

ARTIKEL ASLI

THE EFFECT OF LOW INTENSITY ULTRASOUND
ON ACCELERATING OSTEOBLAST FUNCTIONPENGARUH GELOMBANG ULTRASONIK INTENSITAS RENDAH
TERHADAP PERCEPATAN FUNGSIONALISASI OSTEOBLAS

Respati Suryanto Dradjat

Seksi Orthopaedi dan Traumatologi, Lab/SMF Bedah RSUD Dr Saiful Anwar / FK Unibraw.

ABSTRACT

The aim of this study were to find the effect of low intensity ultrasound on differentiation of human osteoblast culture in term of morphology, detection of calcium deposit, and production of osteocalcin as the most specific marker. It had been proved that the fracture healing can be accelerated by low intensity ultrasound in clinical trial and in animal model. The molecular mechanism must interact with one or more cellular pathways to elicit a biological effect which remain unclear. Human osteoblast (NHOst CC-2538) were plated into 20 dishes divided randomly into control and treatment groups, incubated under 37°C and 5% CO₂ until 70% confluence in osteoblast growth medium. The treatment group were stimulated by low intensity ultrasound 1MHz, 0.2W/cm, for 3minutes on day 1, 3, and 5. Morphological changes were observed using phase contrast microscope, calcium deposit was detected by von Kossa staining, osteocalcin as a bone regulatory factors was detected by Western blotting. The result showed that low intensity ultrasound stimulation increased bone nodule formation significantly (P<0.05). Calcification and osteocalcin production were found earlier and increased compared to the control. It can be concluded that low intensity ultrasound has direct effect on stimulating and accelerating osteoblast function.

Key words: Osteoblast, Low intensity ultrasound, Calcification, Osteocalcin

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap diferensiasi sel osteoblas, yaitu dalam hal morfologi, deposisi kalsium dan produksi osteokalsin sebagai petanda spesifik terhadap aktivitas osteoblas. Penyembuhan fraktur telah terbukti dapat dipercepat dengan rangsangan gelombang ultrasonik intensitas rendah pada penelitian klinik dan percobaan binatang. Pengaruh gelombang ini melalui satu atau lebih jalur molekular, sehingga menimbulkan pengaruh biologi yang hingga saat ini belum diketahui mekanismenya. Kultur sel osteoblas manusia (NHOst CC-2538) dibiakkan pada 20 cawan, secara random dibagi menjadi kelompok yang dirangsang dengan gelombang ultrasonik intensitas rendah dan yang tidak dirangsang. Kultur sel ini dibiakkan pada inkubator dengan suhu udara 37°C, kadar CO₂ 5% sampai tercapai konfluensi 70%. Rangsangan gelombang ultrasonik dengan frekwensi 1MHz, 0,2 W/cm², selama 3 menit pada hari ke 1, 3, dan 5. Perubahan morfologi diamati dengan mikroskop fase kontras, deposisi regulator tulang dideteksi dengan Western blotting. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa rangsangan gelombang ultrasonik intensitas rendah mempercepat pembentukan nodul tulang (P<0.05). Kalsifikasi dan produksi osteokalsin terbentuk lebih cepat dan lebih banyak dibandingkan tanpa rangsangan gelombang ultrasonik. Dapat disimpulkan bahwa gelombang ultrasonik intensitas rendah dapat mempengaruhi percepatan fungsionalisasi osteoblas.

Key words: Osteoblas, Gelombang ultrasonik intensitas rendah, Kalsifikasi, Osteokalsin

PENDAHULUAN

Fungsi tulang sebagai penahan beban untuk menunjang aktivitas sehari-hari tidak pernah lepas dari pengaruh mekanik. Aktivitas tulang normal berupa pertumbuhan, pembentukan dan pertukaran (*turn over*), dipengaruhi oleh tekanan mekanik. Pada proses penyembuhan patah tulang tekanan mekanik ikut mempengaruhi pembentukan kalus (1). Pengaruh mekanik berupa kompresi, distraksi, gravitasi, gelombang elektromagnetik, dan gelombang ultrasonik dapat mempengaruhi aktivitas sel (2). Pengaruh mekanik berupa gelombang ultrasonik untuk mempercepat waktu penyembuhan patah tulang telah

dibuktikan 40 % lebih cepat (3). Pengaruh gelombang ultrasonik intensitas rendah pada fase inflamasi dibuktikan dengan peningkatan produksi PGE2 oleh sel osteoblas (4). Meskipun gelombang ultrasonik intensitas rendah dapat mempercepat penyembuhan patah tulang, tetapi "mekanisme pengaruh gelombang" ultrasonik intensitas rendah terhadap aktivitas osteoblas belum dapat dijelaskan.

Pengaruh mekanik akan menyebabkan tulang berada dalam keseimbangan antara penimbunan dan penyerapan matriks tulang. Tekanan mekanik lebih rendah dari tekanan fisiologis akan menyebabkan deposisi tulang berkurang (*negatif*

bone balance), sehingga densitas tulang berkurang. Tekanan mekanik melebihi tekanan fisiologis sampai pada batas toleransi akan menyebabkan peningkatan deposisi tulang. Tekanan mekanik melebihi batas toleransi akan menyebabkan kerusakan tulang, mulai dari *micro damage* yaitu kerusakan matriks sampai terputus kontinuitas tulang seperti terjadi pada patah tulang. Gangguan proses penyembuhan patah tulang dapat mengakibatkan penyambungan tulang menjadi lambat (*delayed union*), sampai terjadi penghentian proses penyembuhan sehingga tulang tidak menyambung (*non union*). Pada penyembuhan lambat terjadi penurunan aktivitas seluler sehingga proses pembentukan kalus terhambat, penyembuhan terhenti atau tulang tidak sambung terjadi karena terminasi aktivitas seluler. Kegagalan penyembuhan patah tulang berupa *non union* pada tulang panjang mempunyai insiden 5% (5). Perubahan resorpsi dan deposisi tulang bertujuan untuk efisiensi dalam mempertahankan densitas tulang guna beradaptasi terhadap pengaruh mekanik (6). Jika mekanisme pengaruh gelombang ultrasonik terhadap aktivitas osteoblas dapat diungkapkan, maka pengaruh mekanik berupa gelombang ultrasonik dapat dikembangkan pada berbagai aplikasi untuk mempercepat proses pembentukan tulang.

Tulang mampu menahan tekanan mekanik datang dari berbagai arah karena tulang mempunyai struktur lamelar. Pengaruh mekanik terhadap perubahan bentuk tulang panjang (7). Pengaruh tekanan mekanik terhadap pembentukan tulang pada penyembuhan patah tulang, dikemukakan oleh AO/ASIF (*Association International Study of Internal Fixation*) melalui teori *primary* dan *secondary bone healing*, stabilitas absolut akan mengurangi regangan di daerah patah tulang, memungkinkan terjadi *direct bone healing* (8). Studi pengaruh tekanan mekanik terhadap penyembuhan patah tulang belakang dengan konsep fiksasi semi rigid (9). Fiksasi semi rigid memungkinkan terjadi tekanan secara intermiten pada daerah fraktur serta dapat memperbaiki penyembuhan patah tulang. Frost mengemukakan teori pengaruh tekanan mekanik terhadap aktivitas biologi, menggunakan konsep mekanotransduksi (10). Rangsangan mekanik berupa gelombang ultrasonik untuk mempercepat penyembuhan patah tulang (11). Studi pengaruh tekanan mekanik sampai tingkat molekular pada kultur sel, yaitu tekanan hidrostatik melebihi 50 MPa menurunkan ekspresi mRNA TGF- β 1 dan meningkatkan ekspresi mRNA HSP 70 (12). *Oscillating fluid flow* menghambat TNF α , meningkatkan aktivitas NF- κ B melalui I κ B kinase pathway pada osteoblas (13). Gelombang ultrasonik intensitas rendah meningkatkan produksi Prostaglandin E2 melalui induksi COX-2 mRNA pada osteoblas tikus, membuktikan gelombang ultrasonik intensitas rendah mempengaruhi fase inflamasi (4). Gelombang ultrasonik intensitas rendah mampu mempengaruhi aktivitas sel jaringan ikat (8). Gelombang ultrasonik intensitas rendah dan vitamin D3 memberi pengaruh potensiasi terhadap produksi PDGF pada kultur osteoblas (14). Gelombang ultrasonik intensitas rendah dapat meningkatkan angiogenesis dengan meningkatkan produksi IL-8, bFGF dan VEGF pada kultur fibroblas gingival dan osteoblas mandibula in vitro (15).

Studi biologi molekular mengungkapkan berbagai interaksi molekul pada aktivitas kehidupan sel untuk memproduksi berbagai protein. Aktivitas ini dimulai dari gen

sampai terbentuk molekul protein, berupa protein struktural maupun protein regulator. Osteoblas mempunyai peranan langsung terhadap pembentukan tulang, yaitu membentuk matriks tulang berupa kolagen, berbagai protein non kolagen, *growth factor* dan *bone morphogenetic protein*. Osteokalsin adalah salah satu protein non kolagen diproduksi oleh osteoblas, berfungsi sebagai regulator mineralisasi. Osteokalsin merupakan *marker* biokimiawi aktivitas osteoblas. Osteokalsin sebagai petanda diferensiasi osteoblas, lebih spesifik dibandingkan dengan fosfatase alkalin karena osteokalsin tidak disintesa oleh sel lain (16). Melalui pengetahuan biologi molekular dimungkinkan mengungkap mekanisme pengaruh gelombang ultrasonik untuk mempercepat fungsionalisasi osteoblas. Pengaruh gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap proses osteogenesis, dapat diungkapkan melalui pengaruh gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap aktivitas osteoblas pada kultur berkaitan dengan aktivitas pembentukan matriks tulang dan mineralisasi.

Apabila dapat dibuktikan pengaruh mekanik berupa gelombang ultrasonik intensitas rendah dapat meningkatkan aktivitas osteoblas, melalui percepatan fungsionalisasi berupa percepatan pembentukan matriks dan mineralisasi, maka hal tersebut memberi sumbangan ilmiah baru di bidang mekanobiologi dalam melengkapi konsep mekanotransduksi, melalui perubahan sinyal mekanik menjadi sinyal seluler.

Apabila terbukti pengaruh tekanan mekanik berupa gelombang ultrasonik intensitas rendah dapat mempercepat fungsionalisasi osteoblas, maka pemberian rangsang mekanik berupa gelombang ultrasonik intensitas rendah berpotensi untuk dapat digunakan mengembangkan aplikasi perangsangan percepatan proses osteogenesis pada berbagai kelainan tulang.

METODE PENELITIAN

Rancangan penelitian adalah Eksperimental laboratoris, dengan perlakuan berupa rangsangan gelombang ultrasonik intensitas rendah. Penelitian ini menggunakan kultur sel Human Osteoblast (NHOst CC-2538) dibuat oleh Clonetic, Bio-Whittaker Inc. USA.

Pada kultur Human Osteoblast (NHOst CC-2538) *cryopreserved cell* dari satu vial, dilakukan *thawing* dan *seeding* pada waktu bersamaan. Perlakuan berupa pemberian rangsangan gelombang ultrasonik intensitas rendah, dengan frekuensi 1 MHz, 0.2 W/cm² selama 3 menit pada hari ke 1, 3 dan 5, sesuai dengan pengalaman pada penelitian pendahuluan. Rangsang gelombang ultrasonik diberikan melalui *probe* dari Ultrasound US-7P, ditempelkan pada dasar *dish* Petriperm melalui perantara Silikon dan Jelly. Silikon sesuai dengan ukuran *dish* ditempelkan pada dasar *dish* dan *probe* dengan permukaan cembung ditempelkan pada silikon dengan permukaan cekung melalui perantara jelly sebagai penghantar rangsangan.

Silikon dan gel/ jelly digunakan sebagai kontak medium agar gelombang dapat dihantarkan dengan hambatan sekecil mungkin. Hantaran gelombang ultrasonik tidak dihambat oleh benda padat maupun benda cair, tetapi akan diserap atau dihambat oleh benda gas. Koefisien absorpsi oleh medium cair pada frekuensi 1 MHz adalah 0.0006 (17).

Replikasi dihitung dengan rumus $n = \frac{15+p}{p}$ $p=2$ $n=9$

Variabel penelitian

a. Variabel bebas

Variabel bebas adalah rangsangan tekanan mekanik berupa gelombang ultrasonik intensitas rendah. Kontrol (K) adalah kultur osteoblas tanpa dirangsang gelombang ultrasonik.

b. Variabel tergantung

1. Pembentukan nodul tulang dan dihitung jumlah nodul tulang
2. Kalsifikasi dibuktikan dengan pewarnaan von Kossa.
3. Osteokalsin hasil produksi osteoblas, diperiksa melalui Western blotting.

c. Variabel kendali

1. Jumlah sel setiap lapang pandangan pada awal eksperimen, yaitu 350.000 sel/cm² dihitung dengan hemacytometer, dikerjakan sesuai dengan petunjuk persiapan penggunaan NHOst CC-2538 untuk penelitian dari Clonetic.
2. Dish dengan jenis dan ukuran sama.
3. Medium dan penggantian medium, dilakukan pada waktu dan jenis medium sama.
4. Suhu dan kadar CO₂, sel dibiakkan pada suhu 37° C dan kadar CO 25%.
5. Pemeliharaan dalam inkubator, dikeluarkan dan dimasukkan bersama-sama.
6. Metode pemeriksaan (Batch reagensia) dari bahan sama.
7. Cara memberikan perlakuan dikerjakan dengan menghindari kontaminasi yaitu dikerjakan pada ruang dengan aliran udara *laminar* dengan standar sterilitas kelas 2.

Penelitian dimulai dengan mempersiapkan kultur osteoblas dari *cryopreserved cells*, dipakai 1 *cryovial* berisi 500.000 sel. Disiapkan 20 *dish* diisi *Osteoblast growth medium* (OGM) setelah dihangatkan dalam *water bath*. Vial osteoblas dihangatkan dalam *water bath* dan dilarutkan dalam OGM dan dibagi rata pada 20 *dish*. Diperiksa dengan mikroskop fase kontras untuk menghitung jumlah sel secara random dengan hemacytometer. Dish berisi osteoblas dimasukkan dalam inkubator. Pada setiap hari ke 3 dilakukan penggantian medium, setelah dicapai konfluensi 70 % yaitu pada hari ke 7 sel siap dipakai untuk penelitian.

Dari 20 *dish* dipisahkan secara random dan diberi label sebagai kelompok kontrol dan kelompok perlakuan masing-masing 10 *dish*. Pada hari 1 penelitian dilakukan perangsangan pada kelompok perlakuan dengan menempelkan probe ultrasonik pada dasar *dish* melalui perantara lapisan silikon dan gel. Rangsang ultrasonik dengan dosis 0.2 Watt, 1 MHz, selama 3 menit, diambil sampel hari 1 dibuat foto pada mikroskop fase kontras dengan pembesaran 10 kali masing-masing kontrol dan perlakuan, dilanjutkan dengan isolasi protein dari sampel tersebut. Isolasi protein dikerjakan dengan membuang medium dan mencuci kultur sel beberapa kali dengan HBSS, melepaskan sel dari perlekatan dengan trypsin, setelah semua sel larut dipindahkan kedalam tube dan diberi larutan TNS (*Trypsin neutralizing solution*), dilakukan sentrifugasi

50.000 rpm selama 2 menit, pellet ditinggalkan dan dilarutkan dengan *Isogen* untuk memisahkan protein, kemudian dipindahkan pada tabung *ependorf* dan disimpan pada pendingin *deep freeze*. Rangsang ultrasonik dilanjutkan pada hari ke 3 dan 5, diikuti dengan pengambilan sampel untuk diperiksa morfologi dan isolasi protein. Hari ke 7 dan dilakukan pengambilan sampel sesuai dengan bagan *time table*. Pada hari 5 yaitu terakhir pemberian rangsang ultrasonik dilakukan penghitungan jumlah sel perlapangan pandangan dari kelompok kontrol dan perlakuan pada mikroskop fase kontras dengan memakai alat hitung (*counter*).

Pemeriksaan *western blotting* dilakukan setelah seluruh sampel terkumpul, digunakan 9 sampel kontrol dan 9 sampel perlakuan sesuai dengan tempat yang tersedia pada alat elektroforesis. Penelitian dimulai dengan membuat *running gel* dan *starting gel*, sampel dan marker dijalankan pada SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) setelah terjadi pemisahan protein diidentifikasi band osteokalsin, protein dipindahkan ke kertas selulosa melalui transfer blotting. Identifikasi osteokalsin dilakukan melalui reaksi antigen antibodi dengan memberi antibodi primer osteokalsin dan antibodi sekunder, antibodi terhadap antibodi osteokalsin. Untuk membaca band digunakan radiolabel dan pemotretan radiografi.

PENGUMPULAN DATA

Data diperoleh dari pengamatan mikroskopik, penghitungan jumlah sel dengan hemacytometer dan pemeriksaan Western blotting, sesuai dengan *time table* penelitian dan dibuat tabulasi. Pengamatan morfologi meliputi gambaran sel mula-mula berbentuk spindle, membentuk prosesus, membentuk koloni, dan pembentukan nodul tulang jumlah nodul semakin banyak dan semakin besar. Terjadi kalsifikasi setelah terbentuk nodul dibuktikan dengan pemeriksaan von Kossa, kalsifikasi terlihat berwarna gelap pada mikroskop fase kontras. Dari pemeriksaan *Western blotting* akan diperoleh band spesifik bagi osteokalsin setelah melalui reaksi antigen-antibodi dan pemeriksaan radiografi.

Cara Analisis Data.

Thawing dan *seeding* osteoblas serta persiapan untuk memulai penelitian mengikuti persyaratan standar kultur osteoblas dari buku instruksi manual Clonetic, sehingga dicapai jumlah sel + 350.000 atau konfluensi 70%. Pengamatan nodul tulang dan kalsifikasi melalui mikroskop fase kontras.

Uji beda jumlah nodul tulang dari hari ke hari menggunakan uji statistik non parametrik berpasangan *Wilcoxon Signed Ranks Test*. Untuk mengetahui pola pembentukan nodul tulang sesuai dengan pertambahan waktu dilakukan Analisis regresi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data penelitian diperoleh sesuai dengan *Research Time Table*. *Time table* penelitian dibuat agar seluruh kegiatan penelitian dapat dilaksanakan sesuai dengan perencanaan. Secara umum mencakup rencana penyiapan kultur, penggantian medium, perangsangan ultrasonik, pengambilan sampel, pengambilan gambar dan penghitungan jumlah nodul tulang.

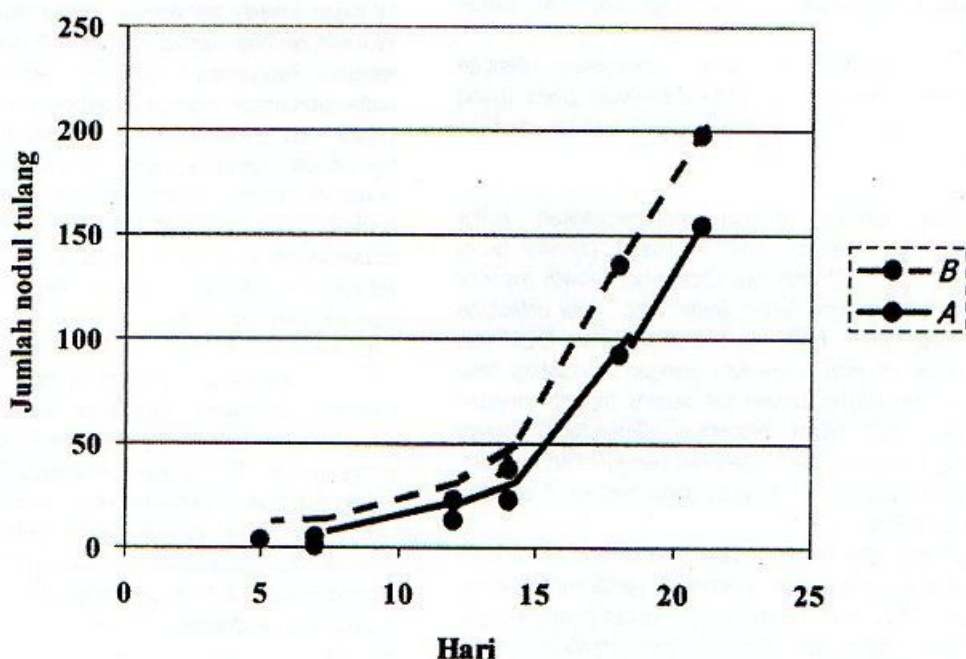
PERUBAHAN MORFOLOGI KULTUR OSTEOLAS

Pengamatan perubahan morfologi pada seluruh lapangan pandangan melalui mikroskop fase kontras Nikon ECLIPSE TE-300 pembesaran 10 kali. Pada penelitian morfologi kultur osteoblas, didapatkan osteoblas bertambah besar, berkelompok seolah-olah seperti sel multinukleus, saling berhubungan membentuk koloni, pada beberapa tempat tampak persiapan pembentukan "nodul tulang". Gambaran ini berbeda dengan kontrol, osteoblas tersebar merata pada medium dan sel berbentuk spindel. Jika osteoblast berbentuk memanjang dan tipis menunjukkan sel tersebut belum aktif.

Pada penghitungan jumlah inti sel per lapangan pandangan secara random dari masing-masing dish, diperoleh data jumlah sel per lapangan pandang untuk kelompok osteoblas tanpa rangsangan gelombang ultrasonik dan kelompok osteoblas yang dirangsang dengan gelombang ultrasonik intensitas rendah, dan dilakukan tes beda dengan uji non parametrik Mann-Whitney. Hasil penghitungan jumlah sel (inti) menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna jumlah osteoblas pada setiap lapangan pandang ($P=0.601$), antara kelompok osteoblas tanpa rangsangan gelombang ultrasonik dan kelompok osteoblas yang dirangsang dengan gelombang ultrasonik intensitas rendah.

Tabel 1. Jumlah Sel / Lapangan Pandangan Tanpa Rangsangan Ultrasonik dan dengan Rangsangan Ultrasonik

Kelompok Osteoblas Tanpa Rangsangan Gelombang Ultrasonik	Kelompok Osteoblas Yang Dirangsang Dengan Gelombang Ultrasonik Intensitas Rendah
54	69
47	48
60	75
61	47
67	57
45	59
42	96
69	50
56	54
66	54



Gambar 1. Grafik Perkembangan Jumlah Nodul Tulang Kontrol dan Perlakuan

Keterangan:

B = Kelompok osteoblas yang dirangsang dengan gelombang ultrasonik intensitas rendah

A = Kelompok osteoblas tanpa rangsangan gelombang ultrasonik

PEMBENTUKAN NODUL TULANG

Nodul tulang terbentuk karena osteoblas membentuk matriks ekstraselular, matriks tulang berupa protein kolagen dan non kolagen akan mengalami kalsifikasi. Hasil penghitungan jumlah nodul tulang berdasarkan observasi dari hari ke hari menunjukkan bahwa pada kelompok osteoblas yang dirangsang dengan gelombang ultrasonik intensitas rendah mulai terjadi pembentukan nodul tulang pada hari ke 5, kelompok osteoblas tanpa rangsangan gelombang ultrasonik pembentukan nodul tulang dimulai pada hari ke 7.

Pada kelompok osteoblas yang dirangsang dengan gelombang ultrasonik intensitas rendah pembentukan nodul tulang terjadi lebih cepat. Jumlah nodul tulang meningkat dari hari ke hari seperti tampak pada Gambar 1.

Tabel 2. Jumlah Nodul Tulang Osteoblas Tanpa Rangsangan Ultrasonik dan Osteoblas yang Dirangsang dengan Ultrasonik Intensitas Rendah

Hari ke	Tanpa rangsangan ultrasonik	Dirangsang ultrasonik
5	0	4
7	1	5
12	13	23
14	23	38
18	93	136
21	154	198

Jumlah nodul tulang kelompok dengan rangsang ultrasonik dari hari kehari lebih banyak dibandingkan kelompok tanpa rangsangan ultrasonik. Pada uji beda dengan tes statistik non parametrik sampel berpasangan Wilcoxon Sign Ranks Test, didapatkan berbeda bermakna jumlah nodul tulang antara kelompok tanpa rangsang ultrasonik dan dengan rangsangan ultrasonik dari hari ke-hari ($p=0.027$).

Dari jumlah nodul tulang dari hari ke-hari dilakukan analisis hubungan antar variabel dengan analisis regresi untuk mendapatkan hubungan fungsional, dari berbagai analisis regresi didapatkan fungsi *non linear* (exponensial) : $0.26X$

$Y = e^{\beta} \quad \beta = 0.999 \quad p = 0.000$ untuk osteoblas dengan rangsangan ultrasonik, dan $0.227X$

$Y = e^{\beta} \quad \beta = 0.977 \quad p = 0.001$ untuk osteoblas tanpa rangsangan ultrasonik

Y=jumlah nodul tulang

X=waktu

Merupakan fungsi paling sesuai untuk menggambarkan hubungan Y dengan X tanpa rangsangan ultrasonik dan dengan rangsangan ultrasonik dibandingkan dengan fungsi linear.

Klasifikasi

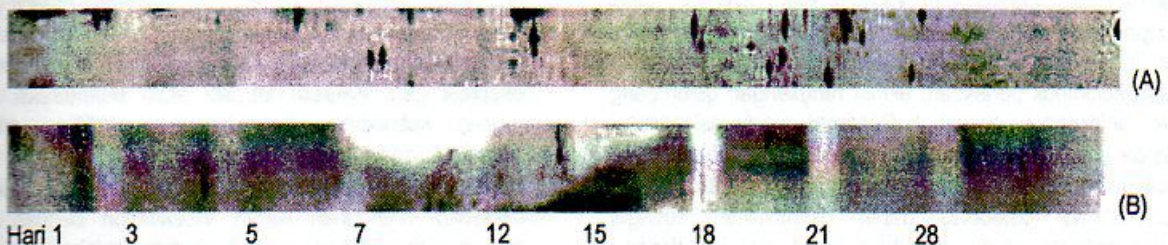
Osteoblas memproduksi dan mensekresi protein struktural dan protein regulator penyusun matriks tulang. Matriks ekstraselular diproduksi oleh osteoblas disebut sebagai osteoid, jika terjadi mineralisasi dengan kristal hidroksiapatit akan membentuk tulang. Sel osteoprogenitor mengalami diferensiasi menjadi osteoblas akan mensekresi berbagai protein penyusun matriks tulang dan akan mengalami kalsifikasi.

Kalsifikasi dapat dideteksi dengan pewarnaan von Kossa, yaitu endapan kalsium berikatan dengan *silver* akan berwarna gelap. Pada kelompok perlakuan pada hari ke 28 terdapat endapan kalsium lebih banyak dibanding kontrol.

Identifikasi protein osteokalsin

Pada proses diferensiasi osteoblas terjadi pergeseran sejumlah protein produksi osteoblas, dari kolagen mayoritas kolagen tipe III menjadi mayoritas kolagen tipe I, dari mayoritas trombospondin menjadi osteokalsin, osteopontin dan sialoprotein.

Osteokalsin merupakan marker bagi diferensiasi osteoblas. Identifikasi osteokalsin dilakukan melalui *Western blotting*, dimulai dengan isolasi protein dari kultur sel, elektroforesis untuk memisahkan berbagai molekul protein sesuai dengan muatan dan berat molekul, pemindahan fraksi protein ke membran selulosa melalui *transfer blotting*. Identifikasi osteokalsin memakai antibodi primer terhadap osteokalsin, setelah diperam dan dicuci dari antibodi sisa, ditambahkan antibodi sekunder terhadap antibodi osteokalsin dari spesies berbeda. Hasil pemeriksaan ini memperoleh *band* osteokalsin dari kelompok perlakuan lebih tebal dibandingkan *band* osteokalsin pada kelompok tanpa rangsangan ultrasonik (Gambar 2.).



Gambar 2. Band Osteokalsin Kontrol (A) dan Perlakuan (B) melalui pemeriksaan Western blotting.

Pengaruh langsung rangsang gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap osteoblas dari perubahan morfologi kultur osteoblas dimulai pembentukan nodul tulang, terjadi kalsifikasi dan terbentuk *band* osteokalsin pada kultur osteoblas kelompok perlakuan yang terjadi lebih awal. Hal ini membuktikan terdapat pengaruh langsung gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap osteoblas, pengaruh ini merupakan pengaruh langsung terhadap osteoblas tanpa melalui perantara sel lain. Gelombang ultrasonik mempengaruhi aktifitas fisiologis, melalui pengaruh ultrasonik terhadap aktivitas *second messenger* di dalam sitosol. Pengaruh rangsang gelombang ultrasonik intensitas rendah tidak meningkatkan jumlah sel kelompok perlakuan, sehingga disimpulkan rangsangan ini tidak mempengaruhi proliferasi. Percepatan fungsionalisasi osteoblas oleh rangsangan gelombang ultrasonik intensitas rendah.

Diferensiasi sel adalah perubahan menjadi sel khusus, osteosit disebut sebagai *fully differentiated osteoblast*. Osteoblas setelah dikelilingi matriks tulang yang mengalami kalsifikasi akan berubah menjadi osteosit. Perubahan morfologi, pembentukan nodul tulang, *band* osteokalsin serta kalsifikasi pada kelompok perlakuan kultur osteoblas terjadi lebih cepat dibanding kelompok kontrol, membuktikan terjadi fungsionalisasi lebih cepat akibat rangsang intermiten gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap osteoblas. Fungsi osteoblas membentuk matriks tulang terbukti dari pembentukan nodul tulang, produksi osteokalsin hingga terjadi kalsifikasi.

Fungsionalisasi Osteoblas

Tujuan penyembuhan patah tulang untuk mengembalikan keutuhan tulang mencakup kekuatan dan fungsi. Osteoblas adalah sel dengan kemampuan memproduksi matriks tulang, sebelum mampu membentuk matriks tulang disebut sebagai preosteoblas. Kemampuan membentuk matriks merupakan petanda diferensiasi sel. Osteoblas berasal dari sel mesenkim mengalami diferensiasi menjadi osteoprogenitor, preosteoblas, osteoblas, dan berakhir menjadi osteosit. Pada peristiwa diferensiasi, sel akan mengalami perubahan morfologi dan fungsi, sehingga perubahan fungsi dapat dipakai sebagai petanda diferensiasi. Rangsang gelombang ultrasonik intensitas rendah menyebabkan perubahan morfologi kultur sel, perubahan ini menuju fungsionalisasi sel yang terjadi lebih cepat, dibuktikan dengan pembentukan nodul tulang yang timbul lebih cepat dan jumlah nodul lebih banyak dari hari ke hari dibandingkan kontrol. Pada keadaan normal osteoblas mempunyai peran penting untuk menjaga dan mempertahankan tulang, sehubungan dengan hal ini rangsangan mekanik dapat digunakan untuk mempercepat pembentukan tulang.

Kalsifikasi adalah proses deposisi kalsium pada matriks ekstraselular tulang, peristiwa ini bukan proses biokimiawi tetapi pengendapan kalsium dari bentuk cair menjadi padat. Pada penelitian ini terbukti kalsifikasi terjadi lebih banyak dan lebih cepat pada kelompok perlakuan, akibat rangsangan gelombang ultrasonik intensitas rendah. Percepatan fungsionalisasi osteoblas pada kultur memberi bukti terdapat pengaruh langsung gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap osteoblas.

Diferensiasi osteoblas dapat didefinisikan sebagai peningkatan aktivitas produksi matriks tulang ditandai dengan peningkatan alkaline fosfatase dan sintesa kolagen. Osteokalsin merupakan *marker* diferensiasi osteoblas, pada penelitian ini

band osteokalsin tampak lebih tebal pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. *Band* osteokalsin diidentifikasi melalui *Western blotting* memberi bukti secara biokimia bahwa terjadi fungsionalisasi sel pada kelompok perlakuan lebih cepat terjadi dibandingkan kontrol melalui produksi protein spesifik penyusun matriks. Untuk menjelaskan hal ini diasumsikan bahwa rangsang gelombang ultrasonik intensitas rendah selama kurun waktu tersebut meningkatkan produksi osteokalsin pada kelompok perlakuan. Matriks ekstraselular merupakan materi dideposisi diluar sel, diproduksi dan disekresi oleh sel dalam bentuk makromolekul. Bentuk fisik matriks ekstraselular beragam dari jaringan ke jaringan, pada tulang matriks ekstraselular bersama mineral membentuk struktur bersifat keras.

Mekanotransduksi

Mekanobiologi adalah pengetahuan mempelajari pengaruh mekanik terhadap jaringan biologi, pengaruh mekanik terhadap sel dapat dijelaskan melalui transduksi sinyal. Transduksi sinyal dapat melibatkan peran reseptor membran sel, membran sel merupakan penerima dan penghantar sinyal guna berinteraksi dengan lingkungan sekitar. Membran sel dapat dilalui oleh molekul kecil yang larut dalam lemak dan bersifat tidak *permeable* terhadap molekul terlarut dalam air. Bagi molekul terlarut dalam air seperti ion, molekul anorganik, dan polipeptida/protein, transduksi sinyal terjadi melalui interaksi molekul sinyal dengan protein membran sel. Berbagai model hantaran sinyal telah diketahui untuk memfasilitasi pengaruh ekstraselular tersebut (18,19,20).

Mekanotransduksi adalah bagian dari transduksi sinyal sel berupa penghantaran sinyal mekanik berubah menjadi sinyal kimiawi, sehingga mempengaruhi aktivitas seluler dapat mempengaruhi aktivitas gen. Mekanotransduksi atau *Mechanical signal transduction* dapat diuraikan menjadi beberapa proses yaitu kaitan mekanik, kaitan biokimiawi, transmisi sinyal, dan respon efektor. Mekanisme molekuler gelombang ultrasonik intensitas rendah dalam mempengaruhi fungsi sel dan sintesa protein sesuai dengan tahapan tersebut belum dapat diungkapkan. Beberapa kemungkinan mekanisme mekanotransduksi adalah:

1. Melalui interaksi reseptor membran sel dengan komponen sitoskeleton, gelombang ultrasonik mempengaruhi mikrotubulus, akan menimbulkan getaran atau kavitasi pada mikrotubulus dan *streaming* akustik, getaran mikrotubulus menyebabkan aktivitas *second messenger*. Perubahan ion atau transpor protein akan merubah sinyal intraselular sehingga menyebabkan terjadi perubahan ekspresi gen.
2. Mekanisme lain adalah pengaruh gelombang ultrasonik mengenai permukaan sel akan mengaktifkan *stretch receptor* jenis *channel* kation, menimbulkan perubahan konsentrasi kation akan merubah *signal* intraselular dan terjadi perubahan ekspresi gen. Kalsium intrasel akan berinteraksi dengan protein kalmodulin, kemudian mengaktifkan *mitogenic activated protein kinase* (MAPK).
3. Mekanisme lain adalah energi mekanik yang ditimbulkan oleh ultrasonik mengubah ikatan sitoskeleton dengan matriks ekstraselular sehingga mempengaruhi metabolisme sel dan ekspresi gen. Sintesa protein merupakan proses biokimiawi kompleks dan rumit, transduksi sinyal ekstraselular mencapai

sasaran intraselular melalui berbagai mekanisme. Sinyal akan mempengaruhi translasi, fosforilasi dan sequestrasi. Perubahan konsentrasi ion kalsium intraselular dapat mempengaruhi sintesa protein melalui mekanisme yaitu, kekurangan kalsium akan menghambat inisiasi dan peningkatan ion kalsium didalam sitosol akan menghambat elongasi. Reseptor kalsium dapat digunakan untuk menjelaskan salah satu kait mekanik. Sel tulang berupa osteoblas, lining cells dan osteosit berperan sebagai sel mekanosensor yaitu mampu menerima dan meneruskan sinyal, sehingga merangsang produksi berbagai faktor parakrin untuk mengaktifkan berbagai sel. Aktivitas selular dapat dipengaruhi oleh berbagai rangsangan, melalui berbagai *pathway*, secara bersamaan atau sendiri untuk menimbulkan ekspresi gen (4,18).

Penyembuhan Patah Tulang

Penyembuhan patah tulang terjadi melalui fase inflamasi, reparasi dan remodeling, gelombang ultrasonik mungkin dapat mempengaruhi ke tiga fase tersebut. Pada fase reparasi terjadi dua proses pembentukan tulang yaitu kondrogenesis dan osteogenesis untuk membentuk kalus. Penelitian ini memperkuat bukti pengaruh gelombang ultrasonik intensitas rendah terjadi pada fase reparasi. Pembentukan matriks tulang dapat dipercepat oleh rangsang ultrasonik dengan dosis rendah, intermiten dan waktu pendek. Dari berbagai penelitian didapatkan berbagai frekwensi dan intensitas untuk merangsang aktivitas sel. Untuk memperoleh sejumlah energi dapat digunakan intensitas dan frekwensi berbeda, demikian pula lama perangsangan, interval pemberian dan jangka waktu perangsangan. Kombinasi frekwensi, interval dan waktu kemungkinan dapat diubah untuk mendapatkan pengaruh percepatan aktivitas osteoblas. Sesuai dengan teori mekanostat dan kurva *strain-stress*, maka transfer energi berlebihan dapat menghambat aktivitas sampai merusak sel, atau kekurangan rangsangan energi mekanik akan menurunkan aktivitas.

Pada kondisi in vivo morfologi osteoblas dikenali dari letak osteoblas di dalam tulang. Osteoblas berubah menjadi osteosit akan berkurang ukuran sebesar 30%, serta kehilangan kemampuan memproduksi matriks tulang. Osteoblas mempunyai inti sel besar, endoplasmik retikulum kasar mengisi sebagian besar kompartemen sel, dan mempunyai aparatus Golgi besar (21). Kondisi in vitro berbeda dengan in vivo, perbedaan pada media kultur, pada kultur sel bersifat homogen hanya terdiri atas satu jenis sel. Penelitian in vitro ini mengungkapkan pengaruh rangsangan gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap osteoblas pada kondisi kultur sel, pengaruh gelombang ultrasonik intensitas rendah in vivo tidak hanya mempengaruhi osteoblas tetapi juga mempengaruhi sel-sel lain. Pada proses penyembuhan patah tulang berbagai sel akan terlibat dalam proses penyembuhan sesuai dengan fase penyembuhan. Gelombang ultrasonik intensitas rendah telah dibuktikan dapat mempercepat maturasi kondrosit. Kondrosit berperan pada proses pembentukan tulang secara endokondral yaitu pada fase pembentukan kalus lunak sebelum digantikan oleh kalus keras. Gelombang ultrasonik dapat mempengaruhi sel-sel lain, sel lain dapat mempengaruhi osteoblas melalui mekanisme parakrin. Pengaruh gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap osteoblas in vivo dapat secara langsung seperti terjadi pada

kondisi in vitro maupun secara tidak langsung melalui mekanisme parakrin. Walaupun kondisi in vitro tidak sama dengan in vivo, tetapi pada kultur osteoblas dapat tumbuh dan berkembang membentuk matriks dan nodul tulang.

Rangsang dengan intensitas rendah dapat digunakan untuk merangsang aktivitas sel secara signifikan, rangsang dengan intensitas tinggi berpotensi untuk merusak sel. Rangsang intermiten memberi kesempatan sel untuk beristirahat atau beradaptasi, berpotensi mempengaruhi aktivitas sel lebih besar dibandingkan dengan rangsangan yang bersifat kontinu. Rangsang kontinu dapat menimbulkan pemanasan jaringan dan rangsang terus menerus dapat berakibat menghambat aktivitas sel. Rangsangan gelombang ultrasonik sampai batas intensitas tertentu akan bermanfaat untuk merangsang aktivitas sel. Rangsangan terhadap aktivitas sel akan setara dengan peningkatan intensitas mengikuti kurva *strain-stress*, jika hal ini dapat diidentifikasi batas intensitas terendah dan tertinggi maka akan diketahui besar dosis optimal untuk mempercepat produksi matriks tulang.

Pembentukan nodul tulang akan bertambah secara kualitatif dan kuantitatif dari hari ke hari, secara kuantitatif jumlah nodul meningkat mengikuti fungsi eksponensial ($Y=e^x$). Penelitian klinik menunjukkan rangsangan gelombang ultrasonik intensitas rendah mempercepat waktu penyembuhan patah tulang sampai 40%, salah satu mekanisme untuk menjelaskan fenomena ini adalah pengaruh langsung gelombang ultrasonik intensitas rendah terhadap osteoblas. Untuk mendapatkan pengaruh gelombang ultrasonik terhadap jaringan keras perlu memperhatikan koefisien absorpsi, impedansi akustik dan kemampuan melawan *shear stress* (17). Untuk mendapatkan pengaruh optimal dalam aplikasi klinik perlu memperhatikan beberapa hal agar diperoleh hasil maksimal yaitu, (1) kontak medium mempengaruhi absorpsi dan refleksi gelombang, sehingga untuk mendapatkan intensitas optimal perlu memperhatikan kontak medium, (2) aktivitas osteoblas dimulai pada saat pembentukan matriks yaitu pada fase pembentukan kalus, fase ini terjadi pada hari ke 7 sampai ke 40.

Gelombang ultrasonik merupakan bentuk energi mekanik diteruskan ke jaringan biologi sebagai gelombang suara dengan frekwensi melebihi batas kemampuan pendengaran. Pada intensitas rendah selain digunakan sebagai alat diagnostik, dapat bermanfaat untuk mempercepat aktivitas osteoblas, sehingga dapat bermanfaat untuk mempercepat proses pembentukan tulang. Pengetahuan ini berpotensi untuk memperbaiki berbagai kelainan tulang berkaitan dengan pembentukan matriks seperti pada osteoporosis.

KESIMPULAN

1. Rangsang gelombang ultrasonik intensitas rendah mempercepat aktivitas osteoblas berupa percepatan pembentukan matriks dan mineralisasi. Hal ini membuktikan bahwa rangsang mekanik dapat mempercepat aktivitas selular, melalui perubahan sinyal mekanik menjadi sinyal selular.
2. Rangsang gelombang ultrasonik intensitas rendah menyebabkan percepatan fungsi osteoblas berupa peningkatan produksi osteokalsin. Hal ini membuktikan bahwa pengaturan aktivitas seluler karena rangsang mekanik terjadi melalui peningkatan aktivitas protein regulator.

DAFTAR KEPUSTAKAAN

- 1 Spiessl, B., Internal Fixation of the Mandible, A Manual of AO/ASIF Principles. Berlin: Springer-Verlag. 1989: 3- 37.
- 2 Buckwalter, Einhorn, Simon,. Orthopaedic Basic Science, Biology and Biomechanic of The Musculoskeletal System, 2nd ed American Academy of Orthopaedic Surgeon. 2000: 320-355.
- 3 Rubin, C., Bolander, M., Ryabi, J.P., Hadjiargyrou, M., The Use of Low-Intensity Ultrasound to Accelerate the Healing of Fractures, J Bone Joint Surg (Am). 2001: 83: 259-269.
- 4 Kokubu, T., Matsui, N., Fujioka, H., Tsunoda, M., Mizuno, K., Low Intensity Pulsed Ultrasound Exposure Increase Prostaglandine E2 Production Via the Induction of Cyclooxygenase-2 mRNA in Mouse Osteoblast. Biochem.Biophys.Res.Comm. 1999: 256, 284-287.
- 5 Wornom, I. L., Buchman, S. R., Bone and Cartilaginous Tissue. In Wound Healing, Philadelphia: Saunders Co. 1992: 356-383.
- 6 Nicol, A.C., Applications (Book 8), Postgraduate Diploma in Biomechanics. University of Strathclyde.1996.
- 7 Wolff, G., Function of the Bone Protein Osteocalcin: Definitive Evidence. Nutrition Review. 1997: 54 (10) : 332-333.
- 8 Ruedi, T.P., Murphy, W.M., AO Principles of Fracture Management, Thieme. 2000: 7-28
- 9 Prijambodo, B., Semi Rigid Segmental Spinal Instrumentation With Kuntcher Nail to Stabilize Traumatic Injuries of The Thoracal and Lumbar Vertebrae, Dissertation, Airlangga University. 1993: 128-129.
- 10 Frost, H.M., Fatigue Damage (Microdamage) in Bone. J Orthop Sci. 1998: 3: 272-281.
- 11 Pilla, A.A., Mont, M.A., Nasser, P.R., Non-invasive Low Intensity Pulsed Ultrasound Accelerates Bone Healing in the Rabbit. J Orthop Trauma. 1990: 4: 246-253.
- 12 Takahashi,., Hydrostatic Pressure Influences mRNA Expression of TGF- β 1 and HSP 70 in Chondrocyte Like Cell Line, J Bone Joint Surg (Am). 1997: 15:150-158.
- 13 Kurokouchi, K., Jacobs, C.R., Donahue, H.J., Oscillating Fluid Flow Inhibits TNF- α -induced NF- κ B Activation Via I κ B Kinase Pathway in Osteoblast-like UMR106 Cells. The J of Biol. Chem. 2001: 276(16): 13499-13504.
- 14 Ito, M., Azuma, Y., Ohta, T., Komoriya, K., Effect of Ultrasound and 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Growth Factor Secretion in Co-Culture of Osteoblast and Endothelial Cells. Ultrasound in Med. & Biol. 2000: 26: 1, 161-166.
- 15 Reher, P., Doan, N., Bradnock, B., Megji, S., Harris, M., Theurapeutic Ultrasound for Osteoradionecrosis: an In Vitro Comparison Between 1 MHz and 45 kHz Machines. European Journal of Cancer. 1998: 34 (12): 1962-1968.
- 16 Hauschka, P.V., Research Currently Focuses on Four Important Question in Skeletal Biology, E-mail: hauschka@a1.tch.harvard.edu. 2001.
- 17 Hoogland, R., Ultrasound Therapy, The Netherlands: Enraf Nonius.1994: 6-21.
- 18 Duncan, R.L., Turner, C.H., Mechanotransduction and the Functional Response of Bone to Mechanical Strain.Calcif Tissue Int. 1995: 57: 344-358
- 19 Lacouture, M.E., Scaffer, J.L., Klickstein, L.B., Resistance to Mechanical Strain in Cultured Osteoblast Like Cells Requires Integrin Mediated Attachment, 46th Annual Meeting Orthopaedic Research Society, Orlando, Florida.2000.
- 20 Lammens, J., Liu, Z., Aerssens, J., Dequeker, J., Fabry, G., Distraction Bone Healing Versus Osteotomy Healing: a Comparative Biochemical Snalysis. J Bone Miner Res. 1998: 13(2): 279-286.
- 21 Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., Molecular Biology of the Cell, 3rd ed Garland Publishing Inc. New York & London. 1994: 721-785.