

CYTOTOXIC EFFECT OF FREEZE DRIED BOVINE CARTILAGE POWDER AND PLATELET RICH PLASMA (PRP) TO MESENCHYMAL STEM CELL (MSCs)

Dwikora Novembri Utomo^{1*}, Anthoni Yusbida²

¹Senior Consultant of Orthopaedic and Traumatology Department, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Dr Soetomo General Hospital, Surabaya

²Resident of Orthopaedic and Traumatology Department, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Dr Soetomo General Hospital, Surabaya

*Correspondence: Dwikora Novembri Utomo, Senior Consultant of Orthopaedic and Traumatology Department, Faculty of Medicine, Universitas Airlangga, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo 6-8, Surabaya
E-mail : dwikora_utomo@yahoo.com

ABSTRAK

Perbaikan tulang rawan adalah masalah klinis yang menantang karena kerusakan merupakan kondisi yang ireversibel. Banyak penelitian telah dilakukan dengan menggunakan beberapa jenis *scaffold* alami maupun sintesis. Upaya untuk memperbaiki tulang rawan articular dengan menggunakan *scaffold* biasanya memiliki banyak masalah, kekurangan pada struktur fisik dan sifat mekanik yang diperlukan untuk memastikan keefektifan jangka panjang terhadap kerusakan tulang rawan. Selain itu, *scaffold* sering menyebabkan toksisitas terhadap inang. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan secara *in vitro* untuk menguji efek toksisitas dari *scaffold* bubuk tulang rawan dan *platelet rich plasma* (PRP). Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan penelitian eksperimental murni pada 4 kelompok *stem cell* hewan yang ditambahkan dengan *scaffold* tulang rawan kering yang diberi *platelet rich plasma* (PRP). Penelitian ini menggunakan *post test only control group design*. Hasilnya diproses dengan MTT assay dan spektrofotometer untuk menghitung *stem cell* yang masih hidup. Tidak ada perbedaan yang signifikan dalam jumlah makrofag antara kelompok kontrol dan *scaffold* tulang rawan kering beku yang ditambahkan PRP ($p=0,128$). Dengan hasil ini pada jumlah makrofag antara kelompok kontrol dan *scaffold* tulang rawan kering beku yang ditambahkan PRP, dapat disimpulkan bahwa biomaterial ini memiliki biokompatibilitas.

Kata kunci : tulang rawan sapi beku kering, *scaffold*, *platelet rich plasma*, makrofag

ABSTRACT

Cartilage repair is a challenging clinical problem because the damage is an irreversible condition. Many studies had been performed using several kinds of natural or synthetic scaffold. Attempts to repair articular cartilage using scaffold usually found many problems, lacks the physical structure and mechanical properties necessary to ensure long-term efficacy to cartilage defect. Furthermore, scaffold frequently cause toxicity to the host. Therefore, this study was performed *in vitro* to test the toxicity effect of scaffold freeze dried bovine cartilage powder and platelets Rich Plasma (PRP). This research was conducted using pure experimental research design in 4 groups of animal stem cells which being added with scaffold freeze dried bovine cartilage scaffold provided with platelet rich plasma. This study using posttest only control group design. The result being processed with MTT assay and spectrophotometer for counting the viable stem cells. There was no significant difference in the amount of macrophage between control and the freeze dried bovine cartilage scaffold provided with PRP ($p=0,128$). With this result in the number of macrophages between the control with freeze dried bovine cartilage scaffold provided PRP, it can be concluded that these biomaterials have biocompatibility.

Keywords : freeze dried bovine cartilage, scaffold, platelet rich plasma, macrophage

PENDAHULUAN

Dari banyaknya cedera pada tulang dan sendi pada kecelakaan, kerusakan tulang rawan sendi masih merupakan masalah utama karena sering menimbulkan keluhan yang berkepanjangan dari penderita.

Hal tersebut sangat merugikan, karena berpengaruh signifikan terhadap menurunnya tingkat produktifitas akibat tingkat kesakitan penderita. Kerusakan tulang rawan sendi memerlukan pembiayaan yang tinggi baik untuk pembelian obat-obatan dan operasi.¹ Salah satu perkembangan yang terbaru di bidang pengobatan tulang rawan sendi adalah pengobatan dengan teknik *cartilage tissue engineering*. Metode ini merupakan terapi kerusakan tulang rawan sendi dengan teknik yang berbasis sel, *growth factor* dan *scaffold*. Sel yang digunakan adalah kondrosit atau *mesenchymal stem cells*. Pada perkembangan terakhir sel yang sering digunakan adalah *bone marrow mesenchymal stem cells*.²

Mesenchymal stem cells (MSCs) adalah sel multipoten yang dapat berdeferensiasi ke dalam beberapa sel selama proses penyembuhan cedera jaringan. *MSCs* dapat berdeferensiasi menjadi *cartilage* pembentuk *cartilage* sendi, *collagen*, osteoblas. Sel itu secara bersama-sama mempunyai kemampuan

untuk meregenerasi kerusakan jaringan yang disebabkan oleh trauma, perubahan degenerasi termasuk osteoarthritis. Regenerasi *cartilage* sendi dengan metode *mesenchymal stem cells (MSCs)* paling banyak digunakan saat ini karena potensinya yang dapat memperbaiki kerusakan jaringan secara signifikan.³ Sejumlah material *scaffold* baik alami maupun sintesis telah ditest secara *in vitro* dan *in vivo* dalam penelitian. *Scaffold* yang ideal mempunyai sifat biokompatibilitas untuk dapat mencegah reaksi radang dari sel-sel host, bentuk yang tiga dimensi untuk proliferasi dan diferensiasi sel, dan porositas yang cukup untuk migrasi sel dan difusi molekul, nutrisi dan oksigen. Matriks dari material tersebut juga harus dapat memfasilitasi implantasi sel tersebut pada lesi dan bertahan di dalam implan.⁴

Berbagai jenis *scaffold* telah dikembangkan untuk terapi kerusakan tulang rawan sendi, tetapi masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Untuk mengisi defek atau rongga pada tulang rawan, *scaffold* yang konvensional kurang cocok dipakai karena relatif tidak larut dan menyatu dengan tulang rawan. *Scaffold* yang biasa digunakan sampai sekarang berbentuk tiga dimensi sehingga biasanya implantasinya kurang baik pada tulang rawan.⁴

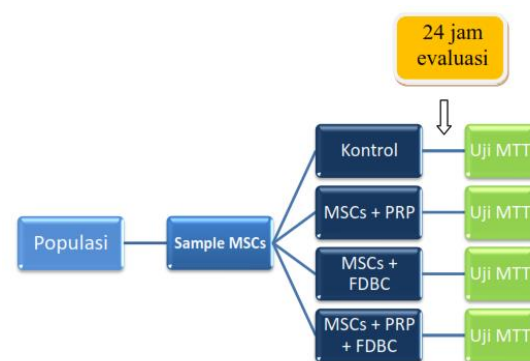
Di Bank Jaringan RS Dr. Soetomo dikembangkan *scaffold* berbentuk *powder* yang dibuat dari tulang rawan sapi dan diproses dengan *freeze dried* (beku kering). Untuk memudahkan implantasinya maka dikombinasi dengan *platelet rich plasma (PRP Gel)*. Bubuk tulang rawan sapi ini larut pada PRP dan akan membentuk larutan yang berbentuk gel sehingga siap untuk diimplantasikan. *PRP gel* ini merupakan bahan yang banyak mengandung *growth factor* yang penting untuk regenerasi tulang rawan, proliferasi dan diferensiasi *mesenchymal stem cells (MSCs)*.

Untuk penelitian lebih lanjut guna memanfaatkan bubuk tulang rawan sapi dan *platelet rich plasma* tersebut maka diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui efeknya terhadap *mesenchymal stem cells*. Pada penelitian sebelumnya terbukti bahwa bubuk tulang rawan sapi tersebut dan *platelet rich plasma* biokompatibel terhadap jaringan. Diharapkan nantinya *scaffold* bubuk tulang rawan sapi ini dapat digunakan secara luas untuk pengobatan kerusakan tulang rawan sendi yang dikombinasi dengan *mesenchymal stem cells*.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini adalah suatu penelitian experimental murni dengan

rancangan *post-test only control group design*. Sampel penelitian dibagi menjadi empat kelompok, tiga kelompok mendapat perlakuan dan satu kelompok menjadi kontrol. Satu kelompok tidak dirikan perlakuan, satu kelompok mendapat *platelet rich plasma (PRP)* satu kelompok mendapat *Freeze Dried Bovine Cartilage (FDBCP)* dan satu lagi mendapatkan FDBCP dan PRP.



Gambar 1. Skema metodologi penelitian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental dimulai dengan pembuatan *platelet rich plasma* dan pengaktifan *mesenchymal stem cell*. *Platelet rich plasma* dan *freeze dried bovine cartilage powder* kemudian diuji toksisitasnya terhadap *mesenchymal stem cell* dengan *MTT assay* pada panjang gelombang 630 nm. Data tentang pengaruh sitotoksik *scaffold* bubuk tulang rawan sapi dan *platelet rich plasma* secara kuantitatif dinilai dengan menggunakan uji viabilitas *MTT assay* terlihat pada tabel 1.

- Hasil perhitungan jumlah Perhitungan jumlah stem cell yang *mesenchymal stem cell* didapatkan dengan ELISA reader ditampilkan pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Hasil Penelitian

Hasil Pemeriksaan			Statistic
MSCs	Mean		,71050
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,60496
		Upper Bound	,81604
	5% Trimmed Mean		,70006
	Median		,68850
	Std. Deviation		,166102
MSCs + PRP	Mean		1,17542
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,03788
		Upper Bound	1,31296
	5% Trimmed Mean		1,16357
	Median		1,15750
	Std. Deviation		,216474
MSCs + FDBCP	Mean		,67467
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,59900
		Upper Bound	,75033
	5% Trimmed Mean		,67707
	Median		,68750
	Std. Deviation		,119088
MSCs + PRP + FDBCP	Mean		1,58317
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1,43867
		Upper Bound	1,72766
	5% Trimmed Mean		1,59641
	Median		1,66650
	Std. Deviation		,227418

Dari data deskriptif diatas didapatkan bahwa kadar rata-rata MTT meningkat pada kelompok yang diberi PRP dan kelompok yang mendapat PRP+FDBCP. Sedangkan pada kelompok yang mendapat FDBCP terjadi penurunan kadar rata-rata MTT untuk mengetahui apakah peningkatan atau penurunan kadar rata-rata MTT ini signifikan, maka dilakukan uji statistik yaitu Uji ANOVA.

- Uji Statistik ANOVA

Karena diberikan empat perlakuan yang berbeda maka digunakan uji ANOVA. Untuk memakai uji ini maka data harus homogen dan varian data harus homogen.

1. Uji homogenitas data

Tabel 2. Homogenitas data penelitian

Perlakuan	Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.
M MSCS	,887	12	,107

T	MSCS +	,930	12	,379
T	PRP			
	MSCS +	,972	12	,928
	FDBCP			
	MSCS +	,880	12	,088
	PRP +			
	FDBCP			

Dari data berikut didapatkan keempat kelompok data terdistribusi normal. Ini karena semua kelompok data memiliki nilai $p > 0,05$.

2. Uji homogenitas variance

Tabel 3. Homogenitas variance

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,475	3	44	,234

Dari data diatas didapatkan bahwa variance data homogen. Ini dilihat dari nilai $p > 0,05$. Karena homogenitas data normal dan homogenitas variance normal maka dapat dilakukan uji ANOVA.

3. Uji ANOVA

Tabel 4. Uji ANOVA

	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	3	2,221	63,308	,000
Within Groups	44	,035		
Total	47			

Pada uji ANOVA didapatkan $p < 0,05$. Ini artinya bahwa terdapat beberapa kelompok data yang berbeda secara signifikan. Untuk melihat kelompok yang berbeda itu maka dilakukan *multiple comparison*.

Tabel 5. Multiple comparisons

Perlakuan	Perlakuan	Sig.	95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
MSCS	MSCS+PRP	,000	-,61904	-,31080
	MSCS+FDBCP	,642	-,11829	,18995
	MSCS+PRP + FDBCP	,000	-1,02679	-,71855

*The mean difference is significant at the 0.05 level

Dari uji *multiple comparison* didapatkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok MSCS+PRP dan kelompok MSCS+FDBCP+PRP. Ini artinya bahwa kenaikan kadar MTT setelah ditambah PRP meningkat secara signifikan. Demikian juga setelah ditambah PRP+FDBCP terjadi kenaikan signifikan. Sedangkan kadar MTT setelah ditambah FDBCP menurun tetapi tidak signifikan.

PEMBAHASAN

Persentase viabilitas *mesenchymal stem cells* setelah dilakukan pemberian *scaffold* bubuk tulang rawan sapi dan platelet rich plasma dihitung dengan menggunakan MTT assay yaitu dengan menilai densitas optik. Sebagai pembanding juga dilakukan uji viabilitas dengan metoda yang sama terhadap bubuk tulang rawan sapi saja dan juga terhadap platelet rich plasma saja. Kadar MTT menunjukkan keaktifan sel. Makin tinggi MTT berarti

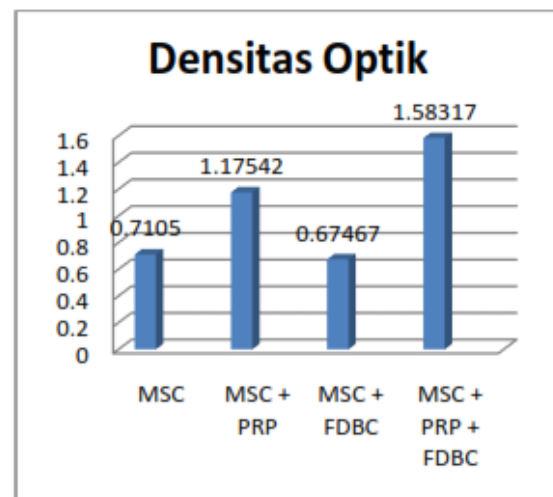
jumlah sel meningkat. Demikian juga sebaliknya, makin rendah berarti jumlah sel menurun.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris menggunakan rancangan penelitian *Post Test-Only Control Group Design* pada kultur *mesenchymal stem cells*. Sampel *mesenchymal stem cells* formula 1 (kontrol), sampel *mesenchymal stem cells* formula 2 (dengan PRP), sampel *mesenchymal stem cells* formula 3 (dengan FDBCP) dan sampel *mesenchymal stem cells* formula 4 (dengan FDBCP dan PRP) ditanamkan pada kultur dan kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Pengukuran persentase jumlah sel yang viabel didalam kultur menggunakan metode *MTT assay*.

Data hasil penelitian eksperimental mengenai uji sitotoksikitas secara *in vitro* pada sampel *mesenchymal stem cells* didapatkan secara kuantitatif yaitu dengan melihat persentase jumlah sel yang yang viabel dalam kultur. Pemeriksaan kuantitatif *MTT assay* berdasar pada kemampuan sel hidup untuk mereduksi garam MTT yang berwarna kuning dan larut menjadi formazan garam tetrazolium yang berwarna biru-ungu dan tidak larut. Produksi formazan dapat dihitung dengan melarutkan dan mengukur densitas optik larutan yang dihasilkan. Reaksi warna biru keunguan digunakan sebagai ukuran jumlah

sel hidup. Semakin pekat warna biru ungunya semakin tinggi nilai absorpsinya hal ini menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Sedangkan jumlah sel dapat diukur sebagai hasil produk MTT dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 630 nm sehingga semakin tinggi persentase densitas optik menunjukkan sel memiliki metabolisme aktif yang dapat mereduksi MTT yang semakin baik.

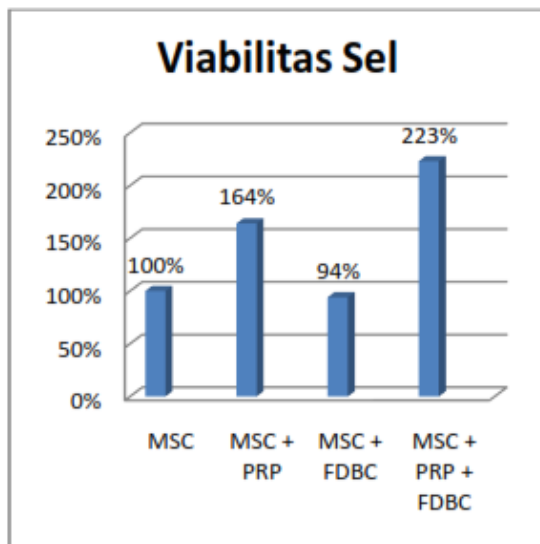
Data tentang densitas optik yang menggambarkan viabilitas *mesenchymal stem cells* dengan menggunakan metode *MTT Assay* dapat dilihat pada grafik di bawah ini.



Gambar 2. Hasil pengukuran densitas optik yang menggambarkan viabilitas *mesenchymal stem cells*

Dari data deskriptif diatas didapatkan bahwa kadar rata-rata MTT meningkat pada kelompok yang diberi PRP yaitu 1,17542 dan kelompok yang mendapat PRP+FDBCP sebesar 1,58317.

Sedangkan pada kelompok yang mendapat FDBCP terjadi penurunan kadar rata-rata MTT dengan rerata 0,67467. Dari data-data tersebut kita dapat menghitung viabilitas dari *stem cell*, yang hasilnya dapat dilihat pada grafik di bawah ini.



Gambar 3. Grafik persentase viabilitas *mesenchymal stem cells*

Dari grafik di atas dapat kita lihat bahwa viabilitas dari *mesenchymal stem cells* formula 1 (kontrol) yang kita anggap mempunyai viabilitas 100%, sampel *mesenchymal stem cells* formula 2 (dengan PRP) meningkat sampai 164%, sampel *mesenchymal stem cells* formula 3 (dengan FDBCP) didapatkan penurunan persentase yang tidak signifikan yaitu sebesar 6%, sehingga menjadi 94%, dan sampel *mesenchymal stem cells* formula 4 (dengan FDBCP dan PRP) meningkat lebih dari dua kali lipat sebesar 223%.

Didapatkan bahwa formula 1 dan formula 3 menunjukkan nilai yang lebih

besar daripada kelompok kontrol (100%). Formula 3 menunjukkan hasil yang paling signifikan. Hal ini menunjukkan terjadi percepatan pertumbuhan *mesenchymal stem cells* pada media kultur setelah diberikan kedua jenis komponen tersebut, yaitu PRP dan FDBCP.

Hal ini membuktikan bahwa PRP dan gel larutan PRP tidak bersifat toksik, justru bersifat merangsang pertumbuhan sel, dan berdasarkan uji statistik didapatkan hasil yang signifikan ($p < 0.05$). Hasil ini sesuai dengan studi yang dilakukan oleh K. Hyunchul seperti yang membuktikan bahwa PRP meningkatkan kapasitas proliferasi dan diferensiasi pada sel tendon.⁶ Penelitian serupa dilakukan oleh K. Akeda yang melakukan percobaan dengan memberikan PRP pada cartilage babi, dan membuktikan bahwa *growth factor* yang ada di PRP merangsang proliferasi kondrosit dan biosintesa matriks.⁷

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

- 1) Secara *in vitro*, *Platelet Rich Plasma (PRP)* terbukti tidak toksik terhadap pertumbuhan kultur *Mesenchymal Stem Cells (MSCs)*.
- 2) Secara *in vitro*, *Freeze Dried Bovine Cartilage Powder (FDBCPP)* terbukti tidak toksik terhadap pertumbuhan

kultur *Mesenchymal stem cells* (MSCs).

- 3) *Scaffold* dari bahan Platelet Rich Plasma (PRP) dan Freeze Dried Bovine Cartilage Powder (FDBCPP) tidak bersifat toksik terhadap *Mesenchymal stem cells* (MSCs).
- 4) *Scaffold Scaffold* dari bahan Platelet Rich Plasma (PRP) dan Freeze Dried Bovine Cartilage Powder (FDBCPP) merangsang proliferasi *Mesenchymal stem cells* (MSCs)

Saran

- 1) Untuk mendapatkan hasil yang lebih *reliable* perlu dilakukan penelitian *in vivo* (pada hewan coba).
- 2) Perlu kiranya untuk melakukan penelitian mengenai efek genotoksisitas dan karsinogenisitas.

DAFTAR PUSTAKA

1. Gobbi A. and Bathan L. 2009. Biological Approach for Cartilage Repair. *Journal Knee Surgery*, 22:36-44.
2. Caplan AI. 2000. Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *J Orthop Res*, 18:773.
3. Getgood et al. 2009. Articular Cartilage Tissue Engineering: Today's research, tomorrow practice? *J Bone and Joint Surgery*, 91(5) p: 565-576.
4. Simon Ziv, Philip A, Watson Biomimetic dental implants—new ways to enhance osseointegration. *J Can Dent Assoc*. 2002;68(5):286–288.
5. Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Shirasaki Y, Ochiai N, Tateishi T. The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J Biomed Mater Res A*. 2003;67:1170–1180.
6. Jo CH, Shin JS, Lee YG, Shin WH, Kim H, Lee SY, Yoon KS, and Shin S. 2013. Platelet rich plasma for arthroscopic repair of large to massive rotator cuff tears: a randomized, single-blind, parallel-group trial. *American Journal of Sports Medicine*. Vol 41(10):2240-8.
7. Akeda K, An HS, Pichika R, Attawia M, Thonar EJ, Lenz ME, Uchida A, and Masuda K. 2006. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads. *Spine* Volume 31 (9):959-66.
8. Williams RJ. 2006. Articular cartilage repair: Clinical approach and decision making in: operative techniques in orthopaedics. New York. Elsevier Inc, p: 218-226.
9. Gregory CA and Prockop DJ. 2007. Fundamental of culture and characterization of Mesenchymal Stem/Progenitor Cells (MSCs) from bone marrow stroma, in culture of specialized cells culture of human stem cells (edited by Freshney RI, Stacey GN, Auerbach JM). Jhon Wiley & Sons. New jersey: 207-232.
10. Muschler GE, Nakamoto C, and Griffith LG. 2004. Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *J. Bone Joint Surg*; Vol.86-A(7): 1542-1558.