

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fraktur merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan disebabkan insiden yang makin lama makin meningkat, dan mempunyai komplikasi yang memerlukan perawatan yang lama. Komplikasi penyembuhan fraktur yang sering terjadi adalah *nonunion* dan *delayed union*. *Nonunion* adalah fraktur yang sudah terjadi antara 6–8 bulan, dan belum menunjukkan adanya tanda-tanda penyembuhan dalam 3 bulan terakhir. Gambaran radiologisnya berupa *bridging* minimal pada tulang, ujung fragmen fraktur yang bundar dan sklerotik, serta kegagalan pembentukan kalus (Salter, 1999; Jilka, 2003; Cohen, 2006; Phieffer dan Goulet, 2006). Sedangkan *delayed union* adalah penyembuhan fraktur yang memerlukan waktu lebih lama dari penyembuhan normal, dengan periode antara 20–26 minggu (Salter, 1999; Phieffer dan Goulet, 2006)

Prevalensi *nonunion* yang dilaporkan bervariasi sesuai dengan wilayah, anatomi, dan kriteria yang digunakan untuk mendefinisikan *nonunion*. Pada tahun 2005-2010 di Amerika Serikat, diperkirakan terdapat 100.000 kasus fraktur menjadi *nonunion* setiap tahun. Selain itu, di Skotlandia, sebuah analisis retrospektif pada tahun yang sama menemukan rata-rata 979 kasus *nonunion* terjadi dengan prevalensi *nonunion* 18,4 / 100.000 kasus per tahun. Menurut jenis fraktur, humerus mempunyai angka kejadian 1–3% dari seluruh kasus fraktur, dan didapatkan 4,2% menjadi kasus *nonunion* yang ditatalaksana secara konservatif. Sedangkan pada fraktur tibia dengan angka kejadian 26/100.000 kasus pertahun, didapatkan 5% kasus *nonunion*. Beberapa penelitian menunjukkan, kasus fraktur sering terjadi pada usia 30–40 tahun dan lebih sering terjadi pada laki-laki. Pada perempuan, tingkat *nonunion* terjadi pada usia dekade kelima dan paling banyak disebabkan oleh kerapuhan tulang (Nandra dkk., 2015).

Pada anak-anak, *nonunion* dianggap sebagai komplikasi yang langka. Kerangka tulang yang belum matang memiliki lapisan periosteal yang aktif, sangat tebal, dan vaskularisasi yang cukup sehingga dapat meningkatkan potensi

penyembuhan. Selama periode 2005–2010 di Skotlandia, terdapat 180 anak berusia dibawah 15 tahun yang dirawat karena mengalami kasus *nonunion* (60,6% laki-laki dan 39,4% wanita). Risiko terjadi *nonunion* adalah 1 per 500 kasus fraktur anak atau kurang pada anak laki-laki yang berusia di bawah 14 tahun dan pada anak perempuan dari segala usia.

Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Nandra, R. dkk. (2015), risiko *nonunion* meningkat menjadi sekitar 1 per 200 kasus fraktur untuk remaja laki-laki pada rentang usia 15–19 tahun. Pada studi lain menunjukkan prevalensi kasus *nonunion* sebesar 2,5% dari 5.571 kasus fraktur. Sebagian besar merupakan fraktur tibia karena *high energy trauma*. Di Indonesia, dengan berbagai tingkat ekonomi dan pendidikan serta keanekaragaman sosial, masyarakat terutama di pedesaan cenderung memilih terapi alternatif ke dukun patah tulang sebagai penanganan awal. Penderita baru akan datang ke pelayanan kesehatan dalam keadaan sudah menjadi *nonunion*, *malunion* atau *delayed union*. Selain itu, fraktur terbuka dengan kerusakan jaringan lunak yang ekstensif memiliki prevalensi *nonunion* yang lebih tinggi (Phieffer dan Goulet, 2006).

Selain menimbulkan masalah kesehatan, tingginya prevalensi kasus *nonunion* juga menimbulkan masalah sosial dan ekonomi pada pasien akibat terganggunya produktivitas (Ekegren dkk, 2018; Saleh dan Hak, 2001; Phieffer dan Goulet, 2006; Garcia-Altès dan Pérez, 2007). Biaya yang dihabiskan untuk pengobatan dan rehabilitasi juga semakin bertambah setiap tahun. Hal tersebut diperkirakan mencapai 1% dari *Gross National Product* pada negara dengan pendapatan perkapita rendah dan 2% pada negara dengan pendapatan perkapita tinggi. Fraktur dengan penyulit seperti infeksi dan kerusakan jaringan lunak yang luas sehingga menyebabkan *stripping* periosteum, yang berperan sebagai sumber penting sel osteoprogenitor, merupakan faktor utama timbulnya *nonunion*. Hal ini membutuhkan waktu serta dana yang lebih besar untuk penyembuhan dan rehabilitasi (Saleh dan Hak, 2001).

Penyembuhan fraktur memerlukan beberapa tahap. Segera setelah fraktur, terjadi pembentukan hematoma pada tulang yang cedera. Hematom ini disebabkan akibat perdarahan dari tulang yang pecah dan pembuluh periosteal yang terbentuk di dalam kanal meduler dan di bawah periosteum. Hematom pada fraktur sangat

hipoksia, dan telah terbukti dalam sebuah studi pada kelinci, bahwa hematoma hanya memiliki tekanan oksigen rata-rata 6,25 mmHg. Peneliti dari Johns Hopkins menemukan hubungan antara hipoksia dan *upregulation* faktor proangiogenik seperti *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Faktor transkripsi yang bertanggung jawab, bernama *Hypoxia Inducible Factor-1 α* (HIF-1 α), mengaktifkan gen yang terlibat dalam metabolisme anaerobik, angiogenesis, dan eritropoiesis. Ekspresi HIF dalam fraktur femur tikus terbukti terus meningkat dan mencapai puncak dengan ekspresi 5,9 kali lipat lebih tinggi dari tulang femur kontralateral. Ekspresi VEGF mencerminkan ekspresi HIF. (Pastukh dkk, 2015).

Fase selanjutnya, terjadi respon inflamasi yang menghasilkan sel-sel inflamasi. Sel inflamasi bersama dengan sitokin dan matriks ekstraseluler yang dihasilkan, memiliki peran penting dalam memfasilitasi proses penyembuhan normal. Salah satu peran sel-sel inflamasi, terutama neutrofil dan makrofag, adalah debridemen jaringan yang terluka dan rusak. Makrofag akan memfagositosis area nekrotik dan memfasilitasi tahap regenerasi dengan melepaskan faktor pertumbuhan. Beberapa faktor pertumbuhan meningkat aktivitasnya selama proses penyembuhan fraktur, antara lain *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Insulin like Growth Factor* (IGF) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Street dkk., 2002; Giannoudis dkk., 2007). Faktor-faktor pertumbuhan ini bertanggung jawab pada proses migrasi, rekrutmen, serta proliferasi sel punca mesenkim dan diferensiasinya terhadap angioblas, kondroblas, fibroblas, dan osteoblas yang memulai proses perbaikan dengan memfasilitasi proliferasi dan diferensiasi dari MSC yang menimbulkan kalus (Oryan dkk., 2015).

Pada awal proses fraktur, pasokan vaskular periosteal, kortikal, dan meduler mengalami gangguan, menyebabkan nekrosis seluler akut dan asidosis. Revaskularisasi diperlukan untuk perfusi kalus dengan oksigen, nutrisi, dan sel inflamasi untuk proses remodeling. Pada sebagian besar kasus, vaskularisasi dibentuk kembali dengan cepat melalui pengembangan jaringan vaskular baru. Pembentukan jaringan ini terjadi melalui dua proses yang berbeda, yaitu angiogenesis dan vaskulogenesis. Angiogenesis adalah proses pembentukan

pembuluh darah baru yang tumbuh dari pembuluh darah yang ada sedangkan vaskulogenesis adalah pembentukan pembuluh darah secara *de novo* dari *endothelial progenitor cell in situ* (EPC) di dalam kalus. (Tanaka dkk., 2005). Angiogenesis dipicu oleh hipoksia untuk menghasilkan kapiler melalui pelepasan VEGF, *acidic and basic fibroblast growth factors* (aFGF, bFGV) dan angiopoietin (Darwin A dkk., 2017).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) adalah penggerak angiogenesis dan vaskulogenesis yang berkarakteristik baik. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) merupakan salah satu faktor penting karena memiliki kemampuan menstimulasi neovaskularisasi salah satunya angiogenesis. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) akan mempercepat pembentukan pembuluh darah baru, osifikasi matriks tulang, maturasi kalus, dan mendorong *bridging callus* pada defek tulang. Aktivitas VEGF berpengaruh dalam setiap tahap penyembuhan fraktur, mulai dari pembentukan hematoma hingga *bone turn over* saat fase remodeling. Peran VEGF dalam penyembuhan tulang dimediasi oleh osifikasi intramembran (Street dkk., 2002).

Disamping VEGF peranan antigen CD-34 sebagai angiogenesis dan vaskulogenesis tidak bisa diabaikan. Antigen permukaan CD-34 ini sebagai penanda permukaan sel yang umumnya terdapat pada sel progenitor, hematopoetik dan sel endotel. Sel endotel progenitor ini mengekspresikan CD-34 yang sudah terbukti dapat melakukan pembentukan pembuluh darah baru dari struktur vaskuler yang telah ada (angiogenesis) pada jaringan yang mengalami iskemik atau menstimulasi faktor-faktor pertumbuhan angiogenik. (Machie and Losordo 2011).

Protein yang dikode oleh gen CD-34 ini berperan dalam perlekatan stem sel ke sumsum tulang, matriks ekstraseluler atau ke sel stroma. Protein ini juga sudah terbukti berperan sebagai *scaffold* pada perlekatan spesifik gilcant sehingga stem sel melekat pada lektin yang diekspresikan oleh sel stroma. (Isache and Harton, 2000). Disamping itu sel CD-34 telah terbukti memicu proliferasi sel progenitor hematopoetik, berperan dalam proses hematopoiesis dan diferensiasi sel hematopoetik serta memiliki kemampuan untuk berdiferensiasi menjadi sel endotel. *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan angiopoietin, telah

terbukti dapat memicu sel CD-34 ke sirkulasi perifer. Saat sel CD-34 bersirkulasi dalam darah terutama pada zona yang mengalami hipoksia, sel CD-34 akan memicu angiogenesis. Penelitian terbaru menunjukkan sel CD-34 dapat menginduksi angiogenesis pada hewan yang mengalami iskemia perifer, iskemia serebral dan iskemia miokard. (Mache and Losordo, 2011).

CD-34 merupakan antigen membran yang berukuran 115 kDa yang dapat ditemukan pada sel progenitor hematopoietik dan sel endotel vaskular. Penggunaan *immunostain* CD-34 sangat bermanfaat dalam mengukur banyaknya pembuluh darah yang dibentuk oleh VEGF pada proses penyembuhan tulang (Stanek J dan Abdaljaleel M, 2019).

Salah satu penyebab fraktur menjadi *nonunion* adalah vaskularisasi yang tidak adekuat akibat mekanisme cedera yang berat dan menyebabkan faktor penyembuhan tulang tidak bekerja dengan baik, sehingga pada kondisi *nonunion* diperlukan pemicu agar faktor pertumbuhan dapat bekerja dengan baik. Beberapa studi yang mengumpulkan sampel dari jaringan *nonunion* dari suatu fraktur menemukan kesulitan untuk mencari korelasi respon faktor pertumbuhan lokal dan sistemik terhadap kejadian *nonunion*, sehingga dilakukan penelitian kondisi *delayed union* pada domba. Studi tersebut menunjukkan bahwa pada kondisi *delayed union*, berbagai faktor yang diperlukan untuk penyembuhan dalam kalus, termasuk VEGF, Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, dan bFGF lebih rendah dibandingkan dengan yang *union*. Secara histologi pada sampel *nonunion*, pembentukan hematoma memerlukan waktu yang lebih lama dan gambaran pembuluh darah yang tumbuh lebih lambat muncul dibanding kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan VEGF yang lebih rendah pada *nonunion* mungkin disebabkan oleh hipoksia yang berkepanjangan (Lienau dkk., 2009).

Proses penyembuhan fraktur dipengaruhi beberapa faktor penting. Berdasarkan studi oleh Giannoudis dkk. (2007), *diamond concept* dapat dijadikan sebagai konsep dalam penyembuhan fraktur. Menurut konsep tersebut, penyembuhan fraktur dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu sel-sel osteogenik, osteokonduktif, faktor mekanik, dan faktor pertumbuhan. Selama proses penyembuhan, terjadi proses regenerasi tulang yang merupakan proses sekuensial ditandai dengan migrasi sel, kopling, proliferasi, dan diferensiasi serta melibatkan

beberapa jenis sel seperti osteoblas, osteoklas, sel endotel, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), faktor pematangan, dan mineralisasi *extracellular matrix* (ECM).

Secara garis besar, faktor yang berpengaruh pada proses penyembuhan fraktur adalah osteoblas, osteosit dan VEGF. Selama proses pembentukan tulang, osteoblas sebagai sel pembentuk tulang utama, mensintesis protein matriks tulang termasuk *alkaline phosphatase* (ALP), *osteocalcin* (OCN), serta kolagen tipe I dan menghasilkan mineral berbasis kalsium dan fosfat yang diendapkan ke dalam *Extracellular Matrix* (ECM) untuk membentuk jaringan yang kuat, termineralisasi, dan berdiferensiasi menjadi sel-sel osteosit (Takeda dan Karsenty, 2001; Raisz dan Seeman, 2001). Diferensiasi ini dikontrol ketat oleh protein regulator ekstraseluler spesifik seperti faktor pertumbuhan, hormon, vitamin, dan sitokin (Tanaka dkk., 2003). Osteoblas dikelilingi protein matriks ekstraseluler termasuk kolagen tipe I dan fibronektin terutama melalui integrin- β 1. Osteoblas mampu mengekspresikan integrin- β 1, dan keterlibatan integrin- β 1 pada osteoblas oleh antibodi spesifik atau matriks ligan, menginduksi proliferasi, diferensiasi, dan sintesis matriks tulang osteoblas melalui tirosin kinase, terutama *Focal Adhesion Kinase* (FAK). Hal ini menunjukkan bahwa pembentukan tulang juga diatur secara ketat oleh adhesi pada matriks tulang (Mundy dkk., 2001).

Osteosit merupakan hasil diferensiasi osteoblas. Pada tulang imatur, osteosit membentuk sekitar 95% dari sel tulang total. Osteosit merupakan satu-satunya sel yang tertanam dalam matriks ekstraseluler tulang. Fungsi fisiologis osteosit belum dipahami dengan baik, tetapi beberapa ilmuwan menyatakan bahwa osteosit bekerja pada *lining cell* untuk meregulasi pertukaran ion-ion mineral antara cairan interstisial dan ekstraseluler. Dengan demikian, osteosit akan mempertahankan lingkungan ion lokal yang sesuai untuk mineralisasi matriks tulang. Atas dasar lokasinya yang unik dalam matriks tulang ini, osteosit bertanggung jawab untuk mendeteksi kerusakan mikro dan untuk mengawali proses perbaikannya (Herling, 2016). Osteosit memainkan peran penting dalam pembentukan dan remodeling tulang melalui mekanisme sklerotin.

Faktor-faktor pertumbuhan yang diperlukan dalam proses penyembuhan tersebut banyak terdapat dalam amnion. Salah satu sediaan amnion yang saat ini

banyak digunakan dalam penelitian adalah Amnion Liofilisasi Steril Radiasi (ALSR) (Blair dkk., 2002; Nakayamada dkk., 2003).

Amnion Liofilisasi Steril Radiasi (ALSR) merupakan suatu penemuan yang telah dikembangkan oleh Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) yang disimpan dalam Bank Jaringan Riset Batan (BJRB). Amnion diproses dengan metode liofilisasi untuk dikeringkan dan dilakukan sterilisasi dengan radiasi sinar γ (sinar gamma) sehingga dapat menghambat aktivitas mikroorganisme. Metode ini dapat meminimalisasi kerusakan jaringan, sehingga tidak merusak sifat biologi senyawa organik seperti *growth factor* yang terkandung dalam amnion (Blair dkk., 2002). *Growth factor* yang terkandung dalam ALSR antara lain PDGF, TGF, FGF, VEGF, IGF, BMP-2, BMP-4 dan *cell scaffold* seperti kolagen dan laminin. Dengan metode tersebut, ALSR dipercaya dapat berfungsi sebagai osteokonduktif/*scaffold*, osteogenik dan *growth factor* pada daerah fraktur.

Penelitian Winanto dkk. (2013) membuktikan bahwa implantasi membran amnion memberikan efek stimulasi yang positif terhadap penyembuhan fraktur. Membran amnion menyediakan membran basal yang mendorong migrasi sel dan diferensiasi, mengurangi peradangan di area bawah membran, dan bertindak sebagai segel biologis yang mencegah berbagai jenis mikroorganisme masuk ke dalam luka dan berbagai jenis jaringan dengan kapasitas regenerasi yang cepat (epitel dan ikat) memasuki tulang cacat dan mencegah potensi osteogeniknya (Nakayamada dkk., 2003; Suryani, 2013).

Pada penelitian defek kepadatan tulang femur kelinci, telah terbukti bahwa ALSR membantu proses regenerasi tulang. Kepadatan tulang dengan intervensi ALSR dilihat dari hasil histomorfometri dan tomografi yang menunjukkan kerapatan yang sebanding atau lebih tinggi dari kelompok penelitian yang diberikan membran kolagen, dan kepadatan yang lebih tinggi dibandingkan dengan hasil yang diperoleh pada kelompok kontrol (tanpa membran). Saat ini ALSR adalah sediaan yang murah serta mudah didapat (Winanto dkk., 2013).

Amnion Liofilisasi Steril Radiasi (ALSR) diharapkan dapat membantu mengatasi timbulnya masalah pada proses penyembuhan fraktur, yaitu *nonunion* beserta komplikasinya. Bukti mengenai pengaruh ALSR dalam membantu proses penyembuhan fraktur dan peningkatan jumlah osteoblas, osteosit, ekspresi VEGF

dan CD-34 terutama pada kondisi *nonunion* masih belum ditemukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu penelitian untuk membuktikan hal tersebut. Penelitian ini belum pernah dilakukan pada manusia, sehingga akan dilakukan pada hewan coba yaitu tikus *Sprague Dawley*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

- 1) Apakah terdapat efek ALSR terhadap jumlah osteoblas pada fraktur dengan *nonunion* yang dialami tikus percobaan?
- 2) Apakah terdapat efek ALSR terhadap jumlah osteosit pada fraktur dengan *nonunion* yang dialami tikus percobaan?
- 3) Apakah terdapat efek ALSR terhadap ekspresi VEGF pada fraktur dengan *nonunion* yang dialami tikus percobaan?
- 4) Apakah terdapat efek ALSR terhadap ekspresi CD-34 pada fraktur dengan *nonunion* yang dialami tikus percobaan?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menganalisis efek ALSR terhadap ekspresi osteoblas, osteosit, VEGF dan CD-34 dalam penyembuhan fraktur dengan *nonunion*.

1.3.2 Tujuan khusus

- 1 Menganalisis efek ALSR terhadap jumlah osteoblas pada fraktur dengan *nonunion* yang dialami tikus percobaan.
- 2 Menganalisis efek ALSR terhadap jumlah osteosit pada fraktur dengan *nonunion* yang dialami tikus percobaan.
- 3 Menganalisis efek ALSR terhadap ekspresi VEGF pada fraktur dengan *nonunion* yang dialami tikus percobaan.
- 4 Menganalisis efek ALSR terhadap ekspresi CD-34 pada fraktur dengan *nonunion* yang dialami tikus percobaan.

1.4 Manfaat Hasil Penelitian

1. Bagi ilmu pengetahuan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangsih bagi ilmu pengetahuan tentang peran ALSR dalam meningkatkan faktor yang mempengaruhi penyembuhan pada fraktur dengan *nonunion*, yaitu osteoblas, osteosit, VEGF dan CD-34.

2. Bagi praktisi

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi pendekatan baru dalam penatalaksanaan fraktur dengan *nonunion*, sehingga dapat membantu tercapainya kondisi *union* dan menekan biaya pengobatan. Di samping itu, penelitian ini mempunyai nilai hak atas kekayaan intelektual (HAKI).

3. Bagi masyarakat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai manfaat ALSR sebagai salah satu tambahan dalam penatalaksanaan komplikasi fraktur yaitu *nonunion*.

