

**DISERTASI**

**PENGARUH PENAMBAHAN SEL PUNCA DAN  
*CONDITIONED MEDIUM* DALAM KARBONAT APATIT  
TERHADAP EKSPRESI m-RNA GEN VEGF, KADAR  
VEGF SERUM DAN KECEPATAN PENUTUPAN  
DEFEK TULANG KEPALA TIKUS**

MAXIMILLIAN CHRISTIAN OLEY  
NIM P02003140039



**PROGRAM S3 ILMU KEDOKTERAN  
PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2019**



**PENGARUH PENAMBAHAN SEL PUNCA DAN  
*CONDITIONED MEDIUM* DALAM KARBONAT APATIT  
TERHADAP EKSPRESI m-RNA GEN VEGF, KADAR  
VEGF SERUM DAN KECEPATAN PENUTUPAN  
DEFEK TULANG KEPALA TIKUS**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat Mencapai Gelar Doktor

Program Studi

Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

**MAXIMILLIAN CHRISTIAN OLEY  
NIM P02003140039**

Kepada

**PROGRAM S3 ILMU KEDOKTERAN  
PROGRAM PASCA SARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2019**



## DISERTASI

### PENGARUH PENAMBAHAN SEL PUNCA DAN *CONDITIONED MEDIUM* DALAM KARBONAT APATIT TERHADAP EKSPRESI m-RNA GEN VEGF, KADAR VEGF SERUM DAN KECEPATAN PENUTUPAN DEFEK TULANG KEPALA TIKUS

disusun dan diajukan oleh

**MAXIMILLIAN CHRISTIAN OLEY**  
Nomor Pokok P02003140039

telah dipertahankan dalam sidang ujian disertasi  
pada tanggal 16 April 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui  
Komisi Penasehat,

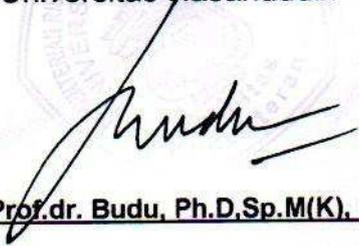
  
Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS (K)  
Promotor

  
Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK (K)  
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

  
Dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed., Ph.D  
Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin

  
Bukhari, M.Clin.Med, Ph.D, Sp.GK (K)  Prof.dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed



## SUSUNAN TIM PENELITIAN

Promotor : Prof. DR. dr. Andi Asadul Islam, SpBS(K)

Kopromotor : Prof. dr. Mochammad Hatta, PhD, SpMK(K)

Dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed., PhD

Penilai : Drs. Indra Bachtiar, Msi, PhD

DR. dr. Djoko Widodo, SpBS(K)

DR. dr. Ibrahim Labeda, SpB(KBD)

Prof. dr. Rosdiana Natsir, PhD, SpBiok

DR. dr. Ilham Jaya Pattelongi, Mkes

DR. dr. Khaeruddin Djawad, SpKK(K)



## PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : MAXIMILLIAN CHRISTIAN OLEY

Nomor Mahasiswa : P02003140039

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 16 April 2019

Yang menyatakan,

MAXIMILLIAN CHRISTIAN OLEY



## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa bahwa hanya atas restu dan karuniaNya lah disertasi penelitian ini berhasil penulis selesaikan.

Penderita defek kalvaria atau defek tulang kepala cukup banyak jumlahnya, diakibatkan karena prosedur operasi atau karena proses penyakit yang didapat. Hal ini menimbulkan permasalahan psiko-sosial-ekonomi pada penderita tersebut dan keluarganya. Prosedur pengobatan saat ini mempunyai kelebihan dan kekurangannya. Melalui penelitian ini penulis mencoba mengenalkan suatu prosedur terapi / cara yang lain untuk mengatasi kekurangan / kelemahan prosedur terapi yang dilakukan saat ini. Hasil penelitian telah menunjukkan suatu prosedur yang lebih baik, sehingga harapan penulis hasil penelitian ini menjadi suatu pilihan dalam mengobati penderita defek tulang kepala.

Penyusunan dan penyelesaian disertasi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Dalam kesempatan ini , saya dengan tulus menyampaikan ucapan terimakasih kepada : Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu MA selaku Rektor Universitas Hassanudin, Prof. Dr. Dr. Andi Asadul Islam, SpBS(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran UNHAS (periode 2014 – 2018). Prof. Dr. Budu, Sp.M(K), PhD, M.Med selaku Dekan Fakultas Kedokteran (2018 – sekarang), Prof. dr. Mochamad Hatta PhD.Sp.MK(K) , selaku Ketua

Studi S3 Kedokteran UNHAS (periode 2014-2018), Dr. Agussalim MSc., PhD., Sp.GK sebagai Ketua Program Studi S3 Kedokteran



UNHAS (periode 2018 – sekarang) yang telah memberi saya kesempatan untuk mengikuti Program Pendidikan Doktor Ilmu Kedokteran.

Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya kepada **Prof. Dr.dr. Andi Asadul Islam, SpBS(K)**, sebagai promotor yang dengan penuh perhatian dan kearifan senantiasa memotifasi, membuka wawasan, membimbing, mendorong dan meluangkan waktu di tengah kesibukan bagi penulis sejak penelitian pendahuluan hingga pada penulisan disertasi ini.

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya dengan tulus hati juga disampaikan kepada **Prof. dr. Mochamad Hatta PhD.Sp.MK(K)**, sebagai ko-promotor yang telah dengan penuh perhatian sebagai orangtua dengan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide, merangkul dan membantu saya sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.

Terimakasih sebesar-besarnya juga disampaikan kepada **dr. Marhaen Hardjo, PhD. M.Biomed**, sebagai ko-promotor yang telah banyak meluangkan waktu dalam membimbing, perhatian, masukkan yang tulus sehingga selesainya disertasi ini.

Ucapan terimakasih sebesar-besarnya disampaikan juga kepada para penguji: **Dr.dr.Ilhamjaya Patellongi, M.Kes, Indra Bachtiar, PHD, Dr.dr.Ibrahim Labeda, SpB-KBD, Prof.dr.Rosdiana Natzir, PhD.Sp.Biok, Dr.dr.Djoko Widodo, SpBS(K), Dr.dr. Khairuddin Djawad, SpKK(K).**

Yang terpenting dari semua keberhasilan ini adalah karena

dukungan dari istri tercinta **dr. Mendy Juniaty Hatibie, SpBP-RE(K)** dan **Matthew Christian Oley** yang telah memberi pengorbanan waktu,



pengertian dan senantiasa mendorong saya untuk tetap semangat dalam menyelesaikan penelitian ini.

Pada kesempatan ini saya juga menyampaikan penghargaan dan terimakasih setinggi-tingginya kepada semua rekan / sahabat di Laboratorium Stemcell and Cancer Institute Jakarta dan rekan / sahabat di Laboratorium V-Stem Inovasi Prima- Bogor yang telah membantu saya untuk menyelesaikan penelitian pendahuluan dan penelitian ini.

Saya juga menyampaikan banyak terima kasih kepada pimpinan, rekan sejawat dan seluruh jajaran Direksi / Staff dari **RS Siloam Manado dan RSUP Prof RD Kandou Manado** yang telah membantu dan mensupport saya dalam penelitian ini. Kepada Pimpinan dan jajaran dari Fakultas Kedokteran Universitas Pelita Harapan (UPH) dan khususnya mas Eka , **Prof. Dr.dr. Eka Julianta Wahjoepramono SpBS(K), SH** selaku Dekan FK UPH dan sebagai senior dan kakak bagi saya , yang selalu mendorong semangat untuk maju dan agar berprestasi baik. Terimakasih banyak juga kepada semua sahabat **Team Bedah Saraf Indonesia (TBS)** atas dukungan dan kerjasama selama ini.

Terima kasih banyak untuk teman-teman seperjuangan kelompok S-3 Siloam Manado, **DR.dr. Eko Prasetyo, SpBS(K), dr. Nova Satolom, SpM, dr. Julency Watung, SpPD, dr. Adelle Damapolii, SpRM, dr, Danny Ngantung, SpS, dr. Joni Rompis, SpA dan dr. Billy Salem, SpB(K)BD**, yang telah bekerjasama satu sama lain sehingga saya dapat

saikan disertasi ini.



Ucapan terima kasih dan penghargaan juga disampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sampaikan satu demi satu yang telah dengan tulus dan segenap hati membantu saya sejak awal hingga akhir dari proses pendidikan dan penelitian ini.

**Maximillian Christian Oley**



## ABSTRAK

**Maximillian Christian Oley.** Pengaruh penambahan Sel Punca dan *Conditioned Medium* dalam Karbonat Apatit terhadap ekspresi mRNA Gen VEGF, kadar VEGF Serum dan kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus. (dibimbing oleh Andi Asadul Islam, Mochamad Hatta dan Marhaen Hardjo)

Tujuan penelitian ini adalah untuk Membuktikan pengaruh penambahan Sel Punca dan *Conditioned Medium* dalam Karbonat Apatit terhadap ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF Serum dan kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus, disamping itu ada tujuan khusus: 1) Membuktikan kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus menggunakan perancah karbonat apatit lebih cepat pada yang diberikan sel punca dan *conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya. 2) Membuktikan ekspresi mRNA VEGF lebih tinggi pada yang diberikan sel Punca dan *Conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya. 3) Membuktikan kadar VEGF serum lebih tinggi pada yang diberikan sel punca dan *conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya. 4) Membuktikan adanya korelasi antara meningkatnya ekspresi mRNA VEGF dan kadar VEGF serum dan meningkatnya kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus

Desain penelitian ini menggunakan *Randomized Posttest only Control Group Design*. Subjek ditempatkan secara random kedalam kelompok-kelompok dan diekspose sebagai variabel independen diberi post test. Nilai-nilai post test kemudian dibandingkan untuk menentukan keefektifan perlakuan. Subyek penelitian Defek Tulang Kepala yang memenuhi kriteria sampel penelitian dibagi 9 (Sembilan) kelompok. Kelompok pertama sebagai kelompok kontrol tanpa perlakuan untuk diambil sampel darah. Kelompok lainnya dibagi 4 (empat) kelompok, diberikan perlakuan penambahan NaCL 0,9%, Sel Punca, Conditioned Medium dan Sel Punca dan Conditioned Medium. Masing-masing kelompok tersebut diberikan lempengan scaffold karbonat apatit A dan B. Scaffold A adalah lempengan karbonat apatit yang tidak berpori, sedangkan scaffold B adalah lempeng Karbonat Apatit yang berpori. Di ambil sampel darah untuk pengukuran kadar VEGF serum dan ekspresi mRNA gen VEGF saat sesudah diberikan perlakuan. Kedua kelompok memperoleh tindakan pengobatan dan perawatan yang sama.

Hasil penelitian ini menunjukkan hasil, pada pengamatan histologis osifikasi sempurna pada pemberian perancah Karbonat Apatit B (berpori-pori) beserta penambahan sel Punca dan Conditioned Medium yang mencapai 80%-100% baik pengamatan waktu 4 minggu dan 8 minggu. Pada pemeriksaan penanda biologis, didapatkan kadar



VEGF serum dan konsentrasi ekspresi mRNA VEGF lebih tinggi pada kelompok kelompok perlakuan yang diberikan sel punca dan kelompok sel punca + conditioned medium. Pada analisa statistik ditunjukkan hubungan linier antara konsentrasi ekspresi mRNA VEGF dengan kadar VEGF serum. Semakin tinggi ekspresi mRNA VEGF, semakin tinggi kadar VEGF serum dengan kontribusi ekspresi mRNA VEGF terhadap kadar VEGF serum dengan determinan ( $R^2$ ) sebesar 0,972 atau 97,2%. Artinya, kontribusi ekspresi mRNA sebesar 97,2% terhadap kadar VEGF serum.

Kata kunci: defek tulang kepala, sel punca, karbonat Apatit, VEGF serum, ekspresi mRNA VEGF



## ABSTRACT

**Maximillian Christian Oley.** The Effects of Stem Cells, Conditioned Medium and Carbonate Apatite combination on the levels of VEGF Serum and VEGF mRNA expression in cranial defect Bone Regeneration: An Animal study, (Supervised by Andi Asadul Islam, Mochamad Hatta and Marhaen Hardjo)

The purpose of this study was to prove the effect of addition of Stem Cells and Conditioned Medium in Carbonate Apatite on VEGF gene mRNA expression, Serum VEGF levels and speed of closure of mouse cranial defects, besides that there was a specific purpose:

1) Proving that the speed of closure of mouse head defects using carbonate apatite is faster than those given in Stem Cells and Conditioned Medium compared to other treatment groups. 2) Proving that VEGF mRNA expression is higher in those given Stem Cells and Conditioned Medium than in other treatment groups. 3) Prove that serum VEGF levels are higher in those given Stem Cells and Conditioned Medium than in other treatment groups. 4) Proving a correlation between increasing VEGF mRNA expression and serum VEGF levels and increasing the speed of closure of mouse cranial defects

The design of this study uses Randomized Posttest only Control Group Design. Subjects were placed randomly into groups and exposed as independent variables were given a post test. The post test values are then compared to determine the effectiveness of the treatment. The subjects of the Cranial Bone Defect who met the criteria for the study sample were divided into 9 (nine) groups. The first group as a control group without treatment for blood samples. The other group was divided into 4 (four) groups, given treatment of adding 0.9% NaCL, Stem Cells, Conditioned Medium and Stem Cells and Conditioned Medium. Each group was given a plate of carbonate apatite scaffold A and B. Scaffold A was a non-porous apatite carbonate plate, while Scaffold B was a porous Carbonate Apatite plate. Blood samples were taken for measurement of serum VEGF levels and VEGF gene mRNA expression after treatment. Both groups received the same treatment.

The results of this study show results, in histological observation the process of perfect ossification in the administration of scaffold Carbonate Apatite B (which is porous) along with the addition of Stem Cells and Conditioned Medium which reached 80% -100% both observations at 4 weeks and 8 weeks. On examination of biological markers, serum VEGF levels and concentrations of VEGF mRNA expression were higher in the treatment group given stem cells and conditioned medium + stem cell

in the statistical analysis indicated a linear relationship between the concentration of VEGF mRNA expression with serum VEGF levels. The higher the VEGF mRNA expression, the higher the serum VEGF level with a positive contribution of VEGF mRNA expression to serum VEGF levels with a



determinant ( $R^2$ ) of 0.972 or 97.2%. That is, the contribution of mRNA expression was 97.2% in serum VEGF levels.

Keywords: cranial defect, stem cells, carbonate apatite, serum VEGF, mRNA VEGF expression



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL</b>	i
<b>HALAMAN JUDUL</b>	ii
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b>	iii
<b>SUSUNAN TIM PENELITI</b>	iv
<b>PERNYATAAN KEASLIAN</b>	v
<b>PRAKATA</b>	vi
<b>ABSTRAK</b>	viii
<b>ABSTRACT</b>	xi
<b>DAFTAR ISI</b>	xiii
<b>DAFTAR TABEL</b>	xvii
<b>DAFTAR GAMBAR</b>	xviii
<b>DAFTAR SKEMA</b>	xxi
<b>DAFTAR GRAFIK</b>	xxii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan Umum	7
1.3.2 Tujuan Khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
1.4.1 Manfaat Akademis	7
1.4.2 Manfaat Praktis	7
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
Mekanisme Trauma Kepala	9
Mekanisme Defek Tulang Kepala	18
Kranioplasti	20



2.3 Osteogenesis Tulang Kepala	24
2.3.1 Pembentukan Kalvaria	29
2.4 Sel Punca (Stem Cell)	33
2.5 <i>Conditioned Medium</i>	40
2.6 Karbonat Apatit / Gama – CHA	42
2.6.1 Spesifikasi membrane / lempeng Scaffold Karbonat Apatit	57
2.7. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	60
2.7.1 Definisi	60
2.7.2 Klasifikasi VEGF	61
2.7.3 Mekanisme Kerja VEGF	62
2.7.4 Ekspresi VEGF	68
2.7.5 Metoda pemeriksaan ekspresi mRNA gen VEGF dan kadar protein VEGF serum	68
2.7.5.1 Ekstraksi Nucleic acid	68
2.7.5.2 Amplifikasi DNA dengan metode PCR	70
2.7.5.3 Analisa produk PCR dengan elektroforesis	71
2.7.5.4 Analisa Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) PCR	72
2.7.5.5 Direct sequencing	72
2.7.5.6 Cara kerja Realtime PCR untuk menentukan profil ekspresi mRNA gen VEGF	73
2.7.5.7 Perhitungan Kurva kalibrasi dengan Ct (cycle threshold)	75
2.7.5.8 Cara kerja Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) untuk menentukan kadar protein gen VEGF pada serum	77

### **BAB III KERANGKA TEORI**

3.1 Kerangka Teori	79
--------------------	----

### **BAB IV KERANGKA KONSEP**

Kerangka Konsep	80
Label	80



4.3 Hipotesis	81
4.4 Definisi Operasional	82
4.4.1 Karbonat Apatit	82
4.4.2 Sel Punca	82
4.4.3 Conditioned Medium	83
4.4.4 Ekspresi mRNA VEGF	83
4.4.5 Kadar Solubel VEGF	84

## **BAB V METODE PENELITIAN**

5.1 Desain Penelitian	85
5.2 Populasi dan Sampel	86
5.2.1 Populasi Sampel	86
5.2.2 Sampel Penelitian	86
5.2.3 Besar Sampel	86
5.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	87
5.3.1.1 Kriteria Inklusi	87
5.3.1.2 Kriteria Eksklusi	87
5.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	88
5.5 Evaluasi	88
5.6 Analisis Data	89
5.7 Etika Penelitian	89
5.8 Prosedur Peneliitan	91
5.9 Alur Peneliitan	94

## **BAB VI HASIL PENELITIAN**

6.1 Karakteristik Subyek Penelitian	95
6.2 Hasil Pemeriksaan Penanda Biologis	96
6.2.1 Kadar VEGF serum dan Konsentrasi mRNA VEGF tiap kelompok	96

## **BAB VII PEMBAHASAN**

Karakteristik Subyek Penelitian	142
Pengaruh Perancah Karbonat Apatit terhadap proses penutupan tulang kepala / osteogenesis dan pengamatan histologis	143



7.3 Proses signaling VEGF dan peranan Sel Punca pada penutupan defek tulang kepala / osteogenesis	152
<b>BAB VIII KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
8.1 Kesimpulan	160
8.2 Saran	161
<b>KEPUSTAKAAN</b>	162
<b>LAMPIRAN</b>	177



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 2-1</b> GCS Score	11
<b>Tabel 2-2</b> Komposisi Tulang Manusia	49
<b>Tabel 2-3</b> Komposisi Membran	58
<b>Tabel 2-4</b> Peranan Growth Factor dan molekul lainnya dalam osteogenesis	66
<b>Tabel 6-1</b> Deskripsi ekspresi mRNA VEGF dan kadar VEGF serum	97
<b>Tabel 6-2</b> Perbedaan kadar VEGF serum pd berbagai kelompok	98
<b>Tabel 6-3</b> Perbedaan kadar mRNA VEGF serum	100
<b>Tabel 6-4</b> Perbedaan kadar VEGF serum pada dua kelompok	103
<b>Tabel 6-5</b> Perbedaan ekspresi mRNA VEGF serum pd dua kelompok	105
<b>Tabel 6-6</b> Kelompok Perlakuan pada pemeriksaan histopatologi	108
<b>Tabel 6-7</b> Hasil Pemeriksaan Histopatologi	113
<b>Tabel 7-1</b> Deskripsi kadar VEGF serum & konsentrasi ekspresi mRNA VEGF	156
<b>Tabel 7-2</b> Deskripsi persentasi kecepatan osifikasi	157
<b>Tabel 7-3</b> Deskripsi kadar VEGF dan persentasi osifikasi	158



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 1-1</b>	Rekonstruksi CT Scan 3D	3
<b>Gambar 1-2</b>	Pasien Cedera Kepala Berat	3
<b>Gambar 2-1</b>	Fraktur Tulang Parietal	15
<b>Gambar 2-2</b>	Fraktur depressed tulang parietal	16
<b>Gambar 2-3</b>	Foto rontgen kepala AP	18
<b>Gambar 2-4</b>	Defek Kalvaria	19
<b>Gambar 2-5</b>	Defek Kalvaria	19
<b>Gambar 2-6</b>	Kranioplasti dengan autograft tulang rusuk	21
<b>Gambar 2-7</b>	Kranioplasti dengan bahan metal	22
<b>Gambar 2-8</b>	Kranioplasti dengan bahan plastik ( <i>polyetherketone</i> )	22
<b>Gambar 2-9</b>	Kranioplasti dengan <i>titanium mesh</i>	23
<b>Gambar 2-10</b>	Kranioplast dengan bubuk tulang	23
<b>Gambar 2-11</b>	Perbandingan Histologi jaringan tulang	29
<b>Gambar 2-12</b>	Histologi Tulang	30
<b>Gambar 2-13</b>	Fungsi pada regenerasi jaringan tulang	44
<b>Gambar 2-14</b>	Mikrostruktur Gama-CHA	47
<b>Gambar 2-15</b>	Bioresorbabilitas Gama-CHA	49
<b>Gambar 2-16</b>	Proses resorpsi tulang oleh osteoklast	50
<b>Gambar 2-17</b>	Proses resorpsi tulang oleh osteoklast	51
<b>Gambar 2-18</b>	Gambaran radiografis implantasi dengan Gama-CHA	52
<b>Gambar 2-19</b>	Gambaran histologi implantasi dengan Gama-CHA	53
<b>Gambar 2-20</b>	Cetakan Plastik PLA	57
<b>Gambar 2-21</b>	Mikrostruktur Membran CHA Berserat PGA 3515	59
<b>Gambar 2-22</b>	Mikrostruktur Membran CHA Berserat PGA 5010	59
<b>Gambar 2-23</b>	Mesin Thermal cycler Applied Biosystem 2720	71
<b>Gambar 2-24</b>	Alat Elektroforesis	71
<b>Gambar 2-25</b>	Alat squencer	73



<b>Gambar 3-1</b> Kerangka Teori	79
<b>Gambar 4-1</b> Kerangka Konsep	80
<b>Gambar 6-1</b> Histopatologi Tulang Temporal	116
<b>Gambar 6-2</b> Histopatologi Tulang Temporal	117
<b>Gambar 6-3</b> Histopatologi Tulang Temporal	118
<b>Gambar 6-4</b> Histopatologi Tulang Temporal	119
<b>Gambar 6-5</b> Histopatologi Tulang Temporal	120
<b>Gambar 6-6</b> Histopatologi Tulang Temporal	121
<b>Gambar 6-7</b> Histopatologi Tulang Temporal	122
<b>Gambar 6-8</b> Histopatologi Tulang Temporal	123
<b>Gambar 6-9</b> Histopatologi Tulang Temporal	124
<b>Gambar 6-10</b> Histopatologi Tulang Temporal	125
<b>Gambar 6-11</b> Histopatologi Tulang Temporal	126
<b>Gambar 6-12</b> Histopatologi Tulang Temporal	127
<b>Gambar 6-13</b> Histopatologi Tulang Temporal	128
<b>Gambar 6-14</b> Histopatologi Tulang Temporal	129
<b>Gambar 6-15</b> Histopatologi Tulang Temporal	130
<b>Gambar 6-16</b> Histopatologi Tulang Temporal	131
<b>Gambar 6-17</b> Histopatologi Tulang Temporal	132
<b>Gambar 6-18</b> Histopatologi Tulang Temporal	133
<b>Gambar 6-19</b> Histopatologi Tulang Temporal	134
<b>Gambar 6-20</b> Fraktur depressed tulang parietal	134
<b>Gambar 6-21</b> Histopatologi Tulang Temporal	135
<b>Gambar 6-23</b> Histopatologi Tulang Temporal	136
<b>Gambar 6-23</b> Histopatologi Tulang Temporal	137
<b>Gambar 6-24</b> Histopatologi Tulang Temporal	138
<b>Gambar 6-25</b> Histopatologi Tulang Temporal	139
<b>6-26</b> Histopatologi Tulang Temporal	140
<b>7-1</b> Gambar Produk Gama-CHA	147
<b>7-2</b> Proses osteogenesis	149



**Gambar 7-3** Proses Osteogenesis

150

**Gambar 7-4** Proses Osteogenesis

152



## DAFTAR SKEMA

<b>Skema 2-1</b> Jenis sel Punca	37
<b>Skema 2-2</b> Aplikasi klinis Conditioned Medium (CM)	42
<b>Skema 2-3</b> Diagram fase solubilitas karbonat apatit	50
<b>Skema 2-3</b> Jenis-jenis VEGF	64
<b>Skema 2-4</b> Diferensiasi osteoblast dan osteogen	67
<b>Skema 5-1</b> Rancangan Penelitian	86
<b>Skema 5-2</b> Alur Penelitian	94
<b>Skema 7-1</b> 3 komponen rekayasa jaringan	143
<b>Skema 7-2</b> HIF - VEGF Pathway	154



## DAFTAR GRAFIK

<b>Grafik 6-1</b> Box Plot kadar VEGF serum berdasarkan kelompok dan waktu pengamatan	96
<b>Grafik 6-2</b> Box Plot kadar VEGF serum berdasarkan kelompok dan waktu pengamatan	102
<b>Grafik 6-3</b> Box Plot kadar VEGF serum	104
<b>Grafik 6-4</b> Box Plot konsentrasi ekspresi mRNA VEGF serum	106
<b>Grafik 6-5</b> Scatter plot antara konsentrasi ekspresi mRNA VEGF dengan kadar VEGF serum	108
<b>Grafik 7-1</b> Scatter plot antara konsentrasi ekspresi mRNA VEGF dengan kadar VEGF serum	157



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Masalah

Kasus trauma kepala di Indonesia semakin meningkat seiring dengan pertambahan kepemilikan kendaraan roda dua (sepeda motor) di masyarakat. Sebagian besar ( 70,0% ) korban kecelakaan lalu lintas adalah pengendara sepeda motor yang berusia produktif ( 15-55 tahun ) dan berpenghasilan rendah. Trauma kepala ( 33,2%) menempati peringkat pertama pada urutan trauma yang dialami oleh korban kecelakaan lalu lintas ( Riyadina ,et al.,2009).

WHO ( 'World Health Organization' ) dalam "World Report on Road Traffic Injury Prevention" memprediksi pada tahun 2020 *brain injury* akan menjadi penyakit ketiga terbesar setelah HIV dan TBC. ( WHO, 2004 ).

Di Amerika, kasus trauma kepala mendekati 40% dari seluruh angka kematian akibat kecelakaan. Kurang lebih 2.000.000 korban trauma kepala dirawat di rumah sakit dan sebagian besar dengan cacat / defisit neurologis setiap tahun. Kebanyakan korban pada usia produktif 15 – 24 tahun. Biaya langsung yang dikeluarkan akibat hal ini sekitar 4 milyar dolar setiap tahun. Biaya tidak langsung berhubungan dng

an ini hampir 10 kali lipat besarnya. (Torner J, et all., 1999)



Selain itu peristiwa perang dan terorisme di belahan dunia lain, menyumbang banyak sekali kasus trauma kepala. Peningkatan jumlah yang bertahan hidup di perang Irak dan Afganistan di banding perang Vietnam karena kemajuan pelindung tubuh dan kecanggihan tindakan medik di medan perang. Oleh karena itu meningkat jumlah yang selamat dari *craniomaxillofacial combat injuries*. (Szpalski C., et all, 2010)

Patologi trauma kepala bisa didapatkan patah tulang tengkorak dan perdarahan dalam kepala / otak. Patah tulang tengkorak ada beberapa jenis seperti fraktur linier, fraktur impresi ataupun *bone loss* (ATLS 2014). Pada kedua patologi yang terakhir hampir dengan tindakan operatif ataupun tidak, hampir selalu didapatkan defek tulang, yang akan menghilangkan fungsi proteksi otak dan secara kosmetik tidak terlihat baik.

Selain akibat trauma, kejadian defek tulang kepala juga disebabkan karena kelainan kongenital seperti *craniosynostosis* (Adamo, et all, 2010), anterior - posterior meningocele (Suwanwela C, Suwanwela N. 1971), craniophagus (Padmosantjojo RM. 2005). Defek ini tidak akan serta merta menutup sesuai tumbuh kembang anak. Suatu studi tentang defek tulang kepala pada anak-anak menyatakan defek dengan diameter di atas 2,5 cm diperlukan tindakan kranioplasti, sebaliknya defek yang lebih kecil cukup dengan ditutup dengan graft dari fascia (Komolafe EO, et all. 2003). Studi lain mengatakan penutupan defek spontan terjadi

pada anak dibawah 2 tahun, tapi tanpa menyebutkan ukuran defek (Szpalski C., et all, 2010).



Defek tulang kepala yang besar dapat juga didapatkan pada tindakan operasi emergensi *craniectomy decompressive*. Prosedur operasi bedah saraf ini mengangkat sebesar mungkin tulang kepala (kalvaria) untuk menyediakan tempat bagi otak yang edema atau bengkak. Tindakan ini umumnya dilakukan pada trauma otak berat atau kejadian stroke intracranial luas. Jika pasien selamat atau sembuh, problem defek tulang kepala yang besar menjadi masalah fungsional ataupun kosmetik. (Kunze E, et al.1998., Schneider GH, et al, 2002., Skoglund TS, et al, 2006., Cooper DJ, et al, 2011., Servadei F, et al, 2011, Hutchinson PJ, et al.2006, Grant GA, et al 2004)

Gambar 1-1.

Gambar 1-2



Gbr.1-1 : Gambar Rekonstruksi CT Scan 3D, *critical size calvarial defect*

2 : Pasien cedera kepala berat yang menjalani tindakan kraniektomi kompresi, beberapa waktu setelah melewati fase edema otak.

(Dokumentasi pribadi)



Gambaran kualitas hidup atau keluhan pasien penderita defek kalvaria di Manado – Sulawesi Utara terangkum pada dua tulisan ilmiah SKRIPSI Mahasiswa Fakultas kedokteran; Gambaran Kualitas hidup pasien cedera kepala pasca operasi di RSUP Prof Kandou 2012-2013 dan Gambaran kualitas hidup pasien defek kalvaria di RSUP Prof Kandou 2014 – 2015. Yang menyimpulkan adanya perasaan tidak nyaman di kepala karena defek kalvaria, disamping keluhan lainnya seperti nyeri kepala, kelumpuhan, kejang, dll (Senduk K, et all 2015, Zwingly P, et all, 2015).

Dalam proses penyembuhan defek tulang yang relatif kecil akan menutup, tapi defek tulang kepala yang besar (*critical size defect*) proses penutupan defek tulang lama atau bahkan tidak menutup. Sampai sekarang ini untuk menutup defek tulang kepala tersebut digunakan implan sintetis yang diupayakan murah, mudah dibentuk dan tidak timbul reaksi penolakan dari tubuh. Seperti *dari bahan metal, plastik*, keramik, dan sekarang ini berkembang polimer / biomaterial yang dapat diserap, atau diambil bahan tulang dari tempat lain di tubuh. (Harris DA, et All. 2014, Springer IN, et all. 2005, Chiarini, et all. 2004, Sanan A, et all. 1997)

Solusi pemakaian implan diatas selain biaya implan yang masih tergolong mahal, mempunyai resiko infeksi yang cukup besar, pasien secara psikologis terbebani karena memakai benda asing di kepalanya.

(e JN, et all. 2003) Selalu timbul pertanyaan apakah akan menimbulkan reaksi tidak baik pada otak / tubuh, dan apakah jika



beraktifitas diluar rumah pada saat hujan akan tersambar petir? (untuk pemakaian *titanium mesh*).

Jika memakai implan tulang sendiri, timbul rasa takut karena menimbulkan luka operasi tambahan lainnya ditubuh dan nyeri atau rasa tidak enak ditempat bekas operasi pengambilan tulang.

Hal-hal seperti inilah yang selalu menimbulkan permasalahan pada pemakaian implan di kepala.

Atas dasar permasalahan tersebut diatas terpikirkan ide cara menutup defek tulang kepala menggunakan perancah tulang Karbonat Apatit yang lebih mirip komposisinya dengan tulang manusia dibanding perancah yang dipakai sekarang. (Ana ID. 2014) Penambahan *Stem Cell* / sel punca dan *Conditioned medium* / media terkondisi yang mengandung hormon pertumbuhan tentunya akan mempercepat proses penulangan. Dalam proses penutupan defek tulang kepala tersebut dinilai *biomarker* / penanda biologis ekspresi gen *Vascular Endothelial Growth Factor (mRNA VEGF)* serta kadar protein VEGF dalam serum. Dengan tujuan melihat pengaruh tingkat gen VEGF terhadap kualitas penutupan defek tulang kepala.( Aydin, et all.2011., Biazar E, et all. 2015, .Scaffler et all.2007., Cabraja,et all. 2009., Casteilla et all, 2011, Dimitrov, et all. 2017, Eckardt H, et all, 2003., Dervi S, et all, 2011., Gabay, et all, 2011., Harirs et all, 2014. Thesleff T, et all 2011, ).



## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas maka permasalahan yang dapat dirumuskan adalah sebagai berikut:

**Bagaimana pengaruh penambahan Sel Punca dan *Conditioned Medium* dalam Karbonat Apatit terhadap ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF Serum, kualitas penutupan defek tulang kepala tikus?**

Dan dirinci dalam beberapa Pertanyaan Penelitian, sbb:

1. Apakah kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus menggunakan scaffold karbonat apatit lebih baik pada yang diberikan sel punca dan *conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya?
2. Apakah ekspresi mRNA VEGF lebih tinggi pada yang diberikan sel Punca dan *Conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya?
3. Apakah kadar VEGF serum lebih tinggi pada yang diberikan sel punca dan *conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya?
4. Apakah ada korelasi antara meningkatnya ekspresi mRNA gen VEGF dan kadar VEGF serum dan meningkatnya kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus?



### 1.3. Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

**Membuktikan pengaruh penambahan Sel Punca dan *Conditioned Medium* dalam Karbonat Apatit terhadap ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF Serum dan kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus**

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus menggunakan peranca karbonat apatit lebih cepat pada yang diberikan sel punca dan *conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya.
2. Membuktikan ekspresi mRNA VEGF lebih tinggi pada yang diberikan sel Punca dan *Conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya.
3. Membuktikan kadar VEGF serum lebih tinggi pada yang diberikan sel punca dan *conditioned medium* dibanding pada kelompok perlakuan lainnya.
4. Membuktikan adanya korelasi antara meningkatnya ekspresi mRNA VEGF dan kadar VEGF serum dan meningkatnya kecepatan penutupan defek tulang kepala tikus.



## **1.4. Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Akademik**

Memberikan sumbangan pemikiran pada dunia kedokteran khususnya bidang Bedah Saraf mengenai penggunaan Sel Punca pada Karbonat Apatit untuk mempercepat proses penutupan defek tulang kepala dan hubungannya dengan ekspresi mRNA gen VEGF dan kadar protein VEGF dalam serum.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

1. Metoda penggunaan Sel Punca dan Karbonat Apatit dapat ditambahkan mengikuti prosedur operasi konvensional
2. Menambah alternatif modalitas material pengganti untuk menutup defek tulang kepala yang mirip dengan tulang manusia
3. Mengetahui hubungan ekspresi mRNA gen VEGF dan kadar protein VEGF dalam serum pada proses penutupan defek tulang kepala



## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Patomekanisme Trauma Kepala

Cedera kepala adalah cedera pada kulit kepala, tulang tengkorak, jaringan otak atau kombinasi dari masing-masing bagian tersebut. Di bidang Ilmu Penyakit saraf cedera kepala lebih tepat dengan istilah cedera kranioserebral; cedera terhadap jaringan otak, selaput otak dan pembuluh darahnya.

Patomekanik cedera kepala dapat di golongan menjadi 2 yaitu cedera kepala primer dan cedera kepala sekunder. Cedera kepala primer merupakan suatu proses biomekanik yang dapat terjadi secara langsung saat kepala terbentur atau karena proses akselerasi-deselerasi dan memberi dampak cedera jaringan otak dan terjadi pada masa akut, yaitu terjadi segera saat benturan terjadi. Kerusakan primer ini dapat bersifat ( fokal ) lokal, maupun difus. Kerusakan fokal yaitu kerusakan jaringan yang terjadi pada bagian tertentu saja dari kepala, sedangkan bagian relatif tidak terganggu. Kerusakan difus yaitu kerusakan yang sifatnya berupa disfungsi menyeluruh dari otak dan umumnya bersifat makroskopis.

Cedera kepala sekunder terjadi akibat cedera kepala primer yang tidak diterapi atau tidak dapat dihindari. Peran seorang klinisi dalam hal ini, "Mencegah terjadinya cedera kepala sekunder". (ATLS 2014)



Cedera kepala diklasifikasikan dalam berbagai aspek. Secara praktis cedera kepala diklasifikasikan berdasarkan : mekanisme, beratnya dan morfologi cedera kepala.

### **Mekanisme Cedera Kepala**

Berdasarkan mekanisme cedera kepala dibagi atas

a. Cedera kepala tumpul, dapat terjadi karena:

- Kecepatan tinggi berhubungan dengan kecelakaan mobil- motor.
- Kecepatan rendah, biasanya disebabkan jatuh dari ketinggian atau dipukul dengan benda tumpul.

b. Cedera kepala tajam/ tembus, dapat disebabkan oleh:

- cedera peluru
- cedera tusukan

Adanya penetrasi selaput dura menentukan apakah suatu cedera termasuk cedera tembus atau cedera tumpul. (ATLS 2014)

### **Beratnya Cedera Kepala**

*Glasgow Coma Scale* (GCS) digunakan untuk menilai secara kuantitatif kelainan neurologis dan dipakai secara umum dalam deskripsi beratnya penderita cedera kepala. Penilaian GCS terdiri atas 3 komponen diantaranya respon membuka mata, respon motorik dan respon verbal. (ATLS 2014)



Tabel 2-1. Glasgow Coma Scale

TABLE 38-2		
Glasgow Coma Scale		
BEHAVIOR	RESPONSE	SCORE
Eye opening response	Spontaneously	4
	To speech	3
	To pain	2
	No response	1
Best verbal response	Oriented to time, place, and person	5
	Confused	4
	Inappropriate words	3
	Incomprehensible sounds	2
	No response	1
Best motor response	Obeys commands	6
	Moves to localized pain	5
	Flexion withdrawal from pain	4
	Abnormal flexion (decorticate)	3
	Abnormal extension (decerebrate)	2
	No response	1
Total score:	<i>Best response</i>	15
	<i>Comatose client</i>	8 or less
	<i>Totally unresponsive</i>	3

Tabel 2-1. GCS Score

(<http://www.firstaidforfree.com/wp-content/uploads/2013/11/GCS.jpg>)

**Berdasarkan skor GCS, beratnya cedera kepala dibagi atas :**

a. Cedera kepala ringan : GCS 14 – 15

b. Cedera kepala sedang : GCS 9 – 13

c. Cedera kepala berat : GCS 3 – 8



## Morfologi Cedera Kepala

Secara morfologi cedera kepala dapat dibagi atas cedera jaringan lunak, fraktur tulang tengkorak, dan cedera otak.

## Cedera Jaringan Lunak

Jaringan lunak kepala terdiri dari 5 lapisan (S-C-A-L-P), yaitu:

- **Skin (kulit)**, sifatnya tebal dan mengandung rambut dan kelenjar keringat (Sebacea)
- **Connective tissue (jaringan subkutis)**, jaringan ikat lemak, kaya akan pembuluh darah terutama di atas Galea. Pembuluh darah tersebut merupakan anastomosis arteri karotis interna dan eksterna, lebih dominan arteri karotis eksterna. Sebagian besar serabut saraf sensorik kulit kepala terdapat pada lapisan S dan C, oleh sebab itu, anestesi infiltrat ditujukan ke lapisan ini
- **Aponeurosis Galea**, merupakan lapisan terkuat, berupa fascia yang melekat pada 3 otot, yaitu musculus frontalis (ke anterior), musculus occipitalis (ke posterior), dan musculus temporoparietalis (ke lateral). Ketiga otot ini dipersarafi oleh nervus fasialis (N.VII)
- **Loose areolar tissue (jaringan areolar longgar)**, mengandung vena emissary yang merupakan vena tanpa katup (*valveless vein*), menghubungkan SCALP, vena diploica, dan sinus vena intrakranial. Avulsi

biasanya terjadi pada lapisan ini. Hematoma yang terbentuk pada ini disebut subgaleal hematom, paling sering ditemukan setelah



cedera kepala, terutama pada anak-anak. Aspirasi terhadap subgaleal hematom sebaiknya tidak dilakukan karena resiko infeksi, kecuali terjadi subgaleal hematom masif maka harus dilakukan aspirasi dan balut tekan.

- **Pericranium**, merupakan periosteum yang melapisi tengkorak, melekat erat terutama pada sutura karena melalui sutura ini periosteum akan langsung berhubungan dengan endosteum (yang melapisi permukaan dalam tulang tengkorak). Hematom di antara lapisan periosteum dan tulang tengkorak disebut *Cephal hematoma (subperiosteal hematoma)*, terjadi terutama pada neonatus yang disebabkan oleh pergeseran dan perubahan bentuk tulang tengkorak saat di jalan lahir, atau terjadi setelah fraktur tulang tengkorak. Biasanya terbatas pada satu tulang (dibatasi oleh sutura), dan terfiksir pada perabaan dari luar, lapisan kulit di atasnya dapat digerakkan dengan mudah. Hal ini membedakannya dengan *caput succedaneum* dan subgaleal hematom. Hematom ini akan diresorpsi sendiri.

#### Trauma pada SCALP meliputi:

- Abrasi (ekskoriasi), terbatas pada lapisan kulit.
- Laserasi, luka telah melebihi ketebalan kulit, dapat mencapai tulang tanpa disertai pemisahan lapisan SCALP.
- Kontusio, berupa memar pada SCALP, bisa disertai hematom seperti subgaleal hematom dan cephal hematoma.
- Avulsi, luka pada scalp disertai dengan pemisahan lapisan SCALP, terjadi pada lapisan *loose areolar tissue*.



## **Fraktur Tulang Tengkorak (ATLS 2014)**

Tulang tengkorak terdiri dari tiga lapisan, yaitu tabula eksterna, diploe, dan tabula eksterna.

Klasifikasi fraktur tulang tengkorak berdasarkan:

- Gambaran fraktur, dibedakan atas: linier, diastase, comminuted, depressed
- Lokasi anatomis, dibedakan atas: konveksitas (kubah tengkorak), basis cranii (dasar tengkorak)
- Keadaan luka, dibedakan atas: tertutup, terbuka

Deskripsi keadaan fraktur dapat menggunakan ketiga kombinasi klasifikasi di atas.

Secara sederhana maka fraktur kranium dibagi :

- a. Kalvaria
  1. Linear atau stelata
  2. Depressed atau nondepressed
  3. Terbuka atau tertutup
- b. Dasar tengkorak
  1. Dengan atau tanpa kebocoran CNS
  2. Dengan atau tanpa paresis N VII



### **Fraktur Linier**

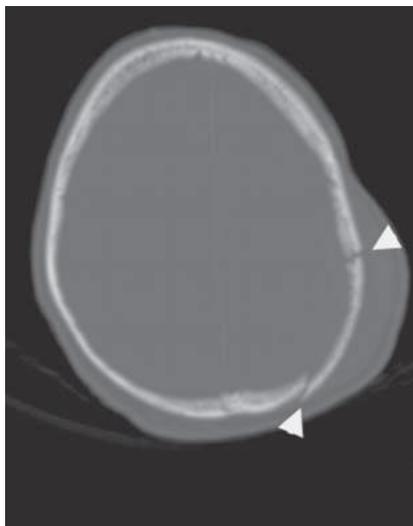
Fraktur linier merupakan garis fraktur tunggal pada tengkorak yang meliputi seluruh ketebalan tulang. Pada pemeriksaan radiologi akan terlihat sebagai garis radiolusen.

### **Fraktur Diastase**

Fraktur yang terjadi pada sutura sehingga terjadi pemisahan sutura kranial. Fraktur ini sering terjadi pada anak di bawah usia 3 tahun.

### **Fraktur Comminuted**

Fraktur dengan 2 atau lebih fragmen fraktur



Gambar 2-1.

Fraktur tulang parietal kiri (tanda panah) dengan kontusio jaringan lunak.



## Fraktur Depressed

Diartikan sebagai fraktur dengan tabula eksterna pada 1 atau lebih tepi fraktur terletak di bawah level anatomik normal dari tabula interna tulang tengkorak sekitarnya yang masih utuh. Jenis fraktur ini terjadi jika energi benturan relatif besar terhadap area benturan yang relatif kecil. Pada gambaran radiologis akan terlihat suatu area 'double density' (lebih radio-opaque) karena adanya bagian-bagian tulang yang tumpang tindih.



Gambar 2-2. Fraktur depressed tulang parietal

## Fraktur Konveksitas

Yaitu fraktur yang terjadi pada tulang-tulang yang membentuk konveksitas (kubah) tengkorak seperti os. Frontalis, os. Temporalis, os. Parietalis, dan os. Occipitalis.



## **Fraktur Basis Cranii**

Yaitu fraktur yang terjadi pada tulang yang membentuk dasar tengkorak. Dasar tengkorak terbagi atas 3 bagian yaitu fossa anterior, fossa media, dan fossa posterior.

Fraktur pada masing-masing fossa akan memberikan manifestasi yang berbeda.

### **Fraktur Basis Cranii Fossa Anterior**

Bagian posterior dari fossa anterior dibagi oleh os. Sphenoid, processus clinoidalis anterior dan jugum sphenoidalis.

### **Fraktur Basis Cranii Fossa Media**

Bagian anterior langsung berbatasan dengan fossa anterior, sedangkan bagian posterior dibatasi oleh pyramida petrosus os. Temporalis, processus clinoidalis posterior dan dorsum sella.

### **Fraktur Basis Cranii Fossa Posterior**

Merupakan dasar dari kompartemen infratentorial.

Adanya fraktur pada daerah ini harus waspada kemungkinan timbulnya hematoma. Sering tidak disertai dengan gejala dan tanda yang jelas, tetapi dapat segera menimbulkan kematian karena penekanan terhadap batang otak.



## 2.2. Patomekanisme Defek Tulang Kepala

Defek tulang kepala terjadi karena trauma kekuatan besar langsung mengenai permukaan tulang tengkorak, dengan berbagai macam patologi seperti trauma tumpul ataupun trauma tajam. (Sanan A, et all 1997, ATLS 2014)

Trauma tumpul akibat benturan langsung tulang kepala ke benda keras seperti kepala membentur aspal pada kecelakaan motor, kepala membentur kaca depan pada tabrakan mobil. Trauma tajam akibat tulang kepala membentur permukaan yang tajam dengan momentum yang besar seperti luka tembak peluru, tertusuk anak panah atau tombak, dibacok dengan parang, dan banyak patologi lainnya yang menyebabkan *fraktur impresi* atau tulang kepala hilang (*bone loss*).

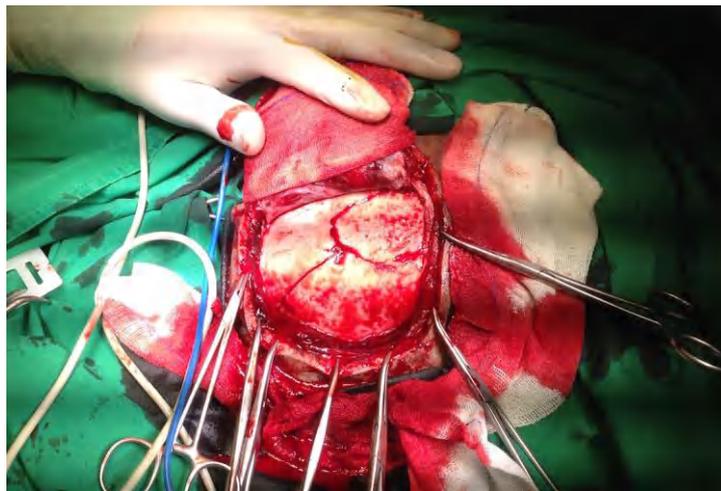


Gambar 2-3. Foto Rontgen Kepala AP / Lateral

Menunjukkan *Bone Loss* / Defek Kalvaria pada Regio Parietal



Tulang kepala yang hilang akan langsung menyebabkan defek tulang kepala, sedangkan fraktur impresi baik itu tertutup atau terbuka, karena prosedur tindakan operasi yang mengharuskan tindakan **kraniektomi dekompresi** yaitu melepas tulang kepala akan juga menyebabkan defek tulang kepala. (Hutchinson PJ, et all.2006, Grant GA, et all. 2004)



Gambar 2-4  
Defek Kalvaria karena tindakan Kraniektomi pada Depressed Fraktur  
(Dokumentasi Pribadi)



Gambar 2-5  
Defek kalvaria akibat tindakan Kraniektomi Dekompresi Bilateral

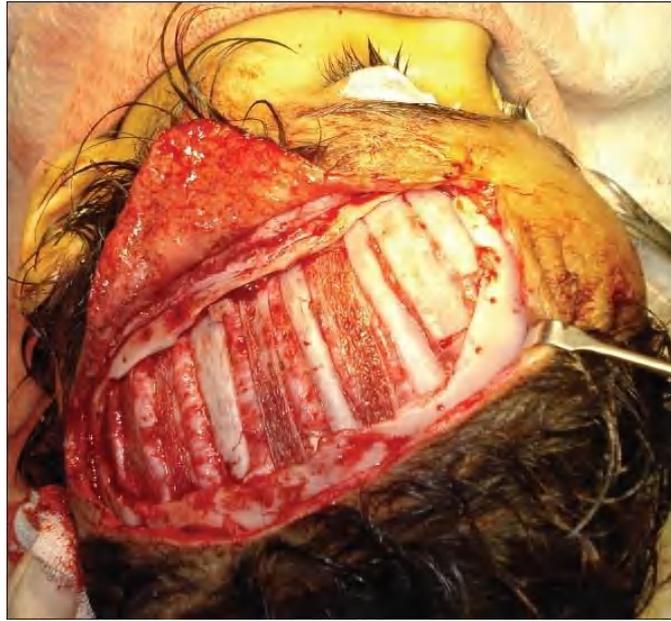


### 2.2.1. Kranioplasti

Kranioplasti adalah prosedur tindakan bedah untuk memperbaiki cacat atau kelainan bentuk tengkorak / kalvaria. Tindakan Kranioplasti hampir sama kuno dengan tindakan trepanasi. Ada bukti tertulis ahli bedah Inca dan Muisca melakukan kranioplasti menggunakan logam mulia dan labu. Penggunaan graft tulang pertama di kemukakan oleh Job Janzoon Van Meekeren, yang pada tahun 1668 tercatat bahwa tulang anjing digunakan untuk graft memperbaiki defek tengkorak seorang pria Rusia. Pada akhir abad 19 mulai diperkenalkan kranioplasti menggunakan autograft. Banyaknya insidens pada peristiwa perang di awal abad 20 menjadikan Kranioplasti menjadi populer, muncul penelitian untuk mencari logam dan plastik alternatif untuk menutupi defek kalvaria tersebut. Polimetil metakrilat (PMMA) adalah implat yang diproduksi besar-besaran sejak tahun 1940 yang masih dipakai sampai sekarang (Gordon, et al. 2014, Sanan A, et al 1997, Stephan SJ, et al.2010, Chiarini L, et al 2004, Springer IN, et al 2005).

Autograft biasanya menggunakan tulang kepala pasien tersebut yang diambil dari sisi lainnya yang sehat. Dilakukan dengan memisahkan lapisan tabula interna dengan tabula externa menggunakan alat khusus, sehingga kedua defek tulang yang ada dapat ditutup. Tepi-tepi tulang di ikat menggunakan benang, kawat ataupun sistim *plate and screw*.





Gambar 2-6  
Kranioplasti dengan autograft tulang rusuk  
(Singh AK, et all. 2011)

Allograft Implan yang digunakan untuk menutup defek tulang kepala berasal dari berbagai macam bahan seperti, plastik, keramik, metal maupun implan tulang dari bagian tubuhnya sendiri (Barone CM, et all.1997, Eufinger K, et All. 2002, Haris DA, et all. 2014, Lee C, et all. 1995).

Namun implan ini mempunyai resiko besar terjadinya infeksi, karena dianggap sebagai benda asing oleh tubuh. Selain itu harganya tidak murah, tentu sulit untuk di aplikasikan pada pasien-pasien yang kurang mampu.

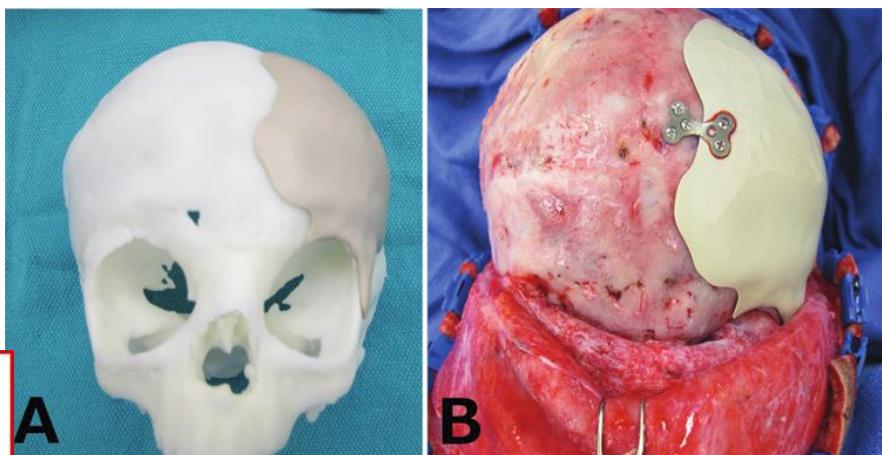




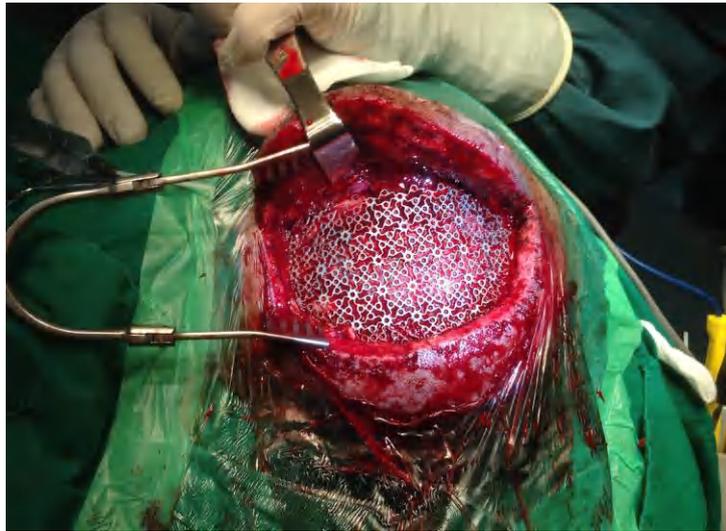
Gambar 2-7. Kranioplasti dengan bahan metal  
(Haris DA, et all.2014)

Pada banyak kasus tindakan Kranioplasti mempunyai resiko penyembuhan luka lama sehingga defek tulang tidak menutup, terjadi infeksi, ataupun luka sembuh tapi defek tulang kepala tetap ada.

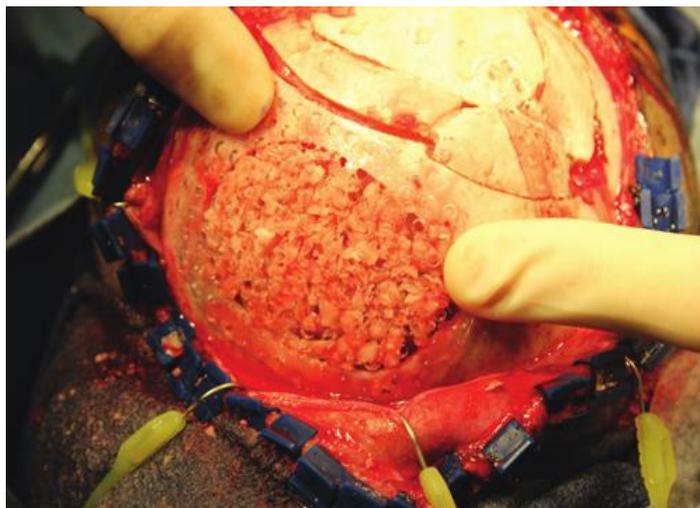
Defek tulang kepala menjadi permasalahan tersendiri pada kasus-kasus trauma kepala. Selain fungsi proteksi dari jaringan otak yang berkurang, fungsi kosmetik juga menjadi keluhan serius dari penderita.



Gambar 2-8. Kranioplasti dengan bahan plastik (polyetherketone)  
Haris DA, et all.2014



Gambar 2-9. Kranioplasti dengan Titanium Mesh  
(Dokumentasi Pribadi)



Gambar 2-10. Kranioplasti dengan bubuk tulang  
Haris DA, et all.2014



### 2.3. Osteogenesis Tulang Kepala

Jaringan tulang merupakan komponen dari sistem skeletal tubuh yang berfungsi sebagai penyangga tubuh. Secara makroskopis, tulang terdiri dari dua bagian yaitu bagian kompakta yang disebut tulang kortikal dan bagian spongiosa yang disebut tulang trabekula.

Tulang kortikal merupakan jaringan ikat kompleks yang mengalami mineralisasi sehingga secara mikroskopis bagian tulang kompakta ini dilihat sebagai material biokomposit. Material biokomposit tulang terdiri dari matriks organik, yaitu protein kolagen (95%), dan substansi anorganik, yaitu protein non kolagen (5%). Kolagen membentuk lapisan-lapisan lamela yang mengelilingi osteon. Di sepanjang itu terdapat kanal yang berisi pembuluh darah dan saraf. Kolagen dalam bentuk lamela ini membentuk tulang kompakta. Di antara matriks lamela, terdapat osteosit yang menerima dan mentransfer nutrisi. Selain kolagen, matriks organik tulang juga berupa protein non kolagen. Protein non kolagen ini berperan dalam remodelling. Bagian tulang spongiosa disebut juga dengan sumsum tulang. Sumsum tulang merupakan sumber *mesenchymal stem cell* atau sel punca mesenkimal. Sel punca mesenkimal merupakan sel pluripoten yang mampu berdiferensiasi menjadi berbagai sel seperti sel lemak, sel tulang rawan atau sel tulang. (Barry FP, et al. 2004, Bianco P, et al, 2001, Gronthos S, et al. 2003)

Proses pembentukan tulang merupakan suatu kaskade diferensiasi hierarkis. Tahap pembentukan tulang dimulai dari perkembangan sel



punca mesenkim menjadi pre osteoblas kemudian menjadi osteoblas. Osteoblas ini akan aktif menjadi osteoblas dewasa yang menjadi osteosit. Diferensiasi osteogenik terdiri dari tiga tahap yaitu proliferasi selular, maturasi selular dan mineralisasi matriks. Osteoblas merupakan sel tulang yang imatur dan mensekresi matriks osteoid yang akan membentuk kalsifikasi matriks ekstraselular. Matriks ini terdiri dari kolagen dan glikoprotein.

Osteoblas aktif yaitu sel mononukleus berbentuk sferis. Sel ini mensintesis dan mensekresi molekul makro matriks tulang yaitu kolagen. Selain kolagen, osteoblas juga mensekresi enzim alkaline phosphatase (ALP) yang berfungsi sebagai katalisator. Osteoblas dewasa berbentuk kuboid dan kaya akan sitoplasma organel. Pada tahap ini sekresi osteoblas berupa ALP dan protein non kolagen seperti fibronektin, fibrokalsin, osteokalsin. Sel ini memproduksi mineral kalsium ekstraseluler dan intraseluler. Osteosit adalah sel tulang yang matur. Osteosit merupakan osteoblas yang telah tertanam di dalam matriks tulang yang mengalami kalsifikasi. Bone lining cells terdapat di sepanjang permukaan tulang, yang akan melakukan pembentukan tulang atau resorpsi tulang.

Pertumbuhan tulang dimulai sejak umur embrio 6-7 minggu dan berlangsung sampai 17 tahun. Pertumbuhan tulang ini akan lengkap pada bulan ketiga kehamilan. Pertumbuhan tulang bayi didalam kandungan dipengaruhi oleh hormon plasenta dan kalsium. Setelah anak lahir, proses

uhan dipengaruhi oleh hormon pertumbuhan, kalsium dan aktivitas  
ari. Osteoblast dan osteoklas inilah yang berperan dalam proses



pertumbuhan (Abdallah BM, et all. 2006, Barry E, et all. 2004, Greene WB. 2008, Phan et all, 2004, Niida, et all. 1999, Zhang Z, et all.1998, Li P, et all. 2013).

Osifikasi dimulai dari sel-sel mesenkim, bila daerah tersebut banyak mengandung pembuluh darah maka akan membentuk osteoblast, bila tidak mengandung pembuluh darah akan membentuk kondroblas.

Pada awalnya pembuluh darah menembus perichondrium di bagian tengah tulang rawan, merangsang sel-sel perichondrium berubah menjadi osteoblast. Osteoblas ini akan membentuk suatu lapisan tulang kompakta, perichondrium berubah menjadi periosteum. Bersamaan dengan proses ini pada bagian dalam tulang rawan di daerah diafisis yang disebut juga pusat osifikasi primer, sel-sel tulang rawan membesar kemudian pecah sehingga terjadi kenaikan pH menjadi basa yang mengakibatkan deposit zat kapur, dengan demikian terganggu nutrisi semua sel-sel tulang rawan dan menyebabkan kematian pada sel-sel tulang rawan dengan demikian terjadi degenerasi dan pelarutan zat-zat interseluler bersamaan dengan masuknya pembuluh darah ke daerah ini, sehingga terbentuk rongga untuk sumsum tulang.

Pada tahap selanjutnya pembuluh darah akan memasuki daerah epifise sehingga terjadi pusat osifikasi sekunder yaitu tulang spongiosa. Tulang rawan dikedua ujung epifise berperan penting dalam pergerakan sendi dan satu tulang rawan diantara epifise dan diafise ini disebut cakram epifise.



pertumbuhan, sel-sel tulang rawan pada cakram epifise terus hancur dan hancur, diganti dengan tulang di daerah diafise, dengan

demikian tebal cakram epifise tetap sedangkan tulang akan tumbuh memanjang. Proses terbentuknya tulang terjadi dengan 2 cara yaitu osifikasi endokondral dan osifikasi intramembranosa. Osifikasi endokondral adalah pembentukan tulang dari sel-sel mesenkim yang berdiferensiasi lebih dulu menjadi kartilago kemudian berubah menjadi tulang, contohnya pembentukan tulang panjang. Osifikasi intramembranosa adalah pembentukan tulang oleh osteoblast yang terdapat dalam membran fibrosa, contohnya tulang pipih pada tengkorak.

Osifikasi intramembranosa atau osteogenesis intramembranosa atau osteogenesis desmali adalah tulang yang terbentuk dalam membran jaringan. Pada mulanya jaringan mesenkim mengalami kondensasi menjadi lembaran jaringan pengikat yang banyak mengandung pembuluh darah sehingga matriks yang terbentuk memiliki anyaman pembuluh darah. Pada proses awal ini, sel mesenkim akan mengalami diferensiasi menjadi osteoblas yang memulai sintesis dan sekresi osteoid. Osteoid kemudian bertambah sehingga berbentuk trabekula yang tebal. Sementara itu juga berlangsung sekresi molekul tropokolagen yang akan membentuk kolagen dan sekresi glikoprotein.. Setelah itu, terjadi proses pengendapan garam kalsium fosfat pada sebagian matriks dan sebagian lagi matriks osteoid yang dikelilingi oleh osteoblas. Dengan menebalnya trabekula, beberapa osteoblas akan terbenam dalam matriks yang mengapur sehingga sel tersebut dinamakan osteosit (Greene WB. 2008, Gray H. 2000, Phillips AM,

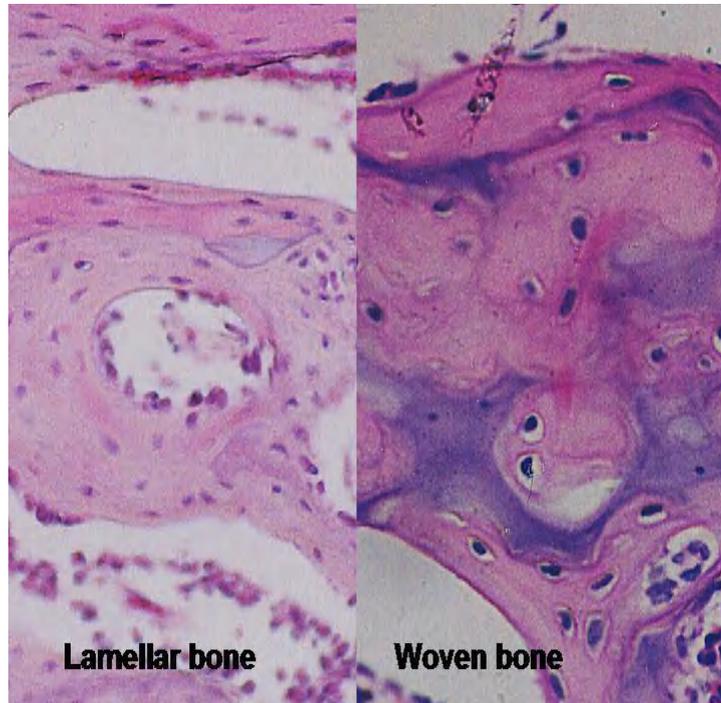


Pada pemeriksaan histologi menggunakan mikroskop, terdapat dua komponen utama yaitu tulang primer dan tulang sekunder. Kedua jenis ini memiliki komponen yang sama tetapi tulang primer mempunyai serabut kolagen yang tersusun secara acak, sedangkan tulang sekunder memiliki serabut kolagen yang tersusun secara teratur .

Dalam pembentukan tulang atau dalam proses penyembuhan tulang, maka tulang yang tumbuh pada awal berupa tulang muda atau tulang primer. Pembentukan tulang primer ini bersifat sementara. Susunan tulang ini berupa anyaman sehingga disebut sebagai *woven bone*. Susunan tulang ini terbentuk pada saat osteoblas membentuk osteoid secara cepat dan terdiri dari serat kolagen yang tidak teratur pada osteoid, lebih banyak osteosit, memiliki kandungan garam mineral yang sedikit sehingga mudah ditembus oleh sinar X. Kemudian jaringan tulang primer ini menjadi jaringan tulang sekunder yang secara fisik lebih kuat.

Jaringan tulang sekunder dikenal sebagai *lamellar bone*. Jaringan tulang sekunder ini terdiri dari ikatan paralel kolagen yang tersusun dalam lembaran lamelar, dengan ciri khas serabut kolagen tersusun dalam lapisan setebal 3-7  $\mu\text{m}$  sejajar satu sama lain dan melingkari konsentris saluran ditengah yang dinamakan kanalis Haversi. Dalam kanalis Haversi berjalan pembuluh darah, serabut saraf dan diisi oleh jaringan ikat longgar. Keseluruhan struktur konsentris ini bernama sistem Haversi. Sel osteosit berada diantara lamellar (Geiger F, et all. 2005, Gray H. 2000, Phillips AM.





Gambar 2-11

Perbedaan histologi jaringan tulang primer dan jaringan tulang sekunder dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. (Matos et al. 2012)

### 2.3.1. Pembentukan Kalvaria

Mesenkim yang membentuk vault neokranium, mula-mula tersusun sebagai membran kapsular disekitar otak yang sedang terbentuk. Membran ini terdiri dari dua lapisan, yaitu lapisan dalam (endomenik) yang merupakan tempat asal neural crest dan lapisan luar (ektomenik) yang merupakan tempat asal mesodermal. Dari lapisan dalam tersebut terbentuk

lapisan yang menutupi otak yang disebut piamater dan arachnoid. Lapisan luar terjadi diferensiasi menjadi duramater. Pada bagian ini terjadi osteogenesis, dimana terjadi pembentukan tulang

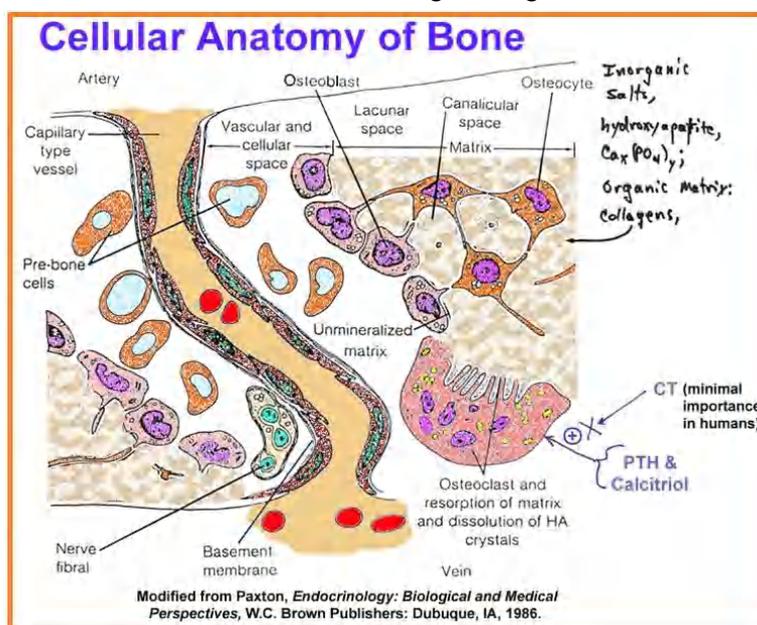


intramembranosa diatas daerah otak yang kemudian membentuk vault tengkorak atau yang disebut kalvaria. Selain itu, lapisan luar ini juga membentuk dasar kondrifikasi otak berupa kondrokranium yang nantinya terjadi osifikasi endokondral. Lapisan luar ini pula yang akan membentuk tulang frontal, parietal, sphenoid, temporal dan occipital.

Pertumbuhan tulang kalvaria ini merupakan kombinasi pertumbuhan suture, aposisi permukaan dan resorpsi, serta pergeseran kearah luar karena perluasan otak. Perkembangan kalvaria sampai tahun kehidupan ke 5, dilanjutkan aposisi permukaan yang menjadi semakin dominan.

Kalvaria termasuk tulang kompakta yang sebagian besar terdiri dari substansi ekstraseluler. Secara mikroskopis, tulang kalvaria memiliki susunan yang lamelar yaitu matriks tulang yang tersusun berlapis-lapis. Lamelar memiliki rongga-rongga yang disebut lacuna. Di dalam lacuna terdapat osteosit. Sistem Haversian terdiri dari saluran Havers yaitu suatu saluran yang sejajar dengan sumbu tulang, di dalam saluran tersebut terdapat pembuluh darah dan saraf (Anwar R, et all. 2008, Patel S, et all.2013, Phillips AM 2005).

Gambar 2-12. Histologi tulang



Proses penyembuhan tulang dimulai sejak terjadinya diskontinuitas tulang sebagai usaha tubuh untuk memperbaiki kerusakan yang di alami. Ada dua proses penyembuhan tulang yaitu secara primer dan sekunder. Penyembuhan tulang secara primer terjadi secara internal remodelling yang meliputi upaya langsung oleh korteks untuk membangun kembali dirinya ketika kontinuitas terganggu. Agar tulang menyatu, tulang pada salah satu sisi korteks harus menyatu dengan tulang pada sisi lainnya untuk membangun kontinuitas mekanis. Proses penyembuhan tulang sekunder yaitu respon dalam periosteum dan jaringan lunak eksternal. Proses penyembuhan tulang ini dibedakan atas 5 fase yaitu : (Rocha FS, et all.2011)

- **Fase inflamasi**

Fase inflamasi berlangsung beberapa hari dan hilang dengan berkurangnya pembengkakan dan nyeri. Terjadi perdarahan dalam jaringan yang cedera dan pembentukan hematoma di tempat yang mengalami patah tulang. Ujung fragmen tulang mengalami devitalisasi karena terputusnya pasokan darah sehingga terjadi hipoksia dan inflamasi yang menginduksi ekspresi gen dan mempromosikan pembelahan sel dan migrasi menuju tempat tulang untuk memulai penyembuhan.

- **Fase proliferasi**

ri setelah fase inflamasi, terbentuk benang-benang fibrin dalam n darah, membentuk jaringan untuk revaskularisasi dan invasi



osteoblas. Osteoblas akan menghasilkan kolagen dan proteoglikan sebagai matriks kolagen pada patahan tulang. Pada fase ini dimulai pada minggu ke 2 dan berakhir pada minggu ke 4.

- **Fase pembentukan kalus**

Pada fase ini mulai terbentuk jaringan tulang. Regulasi dari pembentukan kalus selama masa penyembuhan fraktur di mediasi oleh ekspresi dari growth factor. Salah satu faktor yang dominan adalah Transforming Growth Factor beta (TGF  $\beta$ ), yang menunjukkan keterlibatannya dalam pengaturan diferensiasi dari osteoblas dan produksi matriks ekstra seluler. Adapun faktor lain yaitu Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) yang berperan pada proses angiogenesis selama penyembuhan tulang.

- **Fase konsolidasi**

Dengan aktivitas osteoblas dan osteoklas yang terus menerus, tulang yang immature diubah menjadi mature. Keadaan tulang ini menjadi lebih kuat sehingga osteoblas akan mengisi celah diantara fragmen dengan tulang yang baru.

- **Fase remodelling**

Proses pembentukan dan penyerapan tulang yang terus menerus akan menyebabkan lamela menjadi tebal. Rongga medula akan terbentuk kembali dan diameter tulang kembali pada ukuran semula.

Osteogenesis terjadi sepanjang hidup, termasuk adalah remodeling tulang pada orang dewasa dan proses ini diaktivasi pada keadaan cedera / patah

(Neman J, et all 2012, Liu G, et all.2008).



## 2.4. Sel Punca (Stem Cell)

Perkembangan sel punca dimulai dari penelitian pada tahun 1961. Terapi pengobatan menggunakan sel punca pertama kali berhasil dilakukan transplantasi sumsum tulang pada tahun 1968. Pada awal tahun 1980 berhasil dibuat sel punca embrio dari tikus di laboratorium, tahun 1988 pertama kali berhasil diisolasi sel punca embrio dari hamster, tahun 1998 berhasil diisolasi sel dari massa sel embrio dini dan dikembangkan sel punca embrio serta berhasil diisolasi sel germinal berasal dari sel dalam jaringan gonad janin, dan tahun 2005 ditemukan sumber sel punca pluripoten dan penelitian sel punca terus dikembangkan untuk berbagai jenis terapi penyakit khususnya penyakit degeneratif, hingga kini banyak negara di dunia antara lain Eropa, Amerika, Jepang, Korea, Singapura telah menggunakan terapi sel punca sebagai pilihan pengobatan bagi penyakit kelainan hematologi maupun penyakit degeneratif . (Barry FP, et all. 2004, Brudder SP, et all. 1994, Bianco P, et all. 2001, De Coppi, et all. 2007)

Sesuai dengan kata yang menyusunnya (*stem* = batang; *cell* = sel), *stem cell* adalah sel yang menjadi awal mula dari pertumbuhan sel lain yang menyusun keseluruhan tubuh organisme, termasuk manusia. Seperti batang pohon yang menjadi tumpuan bagi pertumbuhan ranting dan daunnya, *stem cell* juga merupakan awal dari pembentukan berbagai jenis sel penyusun tubuh. Sel Punca merupakan sel dari embrio, fetus, atau sel

yang berkemampuan untuk memperbanyak diri sendiri dalam waktu yang lama, belum memiliki fungsi spesifik, dan mampu



berdiferensiasi menjadi tipe sel tertentu yang membangun sistem jaringan dan organ dalam tubuh (Halim et all. 2010, Pittenger MF, et all. 1999, Widowati et all, 2013, Wagner, et all.2005,).

Padanan kata sel punca dalam bahasa Indonesia antara lain: sel punca, sel induk, sel dasar, sel stem, sel tunas, sel promordial, dan sel batang. Hasil konsultasi Komisi Bioetika Nasional (KBN) dengan Pusat Bahasa diusulkan bahwa istilah sel punca atau sel batang sebagai padanan baku Bahasa Indonesia untuk stem cell. Selanjutnya, KBN memilih sel punca sebagai padanan baku untuk stem cell dalam Bahasa Indonesia (Widowati et all, 2013).

### **Karakteristik Sel Punca**

Untuk dapat digolongkan sebagai sel punca, harus memiliki beberapa karakteristik: belum berdiferensiasi (undifferentiated), mampu memperbanyak diri sendiri (selfrenewal) dan dapat berdiferensiasi menjadi lebih dari 1 jenis sel (multipoten/pluripoten) (Barry FP, et all.2004, Bianco P, et all.2001, Halim dkk., 2010).

### **Belum berdiferensiasi (undifferentiated)**

Sel Punca yang belum memiliki bentuk dan fungsi spesifik seperti sel-sel lain di tubuh manusia. Sel-sel spesifik contohnya sel otot jantung (berdenyut), neuron (menghantarkan impuls), sel  $\beta$  pancreas (mengeluarkan hormon). Terdapat bukti ilmiah yang menunjukkan bahwa

sel punca dalam suatu jaringan matur, tampak sebagai suatu sel inaktif, yang fungsinya baru terlihat dalam waktu dan kondisi



tertentu.

### **Mampu memperbanyak diri (self renewal)**

Sel Punca dapat melakukan replikasi dan menghasilkan sel berkarakteristik sama dengan sel induknya.

Kemampuan ini tidak dipunyai oleh sel-sel jantung, neuron dan pancreas.

Sehingga kerusakannya bersifat *irreversible*.

### **Dapat berdiferensiasi menjadi >1 jenis sel (Multipoten / Pluripoten)**

Keberadaan sel punca yang belum berdiferensiasi dimaksudkan untuk menjaga kontinuitas regenerasi populasi sel yang menyusun dan organ tubuh. Dibanding sel matur lainnya, sel punca mampu untuk berdiferensiasi menjadi >1 jenis sel tubuh. Sel punca bersifat multipoten atau pluripoten bergantung pada jenis dari sel punca tersebut.

Stem Cell merupakan sel yang paling berharga untuk pengobatan regeneratif. Penelitian tentang sel punca memberikan pengetahuan lanjut tentang bagaimana suatu organisme berkembang dari satu sel, dan bagaimana kualitas sel yang menggantikan sel lain yang rusak pada organ dewasa. Sel punca memiliki kemampuan untuk secara berkesinambungan membelah baik untuk replikasi dirinya sendiri atau menghasilkan sel-sel khusus yang dapat berdiferensiasi menjadi berbagai jenis sel atau jaringan

(cell differentiation).



Jenis sel punca yaitu sel embrionik dan sel punca dewasa yang banyak terdapat dalam sumsum tulang, namun pada penelitian lebih lanjut ditemukan juga bahwa ternyata sel punca dapat pula diisolasi dari darah tali pusat, darah perifer, hepar, kulit, maupun dari pulpa gigi, dan bahkan dari jaringan lemak yang pada umumnya merupakan limbah buangan sisa operasi *liposuction* serta dari *human embryonic stem cell* (hESC)

Berdasarkan potensi atau kemampuan berdiferensiasi, sel punca digolongkan menjadi: (Gronthos S, et all. 2003, Baptista, et all. 2009. Kroeze, et all.2011, Mao JJ, et all. 2006, Widowati et all. 2013, Zuk PA et all. 2002,).

### **Totipoten**

yaitu sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi organ hidup yang lengkap, termasuk dalam golongan ini adalah zigot (telur yang telah dibuahi).

### **Pluripoten**

yaitu sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi tiga lapisan germinal: ektoderm, mesoderm, dan endoderm, tapi tidak dapat menjadi jaringan ekstraembryonik seperti plasenta dan tali pusat, termasuk golongan ini adalah sel punca embryonik.

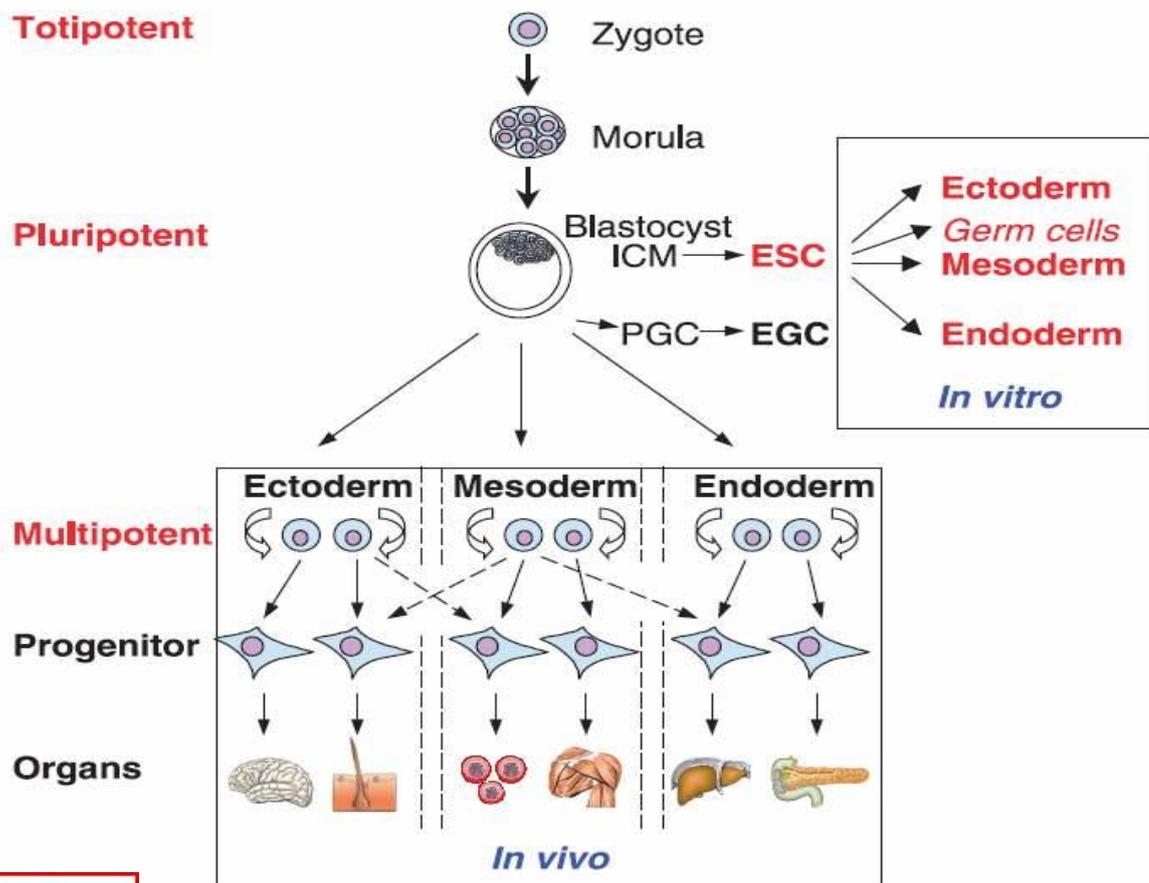


## Multipoten

yaitu sel punca yang dapat berdiferensiasi menjadi banyak jenis sel, misalnya: sel punca hematopoietik. Unipoten, yaitu sel punca yang hanya dapat menghasilkan satu jenis sel, tapi berbeda dengan non-sel punca, jenis unipoten ini mempunyai sifat dapat memperbaharui atau meregenerasi diri.

Skema 2-1.

Jenis Sel Punca



Sedangkan berdasarkan sumber asal stem cell diperoleh di berbagai jaringan tubuh, stem cell dibagi menjadi: zygote, yaitu pada tahap sesaat setelah sperma bertemu dengan sel telur, stem cell embrionik yang diperoleh dari inner cell mass dari suatu blastocyst (embrio yang terdiri dari 50 - 150 sel, kira-kira hari ke-5 pasca pembuahan). Stem cell embrionik umumnya diperoleh dari sisa embrio yang tidak dipakai pada IVF (in vitro fertilization). Tapi saat ini telah dikembangkan teknik pengambilan stem cell embrionik yang tidak membahayakan embrio tersebut, sehingga dapat bertahan hidup dan bertumbuh. Untuk masa depan hal ini mungkin dapat mengurangi kontroversi etik terhadap sel punca embrionik. Stem cell darah tali pusat, yang diperoleh dari darah plasenta dan tali pusat sesaat setelah bayi lahir.

Sel punca dari darah tali pusat merupakan jenis sel punca hematopoietik, dan ada yang menggolongkan jenis sel punca ini ke dalam stem cell dewasa . Stem cell dewasa diperoleh dari jaringan dewasa, antara lain dari sumsum tulang. Ada 2 jenis sel punca dari sumsum tulang yaitu sel punca hematopoietik dan sel punca stromal atau disebut juga MSCs, dari jaringan lain seperti pada susunan saraf pusat, jaringan lemak, otot rangka, pankreas.

Sel punca dewasa merupakan sel-sel yang tidak berdiferensiasi dan ditemukan pada jaringan yang telah mengalami diferensiasi, serta mampu memperbaharui dirinya sendiri selama seumur hidup mikroorganisme tersebut. Peran sel punca dewasa adalah lebih untuk mempertahankan dan memperbaiki jaringan tubuh di tempat sel punca ditemukan. Secara umum stem cell dewasa dianggap memiliki potensi terbatas untuk menjadi jenis sel apapun dalam tubuh, dengan kata lain hanya dapat menghasilkan varietas tipe sel dalam garis

n atau jenisnya sendiri dan dianggap multipotensial. Terdapat dua stik yang dimiliki oleh stem cell diantaranya adalah dapat menghasilkan serupa dengan dirinya dalam periode waktu yang panjang, kemampuan



tersebut dikenal sebagai pembaharuan diri jangka panjang. Selain itu, sel tersebut dapat menghasilkan jenis sel dewasa yang memiliki karakteristik morfologi dan fungsi spesifik. Stem cell dewasa mampu membentuk sel-sel yang berdiferensiasi sempurna dengan fenotip yang matang, mempunyai integrasi sempurna dengan jaringan dan mampu menjalankan fungsi khusus sesuai dengan jaringan tersebut. Umumnya peneliti mengidentifikasi sel punca dewasa dengan cara mengandalkan dua karakteristik yaitu morfologi sel dan identifikasi penanda permukaan.

Beberapa sel punca dewasa memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel jaringan lain selain jaringan asalnya atau disebut sebagai plastisitas atau transdiferensiasi. Untuk menunjukkan bahwa sel punca dewasa mempunyai sifat plastisitas, harus diidentifikasi terlebih dahulu bahwa pada populasi sel jaringan awal terdapat sel punca, kemudian dibuktikan bahwa sel punca dewasa mampu menghasilkan jenis sel normal jaringan lain, dan potensi ini dapat dideteksi pada lingkungan yang baru. Sel ini harus dapat berintegrasi dengan lingkungan barunya, bertahan dan berfungsi seperti sel dewasa yang lain pada jaringan tersebut. Sel punca dewasa merupakan sel multipotensial karena dapat menghasilkan seluruh jenis sel yang memiliki hubungan dengan jaringan asalnya.

Sel Punca yang digunakan pada penelitian ini, adalah Sel Punca Mesenkimal yang diisolasi dan kultur dari tali pusat. Di produksi oleh Stem Cell and Cancer Institute Jakarta. MSC ini diambil dari tali pusat perempuan umur antara 25 – 40 th segera setelah proses persalinan. Donor menanda tangani informed consent, SOP sesuai Komite Etik SCI Jakarta.

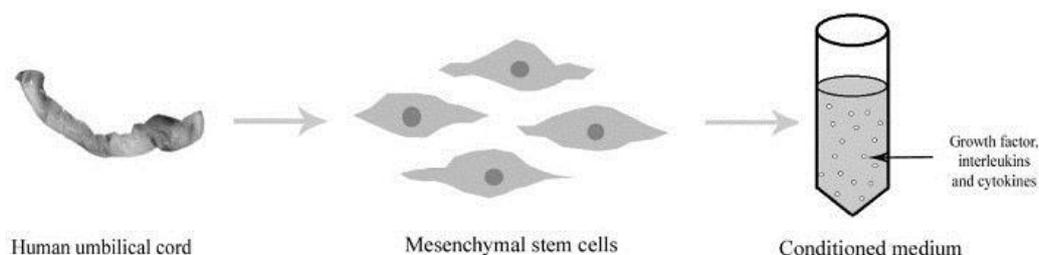
asi MSC di ambil dari tali pusat yang di cuci dengan larutan NaCl 0.9%, dalam bentuk kecil, ukuran 1-2 mm, kemudian di kultur pada media. ini di kultur dalam essential medium  $\alpha$  beserta 2mM GlutaMAX



(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), ditambahkan 20% serum fetal bovine (FBS; Invitrogen) dan penicillin streptomycine amphotericine B (100 U/ml, 100 mg/ml, dan 0,25 mg/ml; Invitrogen). Kultur di inkubasi dengan dilembabkan dengan 5% CO2 di suhu 37 derajat Celsius. Media diganti setiap 5 sampai 21 hari. (Widowati W, Wijaya L, Murti H, et all.2014., Widowati W, Wijaya L, Bachtiar I, et. All, 2014).

## 2.5. Conditioned Medium

Penggunaan sel punca dalam berbagai penyakit sudah marak dilakukan. Pada kultur sel punca mengeluarkan faktor trofik / metabolit, yang pada berbagai penelitian tentang faktor sekresi turunan sel punca dapat menyebabkan perbaikan jaringan pada berbagai kondisi yang melibatkan kerusakan jaringan / organ. Faktor-faktor yang dikeluarkan disebut sebagai secretome, microvesicles, atau exosome dan dapat ditemukan dalam media di mana sel-sel induk dikultur; dengan demikian, media disebut **Media Terkondisi** atau **Conditioned Medium (CM)**. (Pawitan JA,2017)

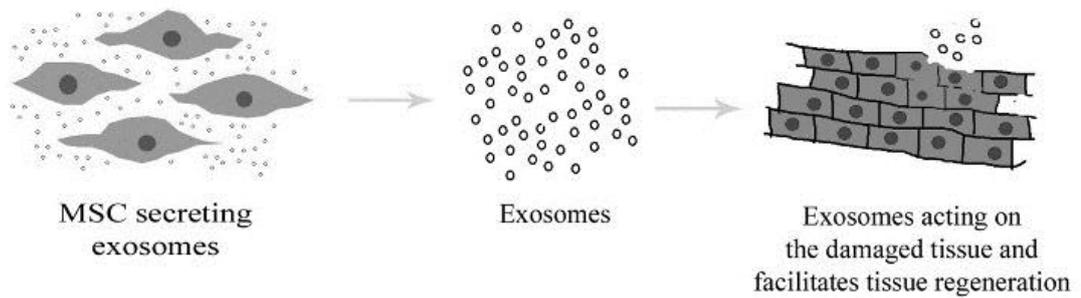


Skema 2-2. Pemisahan Conditioned Medium dari Mesenkimal Stem Sel

Faktor trofik pada CM ini akan merangsang anti oksidan, immunosupresan dan proliferasi sel pada bagian yang di transplantasikan. CM memiliki kapasitas diferensiasi dan fungsi terapi. Dengan demikian, dapat merangsang perubahan sel

berbagai jenis sel dan mempunyai efek parakrin yang membantu dalam perbaikan sel yang rusak.





Skema 2-3. Efek Parakrin dari Mesenkimal Stem

CM mengandung faktor pertumbuhan dan kemokin yang berhubungan dengan lingkungan *chemoattractive* dari jaringan yang berdekatan. 8. Faktor pertumbuhan dan sitokin dalam Conditioned medium yang dikeluarkan dari obat yang berasal dari kultur sel punca dari jaringan adiposa (Tabel 1-2).(Sriramulu et all.2017; Hiroshi T, et all 2017)

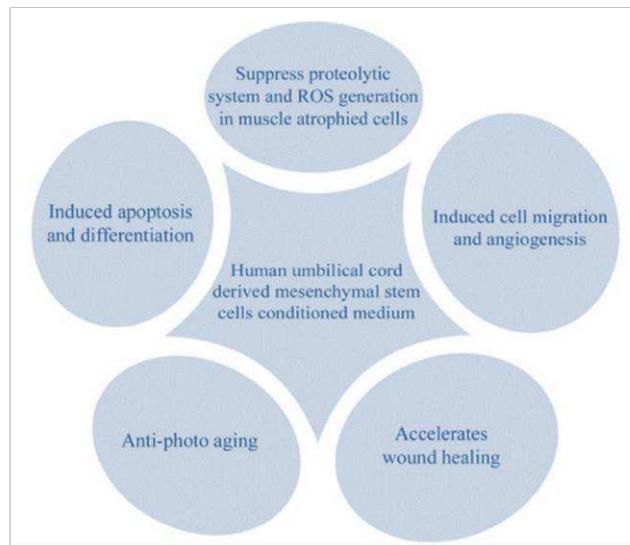
Factors	Role
IL-6	It prevents differentiation, apoptosis induced by serum starvation and as well as enhances proliferation of undifferentiated MSCs.
VEGF	Plays a vital role in angiogenesis, post-natal homeostasis, and skeletal development and also regulates the differentiation of MSCs by modulating the levels of RUNX2 and PPAR $\gamma$ transcription factors.
Angiogenin	Interaction with endothelial cell induces broad range of cellular responses such as cellular proliferation, cell migration and tube formation, etc. and plays a vital role in stimulating angiogenesis.
MCP-1,3	These chemokines acts as a MSC homing factor, the overexpression of MCP signals the MSCs to identify the site of injured tissue and restores the damaged cells.
IGF-1	It plays a vital role in regulating neuronal functions. It suppresses neuronal apoptosis and reduces inflammatory reactions.
bFGF	Triggers FGF receptors which activate P13K/Akt signaling pathway. Thereby it induces human MSC migration via a FGFR/ P13K/Akt pathway.

Tabel 1-2.  
Faktor pertumbuhan dan sitokin dalam Conditioned medium  
(Sriramulu et all.2017)



aan secretome yang mengandung CM memiliki beberapa keunggulan  
dapat dengan penggunaan sel induk, karena CM dapat diproduksi,

dibekukan, dikeringkan, dikemas, dan diangkut dengan lebih mudah. Selain itu, karena tidak memiliki sel; tidak perlu mencocokkan donor dan penerima untuk menghindari masalah penolakan. Oleh karena itu, medium terkondisi yang berasal dari sel induk memiliki prospek yang menjanjikan untuk diproduksi sebagai obat-obatan untuk pengobatan regeneratif. (Bhang SA, et all. 2014, Timmers, et all. 2011, Ho JCY, et all. 2012, Inoue T, et all. 2013, Pawitan JA,2017, Zhou BR, et all.2013)



Skema 2-2.  
Aplikasi klinis Conditioned Medium (CM)  
(Sriramulu et all.2017)

## 2.6. Karbonat Apatit / Gama – CHA

Gama-CHA adalah suatu bone graft (material pengganti) atau perancah tulang yang diproduksi secara biomimetis (sesuai dengan kondisi fisiologis) yang identik dengan tulang asli manusia. Gama-CHA mengandung



karbonat apatit (yang merupakan komponen tulang) serta polimer berupa kolagen terdenaturalisasi.

Gama-CHA berfungsi untuk mempercepat regenerasi jaringan tulang setelah proses operatif pada pasien.

Bone graft adalah suatu bahan yang digunakan dalam proses operatif pada pasien dengan kerusakan jaringan tulang. Pada jaringan tulang yang mengalami kerusakan, diperlukan suatu perancah (scaffold) yang akan berfungsi sebagai pengganti lingkungan mikro yang hilang selama proses kerusakan/ kehilangan jaringan tulang. Dengan fungsi memberikan lingkungan mikro yang sesuai dengan jaringan yang hilang, maka bone graft yang tepat akan membantu terjadinya rekrutmen sel (cell recruitment) dan menjadi penghubung celah/ gap yang terjadi pada jaringan yang rusak atau hilang sehingga dapat membantu transportasi nutrisi, peredaran darah, dan zat-zat lain yang diperlukan untuk percepatan regenerasi jaringan.

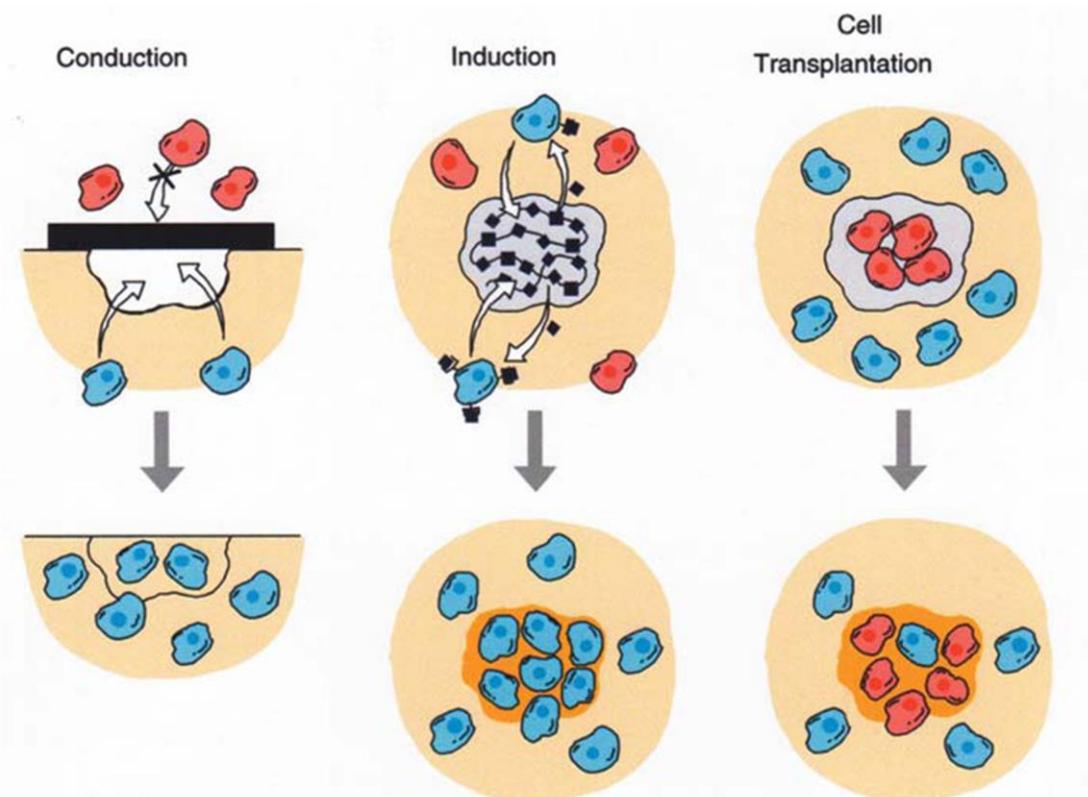
Graft tulang atau bone graft yang baik harus dapat diterima oleh tubuh, tidak menimbulkan reaksi toksisitas, hipersensitivitas, dan oleh karenanya harus identik dengan jaringan tulang asli pada tubuh manusia.

Di samping itu, graft tulang yang baik harus dapat diresorpsi oleh osteoklast dengan tingkat yang sesuai dengan kecepatan remodeling

Artinya, graft tulang yang baik harus identik dengan matriks tulang yang hilang agar regenerasi jaringan dapat berlangsung cepat



secara alamiah sesuai dengan kondisi awal sebelum terjadinya kerusakan/kehilangan tulang. Keunggulan suatu graft tulang dapat dilihat dari kemampuannya berikut ini, sebagaimana tercantum pada Gambar 2-13.



Mooney dan Kaigler, 2001

Gambar 2-13. Fungsi osteokonduktivitas, osteoinduktivitas, dan osteogenesis pada regenerasi jaringan tulang dengan menggunakan graft tulang Gama-CHA.

### Sifat Osteokonduksi

Graft tulang yang baik harus dapat berfungsi sebagai pemandu  
 uhan jaringan tulang baru. Ia dapat memfasilitasi sel-sel yang  
 untuk melekat dan berproliferasi (membelah diri), tetapi juga



sekaligus mencegah melekat dan berkembangnya sel-sel yang tidak diinginkan.

### **Sifat Osteoinduksi**

Graft tulang yang baik akan mampu berikatan dengan protein-protein yang diperlukan untuk pertumbuhan jaringan baru sehingga dapat memicu (induksi) pertumbuhan sel yang sesuai ke arah jaringan yang diinginkan.

### **Sifat Osteogenesis**

Graft tulang yang baik juga dapat memacu pertumbuhan tulang baru dengan sempurna. Graft tulang yang baik akan dapat mempercepat proses proliferasi dan diferensiasi osteoblast, untuk membentuk tulang yang sempurna, sekaligus dapat diresorpsi dengan baik oleh osteoklast.

Pada luka/ kehilangan tulang yang besar dan luas (critical size defect), graft tulang yang baik dapat berfungsi juga sebagai pembawa sel untuk terapi dengan sel punca.

Kebutuhan perawatan menggunakan graft tulang di Indonesia meningkat dengan pesat. Sayangnya, produk yang sudah beredar di pasaran saat ini adalah produk impor, dan berdasarkan survei oleh Grup Riset Rekayasa Jaringan Universitas Gadjah Mada, sebagian besar tidak terdaftar secara formal di Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Gama-CHA unggul



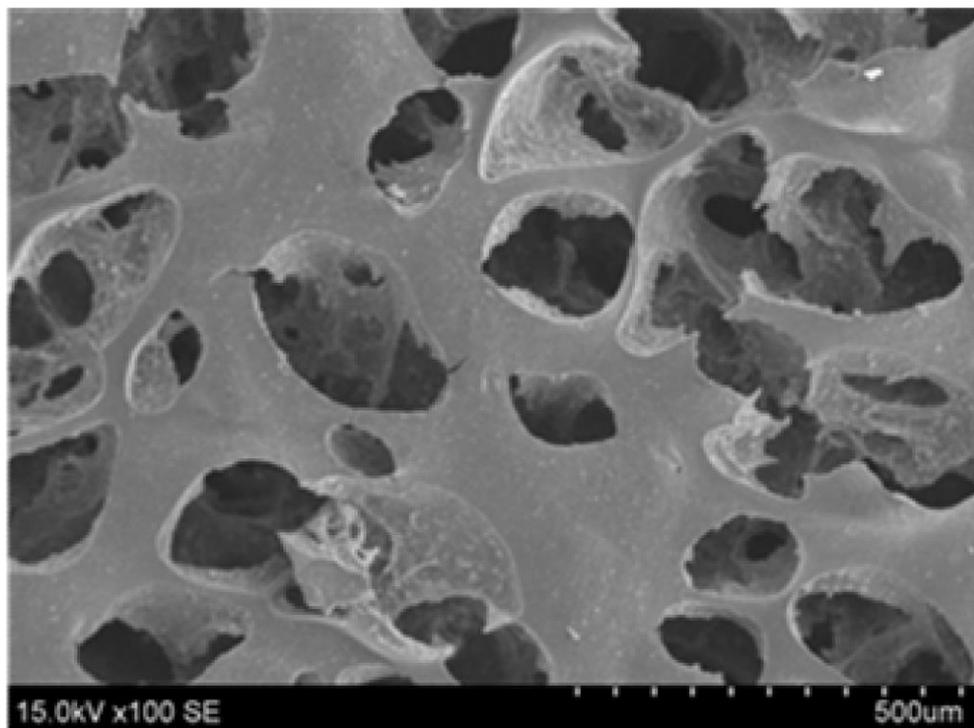
- Gama-CHA adalah graft tulang yang terdaftar secara resmi di Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dengan nomor **Sertifikat Izin Edar Kemenkes RI No. AKD 20602410125**. Oleh karena itu, keamanan Gama-CHA terjamin karena telah memenuhi persyaratan untuk mendapatkan izin edar.
- Gama-CHA juga diproduksi oleh produsen yang telah mendapatkan **sertifikat GMP (Good Manufacturing Process untuk Alat Kesehatan** atau Cara Pembuatan Alat Kesehatan yang Baik) melalui sertifikat izin produksi **Sertifikat Izin Produksi dari Kemenkes RI No. HK.07.Aikes/IV/286/AK.01/2014**.
- Gama-CHA mengandung Karbonat Apatit (CHA), yang merupakan komponen utama pada tulang manusia yang diproduksi secara sintesis tetapi identik (sama dan sebangun) sehingga dapat menghindari reaksi imunologis yang sering terjadi apabila menggunakan allograft maupun xenograft.
- Cara produksi Gama-CHA dilakukan pada suhu dan kondisi biomimetis (sesuai dengan kondisi fisiologis pada tubuh manusia) sehingga menghasilkan CHA yang memiliki kristalinitas rendah yang identik dengan apatit pada manusia, memiliki kadar Ca/P yang sama dengan kadar Ca/P pada tulang manusia, serta memiliki komponen polimer dengan rantai triple helix sama dengan rantai triple helix pada manusia.

Cara produksi Gama-CHA yang tidak menggunakan bahan kimiawi yang ada pada tulang manusia menyebabkan Gama-CHA unggul



dari segi keamanan dan identik dengan tulang manusia sehingga menjamin keberhasilan perawatan.

- Arsitektur Gama-CHA didesain agar memungkinkan osteoblast berproliferasi di daerah yang mengalami luka/ hilang, tetapi menyaring sel-sel yang tidak diinginkan dan berukuran lebih dari 150 mikron untuk tidak berpenetrasi ke dalam luka/ jaringan yang hilang (Gambar 2).
- Desain Gama-CHA juga memungkinkan graft tulang Gama-CHA dapat menjadi pembawa (vehicle) obat, biomolekul, dan sel yang baik dengan kemampuan pelepasan terkontrol (controlled release).



Gambar 2-14.



Arsitektur Gama-CHA menunjukkan interkoneksi 3-Dimensi dengan porositas 150 mikron, memungkinkan selektivitas sel-sel yang dapat berproliferasi pada jaringan yang mengalami luka/ hilang.

Tulang manusia adalah karbonat apatit, bukan hidroksiapatit. Lebih tepatnya, tulang manusia adalah karbonat apatit tipe-B, yang memiliki kandungan karbonat sekitar 7,4 persen.

Dibandingkan dengan hidroksiapatit, karbonat apatit memiliki keunggulan sifat-sifat dalam kaitannya dengan proses remodeling tulang.

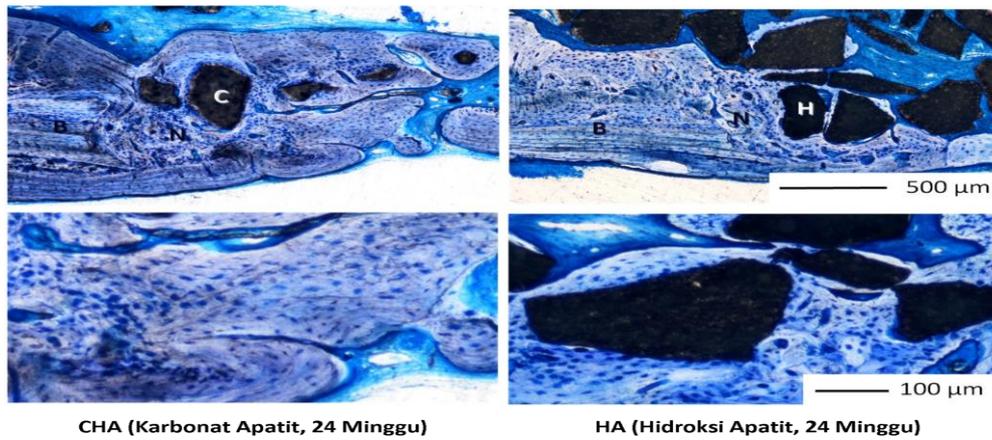
1. Karbonat Apatit Adalah Komposisi pada Tulang Manusia. Hidroksiapatit Bukan Komposisi Tulang Manusia. Tabel 1 menggambarkan Komposisi tulang Manusia.
2. Karbonat Apatit Dapat Diresorpsi dengan Baik oleh Osteoklast. Hidroksiapatit Tidak Dapat Diresorpsi dengan Baik oleh Osteoklast (Gambar 3).
3. Karbonat Apatit Memiliki Kemampuan Kelarutan yang Baik pada Kondisi Asam Lemah, yaitu Kondisi Saat Osteoklast Bekerja Meresorpsi Tulang dengan Mengeluarkan Ion  $H^+$  (Gambar 4 dan Gambar 5).
4. Karbonat Apatit Dapat Memacu Pertumbuhan Tulang Secara Sempurna (Gambar 6). Hidroksiapatit Memacu Pertumbuhan Tulang Lebih Lambat Daripada Karbonat Apatit.

**Tabel 2-2**

**Tabel 1. Komposisi Tulang Manusia: Karbonat Apatit, Bukan hidroksiapatit**

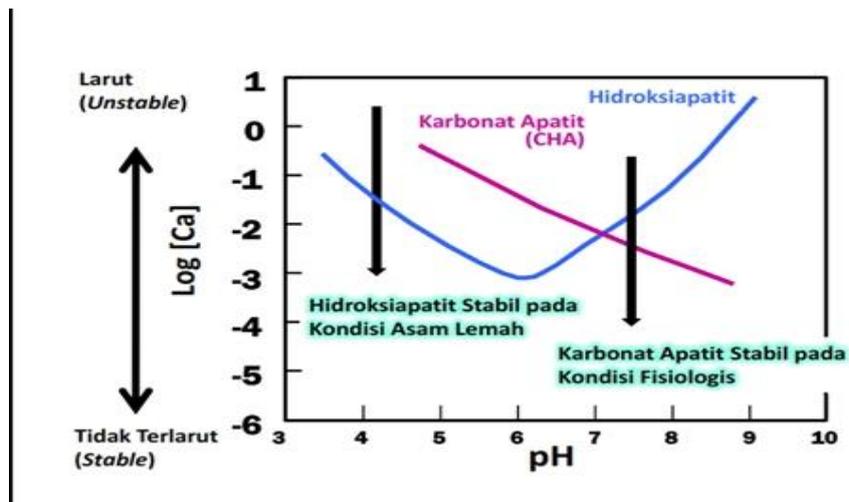
Komposisi	Kandungan (%)
$Ca^{2+}$	34,8
$PO_4^{3-}$	15,2
$Na^+$	0,9
$Mg^{2+}$	0,72
$K^+$	0,03
$CO_3^{2-}$	7,4
$F^-$	0,03
$Cl^-$	0,13





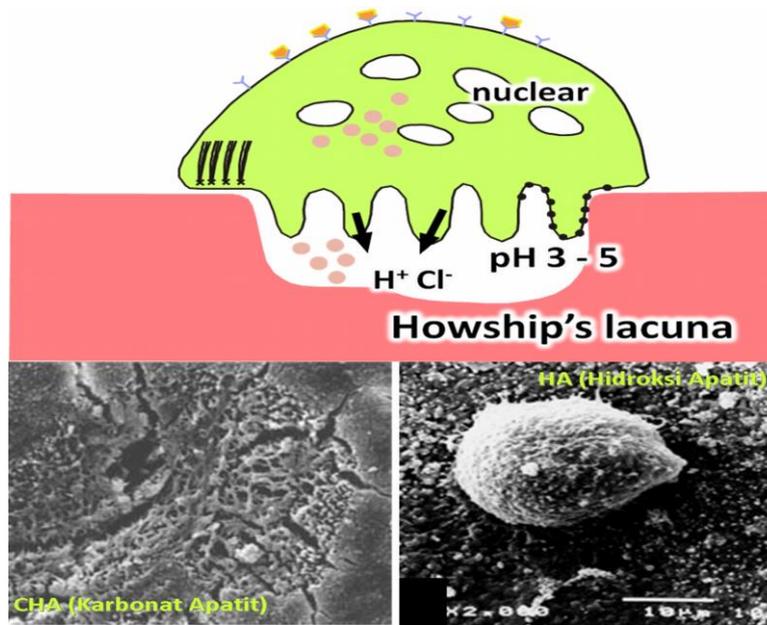
Gambar 2-15 .

Gambaran kemampuan bioresorbabilitas Gama-CHA yang baik, dibandingkan hidroksiapatit. Gama-CHA merupakan karbonat apatit dengan kristalinitas rendah sehingga dapat diresorpsi dengan baik oleh osteoklast dan menjamin proses remodeling tulang yang sempurna. Hidroksiapatit tidak dapat diresorpsi dengan baik oleh osteoklast.



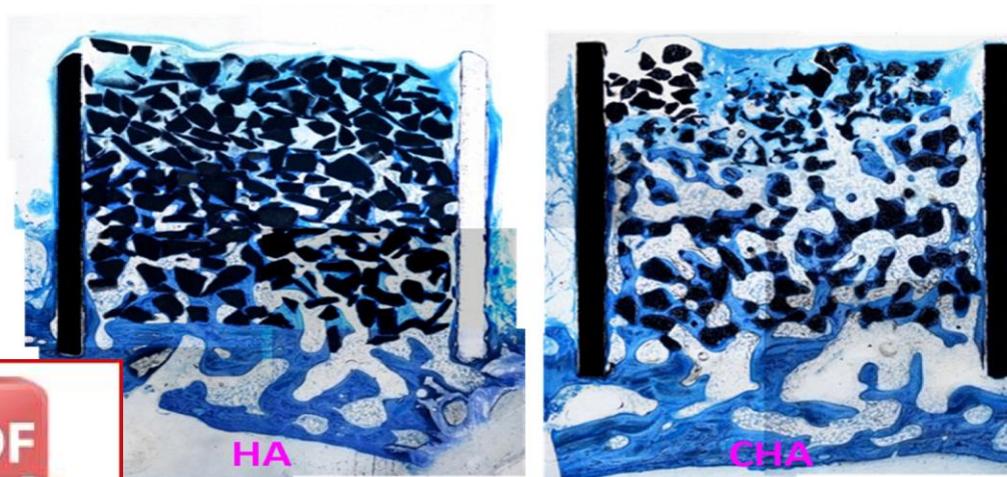
2-3 . Diagram fase solubilitas karbonat apatit, dibandingkan apatit.





Gambar 2-16. Proses resorpsi tulang oleh osteoklast.

Osteoklast bekerja melakukan resorpsi dengan mengeluarkan ion  $H^+$  yang menyebabkan lingkungan menjadi asam (pH 3-5). Pada kondisi asam lemah, hidroksiapatit stabil sehingga resorpsi tidak terjadi dengan baik. Akibatnya, hidroksiapatit akan tersisa selama proses remodeling tulang. Yang sebaliknya terjadi pada karbonat apatit. Secara fisiologis, karbonat apatit memacu regenerasi tulang secara sempurna.



Gambar 2-17.

Pada kondisi asam lemah, hidroksiapatit stabil sehingga resorpsi tidak terjadi dengan baik. Akibatnya, hidroksiapatit akan tersisa selama proses remodeling tulang. Yang sebaliknya terjadi pada karbonat apatit. Secara fisiologis, karbonat apatit memacu regenerasi tulang secara sempurna.

Penelitian untuk pengembangan Gama-CHA dengan No. AKD 20602410125 memakan waktu kurang lebih 15 tahun dari pengembangan yaitu kambing, serta uji klinis pada manusia.

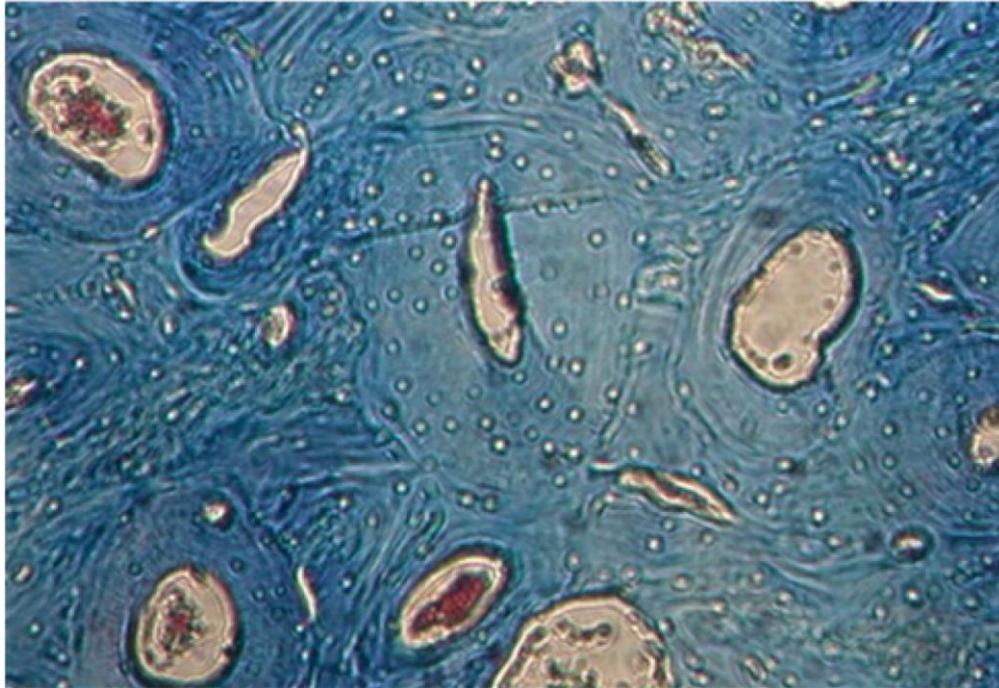
Sertifikat Izin Edar Kemenkes RI formulasi, uji pada hewan coba kecil (tikus dan marmot), uji pada hewan coba besar Hasil uji pada hewan coba kambing sebagaimana yang dipersyaratkan oleh asosiasi ahli implant menunjukkan bahwa Gama-CHA dapat memacu pertumbuhan tulang dengan sempurna (Gambar 7 dan Gambar 8).



Gambar 2-18.



an radiografis menunjukkan pertumbuhan tulang yang terjadi sempurna pada implantasi dengan Gama-CHA.



Gambar 2-19.

Gambaran histologis menunjukkan pertumbuhan tulang yang terjadi secara sempurna pada implantasi dengan Gama-CHA.

Penggunaan Gama-CHA untuk preservasi soket setelah pencabutan menunjukkan hasil bahwa Gama-CHA dapat menurunkan tingkat resorpsi dari 40-60% selama 1 tahun pertama menjadi hanya 12,67% selama 1 tahun pertama. Angka ini adalah terkecil yang pernah didapatkan dari berbagai penelitian tentang penggunaan graft tulang untuk pencegahan resorpsi.



kasus lain dengan menggunakan Gama-CHA sebagai bahan  
ft pasca perawatan enukleasi kista dilanjutkan dengan perawatan

implan menunjukkan hasil evaluasi yang sangat baik. Gambar 11 menunjukkan kasus pasca enukleasi kista yang dirawat dengan Gama-CHA. Gambar 12 menunjukkan bahwa secara radiografis telah terjadi regenerasi tulang yang sangat baik pasca aplikasi Gama-CHA pada pasien tersebut yang dirawat dengan enukleasi kista dilanjutkan implant. Rongga pasca enukleasi kista tertutup dan area sekitar pin implant menunjukkan tulang yang kompak.

Penggunaan Gama-CHA juga terbukti dapat digunakan untuk berbagai kasus, selain untuk preservasi soket pasca ekstraksi gigi, augmentasi implan, Gama-CHA juga telah

digunakan sebagai drug delivery system pada perawatan osteomyelitis. Sebelumnya, SOP perawatan osteomyelitis adalah tidak boleh diberi bahan graft. Gama-CHA telah dipergunakan dalam perawatan osteomyelitis, dengan cara direndam menggunakan antibiotik gentamisin untuk memacu pelepasan antibiotik pada area osteomyelitis. Pasien sampai saat ini tidak mengalami reaksi komplikasi apa pun, dan dengan tingkat penyembuhan yang luar biasa

Gama-CHA merupakan produk hasil penelitian panjang Tim Riset Rekayasa Jaringan Universitas Gadjah Mada dengan Paten Nomor ID P 0036890 yang memperoleh Anugerah Kekayaan Intelektual Luar Biasa

Tahun 2014 dan Publikasi internasional, yang melibatkan ahli dari berbagai negara yang telah dipublikasikan pada masing-masing di jurnal yang memiliki



impact factor tinggi. Gama-CHA juga telah melewati berbagai uji laboratoris maupun klinis yang membuktikan keunggulannya dibandingkan dengan produk graft tulang lain.

## 1. Ringkasan Keunggulan Gama-CHA

Gama-CHA memiliki keunggulan:

- Graft tulang pertama di dunia yang identik dengan tulang asli manusia (biomimetic)
- Memiliki daya osteokonduktivitas yang unggul
- Memiliki variasi aplikasi yang sangat beragam
- Memiliki kemampuan pelepasan terkontrol atau controlled release
- Memiliki sertifikasi halal dari LPOM MUI
- Merupakan produk yang dikembangkan berdasar GMP
- Memiliki izin edar dari Kemenkes RI, terjangkau, produk nasional yang jelas dan aman, serta mudah didapatkan

## 2. Ringkasan Fitur Gama-CHA

- Karbonat apatit blok dengan struktur porositas interkonektif tiga dimensi
- Komponen organik dan anorganik yang identik dengan tulang manusia

...kristalinitas rendah sehingga mudah menyatu selama proses remodeling tulang



- Merupakan karbonat apatit tipe B (Tulang manusia adalah karbonat apatit tipe B)
- Memiliki osteokonduktivitas sangat baik dan mampu memacu pertumbuhan tulang baru dengan cepat
- Mudah dikombinasikan dengan molekul obat, molekul aktif, sel, termasuk antibiotik
- Memiliki daya resorbabilitas dan biodegradabilitas yang sangat baik, serta tidak menyebabkan toksisitas (karena identik dengan kandungan tulang)

#### Tujuan Penggunaan Gama-CHA

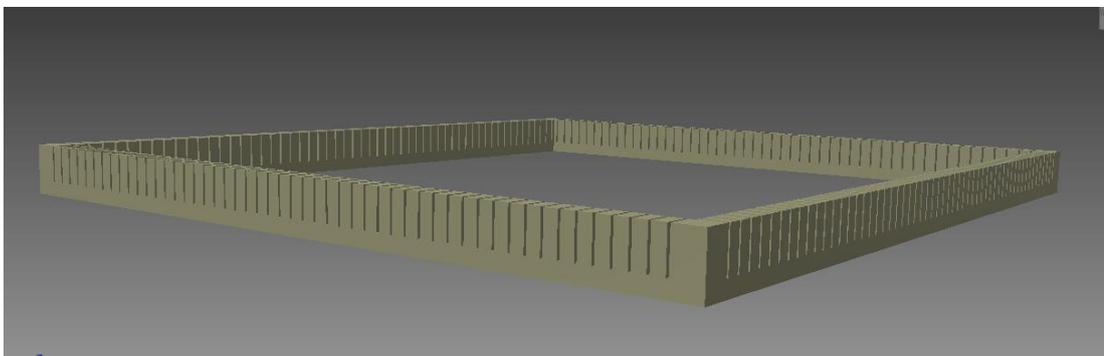
- Tujuan penggunaan Gama-CHA adalah:
- Sebagai material substitusi tulang untuk mempertahankan ruang (bone defect maintenance) pada tulang yang rusak/ hilang
- Sebagai material substitusi tulang untuk menggantikan matriks ekstraseluler yang hilang dan memiliki kandungan yang identik dengan matriks ekstraseluler yang hilang pada tulang yang rusak/ hilang
- Sebagai material substitusi tulang untuk memacu dan menginduksi pertumbuhan tulang baru.



#### Spesifikasi membrane / lempeng Scaffold Karbonat Apatit

...n dibuat dengan cara menyiapkan terlebih dahulu serat PGA (*Poli-  
Acid*) seperti tertera pada laporan sebelumnya, sebagai serat yang

paling *feasible* untuk digunakan. Serat PGA (*biomedical grade*) dibuat dengan ukuran diameter 0.07 mm dengan electrospinning. Suatu cetakan dari plastik PLA disiapkan untuk membuat jejaring mesh serat PGA berukuran 10X10 cm<sup>2</sup> yang ukuran mesh dari serat PGA akan menghasilkan jejaring mesh 2X2 mm<sup>2</sup> (Gambar 1).



Gambar 2-20.

Cetakan dari plastik PLA untuk menghasilkan lembaran jejaring mesh PGA dengan dimensi panjang 10 cm dan lebar 10 cm berukuran mesh 2X2 mm<sup>2</sup>.

Sementara itu, disiapkan formulasi (setelah melewati prapenelitian) gelatin dan CHA. Pembuatan CHA dilakukan melalui metode *dropwise* H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pada emulsi Ca(OH)<sub>2</sub> sesuai dengan Paten Nomor IDP ID P 0036890 oleh Ana (2014), dengan perbandingan sesuai dengan Tabel 1. Pendispersi sitrat digunakan dalam pembuatan membran dengan tetap mengacu pada mengacu pada Paten Nomor IDP ID P 0036890 (Ana, 2013).



melewati proses pembuatan gel sesuai prosedur Paten Nomor IDP 36890 oleh peneliti utama penelitian ini dan dengan mengacu

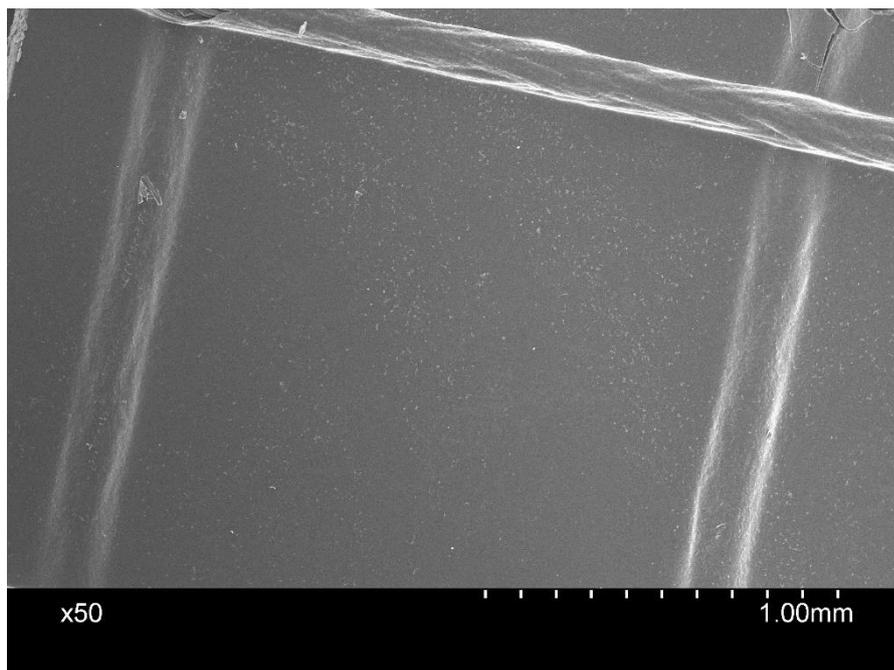
formulasi pada Tabel 1, maka suspensi dituangkan dalam mesh PGA yang telah selesai disiapkan. Suspensi seberat 50 gram digunakan untuk menghasilkan membran berserat PGA dengan ketebalan 2 mm. Kemudian membran berserat PGA dibekukan pada kulkas (-4°C) selama 7X24 jam. Proses *crosslinking* secara fisik menggunakan *vaccum oven* dilakukan selama 72 jam.

**Tabel 2-3.** Komposisi Membran

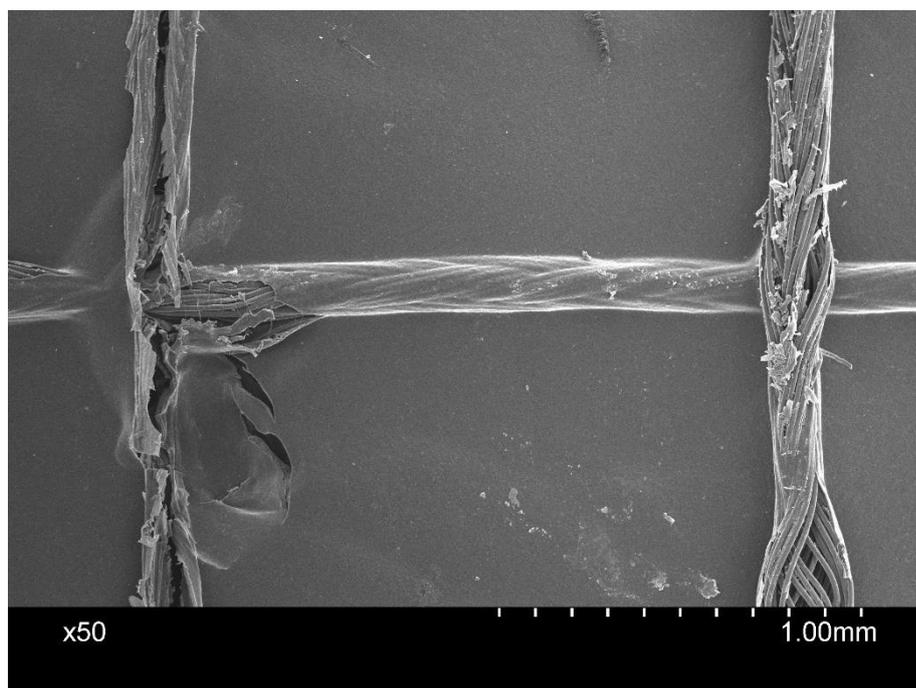
<b>Kode Spesimen</b>	<b>Berat Akhir Gelatin dalam Formulasi 100 mL (gram)</b>	<b>Berat Akhir CHA dalam Formulasi 100 mL (gram)</b>
5010	50	10
3515	35	15

Gambaran struktur mikro membran termasuk porositas dan interkoneksi diamati dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM), JEOL, JSM-6510LA, USA di LPPT (Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu) Unit 1 UGM.





**Gambar 2-21.** Mikrostruktur Membran CHA Berserat PGA 3515.



**Gambar 2-22.** Mikrostruktur Membran CHA Berserat PGA 5010.



Pada penelitian ini dipakai 2 (dua) jenis membran/ lempeng Karbonat Apatit (CHA), yang permukaannya berpori-pori dan yang tidak mempunyai pori-pori. Di Asumsikan bahwa permukaan yang mempunyai pori-pori akan memudahkan sel punca melekat pada permukaan lempeng sehingga kualitas osteogenesis yang terjadi lebih baik / merata.(Ika Dwi Ana 2014, Aprillisna M, et all 2015. Xu A et all 2018, Zong C et all 2010, ).

## 2.7. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

### 2.7.1. Definisi

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) awalnya dikenal sebagai Vascular Permeability Factor (VPF) adalah sinyal protein yang dihasilkan oleh sel-sel yang merangsang vaskulogenesis dan angiogenesis. Ini adalah bagian dari sistem untuk mengembalikan pasokan oksigen ke jaringan, pada saat sirkulasi darah tidak adekuat. Fungsi dasar dari VEGF adalah untuk membentuk pembuluh darah baru saat perkembangan embrional, saat setelah trauma atau luka, pembentukan kolateral pembuluh darah pada keadaan terjadinya oklusi pembuluh darah.

*VEGF* adalah bagian dari *growth factor*, lebih spesifik *platelet-derived growth factor* yang merupakan bagian dari *cyctine-knot growth factor*. Mereka berperan penting dalam memberikan signal penting yang melibatkan vaskulogenesis (formasi *de novo* dari sistem sirkulasi embrionik) dan angiogenesis (pertumbuhan pembuluh darah sebelum pembuluh darah



ntuk)

*VEGF* pertama kali dikenali pada babi, hamster dan tikus oleh *Senger et al.* pada tahun 1983. Dimurnikan dan dikloning oleh *Ferrara dan Henzel* pada tahun 1989. Pembagian dari *VEGF* ditemukan oleh *Tischer et al.* pada tahun 1991. Pada tahun 1996 dan 1997, *Christinger* dan *De Vos* menemukan struktur kristal dari *VEGF*, pertamanya pada resolusi 2,5A kemudian pada resolusi 1,9A.

*Fms-like tyrosine kinase-1 (flt-1)* merupakan reseptor dari *VEGF* menurut *Ferrara et al.* pada tahun 1992. *Kinase insert domain receptor (KDR)* yang merupakan reseptor dari *VEGF* juga dinyatakan oleh *Terman et al.* pada tahun 1992. Pada tahun 1998 *neuropilin 1* dan *neuropilin 2* ditemukan bekerja juga pada *VEGF* reseptor. (Arvidson et all. 2011, Li R, et al. 2009, Koch S, et all. 2011)

### 2.7.2. Klasifikasi VEGF

VEGF terdiri dari 6 jenis: VEGF-A atau sering disebut VEGF, PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D dan VEGF-F. Yang terakhir yang ditemukan kemudian menjadi VEGF-A, dan sebelum penemuan mereka, VEGF-A hanya disebut VEGF. Sejumlah protein VEGF terkait juga telah ditemukan dikodekan oleh virus (VEGF-E) dan di dalam racun beberapa ular (VEGF-F).

Aktifitas *VEGF-A* adalah nama yang diimplikasikan pada pembelajaran sel endotel vaskular, meskipun ini memberikan efek pada

a tipe sel (seperti pemindahan Stimulasi *monocyte/macrophage*, sel kanker, epitel sel ginjal). *VEGF-A* menunjukkan adanya



mitogenesis dan migrasi sel endotel. *VEGF-A* juga merupakan vasodilator dan meningkatkan permeabilitas microvaskular yang merupakan dasar faktor permeabilitas vaskular.

### **Isoforms**

Ada banyak isoform dari *VEGF-A* yang menyebabkan membelahnya mRNA dari single, gen *8-exon VEGFA*. Ini dibagi menjadi 2 bagian yaitu menurut dari terminal exon mereka (exon 8) situs sambatan: Proximal situs sambatan (*denoted VEGF<sub>xxx</sub>*) atau distal situs sambatan (*VEGF<sub>xxx</sub>b*). Sebagai tambahan alternatif sambatan dari exon 6 dan 7 adalah umur ikatan heparin dan angka asam amino (pada manusia: *VEGF<sub>121</sub>*, *VEGF<sub>121b</sub>*, *VEGF<sub>145</sub>*, *VEGF<sub>165</sub>*, *VEGF<sub>165b</sub>*, *VEGF<sub>189</sub>*, *VEGF<sub>206</sub>*; *Protein rodent orthologs* yang mengandung asam amino). Dominasi ini mempunyai konsekuensi fungsi untuk variasi sambatan *VEGF*, seperti sambatan terminal (exon 8) yang protein *pro-angiogenic* (proximal situs sambatan, yang keluar selama *angiogenesis*) atau *anti-angiogenic* (distal situs sambatan, yang dikeluarkan pada jaringan normal). Sebagai tambahan melibatkan atau mengeluarkan exon 6 dan 7 adalah mediasi antara *heparan sulfate proteoglycans (HSPGs)* dan *Neuropilin co-reseptor* pada permukaan sel, merubah kemampuan untuk mengikat dan mengaktifkan *VEGF receptor (VEGFRs)*. *VEGF-C* telah memperlihatkan betapa pentingnya neurogenesis pada daerah subventrikular, tanpa mengerahkan efek *angiogenic*.

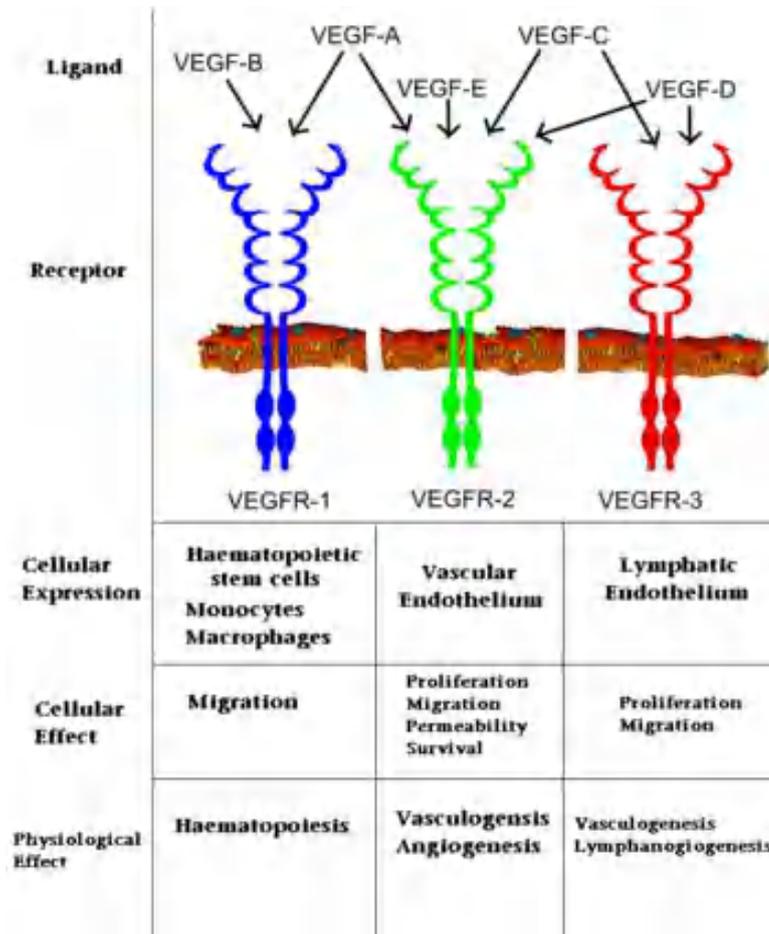


### 2.7.3. Mekanisme kerja VEGF

Semua member dari *VEGF* menstimulasi sel dengan mengikat reseptor tirosin kinase (*VEGFRs*) pada permukaan sel, yang menyebabkan berdimerisasi dan menjadi aktif melalui *transphosphorylation*, meskipun ada perbedaan situs, waktu dan penampakan. *VEGF* reseptor mempunyai porsi ekstraselular yang melibatkan dominan 7 immunoglobulin, single tranfermembran pada peluasan regional. Ikatan *VEGF-A* sampai *VEGFR-1* dan *VEGFR-2* (*KDR/Fik-1*).<sup>15</sup> *VEGFR-2* terlihat sebagai mediasi pada hampir semua sel yang merespon pada *VEGFR*. Fungsi dari *VEGFR-1* lebih kurang dibandingkan *VEGFR-2*.<sup>16</sup> Fungsi lain dari *VEGFR-1* adalah bekerja sebagai decoy reseptor, dieksekusi oleh *VEGF* dari ikatan *VEGFR-2* (Ini terlihat penting dalam pembentukan embrio vaskular). *VEGF-C* dan *VEGF-D*, bukan *VEGF-A* adalah ligan untuk ketiga reseptor (*VEGFR-3/Flt4*) yang memediasi *lymphangiogenesis*. Reseptor (*VEGFR3*) adalah situs utama pengikatan ligan utama (*VEGFC* dan *VEGFD*) yang memediasi aksi prospektif dan fungsi ligan pada target sel. Endotel vaskular growth faktor-C dapat menstimulasi limphangiogenesis (lewat *VEGFR3*) dan angiogenesis lewat *VEGFR2*. *Vascular endothelial growth factor-R3* sudah dapat dideteksi dalam sel limpatik endotel dalam CL pada banyak spesies, ternak, banteng dan binatang menyusui.



Skema 2-3. Jenis-jenis VEGF



Aktivitas VEGF seperti namanya telah dipelajari terutama pada sel-sel endothelium, meskipun tidak memiliki efek pada beberapa jenis sel lain (misalnya stimulasi monosit / migrasi makrofag, neuron, sel-sel kanker, sel-sel epitel ginjal). Pada VBitro, VEGF telah ditunjukkan untuk merangsang sel endotel mitogenesis dan migrasi sel. VEGF juga merupakan mikrovaskuler vasodilator dan ,meningkatkan permeabilitas dan awalnya disebut sebagai factor permeabilitas vascular.



Ekspresi VEGF dipengaruhi oleh rangsangan pada pejamu lain seperti nitric oxide (NO), dan berbagai macam factor pertumbuhan seperti fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor

(PDGF), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), TGF B, EGF, IGF1 dan sitokin inflamasi seperti IL-6.

Faktor pertumbuhan angiogenesis adalah VEGF, bFGF, dan factor pertumbuhan hepatocyte. Regulator positif lainnya adalah angiotropin, angioenin, factor pertumbuhan epidermal, koloni merangsang granulocyte factor, interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, PDGF, TNF- $\alpha$ , dan matriks protein seperti kolagen dan integrins. Beberapa enzim proteolitik penting untuk angiogenesis, termasuk cathepsin, urokinase-type plasminogen activator, gelatinases AS / B, danstromelysin.

Produksi VEGF dapat diinduksi dalam sel yang tidak menerima cukup oksigen. Ketika sebuah sel kekurangan oksigen, menghasilkan induce hipoksia –factor (HIF), factor transkripsi. HIF merangsang pelepasan VEGF, antara fungsi-fungsi lainnya (termasuk modulasi erythropoeisis). VEGF kemudian mengikat reseptor VEGF pada sel endotel, memicu Tirosin kinase Pathway menuju angiogenesis. HIF1 alpha dan HIF Beta terus menerus diproduksi tetapi HIFG alpha O2 sangat labil, jadi dalam kondisi aerobik itu rusak. Ketika sel menjadi hipoksia, HIF1 alpha tetap dan kompleks HIF alpha / b eta merangsang pelepasan VEGF. Setelah dibebaskan, VEGF dapat menimbulkan beberapa tanggapan. Ini dapat menyebabkan sel untuk bertahan hidup.

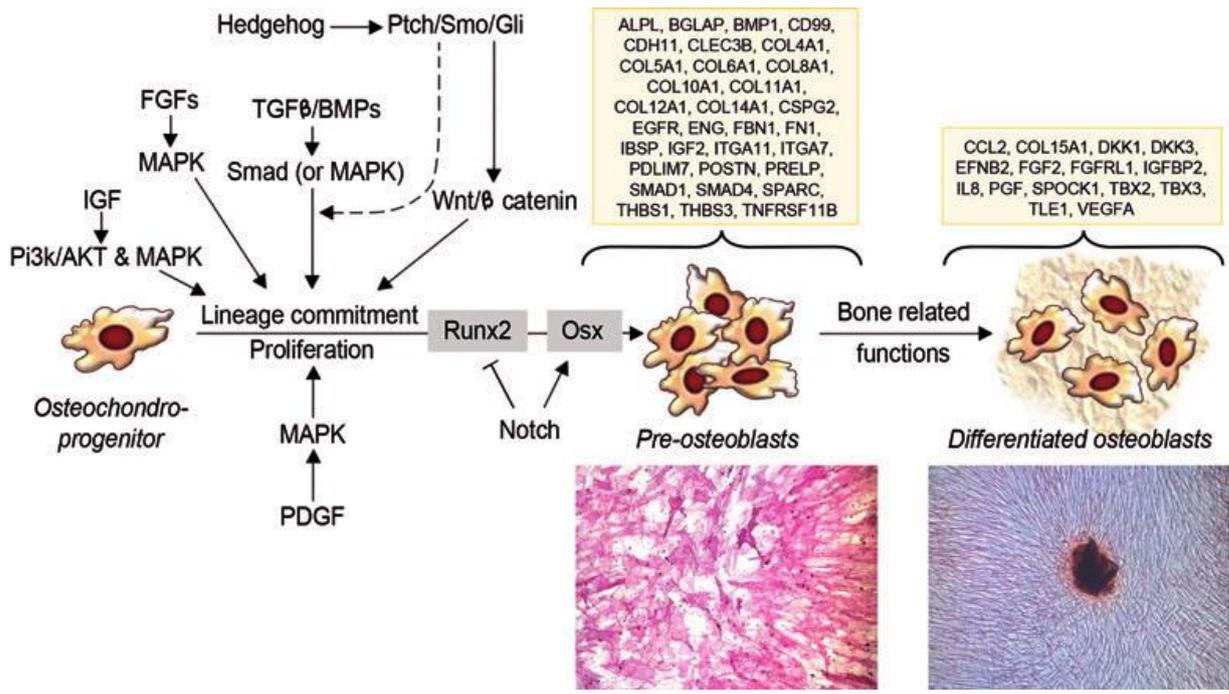


Molecule	Role in bone remodelling
TGF- $\beta$	Mesenchymal stromal cell proliferation; osteoblast precursor recruitment; osteoblast and chondrocyte differentiation (but inhibition of terminal differentiation); bone matrix production; recruitment of osteoclast precursors but inhibition of terminal differentiation and induction of apoptosis
PDGF	Osteoprogenitor migration, proliferation and differentiation; osteoclastogenesis
VEGF	Conversion of cartilage into bone; osteoblast proliferation and differentiation
IGF	Osteoblast proliferation; bone matrix synthesis; bone resorption
EGF	Osteoblast recruitment and proliferation
Fibronectin	Osteoblast migration and adhesion
Vitronectin	Osteoblast migration and adhesion
Prostaglandin E2	Bone resorption

Tabel 2-4.  
Peranan Growth Factor dan molekul lainnya dalam osteogenesis

Pada keadaan luka atau penyembuhan tulang, sekelompok substansi yang berperan dalam osteogenesis seperti TGF- $\beta$ 1, PDGF-BB, VEGF-A dan IGF-1. Molekul-molekul ini akan tertahan dalam jaringan fibrin, perlahan-lahan masuk kedalam lingkungan mikro dan berikatan dengan reseptor pada membran sel. Molekul-molekul yang dilepaskan oleh trombosit mengatur proses kunci yang terkait dalam penyembuhan jaringan, termasuk kemotaksis, proliferasi sel, diferensiasi dan ekstra sintesis matriks seluler. Fibrin yang berikatan itu sendiri dapat bertindak sebagai matriks konduktif atau perancah untuk adhesi sel.





Skema 2-4. Skema. Diferensiasi Osteoblas dan osteogenesis

Skema representasi sinyal jaringan dan factor transkripsi yang mengatur diferensiasi osteoblas dan osteogenesis. Gambar anak panah menunjukkan aksi positif. Garis lurus menunjukkan hambatan, dan garis putus-putus menunjukkan fungsi yang harus dibuktikan nantinya.

Didalam kotak diperlihatkan proses diferensiasi osteogenik dari Stem Cell. Gen ini dikelompokkan sesuai dengan status diferensiasi MSC : 'Pre-osteoblas' adalah MSC yang mampu menghasilkan ALP (aktivitas cytochemical) dan menghasilkan 'Colony Forming Unit'; 'Osteoblas Differentiated' adalah sel yang memiliki kompetensi untuk deposit nodul mineral secara in vitro.

#### 2.7.4. Ekspresi VEGF

duksi *VEGF-A* dapat diinduksi dalam sel yang kurang oksigen.<sup>15</sup> Ketika sel mengalami defisit oksigen, akan



memproduksi HIF (*Hypoxia-inducible factor*). HIF menstimulasi lepasnya VEGF-A, sejalan dengan fungsi lain (termasuk modul dari *erythropoiesis*). Sirkulasi VEGF-A kemudian mengikat reseptor VEGF pada endotel sel, yang memicu jalur tirosin kinase menjadi angiogenesis. Ekspresi pada angiopoetin tidak ada VEGF pada kematian sel endotel dan regresi vaskular.<sup>18</sup> Sebaliknya pada pembelajaran di Jerman in vivo menemukan konsentrasi VEGF menurun setelah 25% pengurangan oksigen selama 30 menit.<sup>19</sup> HIF *alpha* dan HIF1 *beta* tetap diproduksi tetapi HIF1 *alpha* dengan tinggi oksigen labil, jadi pada kondisi anaerob ini akan menurun. Ketika sel menjadi hipoksia, HIF1 *alpha* berlanjut dan HIF1 *alpha* /*beta* menstimulasi pelepasan VEGF. (Arvidson et all. 2011, Deckers MM, et all.2002, Koch S, et all. 2011 Li R, et al. 2009, Li P, et all.2013, Li W, et all. 2000, Liu Y et all. 2012, Peng H, et all. 2009, Gerber HP, et all. 1999, Geiger F, et all. 2005 )

## **2.7.5. Metoda pemeriksaan ekspresi mRNA gen VEGF dan kadar protein VEGF serum**

### **2.7.5.1. Ekstraksi nucleic acid.**

Volume sampel sekitar 100 µl dimasukkan ke dalam 900 µl larutan "L6" yang terdiri dari 120g Guanidium thyocyanate (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, cat no. 50990) dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4, 22 ml 0.2 M Ethylen Diamine Tetra Acetat (EDTA) pH 8.0 dan 2.6g Triton X-100 (Packard, Instrumens) dengan konsentrasi akhir 50 mM Tris HCl, 5

20 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100. Selanjutnya diputar dengan 12.000 rpm. Sedimen ditambahkan suspensi diatom 20 µl yang



terdiri dari 50ml H<sub>2</sub>O dan 500 µl dari 32 % (w/v) "Celite" ("diatom") (Jansen Chimica, Beerse, Belgium, 10.846.79). Dimana 20 µl suspensi diatom ini dapat mengikat 10 µg DNA bakteri, kemudian dilakukan "vortex" dan disentrifuse di dalam tabung eppendorf 1.5 ml dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan sedimen dicuci dengan larutan "L2" yang terdiri dari 120 g GuSCN dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4 yaitu dengan menambahkan 1 ml larutan "L2". Selanjutnya divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, kemudian pencucian diulangi sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan "L2", dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 kali dan 1 ml aseton. Hasilnya kemudian dipanaskan dalam waterbath pada suhu 56°C selama 10 menit dan ditambahkan 60 µl larutan "TE" yang terdiri dari 1 mM EDTA dalam 10 mM Tris HCL pH 8.0, kemudian dilakukan vortex dan dilanjutkan sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, kemudian diinkubasi dalam oven selama 10 menit pada suhu 56°C. Kemudian dilakukan vortex dan sentrifuse ulang selama 30 detik pada kecepatan 12.000 rpm dan diambil supernatannya. Supernatan dari proses ini akan diperoleh hasil ekstraksi nukleitida dan disimpan pada suhu -80°C sebelum dilakukan analisis PCR. (Boom et al.,1990 ; Song et al.1993; Hatta and Smits,2007).

#### 2.7.5.2. Amplifikasi DNA dengan metode PCR (Polymerase Chain Reaction).

ini dilakukan pada sampel DNA yang telah diisolasi. Terlebih dahulu CR-mix dengan primer yang spesifik dari gen VEGF yang akan



diampifikasi sebanyak 22,5 µl yaitu 2,5 µl buffer PCR 10X, 0,5 µl Taq polimerase, 2 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl dNTPs, 13,5 µl aquadest, kemudian ditambahkan primer Forward 5'-ATTTATTTTGGCTTGCCATT-3'; dan primer Reverse 5'-GTCTGTC TGTCTGTCCGTCA-3' masing-masing 1 µl. Selanjutnya sebanyak 2,5 µl ekstrak DNA ditambahkan ke dalam 22,5 µl campuran PCR primer Forward dan reverse dan dilakukan amplifikasi dengan tahap pertama 94°C selama 2 menit dan dilanjutkan dengan 40 siklus masing 60 detik pada 94°C; 45 detik pada 57°C; dan 60 detik pada 72°C. Proses ini dilanjutkan dengan 72° selama 2 menit dengan menggunakan mesin PCR (Thermal cycler Applied Biosystem 2720) . Setelah itu hasil amplifikasi dari campuran PCR primer Forward dan Reverse diambil masing-masing 2,5 µl dan dimasukkan ke dalam campuran loading buffer untuk dielektroforeis. (Frankel et al.1989; Song et al.1993; Zhang et al.1999; Demacq et al.2008; Gürkan et al.2008; Koh et al.2008; Lee et al.2008; Vairaktaris et al.2008; Wang et al.2010; Skarmoutsou et al.2011; Krishnaveni et al.2012; Rahimi et al.2013; Nie et al.2014; Perunovic et al.2015).



Gambar 2-23. Mesin Thermal cycler Applied Biosystem 2720

### 2.7.5.3. Analisa produk PCR dengan elektroforesis

Masing-masing 10 µl produk amplifikasi dicampur dengan 5 µl larutan loading. Setelah tercampur dengan baik masing-masing dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 2% yang terendam dalam tangki yang berisi buffer TBE. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 75 volt. Setelah 1 jam, elektroforesis dihentikan dengan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA dan negatif jika tidak terdapat pita DNA pada gel. ( **Gambar 2-24** )(Song et al.1993).



Gambar 2-24. Alat elektroforesis

### 2.7.5.4. Analisa Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) PCR.



RFLP gen VEGF polimorfisme dianalisis dengan PCR-RFLP. Hasilnya dari lokus gen MMP-9 yang dicerna dengan enzim restriksi

BsmFI untuk polimorfisme dalam kondisi yang direkomendasikan oleh produsen (New England BioLabs, Tokyo, Jepang). Pembatasan enzim pencernaan 203 and 101 base pair divisualisasikan dengan elektroforesis di 1,8% agarose gel diwarnai dengan etidium bromida (Hatta et al.,2010).

#### 2.7.5.5. Direct sequencing

Ada tidaknya polimorfisme dikonfirmasi oleh 'sequencing' langsung setiap band setelah RFLP PCR. Produk PCR disekuensing langsung sebagai berikut: 5 ml produk PCR diinkubasi dengan 2 ml ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio) pada suhu 37°C 15 menit, diikuti dengan 80°C selama 15 menit dan sequencing menggunakan v3.1 Cycle BigDye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington UK) sesuai dengan instruksi pabrik. Singkatnya, reaksi sekuensing dilakukan di 20 ml dari volume akhir mengandung 7 ml produk PCR, 3,2 pmol dari foward primer 5'-GCCTGGCACA-TAGTAGGCC-3', 4 ml Reaksi Ready Mix dan 2 ml BigDye Sequencing Buffer. Parameter untuk reaksi sekuensing adalah sebagai berikut: inkubasi selama 1 menit pada 96°C, diikuti oleh 25 siklus 10 detik pada 96°C, 5 detik pada 50°C, 1 menit pada 60°C, dan langkah terakhir dari 10 menit di 72°C dalam Program Temp Control System PC - 701 (ASTECC, Fukuoka, Jepang). Pewarna 'unincorporated' dihapus oleh DyeEx 2.0 spin Kit (QIAGEN, Maryland, USA). Produk dilarutkan dalam Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, Warrington, Inggris) dan dianalisis menggunakan ABI PRISM 310 analyzer Genetik (Applied Biosystems,

City, California) (Hatta et al.,2010). ( **Gambar 2-25** )





Gambar 2-25. Alat squencer

#### 2.7.5.6. Cara kerja Realtime PCR untuk menentukan profil ekspresi mRNA gen VEGF

Proses gen spesifik oligonukleotida primer untuk GAPDH sebagai housekeeping gene (internal control).

Mendeteksi ekspresi mRNA gen VEGF dengan menggunakan primer spesifik forward 5'GCACCCATGGCAGAAGG-3' dan Reverse 5'-CTCGATTGGATGGCAGTAG TC-3' Protokol PCR: dilakukan penggandaan DNA dengan siklus 94°C selama 3 menit, Siklus diulang 38 kali dengan 94°C (30 dari detik). Mendeteksi gen GAPDH dengan menggunakan Forward/sense primer: AGAGGGAAATCGTGCGTGAC ; Protokol PCR: 94°C(10 menit); 32 siklus 94°C (30 detik). Dan

antisense primer: CAATAGTGATGACCTGGCCGT sesuai dengan Tomomi Yajima.



QRT-PCR menggunakan Green QRT-PCR master mix kit, satu tahap. Protokol ini dioptimalkan untuk instrumen Mx4000. Protokol disesuaikan menggunakan instrumen dengan mengubah pengenceran pewarna berdasarkan petunjuk manual dan mengikuti instrumen pabrik yang direkomendasikan untuk program siklus RT-PCR.

Referensi pewarna pasif dimasukkan dalam reaksi, diencerkan 1 :500. Larutan yang mengandung pewarna dijauhkan dari cahaya. Mengencerkan 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix dan disimpan di atas es. Mengikuti pencairan awal master mix, bagian yang tidak digunakan disimpan pada 4oC dengan catatan, menghindari siklus beku-cair yang berulang.

Reaksi percobaan disiapkan dengan menambahkan komponen-komponen berikut. Menyiapkan campuran reagen untuk reaksi menggunakan beberapa komponen seperti di bawah ini.

Campuran reagen dengan mengambil volume akhir 25 µl (termasuk RNA percobaan)

12,5 µl dari 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix ditambah x µl dari primer awal (konsentrasi dioptimalkan) ditambah lagi Nuklease – bebas PCR – tingkat H2 x µl primer akhir (konsentrasi dioptimalkan) dan juga 0,375 µl larutan pewarna referens dari tahap 1 (opsional) serta 1,0 µl dari RT/Rnase campuran enzim blok dengan 50 µl total volume reaksi juga dapat digunakan. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk

ng (tidak dirotasi), kemudian distribusikan campuran ke tabung percobaan dengan menambahkan x µl RNA percobaan pada setiap reaksi. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk



gelembung (tidak dirotasi). Reaksi disentrifuse dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dan program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin Realtime PCR (CFX Connect system, Biorad Laboratories, Real Time PCR 96 well 0.1 ml, USA). (Yajima et al 1998, Tang and Chen 2009).

#### 2.7.5.7. Perhitungan Kurva kalibrasi dengan Ct (cycle threshold)

Untuk kuantifikasi relatif ekspresi gen hTR maka dibuat kalibrasi kurva dimana RNA GAPDH, sebagai housekeeping enzim, digunakan sebagai kontrol endogen. Kurva kalibrasi sebagai xy (scatter) dan plot mewakili log dari jumlah input (log ng mRNA total awal) sebagai sumbu x dan Ct sebagai sumbu y. Persamaan yang berasal dari garis kurva kalibrasi.

Dua rumus untuk log ng hTR dan GAPDH adalah sebagai berikut:

KONSENTRASI ekspresi mRNA gen = - slope X log (ng mRNA sampel awal) + Ct (r= 0.998).

Contoh :

Konsentrasi ekspresi mRNA gen target =  $-3.26x + 28.63$  (r=0,999)

Konsentrasi ekspresi mRNA gen GAPDH =  $-3.19x + 26.46$  (r= 0.997).

Biasanya berat sampel awal sekitar 50 ng mRNA (=  $\log 50 = 1.698$ )

Bila nilai Ct sampel adalah dimasukkan kedalam rumus untuk gen target atau GAPDH maka konsentrasi hTR atau GAPDH dapat dihitung.

Untuk **menormalkan** perbedaan dalam jumlah total RNA ditambahkan ke reaksi, GAPDH adalah terpilih sebagai kontrol RNA endogen.



Normalisasi konsentrasi gen target, jumlah dengan sendirinya dapat digunakan untuk membandingkan jumlah relatif gen target di berbagai sampel, ditentukan dengan membagi konsentrasi target oleh konsentrasi GAPDH. (Tang, et all . 2009).

Untuk membandingkan 2 sampel gen

Setelah RT-PCR maka dilakukan kuantisasi amplifikasi gen dengan menentukan ambang siklus (Ct).

Kuantisasi relatif ekspresi gen target dievaluasi menggunakan metode perbandingan Ct.

Nilai  $\Delta Ct$  ditentukan dengan cara mengurangkan target Ct masing-masing sampel dengan nilai Ct dari  $\beta$ -actinnya.

Perhitungan  $\Delta\Delta Ct$  ialah nilai rata-rata  $\Delta Ct$  sampel ASC sebagai kalibrator dikurangi nilai rata-rata  $\Delta Ct$  sampel kelompok normal.

Kelipatan perubahan dari ekspresi dari gen target yang setara dengan  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

RUMUS :

Perbedaan kelipatan dalam membandingkan ekspresi gen 1 dengan ekspresi gen 2 =  $[2^{-\Delta\Delta Ct}]$

Dimana :

$\Delta\Delta Ct = \{ \text{rata rata (triplicate) Ct } (\Delta Ct_1) \text{ sampel 1} \} - \{ \text{rata rata (triplicate) Ct sampel 2} \}$  . (Tang, et all . 2009).



### **2.7.5.8. Cara kerja Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) untuk menentukan kadar protein gen VEGF pada serum.**

Sample serum penderita disiapkan bersama seluruh reagen sesuai dengan Human VEGF Quantikine ELISA KIT (R&D Systems, USA) yang digunakan yang diperlukan dalam suhu kamar sebelum digunakan. Setiap sampel dilakukan secara triplicate untuk menjamin kebenaran/validitas hasil ELISA.

Kemudian diisi paknya semua reagen, dilusi standard dan sampel serum penderita. Buka mikroplate strip dan buat layout dari sampel sesuai dengan jumlah sampel yang akan dimasukkan kedalam well/sumur. Tahap pertama dilakukan penambahan 100  $\mu$ L Assay Diluent yang berisi buffer protein kedalam setiap sumur. Selanjutnya ditambahkan 100  $\mu$ L cairan Standard yang berisi precombinant human gen VEGF dari KIT yang telah ditentukan atau dilusi sampel dari serum penderita kedalam setiap well/sumur. Lalu dilakukan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Isap cairan disetiap well/sumur dan dicuci dengan PBS steril. Proses pencucian ini dilakukan 4 kali secara berturut turut. Kemudian ditambahkan 200  $\mu$ L cairan Conjugate yang berisi streptavidin HRP kedalam setiap well/sumur dan tutup dengan penutup plastik dan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Cairan diisap dan selanjutnya dilakukan pencucian ulang sebanyak 4 kali dengan menggunakan PBS steril. Proses berikutnya ditambahkan 200  $\mu$ L Substrate Solution yang berisi TMB kedalam setiap well/sumur. Dan

selama 20 menit pada suhu kamar dimana mikroplate disimpan dalam keadaan gelap untuk menghindari cahaya. Setelah selesai diinkubasi



reaksi dihentikan dengan menambahkan 50  $\mu$ L cairan Stop Solution yang berisi H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kedalam setiap well/sumur dan dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. Dibaca konsentrasi protein gen VEGF dengan satuan ng/ml. (Kolar et al.2008)

