow 2002)

Apapun flep yang digunakan, kesehatan jaringan pada daerah bedah harus selalu menjadi pertimbangan yang penting. Penggunaan 0,12% chlorhexidine dapat menurunkan jumlah bakteri dan meningkatkan respon jaringan terhadap perawatan. Pasien harus berkumur sehari sebelum pembedahan, sesaat sebelum pembedahan dan selama satu minggu setelah pembedahan (Jostes 2002)

2.4.3.c Insisi dan Refleksi

Insisi dibuat dengan scalpel No. 15 atau pisau lain yang cocok. Untuk menghindari robeknya flep saat reseksi, insisinya harus dibuat melalui periosteum sampai menyentuh tulang. Jaringan diangkat dengan elevator periosteum yang tajam dimulai dari insisi vertikal dan kemudian mengangkat bagian horizontalnya. Mengingat periosteum harus ikut terangkat maka elevatornya harus benar-benar kontak dengan tulang ketika jaringan dikelupas dengan kekuatan yang terkontrol. Jaringan dibuka sedemikian rupa sehingga akses dan visibilitas ke daerah operasi memadai sementara memungkinkan retraktor diletakkan pada tulang yang sehat. (McDonald 2008)

2.4.3.d Akses ke Apeks

Dalam banyak kasus karena adanya lesi, tulang telah mengalami resorpsi dan letak daerah apeks dapat diketahui dari terlihatnya lesi jaringan lunak atau perabaan dengan eksplorator. Jika pembukaannya kecil, batas-batasnya dapat diangkat dan diperlebar dengan memakai bur bulat sampai apeksnya terlihat. Jika kerusakannya tulangnya sedikit, setelah menempatkan obyek radiopak di dekat apeks, buatlah radiograf untuk menentukan lokasi apeks. Pengeburan tulang dilakukan dengan disertai irigasi salin steril yang banyak (McDonald 2008)

2.4.3.e Kuretase Periradikuler dan Apekreseksi

Setelah mendapatkan akses, lakukan kuretase lesi dan kumpulkan spesimen untuk pemeriksaan histopatologis. Jaringan harus dikelupas dengan hati-hati, idealnya dalam satu potong, dengan menggunakan kuret tajam yang sesuai ukurannya. (McDonald 2008)

Apekreseksi melibatkan pembuatan bevel bagian apeks akar, dengan sudut bevel seminimal mungkin untuk menurunkan kebocoran dari sistem saluran akar. Pembuatan bevel ini bertujuan untuk mendapatkan visibilitas ke arah apeks yang maksimal. Sudut bevel dibuat kurang-lebih 45° dalam arah fasial-lingual, dengan bevel sekecil mungkin. Biasanya ujung akar yang dipotong tidak melebihi 3-4 mm, yaitu panjang minimum yang diperlukan untuk menjamin hilangnya delta apikal dan memungkinkan terlihatnya saluran akar, yang biasanya terletak di tengah-tengah permukaan akar yang dipotong, dikelilingi pinggiran dentin yang sehat. (Bernes 2002; Gutmann 2004 ; McDonald 2008)

Perlu diperhatikan bahwa reseksi harus dilakukan secara sempurna dari bukal ke arah lingual atau palatal. Bila tidak demikian maka beberapa bagian ujung akar akan tertinggal dalam ujung akar. Agar aman maka operator harus selalu memastikan bahwa membran periodontal harus terlihat sebagai cincin yang tidak terputus mengelilingi ujung akar yang telah dipotong. (Barnes 2002)

2.4.3.f Preparasi Kavitas Ujung Akar dan Penambalan

Preparasi dibuat sedalam minimal 3 mm ke dalam saluran akar, dan paling bagus menggunakan instrumen ultrasonik yang didesain khusus. Setelah preparasi dibuat, irigasikan dengan salin steril atau air. *Small suction tip*, terbuat dari jarum 20- atau 18-gauge dapat dibengkokkan dan digunakan untuk menghilangkan cairan dan debris dari dalam kavitas. Beberapa operator menggunakan *paper point* untuk mengeringkan kavitas (Gutmann 2004; McDonald 2008)

Material penambal ujung akar kemudian dimasukkan ke dalam kavitas yang telah dipreparasi. Material ini harus memiliki sifat seperti (1) kerapatannya baik; (2) dapat ditoleransi dengan baik oleh jaringan periradikuler; (3) tidak diresorpsi; (4) mudah dimasukkan; (5) tidak dipengaruhi oleh kelembapan; (6) dapat dilihat di radiograf; (7) mampu menimbulkan regenerasi jaringan periradikuler. Banyak material yang telah digunakan sebagai material penambal ujung akar seperti amalgam, SuperEBA, *intermediate restorative material* (IRM), ionomer kaca, resin komposit, semen karboksilat, semen zinc fosfat, semen oksida-eugenol, dan *mineral trioxide aggregate* (MTA). (Morrow 2002)

2.4.3.g Penutupan Kembali Flep dan Penjahitan

Setelah ujung akar ditambal dan dibuat radiografinya, flep harus dikembalikan lagi ke posisinya semula dan ditahan disitu selama 5 menit dengan memakai kasa basah disertai tekanan jari yang sedang. Hal ini akan menyebabkan keluarnya darah dari bawah flep, terjadinya adaptasi awal, dan akan memudahkan penjahitan dan lebih sedikit mengakibatkan perdarahan pascaoperasi. Terdapat

banyak teknik penjahitan misalnya jahitan tunggal (terputus), jahitan memanjang (kontinu), dan jahitan sling. Jahitan tunggal merupakan jahitan yang paling banyak digunakan. Disini jarum mula-mula ditembuskan pada jaringan flep yang dibuka dan kemudian ditembuskan ke jaringan cekat. Jahitan diikatkan dengan simpul bedah sederhana. Simpul jangan diletakkan di atas garis insisi karena akan menjadi tempat berkumpulnya debris dan bakteri yang mendorong terjadinya inflamasi dan infeksi. Jahitan biasanya dibuka setelah 3 atau 7 hari kemudian. (McDonald 2008)

2.4.3.h Instruksi Pascabedah

Memperhatikan instruksi pascabedah sangat penting bagi kenyamanan pasien sendiri dan penyembuhan jaringan selama beberapa hari ke depan. Instruksi berikut ini dapat diberikan secara verbal dan dapat dituliskan bagi pasien (Morrow 2002; Gutmann 2004; McDonald 2008):

1. Jangan melakukan aktivitas berat, dan hindari minuman beralkohol dan penggunaan tembakau (baik merokok maupun dikunyah)
2. Penting untuk memiliki diet yang baik dan banyak minum jus buah bersama sup dan makan makanan lunak pada beberapa hari pertama setelah pembedahan.
3. Jangan menarik atau mengangkat jaringan fasial kalau tidak perlu
4. Timbulnya pembengkakan dan perubahan warna adalah hal yang biasa dan akan berakhir dalam beberapa hari.
5. Anda dapat melakukan kompres es dengan tekanan ringan pada wajah Anda dimana pembedahan dilakukan (20 menit tekan, dan 20 menit angkat) sampai waktunya tidur. Sehari setelah pembedahan, Anda dapat meletakkan handuk yang lembut dan hangat pada wajah Anda dimana pembedahan dilakukan. Lakukan hal ini sesering mungkin selama 2-3 hari kedepan.
6. Darah yang merembes adalah hal yang normal. Jika perdarahan meningkat, letakkan bantalan kasa bedah pada jaringan wajah di atas daerah tindakan dan aplikasikan tekanan jari selama 15 menit. Jika perdarahan terus berlanjut hubungi dokter.
7. Berkumurlah dengan clorhexidine dua kali sehari setiap hari. Sehari setelah pembedahan larutkan sesendok teh garam dalam satu gelas air hangat dan dengan hati-hati berkumurlah 2 atau 3 kali sehari hingga 3-4 hari setelahnya. Sikatlah gigi dengan hati-hati karena menyikat dengan terlalu keras dapat merusak daerah tindakan.
8. Ketidaknyamanan setelah pembedahan merupakan hal yang normal. Anda dapat menggunakan obat antinyeri yang diberikan kepada anda, sesuai keperluan
9. Jahitan harus dibuka dalam 48-72 jam
10. Teleponlah dokter jika Anda mempunyai keluhan atau pertanyaan

2.4.3.i Penyembuhan

Reaksi jaringan periapikal seperti infiltrasi sel inflamasi, resorpsi tulang dan proliferasi epitelial pada periodontitis apikal merupakan produk dari infeksi saluran akar. Setelah terapi

endodontik bedah, penyembuhan luka periapikal mengikuti proses yang sama seperti pada terapi endodontik konvensional yaitu sel-sel inflamasi dan sel-sel endothelial serta fibroblast dimusnahkan akibat apoptosis atau kematian sel terprogram. (Lin 2007)

Penyembuhan pada jaringan lunak mencakup pembekuan darah, inflamasi, epitelisasi, penyembuhan jaringan ikat, dan maturasi serta *remodeling* baik jaringan ikat maupun tulangnya. Pembekuan darah dan inflamasi terdiri atas fase kimia dan fase seluler. Mekanisme pembekuan ini penting karena hal ini berdasarkan perubahan dari fibrinogen menjadi fibrin; dibawah tekanan, bekuan merupakan suatu lapisan yang tipis. Jika bekuan tidak berhasil terbentuk akan berakibat merembesnya darah ke daerah luka. Penyembuhan awal dari epitel terdiri atas pembentukan barier epitel yang terbuat dari lapisan sel-sel epitel yang nutrisinya bergantung pada jaringan ikat yang berada di bawahnya. Lapisan epitel ini akan bermigrasi sepanjang permukaan fibrin sampai lapisan ini berkontak dengan sel-sel epitel dari sisi berlawanan dari luka dan membentuk jembatan epitel. Komponen jaringan ikat berasal dari fibroblast, yang terdiferensiasi dari sel-sel ektomesenkim dan tertarik ke daerah luka oleh mediator seluler dan humoral. Pembuluh darah disekelilingnya akan menyediakan nutrisi bagi fibroblas dan prekursorinya, yang akan membentuk kolagen. Makrofag merupakan bagian yang penting dalam proses ini. Ketika penyembuhan telah matang, inflamasi dan jumlah fibroblas akan berkurang disertai dengan de-agregasi serabut kolagen menjadi pola yang lebih teratur. (McDonald 2008)

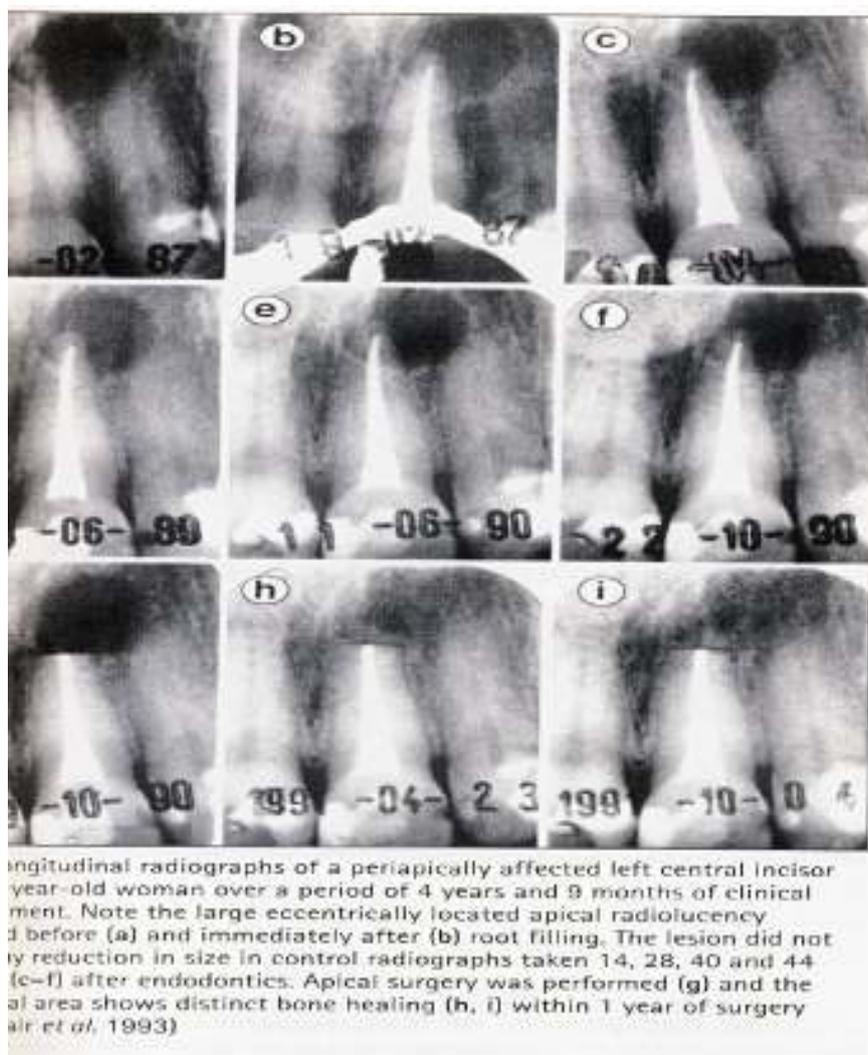
Penyembuhan tulang dimulai dengan proliferasi sel-sel endosteum menjadi koagulum dari lokasi luka. Pada hari ke-12 sampai 14 akan terlihat anyaman trabekula dan osteosit yang mendorong terjadinya pematangan awal dari matriks kolagen di sekitar hari ke-30. Proses ini terjadi dari sebelah dalam ke sebelah luar, berakhir dengan pembentukan lamela tulang yang matang, yang akan terlihat secara radiografik. Proses penyembuhan setelah terapi endodontik bedah sebenarnya sama saja dengan proses penyembuhan setelah terapi non-bedah, namun yang membedakan adalah pada endodontik bedah penyembuhannya lebih cepat karena debridement-nya lebih efektif jika dibandingkan dengan debridement biologis oleh fagosit pada prosedur konvensional/non-bedah. (Lin 2007; McDonald 2008)

Pada proses penyembuhan tulang alveolar maka sebaiknya menggunakan bahan yang dapat merangsang pembentukan tulang baru. Kitosan juga salah satu bahan yang dapat dipergunakan, karena kitosan merupakan hasil deasetilasi kitin, sedangkan kitin dapat diisolasi dari serangga dan jamur, kerangka dan cangkang hewan golongan arthropoda, molusca, nematode, dan crustacean. Sebagai matrik pendukung pada proses imobilisasi enzim, kitosan mempunyai beberapa keuntungan karena mudah didapat, prosedur isolasinya mudah, tidak beracun dan tidak membahayakan. Kitosan mempunyai beberapa sifat yang menguntungkan beberapa antara lain hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability, sifat anti bakteri dan mempunyai afinitas yang besar terhadap enzim. (Sari 2007)

Kitosan limbah kulit udang mengandung 20-30% senyawa kitin, 21% protein dan 40-50% mineral. Kitin merupakan polisakarida terbesar kedua setelah selulosa yang mempunyai rumus kimia

poli (2-asetamida-2-dioksi- β -D-Glukosa) dengan ikatan β -glikosidik yang menghubungkan antar unit ulangnya. Struktur kimia kitin mirip dengan selulosa, hanya dibedakan oleh gugus yang terikat pada atom C2. Jika pada selulosa gugus yang terikat pada atom C2 adalah OH, maka pada kitin yang terikat adalah gugus asetamida (Hargono 2008)

Kitosan dapat dengan mudah berinteraksi dengan zat-zat organik lainnya seperti protein. Oleh karena itu, kitosan relatif lebih banyak digunakan pada berbagai bidang industri terapan dan industri kesehatan. Kitin dan Kitosan dapat digunakan sebagai bahan mempercepat penyembuhan luka bakar, lebih baik dari yang terbuat dari tulang rawan. Selain itu juga sebagai bahan pembuatan garam-garam glukosamin yang mempunyai banyak manfaat di bidang kedokteran. Misalnya untuk menyembuhkan influenza, radang usus dan sakit tulang atau penyembuhan tulang. (Emma 2007



Gambar 1. 4 : radio grafis perawatan apekreseksi serta proses penyembuhannya (Nair *at al.* 1993)

3. Kesimpulan dan saran

3.1 Kesimpulan

Kelainan jaringan lunak gigi (pulpa) serta berlanjut sampai ke periapikal yaitu granuloma dan kista, merupakan suatu kelainan yang sering dijumpai pada gigi yang mengalami kerusakan berlanjut. Patogenesis granuloma dan kista hampir menyerupai yaitu karena adanya reaksi hipersensitivitas tipe IV (tipe lambat/*delayed hypersensitivity*) yang sifatnya kronis. Limfosit-T berkontak dengan makrofag tersensitisasi dan melepas limfokin yang bertindak sebagai mediator reaksi hipersensitivitas tipe lambat. Limfokin lepas terus menerus sehingga terjadi akumulasi sejumlah besar makrofag dan juga sel epiteloid yang bersatu membentuk sel raksasa, mengakibatkan rusaknya tulang alveolar.

Pengobatan granuloma dan kista periapikal, apekreseksi merupakan pilihan yang dianjurkan , hal ini untuk mendapatkan akses yang baik dalam menghilangkan penyebab kelainan tersebut , baik dipermukaan alveolar maupun di apek gigi. Pada alveolar setelah dilakukan apekreseksi, maka diperlukan bahan yang dapat mempercepat pertumbuhan alveolar yaitu kitosan (2-asetamida-2-dioksi- β -D-Glukosa) . Kitosan yang merupakan hasil deasetilasi kitin mempunyai beberapa sifat *hydrophilicity, biocompatibility, biodegradability*, anti bakteri dan afinitas terhadap enzim, sehingga gigi dapat dipertahankan sesuai fungsinya. Untuk lebih jelasnya tentang peran *Nano Chitosan* sebagai pendukung untuk regenerasi tulang dapat dilihat pada BAB II

3.2 Saran

Untuk pengobatan granuloma dan kista perlu dilakukan penelitian lebih mendalam dan cermat untuk memperoleh hasil yang baik

Daftar Pustaka

- Ash, Nelson, 2003. Dental Anatomy, Physiology and Occlusion. Eighth Edition, P 47
- Ashraf F. Fouad and Linda Levin, 2006. Pulp Reaction to Caries and Dental Procedures. Path way of the Pulp, Ninth Edition : 514-516.
- Andris Jaunberzins, James L. Gutmann, David E. Witherspon, and Richard P. Harper. 2000, Effects of Calcium Hydroxide and Tumor Growth Factor- & On Collagen Synthesis in Subcultures I and V of Osteoblasts. JOE. Vol 26 (9): 494-499
- Al Reader, John M. Masstein, and Kenneth M. Hargreaves, 2006. Local Anesthesia in Endodontics. Pat way of the Pulp, Ninth Edition: 691-692
- Baum L, Philips RW, Lund, 2007. Buku ajar Ilmu Konservasi Gigi, Edisi 3, Penerjemah : Rasinta Tarigan, EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta
- Barthel CR, Zaritzki FF, Raab WH-M, at al. 2006. Bacterial Leakage in Root Filled With Different Medicaments and Sealed With Cavit. (Heinrich-Heine- Univ, Duesseldorf, Germany; Berlin), J Endod 32: 127-129
- Bence R. 2000. Pedoman Endodontik Klinik. Penerjemah : Soendoro EH, Univ Indonesia Press, Jakarta
- Claudia Roxane Barthel, Bianca Rosenkranz, Ariane Leuenberg, and Jeaw-Francois Roulet. 2000. Pulp Capping of Carious Exposures : Treatment Out came after 5 and 10 years : A Retrospective study. JOE, Vol 26 (9): 525-528
- Craig Baumgartner, Jeffrey W. Hutter, and Jose F. Siquiera, Jr, 2006. Endodontic Microbiology and Treatment of Infection, Path way of the Pulp, Ninth Edition: 580-583
- Dedi Nugroho Santoso, Budi Oetomo Roeslan. 2006. Komunikasi sel saraf pada Inflamasi pulpa, Majalah Ilmiah Kedokteran Gigi, Vol 21(3): 119-128
- David H. Pashley, Richard E. Walton, and Harold C. Slaukin, 2002. Histology and Physiology of the Dental Pulp. Endodontics , Fifth Edition: 25-28
- Eric Gallatin, Al Reader, Robert Nist, and Mike Beck, 2000. Pain Reduction in Untreated Irreversible Pulpitis Using an Intraosseous Injection of Dep-Medrol. JOE. Vol 26(9) : 636-638
- El Meligy OAS, Avery DR. 2006. Comparison of Mineral Trioxide Aggregate And Calcium Hydroxide as Pulpotomy Agents in Young Permanent teeth (Apexogenesis). Alaxanderia Univ, Egypt; Indiana Univ, Indianapolis. Pediatr Dent 28: 399-401

- Ford PTR. 2003. Restorasi Gigi, Edisi 2, Penerjemah : Narlan Sumawinata, EGC
Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta
- Grossman LI, et al. 2005. Ilmu Endodontik Dalam Praktek, Edisi 11, Penerjemah:
Rafiah Abyono, EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta
- Gulabivala, 2004. Biological and Clinical Rationale for Pulp Therapy,
Endodontics, Third Edition: 3-7
- Howard S. Selden, 2000. Diagnostic Thermal Pulp Testing : A Technique, JOE,
Vol 26(9) : 623-624
- John I. Ingle, Geoffrey S. Heithersay, Gary R. Hartwell, Albert C. Georig,
F. James Marsall, Robert M. Krasny, Alfred L. Frank, and Cyril Gaum, 2002.
Endodontic Diagnostic Procedures, Endodontics, Third Edition : 3-7
- John I. Ingle, Richard E. Walton, Stanley F. Malamed, Jeffrey M. Coil, John A.
Kamadehi, and Joseph T. Barss, 2002. Preparation For Endodontic
Treatment, Fifth Edition : 357-360
- Jaber, W.D. Swaim, and R.A. Dionne, 2003. Immunohistochemical Localization
Of μ -Opioid Receptors in Human Dental Pulp . JOE, 29(1) : 108-110
- Maria Concepcion and Henry J. Rankow, 2000. Accessory Branch of the Mental
Nerve, JOE. Vol 26(9) ; 619-620
- Melissa A. Harmon, John G. Tew, Al M. Best, Chim-L. Hahm, Richmond, VA
And Shandong, China, 2009.. Mature Dendritic Cell in Inflamed Human
Pulp Beneath Deep Caries, OOOE. Vol 107(5&6) : 727-730
- Martin Trope, Lucia Blanco, Noah Chivian, and Asgeir Sigurdsson, 2006. The
Role of Endodontics After Dental Traumatic Injuries. Related Clinical
Topics, Part III, Chapter 16 : 611-613
- Sandra Maria de Melo Maltos, Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho, Fernando
Veloso Silva, Jacques de Carvalho, Leda Quercia Vieira, and Luiz de
Macedo Farias, 2003. Bacterial Concentrations Determine the Ability to
Implant in the Root Canal System and Translocate to Lymph Nodes in
Germ-free Mice. JOE. 29(1): 24-27
- Siti M.K. Soerono Akbar, 2003. Kumpulan Naskah 1991-2003 : 43-49 , Hafizh,
Jakarta
- Stock and Y-L. Ng, 2004. Root Canal Retreatment. Endodontics, Third
Edition : 269-273
- Takasi Matsuo, Toshiyuki Shirakami, Kazumi Ozaki, Tadashi Nakanishi,
Hiromishi Yumoto, and Shigeyuki Ebusi, 2003. Proinflammatory Cytokines
Induce Cyclooxygenase-2 mRNA and Protein Expression in Human
Pulp Cell Cultures, JOE. 29(3): 194-200

- Walton, 2007. Prinsip dan Praktek Ilmu Endodonsia, Penerjemah : Narlan
Sumawinata, EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta
- Wangijaya I, 2005. Anatomi Gigi, Edisi 2, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta
- Wiene FS, 2002. Endodontic Therapy, 8 th Edition, Mostby-Year Book, Inc,St.
Louis

BAB II

Proses *Nano Chitosan* Dari Limbah Kulit Udang Sebagai Pendukung Pada Regenerasi Tulang Alveolar

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Konsumsi udang menghasilkan limbah dalam jumlah besar yang belum dimanfaatkan secara komersial. Kulit hewan invertebrate laut, terutama *Crustacea* mengandung kitin dalam kadar tinggi, berkisar antara 20-60 % tergantung spesies. Apabila limbah tersebut tidak dimanfaatkan dengan baik, maka akan menimbulkan masalah pencemaran lingkungan. Di lain pihak, limbah tersebut dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku industri, terutama kitin dan kitosan (Departemen Kelautan dan Perikanan 2000). Berdasarkan cara pengolahannya, limbah kulit udang dapat dikategorikan menjadi tiga jenis yaitu, pertama kepala udang yang biasanya merupakan hasil sampingan dari industri pembekuan udang kedua yaitu industri pengalengan udang, ketiga percampuran keduanya berasal dari industri udang (Suratman 1992)

Kitin, polimer alami kedua yang paling banyak tersedia di alam setelah selulosa, merupakan polimer aminoglukan dari N-asetil-D-glukosamin yang tidak larut air. Beberapa manfaat yang dapat diambil dari kitin, yaitu di bidang kesehatan sebagai bahan mempercepat penyembuhan luka bakar, lebih baik dari yang terbuat dari kitin. Selain itu juga sebagai bahan pembuatan garam-garam glukosamin yang mempunyai banyak manfaat di bidang kedokteran, misalnya untuk menyembuhkan influenza, radang usus dan sakit tulang dan pertumbuhan tulang (Shahidi *et al.* 1999)

Nano Chitosan merupakan hasil deasetilasi kitin, sedangkan kitin dapat diisolasi dari serangga dan jamur, kerangka dan cangkang hewan golongan Artropoda, Mollusca, Nematoda, dan *Crustacea*. Cangkang kulit udang mempunyai kandungan protein 34,9%; mineral CaCO₃ 27,6%; kitin 18,1% dan komponen lain seperti zat terlarut, lemak dan protein tercemar sebesar 19,4% (Suhardi 1993; Sun 1999)

Nano Chitosan mempunyai beberapa keuntungan yaitu mudah didapat, prosedur isolasinya mudah, tidak beracun dan tidak membahayakan. *Nano Chitosan* mempunyai beberapa sifat yang menguntungkan antara lain *hydrophilicity*, *biocompatibility*, *biodegradability*, sifat anti bakteri dan mempunyai afinitas yang besar terhadap enzim. *Nano Chitosan* merupakan polimer alam yang dapat berikatan secara crosslink apabila ditambahkan crosslinked agent misalnya glutaraldehid, gliksai atau kation Cu²⁺. Proses imobilisasi enzim dengan *Nano Chitosan* yang telah mengalami *crosslinked* disebut sebagai imobilisasi tipe pengikatan *crosslinked agent* yang digunakan adalah kation magnesium (Sarah 2001)

Kulit udang untuk dirubah menjadi zat kitin melalui teknologi pengolahan dilakukan melalui beberapa tahap, yaitu (1) Dimineralisasi yaitu limbah kulit udang dicuci dengan air, dikeringkan di

bawah sinar Matahari sampai kering, lalu digiling menjadi bubuk.(2) Deproteinisasi yaitu limbah udang yang telah dimineralisasi dicampur dengan larutan sodium hidroksida 3,5 persen.(3) Deasetilisasi kitin menjadi *Nano Chitosan* yaitu *Nano Chitosan* dibuat dengan menambah sodium hidroksida 60 persen , panaskan menjadi residu berupa padatan(Hanati *et al.*1999)

Nano Chitosan dan kitin yang banyak mengandung mineral seperti kalsium, magnesium, fosfor sangat baik sebagai rangsangan pembentukan jaringan baru setelah terjadinya kerusakan pada jaringan lunak maupun keras seperti jaringan mukosa dan jaringan tulang.Regenerasi dari jaringan keras, tidak terlepas dari peranan osteoblas, osteoklas, tibrinogemgranulosit, makrofag, stimulating faktor, IL-1, IL-6,TNF dan *growth factor*.Osteoblas mempunyai fungsi utama mensintesis komponen organik tulang yaitu kolagen dan glikoprotein. Sel ini biasanya terletak pada permukaan jaringan tulang, berbentuk kuboid atau kolumnar, dengan posisi saling bersebelahan seperti jaringan epitel (lunquerira 1992)

Untuk membentuk tulang, osteoblas memerlukan sumber bahan anorganik berupa garam kalsium yang didapat dari darah vascular yang sekaligus akan mendorong dan memicu aktivitas osteoblas. Komponen anorganik *Nano Chitosan* berbentuk kristal hidroksiapatit yang merupakan 70% dari seluruh komponen regenerasi tulang (Aoki 1991)

1.2 Permasalahan

Apakah *Nano Chitosan* dari limbah kulit udang yang mengandung bahan anorganik tertentu berpotensi dalam proses regenerasi tulang alveolar

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui bahan anorganik mana yang mungkin dapat merangsang proses regenerasi tulang alveolar.

1.4 Manfaat

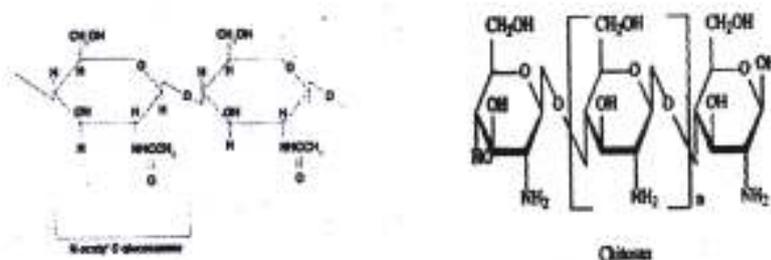
Manfaat yang diharapkan adalah memperluas wawasan mengenai kandungan *nano chltosan* limbah kulit udang yang dapat merangsang regenerasi jaringan lunak (mukosa) dan jaringan tulang alveolar.

2. Pembahasan

Nano Chitosan adalah suatu polimer karbohidrat yang tidak bercabang, mengandung 2 amino-2-deoksi-D-glukosa dengan ikatan $\beta(1-4)$ dan diperoleh dari deasetilasi kitin. *Nano Chitosan* dapat dihasilkan dari kitin dengan melakukan proses deasetilasi. Deasetilasi atau destilasi kitin dapat dilakukan dengan menambah NaOH dengan konsentrasi 40-50% atau 450gr/l NaOH pada suhu 100°C selama dua jam (Singia & Chawia 2001). *Nano Chitosan* merupakan polimer yang terdistribusi secara alami dan meluas, terdapat pada vertebrata laut, serangga, jamur dan kapang berpartikel nano. Meskipun sumber kitin di alam bermacam-macam, namun sampai saat ini sumber utama yang selalu dan mudah dieksplorasi adalah kulit udang dan kulit kepiting, walaupun jenisnya bermacam-macam (Leffler 1997; Singia 2001)

Dalam limbah kulit udang untuk mendapatkan kitin, dimana kitin berikatan dengan garam-garam anorganik terutama kalsium karbonat, protein, fosfor, fluor dan lipid termasuk pigmen—pigmen, sehingga bila memisahkan kitin harus melalui proses isolasi. Isolasi kitin melalui tiga tahap utama, yaitu proses deproteinisasi, demineralisasi dan depigmentasi (Efendi 2001)

Nano Chitosan dapat digunakan pada berbagai bidang industri seperti pertanian, tekstil, pangan, farmasi dan kimia. Bila dilarutkan dalam asam lemah, *Nano Chitosan* akan menjadi polimer kationik dengan struktur linear sehingga dapat digunakan pada proses flokulasi, pembentuk film dan imobilisasi bakteri/ enzim, dengan struktur kimia sebagai berikut (Ornum 1992)



Gambar 1. 5: Struktur kimia kitin dan *Chitosan* (Ornum 1992)

Mineral dalam limbah kulit udang dapat mencapai 40-50% perberat bahan keringnya. Mineral ini terutama berupa karbonat (CaCO₃) yang berikatan secara fisik dengan kitin. Mineral dapat dihilangkan dengan menggunakan larutan HCl encer pada suhu kamar atau dengan larutan EDTA (*Ethilene Diamine Tetra Acetic Acid*), atau juga menggunakan 1,25 N HCl selama 1 jam pada suhu 70-75°C dengan perbandingan 1:10 (Bastaman.1989). Pada proses deasetilasi kitin menjadi *Nano Chitosan* dilakukan di industri secara termokimia menggunakan alkali kuat pada suhu tinggi. Hasil dari proses ini belum sepenuhnya memuaskan sebab kualitas *chitosan* yang dihasilkan masih bervariasi dalam berat molekul, viskositas dan derajat deasetilasi. Selain itu, proses termokimia juga membutuhkan energi dalam jumlah besar untuk menghasilkan dan mempertahankan suhu tinggi serta

menghasilkan limbah dan produk samping berupa alkali dengan konsentrasi tinggi yang berpotensi menjadi toksik bagi lingkungan. Proses deasetilasi dapat dilakukan dengan cara enzimatik menggunakan kitin deasetilase (CDA) sehingga diharapkan akan lebih mudah dikendalikan, lebih efisien, spesifik dan meminimalkan produk samping, serta memiliki viskositas dan berat molekul spesifik pula (Tsigos *et al.*2000)

2.1 Pembuatan *Chitosan*

Limbah kulit udang mengandung zat kitin sekitar 99,1 %. Adapun teknologi pengolahan tersebut dilakukan melalui beberapa tahap yaitu dimineralisasi, deproteinisasi dan deasetilasi kitin menjadi *Chitosan* (Bambang 2003)

2.1.1 Dimineralisasi

Limbah kulit udang dicuci dengan air mengalir, dikeringkan dengan sinar Matahari sampai kering, lalu digiling sampai menjadi serbuk ukuran 40-60 mesh. Kemudian dicampur asam klorida 1,25 N dengan perbandingan 10:1 untuk pelarut dibanding kulit udang, lalu dipanaskan pada suhu 90°C selama satu jam. Residu berupa padatan dicuci dengan air sampai pH netral dan selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama dua puluh empat jam. Kemudian dicampur asam klorida 1N (HCl 1 N) dengan perbandingan 10:1 untuk pelarut dibandingkan kulit udang, lalu diaduk merata sekitar 1 jam. Biarkan sebentar, kemudian panaskan pada suhu 90°C selama satu jam. Residu berupa padatan dicuci dengan air sampai pH netral dan selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 80°C selama dua puluh empat jam atau dijemur sampai kering(Hanafi *et al.*1999)

2.1.2 Deproteinisasi

Proses ini dilakukan pada suhu 60-70°C dengan menggunakan larutan NaOH 1 M dengan perbandingan serbuk udang dengan NaOH = 1:10 (gr serbuk/ml NaOH) sambil diaduk selama 60 menit. Kemudian campuran dipisahkan dengan disaring untuk diambil endapannya. Selanjutnya dilakukan (a) pencucian dan pengeringan yaitu pencucian endapan dilakukan dengan menggunakan aquadest sampai pH netral. Selanjutnya disaring untuk diambil endapannya dan dikeringkan. (b) Penghilangan warna yaitu endapan hasil demineralisasi dan deproteinisasi diekstrak dengan aseton dan di bleaching dengan 0,31%NaOCl (w/v) selama lima menit pada suhu kamar. Perbandingan solid dan solven 1:10 (w/v)(Bambang 2003)

2.1.3 Deasetilasi kitin menjadi *Chitosan*

Kitin yang telah dihasilkan pada proses diatas dimasukkan dalam larutan NaOH dengan konsentrasi 20,30,40,50 dan 60% (berat) pada suhu 90-100°C sambil diaduk kecepatan konstan selama enam puluh menit. Hasilnya berupa slurry disaring, endapan dicuci dengan aquadest lalu ditambah larutan HCl encer agar pH netral kemudian dikeringkan. Maka terbentuklah *Chitosan*. Selanjutnya *Nano Chitosan* yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan metode FTIR untuk

mengetahui Derajat Deasetilasi(DD). Untuk menentukan DD digunakan metode garis oleh Moore dan Robert (Hanall *et al.* 1999)

2.2 Karakteristik Kitin dan Chitosan

Tabel 1.Kitin

Fisik	Berbentuk padat, Kristal, Putih	Hirano (1986) Bastaman (1989) Basmal (2001)
Biokimia	Terdegradasi oleh enzim	Goosen (1997)
Kimia	Tidak larut dalam air, asam organik encer, alkali encer dan pekat, alcohol dan pelarut lainnya tetapi larut dalam asam-asam mineral pekat	Hirano (1986)

Tabel 2 Kitosan

Fisik	Berbentuk padat, Kristal, Putih	Hirano (1986) Bastaman (1989) Basmal (2001)
Biokimia	Terdegradasi oleh enzim	Goosen (1997)
Kimia	Tidak larut dalam air, basa kuat, asam sulfat, lainnya larut dalam asam klorida, nitrat dan asam fosfat	Hirano (1986)

Tabel 3. Standar mutu kitin

Parameter	Nilai
Ukuran partikel, warna	Dari bubuk sampai serpihan, putih
Kadar Air (%db)	$\leq 10,0$
Kadar abu (%db)	$\leq 2,0$
Derajat Destilasi (%)	≥ 15
Kelarutan dalam air :	
- Air	Tidak larut
- Pelarut encer	Tidak larut
- Pelarut organic	Tidak larut
- LiCl ₂	Sebagian larut
Enzim Pemecah	Lisozim dan Kitinase

Tabel 4. Standar mutu Kitin

Parameter	Nilai
Ukuran partikel, warna	Dari bubuk sampai serpihan, putih
Kadar Air (%db)	< 10,0
Kadar abu (%db)	< 2,0
Warna Larutan	Jernih
Derajat Destilasi (%)	>70
Viscositas (dalam cps) :	
- Rendah	< 200
- Medium	200-799
- Tinggi	800-2000
- Ekstra Tinggi	>2000

2.3 Manfaat *Chitosan*

2.3.1 Bidang Peternakan dan lingkungan hidup

Chitosan dari limbah kulit udang, dapat digunakan sebagai agensia penggumpal dalam penanganan limbah terutama limbah berprotein yang kemudian dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak yang tentu tidak mengurangi bahan-bahan yang berbahaya bagi tanaman. Pakan ternak yang dihasilkan dari limbah *Chitosan* ini dapat digunakan sebagai bahan makanan untuk ternak-ternak (bid.Peternakan). Dengan kandungan proteinnya, maka pakan ternak yang dihasilkan baik untuk diberikan kepada hewan ternak. Dari segi lingkungan, penggunaan *Chitosan* sebagai bahan pengawet kayu relative aman karena sifatnya yang tidak toksik dan *biodegradable*. Sebab selama ini bahan pengawet yang sering digunakan merupakan bahan kimia beracun yang kurang ramah lingkungan dan *unbiodegradable*. Dengan menggunakan *Chitosan* sebagai pengawet kayu dari limbah kulit udang ini, berarti kita mengurangi penggunaan bahan-bahan yang dapat merusak lingkungan (Hanati *et al.*1999)

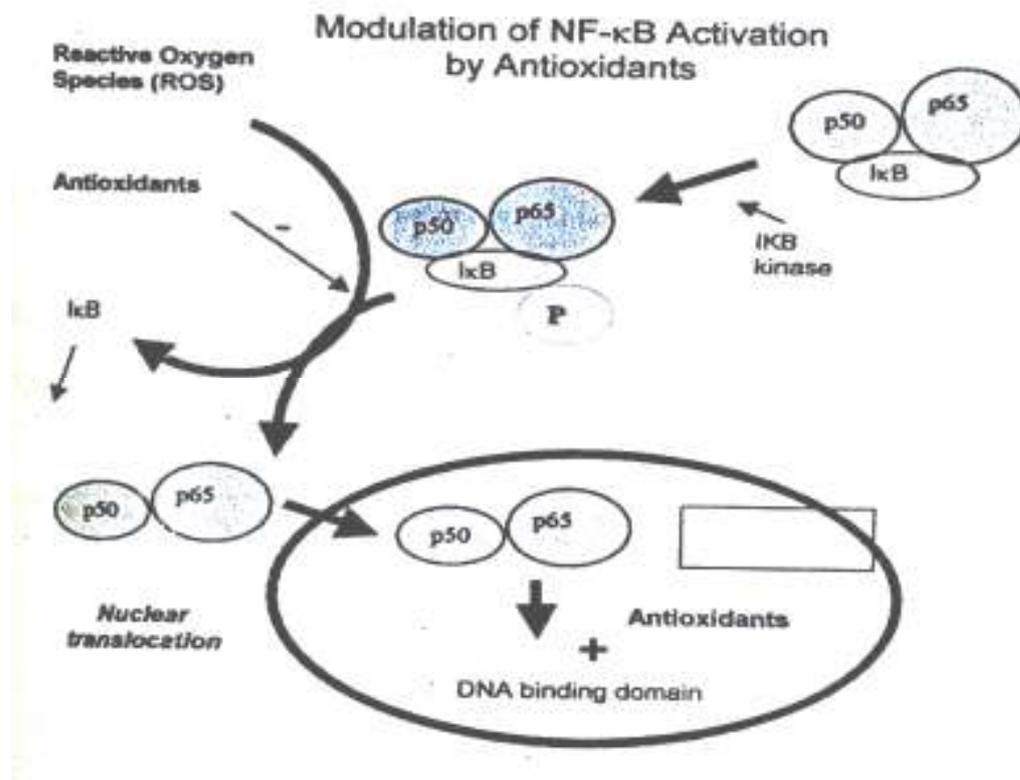
2.3.2 Bidang Kedokteran

2.3.2.a Sebagai antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya pada molekul sekitarnya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas. Antioksidan dan reduktor berfungsi untuk mencegah terjadinya oksidasi atau menetralkan senyawa yang telah teroksidasi dengan cara menyumbangkan hydrogen atau electron (Silalahi 2006)

Derivat *Chitosan* dapat menghambat radikal superoksida (20%). Penggunaan *system phenazin methosulphate* (PMS), *8-nicotinamide adenine dinucleotide* (NADH), *nitroblue tetrazolium* (NBT), *Nano Chitosan* yang larut dalam air (chitoo/igosacharide) mempunyai daya hambat 54,8% pada

konsentrasi 1001mol/L, sedangkan control positif asam ascorbat sebesar 57,4% ‘ pada konsentrasi yang sama. Selanjutnya bahwa selain radikal superoksid, *Chitosan* yang larut , dalam air dapat menghambat *hydrogen peroksida* (H2O2). Dengan demikian *Chitosan* dan derivatnya berpotensi sebagai antioksidan (Yang *et al.* 2005)



Gambar 2 1 ; Efek antioksidan terhadap aktivasi NF-kB (Ho 2002) Antioxidant menonaktivasi degradasi Iκ3 dan meningkatkan transcriptional activity sehingga tidak terjadi ikatan antara NF—kB dan DNA binding domain

2.3.2.b Sebagai anti radikal bebas

Radikal bebas merupakan suatu atom, atau molekul yang memiliki suatu elektron tidak berpasangan. Elektron yang tidak berpasangan tersebut memiliki kecenderungan untuk membentuk pasangan dengan menarik electron dari senyawa lain sehingga terbentuk radikal baru yang sangat reaktif. Radikal bebas dapat berasal dari proses metabolisme di dalam tubuh dan dapat juga berasal dari lingkungan (Halliwell 1999)

Radikal bebas yang bersifat oksidatif dapat merusak molekul makro pembentuk sel seperti protein, karbohidrat, lipid dan asam deoksiribonukleat(DNA), yang mengakibatkan sel menjadi rusak, mati, atau mengalami mutasi. Sistem pertahanan tubuh dalam bentuk antioksidan, tetapi radikal bebasnya lebih dominan dan terakumulasi di dalam jaringan atau sel maka dapat menimbulkan berbagai penyakit degenerative (Januar *et al.* 2004)

Oligo Nano Chitosan yang memiliki berat molekul 1-3 kDa dan 3-5 kDa dapat mencegah terjadinya *oxidative stress*. *Oxidative stress* terjadi karena (1) berkurangnya atau tidak adanya antioksidan akibat dari mutasi enzim antioksidan, seperti superoksid dismutase, glutathion peroksidase ataupun kurangnya asupan antioksidan seperti pada kondisi malnutrisi, (2) peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS) seperti pada penyakit inflamasi kronik (Halliwell and Gutteridge 1999; Shon *et al.* 2002). *Reactive oxygen species* (ROS) merupakan hasil samping dari metabolisme sel atau dapat juga berasal dari sinar Matahari, radiasi ion, ultraviolet dan reaksi kimia yang secara terus menerus diproduksi didalam mitokondria dan kebanyakan di dalam sel (Yang *et al.* 2005)

Mekanisme penghambatan radikal bebas oleh *Nano Chitosan* dan derivatnya, berkaitan dengan penghambatan aktivitas NF- κ B. Perlakuan dengan Ox-LDL meningkatkan ekspresi molekul adhesi ICAM dan EAM-1 melalui aktivasi NF- κ B (Janie *et al.*, 2000). NF- κ B merupakan target utama dari ROS, hiperglikemi *stress oksidatif*. NF- κ B dapat diaktivasi oleh berbagai stimulan `eksogen dan endogen termasuk hiperglikemi, ROS, meningkatnya asam lemak bebas (FFA), *tumor necrosis factor* (TNF) ion dan interleukin (IL)-1(3 serta sitokin proinflamasi lainnya, kerusakan DNA, infeksi virus dan radiasi UV. NF- κ B memegang peran yang penting dalam memperantarai respon imun dan inflamasi serta apoptosis. Regulasi NF- κ B berkaitan dengan sejumlah penyakit kronik termasuk diabetes dan proses regenerasi tulang (Brand *et al.*, 1996)

Nano Chitosan yang larut dalam air memiliki potensi sebagai antitumor dan selanjutnya *Nano Chitosan* yang larut dalam air juga dapat meningkatkan aktivitas *natural killer cells* (Kajimoto *et al.*, 1999). *Natural killer Cells* (NK) adalah sel limfosit granular yang berukuran besar. Pada manusia normal, sel NK terdapat dalam jumlah 5-15% dari jumlah limfosit darah (Kresno 1996).

Dengan demikian ada keterkaitan antara aktivasi NF- κ B dengan penghambatan akibat efek dari *Nano Chitosan*. Karena secara umum pemberian antioksidan dapat menurunkan stress oksidatif dan menghambat oksidasi LDL. Melalui mekanisme penghambatan pada oksidasi LDL, aktivasi NF- κ B juga dapat dihambat. Sehingga *Nano Chitosan* merupakan senyawa anti radikal bebas (Brand *et al.* 1996)

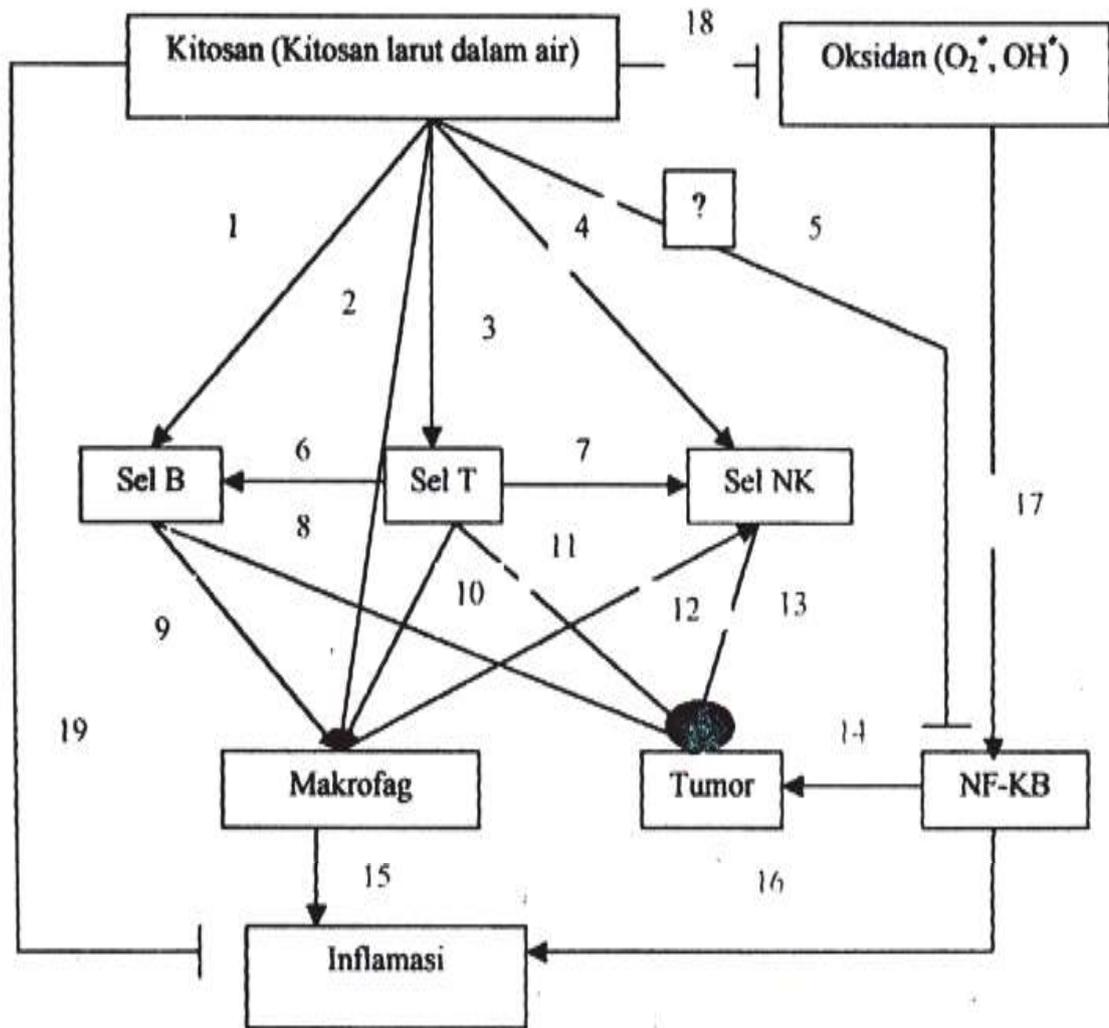
2.3.2.c Sebagai anti tumor

Bila imunitas tubuh mengalami penurunan dan tubuh tidak mampu membunuh sel tumor/kanker maka perlu adanya senyawa bahan aktif alam dari luar tubuh atau senyawa bioaktif yang efektif dan selektif yang dapat menghambat pertumbuhannya sekaligus menaikkan daya tahan tubuh. Senyawa bioaktif tersebut dapat dipergunakan sebagai bahan preventif alami yang berasal dari tumbuhan, hewan, maupun dari mikroorganisme laut (Januar *et al.* 2005)

Biota laut mengandung berbagai jenis senyawa yang mempunyai aktivitas biologi khususnya sebagai anti tumor (Schmitz *et al.* 1993). *Nano Chitosan* dan derivatnya adalah salah satu sumber daya alam akuatik yang memiliki aktivitas biologi. Senyawa ini merupakan suatu polimer karbohidrat yang tidak bercabang dari desetilasi kitin. Berbagai penelitian telah dilakukan tentang pemberian

Nano Chitosan berpengaruh terhadap pertumbuhan dan aktivitas tumor pada binatang tikus (Nashimura *et al.*1986)

Nano Chitosan yang larut dalam air secara signifikan menghambat proliferasi sel kanker ASG. Proliferasi merupakan fungsi biologis dasar pada sel limposit, yaitu meliputi proses diferensiasi dan pembelahan sel. Perbedaan antara sel kanker dan sel normal adalah sifat proliferaatifnya. Sel kanker umumnya mempunyai kecepatan proliferasi lebih tinggi dibanding sel normal. Di samping itu, sel kanker umumnya telah kehilangan kontrol proliferasi karena mengalami perubahan gen yang mengatur *cell cycle* (Shen 2002). Aktivitas antiproliferaatif *Nano Chitosan* larut dalam air pada sel tumor mungkin melibatkan pada penghambatan faktor transkripsi yang mengakibatkan penghambatan RNA polimerase sehingga pertumbuhan sel menjadi terhambat. Penghambatan proliferasi sel kanker oleh *Nano Chitosan* larut dalam air melalui mekanisme apoptosis kemungkinan melalui jalur Fas yang mengaktifasi caspase 8 dan memacu apoptosis (Hanhanan 2000)



Gambar 5. Alur peran kitosan sebagai antitumor

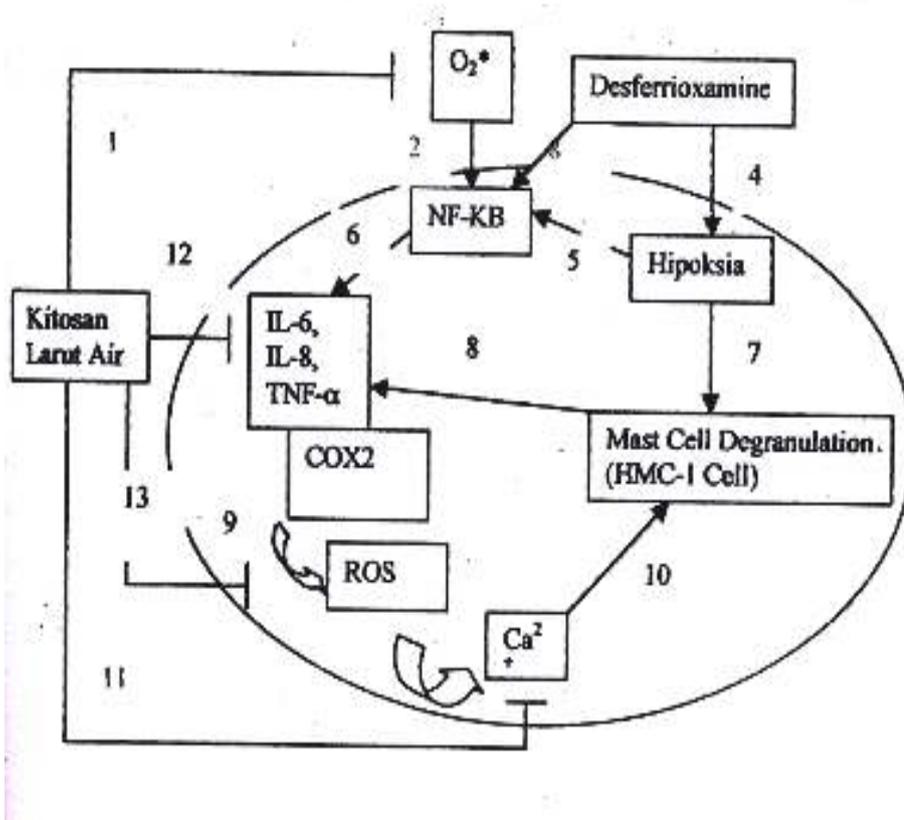
(1) imunisasi beberapa imunogen, pemberian kitosan pada *mucosal interface* meningkatkan respon antibodi khususnya produksi IgA, TGF β , IL-10 (Weiner, 2000; Mayer & Shao, 2004; Weiner, 2001). (1, 3, 6, 8, 9, 10, 11) kitosan mentriger/memicu pelepasan IL-10, mengekspresikan IL-4 dan TGF β mRNA (Ding & Shevach, 1992). IL-4 berfungsi meningkatkan proliferasi sel B, menginduksi ekspresi MHC kelas II mendorong fungsi antibody (IgE, IgG), menginduksi reaktivitas sel Tsitotoksik, IL-4 sinergis dengan IL-2 dalam efek antitumor (Subowo, 1993). (2, 12) kitosan larut dalam air dapat menginduksi aktivitas makrofag melalui produksi sitokin seperti IFN γ , IL-12, IL-18 untuk meningkatkan aktivitas NK (Maeda & Kimura, 2004). (4, 13) kitosan larut dalam air meningkatkan aktivitas NK (Kajimoto *et al*, 1996). (5) dapatkah kitosan menghambat NF-KB? (perlu penelitian). (6, 8) aktivitas limfosit B oleh antigen menjadi sel yang menghasilkan antibody memerlukan bantuan limfosit T helper (Subowo, 1993). (7, 10, 12) peran sel NK tergantung dari rangsangan bersama pada sel T dan makrofag (Kresno, 2001). (13) sel NK melisiskan, mengeliminasi sel tumor dalam sirkulasi (Kresno, 2001) (14) NF-KB mengaktifkan proliferasi sel tumor (Ho, 2002). (15, 19) kitosan menghambat produksi inflammatory mediator melalui protease peptone dari peritoneal macrophages (Porporatto *et al*, 2003). (16) NF-KB mengekspresikan protein inflamasi (Ho, 2002). (17) oksidan (ROS) mengaktifasi NF-KB (Ho, 2002). (18) kitosan larut dalam air dapat menghambat radikal superoksida dan hidroksil (Yang *et al*, 2005).

2.3.2.d *Nano Chitosan* sebagai mediator inflamasi

Inflamasi merupakan proses yang sangat vital untuk semua organisme dan berperan baik dalam mempertahankan kesehatan maupun terjadinya berbagai penyakit, berupa respon protektif tubuh terhadap trauma atau invasi mikroba yang berbahaya seperti gejala sakit (dolor), panas (kalor), merah (rubor), bengkak (tumor) dan hilangnya fungsi (*Functio laesa*) (Rengganis 2004). Fenomena itu dapat terjadi untuk mengeliminasi toksin atau bahan iritan dan merespon antibodi, komplemen, leukosit dan substansi kemotaktik menuju ke titik radang. Kejadian ini tidak terlepas dari peran zat-zat yang berfungsi sebagai mediator kimia yang dilepaskan oleh sel-sel yang mengalami kerusakan. Mediator kimia tersebut antara lain histamine. Aktivasi *mast cell* selain dapat menghasilkan histamine, ada juga menghasilkan beberapa proinflamasi dan sitokin seperti TNF- α 1, IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 dan *tumor growth factor* (TGF)- β 1 (Plaut, *et al.* 1989; Bradding *et al.* 1993)

Nano Chitosan yang larut dalam air menghambat DFX yang menyebabkan produksi sitokin proinflamasi melalui blokade aktivasi NF- κ B di dalam sel HMC-1. Selanjutnya *Nano Chitosan* yang larut dalam air tadi memodulasi sitokin inflamasi melalui penghambatan aktivasi NF- κ B. Dengan demikian *Nano Chitosan* yang larut dalam air merupakan suatu inhibitor dari aktivasi NF- κ B pada *mast cells* HMC-1 yang bermanfaat bagi pengobatan hipoksia akibat penyakit inflamasi (Seo *et al.* 2003)

Mast cells merupakan komponen seluler dari sistem imun, distribusinya perivaskuler dan tersebar pada berbagai daerah portof entery. Sebagai sel imun, *mast cells* memiliki berbagai kemampuan sebagaimana yang dimiliki oleh neutropil dan makrofag, selain itu *mast cells* masih mempunyai kelebihan dalam hal berumur panjang dan memiliki reseptor untuk IgE (Abraham *et al.* 1997)



Gambar 2 2 Keterkaitan *Nano Chitosan* larut dalam air dengan *mast cells*

1. Kitosan larut dalam air menghambat radikal superoksid (Yang *et al.* 2005)
2. Radikal superoksid (ROS) mengaktivasi NF-k β (Ho 2002)
3. Desferrioxamine mengaktifkan NF-k β (Seo *et al.* 2003)
4. Desferrioxamine sebagai mimik hipoksia (Seo *et al.*2003)
5. Hipoksia mengaktivasi NF-k β (Simakajornboon *et al.*2001)
6. NF-k β mengekspresikan IL-6, IL—8, TNF- α (Thompson *et al.*1995)
7. Hipoksia menyebabkan degranulasi *mast cell* (Bratawidjaja 2006)
8. Desferrioxamine menyebabkan produksi sitokin IL-6, IL-8, TNF- α dalam sel HMC-1 (Seo *et al.*2003)
9. TNF- α , interferon gama,iNOS, COX2 dapat menstimulasi enzim memproduksi ROS (Anonymous 2007)
10. Ca²⁺ menyebabkan degranulasi *mast cells* (Bratawidjaja 2006)
11. *Nano Chitosan* larut air memiliki *regulatory effects* terhadap penyakit inflamasi alergi melalui *down-modulating* Ca²⁺ (Kim *et al.*2004)
12. *Nano Chitosan* larut air menghambat desferroxamine yang mengekspresikan IL-6,IL8,TNF- α (Seo *et al.* 2003)
13. *Nano Chitosan* larut air menghambat radikal superoksid (ROS) (Yang *et al.*2005)

2.4 Proses Regenerasi Tulang alveolar

Dengan adanya proses pembentukan limbah kulit udang menjadi *Nano Chitosan* serta manfaat yang dimilikinya, maka dalam melakukan tindakan apekreseksi terjadi pengambilan tulang alveolar dan pemotongan akar gigi. Terbentuknya ruangan dari tindakan apekreseksi diperlukan proses regenerasi tulang alveolar baru (*regeneration alveolar bone*). Untuk mempercepat proses regenerasi tulang diperlukan mediator tambahan yaitu *Nano Chitosan* untuk mempercepat serta mencegah adanya toksisitas, inflamasi berlebih yang dapat menghambat proses regenerasi tulang alveolar (Bambang 2003)

2.4.1 Osifikasi

Osifikasi atau proses pembentukan tulang, dimulai dari sel-sel mesenkim memasuki daerah osifikasi, bila daerah tersebut banyak mengandung pembuluh darah akan membentuk osteoblas, bila tidak mengandung pembuluh darah akan membentuk kondroblas. Pembentukan tulang rawan terjadi segera setelah terbentuk tulang rawan (kartilago). Mula-mula pembuluh darah menembus perichondrium dibagian tengah batang tulang rawan, merangsang sel-sel perichondrium berubah menjadi periosteum. Bersamaan dengan proses ini pada bagian tulang rawan di daerah diafisis yang disebut juga pusat osifikasi primer, sel-sel tulang rawan membesar kemudian pecah sehingga terjadi kenaikan pH (menjadi basa) akibatnya zat kapur dideposisikan, dengan demikian terganggu nutrisi sel-sel tulang rawan dan menyebabkan kematian pada sel-sel tulang rawan ini. Kemudian akan terjadi degenerasi (kemunduran bentuk dan fungsi) dan pelarutan dari zat—zat interseluler (termasuk zat kapur) bersamaan dengan masuknya pembuluh darah ke daerah ini, sehingga terbentuklah rongga untuk sumsum tulang. Pada tahap selanjutnya pembuluh darah akan memasuki daerah epifise sehingga terjadi pusat osifikasi sekunder, terbentuklah tulang spongiosa. Dengan demikian masih tersisa tulang rawan di kedua ujung epifise yang berperan penting dalam pergerakan sendi dan satu tulang rawan diantara epifise dan diafise yang disebut dengan cakram epifise. Selama pertumbuhan, sel-sel tulang rawan pada cakram epifise terus menerus membelah kemudian hancur dan tulang rawan diganti dengan tulang di daerah diafise, dengan demikian tebal cakram epifise tetap, sedangkan tulang akan tumbuh memanjang. Pada pertumbuhan diameter (lebar) tulang, tulang di daerah rongga sumsum dihancurkan oleh osteoklas sehingga rongga sumsum membesar, dan pada saat yang bersamaan osteoblas di periosteum membentuk lapisan-lapisan tulang baru di daerah permukaan (Fister 1980)

2.4.2 Terjadi Osteomielitis

Osteomielitis didefinisikan sebagai infeksi pada tulang yang disebabkan oleh mikroorganisme (Luca Lazzarini 2004). Apekreseksi merupakan tindakan bedah endodontik sangat berpotensi terjadinya osteomielitis bila mana dalam melakukan pembedahan kita mengabaikan segi sterilisasi bahan, alat, tempat dan operator (Bambang 2003)

Tulang alveolar terdiri atas bahan antar sel dan sel tulang. Sel tulang ada 3, yaitu osteoblas, osteosit dan osteoklas. Sedangkan bahan antar sel terdiri dari bahan organik (serabut kolagen, dll) dan

bahan anorganik (kalsium, fosfor, dll). Osteoblas berfungsi untuk mensintesis matriks tulang. Osteosit adalah bentuk dewasa dari osteoblas yang berfungsi dalam resikling garam kalsium dan berpartisipasi dalam reparasi tulang. Osteoklas adalah sel makrofag yang aktivitasnya meresorpsi jaringan tulang. Jadi dalam tulang selalu terjadi perubahan dan pembaharuan (Carlos *et al.*1998). Tulang dapat dibentuk dengan dua cara: melalui mineralisasi langsung pada matriks yang disintesis osteoblas (*osifikasi intramembranosa*) atau melalui penimbunan matriks tulang rawan sebelumnya (*osifikasi endokondral*) (Anonymous 2007)

Tulang alveolar bisa mengalami infeksi melalui 3 cara : aliran darah (osteomielitis hematogen), penyebaran langsung, dan infeksi dari jaringan lunak di dekatnya. Osteomielitis akut ditandai dengan adanya sebuah supuratif atau produksi pus, infeksi yang disertai odema, sumbatan vaskuler, dan thrombosis. Pada awal penyakit, suplai darah ke tulang akan berkurang, diikuti jaringan lunak disekitarnya. Ketika suplai darah ke sumsum dan periosteal terhambat, akan terjadi kematian tulang yang meluas, disebut sequester. Namun, jika diobati secara cepat dan adekuat, dengan antibiotic dan pembedahan, osteomielitis akut dapat dihentikan sebelum kematian tulang. Segera setelah infeksi terjadi, jaringan fibrosa dan sel inflamasi kronik akan terbentuk di sekitar tulang yang mati. Karena terjadi penurunan suplai darah ke daerah tersebut, respon inflamasi secara efektif tidak dapat diproduksi. Hal ini akan menambah kekronisan penyakit. Osteomielitis akut tanpa pengobatan yang efektif dapat menimbulkan osteomielitis kronis baik dari segi klinis maupun histologi (Luca 2004)

Tanda patologis dari osteomielitis kronis adalah adanya nekrosis tulang, regenerasi tulang baru, dan eksudat dari sel darah putih. Pembentukan tulang baru berasal dari fragmen hidup periosteum dan endosteum pada lokasi infeksi. Tulang baru ini akan membentuk selubung, yang dikenal dengan *involucrum*, disertai tulang yang mati di bawah periosteum. *Involucrum* terbentuk tidak teratur dan berlubang membentuk sinus sebagai jalan lewatnya pus. *Involucrum* akan berkembang dalam densitas dan ketebalannya untuk membentuk sebagian atau seluruh diaphysis yang baru (Anonymous 2007)

2.4.3 Penyembuhan

Pada apekreseksi melibatkan manipulasi jaringan lunak dan jaringan keras, penanganan baik pada jaringan lunak (periosteum, gingival, ligamen periodontium, dan mukosa alveolus) maupun jaringan keras (dentin, sementum, dan tulang) dilaksanakan dengan melakukan insisi, diseksi, dan eksisi (Gutmann1991).Penyembuhan pada jaringan lunak mencakup pembekuan darah, inflamasi,epitelisasi, penyembuhan jaringan ikat, dan maturasi serta remodeling baik jaringan ikat maupun tulangnya (Harrison 1991).Pembekuan darah dan inflamasi terdiri atas fase kimia dan fase seluler. Mekanisme pembekuan ini penting karena hal ini berbasiskan perubahan dari fibrinogen menjadi fibrin; dibawah tekanan, bekuan merupakan suatu lapisan yang tipis. Jika bekuan tidak berhasil terbentuk akan berakibat merembesnya darah ke daerah luka. Komponen inflamasi dari penyembuhan adalah suatu jejaring yang kompleks yang terdiri atas baik elemen intrinsik maupun

elemen ekstrinsik. Penyembuhan awal dari epitel terdiri atas pembentukan barrier epitel yang terbuat dari lapisan sel-sel epitel yang nutrisinya bergantung pada jaringan ikat yang berada di bawahnya. Lapisan epitel ini akan bermigrasi sepanjang permukaan fibrin sampai lapisan ini berkontak dengan sel-sel epitel dari sisi berlawanan dari luka dan membentuk jembatan epitel. Komponen jaringan ikat berasal dari fibroblast, yang terdiferensiasi dari sel-sel ektomesenkhim dan tertarik ke daerah luka oleh mediator seluler dan humoral. Pembuluh darah di sekelilingnya akan menyediakan nutrisi bagi fibroblast dan prekursorinya, yang akan membentuk kolagen, awalnya tipe III diikuti kemudian dengan tipe I. Makrofag merupakan bagian yang penting dalam proses ini. Ketika penyembuhan telah matang, inflamasi dan jumlah fibroblas akan berkurang, disertai dengan de-agregasi serabut kolagen menjadi pola yang lebih teratur (Meicher 1981; Harrison 1991).

Penyembuhan jaringan keras seperti halnya dengan jaringan lunak, respons jaringan keras adalah berbasiskan fibroblast yang akan menghasilkan sintesis substansi dasar, sementum, dan pembentukan matriks tulang (Ross 1998). Deposisi sementum baru dari sementoblas dimulai 12 hari setelah pembedahan, pada akhirnya dentin yang terpotong akan ditutupi oleh selapis tipis sementum dan bahkan juga material pengisi ujung akar. Dentin yang terbuka bertindak sebagai pendorong induksi dengan pembentukan sementum baru dari perifer ke arah pusat. Penyembuhan tulang dimulai dengan proliferasi sel—sel endosteum menjadi koagulum dari lokasi luka. Pada hari ke 12 sampai 14 akan terlihat anyaman trabekula dan osteosit, yang mendorong terjadinya pematangan awal dari matriks kolagen di sekitar hari ke 30. Proses ini terjadi dari sebelah dalam ke sebelah luar, berakhir dengan pembentukan lamella tulang yang matang yang juga terlihat secara radiografik (Harrison 1992; Meicher 1992)

3. Kesimpulan dan Saran

3.1 Kesimpulan

Industri perikanan menghasilkan limbah, khususnya limbah kulit udang yang berasal dari pengolahan, dapat dimanfaatkan sebagai bahan baku industri kitin dan *Nano Chitosan*. Pembuatan atau pengolahan limbah kulit udang menjadi kitin dan *Nano Chitosan* dapat diperoleh melalui proses demineralisasi, deproteinisasi dan deasetilasi kitin. Bahan *Nano Chitosan* dan kitin yang larut dalam air, dapat dipakai sebagai mediator yang mempunyai kelebihan seperti meregenerasi tulang alveolar. Tindakan apekreseksi dengan pengambilan tulang alveolar dan pemotongan akar gigi, akan mengakibatkan terjadinya rongga pada tulang alveolar. Untuk mempercepat proses regenerasi alveolar maka *Nano Chitosan* dengan manfaat yang dimilikinya seperti kitin dan derivatnya dapat mengaktifasi makrofag, sel NK dan dapat dimanfaatkan sebagai pencegahan pertumbuhan tumor melalui aktivasi *intestinal immune functions* dan Aktivitas NF- κ B diharapkan proses regenerasi tulang alveolar dapat berlangsung lebih cepat.

Proses penyembuhan pasca apekreseksi pada jaringan lunak dan keras mencakup pembekuan darah, inflamasi, penyembuhan jaringan ikat dan maturasi serta remodeling. Pada jaringan lunak penyembuhan telah matang, inflamasi dan jumlah fibroblast akan berkurang, disertai dengan de-agregasi dan re-agregasi serabut kolagen menjadi pola yang lebih teratur. Pada jaringan keras (*alveolar bone*) dengan proliferasi sel-sel endosteum menjadi koagulum dari lokasi luka. Terlihatnya anyaman trabekula dan osteosit, yang mendorong terjadinya pematangan awal dari matriks kolagen. Proses ini terjadi dari sebelah dalam ke sebelah luar, berakhir dengan pembentukan lamella tulang yang matang, sehingga tuiang menjadi kompak kembali ini dapat terlihat dari gambaran *rotgent photo*. Bagaimana peran dari sel-sel tulang sebagai bahan cangkok tulang dalam proses regenerasi tulang dapat dilihat pada BAB III

3.2 Saran

Limbah kulit udang diproses menjadi *Nano Chitosan* yang mempunyai nilai tinggi seperti bidang peternakan, pertanian dan kedokteran, maka diharapkan pemakaiannya dapat bermanfaat serta tidak bersifat toksik dan mencemari lingkungan.

Daftar Pustaka

- Anonimous, 2007. Others inhibitor: NF-kB activation inhibitor. Calbiochem, Clinofa, Novabiochem & Novagen are brands of EMD Chemical inc, an affiliate of merck _ KGaA. Darmstadt. Germany
- Aoki H, 1991. Science and medical application of hydroxyapatite. Japanese Association of Apatite Science (JASS), Takayama Press System Centre Co. Inc. Tokyo. Japan
- Bambang S, 2003. Kajian Pengembangan Teknologi Proses Produksi Kitin dan Kitosan secara Kimiawi, Prosiding Seeminar Nasional Teknik Kimia Indonesia
- Bastaman S, 1989. Studies on degradation and extraction of chitin and Nano Chitosan from Prawn Shells. Dept Mechanical manufacturing, Aeronautical and Chemical Engineering. Queen's Univ. Belfast
- Bradding P., Wilson S., et al 1993. Immunolocalization of interleukin-4 by mast cell. *Jurnal of Immunology*. 151 : 3853-3865
- Brand, Korbinian., et al, 1996. Activated Transcription Factor Nuclear Factor Kappa Beta is Present in Atherosclerotic Lesion. *J. Clinical Investigation* ; 97 (7): p 1715-1722
- Bratawidjaja, 2006. *Immunologi dasar edisi ketujuh*. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Carlos Junqueira, Jose Carniero, Robert Kelley, 1998. *Histologi Dasar*. Jakarta : EGC
- Departemen Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia, 2003. *Perkembangan ekspor Komoditi hasil perikanan Indonesia 1998-2002*. url: <http://www.dkp.go.id>

- Efendi Z, 2001. Optimasi proses demineralisasi Cangkang rajungan (*Portunus pelagicus*) Kajian Suhu dan Waktu Demineralisasi. Skripsi Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang
- Fister J, Gross BD, 1980. A histologic evaluation of bone response to bur cutting with and Without water coolant, *Oral Surg oral Med Oral Pathol* 49:105
- Goosen, MFA,1997. Aplication of Chitin and Nano Chitosan. Technimic Publishing CO. Inc. Lancaster. USA
- Gutman JL, Harrison JW, 1991. *Surgical Endodontics*, Boston,Blackwell Scientific Halliwell and Gutteridge, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicin*. Third edition.Oxford Scieces Publication. New York p:544-609
- Hanafi M.,Syahrul A., Efrina D., and Suwandi, 1999. Pemampaan kulit Udang untuk Pembuatan Kitosan dan Glukosamin, LIPI Kawasan PUSPITEK, Serpong
- Harrison JW, Jurosky KA, 1991. Wound healing in the tissue of periodontium following Periradicular surgery.I. The Incisional wound. *J Endod* 17;425
- Harrison JW,Jurosky KA, 1992. Wound healing in the tissue of periodontium following Periradicular surgery.III.The osseous Incisional wound,*J Endod* 18:76
- Hirano,S.1986. Chitin and Nano Chitosan, Ulman"s Encyclopedia of industry Chemistry. Republika of Germany. 5th. Ed.A6 : 231-232
- Ho E, 2002. The Virtual Free Radical School : NF-kB-What is it and What's the Deal With Radicals, Linus Pauling Institute Scientist, Departement of Nutrition.Der Bayerischen Julius-Maximilians, Universitat Wurzburg, Wurzburg.174 pp
- Januar, H.L., Wikanta, T and Nursid, M. 2004. Metode uji 2,2 Difenil Pikril Hidrazil (DPPH) dalam Eksplorasi Biol<tivitas Antioksidan dari rumput laut. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Social Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Warta Penelitian Perikanan Indonesia(WPPI) Edisi Pascapanen dan Sosial Ekonomi.
- Junqueira, Carvene Basic Histology 7th ed.1992 cit Sutrisno,1999. Uji Sitoksisitas Curcumin pada Kultur Sel Luteal Tikus.Tesis FKG UGM Yogyakarta
- Kajimoto, et al. 1999. A Study of the Immunoactivatic Effect of Oral Oligoglucosamine in Humans, Elevated by NK-Cell Activation. Resullth From a Cross-over Double Blind Study With Placebo in Healthy Subjects (in Japanese).*Nippon Rinshou Eiyougaku Zasshi*. 21; 41-47
- Kim, S.M., You,H.J., et al,2004. inhibitory effect of water- soluble Nano Chitosan on TNF-on and IL-8 Secretion from HMC-1 cells. *J. Immunopharmacology and Immunotoxicology*,26: 401-409
- Kresno, S.B 1996. *Immunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi ketiga. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran universitas Indonesia. Jakarta
- Leffler, M. 1997. Chitin Breakdown : The bacterial Way. <http://www.mdsg.umd.edu./marinenotes/Mar-Apr97/sidel.html>

- Luca Lazzarini, Jon Mader, and Jason Calhoun, 2004. Journal Osteomyelitis in Long Bones, Vol 3, p: 87-95
- Melcher AH, Chan J, 1981. Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: A study of serial sections, *J Ultrastruct Res* 77:1
- Melcher AH, Irving JT, 1992. The healing mechanism in artificially created circumscribed defects in the femora of albino rat, *J Bone Joint Surg* 44:928
- Nashimura, K., Ishihara, C., Ueki, S and Tokura, I. 1986. Stimulation Of Cytokine Product in Mice Using Deacetylated Chitin. *Vaccine*. 4: 151-156.
- Ornum, J, 1992. Shrimp Waste-Must it be Waste. *Infofish International*. 6(92): 48-52
- Plaut, M., Pierce J H., et al, 1989. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature*. 339:64-67
- Ross R, 1998. The fibroblasts and wound repair, *Biol Rev*, 43:51
- Sarah A, 2001. immobilization and stabilization of Papain on Chelating Sepharose, *Electronic J. Biotechnology*. Catolica de Valparaiso Chile
- Seo, S.B., Jeong, H.J., et al, 2003. inhibitory effect of high molecular weight water soluble Nano Chitosan on hypoxia-induced inflammatory cytokine production. *Bio Pharm. Bull* 26: 175-183
- Shahidi F, Arachchi JKV, and Jeon YJ, 1999. Food Applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci Technol* 10:37-51
- Shon, Y.H., Park, I.K., et al, 2002. Effect of Nano Chitosan Oligosaccharide on 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin-induced Oxidative Stress in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 25:1161-1164
- Silalahi, J. 2006. Makanan Fungsional. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Simakajornboon, N., Gozal, E., Gozal, I.D., 2001. Developmental patterns of NF- κ B activation during acute hypoxia in the caudal brainstem of the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res* 127:175-183
- Singia, A.K and Chawia, M., 2001. Nano Chitosan: Some Pharmaceutical and Biological Aspects-A-Update. *J. Pharm. Pharmacol.* 53:1047-1067
- Suhardi, 1993. Kitin dan Kitosan. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta
- Sun S, and Tu Si, 1999. immobilization of Horseradish peroxidase in cross-linked Phyllocladus Condition and Characterizations. *Biotechnol Appl. Biochem.* 29(Pt2):185-189
- Suratman, W. 1992. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar Metode Teknik. Penerbit Tarsito Bandung
- Thompson, J.E., Phillips, R.J., et al, 1995. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappaB. *Cell*. 80: 573-582
- Tsigos, I, A. Martinou, Kafetzopoulos and V. Bouriotis, 2000. Chitin deacetylase; new versatile Tools in biotechnology. *TIBTECH Rev*, 18: 305-312

Yang. Y, Shu. R, Shao. J, Xu.G, and Gu.X., 2005. Radical Scavening activity of Chitooligosacchide With Different Molecular Weights. European Food Research and V Technology.©Springer-Verlag. 10. 1007/s00217—005—0028·8

BAB III

Peran Osteoblas, Osteosit, Osteoklas dan bahan cangkok tulang dalam proses regenerasi tulang

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Kerusakan jaringan keras (tulang) pasca operasi yang disebabkan adanya kelainan sistemik membutuhkan perawatan yang baik. Kerusakan tulang ini merupakan cacat yang bentuknya spesifik dengan keadaan tulang yang telah mengalami infeksi dan inflamasi. Tulang alveolar yang berhubungan langsung dengan akar gigi ke apikal dari puncak alveolar, dikelilingi dinding tulang pada tiga sisi dengan akar gigi sebagai dinding (Prichard 1983)

Respon inflamasi pada proses penyembuhan luka yang menyebabkan terbentuknya hubungan anatomi dan fisiologis yang baru di antara elemen-elemen tubuh yang rusak (Fedi *et al.* 2005). Mekanisme penyembuhan luka dimulai dengan fase hemostatis dengan terbentuknya bekuan darah di antara permukaan tulang alveolar dan mukosa dalam beberapa menit akan melekat pada permukaan tulang alveolar, setelah beberapa jam dimulai tahap awal peradangan dengan adanya sel radang terutama neutrofil dan monosit yang akan menumpuk pada permukaan tulang alveolar selama 3 hari. Tahap akhir peradangan didominasi migrasi makrofag dalam luka yang diikuti pembentukan jaringan granulasi dan pada hari ke 7 baru terlihat perlekatan jaringan ikat pada permukaan tulang alveolar (Polimeni *et al.* 2006). Pada fase proliferasi, fibroblas bermigrasi dan berproliferasi serta memproduksi kolagen, elastin dan proteoglikan. Proteoglikan membentuk substansi dasar tempat serabut jaringan ikat tertanam. Fase terakhir proses penyembuhan adalah *remodeling*, pada fase ini tubuh berusaha menormalkan kembali semua jaringan selama penyembuhan. Sel-sel muda menjadi matang, kapiler baru menutup dan kolagen mengerut sesuai regangan yang ada, sisa sel-sel inflamasi serta kapiler yang tidak dibutuhkan mengalami apoptosis (Cate *et al.* 2003)

Tulang alveolar terdiri dari bahan antar sel dan sel tulang. Sel tulang ada 3 yaitu osteoblas, osteosit dan osteoklas. Sedangkan bahan antar sel terdiri dari bahan organik (serabut kolagen) dan bahan anorganik (kalsium, fosfor). Osteoblas berfungsi untuk mensintesis matrik tulang. Osteosit adalah bentuk dewasa dari osteoblas yang berfungsi dalam *recycling* garam kalsium dan berpartisipasi dalam reparasi tulang. Osteoklas adalah sel makrofag yang aktivitasnya meresorpsi jaringan tulang (Junqueira *et al.* 1998)

Pembentukan ruangan atau rongga pada tindakan bedah endodontik (apekreseksi) diperlukan proses regenerasi tulang alveolar baru (*regeneration alveolar bone*). Untuk mempercepat proses regenerasi tulang diperlukan bahan cangkokan tulang yang mampu bertindak sebagai barrier fisik yang akan menghalangi migrasi ephitil cekat kearah tulang. Fungsi dasar bahan cangkok tulang adalah 1)

Osteokonduksi: bertindak sebagai kerangka untuk membantu pembentukan tulang, 2) Osteoinduksi : menstimulasi atau menginduksi pembentukan tulang baru, 3) Osteogenesis : sel-sel pada bahan cangkok memproduksi tulang baru (Grant *et al.*1989; Fedi *et al.* 2005)

Bahan yang dicangkokkan dapat berasal dari individu yang sama (*autograft*), bahan dari individu yang berbeda pada spesies yang sama (*allograft*), berasal dari spesies yang berbeda (*xenograft*) dan dari bahan sintesis disebut *alloplast*. Jenis bahan cangkok tulang harus memiliki potensial untuk mempertahankan sel hidup, yang digantikan oleh host dan tidak menimbulkan reaksi imunologi, gampang didapat , memberi kekuatan sekeliling tulang, tidak menyebarkan penyakit (Prichard 1972)

Cangkok tulang merupakan bahan yang secara histologis telah dilaporkan dapat menghasilkan regenerasi tulang. Tujuan utama perawatan cangkok tulang adalah memperbaiki tulang alveolar yang hilang pasca apekreseksi dengan meregenerasi fungsi perlekatan apparatus, mengurangi dan mengeliminasi kerusakan tulang alveolar lebih jauh. Bahan cangkok tulang dapat berfungsi sebagai barrier fisik yang dapat menghalangi migrasi epitel cekat ke apikal. Berbagai variasi bahan cangkok tulang telah memberikan hasil yang lebih baik pada perawatan kerusakan intraboni dan bahan cangkok tulang kebanyakan menggunakan *autograft* dan *allograft* (Grant *et al.*1988; Gurinsky *et al.*2004)

Tulang secara konstan mengalami *remodeling* (pembentukan kembali) dengan proses yang dinamis, dimana osteoblas bersifat responsibel untuk pembentukan tulang dan osteoklas untuk proses resorpsinya. Osteoblas merupakan sel-sel mesenkim khusus yang akan mengalami proses maturasi atau pematangan dimana gen-gen seperti *core-binding factor alpha 1* (cbfa 1) atau faktor perlekatan – inti alpha 1 dan *osterix* (Os x) memiliki peran yang sangat penting (Caetano *at al.*2007)

1.2 Permasalahan

Apakah cangkokan tulang dapat mempercepat proses regenerasi tulang alveolar serta peran osteoblas, osteosit dan osteoklas yang berpengaruh pada regenerasi tulang alveolar tersebut.

1.3 Tujuan

Mendalami peran osteoblas, osteosit, osteoklas dan bahan cangkok tulang pada proses regenerasi tulang

1.4 Manfaat

Manfaat yang diharapkan dapat memperoleh jenis bahan atau suatu zat yang dapat mempercepat proses regenerasi tulang alveolar

2. Pembahasan

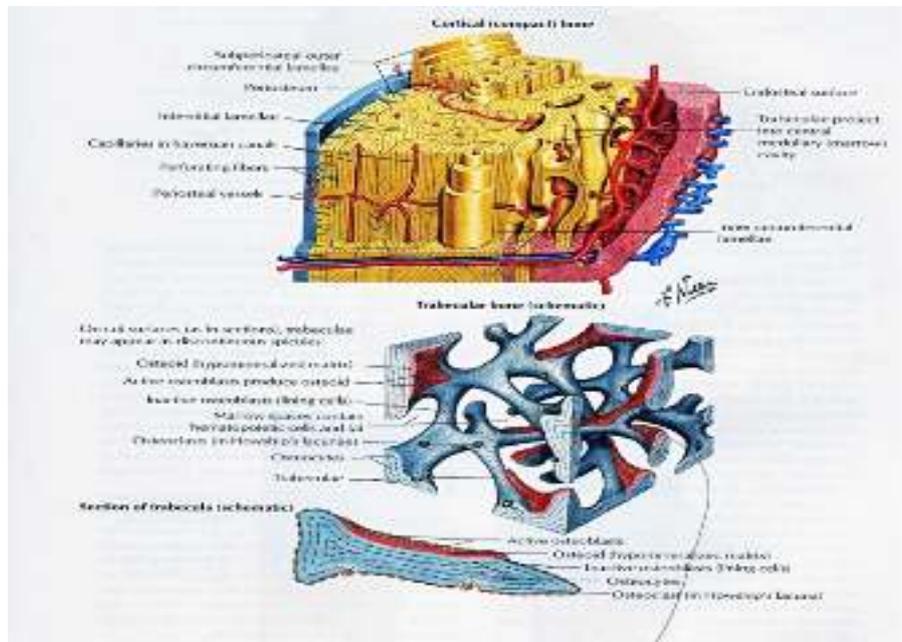
Pembentukan tulang merupakan suatu proses yang rumit melibatkan interaksi antara osteoblas dan osteoklas sehingga mekanisme yang tepat mengenai induksi dari matrik tulang demineralisasi masih belum jelas. Proses demineralisasi secara teoritis akan membuka kemampuan osteoinduksi dan osteokonduksi *bone morphogenetic proteins* (BMPs) pada *Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft* (DFDBA) yang akan memfasilitasi osteogenesis (Herol *et al.*2002). Tingkat demineralisasi DFDBA dari berbagai bank jaringan yang berbeda akan memberikan hasil yang bervariasi pada regenerasi tulang, sedangkan kandungan kalsium 2% pada proses demineralisasi menunjukkan hasil yang optimal dalam menginduksi pembentukan tulang baru pada manusia, sedangkan *Batan Research Tissue Bank* (BRTB) hanya menyebutkan bahwa proses demineralisasi akan dihentikan jika kandungan kalsium mencapai 8% atau kurang. Kadar kalsium yang tidak optimal akan menyebabkan denaturasi BMPs dan berkurang kemampuan osteoinduksi dan osteokonduksi dalam pembentukan tulang baru (Basril *et al.*2005)

2.1 Struktur Tulang

Tulang sebagai organ terdiri dari tulang kortikal dan trabekular. Kedua tipe tulang ini terdiri dari sel dan elemen-elemen matrik yang sama, namun terdapat perbedaan struktural dan fungsional diantara keduanya. Tulang kortikal, kadang disebut tulang kompak, memiliki densitas yang lebih (80% hingga 90% dari tulang mengalami kalsifikasi) daripada tulang kancellus. Bagian diafisis dari tulang panjang sebagian besar terdiri dari tulang kortikal. Tulang alveolar, kadang disebut tulang trabekular, merupakan jaringan/anyaman (*network*) tulang trabekula atau *struts* (penopang atau sangga) yang berguna untuk menahan tekanan pada waktu mengunyah dan mendukung kartilago artikuler. Hanya 15% hingga 25% dari kanal medular terdiri dari tulang alveolar: sisanya terdiri dari sumsum, pembuluh darah, jaringan fibrous, dan jaringan lemak. Metafisis dan epifisis sebagian besar terdiri dari tulang alveolar yang terbungkus lapisan tulang kortikal yang relatif tipis (Walter 2006)

Pertumbuhan keseluruhan tubuh manusia melibatkan akumulasi anyaman massa tulang. Tulang yang baru terbentuk (selama perkembangan, perbaikan fraktur, atau *turnover*/pergerakan menuju ke/berpindah) merupakan tulang anyaman (*woven bone*). Pada tingkat mikroskopik, matriks osteoid dari tulang anyaman ini menunjukkan adanya pola amorfik atau petak (*patchwork*) osteoblas matriks osteoid, dan fiber kolagen yang berorientasi secara acak. *Remodeling woven bone* adalah secara internal ke tulang lamelar. Proses ini membutuhkan pembentukan tulang dan resorpsi tulang. Osteoblas membentuk tulang, osteosit memelihara tulang, dan osteoklas (makrofag terspesialisasi) yang menyerap tulang (resorpsi). Dengan adanya resorpsi dan pembentukan, *woven bone* diremodeling menjadi tulang lamela konsentrik, yang terdiri dari fiber kolagen, sistem haversian, dan lamela interstisial yang menyediakan kekuatan maksimum per volume tulang. Sel-sel yang membentuk tulang yang baru, yaitu osteoblast, lalu dikelilingi oleh matriks tulang dan berkembang

menjadi osteosit yang matang, yang mana membentuk ekstensi seluler untuk transport interseluler (Mark 2004)



Gambar 3. 1 Histologi, embriologi dan formasi dari tulang (Mark D.Miller,MD)

2.2 Histologi Tulang

2.2.1 Tipe tulang

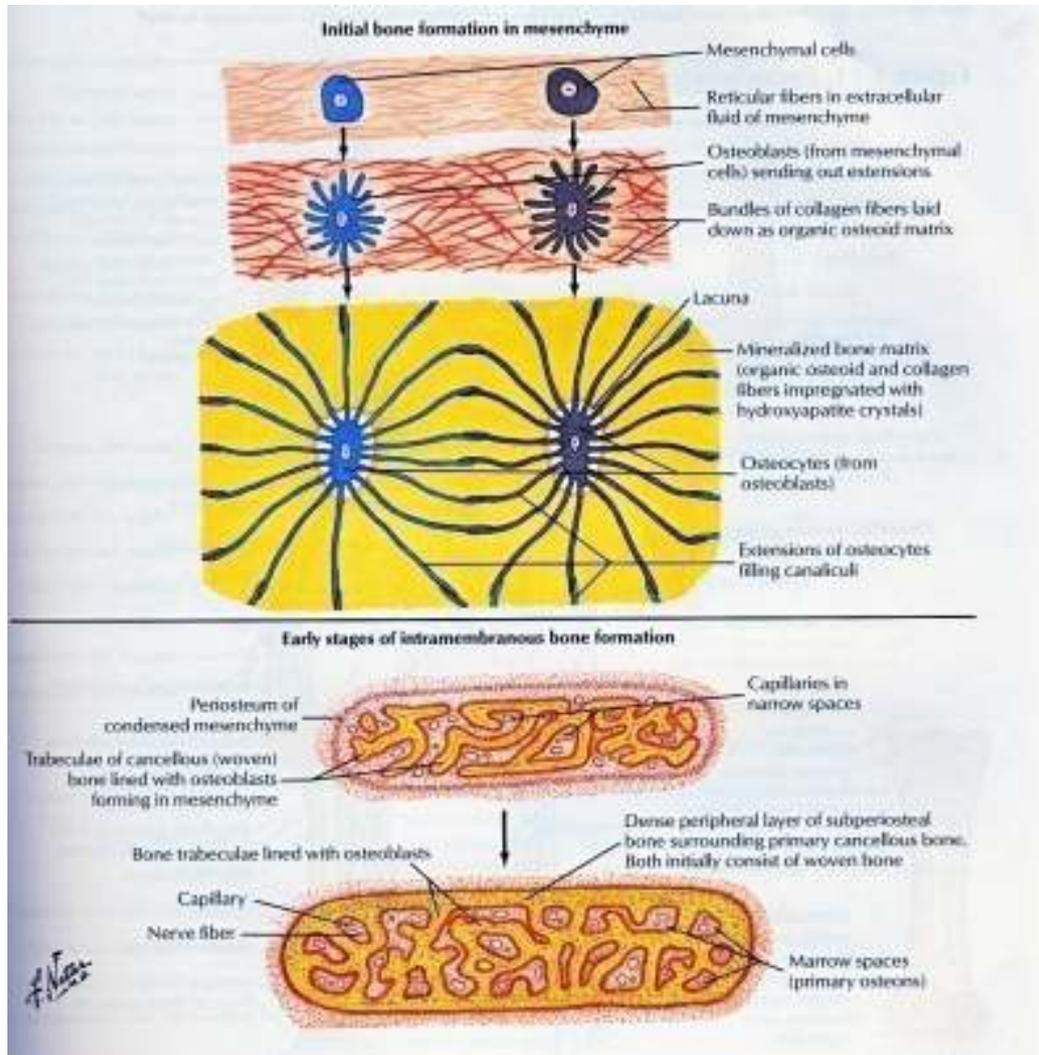
Tipe tulang normal berupa lamelar atau dapat berupa kortikal atau kancellus. Tulang yang imatur atau patologis, yaitu *woven*, lebih banyak osteosit daripada tulang lamelar, tulang memiliki pergerakan menuju ke/berpindah (*turnover*) yang meningkat, dan lebih lemah dan lebih fleksibel dari tulang lamerar. Tulang lamelar berorientasi pada tekanan/*stress oriented* sedangkan *woven bone* berorientasi tidak pada tekanan.*not stress oriented*.

2.2.1.a Tulang kortikal (tulang kompak)

Tulang kortikal menyusun hingga 80% rangka; tersusun atas osteon yang padat atau sistem haversian yang dihubungkan oleh kanal hevaersian yang terdiri dari arteriole, venule, kapiler, saraf, dan kemungkinan saluran limfatik. Lamela interstisial terletak di antara osteon. Fibril sering menghubungkan lamela tapi tidak melintasi garis sement (dimana resorpsi tulang terhenti dan pembentukan tulang baru dimulai). Garis sement membatasi batas luar dari sebuah osteon. Sirkulasi intraoseus (kanal dan kanalikuli [prosesus sell dari osteosit]) menyediakan nutrisi. Tulang kortikal memiliki kecepatan *turnover* yang rendah, modulus Young (E) yang relatif tinggi, dan tahanan yang tinggi terhadap torsi dan lipatan daripada tulang kancellus.

2.2.1.b Tulang kancellus (Tulang *Spongy* atau Tulang Trabekular)

Tulang kanelus kurang padat dan mengalami lebih banyak remodeling berdasarkan garis tekanan/*lines of stress* (hukum Wolf). Memiliki kecepatan *turnover* yang lebih tinggi, modulus Young yang lebih rendah, dan lebih elastis daripada tulang kortikal (Cate *et al.* 2003)



Gambar 3. 2: Formasi tulang dalam sel masenkim dan perlekatan intramembranus (Mark D. Miller, MD)

2.2.2 Biologi seluler

2.2.2.a Osteoblas

Merupakan derivat dari sel-sel mesenkim tak terdiferensiasi. Sel-sel ini memiliki lebih banyak retikulum endoplasmik, apparatus Golgi, dan mitokondria daripada sel-sel lainnya (untuk sintesis dan sekresi matriks). Sel-sel yang lebih terdiferensiasi dan lebih aktif secara metabolik yang berada pada permukaan tulang dan sel-sel yang kurang aktif pada "regio istirahat" atau sel-sel yang terperangkap memelihara lingkungan ionik tulang. Diferensiasi osteoblast *in vivo* dipengaruhi oleh interleukin, *platelet-derived growth factor* (PDGF), dan

insulin-derived growth factor (IDGF). Osteoblast merespon terhadap hormone paratiroid (PTH), memproduksi alkaline fosfatase, memproduksi kolagen tipe I, dan memproduksi osteokalsin (distimulasi oleh 1,25-dihydroxyvitamin D). Osteoblast memiliki interaksi reseptor-efektor untuk (1) PTH; (2) 1,25-dihydroxyvitamin D; (3) glukokortikoid; (4) prostaglandin; dan (5) estrogen (table 1-2). Agen antiseptik tertentu bersifat toksik pada osteoblast yang dikultur (termasuk hidrogen peroksida dan larutan povidone-iodine (Caetano *et al.* 2007)

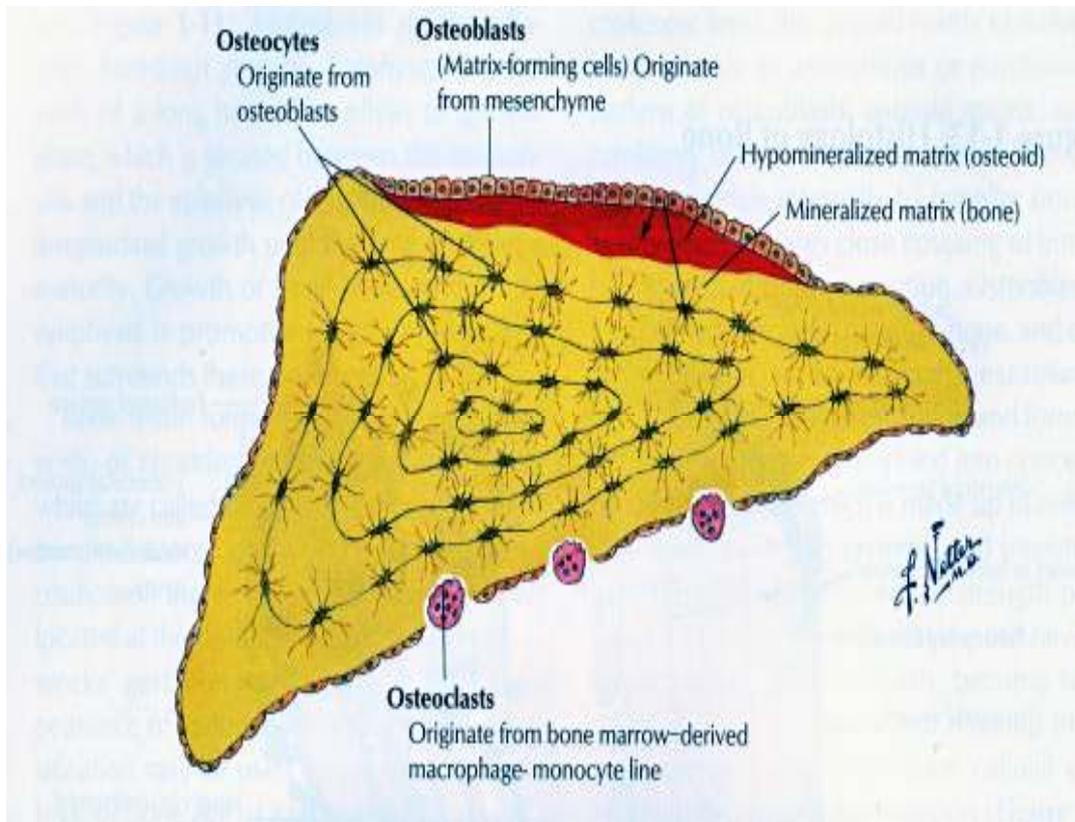
2.2.2.b Osteosit

Menyusun 90% dari sel-sel pada rangka matur; awalnya merupakan osteoblast yang terperangkap dalam matriks yang baru terbentuk. Osteosit memiliki rasio nukleus/sitoplasma yang tinggi dengan proses sitoplasmik interkoneksi yang panjang. Tidak seaktif osteoblast dalam memproduksi matriks. Berperan penting untuk mengontrol kalsium ekstraseluler dan konsentrasi fosfor. Distimulasi secara langsung oleh kalsitonin dan diinhibisi oleh PTH (Mark 2004)

2.2.2.c Osteoklas

Sel-sel raksasa/*giant cells* bermultinukleasi dan memiliki bentuk yang ireguler, yang berasal dari jaringan hematopoietic (progenitor monosit membentuk sel-sel raksasan dengan cara fusi. Memiliki batas membran plasma berlipat sehingga memiliki area permukaan lebih banyak; dan penting dalam resorpsi tulang dan *clear zone* di sekelilingnya. Resorpsi tulang terjadi pada cekungan/depresi/*depression* pembentukan dan resorpsi tulang terjadi secara berpaduan/*linked*, namun resorpsi terjadi lebih pesat. Osteoblast mengekskresikan ligan RANK (RANK L), yang merupakan molekul yang berikatan pada reseptor pada osteoklast, sehingga meningkatkan resorpsi tulang; mekanisme ini diinhibisi oleh osteoprotegerin yang berikatan pada RANK L sehingga menghindari interaksi dengan osteoklast. Osteoklast mensintesis tartrat-resistant acid phosphate. Osteoklas berikatan pada permukaan tulang melalui protein sel perlekatan, yang menutup daerah dibawah osteoklas secara efektif. Osteoklas memproduksi ion hydrogen (melalui karbonik anhidrase), yang menurunkan pH dan meningkatkan solubilitas kristal hidroksiapatit, lalu matriks organik kemudian dihilangkan dengan pencernaan proteolitik/*proteolytic digestion*. Pasien dengan defisiensi karbonik anhidrase tidak dapat menyerap tulang. Osteoklas memiliki reseptor spesifik untuk kalsitonin yang menyebabkan osteoklas ini meregulasi resorpsi tulang secara langsung. Osteoklas bertanggung jawab pada resorpsi tulang yang terlihat pada myeloma multipel dan penyakit metastatik tulang. *Interleukin-1 (IL-1)* merupakan stimulator yang poten untuk resorpsi tulang osteoklastik dan telah ditemukan pada membran disekeliling sambungan total yang longgar (loose total joint) pada implant. IL-10 menekan pembentukan osteoklas.

Biofosfanate menghambat resorpsi osteoklas pada tulang (dengan menghambat osteoklas membentuk batas yang berkerut yang penting untuk ekspresi asam hidrolase) dan menurunkan insidensi kejadian skeletal pada pasien dengan myeloma multiple (Ruimerman 2006)



Gambar 3. 3 : Komposisi tulang Lamellar (Walter B. Greene. MD)

2.2.3 Matrik Tulang

Matrik tulang terdiri dari komponen organik (40%) dan komponen inorganik (60%)

2.2.3.a Komponen organik—40% dari berat bersih tulang

- i. Kolage terutama kolagen tipe I. Zona Lubang (celah) terdapat pada fibril kolagen diantara bagian akhir molekul. Pori terdapat di antara sisi molekul yang parallel. Deposisi mineral (kalsifikasi) terjadi diantara zona lubang dan pori. Pertautan-silang/*cross-linking* menurunkan solubilitas kolagen dan meningkatkan kekuatan tegang.
- ii. Proteoglikan
- iii. Matriks protein (nonkolagenus)—Osteocalcin diinhibisi oleh PTH dan distimulasi oleh 1,25-dihydroxyvitamin D. Jumlah osteocalcin dapat diukur dalam serum atau urin sebagai penanda turnover tulang; meningkat pada penyakit paget, osteodistrofi renal, dan hiperparatiroidisme.
- iv. *Growth Factor* dan Sitokon (Zhang *et al.*1997)
- v.

2.2.3.b Komponen inorganik (mineral)—60% dari berat bersih tulang

- i. Kalsium hidroksiapatit [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$].
- ii. Osteokalsium Fosfat (*Brushite*) (Walter 2006)

2.3 Cangkok Tulang

Cangkok tulang adalah merupakan bahan yang secara histologis dapat memperbaiki tulang alveolar yang hilang dengan meregenerasi fungsi perlekatan apparatus, mengurangi dan mengeliminasi ruang pada tulang yang hilang (Grant *et al.* 1988). Dasar pemikiran cangkok tulang adalah proses induksi tulang dimana bahan cangkok tulang dapat menarik sel-sel multipotensial dari resepien yang terdapat disekitar bahan cangkok tulang. Proses demineralisasi akan memperlihatkan protein penginduksi tulang yang terdapat pada matrik tulang, yang mengandung mediator osteoinduksi disebut *Bone Morphogenetic Protein* (BMPs) (Toricelli *et al.* 2002)

Stadium awal pembentukan tulang adalah sekresi kolagen dan zat dasar oleh osteoblas. *Demineralized Bovine Bone Powder* menunjukkan pembentukan *bone marrow* dan kolagen pada minggu ke 12. Bahan tersebut telah mengalami demineralisasi dengan dilusi asam hidroklorik (0,6 N HCl) yang berfungsi membuka daerah morfogenetik tulang dalam matrik organik tulang dan akan menginduksi protein dalam matrik tulang yang berisi immuno reaktif BMPs. BMPs ini yang akan mendorong sel mesenkim berdiferensiasi menjadi sel kondroblas dan osteoblas (Ogurtan *et al.* 2007)

2.4 Bahan Cangkok Tulang

Berbagai macam bahan cangkok tulang telah digunakan pada perawatan kerusakan tulang yang disebabkan oleh kelainan sistemik maupun oleh karena trauma. Bahan yang dicangkokkan dapat berasal dari individu yang sama (*autograft*), bahan dari individu yang berbeda pada spesies yang sama (*allograft*), berasal dari spesies yang berbeda (*xenograft*) dan dari bahan sintesis *Alloplast*. *Allograft* sudah lama digunakan untuk perawatan kerusakan tulang, namun dengan keterbatasan penyediaan bahan dari tulang manusia maka dikembangkan bahan alternatif pengganti yang relatif lebih gampang didapat, lebih murah dan sifatnya hampir menyerupai *allograft*. Bahan jenis *xenograft* dan *alloplast* menjadi pilihan yang memungkinkan untuk perawatan kerusakan tulang (Prichard *et al.* 1972).

Penelitian pada hewan mamalia menunjukkan adanya protein induksi tulang mamalia yang disebut *bovine BMPs / osteogenic proteins* (Ops) dan *baboon BMPs/OPs* yang mempengaruhi diprensiasi tulang. *Xenograft* dari tulang sapi merupakan material graft yang relatif baru dalam prosedur regenerasi tulang (Groeneveld & Burger 2000). Bahan cangkok jenis *xenograft* berasal dari ekstraksi protein tulang sapi yang menghasilkan struktur menyerupai tulang cancellous manusia dan memiliki kemampuan meningkatkan pembentukan tulang (Toricelli *et al.* 2002).

Bahan graft dapat mengontrol proses penyembuhan dengan mencegah sel epitel tidak bermigrasi ke apikal dan mengganggu regenerasi serat tulang baru pada permukaan tulang (Ogurtan

et al. 2007). Bahan cangkok tulang merupakan jaringan yang diharapkan dapat hidup pada *host* setelah ditanam, dan mengikuti berjalannya waktu proses regenerasi. Bahan cangkok tulang juga diharapkan mampu menyatu dalam proses penyembuhan (Grant *et al.* 1988)

2.5 Perkembangan bahan cangkok tulang

Bahan cangkok tulang yang mulai dikembangkan akhir-akhir ini adalah pemakaian bahan bioceramic antara lain penggunaan β -tricalcium phosphate (β -TCP) dan *hydroxyapatite* (HA). *Osseous alloplast*, merupakan bahan osteokonduksi, yang membentuk *scaffold* pada formasi tulang baru (Fleckenstein 2006). β -Tricalcium Phosphate memiliki sifat *biocompatible* , *resorbable* dan *osteoconductive*. *Hidroxyapatite* adalah suatu bahan yang berpengaruh dalam stimulasi regenerasi jaringan tulang dan memiliki kemampuan untuk menstimulasi aktivitas osteogenik pada kerusakan tulang dan jaringan sekitarnya (Wada *et al.* 1989)

Hidroxyapatite β Tricalcium Phosphate merupakan bahan *graft* sitesis yang bersifat osteokonduksi, membentuk *scaffold* pada permukaan tulang baru. Kombinasi *hydroxyapatite* dan β *Tricalcium Phosphate* mampu bertindak sebagai bahan pengisi sintetik yang bersifat *biabsorbable*, tidak menimbulkan respon inflamasi dan bersifat *biokompatibel* (Ganeles 1986). *Demineralized Bovine Bone Powder* merupakan jenis bahan cangkok tulang yang didapat melalui proses demineralisasi tulang sapi dengan asam hidroklorik (0,6 N HCl) yang kemudian dikeringkan secara beku kering. Proses demineralisasi akan memperlihatkan protein penginduksi tulang yang terdapat pada matrik tulang, yang mengandung mediator osteoinduksi disebut *Bone Morphogenetic Protein* (BMPs) (Wirjokusumo 2001)

2.6 Formasi Osteoblas dan Tulang

Pembentukan atau formasi tulang secara konstan mengalami *remodeling* (pembentukan kembali) dengan proses yang dinamis dimana osteoblas bersifat *responsible* untuk pembentukan tulang dan osteoklas untuk proses resorpsinya. Osteoblas merupakan sel-sel mesenkim khusus yang akan mengalami proses maturasi / pematangan dimana gen-gen seperti *core-binding factor alpha 1* (*cbfa1*) atau faktor perlekatan – inti alpha 1 dan *osterix* (Osx) memiliki peran yang sangat penting. Baru-baru ini diketahui bahwa jalur beta-catenin/Wnt berperan dalam sebagian difrensiasi dan proliferasi osteoblas(Caetano *et al.* 2007). Mutasi pada beberapa protein terlibat dalam jalur ini, seperti reseptor lipoprotein yang *low – density* (densitas rendah) yang berhubungan dengan protein 5/6 (LRP 5/6) memicu terjadinya penyakit tulang. Osteoblas juga berperan dalam regulasi resorpsi tulang melalui aktivator reseptor dari faktor *nuclear-kappa β* (RANK) *Ligand* (RANKL), yang berhubungan dengan reseptor ini, pada permukaan sel-sel osteoblas, RANK ini menginduksi terjadinya difrensiasi dan fusi (Lanssens *et al.* 2005)

Osteoblas mengeluarkan reseptor penarik yang dapat larut (osteoprotegenin, OPG) yang memblokir interaksi RANK/RANKL dengan berlekatan dengan RANKL, dan menghambat difrensiasi

dan aktivasi osteoklas. Keseimbangan antara RANKL dan OPG menentukan formasi dan aktivitas osteoklas. Faktor lain yang mempengaruhi massa tulang adalah leptin, suatu hormon yang diproduksi oleh adiposity yang memiliki efek ganda, dan dapat bereaksi melalui system saraf pusat dan menurunkan aktivitas osteoblas, atau bias juga memiliki efek osteogenik dengan cara melekat langsung pada reseptornya pada permukaan sel-sel osteoblas (Caetano *et al.*2007)

2.6.1 Transformasi β 1 pada tulang

Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) adalah suatu faktor pertumbuhan yang tersebar dimana-mana yang berperan dalam control proliferasi, migrasi, difrensiasi dan pertahanan berbagai tipe sel yang berbeda. TGF- β 1 mempengaruhi beberapa proses seperti embriogenesis, angiogenesis, inflamasi dan penyembuhan luka. Pada jaringan tulang, TGF- β 1 berperan besar dalam proses perkembangan dan memelihara, mempengaruhi metabolisme tulang keras dan tulang kartilago.

TGF- β 1 merupakan salah satu faktor yang sangat penting pada jaringan tulang, membantu mempertahankan keseimbangan antara proses dinamik resorpsi dan formasi tulang. Banyak laporan yang kontradiksi yang telah dipublikasikan mengenai fungsi TGF- β 1 pada jaringan tulang dan mengenai sitokin multifungsional (Janssens *et al.*2005)

Sitokin adalah istilah umum untuk sebagian besar grup molekul yang ikut serta dalam pemberian sinyal antar-sel selama proses imun dan respon inflamasi lokal dan sistemik. Sitokin juga berperan pada penyembuhan luka, hematopoiesis, dan proses biologi lainnya, *remodelling* tulang, resorpsi dan deposisi tulang baru (Oppenheim *et al.* 1994)

Isoform dari TGF β s yang paling banyak dalam spesies mamalia adalah *Transforming Growth factor β 1 (TGF β 1)*. *Transforming Growth Factor β 1* merupakan mediator inflamasi multifungsional serta salah satu elemen utama dalam perbaikan luka, yang mengatur proliferasi dan diferensiasi sel. TGF β 1 mengaktifasi ekspresi gen untuk sintesis komponen matrik ekstraseluler termasuk protein kolagen . Aktivitas TGF β 1 dapat menghambat pembentukan osteoklas, meningkatkan pertumbuhan fibroblas untuk membentuk matrik ekstraseluler dan kalsifikasi pada tulang alveolar. TGF β 1 juga meningkatkan proliferasi osteoblas serta mencegah osteoporosis (Roeslan *et al.* 2009)

2.6.2 Reseptor TGF-beta pada osteoblas dan remodeling tulang

Transforming growth factor – beta banyak terdapat pada matrik tulang dan mengatur aktivitas osteoblas dan osteoklas. Responsif osteoblastik ke TGF- beta pada binatang percobaan transgenik mengalami peningkatan massa tulang trabekular yang tergantung pada usia (age-dependent), yang meningkat pada usia 6 bulan, karena ketidak seimbangan antara formasi dan resorpsi tulang selama proses remodeling tulang. Selama tingkat formasi tulang osteoblastik tidak berubah, peningkatan massa tulang trabekular tersebut cenderung dikarenakan penurunan resorpsi tulang oleh osteoklas (Buduneli *et al.*2001)

2.7 Remodeling Tulang

2.7.1 Umum

- i. Hukum Wolff—remodeling tulang terjadi sebagai respon stress mekanikal. Peningkatan mekanikal stress mengakibatkan peningkatan tulang secara signifikan. Menghilangkan stress mekanikal eksternal dapat mengakibatkan kehilangan tulang secara signifikan, yang bersifat reversibel (dalam derajat yang bervariasi) terhadap remobilisasi.
- ii. *Piezoelectric charges*—remodeling tulang terjadi sebagai respon terhadap adanya muatan elektrik. Sisi kompresi tulang bersifat elektronegatif, yang menstimulasi osteoblast (formasi); sisi tension/tegangan bersifat elektropositif, yang menstimulasi osteoklast (resorpsi). Baik tulang kortikal maupun kanselus mengalami remodeling secara kontinyu selama hidup akibat aktivitas osteoklastik dan osteoblastik
- iii. Hukum Hueter-Volkmann—remodeling dapat terjadi pada sebuah paket sel-sel yang dikenal sebagai basic multicellular units (BMUs), yang dimodulasi oleh hormon sistemik dan sitokin. Hukum Hueter-Volkmann menyatakan bahwa faktor mekanikal dapat mempengaruhi pertumbuhan longitudinal, remodeling tulang, dan perbaikan fraktur; kekuatan kompresif menghambat pertumbuhan dan kekuatan tensile menstimulasi pertumbuhan; hal ini mungkin memainkan peran dalam progresi skoliosis dan penyakit Blount.

2.7.2 Tulang Kortikal

Remodeling oleh saluran osteoklastik/*osteoclastic tunneling (cutting cone)*, diikuti oleh pelapisan osteoblast dan deposisi lapisan lamella, hingga ukuran saluran menyempit seukuran diameter saluran sentral osteonal. Kepala dari *cutting cone* terbuat dari osteoklast, yang membuat suatu lubang melalui tulang kortikal. Dibalik osteoklast depan terdapat kapiler, diikuti oleh osteoblast yang meletakkan osteoid untuk mengisi kavitas resorpsi.

2.7.3 Tulang Kanselus

Remodeling oleh resorpsi osteoklastik, diikuti oleh osteoblast yang kemudian meletakkan tulang baru (Mark 2004)

3. Kesimpulan dan saran

3.1 Kesimpulan

Tulang yang mengalami kerusakan oleh karena infeksi, fraktur, dan pengambilan dengan sengaja diperlukan suatu proses untuk mengembalikan seperti keadaan semula. Proses regenerasi tulang baru (*regeneration bone*) diperlukan bahan yang bertindak sebagai barrier fisik yang akan menghalangi migrasi ephitel cekat kearah tulang. Barrier fisik dapat berupa cangkokan tulang, dimana berfungsi sebagai osteokonduksi yaitu bertindak sebagai kerangka untuk membantu pembentukan tulang, osteoinduksi yaitu menstimulasi atau menginduksi pembentukan tulang baru dan sel-sel pada barrier fisik untuk memproduksi tulang baru disebut osteogenesis. Bahan cangkok tulang dapat berasal

dari alami dan sintesis yaitu *autograft* berasal dari individu yang sama, *allograft* berasal dari individu yang berbeda pada spesies yang sama, *xenograft* berasal dari spesies yang berbeda, dan *alloplast* dari bahan sintesis.

Struktur dan histologis tulang pada tubuh manusia merupakan sesuatu yang melibatkan akumulasi anyaman massa tulang. Secara mikroskopik, matrik osteosid dari tulang anyaman menunjukkan pola amorfik osteoblas, matrik osteosid, dan fiber kolagen. Tipe tulang terdiri dari tulang kortikal (tulang kompak) yang dihubungkan oleh kanal hevaersian terdiri dari arteriole, venule, kapiler, saraf, saluran limfatik, dan tulang kanselus (tulang spongy atau tulang trabekular) yaitu tulang kurang padat dan lebih elastic dari tulang kortikal. Osteoblas merupakan sel-sel membentuk tulang, derivat dari sel mesenkim tidak terdiferensiasi memiliki lebih banyak retikulum *endoplasmic*, *apparatus golgi* juga dipengaruhi oleh *interleukin*. Osteosit merupakan sel-sel memelihara tulang yang memiliki rasio sitoplasma tinggi dengan prosesus sitoplasmik yang panjang. Osteoklas merupakan sel-sel menyerap tulang yaitu *giant cell* dalam resorpsi tulang. Resorpsi tulang terjadi pada cekungan dan terjadi secara perpaduan / linked sehingga resorpsi terjadi lebih pesat. Osteoklas memiliki reseptor spesifik untuk kalsitonin yang menyebabkan osteoklas meregulasi resorpsi tulang secara langsung.

Proses regenerasi atau remodeling merupakan terjadinya respon terhadap adanya muatan elektrik, diikuti adanya resorpsi osteoklastik dan sel osteoblas memberikan respon sangat aktif yang kemudian meletakkan tulang baru sehingga terjadilah regenerasi tulang. Regenerasi tulang juga sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu 1) bahan *hidroxyapatite β tricalcium phosphate* yang akan membentuk *scaffold* pada permukaan tulang. 2) TGF- β 1 merupakan faktor pertumbuhan yang tersebar dimana-mana membantu mempertahankan keseimbangan antara proses dinamik resorpsi dan formasi tulang.

3.2 Saran

Dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap bahan atau zat yang dapat mempercepat proses regenerasi tulang alveolar. Untuk mengetahui peran makrofag terhadap respon lokal dan sistemik regenerasi tulang dapat dilihat pada BAB IV

Daftar Pustaka

- Basri-Abas, Pramita-Pandansari, and Febrida-Anas: Status Bank Jaringan Di Indonesia, seminar teknologi nuklir bidang kesehatan di Propinsi NTB, 21 Juni 2005
- Boedi OR, Andy winata and Isnani Jenie: Efek Gaya Interrupted dan Continuous terhadap kadar *Transforming Growth factor β 1* Cairan celah gusi sisi renggang caninus. Scientific Jurnal in Dentistry. Juni 2009, Vol 24 (2)

- Buduneli N., Kutukculer N., Aksu G., Atilla G., 2001. *Evaluation of Transforming growth factor- β I Level in crevicular fluid of cyclosporine a-treated patient. Periodontal and Alveolar.* p 526-531
- Caetano-Lopes J, Chanhao H and Fonseca JE, 2007: *Osteoblasts and Bone Formation. Unidade Investigacao em Reumatologia*, Instituto de Medicina Moluculer, Faculdade de Medicina Da Universidade Lisboa, Portugal, Apr-Jun; 32(2):103-110
- Carlos Junqueira, Jose Carniero, Robert Kelley, 1998: *Histologi Dasar*. Jakarta : EGC
- Cate ART, Bartold PM, Squier AC and Nancy A, 2003: *Repair and Regeneration of Oral Tissues* Nanci, A., *Oral Histology Development, Structure, and Function*, 6th ed., The C.V., Mosby Company, St. Louis.
- Fedi PF, Verrino AR and Gray JL, 2005: *Silabus Periodontal alveolar (terj)*, Jakarta, EGC. p 94-96
- Fleckenstein KB, Cuenin MF, Peacock ME, Bi'zman MA, Swie GD, Buxton TB, Singh BB, and McPherson III JC, 2006: *Effect of a Hydroxyapatite Tricalcium Phosphate Alloplast on Osseous Repair in the Rat calvarium, J Periodontal.*, Vol 77, p 39-45
- Ganeles J, Listgarten MA, and Evian CL, 1986: *Ultrastructure of Durapatite-Periodontal Tissue Interface in Human Intraony Defects, J Endodontic.*, Vol 45, p 133-139
- Grant DA, Stem IB, and Lisgarten MA, 1988: *Periodontic, 6th ed*, Toronto, The C.V. Mosby Company, p 348-63, 860-80
- Groeneveld EHJ and Burger EH, 2000: *Bonemorphogenetic proteins in humanbone Regeneration, European Jurnal of Endocrinology* , 142: 9-21
- Gurinsky BS, Reynolds MA, and Mellonig JT, 2004: *Clinical Evaluation of Demineralized Freeze-dried Bone Allograft and enamel matrix Derivative Osseous Defects in Humans* , *J Oral Surgery*, V 75, 1309-18
- Herol M, Pashley DH, Cuenin MF, Niagro F, Hokett SD, Peacock ME, Mailhot J, and Borke J, 2002: *The effects of Varying Degrees of Allograft Decalcification on Cultured Porcine Osteoclast Cells, J Endodontic.*, 73: 213-9
- Katrien Janssens, Peter ten Dijke, Sophie Janssens and Wim Vain Hul, 2005: *Transforming Growth Factor- β 1 to the Bone.*, *Endojournals.org*, Departement of Medical Genetics, University of Antwerp 2610 Belgium., 56: 374-80
- Mark D. Miller, 2004: *Review of Orthopaedics.*, Departement of Orthopaedic Surgery University Of Virginia Charlottesville, VA, Fourth edition, Saunders An Imprint of Elsevier, 78-85
- Ogustan Z, Hatipglu F, and Ceylan C, 2007; *Comparative Evaluation of Demineralized and Mineralized Xenogenic Bovine Bone Powder and Chips on the Healing of Circumscribed Radical Bone Defect in The Dog, Sagik Bilimleri Dergisi, Clit 21, Say 6, Sayfa(lar): 269-76*

- Polimeni G, Xiropaidis AV, and Wikesjo UME, 2006: *Biology and Principle of Periodontal wound Healing / regeneration, Periodontology*: 41: 30-47
- Princhar JF, 1972: *Advanced Periodontal Disease/ surgical and Prosthetic Management*, W.B.Saunders, Toronto: 512-43
- Princhar JF, 1983: *The Diagnosis and Management of Vertical Bony Defects* , *J Periodontal*: Vol 54: 29-35
- Ruimerman R, Hilbers P, Van Rietbergen B, and Huiskes R, 2006: Indirect Osteoblast-Osteoclast Coupling Through Mechanics Explains Elevated Osteoblastic Bone Formation as a Response to Increased Osteoblastic Activity, 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research society, Faculty of Biomedical Engineering, Eindhoven University of Technology, The Netherlands: 0260
- Toricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, and Giardino R, 2002: *Characterization of Bone Defect Repair in Young and aged Rat Femur Induced by Xenogenic Demineralized Bone Matrix*, *J Endodontology*: 73: 1003-09
- Wada T, Hara K, and Ozawa H, 2006: *Ultrastructural and Histochemical Study of β Tricalcium Phosphate Resorbing Cells in Periodontium of Dogs*, *J Periodont Res*: 24: 391-401
- Walter B. Greene, MD, 2006: *Netters Orthopaedics*; OrthoCarolina Charlotte, North Carolina, Saunders Elsevier: 16-18
- Wirjokusumo S, 2001: Aplikasi Klinis Biomaterial di Bidang Bedah Mulut dalam *The 1st Indonesian Tissue Bank Scientific Meeting and Workshop on Biomaterial Application*, Surabaya: 43-44
- Zhang M, Powers RM, and Wolfenbarger L, 1997: *Effect(s) of the Demineralization Process on The Osteoinductivity of Demineralized Bone Matrix* , *J Orthopaedics*:68: 1085-92

BAB IV

Pengaruh Makrofag Terhadap Respons Inflamasi Lokal dan Sistemik Pada Proses Regenerasi Tulang Alveolar

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Makrofag merupakan sel imun utama pembentuk sitokin lokal di jaringan, dan pada trauma hebat makrofag sering mengalami gangguan respons imun berupa gangguan imunitas seluler (Franke 2006). Dengan adanya trauma yang ditimbulkan pada waktu pengambilan tulang alveolar dan luka pada jaringan gingiva dalam proses apekreseksi, secara fisiologis terjadi perubahan lingkungan mikro dari makrofag yang menyebabkan perubahan aktivasi makrofag (Mc Donal & Torabinejad 2008). Terjadinya aktivasi makrofag sangat tergantung terjadinya kontak antara reseptor dan ligand (Kearns 2008)

Kerusakan jaringan pada waktu tindakan apekreseksi akan memicu makrofag yang telah teraktivasi sebelumnya untuk mengekspresikan mediator inflamasi sehingga mempengaruhi respons inflamasi baik lokal maupun sistemik. Kerusakan jaringan dan perdarahan pada perawatan apekreseksi, komponen jaringan ikat berasal dari fibroblas, yang terdiferensiasi dari sel-sel ektomesenkim dan tertarik ke daerah luka oleh mediator seluler dan humoral. Pembuluh darah disekelilingnya akan menyediakan nutrisi bagi fibroblas dan prekursornya, yang akan membentuk kolagen. Makrofag merupakan bagian yang penting dalam proses regenerasi tulang alveolar (Mc Donald 2008)

Systemic Inflammatory Response syndrome (SIRS) merupakan respons inflamasi sistemik yang terjadi secara berlebihan dan berkepanjangan. Telah dibuktikan dari hasil penelitian bahwa reaksi inflamasi ini disebabkan oleh adanya pelepasan sitokin (IL-1 dan TNF- α) yang berlebihan secara sistemik (Shapiro 2005). Respons sistemik awalnya berasal dari ekspresi sitokin oleh sel imun lokal terutama oleh makrofag karena adanya *danger signal* (Heitbrink 2006). Untuk mengurangi dan membatasi aktivasi makrofag yang merugikan, pada kehilangan atau fraktur tulang dan gingival secepatnya dilakukan penutupan luka. Dengan penutupan luka pasca operasi tulang alveolar lebih dini, sangat memungkinkan untuk melakukan evakuasi hematoma atau cairan luka, evakuasi jaringan nekrotis, dan stabilisasi luka lebih dini (Goodman 2008)

Baue (2000) mengatakan bahwa komplikasi oleh SIRS dapat menyebabkan kematian masih cukup tinggi, maka pencegahan merupakan hal yang penting dalam penanganannya. Pencegahan dengan pemberian medikamentosa kortikosteroid, *monoclonal antibody (antiendotoxin antibodies, TNF antagonis, IL-1 ra)* dan lain-lain telah dicoba tetapi hasilnya belum memuaskan (Hotchkiss 2003). SIRS yang merupakan continuum dari respons inflamasi terhadap perubahan fisiologis umum

dari suatu *injury*/trauma bergantung pada respon *host* dan cadangan fisiologis tubuh (Fry 2000). Perjalanan klinis trauma (post apekreseksi) tergantung pada derajat kerusakan awal (*first hit*), respon biologi tubuh (dipengaruhi oleh genetic, usia, jenis kelamin, penyakit penyerta) dan tipe pengobatan (*second hit*). Dari ketiga faktor ini, hanya tipe pengobatan (penambahan graft) yang dapat diatur dan dipakai sebagai cara pencegahan dan mempercepat regenerasi tulang sehingga mengurangi beban biologi tubuh akibat trauma (Morley *et al.* 2002)

Faktor kerusakan awal akibat trauma, peningkatan IL-6 dan IL-8 dapat memprediksi kejadian *multiple organ failure* (MOF) (Dolan 2006). Pape (2001) juga mendapatkan bahwa kadar IL-6 diatas 500pg/ml praoperatif dapat meningkatkan kejadian MOF pascaoperatif. Proses regenerasi tulang alveolar pasca apekreseksi mencangkup pembekuan darah, inflamasi, penyembuhan jaringan ikat dan maturasi serta remodeling. Pada jaringan gingiva penyembuhan telah matang, inflamasi dan jumlah *fibroblast* akan berkurang, disertai dengan de-agregasi serabut kolagen menjadi pola yang lebih teratur (Ramage 2007). Dengan adanya respons inflamasi baik lokal maupun sistemik (IL-6 sebagai maker) pada saat penyembuhan luka pasca apekreseksi, perannya masing-masing respon tersebut dapat diketahui.

1.2 Permasalahan

Bagaimana respons makrofag terhadap inflamasi lokal dan sistemik pada proses regenerasi tulang alveolar

1.3 Tujuan

Mengetahui respons inflamasi lokal sekitar trauma alveolar dan (makrofag pengeksresi interleukin) pada apekreseksi serta untuk mengetahui respons inflamasi sistemik (IL-6 sebagai marker)

1.4 Manfaat

Diharapkan dapat lebih memperjelas respons makrofag sebagai pengeksresi interleukin terhadap inplamasi lokal dan sistemik pasca tindakan apekreseksi pada tulang alveolar

2. Tinjauan Pustaka

Kelainan pada periapikal dari gigi yaitu kista periapikal, granuloma dan abses yang dapat merusak jaringan disekitarnya. Tulang alveolar disekitar periapikal juga mengalami kerusakan dan perlu perawatan yang tepat (Chandler 2002). Apekreseksi merupakan bagian dari bedah periradikuler dan didefinisikan menurut *American Association of Endodontists* sebagai eksisi bagian apikal akar gigi dan jaringan lunak cekat saat bedah periradikuler berlangsung serta tulang alveolar yang mengalami resorpsi, nekrosis pada permukaannya. Adanya ruangan tulang alveolar pasca bedah apekreseksi disertai proses penyembuhan dan reaksi yang ditimbulkan (Mc Donal 2008)

Kerusakan jaringan keras (tulang alveolar) dan jaringan lunak (gingiva) bisa menyebabkan inflamasi serta *septicemia* yang dapat menghambat proses penyembuhan jaringan pasca oprasi (Baumgartner 2002). Banyak teori yang telah diajukan untuk menerangkan mekanisme terjadinya *nonseptic (inflammatory)* MOD, misalnya teori makrofag (meningkatnya sitokin dan mediator lain dari makrofag yang aktif), teori sirkulasi mikro (penghantaran oksigen yang tidak adekwat, *ischemia reperfusion*), teori interaksi leukosit dan endothel, *gut theory* (bakteri dan produknya berasal dari saluran cerna), *one and two hit theory* dan terakhir ada disebut sebagai teori *neutrophil-mediated tissue injury*, yang pada dasarnya semua teori tersebut saling mendukung satu sama lain (Giannoudis *et al.*2004; Tzioupi *et at.*2005). Fraktur pada tulang alveolar pada apekreseksi adalah hilangnya kontinuitas tulang dan tulang rawan karena adanya trauma yang cukup kuat pada tulang dan jaringan sekitarnya. Kerusakan tulang dan jaringan lunak sekitar trauma akan merangsang tubuh untuk memberikan respons terhadap kerusakan jaringan akibat apekreseksi (Mc Donald 2008).

2.1 Respon tubuh terhadap trauma

Jika terjadi trauma, apalagi kerusakan yang besar melibatkan jaringan keras (tulang) dan jaringan lunak, maka tubuh akan memberikan respons akibat adanya rangsangan serat aferen ke susunan saraf pusat, misalnya karena rasa takut, rasa nyeri/sakit, adanya luka, perdarahan sampai syok, atau badanya inflamasi/ imonologik lokal respons. Semua itu merupakan suatu *stressor* yang memberikan respons yang tidak spesifik disebut *general adaptation syndrome* (GAS) (Constantinides 2003). Pengaturan respons ini mulai dari *Hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis*, *Symphatetic-adrenomedullary axis*, *parasympathetic nervous system*, *thermoregulatory center*, *acute phase production*, dan elaborasi sitokin anti inflamasi yang bertujuan mencegah inflamasi sistemik (Munford 2001). Respons tubuh terhadap trauma atau stressor ini diawali dengan adanya suatu *alarm stage*, yaitu susunan syaraf dirangsang dan pertahanan tubuh dimobilisasi. Hal ini diawali dengan dirangsangnya kelenjar *hypophysis* dan saraf simpatik. *Adaptive stage* dimulai dengan kerja *hormone kortisol*, *norepinephrine* dan *epinephrine*. Kemudian hal itu dilanjutkan dengan *exousted stage*, yaitu kompensasi tubuh tidak mampu mengatasi *stress* dan *stressor* berlanjut hingga menimbulkan penyakit (Putra 2000; Aryono 2004)

Setiap kali ada kerusakan jaringan karena trauma, maka jaringan tubuh akan memberi reaksi untuk melawan atau mempertahankan keutuhan melalui serangkaian mekanisme pertahanan yang tidak dapat dipisahkan, yaitu fungsi syaraf (*nervous, immediate phase*) ditandai dengan *phenomena ischemia reperfusion*, fungsi immune (*second phase*) ditandai dengan adanya *infiltrasi inflammatory cell* ke jaringan, dan fungsi *endocrine (late phase)* ditandai dengan adanya *endothelial modeling* (Aller *et al.* 2004). Fungsi imunitas diawali dengan reaksi inflamasi. Reaksi inflamasi ini awalnya bersifat fisiologis yang mekanismenya dapat diterangkan dengan “*danger model*”, yaitu teori imunologi dari Matsinger (Hietbrink 2006). *Alarm signal* ini disekresi oleh sel yang sehat atau sel yang nekrosis setelah trauma. Kondisi trauma yang berat menyebabkan reaksi lokal akan menimbulkan reaksi sistemik yang besar kecilnya atau berat ringannya bergantung pada jenis jaringan, *alarm signal* dan kerusakan awal (*severity of the primary insult*). Secara umum, perubahan sistemik ini disebut dengan *acute phase response (APR)*, *stress response* atau ada yang menyebutnya SIRS (Cone 2001). *Systemic Inflammatory Response Syndrome* mempunyai mekanisme *feedback* yang sama pentingnya dengan proses inflamasi awal untuk mencegah reaksi inflamasi yang berlebihan yang mengakibatkan terjadinya kerusakan jaringan yang hebat atau terjadinya SIRS yang akan diikuti oleh terjadinya *Multiple Organ Failure* (Marriott 2004)

2.1.1 Fase respon tubuh terhadap trauma

Sir Devid Cuthberston membedakan respon metabolic tubuh terhadap trauma menjadi fase hipodinamik (*Ebb phase*), Fase hiperdinamik (*hyperdynamic phase* atau *flow phase*), dan diikuti fase penyembuhan (*convalescence phase*) (Kim 2000). Dengan adanya fase-fase ini, adanya perbedaan mediator inflamasi dari hari ke hari yang erat kaitannya dengan respons tubuh terhadap *second insult* akan dapat dilihat.

2.1.1.a Fase Ebb

Fase Ebb adalah fase yang ditandai dengan adanya perdarahan sehingga terjadi hipovolemia. Pada fase ini yang diutamakan adalah respon tubuh untuk mempertahankan sirkulasi darah ke otak dan jantung. Respon ini diawali dengan adanya kerusakan jaringan dan selanjutnya HPA axis akan melepaskan *catecholamine* dengan *norepinephrine* sebagai mediator utama. *Norepinephrine* akan mengikat reseptor beta-1 pada jantung dan reseptor alpha dan beta-2 pada pembuluh darah perifer (Kim 2000). Respons ini identik dengan respons *immediate* pertahanan tubuh (Aller.2004).

Setelah trauma atau adanya *injury*, rangsangan dari serat syaraf afferent yang menyebabkan *neuron nucleus paraventricular hypothalamus* akan mensekresi *corticotrophin releasing hormone* (CRH) yang akan merangsang pelepasan ACTH (*Adreno Corticotrophin Hormone*) dari hipofise anterior (Kim 2000). ACTH akan merangsang sekresi Glukokortikoid, terutama kortisol dari korteks adrenal. Kortisol menurunkan *glucose diperifer* (sehingga menimbulkan peningkatan osmoralitas

serum), mempunyai aktivitas mineralokortikoid (sehingga terjadi peningkatan retensi air) sehingga volume cairan intravaskuler cukup.

Fase Ebb ini ditandai dengan perfusi jaringan yang jelek serta suhu tubuh rendah. Pada saat seperti ini, kebutuhan *energy* dan *cardiac output* menurun, sedangkan tahanan pembuluh darah perifer meningkat. Dengan pemberian cairan yang cukup, biasanya fase ini akan membaik dan sudah kembali selama 24 jam (Kim 2000)

2.1.1.b Fase *flow*

Fase *flow* mulai setelah kembalinya volume darah. Keadaan seperti ini ditandai dengan keadaan hipermetabolik, terutama katabolisme protein. Fase Ebb dan fase *flow* memiliki tujuan berbeda, yaitu fase Ebb bertujuan untuk mengembalikan hipovolemia, sedangkan fase *flow* bertujuan untuk memulai penyembuhan jaringan yang rusak. Jaringan yang cedera akan mengaktifkan 5 inisiator faktor (*Coagulation protein, active platelet, mast cell, contact activating system dan complement*) sehingga akan menimbulkan proses inflamasi. Proses inflamasi terjadi karena terbentuknya C5a, kinin bradykinin, thrombin dan keluarnya *chemoattractant* yang fungsinya untuk merekrut dan mengaktifkan sel efektor, seperti sel Polymorphonuklear (PMN), makrofag dan limfosit (Fry 2000; Hietbrink 2006). Aktifnya PMN, makrofag dan limfosit mengakibatkan keluarnya mediator, termasuk sitokin (sitokin proinflamasi IL-1, TNF alpha, IL-6, IL-8 dan sitokin antiinflamasi IL-4 dan IL-10), nitrikoksid, dan *platelet-activating factors*(PAF) (Kim 2000; Oberholzer 2000)

Polymorphonuclear di samping melepaskan molekul oksidasi yang poten, juga mampu melakukan fagositosis. Fagositosis juga dilakukan oleh makrofag. Makrofag yang diaktifkan oleh sitokin atau oleh perubahan lingkungan mikro (*micro environment*) akan mencerna organisme yang masuk, membersihkan jaringan nekrosis, dan melepaskan sitokin yang lain (Kim 2000; Hietbrink 2006)

Mediator lain yang dikeluarkan pada fase *flow* adalah sitokin. Sitokin merupakan mediator utama pada fase *flow*, mempunyai sifat yang pleotropik, dan redundan. IL-1 dan TNF- α merupakan *proximal proinflammatory* sitokin yang menyebabkan pelepasan sitokin atau mediator inflamasi lain dan *acute phase protein* bersama IL-6. Selanjutnya, bersamaan dengan itu dipicu juga *antiinflammatory* sitokin IL-4 dan IL-10 berfungsi untuk menghambat TNF- α , yang bertujuan untuk mencapai keadaan homeostasis (Kim 2000).

Fase *flow* ini merupakan suatu fase yang didominasi oleh respon inflamasi dengan sitokin sebagai mediator utama. Respon ini memang sangat diperlukan untuk homeostasis tubuh. Hilangnya homeostasis imun ditandai dengan perubahan metabolisme yang mencolok, seperti pada trauma hebat, dan akhirnya akan memberikan pengaruh pada system imun (Cook 2001)

2.1.1.c Fase Penyembuhan (*convalescence*)

Fase rehabilitasi merupakan kelanjutan fase *flow*. Fase *flow* (hipermetabolik) akan mencapai puncak dalam beberapa hari dan kemudian akan menurun akibat adanya mekanisme *up-regulating and down-regulating* untuk mencapai keadaan homeostasis. Di dalam mekanisme *down regulating* ini, apoptosis merupakan salah satu faktor sehingga lambat laun akan kembali normal (Mahidara 2000). Akhirnya, semua molekul mediator kembali pada kadar normalnya (Kim 2000).

Fase rehabilitasi ini berjalan perlahan dan dapat berlangsung dalam beberapa minggu hingga beberapa bulan sampai terjadi penyembuhan yang baik. Pada trauma tulang (alveolar), fase Ebb berlangsung sebentar bergantung pada banyaknya perdarahan dari trauma. Fase Ebb akan diikuti oleh fase *flow* dan fase *convalescence*. Fase-fase penyembuhan trauma tulang yang dapat dibedakan menjadi fase hematoma, fase inflamasi, fase kalus lunak (*red callus*), fase kalus keras (*white callus*), dan fase remodeling digolongkan dalam fase *flow* dan fase *convalescence*. Keadaan ini dapat tercapai jika keadaan homeostasis dapat dipertahankan. (Manologas 2009)

2.2 Respon inflamasi

2.2.1 Respon inflamasi lokal

Organisme yang kompleks mempunyai 3 level pertahanan terhadap jejas asing (*injurious foreign agent*), yaitu barrier kulit dan mukosa yang utuh, *immunitas nonspesifik* dan immunitas spesifik. Manifestasi immunitas *nonspesifik* yang utama adalah respon inflamasi (Bone 2001). *Immunitas nonspesifik* merupakan respon awal dari suatu jejas yang diperantarai oleh makrofag, sel *Natural Killer*, sel endotel, dan neutrofil. Respon imunitas nonspesifik tidak cukup tanpa adanya respon imunitas spesifik, begitu juga sebaliknya. Modulasi imunitas spesifik oleh imunitas *nonspesifik* diperantari oleh adanya sel penyaji antigen (APC) sehingga akan menimbulkan aktivasi Th0 menjadi Th1 atau Th2 (Cook 2001).

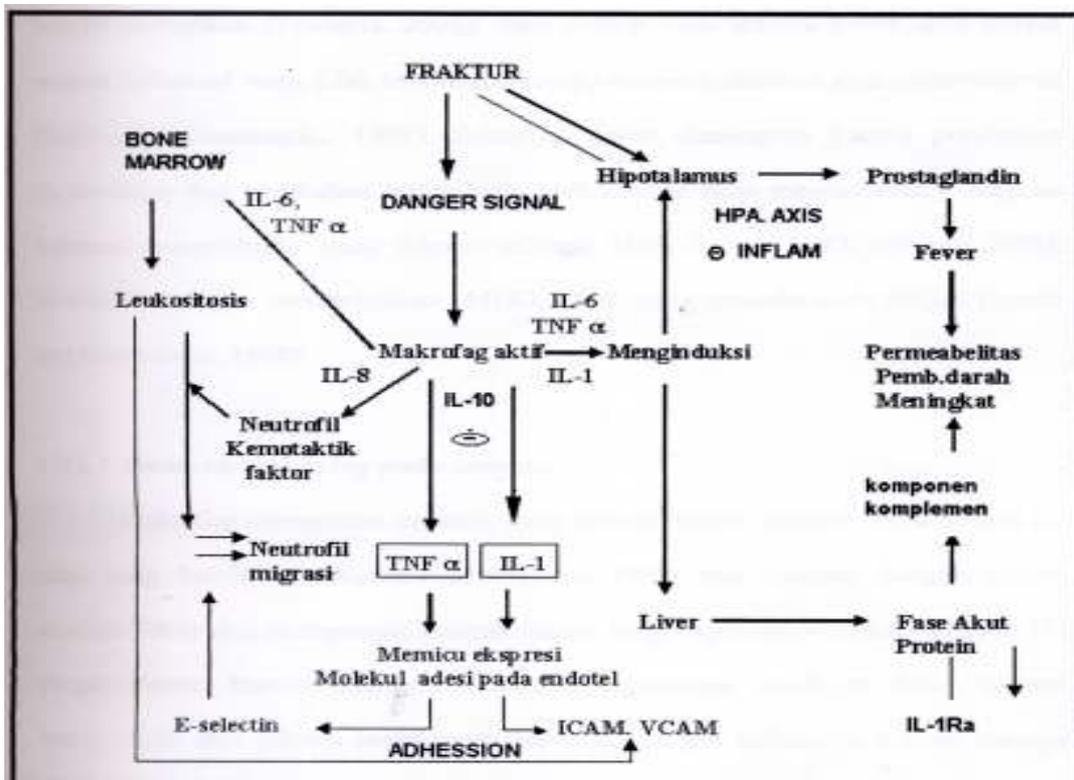
Inflamasi lokal merupakan respons yang cepat dari tubuh terhadap jejas (*injurius agent*) yang menyediakan dan mengantarkan mediator pertahanan tubuh. Respons ini terdiri atas 3 komponen, yaitu perubahan diameter pembuluh darah yang menyebabkan peningkatan aliran darah, perubahan struktur mikrovaskuler sehingga memungkinkan serum protein dan leukosit meninggalkan sirkulasi, dan emigrasi leukosit dari sirkulasi ke fokus jejas (Kumar *et al.* 2005)

Adanya kerusakan jaringan akibat trauma pasca operasi (apekreseksi) sebagai danger signal menyebabkan dimulainya proses inflamasi (Marrow 2002). Danger signal akan mengaktifkan 5 inisiator inflamasi (*the five inisiator of inflammation*) yang terdiri atas protein koagulasi, platelet aktif, sel mast, sistem aktivasi kontak dan komplemen yang akan menghasilkan produk, seperti C5a, thrombin, dan bradykinin. Produk –produk itu akan menyebabkan adanya perubahan permeabilitas vaskuler, penarikan leukosit, dan perubahan tonus vasomotor (Hietbrink 2006).

2.2.2 Respons inflamasi sistemik

TNF- α , IL-1 yang diekspresi oleh makrofag dan molekul proinflamasi yang lain, selain dapat menginduksi lokal inflamasi, dapat juga memicu respons sistemik, misalnya takikardi, takipnoe, leukositosis dan fibrin (Munford 2001). Respons ini disebut sebagai *acute phase respons* atau *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) (Kumar *et al.*2005). Inflamasi sistemik terjadi karena berhamburannya (spillover) mediator lokal trauma ke sistemik. Mirip dengan proses infeksi, ada bukti yang menunjukkan bahwa beratnya reaksi sistemik terhadap infeksi sangat dipengaruhi oleh intensitas inflamasi lokal di tempat infeksi (Ulevitch 2003). Demikian pula halnya pada trauma terhadap hubungan respons sistemik dengan derajat trauma. Sitokin yang terbentuk secara lokal berlebihan, maka hal itu akan memberi efek sistemik. Sitokin ini akan mempengaruhi respons selanjutnya. Misalnya, IL-6 dan TNF- α sistemik menginduksi sumsum tulang sehingga diproduksi sejumlah leukosit yang menyebabkan terjadinya keadaan leukositosis.

Secara garis besar proses inflamasi lokal dan sistemik pada trauma disajikan pada gambar 1. Protein fase akut juga akan mempengaruhi makrofag untuk mengekspresikan TNF- α R dan IL-1Ra (Wang 2000). Makrofag yang aktif juga akan mempengaruhi sel Th1 (melalui IL-12) dan mempengaruhi Th2 (melalui IL-4) untuk menjaga homeostasis. Dengan demikian, respons inflamasi yang bersifat sistemik ini lebih bersifat antiinflamasi yang bertujuan untuk membatasi dan menghalangi penyebaran jaringan yang rusak (*injurius agent*) (Munford 2001)



Gambar 4. 1: Sekema reaksi inflamasi lokal dan sistemik pada fraktur (Munford and Pugin 2001)

1. Bone marrow memproduksi IL-6, TNF α dan leukositosis

1.1 IL-6, TNF- α diekspresi oleh makrofag (Munford and Pugin 2001)

1.2 Leukosit yang diproduksi *bone marrow* menyebabkan terjadinya Leukositosis (Ulevitch 2003)

2. Denger signal

2.1 Mulai proses inflamasi dengan aktifnya makrofag terjadi induksi melalui IL-6, TNF- α

2.2 Makrofag yang aktif menghasilkan TNF- α , IL-1 dimana IL-10 berkurang

2.3 TNF- α , IL-1 akan memicu ekspresi molekul adesi pada endotel yang menghasilkan E-selectin dan ICAM, VCAM (Marrow and Rubinstein 2002)

3. Hipotalamus

3.1 Hipotalamus menghasilkan Prostaglandin

3.2 Makrofag aktif menginduksi melalui IL-6, TNF- α ke hipotalamus mengurangi inflamasi pada HPA Axis

3.3 Prostaglandin meningkatkan permeabilitas pembuluh darah melalui Fever (Munford and Pugin 2001)

Respons pertahanan tubuh, termasuk inflamasi sangat diperlukan untuk mempertahankan kehidupan dan mencegah kuman patogen. Meskipun demikian, jika respons inflamasi hebat, berlangsung lama, dan tak dapat dikontrol akan bersifat merugikan. Satu contoh pada trauma hebat akan terjadi respons inflamasi yang tidak terkontrol berupa imuno aktivasi atau imunosupresi (Tzioupis 2005)

2.2.3 Peranan Makrofag pada trauma

Makrofag merupakan monosit yang berada dalam jaringan, berasal dari stem sel yang bersifat multipotensial bersama PMN dan disebut dengan *system myeloid*. Makrofag mempunyai banyak fungsi yang dapat digolongkan sebagai : (1) fungsi efektor, karena mampu melakukan fagositosis, *oxidative burst*, sekresi *Nitric oxide*, dan sekresi *metalloproteinase*; (2) fungsi inflamasi, karena mampu memproduksi sitokin proinflamasi, *chemokine* dan metabolit *arachidonic acid*; (3) fungsi antiinflamasi yang memproduksi IL-1Ra, IL-10, TGF- β ; dan (4) fungsi tambahan sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*) (Stout 1997).

Sel makrofag merupakan sel fagositik yang khusus karena dapat hidup lebih lama dari PMN, dapat beradaptasi dengan bermacam-macam mikrostimuli, dan mengantarkan bermacam-macam stimuli fisik maupun kimiawi yang bersifat tidak spesifik yang dihasilkan oleh jaringan yang mengalami trauma (Hauser 2006). Makrofag mampu mengawali proses inflamasi karena sangat responsive dan aktif dalam biosintetik. Disamping itu, makrofag mampu melakukan *debridement* luka

dan mampu melakukan sekresi bahan biologis aktif (Hietbrink 2006). Monosit akan direkrut ke arah jejas bersamaan dengan PMN dan monosit maksimum berada di dalam jaringan pada hari III hingga IV (Kumar 2005).

Aktivasi makrofag sangat bergantung pada kontak antara reseptor dan ligand. Dari perbedaan aktivasi makrofag tersebut dapat diketahui ada 3 populasi makrofag aktif dengan fungsi masing-masing, yaitu makrofag aktif klasik (*classically activated macrophage*), makrofag aktif alternative (*alternatively activated macrophage*), dan makrofag aktif tipe II (*type II-activated macrophage*). Makrofag aktif klasik terbentuk karena makrofag dipicu oleh INF- γ dan TNF, sebagai produknya adalah TNF, IL-12, IL-1, dan IL-6. Makrofag aktif alternatif terbentuk akibat adanya IL-4 atau *glucocorticoid* dan sebagai produknya adalah IL-1Ra dan IL-10. Sedangkan makrofag aktif tipe II terbentuk akibat ligasi TLR-Ig kompleks dan sebagai produknya adalah IL-10, TNF dan IL-6 (Mosser 2003)

Pada lingkungan mikro aktivasi makrofag pada trauma juga bergantung di jaringan yang trauma sehingga menimbulkan manifestasi makrofag aktif yang berbeda. *Two hit respons* setelah trauma meningkatkan reaktivitas TLR4 (Murphy *et al.* 2004), sehingga pada keadaan trauma yang berat (misalnya luka bakar berat) akan menimbulkan disosiasi respons imun karena terjadi hiperstimulasi makrofag yang menyebabkan adanya penurunan respons imun dan penurunan fungsi makrofag (Atiyeh 2001). Pretus *et al* 2009) secara *invitro* dengan mempergunakan glukukan (*macrophage-activating immunomodulator*) sebelum dan sesudah dilakukan perusakan dan trauma tungkai belakang mencit, dan didapatkan bahwa glukukan menurunkan produksi PGE2 dari makrofag dan menghilangkan supresi proliferasi sumsum tulang.

2.2.4 Resolusi inflamasi

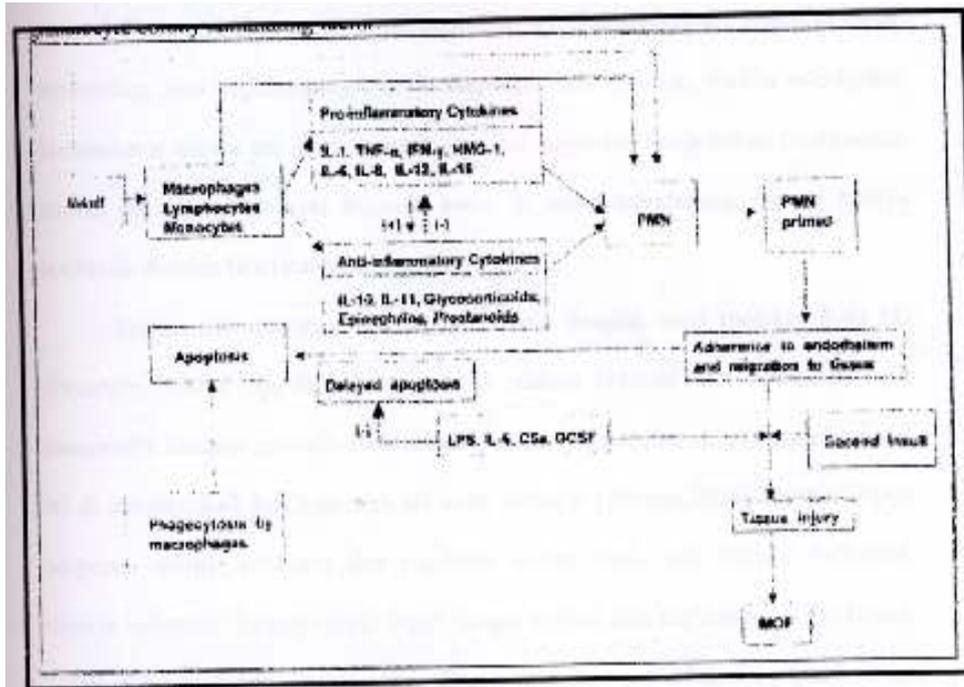
Inflamasi merupakan respons tubuh terhadap adanya jejas yang bertujuan melawan atau menghilangkan agen penyebab yang ditandai dengan adanya vasodilatasi, peningkatan permeabilitas, migrasi dan perekrutan sel darah yang penting. Keadaan ini dapat mengalami resolusi lengkap, menjadi persisten, atau menjadi progresif (Haslet 2009; Cone 2001). Hilangnya agen penyebab atau jaringan yang rusak akan menyebabkan proses inflamasi mulai mengalami resolusi, baik secara lokal maupun inflamasi sistemik.

Berhentinya proses inflamasi diperkirakan karena hilangnya “*ongoing stimulation*” (De Bel 2000). Hilangnya proses yang mengawali inflamasi akan menghilangkan rangsangan berikutnya sehingga akan menyebabkan menurunnya mediator inflamasi, turunnya emigrasi granulosit, restorasi permeabilitas pembuluh darah, berkurangnya sekresi agen proinflamasi, dan akhirnya diikuti dengan repair dari jaringan yang rusak (Haslet 2009). Jika mediator proinflamasi keluar dari fokus inflamasi, maka mediator itu akan dilarutkan oleh volume darah dan cairan interstitial sehingga potensinya akan berkurang (Cone 2001)

De Bel (2000) menyebutkan bahwa mekanisme antiinflamasi ini terlihat dengan terbentuknya mediator seperti berikut :

1. Produk antisitokin inflamasi
Sitokin antiinflamasi (IL-4, IL-10, IL-13, *Growth Factor* terutama TGF β), Reseptor antagonis (IL-1Ra), Soluble reseptor (sTNFR)
2. Reaksi neuroendokrin berupa peranan kortikosteroid dan *catechol amine* ikut berperan dalam resolusi inflamasi. Glukokortikoid berfungsi sebagai modulator apoptosis granulosit. Disamping itu, glukokortikoid memodulasi makrofag untuk memfagositosis badan apoptosis (*apoptotic bodies*). Kortisol mampu memodulasi produksi sitokin, yaitu menurunkan produksi proinflamasi sitokin (Bone *et al.* 1999).
3. *Heat shock protein* (Hsp) disebut juga *stress protein* (Purnomo 2003), yaitu protein yang dibentuk oleh sel sebagai respons pelindung terhadap semua stress (Kim *et al.* 2002). Berbagai macam tipe *stress cell* dapat terjadi, misalnya stress terhadap toksisitas TNF (yang menyebabkan gangguan terhadap aktivitas *phospholipase A*), toksisitas PMN aktif, iskemia, toksisitas endotoksin, toksisitas NO (yang menyebabkan penurunan aktivitas peroksinitrit dari *poly (ADP) ribosyltransferase* dan dari respirasi mitokondria). Namun, jika terjadi nekrosis dan Hsp terdapat diluar sel, Hsp akan bersifat sebagai *endogenous danger signal* yang dapat dikenali oleh makrofag (Ohashi 2000)
4. Apoptosis atau *programmed cell death* merupakan program aktif kematian sel yang ditandai oleh pengkerutan, kondensasi sitoplasma, dan fragmentasi nukleus (Kaplowitch 2000). PMN merupakan sel utama di tempat inflamasi akut yang bersifat lokal dan apoptosis PMN berperan penting dalam resolusi inflamasi (Mahidara 2000; Kaplowitch 2003). Apoptosis memerlukan reseptor, adaptor protein, dan enzim proteolitik, seperti kaspase (Kaplowitch 2000). Sel PMN pada daerah inflamasi akan mengekspresikan reseptor yang mampu menginduksi inti sehingga terjadi transkripsi gen yang menyebabkan apoptosis. Sel granulosit yang mengalami apoptosis, setelah dipagosit oleh makrofag, selanjutnya terjadi penekanan produk proinflamasi dari makrofag, misalnya IL-1 beta, GM-CSF, IL-8, TNF dan lain-lain sehingga resolusi inflamasi akan terjadi (Haslet 2009).

Terhambatnya apoptosis, misalnya pada sepsis menyebabkan destruksi jaringan, yaitu PMN tua (*senescent*) yang gagal mengalami apoptosis akan mengalami nekrosis sehingga akan terjadi kebocoran protein proinflamasi dan enzim proteolitik dari sitoplasma (Mahidara 2000)



Gambar 4. 2: Hubungan apoptosis dengan biologi respons inflamasi (Nomikos & Vamvakopoulos 2001)

1. Macrophages Lymphocytes Monocytes

1.2 Menghasilkan *Pro inflammatory Cytokines* (IL-1, TNF- α , HMG, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18)

1.2 Menghasilkan *anti Inflammatory Cytokines* (IL-10, IL-11, Glycocorticoids, Epinephrine)

1.3 Kesemuanya menghasilkan PMN selanjutnya terjadi *Adherence to endothelium and migration to tissue* (Mahidara 2000)

2. Apoptosis

2.1 *Adherence to endothelium and migration to tissue* serta *Tissue injury* menyebabkan terjadinya MOP

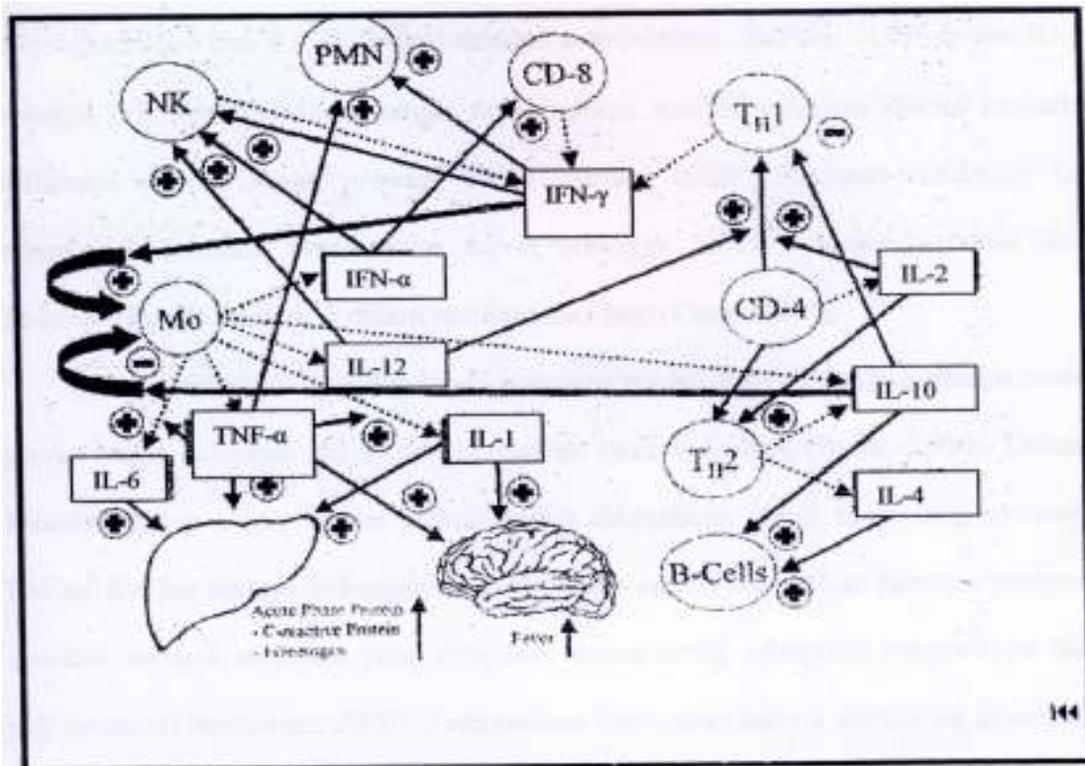
2.2 Delayed apoptosis (LPS, IL-4, CS4, GCSF) dapat menyebabkan apoptosis

2.3 Apoptosis juga disebabkan adanya *Phagocytosis by Macrophages* (Kaplowitch 2000)

2.3 Sitokin pasca trauma

Sitokin merupakan bahasa untuk komunikasi tarsel, yaitu komunikator primer dari sistem imun yang berperan sebagai pembawa pesan-pesan kimiawi antarsel. Proses tersebut meliputi pertumbuhan sel, diferensiasi sel, repair jaringan, remodeling, dan regulator dari imun respons. Pada trauma, sitokin merupakan komunikator antara sel stress somatik dan sel myeloid (Raeburn 2002).

Secara umum, sitokin tidak ditumpuk dalam sel sebagai molekul, tetapi sitokin terbentuk secara terbatas oleh DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) yang ditranskripsi dan kemudian diikuti translasi RNA (*Ribo Nucleic Acid*) sehingga harus ada perangsang yang berfungsi merangsang inti untuk memproduksi sitokin. Sitokin bekerja terhadap beberapa macam sel dan sifat ini disebut dengan pleotropis dan mempengaruhi pembentukan sitokin yang lain. Kemampuan sitokin untuk meningkatkan atau menekan produksi sitokin yang lain merupakan suatu mekanisme regulator yang penting terhadap system imun dan system inflamasi (Constantinides 2003). Hal ini dapat dilihat seperti gambar 3



Gambar 4. 3: Hubungan sitokin dengan fever dan *acute phase protein* (Oberholzer 2000)

Keterangan Gambar : → = cara kerjanya ----→ = diproduksi oleh

1. IFN-y
 - 1.1 kerjanya menghasilkan PMN, NK, menambah Mo
 - 1.2 IFN-y diproduksi oleh Th 1, CD 8, NK
2. IL-10
 - 2.1 kerjanya menghasilkan Th 1, B-Cells, mengurangi Mo
 - 2.2 diproduksi oleh Th 2, Mo
3. Mo diproduksi oleh IFN-α, IL-10, IL-12, IL-1, TNF-α, IL-6 (Constantinides 1993)

Respons tubuh terhadap trauma atau *stressor* ini diawali dengan adanya suatu *alarm stage*, *adaptive stage*, dan kemudian *exhausted stage* (Putra 2000). Dalam keadaan *alarm stage*, semua potensi tubuh dikerahkan untuk mengatasi *stressor*. Hal ini terlihat dengan bekerjanya *system neuro-*

endocrine, system hormone maupun sitokin sebagai mediator yang terbentuk secara cepat, teregulasi secara ketat dan *self limited* (Oberholzer 2000). Pada trauma ditemukan bahwa sitokin ini diperoleh dengan kadar tinggi pada hari pertama dan menurun pada hari berikutnya, misalnya IL-6 pada trauma dengan *injury severity score* (ISS) Pada keadaan infeksi respons imunologik tubuh naik dengan sangat cepat pada hari 1, kemudian mengalami penurunan di hari berikutnya. Hal ini bergantung pada virulensi kuman, luas inokulum, penyakit penyerta, dan faktor genetik (Hotchkiss 2003).

Fluktuasi sitokin di dalam sirkulasi bergantung pada fase trauma dan beratnya trauma. Pada mulanya inflamasi nonspesifik terjadi secara lokal, kemudian menyebabkan inflamasi sistemik, dan diikuti dengan resolusi jika tidak terjadi disregulasi keseimbangan mediator proinflamasi dan antiinflamasi. TNF- α dan IL-1 merupakan *cytokine proximal* yang mampu menginduksi kaskade inflamasi berikutnya. Pada trauma dengan homeostasis baik, sitokin akan meningkat dan kemudian menurun pada hari-hari berikutnya serta diikuti oleh proses penyembuhan (Manolagas 2009)

2.3.1 Tumor Necrosis Factor-Alpha atau TNF- α

Tumor nekrosis faktor- alpha ditemukan pertama kali berdasarkan adanya *necrosis hemoragic* pada tumor tertentu pada murine. TNF- α diproduksi oleh makrofag aktif, T-cell, dan sel-sel lain seperti sel Kupffer, sel endothil dan sel glial (Giannoudis.2004). TNF- α mempunyai aktivitas biologis pada sistem imun sebagai mediator *inflammatory* yang pertama (*proximal inflammatory mediator*)(Boedina Kresno 2001)

Selain untuk menyerang sel-sel tumor, pranan utama TNF- α adalah ikut dalam proses inflamasi, baik lokal maupun sistemik. Secara sistemik TNF- α menyebabkan kaheksia, menginduksi terjadinya syok. Pemberian TNF- α secara lokal menyebabkan terjadinya suatu inflamasi ringan yang ditandai oleh adanya akumulasi neutrophil. Pada sel endothelium TNF- α meningkatkan permeabilitas dan ekspresi molekul adesi (Giannoudis et al.2004). TNF- α memicu aktivitas prokuagulan dan menekan aktivitas antikuagulan. Hal ini menyebabkan adanya hambatan aliran darah dan nekrosis jaringan (Durum 2006)

Pada trauma TNF- α merupakan regulator utama dari respons imunoinflamasi. TNF- α mempunyai waktu paruh yang pendek (sekitar 20 menit) di dalam plasma sehingga penggunaan TNF- α sebagai marker dan *predictor mortalitas* tidak memuaskan (Raman et al, 2003)

2.3.2 Interleukin 1 (IL-1)

Interleukin-1 adalah sitokin yang paling pertama didapatkan. Interleukin-1 diproduksi oleh makrofag yang aktif, misalnya sel Kupffer, sel Langerhans atau sel Dendritik. Dalam keadaan normal monosit tidak membentuk IL-1 mRNA, tetapi bila ada rangsangan berupa (1) produk bakteri, (2) agen perusak, (3) agen endogen, misalnya C5a atau TNF, maka IL-1 ditranslasi (Boedina Kresno 2001).

IL-1 merupakan mediator penting dalam inflamasi lokal dan inflamasi sistemik. IL-1 bersama TNF memicu endotel pembuluhn darah untuk mengekspresikan prostaglandin E2, *nitric oxide*, dan

molekul-molekul adesi. Dengan meningkatnya aliran darah, terinduksinya kemoatraktan dan rekrutmen leukosit akan menyebabkan akumulasi dari sel inflamasi. IL-1 menginduksi pertumbuhan fibroblas, meningkatkan neovaskularisasi sehingga penyembuhan luka dapat terjadi. Secara sistemik IL-1 akan mengakibatkan panas badan meningkat, hipoglisemi dan terbentuknya respons fase akut dari hati. Septik syok akan terjadi jika terjadinya vasodilatasi berlebihan yang kemungkinan disebabkan oleh IL-1 atau kombinasi dengan beberapa sitokin lain (Durum 2006)

2.3.3 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 merupakan sitokin yang mempunyai efek yang sangat luas terhadap bermacam-macam sel target (*pleitrophy*). Aktivitas IL-6 bertumpang tindih dengan aktivitas IL-1 dan TNF (*redundancy*), tetapi IL-6 mempunyai sifat-sifat tambahan lain, seperti *growth factor*, hematopoiesis dan stimulator hepatitis (Boedina Kresno 2001)

Interleukin-6 diproduksi oleh makrofag, fibroblas, T dan B sel dan bermacam-macam sel hematopoietik dan nonhematopoietik akibat adanya induksi TNF- α atau IL-1 β (Raeburn 2002). Secara umum IL-6 berhubungan dengan IL-1 dan TNF- α , artinya ketiga sitokin ini dapat saling berkoordinasi pengeluarannya dari monosit yang aktif. IL-6, IL-1 dan TNF- α dapat menginduksi produksi yang lain. IL-1 dan TNF- α dapat menginduksi IL-6, TNF- α dapat menginduksi IL-1, IL-1 dapat menginduksi TNF- α , tetapi sebaliknya IL-6 tidak dapat menginduksi IL-1 dan TNF- α , melainkan dapat menekan produksinya dari makrofag (Durum 2006). Pada trauma IL-6 merupakan marker yang paling baik untuk menentukan derajat trauma karena stabil di plasma dengan waktu paruh lebih dari 6 jam (Gianoudis *et al.* 2004).

2.3.4 Interleukin-10

Interleukin-10 merupakan glikoprotein dengan BM 18 kD, diproduksi oleh sel Th2 dan makrofag aktif jalur alternative. Gen pembentuk terdapat pada kromosom nomor 1 (Pegram 2009)

Interleukin-10 memiliki kemampuan untuk menghambat produksi Th1. Ada dua fungsi utama IL-10 adalah (1) untuk menghambat produksi TNF, IL-1, Chemokin, IL-12; (2) untuk menghambat makrofag dalam membantu aktivasi sel T. IL-10 sering disebut sebagai *Cytokine Synthesis Inhibitory Factor*, Sitokin Anti Inflamasi dan *macrophage-deactivation factor* (Ogata *et al.* 2009)

Produksi IL-10 dari makrofag dipicu oleh IL-4, glukokortikoid, dan PGE2, juga dapat dihambat oleh IFN- γ karena IFN- γ dapat memicu makrofag untuk menurunkan ekspresi IL-10 sehingga keadaan homeostasis dapat tercapai. Sebagai sitokin antiinflamasi, IL-10 telah dicoba digunakan untuk SIRS pascatrauma. IL-10 dikatakan akan bersinergi dengan IL-13 (Pegram 2009)

2.3.5 Makrofag Jaringan sekitar Fraktur mengekspresi IL-1 β

Aktivasi makrofag bergantung pada lingkungan mikro jaringan. Adanya fraktur atau trauma, tubuh akan merespons melalui proses homeostasis tubuh berupa proses fisiologis melalui respons saraf, immunologis dan metabolisme (Aller 2004). Fraktur merupakan fokus inflamasi karena adanya

jaringan nekrosis, jaringan iskemia yang dikelilingi oleh jaringan hipoksia. Kerusakan jaringan ini merupakan *danger signal* sehingga terjadi proses inflamasi. Pada respons imun seluler, makrofag merupakan yang sangat penting dan akan mengalami aktivasi karena adanya *danger signal* tersebut. Aktivasi makrofag secara klasik memerlukan signal berupa INF- γ melalui INF- γ -R untuk mengekspresikan mediator proinflamasi (Mosser 2003)

Dalam proses inflamasi, jika keadaan homeostasis tercapai, maka PMN akan mengalami apoptosis dan berkurang jumlahnya dan diganti fungsinya oleh makrofag. Terhambatnya produksi sitokin proinflamasi oleh produk PMN menyebabkan aktivasi makrofag terhambat yang diduga karena PGE₂. PGE₂ akan menekan terbentuknya IFN- γ dan IL-12 sehingga produksi proinflamasi sitokin kurang (Kumar 2005)

2.3.6 Chitosan sebagai mediator inflamasi

Kitosan yang larut dalam air menghambat DFX yang menyebabkan (produksi sitokin proinflamasi melalui blokade aktivasi NF- κ B di dalam sel HMC-1). Selanjutnya kitosan yang larut dalam air tadi memodulasi sitokin inflamasi melalui penghambatan aktivasi NF- κ B. Dengan demikian kitosan yang larut dalam air merupakan suatu inhibitor dari aktivasi NF- κ B pada *mast cells* HMC-1 yang bermanfaat bagi pengobatan hipoksia akibat penyakit inflamasi (Seo *et al.*2003)

Inflamasi dapat terjadi untuk mengeliminasi sitokin atau bahan iritan dan merespons antibodi, komplemen, leukosit dan substansi kemotaktik menuju ke titik radang. Peran dari zat-zat yang berfungsi sebagai mediator kimia yang dilepaskan oleh sel-sel yang mengalami kerusakan. Mediator kimia tersebut antara lain histamin. Aktivasi *mast cells* selain dapat menghasilkan histamin, ada juga menghasilkan beberapa proinflamasi dan sitokin seperti TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 dan *tumor growth factor* (TGF)- β 1. *Mast cells* merupakan komponen seluler dari sistem imun, distribusinya perivaskuler dan tersebar pada berbagai daerah portof entery. Sebagai sel imun, *mast cells* memiliki berbagai kemampuan sebagaimana yang dimiliki oleh neutropil dan makrofag (Durum 2006)

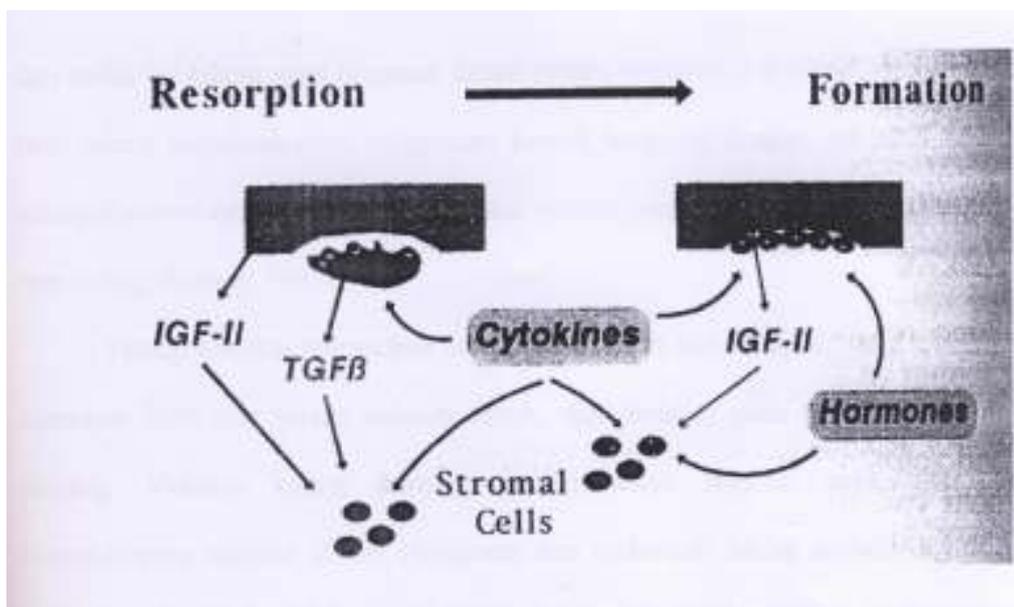
2.4 Regenerasi tulang alveolar

Tulang selalu beradaptasi terhadap *stress*, dan mengalami perbaikan –regenerasi secara periodik sehingga tulang yang lama diganti dengan tulang yang baru. Genesis maupun apoptosis dari sel-sel yang terlibat yaitu sel osteoblas dan sel osteoklas sangat spesifik sehingga menentukan sekali dalam proses homeostasis tulang (Salter 1999). Stanford Field (2003) mengatakan bahwa tulang alveolar bersifat sebagai struktur (*anatomical structures*), sehingga tulang secara umum mempunyai fungsi antara lain : homeostasis mineral, sebagai sistem hematoposis, memperkuat kerangka tubuh dan anggota gerak, mendukung gerakan tubuh, dan melindungi organ-organ tubuh sesuai dengan bentuk dan fungsinya (Manolagas.2000). Sedangkan khusus pada tulang alveolar struktur dan

fungsinya sangat spesifik yaitu perlekatan syaraf –syaraf pada gigi, tempat kedudukan dari gigi, melindungi pembuluh darah dan membentuk wajah (Fister 2000).

Pada masa pertumbuhan, masa tulang akan terus bertambah dan akan mencapai puncaknya pada usia dekade ketiga, dan selanjutnya massa tulang akan menurun secara bertahap tanpa menimbulkan gejala. Pada wanita, setelah mengalami menopause penurunan massa tulang akan terjadi lebih cepat dan progresif terutama pada saat 5 – 10 tahun pascamenopause (Pacifini 2008). Selama hidup, jaringan tulang akan mengalami proses penyerapan dan pembentukan tulang secara dinamis yang dinamakan proses regenerasi tulang (*bone regeneration*). Proses ini merupakan aktivitas dari dua tipe sel yang berbeda yaitu sel osteoklas merupakan sel penyerap tulang dan sel osteoblas merupakan sel pembentuk tulang (Kearns 2008)

Proses *coupling* yaitu pasangan penyerapan dan pembentukan tulang, dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain, adanya sitokin, faktor pertumbuhan (*growth factors*), dan faktor hormonal (Baylink 1999) . Proses regenerasi ini selalu sama yaitu dimulai dari aktivitas sel osteoklas yang bertanggung jawab sebagai penyerap tulang, dan kemudian diikuti oleh aktivitas sel osteoblas sebagai pembentuk tulang, pembuluh kapiler sentral, dan jaringan ikat (Manolagas 2000). Keseserasian kerja antara osteoklas dan osteoblas dalam proses regenerasi tulang (alveolar) dapat dilihat sebagai berikut (gambar 4)



Gambar 4. 4: Proses regenerasi tulang yaitu penyerapan dan pembentukan tulang pada keadaan normal terjadi secara seimbang. Dipengaruhi Sitokin, faktor pertumbuhan, dan faktor hormonal. (Baylink1999)

1. Resorpsi Tulang
 - 1.1 Cytokin melalui IGF II dan TGF
2. Formation (Pembentukan Tulang)

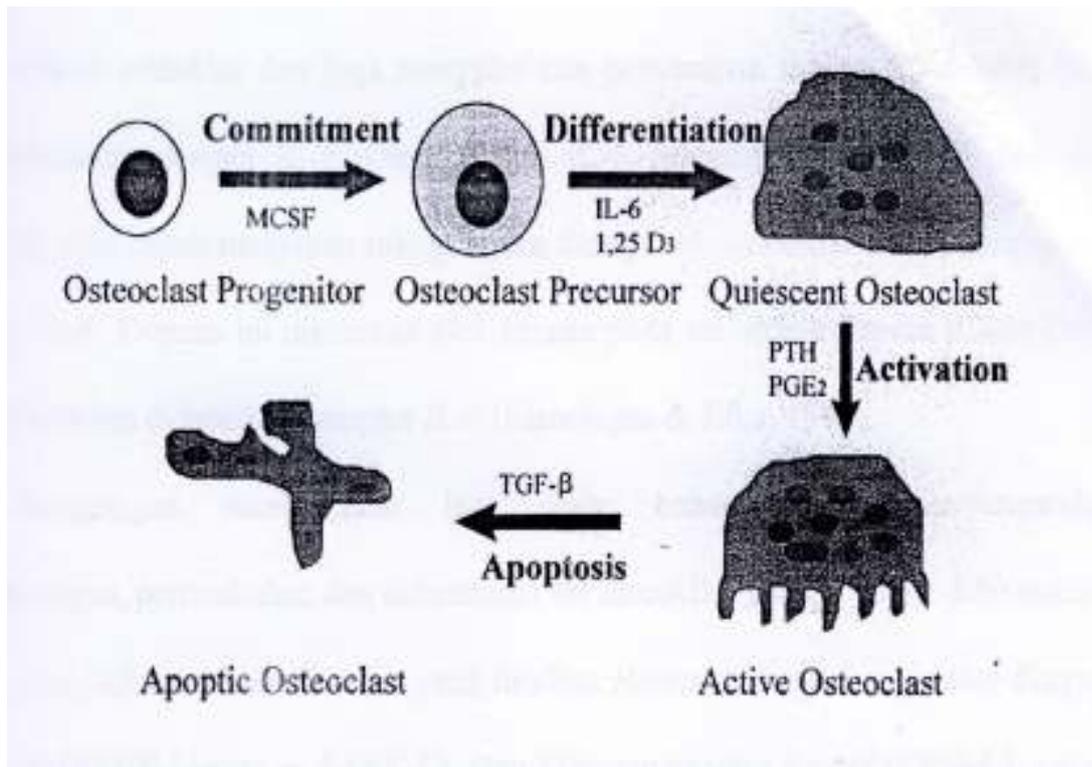
2.1 Hormonal pertumbuhan , cytokine mnelepas *stromal cells*, IGF II
Sehingga terjadi regenerasi tulang (Manolagas 2000)

2.4.1 Peran seluler pada regenerasi tulang

Regenerasi tulang bertujuan mempertahankan massa tulang agar tetap stabil. Seperti diketahui aktivitas ini dilakukan oleh keseimbangan kerja dari sel osteoklas dan sel osteoblas. Selama hidup akan selalu terjadi regenerasi tulang alveolar dengan cara penyerapan tulang alveolar yang tua oleh sel osteoklas dan diganti dengan pembentukan tulang alveolar yang baru oleh osteoblas, dengan tujuan tetap ingin mempertahankan integritas anatomi dan struktur tulang (Manolagas 1995). Kedua sel tersebut memang berasal dari sel sumsum tulang (*bone marrow*), akan tetapi mempunyai silsilah turunan yang berbeda. Sel progenitor osteoblas berasal dari turunan jalur sel mesensium dari stroma sumsum tulang, sedangkan sel progenitor osteoklas berasal dari turunan hematopoitik (Manolagas 2000)

2.4.2 Sel Osteoklas

Sel osteoklas sebetulnya berasal dari sel hematopoitik pada sumsum tulang yang disebut : *granulocyte-macrophage colony-forming units* (CFU-GM), yang terdiri dari sel monokuler dan sel makrofag (Manolagas 1995). Sel monokuler merupakan sel bakal osteoklas yang disebut progenitor osteoklas. Progenitor osteoklas bergerak dari sumsum tulang ke tulang lainnya melalui sirkulasi atau migrasi langsung. Selanjutnya atas pengaruh *Macrophage Colony-Stimulating factors* (MSCF) menjadi prekursor osteoklas. Prekursor osteoklas ini masih merupakan sel mononukler, dengan pengaruh sitokin (IL-6) mengadakan fusi membentuk sel multinukler osteoklas, yang selanjutnya berfungsi menyerap tulang (Baylink *et al*, 1999) (Gambar 5). Hasil akhir dari sel osteoklas adalah mengalami kematian secara terprogram yang disebut apoptosis. Proses apoptosis ini juga diatur oleh faktor sistemik dan faktor lokal.

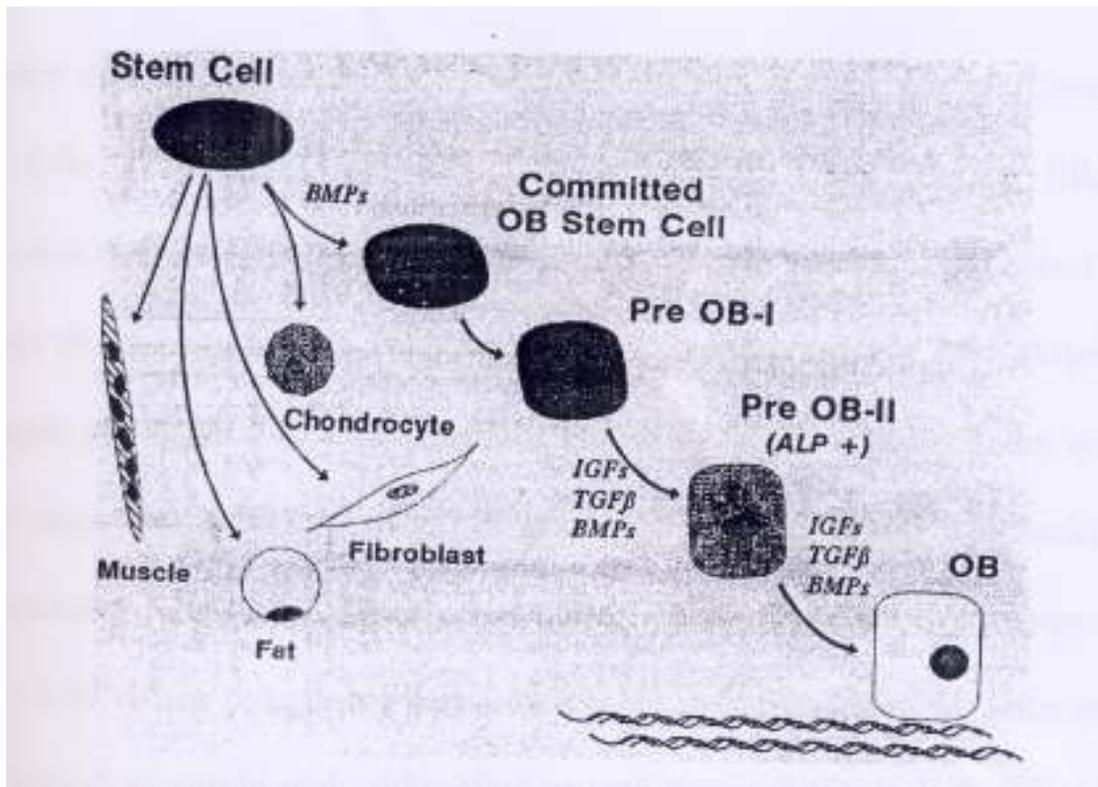


Gambar 4. 5: Proses terbentuknya sel osteoklas dari osteoklas progenitor dan peran dari sitokin (Baylink 1999)

1. Osteoklas Progenitor bergerak ke sumsum tulang, pengaruh MCSF
Menjadi precursor osteoklas dengan pengaruh IL-6 sehingga terbentuk
Osteoklas Quiescen
2. Osteoklas Quiescen diaktivasi oleh PTH dan PGE2 sehingga terjadi
Osteoklas yang aktif
3. Osteoklas bisa terjadi Apoptosis oleh TGF- β (Apoptotic Osteoclast)
(Manolagas 1995)

2.4.3 Sel Osteoblas

Sel osteoblas berasal dari sel mesensim sumsum tulang yang pluripoten dibawah pengaruh faktor pertumbuhan (*growth factors*) dan faktor lain, yang mana sel asal (*stem cell*) selain akan berdiferensiasi menjadi preosteoblas, juga berpotensi menjadi fibroblast, kondrosit, adiposity, atau sel otot (Manolagas 1995). Selanjutnya sel preosteoblas akan berdiferensiasi dan kemudian berakhir dengan sel osteoblas matang (*mature osteoblast*) (Baylink *et al.* 1999) (Gambar 6)



Gambar 4. 6: Proses terbentuknya sel osteoblas dari stem sel atau mesensim dan peran dari sitokin (Baylink 1999)

1. *Stem Cell*
 - 1.1 BMPs menjadi committed osteoblas *stem cell* sampai terbentuk
Osteoblas mengaktifkan IGFs, TGFβ, BMPs
 - 1.2 Chondrocyte memacu osteoblas menjadi matang (Manolagas 1995)
2. *Stem Cell* juga menghasilkan Fibroblas, fat, Muscle sehingga membantu proses terbentuknya osteoblas (Baylink 1999)

Dalam pengaturan diferensiasi, aktivitas dan lama hidup dari sel osteoblas selain peran dari faktor pertumbuhan (*growth factors*), terdapat juga suatu faktor transkripsi sebagai penentu genetik penotipe osteoblas selama diferensiasi dari progenitor mesensim primitif. Sel osteoblas juga memproduksi molekul yang menyerupai sitokin (*cytokine-like molecules*) yang berafinitas tinggi dengan RANK (*receptor activator of nuclear factor-κB*) yang disebut RANK – Ligand (RANK-L) (Ramage 2007)

Sel osteoblas matang akan mensintesis matrik tulang yang berupa protein seperti misalnya : kolagen tipe I, protein non kolagen, dan proteoglikan spesifik tulang. Pada matrik terdapat beberapa protein non kolagen yang mempengaruhi pengaturan matriks, mineralisasi dan mempengaruhi perilaku sel tulang, yaitu osteokalsin, osteonektin, sialoprotein tulang, fosfoprotein tulang dan proteoglikan (Respati 2002). Aktivitas osteoblas dideteksi dengan meningkatnya kadar enzim alkalin fosfatase (ALP) dan osteokalsin. Proses selanjutnya belum jelas apakah sel osteoblas matang akan seluruhnya menjadi sel osteosit atau ada beberapa yang mengalami apoptosis (Baylink *et al.* 1999).

3.Kesimpulan dan Saran

3.1 Kesimpulan

Jaringan yang mengalami kerusakan oleh karena trauma terutama tulang alveolar pada tindakan apekreseksi, memicu makrofag mengekspresi mediator inflamasi sehingga mempengaruhi respons inflamasi baik lokal maupun sistemik. Makrofag sel imun utama pembentuk sitokin lokal di jaringan, dan pada trauma hebat makrofag sering mengalami gangguan respons imun berupa gangguan imunitas seluler. Inflamasi sistemik yang berlangsung secara berlebihan dan berkepanjangan mengakibatkan *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS). Respon tubuh terhadap trauma pasca apekreseksi ini memberikan respons rangsangan serat aferen ke Susunan Saraf Pusat, ini diawali dengan adanya suatu alarm stage misalnya rasa takut, rasa nyeri/sakit, perdarahan sampai syok. Trauma yang timbul akan adanya respons metabolik tubuh terdiri dari fase hipodinamik (Ebb phase), fase hiperdinamik (Flow phase) dan fase penyembuhan (convalescence phase). Fase ini saling mempengaruhi tercapainya remodeling jaringan (tulang alveolar) jika keadaan homeostasis dapat dipertahankan.

Respons Inflamasi terjadi bersifat lokal dan sistemik. Inflamasi merupakan respons tubuh terhadap jejas yang bertujuan menghilangkan agen penyebab dengan tanda : dolor, calor, tumor, rubor dan functio laesa. Respons inflamasi lokal merupakan respons cepat dari tubuh terhadap jejas yang menyediakan dan menghantar mediator pertahanan tubuh, sedangkan respons inflamasi sistemik menghasilkan TNF- α dan IL-1 yang diekspresi oleh makrofag dan molekul proinflamasi. Inflamasi sistemik terjadi karena berhamburnya mediator lokal trauma ke sistemik, inflamasi ini bersifat antiinflamasi yang bertujuan untuk membatasi dan menghalangi penyebaran jaringan yang rusak (injurius agent). Aktivasi makrofag sangat tergantung pada kontak antara reseptor dan ligan. Regenerasi Tulang alveolar, dimana tulang selalu beradaptasi terhadap stress, dan mengalami perbaikan regenerasi secara periodic sehingga tulang yang lama diganti dengan tulang baru. Sel osteoblas dan sel osteoklas menentukan dalam proses homeostasis tulang, mengakibatkan genesis dan apoptosis. Makrofag yang timbul akibat trauma menghasilkan sitokin mengakibatkan inflamasi sangat mempengaruhi proses regenerasi tulang alveolar. Mempercepat terjadinya regenerasi tulang peran *Platelet-Rich Plasma* dalam pertumbuhan osteoblas dapat dibaca pada BAB V

3.2. Saran

Proses regenerasi tulang alveolar pasca apekreseksi serta peran masing-masing interleukin yang diekspresikan oleh makrofag sehingga mencegah terjadinya inflamasi yang berlebihan, dan proses regenerasi tulang alveolar dapat berjalan dengan sempurna.

Daftar Pustaka

- Aller, M.A., Arias, J.L., Nava, M.P., Arias, J. 2004. Post Traumatic Inflammation Is a Complex Response based on the Pathological Expression of the Nervous, Immune, and Endocrine Functional Systems. *Experimental Biology and Medicine*, 229:170-181
- Aryono, P.D. 2004. Tingkat Kerusakan Hipopatologik Hati dan Usus Merupakan Tanda Prognostik Utama pada Trauma dengan Syok Hemoragik, Penelitian pada Hewan percobaan *Capra hircus* (Kambing). (Disertasi). Jakarta: Universitas Indonesia
- Athiyeh, B.S., Al-Amm. 2001. Immunologic Response to injury. In: Feliciano, D.V., Moore, E. E., Mattox, K.L. editors. *Trauma*. Third edition. Connecticut: Apleton Lange. p. 1177-88
- Baue, A.E. 2000. History of MOF and Definition of Organ Failure In: A.E. Baue, E. Faist D.E. Fry, Editors. *Multiple Organ Failure, Pathophysiology, Prevention and Therapy*. New York: Springer p 3-13
- Baumgartner, J and Hutter, J., 2002. *Endodontic Microbiology and Treatment of Infections*. Mosby, India; 375-378
- Baylink, D.J., Jennings, J.C., Mohan, S. 1999. Calcium and Bone Homeostasis and Changes With Aging. In: Hazzard, W, R. et al. editors. *Principles of Geriatric Medicine and Gerontology*. 4th. Ed. New York: International Edition McGraw-Hill. P: 1041-1056
- Boedina Kresno, S. 2001. *Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi keempat. Jakarta. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Bone R.C., Baue, A. E., Donnersmarck, G H., Faist, E. 1999. T-cell Reactivity and its Predictive in Immunosuppression after Burn. *Critical Care Medicine*. 27,1:66-72
- Chandler and Koshy, 2002. The Changing Role of the Apicoectomy Operation in Dentistry, *J.R. Col Surg. Edinb.*, 47 (Home Page of the Surgeon), Available at: <http://www.rcsed.ac.uk/journal/vol147-5/>
- Cone, J.B . 2001. Inflammation , *American Journal of Surgery*, vol., 182. No.6.
- Constantinides, P., 2003. *General Pathobiology*. First edition. Connecticut: Apleton Lange.
- Cook, MC. 2001. Immunology of Trauma . *Trauma* 3: 79-88
- De Bel, E. E., Goris, R.J.A. 2000. Systemic Inflammation After Trauma, Infection, and Cardiopulmonary Bypass: Is Autodestruction a Necessary Evil In: A.E Baue E. Faist, D.E. Fry; editors. *Multiple Organ Failure, Pathophysiology, Prevention and Therapy*, First edition. New York: Springer, p:71-81

- Dolan, S.E., Kanter, J.R., Grinspoon, S., 2006. Longitudinal Analysis of Bone Density in Human Immunodeficiency Virus-Infected Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(8):2938-2945
- Durum, S.K., Mueggue, K. 2006. Cytokines Linking the immune and inflammatory System; IL-1, TNF, IL-6, TNF- α/β and TGF- β . In: ed. Rich.R.R., *Clinical Immunology Principle and Practice*. Toronto: Mosby Company
- Fister J, Gross.B.D., 2000. A Histologic Evaluation of Bone Responses to bur Cutting with and Without water coolant, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 49:105
- Franke, A., Lante, W., Kurig, E., Zoller, L.G., Weinhold, C., Markewitz, A. 2006. Is interferon gamma suppression after Cardiac surgery caused by a decrease interleukin-12 synthesis?. *Ann Thorac Surg.* 82(1):103-109
- Fry, D.E. 2000. Systemic Inflammatory Response and Multiple Organ Dysfunction Syndrome: Biologic Domino Effect. In: A.E. Baue, E. Faist, D.E.Fry; editors *Multiple Organ Failure, Pathophysiology, Prevention and Therapy* First edition. Springer New York 3:23-29
- Giannoudis, P.V., Hildebrand, F., Pape, H.C. 2004. Inflammatory serum markers in Patients with multiple trauma: Can They Predict Outcome?. *JBJS* April
- Goodman, S.B., Goldberg, V., O Keefe, R. 2008. Biology Summary. *J. Am. Acad Ortho Surg* 2008, 16(suppl 1): S76-S78
- Haslet, C. 2009. Granulocyte Apoptosis and its Role in the Resolution and Control of Lung Inflammation, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160 (5), Nov.,: S5-S11
- Hauser CJ. 2006. Regional Macrophage Activation after Injury and the Compartmentalization of Inflammation in Trauma. *New Horiz.* 4(2);235-51
- Hietbrink, F., Koenderman, L., Rijkers, G.T., Leenen, L.P.H. 2006. Trauma: the role of The innate immune system. *World Journal of Emergency Surgery.* 1.15
- Horizon, J.W., Jurosky, K.A. 1991. Wound Healing in the Tissue of Periodontium Following Periradicular Surgery. I. The Incisional wound. *J. Endod* 17:425
- Hotchkiss, R.S., Karl, I.E. 2003. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. *NEJM*, 348(2) January: 138-150
- Kaplowitch, N. 2000. Cell Death the Millennium, Implication for Liver Disease. *Dalam: Clinics In Liver Disease.* 4. (1): 1-18
- Kearns, A.E., Khosla, S., Kostenuik, P.J. 2008. Receptor Activator of Nuclear factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease. *Endocrine Reviews* 29(2): 155-192. Copyright© 2008 by The Endocrine Society
- Kim, P.K., Deutschmann, C.S. 2000. Inflammatory Responses and mediators, *Surgical Clinics of North America*, 80(3): 58-62

- Kim, Y.K., Zhang, H., Villar, J. Slutsky, A.S. 2002. Heat shock Protein. Dalam: Sepsis and Multiple Organ Dysfunction a multidisciplinary approach, eds. Deitch, EA., Vincent, JI., Windsor, A. First edition, WB Saunder Company, London, p154-160
- Kumar, V. Abbas, A.K., Fausto, N. 2005. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Seventh Edition, Elsevier Saunder. Philadelphia
- Mahidara, R., Billiar, T.R. 2000. Apoptosis in sepsis. Critical Care Medicine, Vol,28,No.4 April. Lippincot William & Wilkins. P 105-112
- Manolagas, S.C., 2000. Birth and Death of Bone cells: Basic Regulatory Mechanisms And Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis. Endocrine Reviews Vol: 21, No. 2: p: 115-137. Copyright© 2000 by The Endocrine Society Printed in USA
- Manolagas, S.C., Kousteni, S. & Jilka, R.L., 2002. Sex Steroids and Bone. Copyright©2002 by The Endocrine Society
- Manolagas, S.C., & Jilka, R.L., 2009. Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis The New England Journal of Medicine. Vol. 332. No.5.Feb.2,1995, p; 305-310. Downloaded From www.nejm.org on September 07, 2004

42

- Marriott, I., Gray, D.L., Tranguich, S.L. et al. 2004. Osteoblast Express the Inflammatory Cytokine Interleukin-6 in a Murine Model of Staphylococcus Aureus Osteomyelitis and infected human bone tissue. American Journal of Pathology, Vol. 164. No 4, April 2004
- Marrow and Rubinstein., 2002. Endodontic Surgery dalam Ingle, J (ed): Endodontics
- Mc Donald, N and Torabinejad, M., 2008. Bedah Endodonsia dalam Walton, R dan Torabinejad, M (ed): Prinsip dan Praktik Ilmu Endodonsia, Penerjemah: Lilian Juwono, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta: 53-57
- Morlay, J., Kossygan, K., Giannoudis, P.V. 2002. Damagr Control Orthopaedic: a new Concept in the management of the multiply injured patient. Current Orthopaedic, 16,362-367
- Mosser, D.M., 2003. The Many Faces of Macrophage Activation, Journal of Leukocyte Biology, Vol. 73, 209-212
- Munford, R.S, Pugin, J. 2001. Normal Response to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive, Am.J.Respir. Crit. Care med., Volume 163, number 2: 316-321
- Nomikos, I.N., Vamvakopolous, N.C., 2001. Correlatng Functional staging to effective Treatment of acut surgical illness, Ammerican Journal of Surgery, 182 (3)
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., Moldawaer, L.L., 2000. Cytokine Signaling-regulation of the immune respons in Normal and critically III states, Critical Care Medicine 28(4): 3-10

- Ogata, M., Okamoto, K., Kohriyama, K., Kawasaki, T., Itoh, H., Shigematsu, A. 2009. Role Of Interleukin-10 on Hyperresponsiveness of Endotoxin During Surgery. *Critical Care Medicine*, 28.(9), September, 3166-3170
- Ohashi, K., Burkart, V., Flohe, S., Kolb, H. 2000. Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex, *The Journal of Immunology*, 164: 558-561
- Pacifici, R., 2008. Editorial: Cytokines, Estrogen, and Postmenopausal Osteoporosis The Second Decade. *Endocrinology* vol. 139, No. 6.p: 2656-2661.
- Pape, H.C. et al., 2001. Major Secondary Surgery in Blunt Trauma Patients and Perioperative Cytokine Liberation; Determination of Clinical Rebound of Biochemical Methods, *J. Trauma*, June 50 (6): 283
- Pegram, M., Mitsuyasu, R.T., 2009. Immune Modulation Interferons and Interleukin In: Rich, R.R. editor, *Clinical Immunology Principle and Practice*. Mosby Company. Toronto, pp 2030-2053
- Pretus, H.A., Browder, I.W., Lucore, P., McNamee, R.B., Jones, E.I., Williams, D.L. 2009. Macrophage activation decrease macrophage prostaglandin E2 release In experimental trauma. *J. Trauma*. 29(8): 1152-1156
- Purnomo, S. 2003. Stress Protein and SIRS Sepsis the possible roles of Heat Shock Protein (HSP) in the development of Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), Naskah lengkap PIT Perhimpunan Patobiologi Indonesia, Surabaya 24-26 Januari, pp 5-10
- Putra S.T. 2000. Paradigma dan Perkembangan Patobiologi. Kumpulan Makalah Patobiologi Pertemuan Nasional Patobiologi Indonesia, Surabaya
- Raeburn, C.D., Sheppard, F., Barsness, K.A., Arya, J., Harken, A.H. 2002. Cytokines for Surgeons. *American Journal of Surgery*, Vol 183. No.3 March:268-273
- Raman, R., Pape, H.C., Giannoudis, P.V. 2003. Cytokine in Orthopaedic Practice: a review *Current Orthopaedics*, 17, pp:378-385
- Ramege, S.C., Urban, N.H., Jiranek, W.A., Miati, A., Beckman, M.J. 2007. Expression of RANK-L in Osteolytic Membranes: Association with Fibroblastic Cell Markers. *J. Bone Joint Surg Am*. 2007; 89:841-8
- Respati, S.D. 2002. Pengaruh Gelombang Ultrasonik Intensitas rendah Terhadap Percepatan Fungsionalisasi Osteoblas. (Disertasi). Surabaya: Program Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Rosenberg, A.D., Burnstein, R.L., 1999. Perioperative Anesthetic Management of Orthopedic Injuries *Anesthesiology Clinics of North America*, 17(1): 171-180
- Salfer, R.B., 1999. *Textbook of Disorders and Injuries of the Musculoskeletal System* Third Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p: 7-29

- Seo,S.B.,Jeong, HJ., et al, 2003. Inhibitory effect of high molecular weight water Soluble Nano Chitosan on hypoxia-induced inflammatory cytokine production. Bio Pharm. Bull 26:175-183
- Shapiro, L. & Gelfand. J.a. 2005. Cytokines. In: Ayres, S.M., Grenvik, A., Holbrook,P.R.,Shoemaker, W.C.,Editors. Text Book of Critical Care, Third edition, Philadelphia: WB Saunders Company, p. 154-160
- Stanford Field, 2003. Building Strong Bones. Spring 2003. Is available from:
<http://www.smartlifeforum.org/toolateschmart/building-strong-bones.htm>
- Theze, J. 1998. The Cytokine Network and Immun Functions , First Edition, New York:Oxford University Press
- Tzioupis, CC., Katsoulis S., Manidakis, N., Giannoudis, PV. 2005. The Immuno-Inflammatory Response to Trauma. Trauma 7: 171-183
- Wang, H., Tracy, K.J., 2000. Tumor Necrosis Factor, Interleukin-6, Macrophage Migration Inhibition Factor, and Macrophage Inflammatory Protein-1 in Principle and Clinical Correlates, Third Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p: 471-482

BAB V

Pengaruh *Platelet-Rich Plasma* Terhadap Kultur Osteoblas Yang Mengandung *Nano Chitosan*

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Pemakaian biomaterial sebagai bahan pengganti tulang sangat berkembang sebagai konsekuensi perkembangan bedah rekonstruktif, khususnya di bidang Bedah Ortopedi maupun Bedah Maksilofasial yang dalam banyak kasus memerlukan penambahan kuantitas tulang. Banyaknya kasus seperti pemasangan implan gigi, fraktur tulang wajah, apekreseksi, resorpsi tulang dan sebagainya membuat banyaknya penggunaan bahan-bahan pengganti tulang disertai dengan inovasi *tissue engineering*/rekayasa jaringan demi mencapai regenerasi jaringan tulang (Habibovic 2007)

Tulang merupakan jaringan yang memiliki aktivitas metabolik tinggi dan didukung oleh massa tulang (*bone cells*), yaitu osteoblas, osteoklas, dan osteosit. Massa tulang tersebut berasal dari sel induk berbeda, proliferasi dan diferensiasinya dipengaruhi oleh sinyal yang berbeda. Hubungan antara sel-sel tersebut sangat erat, karena setiap sel memiliki peran dalam mempertahankan kesehatan tulang (Robling *at al.* 2006).

Rekayasa jaringan menurut Lahger & Vacanti (1993), adalah suatu bidang interdisiplin yang mengaplikasikan prinsip rekayasa dalam ilmu pengetahuan biologi (*biolife science*) menuju pengembangan material biologis pengganti yang akan berfungsi untuk memperbaiki, memelihara atau meningkatkan fungsi jaringan. Pada rekayasa jaringan khusus yang mengenai regenerasi tulang, dua strategi utama dapat diaplikasikan untuk menghasilkan jaringan yang baru yakni: a). Pembentukan tulang dengan menggunakan *bone-inducing substances*, b). Konstruksi implan hibrid yang terdiri atas sel osteogenik jaringan dan *scaffolds*/ matriks biomaterial (Lynch *at al.* 1999)

Elemen dasar yang dibutuhkan dalam rekayasa jaringan tersebut antara lain adalah ketersediaan sel osteogenik, *scaffolds* (matriks) serta molekul stimulan (*growth factors*). *Scaffolds* (matriks) memegang peranan penting dalam pertumbuhan sel, baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo*. *Scaffolds* dapat mempercepat pembentukan struktur jaringan, dan kelak akan digantikan oleh matriks ekstraseluler yang baru untuk menjadi jaringan yang utuh. Struktur *scaffolds* yang porous, tiga dimensi dan memiliki ruangan yang *inter-penetrable*, penting untuk pertumbuhan jaringan alamiah yang utuh. Selain itu, *scaffolds* juga diperlukan untuk mendapatkan dukungan fisik dan bertindak sebagai substrat yang mengarahkan pertumbuhan, adhesi dan diferensiasi sel. Interaksi antara sel dan matriks ekstraseluler mempengaruhi pertumbuhan dan regenerasi osteoblas (Kim 2008).

Bahan pengganti tulang terbagi menjadi dua bagian, yaitu material natural dan sintetik. Bahan pengganti tulang natural yang terbaik, adalah tulang autogenous yang sering disebut sebagai *gold standard* untuk perbaikan dan regenerasi tulang, karena tidak bersifat imunogenik tapi bersifat

osteogenik, osteoinduktif dan osteokonduktif. Kekurangan penggunaan tulang autogenous adalah minimnya area donor (terutama di regio *intra oral*), menimbulkan morbiditas pada pasien serta memerlukan tambahan biaya. Bahan pengganti tulang sintetik terdiri atas empat golongan yakni implan metalik/logam, keramik, polimer serta komposit. Namun, dibandingkan dengan graft tulang natural (autogenous), sifat biologik bahan pengganti tulang sintetik, yaitu sebagai inisiator dan pendukung pertumbuhan tulang lebih rendah(Lynch *at al.*1999).

Saat ini sejumlah penelitian telah dilakukan terhadap biomaterial yang dapat digunakan untuk mengatasi kerusakan maupun kehilangan tulang, salah satunya adalah *Nano Chitosan*. *Nano Chitosan*, suatu *aminopolisakarida (poly-1,4-D-glukosamine)* yang berasal dari produk *deasilated alkaline chitin* (yaitu struktur primer polimer dari *ekstraskeleton arthropoda*) merupakan bahan pengganti tulang aloplastik yang natural. Kemiripan struktur *Nano Chitosan* dengan *glucosamine* pada matriks ekstra seluler, menyebabkan efek biokompatibilitasnya terhadap jaringan menjadi lebih baik. *Nano Chitosan* bersifat *biodegradabel, biokompatibel*, tidak toksik, inert secara fisiologis, menstimuli proliferasi sel, meningkatkan penyembuhan luka serta larut dalam larutan asam (pH<6). *Nano Chitosan* dapat difabrikasi menjadi beberapa bentuk dan banyak digunakan dalam bidang biomedik. Kekurangan *Nano Chitosan* adalah memiliki sifat fisika yang buruk yaitu menjadi rapuh pada keadaan kering. Namun kekurangannya ini dapat dikompensasikan melalui penggabungan *Nano Chitosan* dengan material lain, seperti glatin, tricalcium phosphate, hidroksiapatit maupun kolagen untuk membentuk *sponges Nano Chitosan-material lain* (sebagai komposit). *Nano Chitosan* sebagai *scaffolds* dapat berfungsi sebagai substansi bioaktif yang mempengaruhi pertumbuhan sel. Arpornmaeklon (2007) melakukan penelitian terhadap pengaruh penggunaan *Nano Chitosan-collagen sponges* terhadap pematangan osteoblas tikus. Hasilnya adalah sponges komposit tersebut dapat meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi serta maturasi sel osteoblas(Mukherjee *at al.*2003).

Nano Chitosan dibuat dari kulit udang atau kerang yang merupakan genus Arthropoda atau Moluska serta banyak dijumpai di Indonesia. Beberapa instansi seperti Badan Tenaga Atom Nasional, Departemen Kelautan dan Perikanan, maupun Institut Pertanian Bogor (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan) telah banyak memproduksi *Nano Chitosan* dan telah digunakan sebagai bahan dasar kosmetika, pupuk, serta di bidang kedokteran sebagai penyembuh luka maupun *drug delivery system* (Kim 2008)

Beberapa peneliti berusaha untuk menambah kecepatan dan meningkatkan mekanisme penyembuhan luka dengan menambah faktor pertumbuhan individual, seperti *platelet-rich plasma* (PRP). Platelet terlibat dalam penyembuhan luka melalui pembentukan bekuan darah serta pelepasan berbagai faktor pertumbuhan untuk memulai dan mendukung penyembuhan luka. Penggunaan PRP adalah adanya aktivasi sejumlah besar platelet pada saat *graft* diletakkan dalam defek akan melepaskan sejumlah faktor pertumbuhan, meliputi *platelet-derived growth factor* (PDGF), *transforming growth factor* (TGF- β), *insulin-like growth factor I* (IGF-I), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan *epidermal growth factor* (EGF). Peningkatan konsentrasi faktor pertumbuhan

memiliki efek positif pada pembentukan prekursor osteoblas (ob) dan osteoklas (oc), diferensiasi dan aktivasi osteoblas dan osteoklas serta pembentukan dan aktivasi sel endotel sehingga memperkuat angiogenesis. Marx,dkk (1998) telah menyimpulkan bahwa PRP mampu meningkatkan pembentukan tulang dalam *graft* serta meningkatkan kepadatan tulang(Gerard *at al.*2007). Seperti telah diketahui berbagai molekul protein yang dihasilkan oleh osteoblas seperti osteokalsin,osteopontin, sialoprotein, kolagen dan fosfatase alkali berperan pada pembentukan atau regenerasi tulang Protein-protein spesifik ini dapat disebut sebagai biomarker untuk pembentukan tulang, sehingga dapat digunakan untuk mengamati proses osteogenesis dengan mudah(Zhu 2006)

1.2 Rumusan Masalah

Apakah dengan penambahan PRP pada kultur osteoblas yang mengandung Nano Chitosan akan meningkatkan aktivitas osteoblas

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui lebih dalam peran atau pengaruh platelet-rich plasma pada kultur osteoblas yang mengandung *Nano Chitosan*

1.4 Manfaat

Peran PRP pada *Nano Chitosan* dalam kultur osteoblas sebagai stimulator terhadap aktivitas osteoblas sehingga dapat mempercepat regenerasi tulang

2. Tinjauan Pustaka

2.1 Rekayasa Jaringan (*Tissue Engeneering*)

Rekayasa jaringan menurut Langer & Vacanti (1993), adalah suatu bidang interdesiplin yang mengaplikasikan prinsip rekayasa dalam ilmu pengetahuan biologi (*biolife science*) untuk pengembangan material biologis yang akan memperbaiki, memelihara atau meningkatkan fungsi jaringan. Secara umum teknologi rekayasa jaringan mengupayakan fabrikasi bahan pengganti jaringan pada tubuh manusia (Habibovic 2007)

Dalam bidang kedokteran gigi khususnya bidang bedah Maksilofasial penggunaan berbagai graft tulang sebagai bahan pengganti untuk augmentasi maupun perbaikan defek tulang, dewasa ini mutlak diperlukan. Banyaknya kasus kista dan granuloma yang memerlukan penanganan apekreseksi dan pemasangan implantasi gigi pada tulang rahang yang tidak adekuat, memerlukan elevasi dasar sinus maksilaris, augmentasi vertical linger alveolar, serta kasus-kasus fraktur tulang wajah misalnya karena suatu tumor yang menyebabkan terjadinya defek tulang yang lebar, yang memerlukan tindakan rekontruksi khusus dan pada akhirnya diperlukan pemakaian suatu bahan pengganti tulang. Demikian pula , peningkatan kualitas hidup manusia yang akan berdampak pula pada peningkatan harapan

hidup, tentu akan mempengaruhi tingginya permintaan terhadap bahan pengganti jaringan yang mengalami kerusakan (Lynch *et al.*1999)

Kemajuan ilmu pengetahuan telah memungkinkan inovasi graft atau bahan pengganti tulang yang dapat memenuhi kebutuhan material dalam bidang rekonstruksi jaringan, dengan mengambil sifat-sifat tulang autogenous yang baik, serta meminimalisasikan berbagai faktor negatif penggunaan tulang autogenous, allograft maupun xenograft. Oleh sebab itu, rekayasa jaringan dalam bidang graft tulang menggunakan bahan aloplastik dikembangkan lebih jauh (Habibovic 2007)

Karena rekayasa jaringan tulang harus memiliki rekapitulasi struktur dan fungsi jaringan asli yang akan digantikan, maka *scaffolds* yang digunakan harus memenuhi syarat sebagai berikut: a) memiliki stabilitas mekanik, bentuk yang tepat, distribusi pori-pori yang terukur, b) materialnya harus dapat membentuk lingkungan yang tepat, agar sel-sel tulang baru dapat bermigrasi dan mendeposit matriks tulang pada carrier templet, c) harus memiliki sifat osteokonduktif maupun osteoinduktif, d) biokompatibel dan biodegradable terhadap lingkungannya, e) non toksik dan non imunogenik. Selain itu, diperlukan dua strategi utama untuk menghasilkan jaringan baru yang menggunakan teknologi rekayasa jaringan, yakni a) pembentukan tulang melalui stimulasi kimia dengan menggunakan *bone-inducing substances*, b) konstruksi *implant hybrid* yang terdiri atas sel osteogenik jaringan dan *scaffolds biomaterial* (Silva 2007)

Elemen dasar yang dibutuhkan dalam rekayasa jaringan tulang adalah ketersediaan sel osteokompeten, *scaffolds* (matriks), dan molekul stimulan (*growth factors*). Sel berfungsi untuk mensintesis matriks jaringan baru pada jaringan yang rusak. Peranan molekul stimulan dalam hal ini adalah sebagai *growth factors* yaitu meningkatkan potensi sel dalam proses regenerasi jaringan (Lynch *et al.*1999). *Scaffolds* memegang peranan penting dalam pertumbuhan sel baik secara *in vitro* maupun secara *in vivo*. Matriks ini menyediakan bentuk porous, tiga dimensi serta inter penetrable sehingga terbentuk ruang yang diperlukan untuk pertumbuhan sel yakni kegiatan adhesi proliferasi dan diferensiasi sel. *Scaffolds* juga akan mempercepat pembentukan struktur yang kelak akan digantikan oleh matriks ekstraseluler baru untuk membentuk jaringan natural yang utuh (Peng *et al.* 2006). Selain itu, dalam mekanisme regenerasi jaringan, *scaffolds* tidak hanya berperan sebagai *framework* sementara, namun juga dibutuhkan untuk mengisi ruang dan mengontrol pelepasan *growth factors* oleh sel-sel yang osteokompeten (Kim 2008).

Pengembangan bahan pengganti tulang sintetik merupakan tantangan dalam bidang rekayasa jaringan tulang, yang mampu memiliki sifat "*intelligent*" yaitu bahan pengganti tersebut harus dapat mengarahkan lingkungan *in vivo* untuk membentuk tulang baru. Setidaknya, bahan tersebut harus memiliki kemiripan sifat biologis dengan tulang autologous namun meniadakan kerugian yang ditimbulkan. Kelompok bahan pengganti tulang yang bersifat "*intelligent*" biasanya berasal dari material yang bersifat osteoinduktif (Habibovic 2007)

2.2 Tulang

Tulang merupakan jaringan yang memiliki aktivitas metabolik tinggi dan didukung oleh massa tulang, yaitu osteoblas, osteoklas dan osteosit. Massa tulang tersebut berasal dari sel induk berbeda, serta proliferasi dan diferensiasinya dipengaruhi oleh sinyal yang berbeda (Robling 2006). Meskipun demikian, hubungan antara massa tulang tersebut sangat erat, karena setiap sel memiliki peran dalam mempertahankan kesehatan tulang.

Pada manusia, massa tulang mencapai tingkat maksimum kira-kira 10 tahun setelah akhir pertumbuhan linear. Kepadatan ini akan menetap karena tulang secara terus menerus akan terdeposisi dan diabsorpsi melalui tulang rangka, sampai kira-kira pada dekade ke-empat saat massa tulang kehilangan unsur mineral yang terjadi selama proses remodeling. Mekanisme biologik ini akan dialami pula oleh tulang tengkorak maupun tulang rahang (Garg 2004)

2.3 Fisiologi Tulang

Tulang merupakan jaringan hidup yang memiliki dua fungsi primer yaitu pendukung struktural dan tempat berlangsungnya metabolisme kalsium. Tulang manusia dewasa berada pada keadaan dinamis, proses perusakan dan pembentukan kembali dilakukan melalui koordinasi kerja antara osteoklas dan osteoblas (Silva 2007). Sistem skeletal manusia meliputi fungsi sebagai berikut a) merupakan reservoir kalsium tubuh (mengandung 99% kalsium tubuh), b) regulasi homeostasisnya dipengaruhi oleh *system endokrin*, c) memiliki fungsi struktural sebagai jaringan termineralisasi, d) merupakan *material anisotropic* (sifat mekanisnya bervariasi tergantung arah), dan e) memiliki tingkat remodeling yang tinggi pada dewasa muda (Garg 2004).

Jaringan tulang terdiri atas komponen organik sebanyak 35% dari berat kering tulang yang meliputi kolagen tipe I (90%) yang dikenal sebagai matriks ekstraseluler, sedangkan sisanya merupakan komponen non-kolagen. Komponen non-kolagen itu sendiri terdiri atas kelompok *proteoglycan* (Glycosaminoglycans=GAGs) serta kelompok *glycoprotein* (osteonektin, osteopontin, Fibronektin, *bone sialoprotein*). Komponen inorganik tulang sering juga disebut kompartemen mineral, meliputi sekitar 60-70% dari berat kering tulang (Lynch *et al.*1999). Kristal mineral tulang dapat diklasifikasikan sebagai apatit dari pada hidroksiapatit, komponen tulang yang terakhir adalah air. Mineral-mineral dalam jaringan tulang terdapat secara primer sebagai hidroksiapatit disamping sejumlah kecil protein non-kolagen yang melekat pada matriks mineralnya, termasuk didalamnya kelompok *bone morphogenetic proteins* (BMPs) (Garg 2004)

2.4 Massa Tulang

Tulang yang sempurna terdapat tiga tipe sel yang terlibat dalam proses metabolisme dan fisiologi tulang, yakni osteoblas, osteosit, dan osteoklas. Osteoblas, berasal dari sel mesenkim, yang mendeposit matriks tulang selama proses pembentukan jaringan, terdapat pada dua daerah yaitu endosteal dan periosteal. Osteoblas periosteal terdapat pada permukaan luar tulang di bawah

periosteum, sedangkan osteoblas endosteal terdapat pada saluran vaskular di dalam tulang (Robling 2006)

Osteoblas yang matur akan mensekresikan matriks tulang, yang terdiri atas kolagen tipe I, protein non-kolagen dan proteoglikan. Beberapa protein non-kolagen yang disintesis oleh osteoblas, antara lain fosfatase alkali, osteokalsin, osteopontin dan faktor pertumbuhan. Osteoblas yang mengekspresikan sejumlah molekul sinyal yang bekerja secara autokrin maupun parakrin. Molekul yang bekerja secara autokrin mengatur aktivitas osteoblas adalah *transforming growth factor β* (TGF- β), *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), dan *prostaglandin* (PGE). Sedangkan molekul seperti hormon paratiroid, PGE, *osteoprotegerin* (OPG), dan *receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$ ligand* (RANKL) bekerja secara parakrin mempengaruhi pembentukan dan aktivitas osteoklas. Osteoblas kemudian akan berdiferensiasi menjadi osteosit setelah matriks tulang matur dan termineralisasi (Sommerfeldt *et al.* 2001).

Jika osteoblas telah berhasil membentuk matriks tulang dan bersatu dengannya, maka sel ini akan berubah menjadi osteosit. Osteosit sendiri merupakan sel yang aktif namun mereka dibutuhkan untuk mempertahankan viabilitas tulang dan homeostasis. Osteosit merupakan sel tulang yang berlimpah jumlahnya dan berkomunikasi dengan sel-sel pada permukaan tulang melalui suatu proses dalam kanalikuli. Osteosit mengekspresikan *Transforming Growth Factors- β* (TGF- β) serta faktor pertumbuhan lainnya. Osteoklas yang merupakan sel berinti banyak, memiliki diameter 100 μm dengan 10-12 nukleus, juga berperan dalam proses resorpsi tulang dan aktivitasnya dipengaruhi oleh hormon *parathyroid*. Osteoklas akan berfusi dengan monosit pada *Howship lacunae* sepanjang permukaan tulang yang bermineralisasi (Garg 2004)

2.4.1 Osteoblas

Osteoblas merupakan sel pembentuk tulang, berasal dari stem sel mesenkim. Proses terbentuknya osteoblas dari *undifferentiated mesenchymal cells* terjadi pada dua mekanisme, yang satu sebagai sel osteoprogenitor sedangkan yang lain sebagai sel osteoprogenitor yang *inducible*. Osteoblas yang matang akan bertanggung jawab terhadap pembentukan protein matriks tulang. Deposisi tulang akan terus berlangsung dalam suatu daerah pertumbuhan aktif selama beberapa bulan, dengan cara osteoblas akan menumpuk tulang baru secara berlapis-lapis sehingga membentuk lingkaran konsentris pada permukaan dalam kavitas tempat mereka bekerja. Selama proses osteogenesis, osteoblas akan mensekresi sejumlah faktor pertumbuhan seperti *Platelet Derived Growth Factors* (PDGFs), *Transforming Growth Factors- β* (TGF- β), dan *Insulin Growth Factors* (IGFs) yang disimpan dalam matriks tulang (Bai *et al.* 2004)

Eksresi faktor transkripsi *runt-related transcription factor-2* (Runx-2), *distal-less homeobox-5* (Dlx-5), dan *msh homeobox homologue-2* (Msx-2) diperlukan untuk mendorong sel prekursor menjadi turunan osteoblas. Diferensiasi lebih lanjut dari preosteoblas menjadi osteoblas yang matur

memerlukan ekspresi Runx-2, osterix (Osx), dan sejumlah komponen jalur sinyal *winglessgene homologues* (Wnt) (Robling 2006)

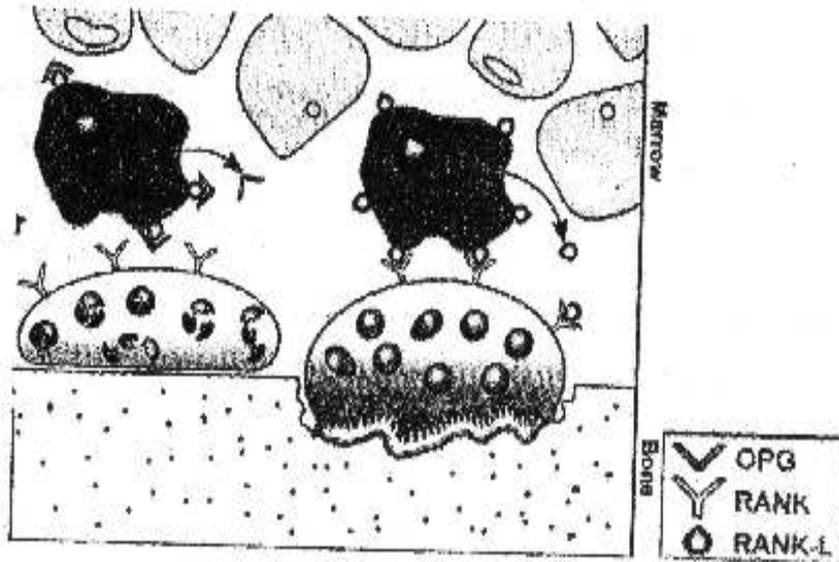
2.4.2 Osteoklas

Sel yang berperan dalam proses resorpsi tulang adalah osteoklas. Osteoklas berasal dari stem sel hematopoietik yang terutama terdapat pada sumsum tulang dan limpa. Proses pembentukan osteoklas (osteoklastogenesis) dimulai saat stem sel hematopoietik distimulasi untuk membentuk sel mononuklear, kemudian sel tersebut akan berdiferensiasi menjadi preosteoklas, yang selanjutnya dilepaskan ke aliran darah. Prekursor osteoklas yang terdapat pada sirkulasi darah akan meninggalkan pembuluh darah perifer menuju daerah tulang yang akan diresorpsi, dan berfusi satu sama lain membentuk osteoklas imatur (Robling 2006).

Diferensiasi lebih lanjut dari osteoklas imatur untuk menjadi matur memerlukan adanya molekul RANKL. Protein dengan berat molekul 35 kDa ini diekspresikan antaranya oleh sel stroma osteoblas, limfosit T, dan sel dendritik (Sommerfeldt *et al.*2001). RANKL akan berikatan dengan reseptornya, yaitu *receptor activator of nuclear factor κ B* (RANK) yang terdapat pada membran sel prekursor osteoklas. Ikatan antara RANK dengan ligannya akan menyebabkan terjadi transduksi sinyal pada prekursor osteoklas, berupa pengikatan protein adaptor *tumor necrosis factor associated factor-6* (TRAF-6) sebagai *second messenger*. Hal tersebut akan mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor κ B* yang akan bertranslokasi ke nukleus. *Nuclear factor κ B* akan meningkatkan ekspresi C-fos oleh nukleus. C-fos akan berinteraksi dengan *nuclear factor of activated T cells, calcineurin dependent 1* (NFAT-c1) yang kemudian akan merangsang transkripsi dari gen yang berperan dalam osteoklastogenesis, sehingga prekursor osteoklas dapat berdiferensiasi menjadi osteoklas matang (Boyce *et al.*2007)

Setelah osteoklas menjadi matang, aktivitas resorpsi dan survival dari sel tersebut tetap diatur oleh RANKL. Sedikitnya ada tujuh jalur sinyal yang diaktivasi oleh protein kinase dengan mediasi RANK sebagai sinyal. Tujuh jalur sinyal itu adalah empat sinyal yang langsung memediasi osteoklastogenesis (inhibitor NF- κ B kinase/NF- κ B, c-Jun amino terminal kinase [JNK]/aktivator protein-1[AP-1], c-myc dan calcineurin/NFAT-c1) dan 3 sinyal yang memediasi aktivasi osteoklas (src, MKK6/p38/*microphthalmia-associated transcription factor* [MTIF]) dan survival osteoklas (src dan extracellular signal-regulated kinase [ERK]) (Lee *et al.*2005).

Proses osteoklastogenesis dapat dihambat oleh adanya molekul osteoprotegerin (OPG) yang diekspresikan oleh osteoblas. OPG dapat berikatan dengan RANKL, sehingga RANKL tidak dapat berikatan dengan RANK pada prekursor osteoklas. Akibatnya prekursor osteoklas gagal berdiferensiasi menjadi osteoklas yang matur dan akan diinduksi untuk mengalami kematian sel yang terprogram (*apoptosis*). Interaksi antara RANKL dengan OPG dan RANK terlihat pada gambar 1



Gambar 5. 1: Proses osteoklastogenesis dan molekul yang berperan (Lee *et al.* 2005]

1. Osteoprotegerin (OPG) dapat berikatan langsung dengan RANKL dimana OPG diekspresi oleh osteoblas (Sommerfeldt *et al.* 2001)
2. RANKL dengan RANK tidak dapat berikatan pada prekursor osteoklas sehingga menjadi osteoklas yang matur dan mengalami apoptosis (Lee *et al.* 2005)

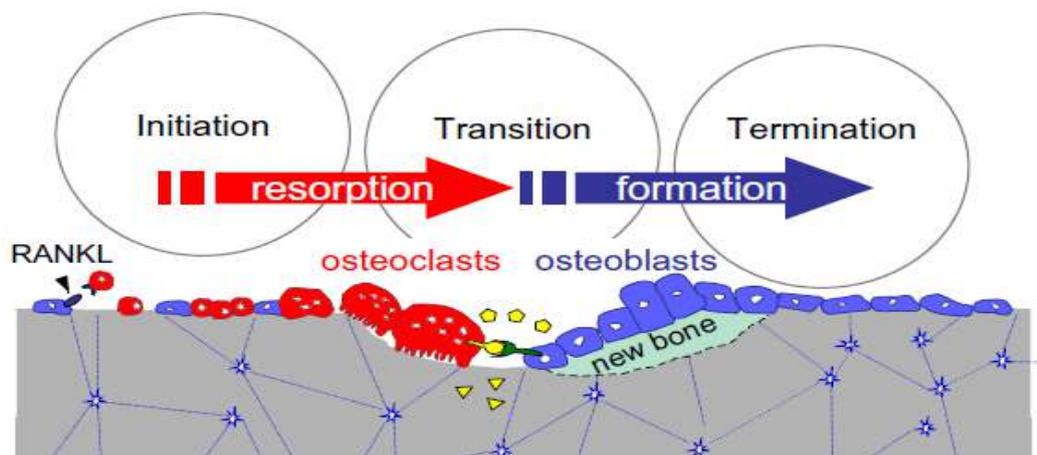
2.4.3 Osteokalsin

Berbagai molekul protein yang diproduksi oleh osteoblas seperti osteokalsin, osteopontin, dan kolagen berperan pada pembentuk atau regenerasi tulang. Alkali Fosfatase memiliki peranan penting dalam proses kalsifikasi tulang, karena adanya peningkatan aktivitas osteoblas setelah pemberian enzim tersebut, hal itu juga merupakan indikator tahap diferensiasi osteoblas tingkat awal (Arpornmaeklong 2007). Protein non-kolagen lain yang terdapat dalam tulang adalah osteokalsin. Protein ini disekresi oleh osteoblas dan diduga berperan dalam mineralisasi serta homeostasis ion kalsium. Osteokalsin juga merupakan parameter untuk pengukuran tahap diferensiasi osteoblas disamping alkali fosfatase (Peng Lin *et al.* 2006). Disamping itu, osteokalsin juga berfungsi sebagai regulator negatif pada pembentukan tulang, namun mekanismenya masih belum diketahui secara jelas. Tingginya level kadar aktivitas alkali fosfatase dan osteokalsin menunjukkan peningkatan sifat osteokonduktif material. Alkali fosfatase maupun osteokalsin yang dihasilkan oleh osteoblas, seringkali disebut sebagai *biochemical marker* atau biomarker untuk proses pembentukan tulang (Varghese 2009)

2.5 Hubungan Osteoblas dan Osteoklas

Kumpulan sel pada osteoblas dan osteoklas terdapat dalam suatu garis yang berhubungan dengan sel satu dengan sel lainnya, faktor parakrin diffusible dan interaksi sel tulang matriks. Hubungan osteoblas dan osteoklas di dalam *basic multicellular unit* (BMU) terjadi pada tahap-tahap

inisiasi, transisi, dan fase penghentian remodeling tulang. Pada tahap inisiasi, prekursor hematopoietik di gabung ke *basic multicellular unit*. Prekursor ini meneruskan reseptor sel permukaan termasuk c-MFS, RANK dan molekul *costimulatory*, seperti *Osteoclast Associated Receptor* (OSCAR), dan berdiferensiasi menjadi osteoklas mengikiti sel-sel lainnya berhubungan dengan osteoblas, yang meneruskan pada ligan. Pada tahap transisi dari resorpsi tulang untuk pembentukan dimediasi oleh faktor *coupling* ke dalam osteoklas yang diturunkan, langsung diferensiasi dan diaktivasi oleh osteoblas dalam *lacunae*, kemudian diresorpsi untuk mengisi tulang yang baru. *Bidirectional sinyal* yang dihasilkan oleh interaksi antara ephrinB2 pada osteoklas dan EphB4 pada prekursor osteoblas memfasilitasi transisi. Interaksi terjadi antara osteoklas dan sel-sel lapisan dalam *Bone Remodeling Compartment* (BRC). Tiga fase remodeling tulang ditunjukkan pada gambar 2 yaitu terlihat sel turunan osteoklas (merah), osteoblas (biru), osteocit (berbentuk bintang), canaliculi pada garis biru dan tulang (abu-abu). Fase inisiasi dimulai dengan penarikan tanda awal hematopietik, sedangkan diferensiasi osteoklas diinduksi oleh sel turunan osteoblas menunjukkan ligand osteoklastogenik seperti RANKL, osteoklas menjadi multinukleasi dan menyerap tulang. Transisi ditandai perubahan dari penyerapan tulang hingga formasi melalui faktor penyatuan, kemungkinan termasuk faktor yang dapat berpencah (pentagon kuning), molekul berikatan pada memberan (lolipop kuning), dan faktor yang melekat pada matriks tulang (segitiga kuning). Fase terminasi menegaskan bahwa lakuna yang tertutup diisi kembali karena aktivitas pembentukan tulang dari osteoblas dan osteoklas merata untuk membentuk lapisan sel diatas tulang baru (Koichi 2008)



Gambar 5. 2: Tiga fase remodeling tulang (Koichi 2008):

1. Fase Inisiasi yaitu dimulai dengan penarikan tanda awal hematopietik
2. Fase Transisi yaitu ditandai dengan perubahan dari penyerapan tulang hingga formasi melalui faktor penyatuan
3. Fase Terminasi yaitu pembentukan tulang dari osteoblas yang merata untuk membentuk lapisan sel diatas tulang baru

Langkah pertama dalam remodeling tidak mungkin resorpsi tulang. Osteoklas pertama harus dibentuk dan berapa banyak tulang harus diresorpsi. Instruksi-instruksi ini mungkin timbul dari sinyal yang dihasilkan oleh deformasi atau kematian *osteocytes*, yang menentukan lokasi dan jumlah resorpsi yang dibutuhkan. Sebagian lapisan sel-sel membentuk kanopi dari ruangan pada tulang yang mengalami remodeling. Dalam lingkungan mikro ini, faktor lokal, termasuk faktor pertumbuhan pembuluh darah, penyediaan pasokan prekursor osteoklas vaskuler, makrofag, dan sel T aktif yang berpartisipasi dengan precursor osteoblas dalam proses osteoklastogenesis. Prekursor osteoblas selanjutnya menjadi osteoblas dewasa yang membentuk osteoid matang. Pembentukan tulang juga dapat digabungkan dengan resorpsi tulang oleh produk dari matriks yang diresorpsi osteoklas sendiri. Dengan demikian osteocit yang terlibat dalam memulai remodeling dan regulasi lokal adalah *bidirectional*, dengan prekursor osteoblas memimpin proses osteoklastogenesis dan produk dari osteoklas dan dari matrik diresorpsi memodulasi pembentukan tulang (Dimitrios 2006)

2.6 Kultur Sel Tulang

Salah satu upaya untuk mempelajari biologi tulang adalah dengan kultur sel. Kultur sel adalah proses pengembangbiakan sel dibawah kondisi terkontrol pada lingkungan buatan yang kondusif untuk pertumbuhannya (Belezikian *et al.* 1994). Keunggulan penggunaan kultur sel adalah lingkungan hidup sel dapat diatur, karakteristik sel dapat digambarkan dengan jelas, dan mudah diukur, namun kerugiannya adalah mudah terkontaminasi dan relatif mahal (Freshney 2000).

Kultur sel tulang dapat berupa kultur primer dan kultur skunder. Pada kultur primer, sel didapat dari organ atau jaringan asalnya, kemudian dipelihara pada lingkungan kultur yang sesuai agar dapat melekat, membelah, dan tumbuh. Untuk sel tulang, jaringan yang dapat diambil adalah jaringan sumsum tulang. Kultur sel skunder (*cell line*) adalah kultur sel yang diperoleh dari kultur sel primer dan telah dipisahkan secara enzimatis ataupun secara mekanis. *Cell line* dengan fenofit osteoblas antara lain berasal dari cell line osteosarcoma tikus (UMR-106, ROS 17/ 2), *cell line* osteosarcoma manusia (MG-63, SaOS, TE-85), dan *cell line* yang berasal dari normal (MC3T3-E1 yang berasal dari calvaria tikus) (Belezikian *et al.* 1994)

Fungsi kultur sel adalah untuk mengamati berbagai perilaku, karakteristik, dan bentuk sel. Karakteristik sel yang dapat digunakan untuk mengevaluasi kultur sel adalah morfologi sel, kecepatan pertumbuhan, efisiensi pertumbuhan, viabilitas sel, dan fungsi khusus lain yang dilakukan oleh sel. Oleh karena itu, kultur osteoblas memiliki kegunaan yang bervariasi, antara lain untuk pengamatan biokimia sel, uji toksik atau uji teraupetik suatu bahan, atau untuk terapi gen (Freshney 2000).

2.7 Mekanisme Regenerasi dan Augmentasi Tulang

Tiga proses berbeda yang dihubungkan dengan keberhasilan graft tulang adalah proses osteogenesis, osteoinduksi, dan osteokonduksi. Osteogenesis merupakan pembentukan dan perkembangan tulang. Graft osteogenik berasal dari atau terbentuk dari jaringan yang terlibat dalam

pertumbuhan atau perbaikan tulang alaminya misalnya dari sum-sum tulang. Sel osteogenik dapat mendukung pembentukan tulang dalam jaringan atau mempercepat pertumbuhan tulang secara lokal (Thor 2007). Osteoinduksi adalah proses untuk merangsang osteogenesis. Graft osteoinduktif dapat digunakan untuk menginisiasi diferensiasi *Mesenchymal Stem Cell* (MSC) ke arah osteogenik, memperkuat regenerasi tulang dan mungkin dapat menyebabkan tulang tumbuh di tempat yang tidak diharapkan. Osteoinduksi menyediakan infiltrasi sel maupun nutrisi melalui *scaffolds* yang bersifat *porous* dan berbentuk tiga dimensi sehingga dapat dideposisi oleh tulang baru. Graft osteokonduktif dapat merangsang pertumbuhan tulang dan menyebabkan apoptosis tulang dari tulang sisa, namun mereka tidak mampu menghasilkan pembentukan tulang sendiri bila diletakkan pada jaringan. Untuk mendukung pertumbuhan tulang menyeberang dipermukaan, graft osteokonduktif memerlukan keberadaan tulang yang ada atau sel mesenkim yang berdiferensiasi (Garg 2004)

2.8 Aktivitas Seluler Proses Regenerasi Tulang-Graft V

Cancellous cellular marrow graft, yang diletakkan pada suatu defek kontinuitas mandibula/bedah augmentasi sinus/ implant gigi, berada dalam *dead space* yang berisi bekuan darah. *Dead space* tersebut biasanya hipoksia (pO_2 5-10 mmHg), asidotik (pH 4-6), serta berisi platelet, leukosit, sel darah merah dan fibrin dalam suatu kompleks jaringan disekitar osteosit, osteoblas endosteal dan *marrow stem-cell*. Permulaan regenerasi tulang diawali dengan pelepasan PDGF, TGF- β dan IGF dari regenerasi platelet pada graft. PDGF akan menstimulasi mitogenesis *marrow stem-cell* pada graft untuk meningkatkan jumlahnya, ia juga akan melalui proses angiogenesis kapiler ke dalam graft melalui peningkatan mitosis sel endotel. Sedangkan, TGF- β mengawali aktivasi fibroblas dan preosteoblas untuk mulai mitosis dan meningkatkan jumlahnya, sebagaimana mereka juga berdiferensiasi menjadi osteoblas matang yang berfungsi. Seterusnya, sekresi TGF- β mempengaruhi osteoblas untuk melekat pada matriks tulang dan fibroblas melekat pada matriks kolagen untuk mendukung pertumbuhan kapiler. IGF bertindak pada osteoblas endosteal yang sejajar dengan trabekula tulang kancellous graft (Marx *et al.*1998).

Aktivitas tersebut berlangsung segera pada penutupan luka. Pada hari ke-3, kapiler nampak mulai memasuki daerah graft. Penetrasi kapiler secara utuh akan nampak pada hari ke-14 hingga 17. Masa paruh waktu platelet pada luka serta pengaruh langsung dari *growth factor* yang terkandung dalam platelet tidaklah lebih dari 5 hari (Alfaro 2006). Aktivitas penyembuhan dan regenerasi tulang dapat dijelaskan dalam dua mekanisme. Mekanisme pertama ditandai dengan peningkatan dan aktivasi sum-sum tulang ke arah osteoblas yang kemudian akan mensekresi TGF- β dan IGF kedalam matriks osteoid. Mekanisme kedua adalah melalui kemotaksis dan aktivasi makrofag yang mengganti platelet sebagai sumber *growth factor* setelah hari ke-3. Makrofag tertarik kedalam graft karena aksi PDGF dan karena perbedaan gradient oksigen (antara *dead space* graft dan jaringan normal yang terdekat) (Varghese 2007).

Pembentukan tulang diawali dari osteoblas endosteal yang searah dengan permukaan trabekula tulang konselous. Karena merupakan osteoblas terdiferensiasi, sel induk maka proses mitosis diarahkan oleh PDGF dan TGF- β sebagai pemicu diferensiasi sel kearah graft. Tulang yang baru terbentuk merupakan *woven bone* tanpa sistem *haversian* dengan sedikit integritas struktural. Fase ini disebut tulang fase I dan terjadi iebih dari 4 minggu pada graft pada minggu ke-4, revaskularisasi graft menghilangkan gradient oksigen yang diperlukan untuk memelihara aktivitas makrofag. Tulang fase I akan meneruskan urutan resorpsi sehingga terbentuk tulang matur dengan arsitektur lamelar dan system *haversian* yang dikenal dengan tulang fase II. Maturasi aktual dari graft hingga *woven bone* yang akhirnya menjadi tulang lamelar matur dengan sistem *haversian*, melibatkan pranan IGF dan BMPs. Setelah matriks tulang terbentuk dan dimineralisasi oleh osteoblas, maka IGF dan BMPs akan menyatu dalam matriks tulang sehingga mengaktifasi proses resorpsi-remodeling tulang (Marx 1998)

2.9 Nano Chitosan

Nano Chitosan, suatu aminopolisakarida (*poly-1,4-D-glukosamine*) berasal dari produk deasilasi alkali *chitin*, yaitu struktur primer polimer dari ekstraskeloton krustasea, moluska, dan arthropoda merupakan bahan pengganti tulang aloplastik yang natural. Kemiripan struktur *Nano Chitosan* dengan *glucosamine* pada matriks ekstra seluler menyebabkan efek biokompatibilitasnya terhadap jaringan menjadi lebih baik. Besarnya kandungan *glucosamine* dalam unsur *Nano Chitosan* dikenal dengan istilah derajat deasetilasi (DD). *Nano Chitosan* memiliki berat molekul bervariasi antara 300 - 400 kD dengan DD antara 30%-95% tergantung Cara pemrosesan serta sumber asal *Nano Chitosan* (Sundararajan.1999). Dalam bentuk Kristal, *Nano Chitosan* dapat larut pada larutan asam (pH<6) karena adanya kelompok amino bebas pada *glucosamine*. *Nano Chitosan* juga hampir memenuhi semua persyaratan biologis *scaffold* yang ideal, bersifat *biodegradable*, biokompatibel, non toksik, *inert* secara fisiologis, menstimulasi proliferasi sel, meningkatkan penyembuhan luka, serta memiliki kemampuan antibakteri, hemostatik, fungistatik, dan antitumor (Kim *et al.*2008)

Dalam bidang biomedik, *Nano Chitosan* dapat digunakan sebagai *wound dressing*, *drug delivery system*, maupun bahan pengisi ruang implant gigi (*filler*). Kekurangan *Nano Chitosan* adalah memiliki sifat fisika yang buruk, yaitu menjadi rapuh pada keadaan kering. Kekurangan ini dapat dimineralisasikan dengan cara mengkombinasikan *Nano Chitosan* bersama material lain, yaitu glatin, *tricalcium phosphate*, hidroksiapatit maupun kolagen. Kombinasi material-material tersebut akan membentuk *sponges Nano Chitosan-material* lain (komposit) (Mukherjee *et al.*2003)

Nano Chitosan sebaga *scaffold* (matriks) dapat berfungsi sebagai substansi bioaktif yang mempengaruhi perilaku sel selama proses pertumbuhannya. Mukherjee *et al* (2003) melaporkan hasil penggunaan pasta komposit *Nano Chitosan glutamate* dengan hidroksiapatit yang dapat berperan sebagai material osteoinduktif seperti BMP-2. Pengaruh penggunaan *Nano Chitosan-collagen sponges* terhadap maturasi sel osteoblas tikus, juga telah banyak dilaporkan dalam penelitian sebelumnya. *Sponges* komposit tersebut dapat meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi osteoblas.

Demikian pula, *Nano Chitosan / tricalcium phosphate sponges* dilaporkan dapat menyebabkan *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) mengekspresikan sifat osteogenik (Arpornmaeklong 2007).

Nano Chitosan juga dilaporkan dapat merangsang proses regenerasi tulang. Meskipun mekanisme molekuler peranan *Nano Chitosan* terhadap sel tulang belum banyak diteliti, namun sejumlah penelitian *in vitro* maupun *in vivo* menunjukkan *Nano Chitosan* dapat merangsang pembentukan tulang dan menghambat resorpsi tulang. Dilaporkan bahwa pada *Nano Chitosan* 0,2% dalam asam asetat 0,2% dapat merangsang diferensiasi sel osteoprogenitor dan memfasilitasi pembentukan tulang (Klokkevold 1995). Penelitian *in vitro* dengan menggunakan *Nano Chitosan* terfosforilasi (P- *Nano Chitosan*) menunjukkan bahwa P-*Nano Chitosan* dapat meningkatkan proliferasi osteoblas dan meningkatkan aktivitas osteoblas, berupa peningkatan fosfatase alkali, kolagen tipe I, dan konsentrasi kalsium (Zhu *et al.* 2003). Produk *Nano Chitosan* dari IPB yang digabung dengan *Platelet Rich Plasma* (PRP) dilaporkan dapat meningkatkan aktivitas osteoblas secara *in vitro*, berupa peningkatan proliferasi sel, protein total, dan osteokalsin pada medium kultur. *Nano Chitosan* produk BATAN dapat menghambat proliferasi osteoklas, menghambat produk spesies oksigen reaktif, dan dapat mengurangi terjadinya resorpsi tulang (Suniarti *et al.* 2009).

Secara *in vivo*, *Nano Chitosan* juga menunjukkan dapat merangsang pembentukan tulang dan menghambat resorpsi tulang. Penggabungan *Nano Chitosan* dengan *Bone Morphogenic Protein* (BMP) dilaporkan dapat menginduksi pembentukan tulang pada model tikus osteoporosis (Muzzarelli *et al.* 1997). *Nano Chitosan oligosakarida* yang diberikan pada model tikus ovariektomi dilaporkan dapat mencegah penurunan dari volume tulang, jumlah, dan ketebalan tulang trabekula dari tulang femur. Penelitian-penelitian tersebut menunjukkan potensi yang besar dari *Nano Chitosan* untuk dimanfaatkan pada regenerasi tulang (Iwata *et al.* 2003).

Beberapa instansi di Indonesia seperti Badan Tenaga Atom Nasional, Departemen Kelautan dan Perikanan, dan Institut Pertanian Bogor (Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan) telah memproduksi *Nano Chitosan*, dan telah dipasarkan sebagai bahan dasar kosmetika, pupuk, serta di bidang kedokteran di Indonesia sebagai penyembuh luka (*wound dressing*), benang jahit untuk proses pembedahan, sebagai sistem penghantar obat (*drug delivery system*), dan sebagai *scaffold* untuk regenerasi jaringan (Suniarti *et al.* 2009)

2.10 Platelet-Rich Plasma

Platelet-rich plasma (PRP) adalah komponen darah dimana terdapat platelet yang terkonsentrasi dalam jumlah kecil plasma darah. Jumlah platelet dalam PRP dapat melebihi 2 juta platelet per mikro liter. Beku darah secara natural terdiri atas 95% sel darah merah, 5% platelet, kurang dari 1% sel darah putih dan sejumlah benang fibrin (Anila S and Nandakumar, 2006). Sedangkan beku darah PRP terdiri atas 4% sel darah merah, 95% platelet, dan 1% sel darah putih. PRP mengandung berbagai macam faktor pertumbuhan, sel darah putih dan sel fagosit, konsentrasi fibrogen, bahan vasoaktif dan kemotaktik serta sejumlah besar platelet (Tozum 2003)

Faktor pertumbuhan yang berasal dari PRP akan mengawali penyembuhan jaringan ikat, regenerasi dan perbaikan tulang, mempromosikan pembentukan pembuluh darah baru dan menstimulasi penyembuhan luka. Faktor pertumbuhan yang berasal dari PRP antar lain adalah *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor* (TGF), *Insulin Growth Factor* (IGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF) serta *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)(Moreen *et al.*2007). Selama fase perbaikan jaringan, platelet akan terjebak di dalam beku fibrin, kemudian mengalami degranulasi dan akhirnya melepaskan dua faktor pertumbuhan utama yakni PDGF dan TGF- β . PDGF akan berikatan dengan sel endotel untuk mengawali pertumbuhan kapiler, sedangkan TGF- β akan berikatan dengan osteoblas dan sum-sum tulang untuk mengawali proses mitosis dan menstimulasi pembentukan osteoid (Marx *et al.*1998).

Peran penting platelet dalam proses penyembuhan luka maupun regenerasi jaringan hanya pada fase awal osteogenesis, karena platelet hanya memiliki *life span* kurang dari 5 hari (Moreen *et al.*2007). Fungsi utama PRP yang berada pada platelet adalah a) *jump start osteogenesis* dengan melepaskan faktor pertumbuhan pada sisi lokal. Osteoblas dapat bergerak melintasi jarak yang besar dengan membentuk sistem *scaffold* (fibrin) yang akan memandu pergerakannya; b) menyebabkan konsolidasi awal pada graft karena meningkatkan jumlah PDGF dalam graft akan mengawali aktivitas sel osteokompeten pada tingkat molekuler; c) mempercepat mineralisasi karena adanya PDGF yang ditambahkan pada fase awal; d) meningkatkan densitas tulang trabekula hingga 15%-30% kali; e) mempercepat penempatan implant pada sisi graft dengan cara meningkatkan sifat osteokonduksi *scaffold*. PRP dapat meningkatkan derajat maturasi dan densitas pada prosedur graft tulang hingga 2.16 kali (Anila 2006)

Aplikasi PRP dalam bidang kedokteran gigi meliputi prosedur elevasi dasar sinus, perbaikan celah langit-langit alveolar, *oro/nasal oral fistulae*, hemostasis pasca operasi sisi donor graft tulang, defek kontinuitas pada mandibula serta penderita hemophilia yang akan menjalani operasi. Kontra indikasi penggunaan PRP adalah sangat terbatas meliputi sindroma disfungsi platelet, trombositopenia kritikal, pasien hemodinamika yang tidak stabil, dan kehamilan (Tozum 2003)

Jika keuntungan pemakaian PRP adalah terjadinya percepatan regenerasi tulang bersamaan dengan pelepasan seluruh *growth factor* yang terkandung didalam platelet manusia, maka kelemahan PRP adalah pendeknya masa paruh waktu platelet dalam graft. Degranulasi platelet terjadi antara hari ke 3 dan ke 5 dan akhir aktivitas *growth factor* terjadi pada hari ke-7 hingga ke-10 (Lynch *et al.*1999).

Penelitian tentang PRP yang pernah dilakukan secara *in vivo* adalah penambahan PRP akan meningkatkan jumlah sel osteoblas dan osteoklas dalam graft tulang mandibula *autogenous* pada bulan ke-1 dan ke-2, namun tidak pada bulan ke-3 dan ke-6 (Arpornmaeklong 2007). Demikian pula, pada penelitian lain yang menyatakan adanya percepatan pembentukan tulang baru antara graft tulang *autogenous* yang ditambahkan PRP dengan graft tulang *autogenous* saja pada penyembuhan 3 bulan (Thor 2007)

Selanjutnya pada saat darah disentrifugasi, ia akan terpisah menjadi tiga komponen dilihat dari kepekaannya. Bagian paling atas adalah *platelet-poor plasma* (PPP), bagian tengahnya adalah *buffy coat* (*platelet-rich plasma*) dan bagian paling bawah adalah sel darah merah. Komponen PPP adalah plasma aselular, sedangkan PRP adalah plasma dengan sejumlah besar kandungan platelet dan sel darah putih. Namun, baik PRP maupun PPP merupakan fraksi plasma, yang mengandung fibrinogen dan faktor beku darah. Pembentukan fibrin, walaupun bekuan sebagai *growth factor* akan menimbulkan sifat osteokonduktif yang diperlukan dalam regenerasi tulang. Pembentukan fibrin pada proses PRP tadi dikenal sebagai *fibrin glue* atau PPP atau *platelet-enriched fibrin glue*. Kandungannya meliputi sejumlah besar fibrinogen, yang akan menghasilkan *fibrin clot* yang padat dengan kekuatan adhesive untuk memegang konfigurasi tulang yang dibutuhkan (Zhu 2006). Beberapa penelitian yang berkaitan dengan penggunaan *fibrin glue* adalah selain meningkatkan pembentukan tulang, ia juga dapat meningkatkan penyembuhan graft tulang, karena adanya sejumlah *growth factor* pada platelet. Juga dilaporkan bahwa kombinasi *platelet-enriched fibrin glue* dengan graft tulang *autogenous* dapat meningkatkan rata-rata osteogenesis dan memperkuat pembentukan tulang secara *in vivo* (Huh 2006)

2.11 Perhitungan Platelet

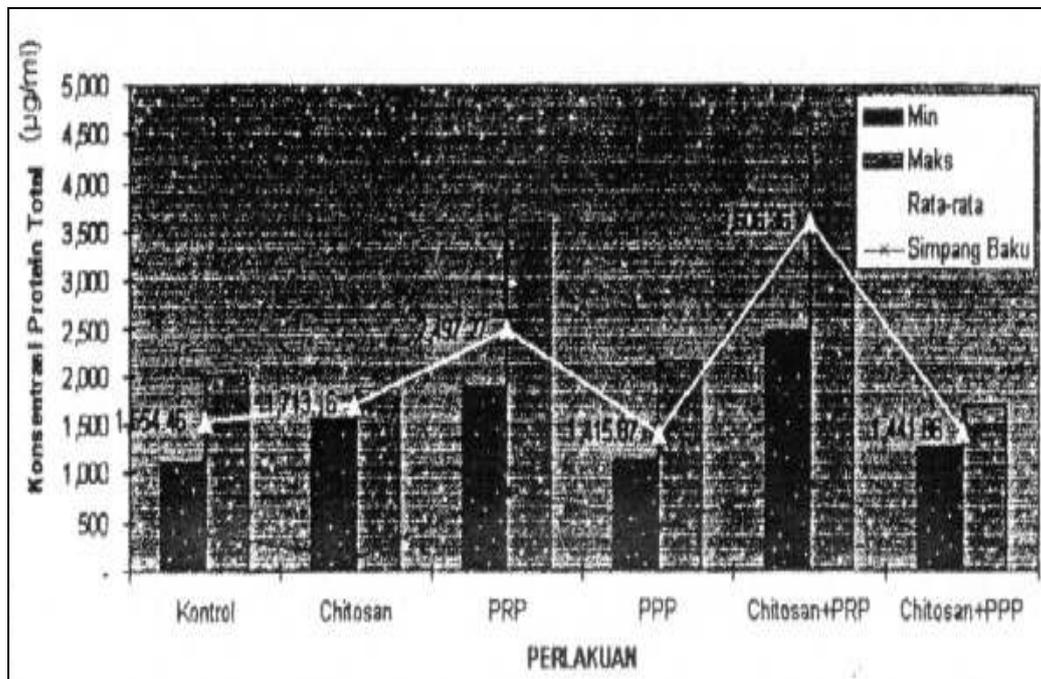
Perhitungan platelet bervariasi menurut satu metode ke metode lainnya, jumlah normal untuk tujuan klinis secara umum berkisar 150.000 hingga 400.000 milimeter kubik darah. Saat perhitungan platelet ada dibawah normal, keadaan ini disebut sebagai thrombocytopenia, sedangkan saat perhitungan platelet ada diatas normal keadaan ini disebut sebagai thrombocytosis. Prosedur untuk perhitungan platelet ada metode indirek (Fonio, Damashek, Olef, Cramer and Bannerman), metode direk (Rees and Ecker, Brecher-cronkite, Feissly and Ludin, Tocantins, Kristenson dimodifikasi lempert, Unopette) dan metode otomatis (Coulter Counter, Ortho counter, Clay Adams Counter, Hycel Counter, Royco Counter, J.T. Baker Counter, Technicon Counter, Fisher Counter). Pada metode indirek, rasio platelet terhadap sel darah merah ditentukan dengan studi smear darah. Diasumsikan bahwa rasio platelet terhadap sel darah merah ini juga terdapat pada 1 milimeter kubik darah, rasio ini dimultiplikasi oleh jumlah sel darah merah dalam 1 milimeter kubik darah. Pada metode direk, darah diencerkan dan platelet dihitung dengan baik pada mikroskop ataupun instrument elektronik. Metode indirek kurang akurat, kurang dipakai secara luas, dan memiliki hasil yang sedikit lebih tinggi dari jumlah normal jika dibandingkan dengan metode direk (Seiverd 1983)

2.12 Platelet-Rich Plasma, Osteoblas Dengan Nano Chitosan

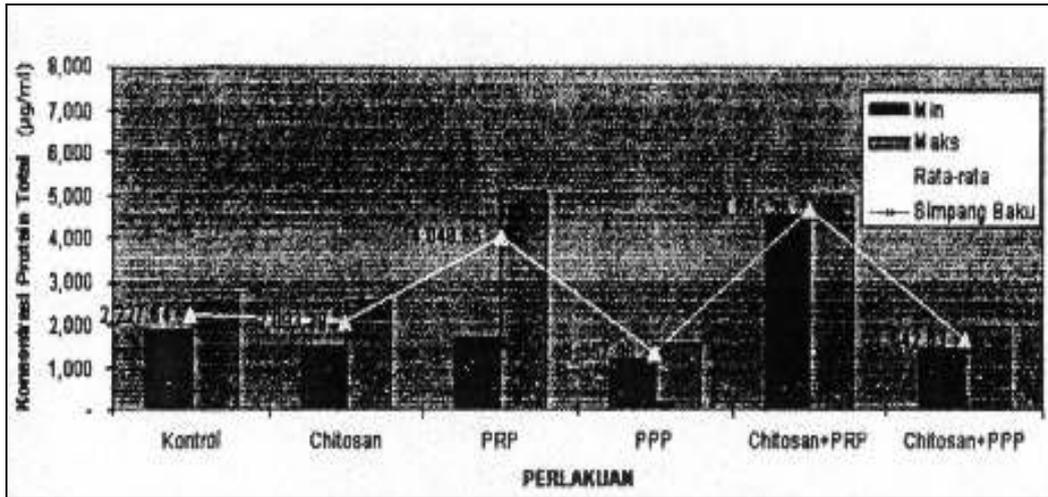
Penambahan PRP pada *Nano Chitosan* sebagai *scaffold* diharapkan sebagai fungsi *delivery vehicle* bagi sel-sel osteokompeten maupun bagi faktor-faktor pertumbuhan, namun juga memiliki peran untuk mendukung dan mengatur proses regenerasi tulang dengan fungsi sebagai matriks

ekstraselular serta memelihara ruang dan bentuk defek dari tulang yang diregenerasi (Arpornmaeklong 2007).

Peranan PRP telah banyak dinyatakan dalam literatur, terutama 5 hari pertama, yaitu pada fase awal osteogenesis dimana dilepaskan faktor-faktor pertumbuhan terutama PDGF dan TGF- β , dimana faktor-faktor pertumbuhan tersebut akan mengawali proses angiogenesis dan pembentukan osteoid (Gerard *et al.* 2007). Komposisi PRP yang mengandung platelet dalam jumlah besar memungkinkan untuk mengambil alih peran sebagai *scaffold*. Namun jika dibandingkan dengan hasil kenaikan konsentrasi protein pada aplikasi *Nano Chitosan* yang ditambah PRP, maka akan tampak lebih baik hasilnya jika dibandingkan penggunaan *Nano Chitosan* saja maupun PRP saja sebagai *scaffold* tunggal pada perlakuan waktu yang berbeda (Poedjiastoeti 2008) (lihat gambar 3,4,5)

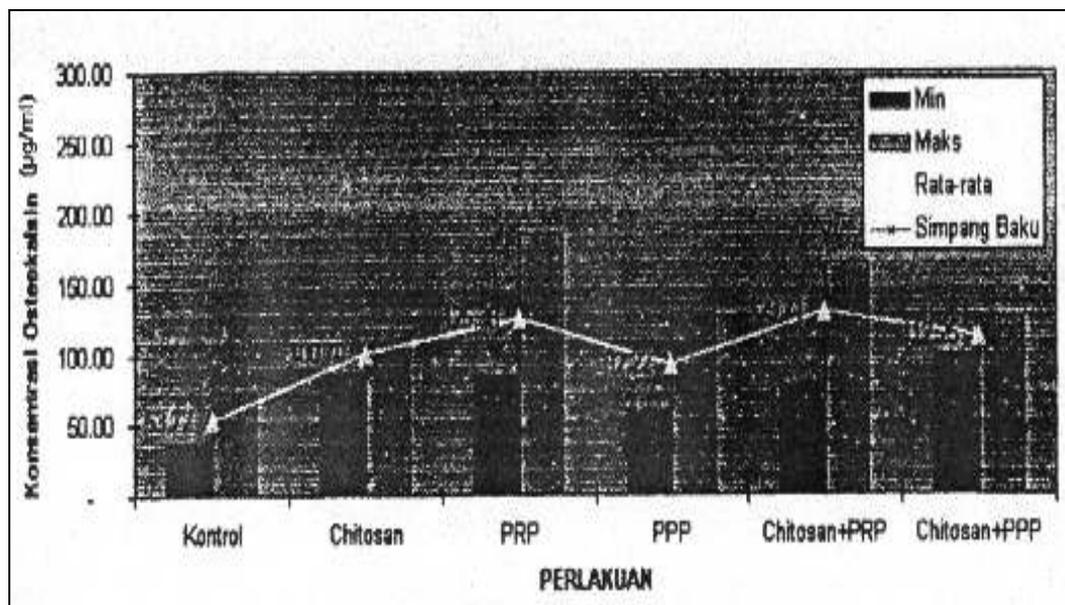


Gambar 5. 3: Grafik nilai rata-rata konsentrasi protein total pada kultur osteoblas (Poedjiastoeti 2008)



Gambar 5. 4 Grafik nilai rata-rata konsentrasi protein total pada kultur osteoblas yang diberi *Nano Chitosan*,PRP,PPP, *Nano Chitosan*+PRP, dan *Nano Chitosan*+PPP pada 72 jam (Poedjiastoeti 2008)

1. Pada pemberian *Nano Chitosan* dengan PRP menunjukkan peningkatan konsentrasi protein total yang sangat baik
2. Pemberian *Nano Chitosan* saja dibandingkan tanpa pemberian apa-apa dan hanya PPP tidak jauh berbeda peningkatan protein totalnya



Gambar 5. 5: Grafik nilai rata-rata konsentrasi osteokalsin pada kultur osteoblas yang diberi *Nano Chitosan*,PRP,PPP, *Nano Chitosan*+PRP,dan *Nano Chitosan*+PPP pada 48 jam (Poedjiastoeti 2008)

Pada penelitian *in vivo* secara histologik, telah dilakukan penelitian mengenai penambahan PRP pada partikel *autogenous bone graft* yang menghasilkan pembentukan tulang baru secara bermakna dibandingkan tanpa penambahan PRP pada *autogenous bone graft* setelah masa observasi 3 bulan (Thor 2007). Sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Gerard *et al.*2007) mengemukakan bahwa

PRP meningkatkan jumlah osteoblas maupun osteoklas pada sisi graft hanya pada satu bulan saja, sedangkan pada bulan ke-2, ke-3 maupun ke-6 tidak tampak adanya perbedaan bermakna dalam jumlah total osteoblas maupun osteoklas pada sisi PRP maupun non-PRP. Wu Wei, (2007) juga menyatakan bahwa penggunaan PRP saja dapat meregenerasi kartilago sehingga PRP dapat digunakan sebagai *scaffold* untuk rekonstruksi defek kartilago

Fungsi *scaffold* dengan penambahan PRP menyebabkan konsentrasi protein yang dihasilkan akan lebih meningkat lagi. Secara umum dapat dikatakan bahwa regenerasi tulang akan berjalan lebih baik jika ditambahkan aplikasi PRP pada *Nano Chitosan* sebagai *scaffold*. Dalam hal ini, PRP berperan sebagai stimulant (Choukroum *et al.*2006)

3. Kesimpulan dan Saran

3.1 Kesimpulan

Rekayasa jaringan merupakan bidang interdisiplin *biolye science* yang akan memperbaiki, memelihara, dan teknologi rekayasa jaringan mengupayakan fibrikasi bahan pengganti jaringan pada tubuh manusia. *Nano Chitosan* merupakan suatu bahan aminopolisakarida (*poly-1,4-D glucosamine*) berasal dari produk deasilasi alkali *chitin*. Dalam bidang biomedik *Nano Chitosan* dapat digunakan sebagai *wound dressing*, *drug delivery system*, dan bahan pengisi ruang implan gigi serta oprasi tulang alveolar lainnya. *Nano Chitosan* juga mempunyai sifat buruk yaitu rapuh dalam keadaan kering.

Platelet-rich plasma (PRP) merupakan komponen darah dimana terdapat platelet yang terkonsentrasi dalam plasma darah, dimana platelet dalam PRP jumlahnya dapat melebihi 2 juta platelet per mikro liter darah. Beku darah PRP terdiri dari 4% sel darah merah, 95% platelet, dan 1% sel darah putih. Faktor pertumbuhan dari PRP antara lain PDGF, TGF, IGF, EGF serta VEGF.

Kultur sel tulang dapat berupa dari organ atau jaringan asalnya (kultur primer) dan kultur skunder dari kultur sel primer dan telah dipisahkan secara enzimatik ataupun secara mekanis. Fungsi kultur sel adalah untuk mengamati berbagai perilaku, karakteristik dan bentuk sel, sedangkan pada kultur osteoblas memiliki kegunaan yang bervariasi, antara lain untuk pengamatan biokimia sel, uji toksik atau uji teraupetik suatu bahan, atau untuk terapi gen.

Nano Chitosan dengan pemberian PRP yang berperan sebagai stimulant dapat meningkatkan aktivitas osteoblas secara *in vitro*, berupa peningkatan proliferasi sel, protein total, dan osteokalsin pada media kultur tulang berupa *scaffold* (matriks), juga dapat menghambat proliferasi osteoklas, menghambat produksi spesies oksigen reaktif dan mengurangi resorpsi tulang. Menentukan tingkat pertumbuhan sel-sel tulang, maka diperlukan teknik yang tepat untuk melihat bagaimana proliferasi dari sel tulang. lihat pada BAB VI

3.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai formula *Nano Chitosan* yang tepat untuk dapat dimanfaatkan sebagai biomaterial untuk mencegah kerusakan tulang dan meregenerasi tulang pasca operasi
2. Penambahan PRP pada *Nano Chitosan* menunjukkan aktivitas osteoblas seraca *in vitro*, dengan demikian diperlukan penelitian lanjutan mengenai peran PRP sebagai *growth factor* dalam proses osteogenesis secara *in vivo*

Daftar Pustaka

- Alfaro, F .H. *Bone Grafting in Oral Implantology. Techniques and Clinical Applications Quintessence*. Chicago. 2006; 9-16
- Anila S and N andakumar. *Application of Platelet-rich Plasma for Regenerative Therapy in Periodontics. Trends Biomater Artif Organs*. Vol 20;1.2006:78-83
- Arpornmaeklong P. *Growth and differentiation of mouse osteoblast on Nano Chitosan-Collagen sponges*. *Int.J.Oral Maxillofac. Surg*.2007;36;328-337
- Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM. *Oxidative stress inhibits osteoblastic Differentiation of bone cells by ERK and NF- β* . *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2004;314 (1):197-207
- Bilezikian IP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of Bone Biology*. Academic Press, San Diago, 1994.
- Boyce BF, Xing L. *Biology of RANK, RANKL and osteoprotegerin*. *Arthritis Research & Therapy*. 2007;9 (Suppl 1):S1
- Charles E. Seiverd. *Hematology for Medical Technologists*. Fifth Ed, Lea&Febiger Philadelphia,1983;18:407-426
- Choukroun J. Platelet-rich Fibrin (PRF) A second- generation *Platelet Concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in Sinus lift. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*,2006;101: 299-303
- Dimitrios J. Hadjidakis and Ioannis I. Androulakis, *Bone Remodeling*,2006. Second Departejment of internal Medicine, Propaedeutic, and Research Institute Athens University, Atikkon University General Hospital, Athens,Greece.1092:385-396
- Freshney RI. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. 4th Ed. New York Wiley-Liss, 2000:1-6, 78,89-104,309-12,329-37.
- Grag, A.K. *Bone: Biology, Harvesting, Grafting for Dental implants*. Quintessence. Chicago. 2004:3-23.
- Gerard,D. *Effect of Platelet-rich Plasma at the Cellular Level on Healing of Autologous Bone-Grafted Mandibular Defects in Dogs. J. Oral maxillofac Surg*.2007;65;721-727.
- Habibovic P. Dan de Groot K. *Osteoindictive Biomaterial-propreties and Relevance In Bone repair. J. Tissue Eng Regen Med*.2007;1:25-32.

- Huh, Jin-Yeung. *The effect of platelet-enriched fibrin glue on bone regeneration in Autogenous bone graft. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;101:426-31
- Iwata H, Yana S, Nasu M, Yosue T. *Effects of Nano Chitosan oligosaccharides an the femur Trabecular structure in ovariectomized rats. Oral Radiol.*2003;21:19-22
- Kim. In-Yong . *Nano Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. J. Biotechadv.*26.2008;1-21.
- Klokkevold PR. *The effect of poly-N-acetyl glucosaminoglycan (Nano Chitosan) on Osteogenesis in vitro.*(Thesis). Los Angeles. University of Califomia;199.
- Koichi Matsuo,Naoko Irie. *Osteoclast-Osteoblast Communication*,2008. Departement of Microbiology and Immunology, School of Medicine, Keio University,35 Shinanomachi,Shinjiku-ku,160-8582 Tokyo,Japan:201-206
- Lee, NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS. *A crucial role for reactive Oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. Blood.*2005; 106:85 2-9.
- Lynch, S.E, Genco,R.J.,Marx, R.E. *Tissue Engineering. Aplication in Maxillofacial Surgery and Periodontics.* Quntessence Publ Inc. Illinois. 1999;3-16,71-85
- Marx, R.E., *Platelet-rich Plasma Growth Factor Enhancement for Bone Graft; Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:638-646
- Mooren,R.E.C. *The Effect of Platelet-rich Plasma on Early and Late Bone Healing: an experimental study in goats. Int.J.OralMaxillofac.Surg.*2007;36:626-631
- Mukherjee, D.P. *An Animal Evaluation ofa Pasta Nano Chitosan Glutamate and Hydroxyapatite as a Synthetic Bone Graft Material. J. Biomed Mater Res Part B.*2003:603-609
- Muzzarelli RAA, Biagini G, Belmonte MM, Talassi O, Gandolfi MG, Solmi R. *Osteoinduction by Nano Chitosan-complexed BMP: mopho-structural responses in an osteoporotic model. journal of Bioactive and Compatible Polymers.*1997; 121321-9.
- Peng-lin, *Preparation and Evaluation of Porous Nano Chitosan/Collagen Scaffolds for Periodontal Tissue Engeneering. journ. Of Bioactive & Compatible Polymers.* 2006;21:207-220.
- Poedjiastoeti W, *Platelet-rich Plasma dan dan Platelet Poor Plasma pada bahan Graft dengan aktivitas osteoblas, J. Dental. FKG UI;*25:19-21,2008
- Robling AG,Castillo AB, Turner CH. *Biomechanical and moleculer regulation of bone Remodeling. Annu. Rev. Biomed Eng.*2006;8:4S5-98.
- Silva G.A. *Materials in particulate form for tissue engineering. 2. Application in bone J. Tissue Eng Med.*2007;1:97-109.
- Sommerfeldt DW, Rubin CT, *Biology of Bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. Eur Spine J.* 2001;10:S85-S95.
- Sundararajan, V.M and Matthew, H.W.T. *Porous Nano Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. J. Biomaterial.* Vol 20. 1999:1133-1142.

- Suniarti DF, Sukanto SA, Sudarsono N. Pengaruh *Nano Chitosan* terhadap proliferasi sel Osteoklas, resorpsi tulang dan produk oksigen radikal pada kultur sel osteoklas dari sum-sum tulang tikus. Diskusi panel, *Research Day and Student Research Competition*;2009 Jan 20-21; Jakarta, Indonesia;2009
- Thor, A. *Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. Int.J. Oral maxillofac Surg.* 2007;36:1164-1171.
- Tozum,T.F and Demiralp,B. *Platelet-rich Plasma: a Promising Innovation in Dentistry. J Can DentAssoc.*2003;69(10):664.
- Vergheese,A. *Tissue Engineering.CVG Books.* Bangalore. 2009: 1-22,67-93
- Wu Wie. *Autologous injectable Tissue-Engineering Cartilage by Using Platelet-rich Plasma:Experimental Study in a Rabbit Model. J. Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:1951-1957.
- Zhu Y, Wang X, Cui FZ, Feng QL, de Groot K. *In vitro cytocompatibility and Osteoinduction of phosphorylated Nano Chitosan with osteoblast. Journal of Bioactive and Compatible Polymers.* 2003;18:375-90.
- Zhu, Shi-Jiang. *A comparative histologic analysis of tissue engineering bone using Platelet-rich plasma and platelet-enriched fibrin glue. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:175-9.

BAB VI

Teknik Menentukan Tingkat Proliferasi Sel Osteoblas, *Mast cell* Pada Kultur Sel Osteoblas

1. Pendahuluan

1.1 Latar Belakang

Kultur sel (*cells culture*) pertama digunakan pada awal abad 20 sebagai suatu metode untuk mempelajari perilaku sel hewan yang bebas dari pengaruh variasi sistemik yang dapat timbul saat hewan dalam keadaan hemostatis ataupun dalam pengaruh percobaan atau perlakuan (*experiment*). *Cells culture* bukanlah teknik yang baru. Teknologi ini telah berkembang sejak satu abad yang lalu, melalui masa-masa pengembangan sederhana pada awalnya, diikuti fase perkembangan *expansive* pada pertengahan abad yang lalu, dan kini berada pada fase pengembangan khusus untuk memahami aspek mekanisme kontrol, proliferasi dan diferensiasi fungsi sel. Kendati teknologi *cells culture* kini telah berkembang begitu pesat, seperti kultur sel-sel khusus, *chromosome painting*, dan *DNA fingerprinting*, teknologi dasar yang awal dikembangkan, seperti teknik kultur primer, karakterisasi sel, dan yang lainnya, secara prinsip masih sama. (Freshney 2004)

Kultur sel digunakan sebagai istilah umum yang juga meliputi kultur organ. Teknologi kultur organ lebih lazim digunakan untuk suatu kultur jaringan tiga dimensi yang tidak terurai dengan sebagian atau seluruh gambaran histologisnya yang secara *in vivo* masih utuh. Istilah kultur sel digunakan untuk berbagai kultur yang berasal dari sel-sel yang terdispersi yang diambil dari jaringan asalnya (kultur primer) (Abercrombie 2004)

Sel-sel tulang terdiri dari osteoprogenitor, osteoblas, osteosit, dan osteoklas. Sel osteoprogenitor merupakan populasi sel induk, berkembang dari mesenkim, yang memiliki daya mitotik dan kemampuan untuk berkembang menjadi sel tulang dewasa. Sel ini mirip sel mesenkim, yang memiliki daya mitotik dan kemampuan untuk berkembang tulang yang matang. Sel-sel ini biasanya di temukan pada permukaan tulang di lapisan dalam periosteum, pada endosteum dan dalam saluran vaskular tulang kompakta. Terdapat dua jenis sel progenitor, satu jenis (*preosteoblast*) memiliki sedikit retikulum endoplasma dan akan menghasilkan osteoblas dan yang lain (*preosteoclast*) mengandung lebih banyak mitokondria dan ribosom bebas dan menghasilkan osteoklas (Fonseca 2005)

Sel osteoblas sangat menentukan dalam proses regenerasi tulang dan ditemukan pada permukaan tulang, bentuk selnya bermacam-macam, dari sel kuboid sampai piramidal dan seringkali berwujud lembaran utuh yang menyerupai susunan epitel. Osteoblas mengandung enzim alkali fosfatase yang menandakan bahwa osteoblas tidak saja berhubungan dengan pembuatan matrik tapi juga dengan proses kalsifikasi (Leeson *et al.* 2005). Osteoblas yang matur akan mengekspresikan matrik tulang yang terdiri atas kolagen tipe I, protein non-kolagen dan proteoglikan. Beberapa protein non-kolagen yang disintesis oleh osteoblas, antara lain alkali fosfatase, osteokalsin, osteopontin dan

faktor pertumbuhan. Osteoblas yang mengekspresikan sejumlah molekul sinyal yang bekerja secara autokrin maupun parakrin. Molekul yang bekerja secara autokrin mengatur aktivitas osteoblas adalah *transforming growth factor β* (TGF- β), *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), dan *prostaglandin* (PGE). Sedangkan molekul seperti hormon paratiroid, PGE, *osteoprotegerin* (OPG), dan *receptor activator of nuclear factor κ ligand* (RANKL) bekerja secara parakrin mempengaruhi pembentukan dan aktivitas osteoklas. Osteoblas kemudian akan berdiferensiasi menjadi osteosit setelah matriks tulang matur dan termineralisasi (Habibovic 2007).

Pembentukan *mast cell* (mastoposis) berawal disumsum tulang. Sel induk hematopoiesis (SIH), atau *hematopoiesis stem cell* (HSC) di sumsum tulang tumbuh menjadi *sel calon – mast cell*, kemudian menyebar ke seluruh tubuh mengikuti aliran darah, pada tempat jaringan yang sesuai sel ini keluar dari pembuluh darah, tumbuh menjadi *mast cell* dewasa, sesuai dengan pengaruh lingkungan-mikro jaringan setempat, menetap dan berfungsi di jaringan itu. Atas dasar ini, maka terdapat berbagai macam jenis *mast cell* yang spesifik untuk setiap jenis jaringan tubuh yang berbeda.

Respon imun Th-1 dan Th-2 seyogyanya berada dalam koordinasi yang menguntungkan untuk mengeliminasi berbagai penyebab penyakit secara efisien. Respon imun Th-1 merupakan *phagocyte dependent host response*, atau *cell mediated immune response*, Respon imun profil Th-2 merupakan *phagocyte independent host response*, merupakan *humoral mediated immune response*. Aktifitas Th-2 yang berlebih akan menekan Th-1, melalui IL-4 dan IL-10. *Mast cell* berperan dalam aspek *immune defense mechanism, immune regulation, hypersensitivity (immediate maupun delayed type)*, tumor *cytotoxicity, angiogenesis, fibrosis, tissue repair-remodelling, bronchial constriction, intestinal hypermotility* dan berbagai aspek biologis lainnya. Keanekaragaman mediator serta luasnya spektrum peran *mast cell*, menyebabkan *mast cell* di pandang sebagai *wondering cell* yaitu sel yang menakjubkan, karena potensi biologisnya yang sangat luas, Peran *mast cell* yang sangat luas dalam tubuh, merupakan sel yang harus dieksplorasi untuk meningkatkan kualitas hidup manusia, khususnya bila mengalami trauma.

Regenerasi jaringan tulang merupakan terjadinya pertumbuhan jumlah sel-sel pembentuk tulang (sel osteoblas) dan sel pendukung. Proliferasi sel osteoblas merupakan salah satu indikator untuk menentukan proses terjadinya regenerasi tulang, selain faktor sistemik dan patologis. Sejumlah teknik telah dikembangkan untuk mempelajari kelangsungan hidup sel dan proliferasi pada populasi sel, dan bila terjadi kerusakan seluler akan mengakibatkan hilangnya kemampuan sel untuk mempertahankan dan menyediakan energi untuk fungsi sel metabolisme dan pertumbuhan. Pentingnya tingkat proliferasi sel untuk menentukan adanya pertumbuhan dari suatu sel, maka diperlukan beberapa teknik atau metode melihat tingkat proliferasi suatu kultur sel. (Robling 2006)

1.2 Rumusan Masalah

Teknik proliferasi sel mana yang sangat efektif dapat menentukan tingkat proliferasi sel, *mast cell* dari kultur Sel osteoblast

1.3 Tujuan

Melihat teknik proliferasi sel mana yang paling efektif tingkat proliferasi sel, *mast cell* dari kultur sel osteoblas untuk mendapatkan teknik yang tepat

1.4 Manfaat

Mendapatkan teknik yang tepat tentang proliferasi sel, *mast cell* dari kultur sel osteoblast

2. Tinjauan Pustaka

2.1 Kultur Sel

Pada saat istilah kultur sel diperkenalkan, teknik ini pertama kali dikembangkan dengan menggunakan fragmen jaringan dan sel yang tidak terurai, dan pertumbuhan sel atau jaringan terjadi dengan bermigrasinya sel fragmen jaringan disertai adanya mitosis diluar pertumbuhan. Kultur sel dari jaringan *explants primer* inilah yang mendominasi perkembangan teknik kultur sel pada lebih dari lima puluh tahun perkembangannya, sehingga tidaklah mengherankan jika istilah kultur sel atau jaringan sudah begitu melekat untuk pengembangan teknologi ini. Walaupun demikian, fakta yang terjadi pada saat percepatan perkembangan teknologi ini berikutnya di era setelah tahun 1950 lebih didominasi oleh penggunaan kultur sel yang terurai dari jaringan (Abercrombie 2004)

Kultur sel adalah proses pengembangbiakan sel dibawah kondisi terkontrol pada lingkungan buatan yang kondusif untuk pertumbuhannya. Keunggulan penggunaan kultur sel adalah lingkungan hidup sel dapat diatur, karakteristik sel dapat digambarkan dengan jelas, dan mudah diukur, namun kerugiannya adalah mudah terkontaminasi dan relatif mahal (Freshney 2004).

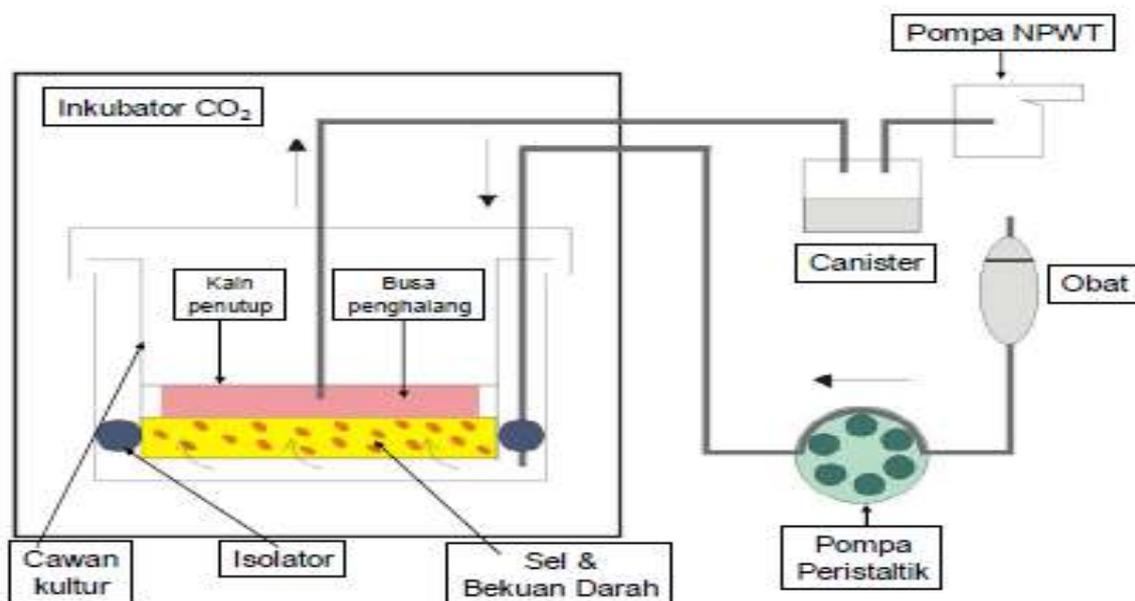
Terminologi kultur organ lebih lazim digunakan untuk suatu kultur jaringan tiga dimensi yang tidak terurai dengan sebagian atau seluruh gambaran histologinya yang secara *in vivo* masih utuh. Istilah kultur sel digunakan untuk berbagai kultur yang berasal dari sel-sel yang terdispersi yang diambil dari jaringan asalnya, dari kultur primer, atau dari *cells line* atau *cells strains* secara enzimatik, mekanik, dan kimiawi. Terminologi kultur *hystotypic* akan diterapkan untuk jenis kultur jaringan yang menggabungkan kembali sel-sel yang telah terdispersi sedemikian rupa untuk membentuk kultur jaringan menyerupai struktur tiga dimensi, seperti contohnya pada perfusi atau pertumbuhan berlebih pada kultur monolayer, reagregasi pada suspensi sel, atau infiltrasi dari matriks tiga dimensi seperti penggunaan gel kolagen. Istilah kultur organotipik digunakan pada kultur dengan prosedur seperti diatas namun mengkombinasikan sel dari berbagai jenis yang berbeda, contohnya adalah keratosit epidermal yang dikombinasikan dengan mereagrasikan dengan fibroblast dermal (Wilkes 2007)

2.1.1 Perkembangan Teknologi Kultur Sel

Untuk mempelajari teknik dasar kultur sel diperlukan pemahaman dasar tentang anatomi, histologi sel, dan prinsip dasar biokimia. Perkembangan ilmu biologi molekuler menyebabkan sulitnya melihat batas pemisah antara biologi molekuler dengan kultur sel. Perkembangan teknologi

kultur sel kini banyak diarahkan untuk dapat memberikan simulasi proses biologi yang terjadi pada tubuh manusia, sehingga tidak hanya digunakan untuk mempelajari proses atau mekanisme yang terjadi pada sel, namun juga interaksi yang terjadi antar sel dengan lingkungan yang dapat diatur menyerupai berbagai keadaan fisiologis ataupun patologis. Hal ini akan semakin mengatasi kelemahan teknologi kultur sel yang dianggap sebagai teknologi *experiment in vitro*, kendati menggunakan sel atau jaringan hidup, dibanding dengan penggunaan hewan percobaan yang dinilai sebagai *experiment in vivo* (Puleo 2007).

Wilkes dan kawan-kawan pada tahun 2007 mengembangkan suatu metode bioreaktor untuk mengaplikasikan keadaan tekanan subatmosfer pada kultur sel tiga dimensi. Model ini dikembangkan dengan tujuan memfasilitasi upaya mempelajari lebih baik mekanisme biologis proses penyembuhan luka dengan menggunakan teknik *Vacuum-assisted Closure (VAC)*, *Negative Pressure Wound Therapy (NPWT)* yang telah secara luas berhasil digunakan. Pada bioreaktor ini digunakan analog jaringan tiga dimensi terdiri dari fibroblast yang mengandung bekuan fibrin yang dikultur pada cawan bertingkat. Cawan kultur ini mendapat perfusi medium yang diatur dengan kecepatan dan tingkat aliran serta tekanan sesuai keadaan jaringan, yang secara skematis divisualisasikan seperti tampak pada gambar 1 dibawah ini



Gambar 6. 1: Skema sistem cawan bioreaktor (Wilkes 2007)

Pengembangan bioreaktor ini memanfaatkan teknologi *microelectromechanical system (MEMS)* yang telah lebih dahulu banyak dikembangkan sebagai perpaduan teknologi kultur sel dengan rekayasa material biologi (Puleo 2007). Mesti banyak berkembang referensi yang menyajikan teknologi baru, namun masih banyak referensi teknologi dasar yang dipertahankan. Misalnya Puck dan Marcus melakukan kloning sel dengan tehnik dilusi dan mengukuhkan metodenya yang kini secara

rutin masih digunakan di banyak laboratorium. Lovelock dan Bishop mendemonstrasikan keunggulan *dimethylsulfoxide* (DMSO) untuk preservasi sel beku. Kedua teknologi ini belum tergantikan tanpa adanya modifikasi yang substansial. Ilmu pengetahuan dan teknologi moderen menjadi semakin bergantung pada teknologi canggih. Prosedur pewarnaan antibodi, ELISA, analisis probe molekuler, pemeriksaan toksisitas, kini sudah tersedia dalam bentuk kit, yang dan mudah kendati dengan biaya yang lebih mahal

2.1.2 Perkembangan Implementasi Teknologi Kultur Sel.

Meskipun tantangan untuk mendapatkan sel-sel yang tumbuh secara *in vitro* telah terjawab, dan diversitas dari jenis sel telah meningkat secara konstan, kultur sel kini sudah semakin populer dari sebelumnya. Untuk beberapa kalangan kultur sel menghasilkan peluang untuk mengurangi percobaan hewan yang tidak perlu, untuk kalangan lainnya teknologi kultur sel mendorong kemampuan untuk menghasilkan produk farmasi inovatif yang lebih ekonomis, dan untuk beberapa kalangan tertentu teknologi ini masih menjadi metode untuk mengeksplorasi permasalahan regulasi sel dan potensinya untuk pengembangan intervensi medis (Linke *et al.* 2007)

Perkembangan teknologi kultur sel juga telah dimanfaatkan untuk mempelajari peran peptin, proliferasi sel, protein yang kini banyak dibicarakan kontribusinya pada pathogenesis berbagai penyakit degenerative. Dengan memanfaatkan teknologi kultur sel diketahui bahwa proliferasi dan difrensiasi sel-sel prediposit untuk berkembang menjadi adipositi baru. Salah satu aspek yang paling menarik dalam perkembangan terkini kultur sel adalah mengetahui seberapa jauh kultur sel menjadi teknologi yang dapat diterima pada era dimana teknologi ini sebelumnya merupakan “*exploratory fringe*”. (Ramsay 2005)

Sejak dikembangkannya Laboratorium Kultur Sel dan Jaringan di Unit Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Pedjajaran pada tahun 1997, hingga kini beberapa jenis kultursel telah berhasil dikembangkan, antara lain kultur sel osteoblas, sel endotel, sel otot jantung, sel tiroid, dan sel fibroblast yang diisolasi baik dari preputium maupun *chick embryo*. Isolasi berbagai sel di atas dilakukan dengan menggunakan teknik disperse enjimatik maupun mekanik. Pemanfaatan teknologi ini banyak membantu penyelesaian penelitian para peserta program pasca sarjana maupun para peneliti yang memperoleh hibah penelitian dari berbagai sumber (Supriyadi 1999)

2.2 Struktur Tulang

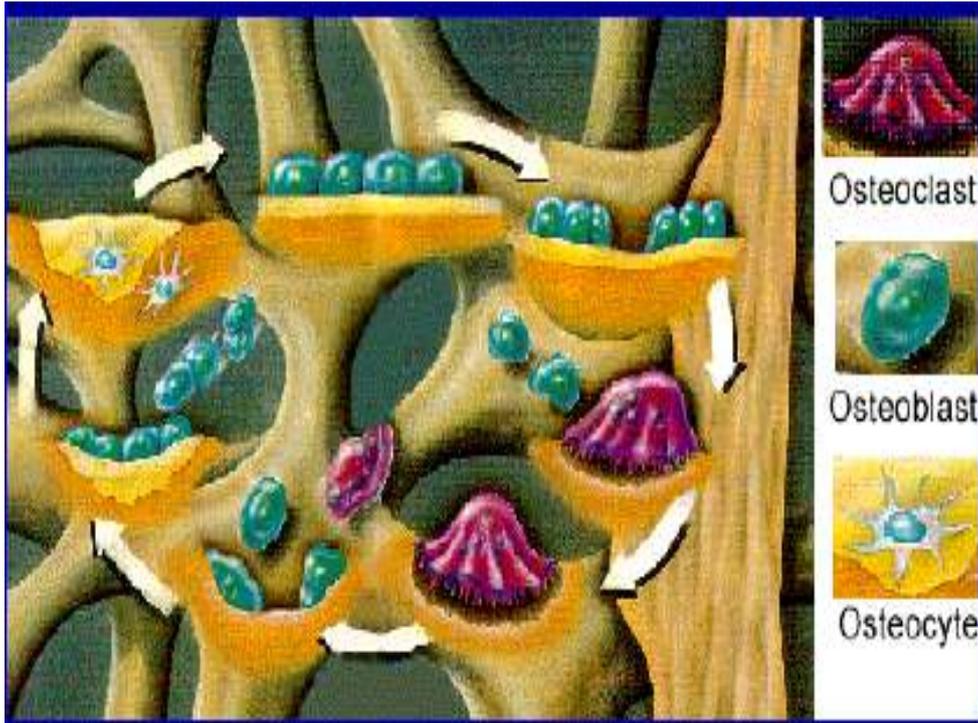
Secara garis besar tulang dikenal ada dua tipe yaitu tulang korteks(kompak) dan tulang trabekular (berongga = *spongy* = *cancelous*). Bagian luar kedua tulang tersebut merupakan tulang padat yang disebut korteks tulang dan bagian dalamnya adalah tulang trabekular yang tersusun seperti bunga karang (Buckwalter 1995; Riis 1996).Tulang korteks merupakan bagian terbesar (80%) penyusun kerangka, mempunyai fungsi mekanik, modulus elastisitas yang tinggi dan mampu menahan tekanan mekanik berupa beban tekukan dan puntiran yang berat. Tulang korteks terdiri dari

lapisan padat kolagen yang mengalami mineralisasi, tersusun konsentris sejajar dengan permukaan tulang. Tulang korteks terdapat pada tulang panjang ekstremitas dan vertebra. Tulang spongiosa atau *cancellous* atau trabekular mempunyai elastisitasnya lebih kecil dari tulang korteks, mengalami proses resorpsi lebih cepat dibandingkan dengan tulang korteks. Tulang *spongiosa* terdapat pada daerah metafisis dan epifisis tulang panjang serta pada bagian dalam tulang pendek (Buckwalter 1995; Cusharon 1998).

Unsur yang membentuk tulang adalah mineral sekitar (65%), matriks (35%) sel-sel osteoblas, osteoklas, osteosit dan air. Matriks tulang korteks dan trabekula tersusun atas matriks organik dan anorganik. Komponen anorganik merupakan 65% dari seluruh massa tulang, sedangkan komponen organik sekitar 20% dan air 10%. Kolagen tulang merupakan komponen organik terbesar yang membentuk dan memungkinkan tulang menahan regangan sedangkan anorganik atau mineral berfungsi menahan beban tekanan (Compston 2001). Asal mula sel-sel tulang berasal dari stem sel tulang yang berkembang menjadi mesoderm progenitor kemudian membentuk jalur mesenkim (preosteoblas, osteoblas, osteosit dan *bone lining cells*) dan jalur hemopoetik (preosteoklas, osteoklas). (Kumar 2005)

2.3 Sel Tulang

Asal mula sel-sel tulang berasal dari stem sel tulang yang berkembang menjadi mesoderm progenitor kemudian membentuk jalur mesenkim (preosteoblas, osteoblas, osteosit dan *bone lining cells*) dan jalur hemopoetik (preosteoklas, osteoklas). (Kumar 2005). Sel-sel ini biasanya ditemukan pada permukaan tulang di lapisan dalam periosteum, pada endosteum dan dalam saluran vascular tulang kompakta. Terdapat dua jenis sel progenitor, satu jenis (preosteoblas) memiliki sedikit retikulum endoplasma dan akan menghasilkan osteoblas dan yang lain (preosteoklas) mengandung lebih banyak mitokondria dan ribosom bebas dan menghasilkan osteoklas (Fonseca 2001)



Gambar 6. 2: Struktur sel tulang matang (Osteoblas, osteosit, osteoklas) (Fonseca 2001)

2.3.1 Sel Osteoblas

Osteoblas berasal dari jalur sel mesenkim stroma sumsum tulang. Osteoblas memproduksi osteoid atau matrik tulang, berbentuk bulat, oval atau polihedral, terpisah dari matrik yang telah mengalami mineralisasi. Osteoblas berfungsi mensintesis dan mensekresi matrik organik tulang, mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraseluler pada proses mineralisasi. Osteoblas mengandung retikulum endoplasmik, membrane golgi dan mitokondria. Pematangan osteoblas memerlukan *fibroblast growth factor* (FGF), *bone morphogenic proteins* (BMPs), *core binding factor-1* (CBFA-1) dan *osteoblast specific cis acting element* (OSE-2). Osteoblas memiliki reseptor estrogen, sitokin, *paratiroid hormone* (PTH), *insulin derivated growth factor* (IGF), dan vitamin D3. Osteoblas saling berhubungan melalui *gaps junction*. Osteoblas yang menetap pada permukaan tulang bentuknya pipih yang dinamakan *bone lining cells / resting osteoblast*. Osteoblas mengandung enzim alkali fosfatase yang menandakan bahwa osteoblas tidak saja berhubungan dengan pembuatan matrik tapi juga dengan proses kalsifikasinya (Rosenberg 2005)

2.3.2 Osteosit

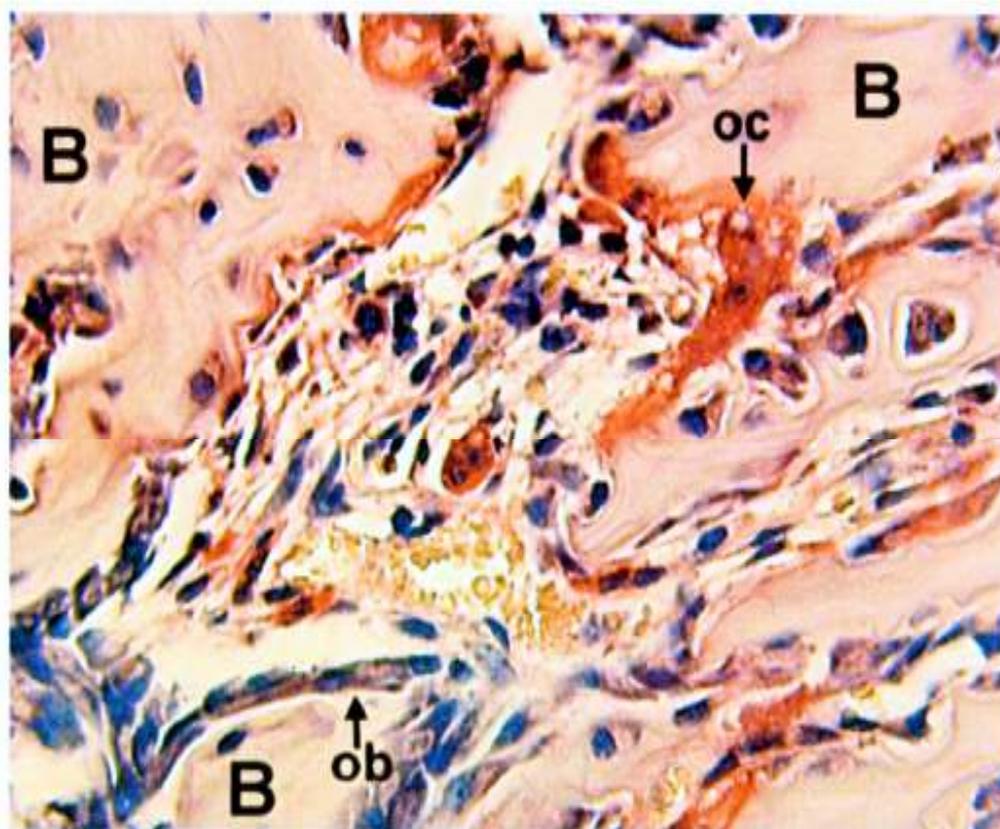
Osteosit berasal dari osteoblas dimana pada akhir proses mineralisasi akan tersimpan pada matrik tulang. Osteosit mempunyai satu inti, jumlah organela bervariasi dan sel ini menjangkau permukaan luar dan dalam tulang, membuat tulang menjadi sensitif terhadap tekanan, mengontrol pergerakan ion serta mineralisasi tulang (Fonseca 2001)

Osteosit merupakan 90% dari sel tulang terletak diantara matrik tulang yang mengalami mineralisasi. Osteosit mempunyai satu inti, jumlah organela bervariasi. Jaringan sel ini menjangkau

permukaan luar dan dalam tulang, membuat tulang menjadi sensitive terhadap pengaruh tekanan, mengontrol pergerakan ion serta mineralisasi tulang. Osteosit berasal dari osteoblas yang pada akhir proses mineralisasi terhimpit oleh ekstraseluler matrik. Osteosit merupakan sel yang sensitive terhadap tekanan mekanik, berperan dalam pemeliharaan massa dan struktur tulang.(Kumar 2005)

2.3.3 Osteoklas

Osteoklas berasal dari jalur hemopoetik yang juga membuat makrofag dan monosit. Sel ini berpindah dari sumsum tulang lewat sirkulasi atau migrasi direk. Sel precursor osteoklas terdapat pada sumsum tulang dan sirkulasi darah. Sel ini ditemukan pada permukaan tulang yang mengalami resorpsi dan kemudian membentuk cekungan yang dikenal sebagai *Lacuna Howship*. Osteoklas dalam sitoplasmanya akan terisi oleh mitokondria guna menyediakan energi untuk proses resorpsi tulang. Osteoklas merusak matrik tulang, melekat pada permukaan tulang, memisahkan sel dengan matrik, menurunkan pH 7 menjadi pH 4. Keasaman ini akan melarutkan mineral dan merusak matrik sel sehingga protease keluar. Osteoklas memiliki reseptor yaitu *RANK-ligand* (RANK-L) untuk maturasi sel dan mengalami apoptosis (Morgan 2001)



Gambar 6. 3. Sel Tulang (ob: Osteoblas, oc: Osteoklas (Morgan 2001)

2.3.4 Sitokin Dan Faktor Pertumbuhan Tulang

Faktor pertumbuhan / *Transforming growth factor-β* (TGF-β) banyak ditemukan pada matrik tulang. TGF-β aktif selama proses pembentukan tulang, memperkuat aktivitas osteoblas dengan

meningkatkan sintesis kolagen, kecepatan aposisi tulang serta menghambat difrensiasi osteoklas (Rosenberg 2005). Faktor lokal dan faktor sistemik dapat merubah proliferasi dan difrensiasi osteoblas. Faktor tersebut seperti *Platelet-derived growth factor* (PDGF) yang diproduksi oleh limposit. Sebagai tambahan, matrik tulang adalah sumber utama dari *growth factor* dimana dapat merubah proliferasi dan difrensiasi osteoblas, yaitu *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), TGF- β , *Insuline-like Growth Factor* (IGFs), dan *Fibroblast Growth Factor* (FGFs) (Roodman 2004)

2.3.5 Peran Mast Cell

Mast cells sebagai sel efektor pada reaksi hipersensitivitas tipe I dan respon protektif terhadap berbagai macam jenis parasit. Sel ini berdiferensiasi pada sumsum tulang yang berasal dari progenitor hematopoitik CD34+ dan bermigrasi ke pembuluh darah. Di dalam jaringan periferal pematangan diri *mast cells* dibawah pengaruh *stem cell factor* (SCF), IL-3 dan produksi mediator lokal (Kitamura 1989).

Mast cells tidak menggambarkan suatu sel homogenitas tunggal melainkan kumpulan populasi sel yang memiliki reseptor membran yang berafinitas tinggi bagi IgE yang disebut Fc ϵ RI. Ketika reseptor teraktivasi adanya interaksi antigen dan IgE, maka jalur transduksi sinyal Fc ϵ RI dapat menimbulkan (1) pelepasan granul yang mengandung histamin dan protease, (2) produksi mediator inflamasi turunan lipid, dan (3) sintesis sitokin (Gilfillan 2006). Sekresi mediator dan sitokin ini bertanggung jawab pada fase cepat dan lambat respon alergik, tergantung pada tempat dimana terjadinya aktivasi *mast cells* (Galli *et al.*2005). Molekul-molekul yang disekresikan itu dapat mempengaruhi kontraksi otot polos, kemotaksis sel-sel imun, permeabilitas lapisan sel endothelial dan produksi mucus. Dengan demikian aktivitas *mastosit* sangat penting perannya terkait dengan terjadinya penyakit inflamasi.

Secara imunologi, ketidakseimbangan respon imun Th1 dan Th2 (berlebih) akan mengarah pada degranulasi *mastosit*. Salah satu akibatnya adalah inflamasi alergi, aktivitas *mast cells* (degranulasi) dapat disebabkan oleh antigen dan Ca²⁺-Ionophor. Selain itu, reactive oxygen species (ROS) memodulasi fungsi efektor *mast cells* termasuk superoksida dan H₂O₂ (Widjajanto 2012).

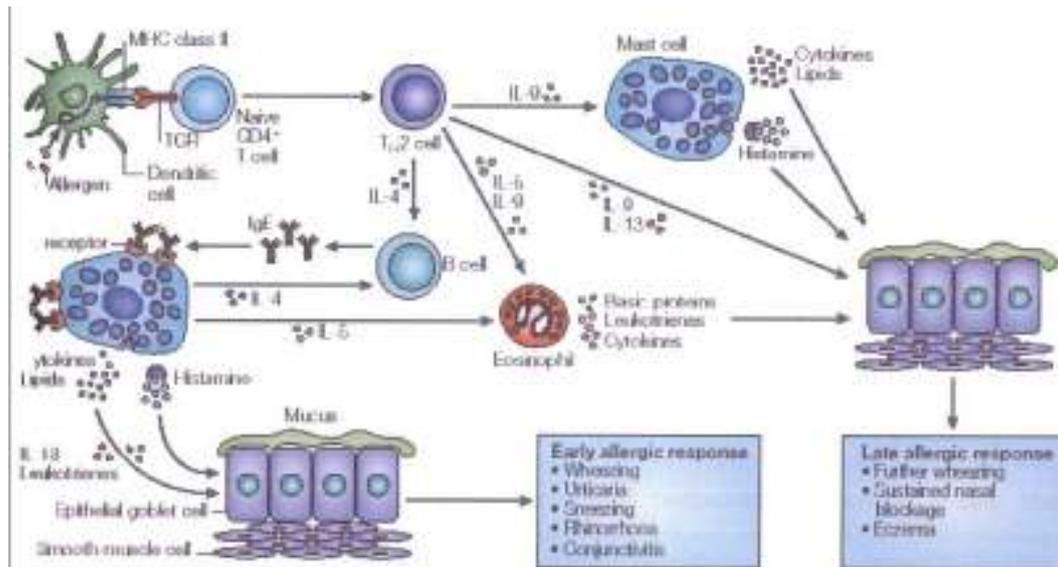
2.3.6 Alergen dan Aktivasi Mast cells

Alergen adalah antigen yang dapat menyebabkan hipersensitivitas (Abbas *et al.* 2010). Hipersensitivitas atau reaksi alergi dapat merupakan suatu respon terhadap gangguan imunitas. Reaksi alergi ini dapat terjadi baik lokal maupun sistemik. Pada organ tertentu seperti kulit, saluran nafas dan saluran cerna adalah organ yang paling sering terpajan alergen terutama melalui makanan dan bahan yang dimasukkan ke dalam tubuh. Alergen pada makanan dan bahan lain memiliki beberapa jenis antara lain seperti pada ikan, udang diketahui *allergen-M* sebagai determinan. Ketika terjadi paparan alergen atau disebut antigen dapat diikat atau bereaksi dengan antibodi yang disebut sebagai imunoglobulin. (Abbas *et al.* 2010). Imunoglobulin (Ig) dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari

proliferasi sel B yang terjadi setelah kontak dengan antigen. Molekul yang disintesis oleh sel B ini diproduksi dalam 2 bentuk yang berbeda yaitu sebagai reseptor permukaan (untuk mengikat antigen) dan sebagai antibodi yang disekresikan ke dalam cairan ekstraseluler. Antibodi yang disekresikan dapat berfungsi sebagai adaptor yang mengikat antigen melalui *binding sites*-nya yang spesifik, sekaligus merupakan jembatan yang menghubungkan antigen dengan sel-sel sistem imun atau mengaktivasi komplemen (Hertz 1998).

Antibodi atau imunoglobulin pada manusia terdiri atas IgM, IgG, IgE, IgA dan IgD. Semua molekul Ig memiliki 4 rantai polipeptida dasar yang terdiri dari dua rantai berat dan dua rantai ringan yang identik. Rantai berat terdiri dari 450–600 asam amino sedangkan rantai ringan hanya terdiri 230 asam amino. Imunoglobulin bukan sekedar molekul yang dapat mengikat antigen dengan cara *lock and key*, tetapi juga mempunyai sifat yang sangat kompleks, yaitu dapat mengikat antigen secara spesifik baik dalam fase pengenalan maupun dalam fase efektor imunitas humoral (Abbas *et al.* 1994). Imunoglobulin yang berkaitan dengan alergen adalah IgE. Oleh karena itu, IgE dikenal sebagai reagen pada reaksi hipersensitivitas tipe cepat (*immediate type*), misalnya pada rinitis musiman, asma, urtikaria dan reaksi anafilaktik. (Abbas 2005)

Menurut Widjajanto (2001), keseimbangan respon imun Th-1 dan Th-2 harus terkendali, karena dominasi aktivitas yang satu akan menekan yang lain. Hal ini dapat diarahkan untuk memandu strategi pengobatan-penatalaksanaan penyakit menular. Bila sitokin yang dihasilkan limfosit Th-2 berinteraksi dengan limfosit B maka limfosit B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi IgE. Limfosit Th yang baru diaktifkan oleh alergen akan berfenotip Th-2. Produksi sitokin sel Th-2 terutama IL-4 akan menekan perkembangan sel Th-1 dan produksi sitokin sel Th-1 terutama TNF- α akan menekan perkembangan sel Th-2. Degranulasi mastosit melepaskan mediator histamin. Histamin yang dilepaskan mastosit ditangkap oleh reseptor histamin di target organ. Bila terjadi interaksi histamin dengan reseptornya pada target organ maka reaksi alergi akan terjadi (Gambar4)



Gambar 6. 4 Proses degranulasi mastosit, paparan pertama alergen menimbulkan aktivasi sel Th-2 dan sintesis IgE. Paparan selanjutnya menimbulkan aktivasi dan pelepasan mediator-mediator oleh sel-sel inflamasi (Hawrylowicz *et al.*2005).

2.4 Macam-macam Teknik Proliferasi Sel

Sejumlah metode telah dikembangkan untuk mempelajari kelangsungan hidup sel dan proliferasi pada populasi sel. Proliferasi sel dikendalikan oleh faktor-faktor pertumbuhan yang mengikat reseptor permukaan sel yang terhubung ke sinyal molekuler. Jaringan / sel untuk dapat berproliferasi dan berkembang dalam kultur dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu, disebabkan oleh perbedaan dalam jenis sel yang digunakan, konsentrasi serum, fabrikasi permukaan, metode, teknik sterilisasi, dan jenis substrat. Tes proliferasi sel yang banyak digunakan dalam biologi sel untuk studi pertumbuhan, sitokin dan faktor-faktor komponen media yang dipergunakan (Adriano *et al.*2006)

2.4.1 Teknik Flow Cytometry (S-phase)

Beberapa teknik yang tersedia untuk evaluasi tingkat proliferasi sel dalam jaringan tumor. Teknik ini banyak digunakan untuk menghitung mitosis dalam jumlah tertentu dan proliferasi sel tertentu atau spesifik. Teknik ini telah menemukan aplikasi yang paling berguna dalam evaluasi *neoplasma mesenchymal* (terutama uterus tumor otot polos), karsinoma payudara, neuroblastoma. Teknik S-phase ini untuk mengevaluasi proliferasi sel dengan menghitung inti di S-phase (DNA sintesis) di dalam label timidin *in vitro*, *embedding paraffin*, dan *autoradiografi*. Penentuan standar indeks pelepasan timidin (TL-1) dilakukan dengan menghitung 2000 inti tumor, merupakan teknik yang semi kuantitatif dalam penentuan tingkat proliferasi sel. Tehnik ini telah digunakan secara luas dalam studi brest karsinoma, telah menentukan bahwa pasien dengan karsinoma dengan TL-1 tinggi memiliki peningkatan insiden kekambuhan dini dan kematian dini. Pada kultur sel teknik ini sering

tidak mendapatkan hasil yang akurat dalam menentukan tingkat proliferasi sel, disebabkan tehnik penghitungannya yang bersifat semi kuantitatif (Hongming *et al.*2006)

2.4.2 Teknik Microspectrophotometric Analisis

Teknik analisis dilakukan dengan pewarnaan bagian jaringan yang diperoleh dari *paraffin-embedded material* dengan reaksi *Feulgen* (spesifik DNA) dan menentukan konten DNA (*expressed in arbitrary units*) dalam *microspectrophotometer* menggunakan panjang gelombang tunggal 560 pM. Teknik ini sering di kombinasikan dengan tehnik imunohistokimia yaitu menentukan proliferasi sel dengan pewarnaan untuk antigen nuklir berhubungan dengan pertumbuhan sel dan pembelahan, analisis ini dengan cara menentukan proliferasi sel secara visual di bawah mikroskop atau dengan bantuan sebuah analisa gambar (Siti 2011)

2.4.3 Teknik Ki-67 dan PCNA

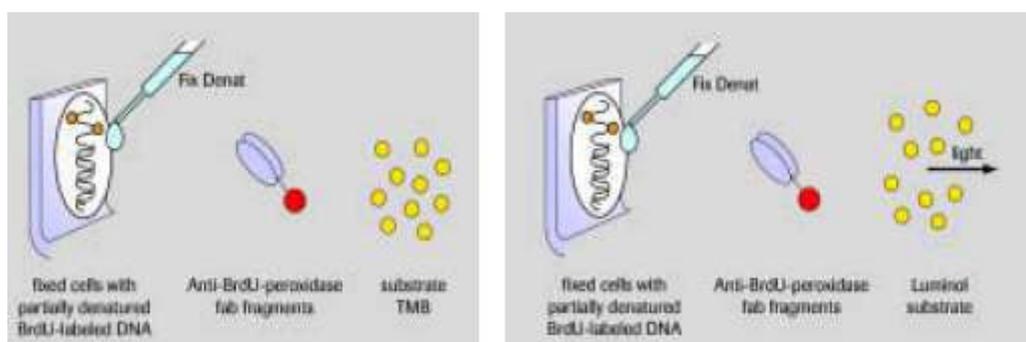
Teknik Ki-67 adalah penanda proliferasi sel lain yang terdeteksi setelah fiksasi formalin dan *embedding paraffin*, dan berfungsi sebagai kofaktor untuk *delta polymerase* selama fase sintesis DNA dari siklus sel dan proliferasi sel. Sedangkan PCNA adalah penanda yang paling sering digunakan, bersama dengan Ki-67 untuk evaluasi aktivitas proliferasi imunohistokimia dalam *paraffin embedded* materi. Adapun prosedur kerja dari ketiga teknik proliferasi diatas (teknik *Flow cytometry (S-Fase)*, teknik *Microspectrophotometric* analisis, teknik Ki-67 dan PCNA) hampir sama dengan prosedur pengecatan Imunohistokimia yaitu : hari I 1. Potong blok parafin dengan ketebalan maksimal 5 cm, kemudian ditempelkan pada obyek glas yang sudah dilapisi *poly-L-lisine*, 2. Taruh pada incubator selama 1 malam dengan suhu 37° C, 3. Defarafinisasi dengan *xylol*, 4. Dehidrasi dengan alkohol, 5. Cuci dengan aquades, 6. Teteskan H₂O₂ dalam *methanol* 3% sampai menutupi seluruh permukaan jaringan selama 15 menit, 7. Cuci dengan aquades selama 10 menit, 8. Cuci dengan BPS (*Phosphat Buffer Saline*) pH 7,4, sebanyak 2 kali selama 10 menit, 9. Retrieval antigen, dengan cara dipanaskan dala *buffer sitroat* pH 6,0 dengan *micromave oven*. Mula-mula dengan pemanasan tinggi sampai mendidih kemudian dilanjutkan dengan pemanasan sedang selama 5 menit, 10. Dinginkan pada suhu kamar, 11. Cuci BPS 2 kali selama 10 menit, 12. Teteskan bloking serum/kultur selama 10 menit (sesuai produk), 13. Teteskan antibody primer selama 1 jam pada suhu kamar atau semalam suhu -4°C.

Hari II yaitu : 1. Cuci dengan BPS 2 kali dalam 10 menit, 2. Teteskan *Biotinylated Anti Polyvalent* selama 15 menit, 3. Cuci dengan BPS 2 kali selama 10 menit, 4. Teteskan *streptavidin peroxidase* selama 10 menit, 5. Cuci dengan BPS 2 kali selama 10 menit, 6. Teteska DAB selama 10 menit, 7. Cuci dengan air mengalir, 8. Teteskan *Mayer Haematoxylin* selama 2 menit, 9. Cuci dengan air mengalir, 10. Isi alkohol dan *xylol* kemudian tutup dengan entelen.

2.4.4 Teknik ELISA BrdU (kolorimetri) dan ELISA BrdU (Chemiluminescence)

Proliferasi sel ELISA BrdU (*5-bromo-2-deoxyuridine*) kolorimetri dan ELISA BrdU chemiluminescence adalah sangat sensitive sebagai proliferasi [3]-timidin berbasis sel uji. Kemampuan untuk mendeteksi jumlah minimum sel berkembang biak dalam sampel tertentu tergantung pada jumlah BrdU dimasukkan ke dalam sel dan dengan demikian periode pembelahan telah terjadi. Dalam banyak kasus, pembelahan dan proliferasi sel membutuhkan periode pelabelan 2 sampai 24 jam. Penggunaan substrat chemiluminescence memungkinkan pengukuran proliferasi sel, secara spesifik antibodi anti-BrdU peroksidase-konjugat (anti-BrdU-POD, fragmen Fab) akan mengikat BrdU-berlabel DNA setelah DNA terdenaturasi. Antibodi spesifik mengakui *5-bromo-2-deoxyuridine*, tidak menunjukkan reaktivitas silang dengan endogen seluler komponen seperti timidine atau urudin. Teknik ini dapat digunakan secara spesifik untuk uji sel patuh serta sel pada suspensi kultur dalam 96-lempeng *microplate* (misalnya sel limfosit darah perifer diaktifkan dalam sel *in vitro* dapat berkembang biak)

Prosedur kerja dari ELISA BrdU (Kolorimetri): 1. BrdU pelabelan pereaksi (1000 x), steril, 2. Anti-BrdU-POD fragmen tab, 3. Antibodi solusi pengenceran (siap digunakan), 4. Mencuci penyangga dengan aquadest (10 x), 5. FixDenat (reagen) siap digunakan, 6. TMB substrat silusi (siap digunakan). Sedangkan prosedur kerja dari ELISA BrdU (Chemiluminescence) : 1. BrdU pelabelan pereaksi (1000 x), steril, 2. Anti-BrdU-POD fragmen tab, 3. Antibodi solusi pengenceran (siap digunakan), 4. Mencuci penyangga dengan aquades (10 x), 5. FixDenat (reagen) siap digunakan, 6. Sebuah komponen substrat (*luminal/4-iodophenol*), 7. Substrat komponen B (peroksida). Dengan catatan solusi FixDenat (termasuk dalam kit) juga tersedia sebagai reagen yang terpisah (Contoh: Cat.No 11 758 764 001,4x100 ml [cukup untuk tes 2000]. Ini siap digunakan solusi penyederhanakan deteksi DNA BrdU-label dalam aplikasi ELISA dan proliferasi sel, karena secara bersamaan perbaikan sel dan DNA denatures untuk mengekspos epitop BrdU. (Deal *et al.*2010)



▲ Figure 66: Principle of the Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric).

▲ Figure 67: Principle of the Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent).

Gambar 6. 5: Prinsip ELISA BrdU (Kolorimetri), ELISA BrdU (Chemiluminescent)

2.4.5 Teknik Studi Proteome

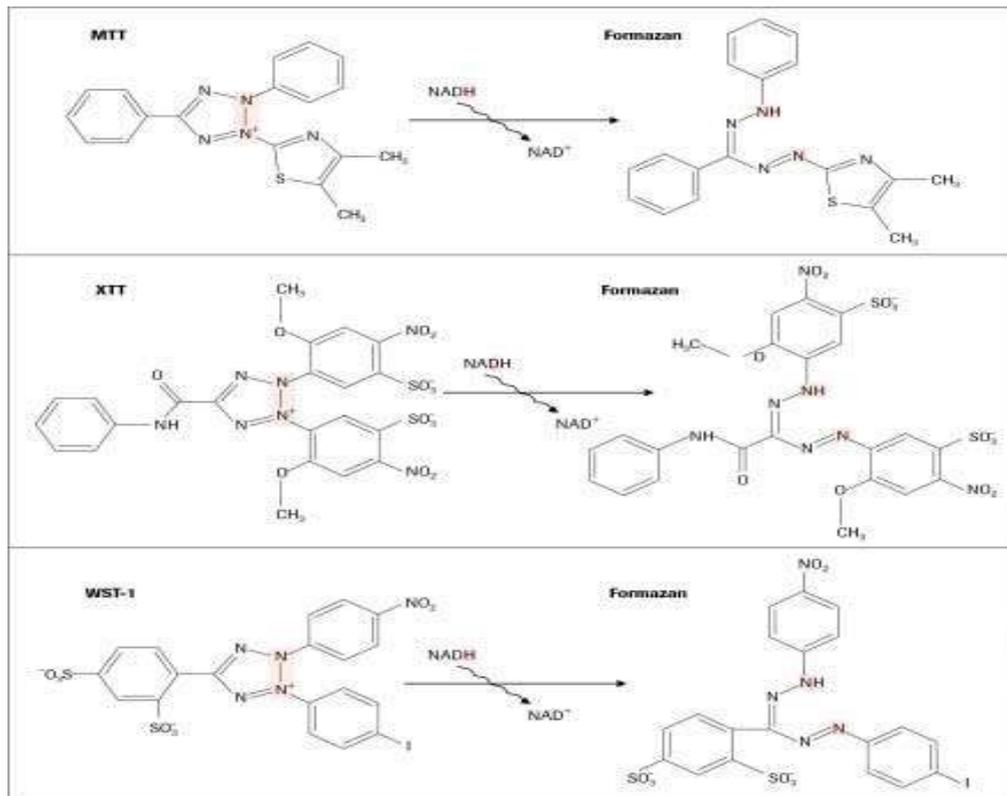
Teknik ini menganalisis sel-sel osteoblastik, baik dalam status proliferasi dan juga mengidentifikasi untuk kondisi kedua protein. Selain itu untuk mengevaluasi perbedaan fenotipik

yang signifikan, pada perbandingan studi proteome juga dilakukan antara sel osteoblas dan SaOs2 (*osteosarcoma saos-2*) manusia normal. Adapun bahan dan teknik studi proteome adalah Kultur osteoblas diisi larutan DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) dilengkapi dengan 10% v/v betis serum (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 2mM L-glutamin (Gibco), penicillin (100 U/mL) dan streptomisin (100 mg/mL). Kultur di inkubasi pada suhu 37°C dalam suasana lembab dari 7% CO₂, 93% udara. Sel dipertahankan dengan menghapus pada kondisi menengah dan menggantinya dengan yang baru, setiap tujuh hari. Setelah 3-6 minggu kultur sel telah tumbuh keluar dari fragmen tulang. Penilaian kelayakan osteoblas dan proliferasi dengan adanya sel yang berlapis dalam 12- lempeng piring, diinkubasi dalam DMEM dilengkapi dengan 10% atau 2% FCS UG. Pada hari 1,3,6,10,16 dan 20 selama kultur sel, media telah diapus dan sel-sel dicuci dengan PBS, selanjutnya dihitung menggunakan ruang *Neubauer*. Proliferasi dan viabilitas sel dinilai oleh metode *trypan blue dye exclusion*, yang menghasilkan uji kuantitatif dan kualitatif sel kultur. (Adriano *et al.* 2006)

2.4.6 Teknik MTT Assay

Teknik MTT Assay (*4,5-dimethylthiazol-2-il*)-2,5-difenil tetrazolium bromide) telah dikembangkan untuk mempelajari kelangsungan hidup sel dan proliferasi pada populasi sel. Teknik moderen dan alat tes yang nyaman telah dikembangkan dalam format lempeng (96-sumur). Tes lempeng telah dikembangkan berdasarkan parameter yang berbeda terkait dengan viabilitas sel dan proliferasi sel, sedangkan parameter yang paling penting digunakan adalah aktivitas metabolisme dan sintesis DNA untuk format lempeng. Kerusakan seluler akan mengakibatkan hilangnya kemampuan sel untuk mempertahankan dan menyediakan energi untuk fungsi sel metabolisme dan pertumbuhan. Tes aktivitas metabolik biasanya mengukur aktivitas mitokondria, dimana sel-sel diinkubasi dengan *substrat colorometric* (MTT, XTT, WST-1). Salah satu parameter yang digunakan sebagai dasar untuk tes *colorometric* adalah aktivitas metabolisme sel-sel, misalnya piring mikrotiter tes yang menggunakan MTT garam *tetrazolium*, sekarang banyak digunakan untuk kuantitatif proliferasi sel dan sitotoksitas (Bachtiar 2011)

MTT assay dibelah untuk *formazan* oleh *system suksinat-tetrazolium reduktase* (EC 1.3.99.1) yang termasuk rantai pernapasan mitokondria dan hanya aktif di sel yang layak, bukti terbaru menunjukkan bahwa elektron transporasi mitokondria mungkin memainkan peran kecil dalam pengurangan seluler MTT. Pengurangan yang paling seluler terjadi dalam sitoplasma dan mungkin melibatkan nukleotida piridin kofaktor NADH dan NADPH, juga telah tersedia modifikasi garam tetrazolium seperti XTT, WST-1 (gambar 4)



Gambar 6. 6 Struktur Molekuler MTT,XTT,WST-1 dan produksi dari reaksi koresponding (Bachtiar 2011)

Komponen MTT kit berisi 10 botol (1ml masing-masing) larutan MTT 1X. Sedangkan untuk mempertahankan sifat dan fungsinya, MTT kit harus disimpan pada 4°C dan hindari dari cahaya, disimpan dengan benar, komponen MTT kit harus tetap stabil untuk minimal 6 bulan. Bahan yang diperlukan Luteolin, kuersetin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Dimetilsulfoksida (DMSO) (Bachtiar 2011)

Tata cara (protokol) dalam penggunaan bahan MTT assay untuk pengujian prolifersi sel hidup, harus memperhatikan ketentuan yang berlaku. Adapun protokol tersebut adalah: 1. Plat sel ke 96-sumur kultur jaringan, 2. Melakukan percobaan dengan menambahkan bahan kimia atau agen biologi kedalam sumur yang sesuai. Volume akhir medium kultur jaringan di setiap sumur harus 0,1 ml, dan menengah dapat mengandung sampai 10% serum sel, 3. Gunakan salah satu vial larutan MTT assay untuk setiap plat 96-sumur, dengan catatan jika sedimen ada dalam larutan, panas solusi untuk 37°C dan aduk perlahan sampai solusi yang jelas diperoleh, 4. Tambahkan solusi MTT 10µL untuk setiap umur, campur dengan menekan lembut di sisi kaki atau guncangkan sebentar pada pengocok orbital, 5. Inkubasi pada 37°C selama 4 jam. Pada kepadatan sel tinggi (>100.000 sel per sumur) waktu inkubasi dapat dipersingkat hingga 2 jam, 6. Tambahkan Dimetilsulfoxida (DMSO) 200µL ke dalam sumur masing-masing untuk membubarkan formazan dengan pipeting ke atas dan ke bawah beberapa kali, 7. Ukur absorbansi pada pembaca piring ELSA dengan panjang gelombang 570 nm uji dan panjang gelombang 630 nm referensi untuk mendapatkan sinyal sampel (Spinner 2000)

2.4.7 Teknik XTT Based Assay (Nomor katalog:20-300-1000)

XTT Based Assay (*2,3-Bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxyanilide*) adalah suatu teknik untuk menentukan kuantitas proliferasi sel dan kelangsungan hidup, tanpa menggunakan isotop radioaktif. Hal ini dapat digunakan sebagai pengganti *non-radioaktif* untuk tes sitotoksik berdasarkan pelepasan ^{51}Cr dari sel, mempertahankan sensitivitas sel sangat tinggi. Teknik ini dikembangkan untuk uji proliferasi sel dalam reaksi terhadap faktor pertumbuhan yang berbeda, sitokin, dan komponen nutrisi. Selain itu, sangat cocok untuk pengujian sitotoksitas bahan seperti *tumor necrotizing factor* (TNF) atau inhibitor pertumbuhan lainnya dan aktivitas limfosit. (Hansen 2009)

Teknik XTT Based Assay memiliki sejumlah kelemahan diantaranya: penggunaan bahan radioaktif dan teknik yang relatif kompleks. Bahan yang digunakan garam *tetrazolium* (kolorimetri) merubah menjadi senyawa *formazan* berwarna. Prinsip dari teknik ini didasarkan pada kemampuan sel mengaktifkan metabolisme untuk mengurangi garam *tetrazolium* XTT senyawa berwarna oranye *formazan*, pewarna terbentuk larutan air dan intensitas pewarna dapat dibaca pada panjang gelombang tertentu dengan spektrofotometer. Teknik ini meliputi kultur sel dalam piring 96-sumur, menambahkan reagen XTT Based Assay dan diinkubasi selama 2-24 jam, selama inkubasi dilihat dengan spektrofotometer untuk mengukur warna oranye terbentuk dengan bantuan ELISA. Semakin besar jumlah sel-sel aktif di dalam sumur, aktivitas semakin besar enzim mitokondria, dan semakin tinggi konsentrasi pewarna yang terbentuk, yang kemudian dapat diukur proliferasi sel secara kuantitatif. (Tada 2006)

Prosedur teknik ini yaitu: 1. Kultur sel dibiakkan dalam piring datar 96-sumur, untuk setiap sumur ditambah 100 μl media pertumbuhan. Sel-sel harus diinkubasi dalam incubator CO_2 pada suhu 37°C , 2. Reagen XTT Based Assay dan aktivitas kultur sel terlihat perlahan sampai diperoleh gambaran (solusi) yang jelas, 3. Untuk mendapatkan reaksi kultur sel cukup satu sumur (96-sumur), tambahkan larutan aktivitas 0,1 ml untuk reagen XTT (5 ml), 4. Tambahkan 50 μl dari larutan reaksi untuk setiap sumur dan meneteskan piring di incubator 2-24 jam (biasanya 2-5 jam cukup), 5. Kocok piring dengan lembut untuk mendistribusikan pewarna secara merata dalam sumur, 6. Ukur absorpsi kultur sel dengan spektrofotometer (ELISA reader) pada panjang gelombang 450-500 nm (Hansen 2009)

3. Kesimpulan dan Saran

3.1 Kesimpulan

Kultur sel bukan merupakan hal yang baru di bidang kedokteran moderen, dengan adanya metode sel ini akan semakin berkembangnya teknologi kultur sel yang dianggap sebagai teknologi *experiment in vitro*, kendati menggunakan sel atau jaringan hidup, dibanding dengan penggunaan hewan percobaan yang dinilai sebagai *experiment in vivo*. Untuk terjadinya pertumbuhan tulang yang mengalami fraktur, pasca operasi (apekreseksi) diperlukan adanya proliferasi sel khususnya sel

osteoblas dan peran dari *mast cell* sangat berpengaruh pada proses regenerasi jaringan yaitu adanya *wondering cell*, *tissue repair-remodeling* dan alergen. Jenis-jenis sel tulang yang mempengaruhi proses regenerasi tulang adalah osteoblas, osteosit, osteoklas dan *mast cell*. Teknik untuk menentukan proliferasi sel pada kultur sel ada beberapa macam yaitu teknik *flow cytometry* (S-phase), teknik *microspectrophotometric* analisis, teknik Ki-67 dan PCNA mempunyai prosedur kerja yang sama dan mempunyai kelemahan karena hasilnya bersifat semi kuantitatif, sedangkan teknik ELISA BrdU (kolorimetri) dan ELISA BrdU (*chemiluminescence*) menentukan pembelahan dan proliferasi sel secara spesifik uji sel patuh. Teknik yang dapat menentukan proliferasi sel XTT Based Assay prosedur kerja yang hampir sama, tapi teknik MTT Assay yang baik karena bersifat sederhana yaitu teknik kolorimetri dengan merubah larutan garam tetrazolium menjadi larutan formazan (merubah warna orange pada sel menjadi warna ungu) serta cara kerja menggunakan lempeng sumur

3.2 Saran

Walaupun teknik MTT Assay mempunyai keunggulan dari teknik yang lain untuk menentukan tingkat proliferasi sel, *mast cell* pada kultur sel secara kuantitatif dan kualitatif, maka diperlukan kecermatan dalam menghitung jumlah sel yang terjadinya perubahan warna (orange ke ungu)

Daftar Pustaka

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. 2010. Cellular and molecular Immunology, 6th edition, updated. Elsevier.
- Abercrombie M, Heaysman JEM. Observations on the social behaviour of cells in tissue culture, II. "Monolayering" of fibroblasts. *Exp Cell Res.* 2004;6:293-306.
- Adriano Spreafico, Bruno Frediani, Caterina Capperucci, Francesca Chellini., 2006. *A Proteomic Study on Human Osteoblastic Cells Proliferation and Differentiation*. Dipartimento di Medicina Clinica e Scienze Immunologiche, Policlinico Le Scotte, Universita Degli Studi Di Siena, Italy
- Bachtiar EW, Bachtiar BM, Abas B, Harsas NA, Sadaqah NF, and Aprillia R, 2011. *Biocompatibility And osteoconductivity of bone xenograft, hydroxyapatite and hydroxyapatite-Nano Chitosan On osteoblast culture*, Badan Tenaga Nuklir nasional (BATAN) Jakarta-Indonesia
- Buckwalter JA, Glinicher MJ, Cooper RR, Recher R, 1995. *Bone biology. J. Bone Joint Surg*; 77(8): p.1256-72
- Compston JE, 2001. *Sex Steroid and Bone. In: Physiological reviews. The american physiology society*: p. 419-46
- Cusharon, 1998. *Basic Sciences. Electronic Textbook*: www.worldortho.com
- Food Sci Technol 10:37-51

- F Deal, W Casay, P Ceger, D Allen, M Nakamura, 2010. *International Validation Study of an In Vitro Cell Proliferation Test Method for Screening Potential Estrogenic Agonists and In MCF-7 Cells*, KoCVAM/NIFDS/KFDA, Seoul, Korea
- Fonseca, R.J., Walker, R.V., 2005. *Oral and Maxillofacial Trauma*, W.B. Saunders Company, Philadelphia
- Freshney R.I. *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. 4th Ed. New York Wiley-Liss, 2004:1-6, 78,89-104,309-12,329-37.
- Galli, S. J., Metcalfe, D. D., Arber, D. A & Dvorak, A. M. 2005a. Basophils and mast cells and their disorders. In: Beutler, E., Litchman, M. A, Collier, B. S., Kips, T. J., Seligsohn, U., editors. *Williams hematology*. New York : McGraw-Hill. p. 538-592.
- Gilfillan, A.M., & Tkaczyk, Ch. 2006. Integrated signaling pathways for mast cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 6:218-230.
- Habibovic P. Dan de Groot K. *Osteoinductive Biomaterial-properties and Relevance In Bone repair. J. Tissue Eng Regen Med.* 2007;1:25-32.
- Hansen, M.B. 2009. *J. Immunology Methode*, 119:203-210
- Hertz, M & Nemazee, D. 1998. Receptor editing and commitment in B lymphocytes. *Current opinion in Immunol.* 10:208-213.
- Hongming Zhuang, Wei Wang, A. David Tahernia, Craig L. Levitz, Wayne T. Luchetti, and Carl T. Brighton, 2006. *Mechanical Strain-Induced Proliferation of Osteoblastic Cells Parallels Increased TGF- β 1 mRNA.*, *Biochemical and Biophysical, Research Communication* 229,449-453. Philadelphia, Pennsylvania
- Kitamura, 1989. Heterogeneity of mast cell and phenotypic change between subpopulations. *Annu. Rev. Immunol.* 7:59-76.
- Kobayashi, Y., Daisuke Sakai, Toru Iwashina, Sadahiro, I. 2009. *Low Intensity Pulsed Ultrasound Stimulates Cell Proliferation Proteoglycan Synthesis and Expression of Growth Factor-Related Genes In Human Nucleus Pulposus Cell Line.* *European Cells and Material*, Vol 17 P: 15-22
- Kumar, V., and Robbins, S.L., 2005. *Basic Pathology*, 4.ed, pp.58-60
- Leeson, C.R., Leeson, T.S., Paparo, A.A., 2005 *Buku Ajar Histologi.*, ed.5, P. 106-117, EGC Jakarta
- Linke K, Achanz J, Hansmann J, Walles T, Brunner H, Mertsching H. *Engineered Liverlike Tissue on a Capillarized Matrix for Applied Research. Tissue Eng.* 2007;13(11):2699-707.
- Morgan SL, Saag KG, Julian BA, Blair H, 2001. *Osteopenic bone disease. Arthritis and allied condition* 14th ed. Editors: Koopman WJ. Philadelphia. Lippincott Williams and Wilkins. (122): p. 2449-97
- Puleo CM, Yeh HC, Wang TH. *Applications of MEMS Technologies in Tissue Engineering. Tissue Eng.* 2007;13(12):2839-54

- Ramsay TG. *Porcine preadipocyte proliferation and differentiation: A role for leptin?* J.Anim Sci. 2005;83(9):2066-74.
- Riis BJ, 1996. *The role of bone turnover in pathophysiology of osteoporosis. Br J Obstet Gynecol.* 103 (13): p. 9-15
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. *Biomechanical and molecular regulation of bone Remodeling. Annu. Rev. Biomed Eng.* 2006;8:4S5-98.
- Rosenberg AE, 2005. *Bones, joints and soft tissue tumors.* In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Robbins and Contran Pathologic Basic of Disease 8th ed.* Philadelphia: Elseiver Saunders. (26) ; p. 1273-03
- Scaffolds.* Rutgers University, New Jersey Governor's School of Engineering & Technology
- Siti Afeefah.MY, Rohaya Megat.AW, Sahidan Sanafi, 2011. *Proliferation and Biochemical Analysis Of Osteoblast, Osteoclast Differentiation From human Mononucleated Cells.* Sains Malaysiana 40 (4).305-309
- Supriyadi R. *Peningkatan produksi Endothelin-1 (ET-1) dan Pelepasan Radikal Bebas.pada Kultur Kardiomyosit dalam Keadaan Hipoksia.* Bandung. Universitas Padjadjaran.1999
- Spinner D.M, 2000. *MTT Growth Assay in Ovarian Cancer, In Ovarian Cancer and Protocol,* edited by Bartlett and M.S (Humana Press Inc), p 175-177
- Tada, H. 2006. *J.Immunology Methode*, 93.157-165
- Widjajanto, E, 2001. *Hubungan antara mastosit dengan hiposelularitas sumsum tulang melalui mediator leukotrien B-4 (LTB-4) dan tumor nekrosis factor- α (TNF- α), penelitian pada aspirat sumsum tulang dari penderita gangguan hematopoiesis.* Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Wilkes RP, McNulty AK, Feeley TD, Schmidt MA, Kieswetter K. *Bioreactor for Application of Subatmospheric Pressure to Three-Dimensional Cell Culture. Tissue En* 2007;13(12):3003-10.