

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

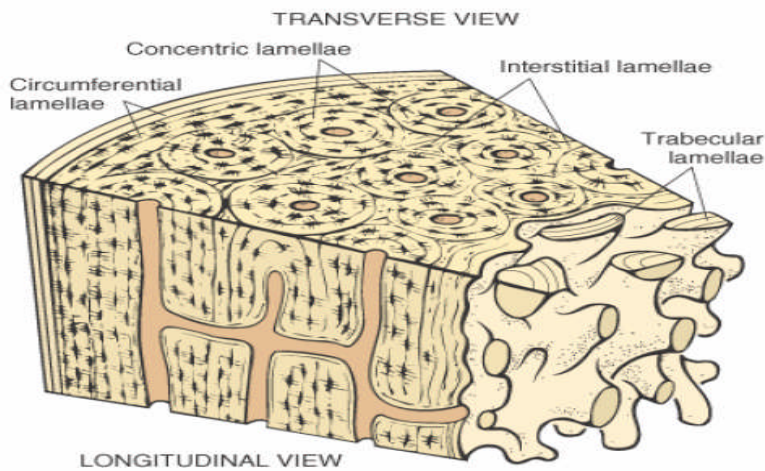
#### 2.1. Tulang

##### 2.1.1 Struktur tulang

Secara garis besar tulang dikenal ada dua tipe yaitu tulang korteks (kompak) dan tulang trabekular (berongga = *spongy* = *cancelous*). Bagian luar dari tulang merupakan tulang padat yang disebut korteks tulang dan bagian dalamnya adalah tulang trabekular yang tersusun seperti bunga karang<sup>16,17</sup>.

Tulang korteks merupakan bagian terbesar (80%) penyusun kerangka, mempunyai fungsi mekanik, modulus elastisitas yang tinggi dan mampu menahan tekanan mekanik berupa beban tekukan dan puntiran yang berat. Tulang korteks terdiri dari lapisan padat kolagen yang mengalami mineralisasi, tersusun konsentris sejajar dengan permukaan tulang. Tulang korteks terdapat pada tulang panjang ekstremitas dan vertebra. Tulang spongiosa atau *canselous* atau trabekular mempunyai elastisitasnya lebih kecil dari tulang korteks, mengalami proses resorpsi lebih cepat dibandingkan dengan tulang korteks. Tulang *spongiosa* terdapat pada daerah metafisis dan epifisis tulang panjang serta pada bagian dalam tulang pendek<sup>16,18</sup>.

Secara makroskopis tulang dibedakan menjadi *woven bone* dan *lamella bone*. *Woven bone* adalah bentuk tulang yang paling awal pada embrio dan selama pertumbuhannya terdiri dari jaringan kolagen berbentuk ireguler. Setelah dewasa *woven bone* diganti oleh tulang berlapis atau *lamella bone* yang terdiri dari tulang korteks dan trabekular<sup>19,20</sup>.



Gambar 1. Struktur Tulang Normal dengan *Sistem Havers* <sup>21</sup>.

Korteks tulang tersusun seperti osteon atau sistem *havers*, yaitu lapisan konsentris terdiri dari kanal dengan panjang  $> 2$  mm dan lebar 2 mm dimana didalamnya terdapat osteosit dan pembuluh darah untuk nutrisi. Trabekular tulang tersusun lamelar dan terdapat pembuluh darah yang berhubungan dengan sumsum tulang. Pada kedua tempat ini yaitu bagian trabekular tulang dan permukaan korteks tulang rentan terhadap pengeroposan tulang <sup>19-21</sup>.

### 2.1.2 Komposisi tulang

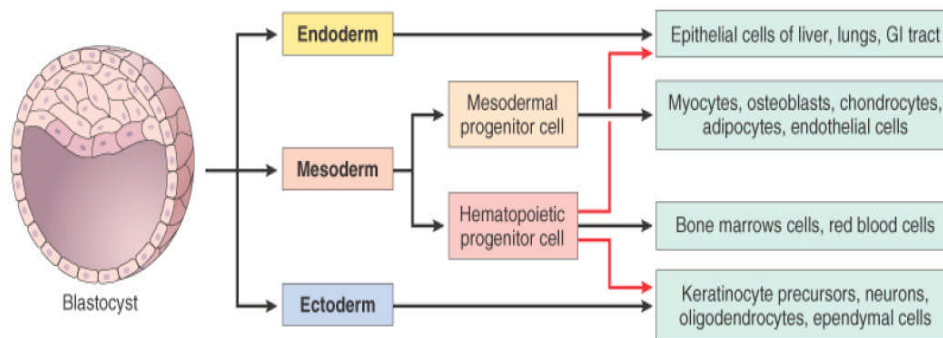
Unsur yang membentuk tulang terdiri dari mineral anorganik (65%), matriks organik (35%), sel osteoblas, osteoklas, osteosit dan air. Komponen matriks tulang korteks dan trabekula tersusun atas matriks organik dan anorganik. Komponen anorganik merupakan 65% dari seluruh masa tulang sedangkan komponen organik sekitar 20% dan air 10%. Kolagen tulang merupakan komponen organik terbesar yang membentuk dan memungkinkan tulang menahan

regangan sedangkan anorganik atau mineral berfungsi menahan beban tekanan

12.

Asal mula sel-sel tulang berasal dari stem sel tulang yang berkembang menjadi mesoderm progenitor kemudian membentuk jalur mesenkim (preosteoblas, osteoblas, osteosit dan *bone lining cells*) dan jalur hemopoetik (preosteoklas, osteoklas). Stem sel ini definisinya masih sulit dipahami, beberapa pendapat mendefinisikan stem sel merupakan *unspecified* dan *undifferentiated cells* yang berfungsi memperbaharui sel-sel tubuh termasuk didalamnya sel-sel darah, kulit, intestinal, dan seterusnya. Pada awal pembentukannya diawali oosit teraktifasi, menjadi zigot membelah berbentuk blastokis yang berisi DNA donor<sup>21-23</sup>.

Blastokis akan terurai menghasilkan sel-sel embrionik / *stem cell embryonic*, sel-sel inilah yang terdiri beberapa tipe sel sel pluripoten terbagi menjadi tiga yaitu endoderm, mesoderm (progenitor sel mesoderm dan progenitor sel hematopoesis) dan ektoderm yang akan berdiferensiasi sebagai sel-sel progenitor dan mempunyai kapabilitas berdiferensiasi menjadi berbagai jaringan tubuh nantinya, seperti proses pembentukan sumsum tulang, tampak pada gambar 2<sup>23</sup>.



Gambar 2. Fungsi diferensiasi sel-sel embrionik dan generasi sel-sel jaringan<sup>23</sup>.

Sumsum tulang adalah tempat terpenting dari 6 sampai dengan 7 bulan kehidupan janin dan selama masa anak dan dewasa normal, sumsum tulang adalah satu-satunya sumber sel darah baru serta lingkungan yang cocok untuk perkembangan stem sel. Di dalamnya terdapat sel stromal, sel lemak dan jaringan mikrovaskuler. Sumsum tulang juga merupakan tempat asal utama limfosit manusia dan ada bukti untuk sel prekursor sama dari kedua sistem hemopoetik dan limfoid. Stem sel hemopoetik juga membentuk osteoklas yang merupakan bagian sistem fagosit monosit dan berfungsi sebagai resorpsi tulang. Didalam aspek umum hemopoesis, stem sel sumsum tulang (pluripoten stem sel) setelah pembelahan sel dan langkah diferensiasi, menjadi urutan sel progenitor untuk tiga jalur berfungsi membentuk sel sumsum tulang utama yaitu : a. eritroid ; b. granulositik dan monositik ; c. megakariositik<sup>23,24</sup>.

### 2.1.3 Sel Tulang

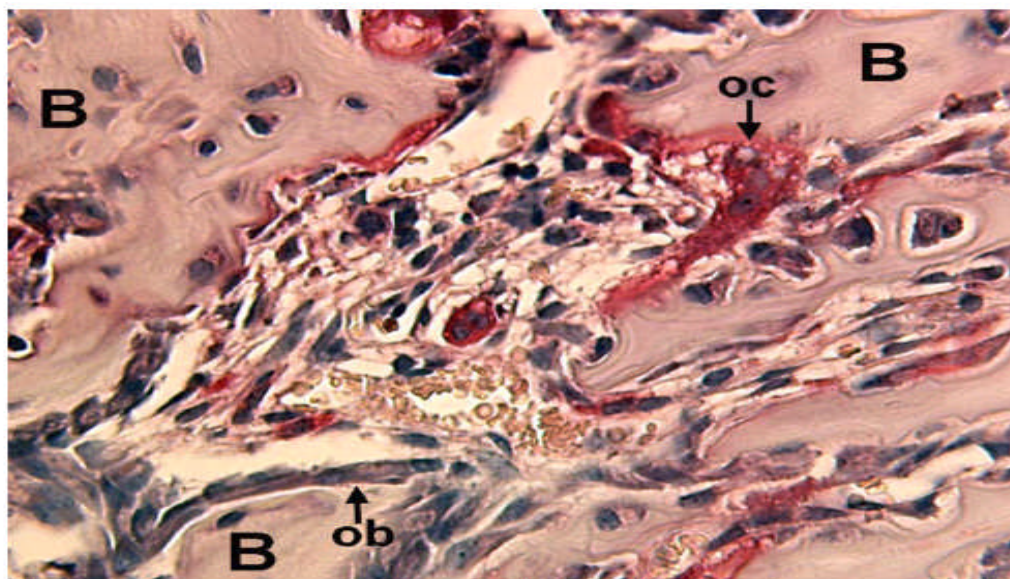
#### a. Osteoblas

Osteoblas berasal dari jalur sel mesenkim stroma sumsum tulang. Osteoblas memproduksi osteoid atau matriks tulang, berbentuk bulat, oval atau polihedral, terpisah dari matriks yang telah mengalami mineralisasi. Osteoblas berfungsi mensintesis dan mensekresi matriks organik tulang, mengatur perubahan elektrolit cairan ekstraselular pada proses mineralisasi. Osteoblas mengandung retikulum endoplasmik, membran golgi dan mitokondria. Pematangan osteoblas memerlukan *fibroblast growth factor* (FGF), *bone morphogenic proteins* (BMPs), *core binding factor-1* (CBFA-1) dan *osteoblast specific cis acting element* (OSE-2). Osteoblas memiliki reseptor estrogen, sitokin, paratiroid hormon (PTH), *insulin derivated growth factor* (IGF), dan Vitamin D3. Osteoblas saling berhubungan melalui *gap junction*.. Osteoblas yang menetap pada permukaan tulang bentuknya pipih yang dinamakan *bone lining cells / resting osteoblast* <sup>21,22,23</sup>.

#### b. Osteoklas

Osteoklas berasal dari jalur hemopoetik yang juga membuat makrofag dan monosit. Sel ini berpindah dari sumsum tulang lewat sirkulasi atau migrasi direk. Sel prekursor osteoklas terdapat pada sumsum tulang dan sirkulasi darah. Sel ini ditemukan pada permukaan tulang yang mengalami resorpsi dan kemudian membentuk cekungan yang dikenal sebagai lakuna *Howship*. Osteoklas dalam sitoplasmanya akan terisi oleh mitokondria guna menyediakan energi untuk proses resorpsi tulang. Osteoklas merusak matriks tulang, melekat pada

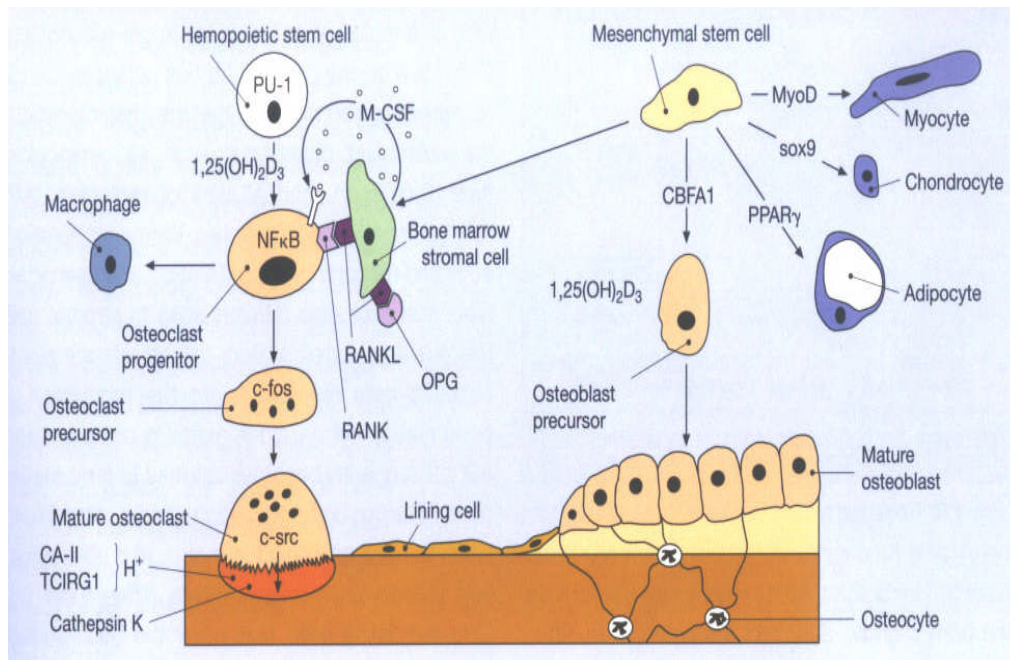
permukaan tulang, memisahkan sel dengan matriks, menurunkan pH7 menjadi pH4. Keasaman ini akan melarutkan mineral dan merusak matriks sel sehingga protease keluar. Osteoklas memiliki reseptor yaitu *RANK-ligand* (RANK-L) untuk maturasi sel dan mengalami apoptosis<sup>21,23,25</sup>.



Gambar 3. Sel Tulang (ob : Osteoblas; oc : Osteoklas)<sup>26</sup>.

### c. Osteosit

Osteosit merupakan 90% dari sel tulang terletak diantara matriks tulang yang mengalami mineralisasi. Osteosit memiliki satu inti, jumlah organela bervariasi. Jaringan sel ini menjangkau permukaan luar dan dalam tulang, membuat tulang menjadi sensitif terhadap pengaruh tekanan, mengontrol pergerakan ion serta mineralisasi tulang. Osteosit berasal dari osteoblas yang pada akhir proses mineralisasi terhimpit oleh ekstraselular matriks, berperan dalam pemeliharaan massa dan struktur tulang, terlihat digambar 4<sup>21,27,28</sup>.



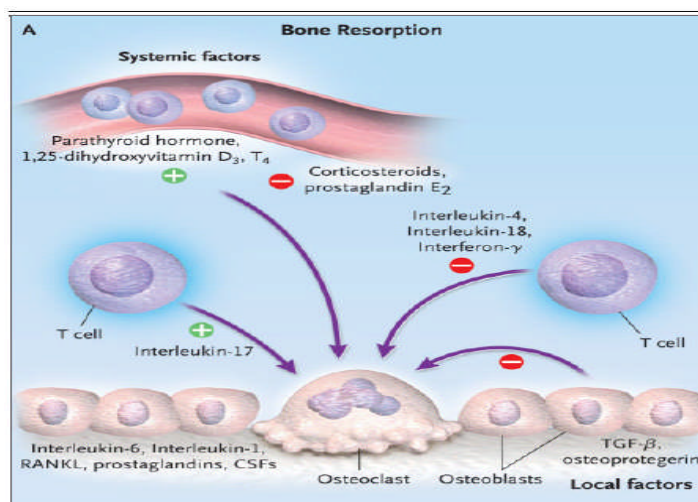
Gambar 4. Regulasi Fungsi dan Diferensiasi Sel Tulang<sup>29</sup>.

## 2..2. Sitokin dan faktor pertumbuhan tulang

IL-1 berperan utama dalam resorpsi tulang, merangsang prekursor mitogenik osteoklas. Fungsi ini diperkuat oleh TNF- $\alpha$ , akan bekerja secara sinergis dengan PTH (paratiroid hormon). IL-6 merupakan protein fase akut yang memperkuat resorpsi tulang bersama IL-1 dan TNF- $\alpha$  melalui rangsangan mitogenesis dari sel osteoklas. TGF- $\beta$  banyak ditemukan pada matriks tulang. TGF- $\beta$  aktif selama proses pembentukan tulang, memperkuat aktivitas osteoblas dengan meningkatkan sintesis kolagen, kecepatan aposisi tulang serta menghambat diferensiasi osteoklas<sup>23,27</sup>.

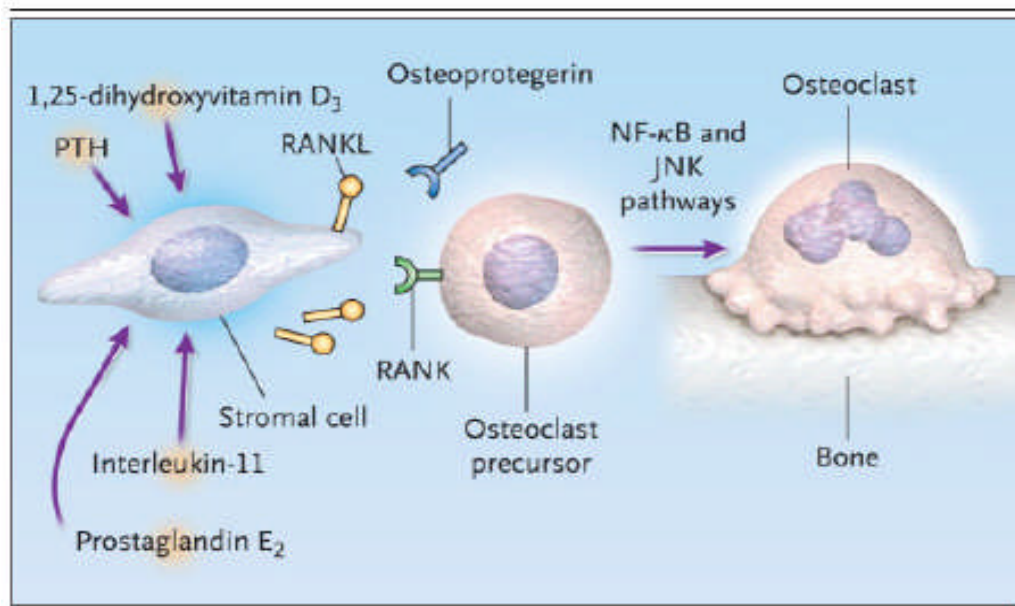
Hormon sistemik yaitu PTH, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, dan Thyroxine (T<sub>4</sub>) menstimulasi formasi osteoklas, dengan memicu ekspresi RANKL (*Receptor Activator of nuclear Factor kappa beta ligand*) pada sel-sel stroma sumsum tulang dan osteoblas. Selain itu, osteoblas memproduksi IL-6, IL-1, prostaglandin, dan *colony stimulating factor* (CSFs) serta menstimulasi formasi osteoklas, sel aksesori tambahan. Sel T memproduksi sitokin-sitokin yang dapat menghambat formasi osteoklas, seperti IL-4, IL-18, dan Interferon- $\gamma$ , dapat dilihat pada gambar 5<sup>30</sup>.

Faktor lokal dan faktor sistemik dapat merubah proliferasi dan diferensiasi osteoblas. Faktor tersebut seperti *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) yang diproduksi oleh limfosit. Sebagai tambahan, matrik tulang adalah sumber utama dari *growth factors* dimana dapat merubah proliferasi dan diferensiasi osteoblas, yaitu *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), TGF- $\beta$ , *Insulin-Like Growth Factors* (IGFs), dan *Fibroblast Growth Factors* (FGFs)<sup>30</sup>.



Gambar 5. Resorpsi dan Formasi Tulang<sup>30</sup>.

Kortikosteroid dapat memicu apoptosis osteoblas dan menghambat formasi tulang, dapat dilihat pada panel B <sup>21</sup>.



Gambar 6. RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa beta ligand*) dan Formasi Osteoklas <sup>30</sup>.

Gambar 6 menunjukkan RANKL adalah pemicu formasi osteoklas. *Osteotropic factors*, 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, parathyroid hormone (PTH), prostaglandin E-2, dan Interleukin-1, memicu formasi osteoklas dengan cara menaikkan regulasi ekspresi RANKL pada permukaan sel-sel stroma sumsum tulang dan osteoblas yang imatur. Kemudian RANKL melekat dengan reseptor RANK, pada permukaan prekursor osteoklas, dan oleh jalur *nuclear factor- Kβ*, dan Jun N-Terminal Kinase (JNK) memicu terbentuknya formasi osteoklas, dan mempromosikan osteoklas *survival*. Tambahan, reseptor perangkap yaitu osteoprotegerin, menghambat RANKL melekat pada RANK. RANKL juga

terdapat dalam bentukan soluble (larut) yang diproduksi oleh sel T pada saat inflamasi. Rasio RANKL dengan osteoprotegerin menentukan tingkat osteoklastogenesis<sup>30</sup>.

### **2.3 Penyembuhan fraktur tulang**

Penyembuhan fraktur tulang secara garis besar terdiri dari dua kombinasi proses yaitu *intramembranous* dan *endochondral*. Proses *endochondral* osifikasi dimulai ketika periosteum robek ketika terjadi fraktur sedangkan pada proses *intramembranous* dimulai mulai terbentuk *soft callus* hingga *hard callus*. Proses penyembuhan fraktur diatur oleh signal molekuler yang dibagi menjadi 3 grup, (1) *sitokin* (2) TGF- $\beta$ 1, (3) faktor angiogenik<sup>31</sup>.

#### *a. Sitokin*

*Sitokin* memiliki peran penting pada proses *cascade* inflamasi setelah terjadi trauma. *Sitokin* akan diproduksi dan berfungsi dalam waktu singkat setelah terjadi trauma. *Sitokin* yang dihasilkan meliputi: IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang akan mendorong sel radang untuk diproduksi. Sel radang yang diproduksi adalah sel makrofag dan sel mesenkim.. Proses ini dimulai dari fraktur hingga puncaknya dua puluh empat jam dan menghilang setelah 3 hari. IL-1 dan IL-6 akan muncul kembali pada fase re-modelling. Sedangkan TNF- $\alpha$  akan muncul kembali pada fase reabsorpsi kartilago dan pembentuk tulang primer. Selain itu TNF- $\alpha$  merangsang terjadi proses apoptosis dari sel *condrosit* yang mengalami hipertrofi selama proses pembentukan tulang primer. Salah satu jenis superfamily dari

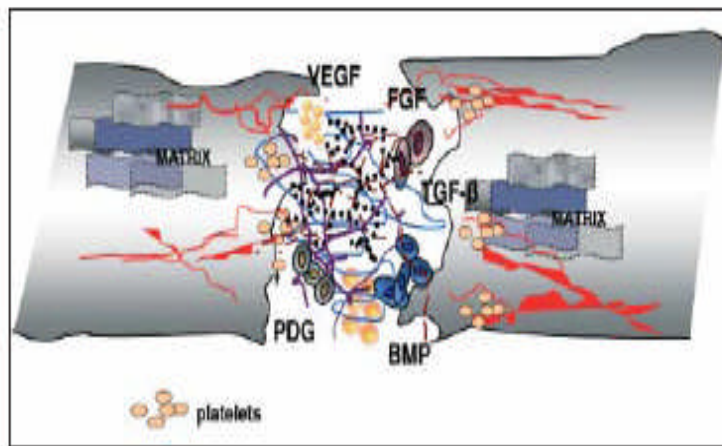
TNF- $\alpha$  yaitu RANKL dan *macrophage colony – stimulating factor* (MSCF) bertugas mengatur proses *osteoclastogenesis* akan meningkat pada fase inflamasi dan menurun saat proses remodeling<sup>32</sup>.

b. TGF- $\beta$ 1

Super family dari TGF- $\beta$ 1 akan mengalami diferensiasi menjadi *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs), *Growth Differentiation Factors* (GDFs), *Activins*, *Inhibits*, *Mullerian Inhibiting Substance*. Spesifik dari berbagai macam substans ini meliputi BMPs (2-8), GDFs (1,5,8 dan 10) dan TGF- $\beta$  1-3 akan berperan pada proses osifikasi *Intramembranous* dan *Encondral* selama penyembuhan tulang<sup>6</sup>. TGF- $\beta$  1-3 dihasil dari sel platelet yang timbul saat awal terjadi trauma yang merangsang akan meningkat hingga hari ke -7 . TGF- $\beta$  2 dan TGF- $\beta$  3 memiliki peran penting dari proses *chondrogenesis*<sup>33</sup>. Selama penyembuhan tulang, BMPs akan diproduksi oleh sel mesenkim, osteoblast dan kondrosite. Walaupun banyak jenis family dari BMP , terdapat BMP yang konsisten dan berperan penting dalam penyembuhan tulang . BMPs -2,-6,-9 memiliki peran penting dalam proses diferensiasi sel masenkim untuk menjadi sel osteoblast. BMP-2 , -6, dan -9 menurut penelitian mendorong diferensiasi dari sel stem menjadi sel osteoblas. BMP-5 dan -6 akan bekerja sama dengan TGF- $\beta$  akan mendorong proses *cascade* dari pembentukan kartilago dan tulang. BMP -3,-4,-7 dan -8 tidak berperan pada fase inflamasi tetapi akan meningkat pada fase respsi kartilago dan pembentukan tulang primer<sup>34</sup> .

### c. Angiogenik

Penyembuhan fraktur yang optimal akan tergantung pembentukan vaskularisasi yang optimal . Proses *angiogenesis* diatur oleh dua macam jenis yaitu *vascular endothelial growth factor* ( VEGF ) dan *angiopoetin dependent pathway* <sup>35</sup>. VEGF mendorong proses *neoangiogenesis* dengan terbentuknya endothel kapiler dan mitogen <sup>36</sup>. Jenis family dari VEGF yaitu VEGF D, VEGF A, dan VEGF C akan meningkat pada fase pembentukan kartilago dan menurun pada fase remodeling. Proses *angiogenesis* oleh *angiopoetin* mekanisme belum diketahui . *Angiopoetin* -1 meningkat pada fase inflamasi diduga sebagai pendorong terjadi vaskularisasi di periosteum pada penyembuhan tulang <sup>37</sup>.



Gambar 7 . Fase awal dari penyembuhan tulang <sup>38</sup>.

## 2.4 Fase penyembuhan tulang

Pada fase penyembuhan tulang terdiri dari beberapa fase yaitu

1. Fase reaktif meliputi
  - Fase inflamatori
  - Fase pembentukan granulasi
2. Fase reparasi meliputi
  - Pembentukan kalus
  - Pembentukan tulang lamelar
3. Fase remodeling
  - Remodeling dari kontur tulang

### 2.4.1 Fase reaktif ( 2-3 minggu )

Setelah terjadi fraktur, pembuluh darah mengalami kontriksi sehingga pendarahan berhenti. Setelah beberapa jam setelah fraktur, terjadi sel darah merah mengalami ekstravasasi membentuk *clot* yang dikenal dengan hematoma, setelah sel darah merah mengalami degenerasi pada waktu bersamaan sel fibroblas akan tetap bertahan dan terus bereplikasi. Mereka akan membentuk agregat sel kemudian berpisah dengan pembuluh kapiler membentuk jaringan granulasi. Pada fase inflamasi timbul karena peran dari sitokin yaitu IL-1 dan IL-6 dan TNF- $\alpha$  yang dihasilkan dari sel makrofag dan sel mesenkim. Pembentukan kalus dimulai dari ekspresi dari TGF- $\beta$ , PDGF dan BMP-2. Terjadi dari proliferasi dari sel mesenkim akibat pengaruh *Growth Differentiation Factor*<sup>4,5</sup>.

#### 2.4.2 Fase reparasi ( 3 minggu- 8 minggu )

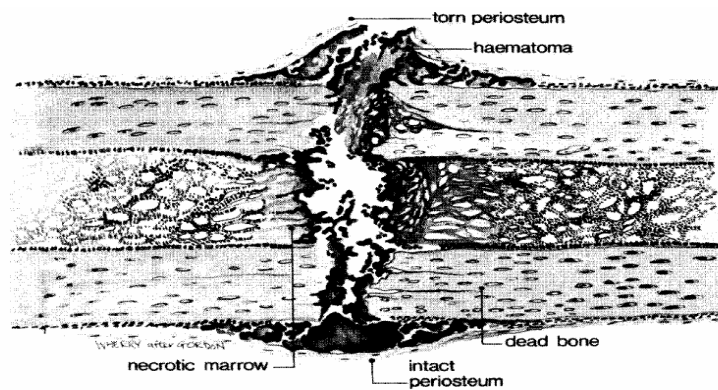
Beberapa minggu setelah terjadi fraktur, setelah terjadi replikasi dari sel periosteum. Sel periosteum proksimal dari fraktur berkembang membentuk kondroblas dan kartilago hialin. Sitokin yaitu TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, dan *Growth Differentiation Factor* ( GDF-5 ) tetap meningkat untuk mempertahankan proses kondrogenesis. Sel periosteum dibagian distal dari fraktur berkembang membentuk osteoblas dan membentuk *woven bone* akibat peran sitokin RANKL dan MSCF. Angiopoetin dan VEGF akan mendorong proses angiogenesis untuk vaskularisasi yang baru. Dari fibroblas dengan granulasi jaringan, diikuti perkembangan dari kondroblas dan kartilago hialin. Proses ini disebut pembentukan kalus<sup>4,5</sup>.

#### 2.4.3 Fase maturasi ( 8 minggu- 12 minggu )

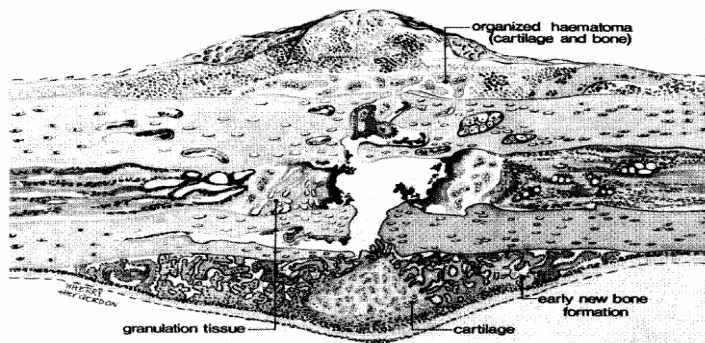
TNF- $\alpha$  akan kembali meningkat untuk menginduksi proses apoptosis dari sel kondrosit yang berlebihan. Pada fase ini terjadi pergantian kartilago hialin dan *woven bone* dengan lamelar bone, perubahan ini dikenal dengan osifikasi endokondral yang melibatkan BMP -5 dan -6 selama proses ini berlangsung. Proses pembentukan lamelar bone dimulai dengan matrik kolagen yang mengalami mineralisasi, sel osteoblas yang berasal dari saluran pembuluh darah akan membawa matrik mineral. Proses pembentukan baru lamelar bone dikenal dengan *trabekula bone*<sup>4,5</sup>.

#### 2.4.4 Fase remodeling ( setelah 12 minggu )

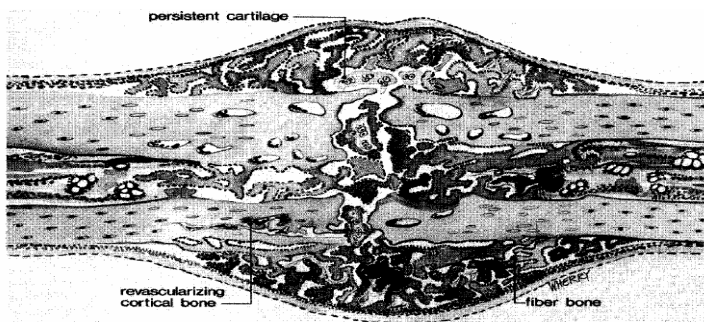
Fase remodeling terjadi pergantian *trabecula bone* dengan *compact bone* Oleh karena peran dari RANKL , MSCF dan peningkatan sitokin IL-1 dan IL 6 .*Trabecula bone* akan diabsorpsi oleh sel osteoclast yang membentuk lubang sempit dikenal dengan *Howship lacuna*. Kemudian osteoblas akan dideposit dalam lubang resorpsi <sup>4,5</sup>.



Gambar 8 . Fase awal dari fraktur , tampak periosteum yang robek dan akumulasi hematome dibawah dari periosteum dan antara tulang .Tampak nekrosis dari sumsum tulang dan *dead bone* pada garis fraktur <sup>4</sup>.



Gambar 9. Fase maturasi terdapat organisasi hematome yang awal timbul formasi tulang mulai dari subperiosteal region dan pembentukan kartilago pada sisi yang lain <sup>4</sup>.



Gambar 10. Fase akhir dari penyembuhan tulang , terjadi bridging yang dibentuk jaringan serat tulang yang immature . Tampak jaringan kartilago yang timbul dari pembuluh darah kapiler yang timbul <sup>4</sup>.

Tabel 2. Stadium penyembuhan tulang<sup>5,32,37</sup>.

Fase penyembuhan fraktur	Proses biologis	Ekspresi molekul yang berperan
Inflamasi	Hematoma	IL-1, IL-6 dan TNF $\alpha$ berperan dalam inisiasi jalur penyembuhan
	Inflamasi	Ekspresi dari TGF- $\beta$ , PDGF dan BMP -2 meningkat untuk menginisiasi pembentukan kalus
Pembentukan kartilago dan response periosteal	Keterlibatan sel mesenkim	GDF-8 dihambat pada hari 1, berperan dalam pengaturan proliferasi sel
	Dimulainya kondrogenesis dan osifikasi endokondral	TGF- $\beta$ 2, $\beta$ 3, dan GDF-5 meningkat karena keterlibatannya dalam proses kondrogenesis dan pembentukan tulang secara endokondral
Pesorpsi kartilago dan pembentukan primer tulang	Proliferasi sel pada osifikasi intramembranosa	Peningkatan BMP-5 dan 6
	Pertumbuhan vaskuler	Angiopoetin dan VEGF diinduksi untuk menstimulasi pertumbuhan vaskular dari pembuluh darah periosteum
	Neo-angiogenesis	
	Fase osteogenesis paling aktif	TNF- $\alpha$ meningkat bersamaan dengan resorpsi kartilago, menyebabkan keterlibatan sel-sel mesenkim dan menginduksi apoptosis pada kondrosit yang hipertropi.
Pembentukan tulang dan “Bone remodelling” sekunder	Keterlibatan sel-sel tulang dan pembentukan “woven bone “	RANKL dan MCSF meningkat bersamaan dengan resorpsi kartilago yang sudah terjadi mineralisasi.
	Apoptosis pada kondrosit dan proteolitik pada matriks tulang	
	Keterlibatan osteoclast dan resorpsi tulang rawan	BMP-3, 4, 7 dan 8 meningkat bersamaan dengan resorpsi kartilago yang sudah terkalsifikasi
	Neo-angiogenesis	BMP-5 dan 6 masih tinggi pada fase ini, berperan dalam pengaturan osifikasi intramembranosa dan endokondral. VEGF ditingkatkan untuk menstimulasi neo-angiogenesis
Pembentukan tulang dan “Bone remodelling” sekunder	“Bone remodelling” terjadi bersamaan dengan aktivitas osteoklast	IL-1 dan IL 6 meningkat lagi bersamaan dengan bone remodelling, dimana terjadi penurunan kadar RANKL dan MSCF
	Pembentukan sumsum tulang	Penurunan ekspresi TGF- $\beta$ dan lainnya

## 2.5 Kolostrum bovine

Kolostrum adalah materi sebelum susu di hasilkan, setelah ibu melahirkan anak . Kolostrum merupakan cairan kental yang berwarna kuning yang dihasilkan payudara dan mengandung banyak protein. Umumnya diproduksi kurang lebih lima hari setelah proses melahirkan. Colostrum mengandung lemak , protein, mikronutrien yang terdiri dari vitamin dan mineral , dan IgA secretory yang tinggi <sup>39</sup> .

Dikarenakan produksi kolostrum pada manusia terbatas jumlahnya selain itu ibu pendonor kolostrum sering memiliki riwayat merokok dan penggunaan alkohol .Maka sebagai alternatif kolostrum bisa didapatkan dari hewan khususnya sapi . <sup>39</sup> Kolostrum bovine dihasil 5-7 hari setelah sapi melahirkan. Kolostrum bovine mengandung komponen yang berbeda dari susu sapi. Kolostrum bovine mengandung kandungan protein, lemak , laktosa dan amino esensial <sup>40</sup> .

## 2.6 Laktoferin

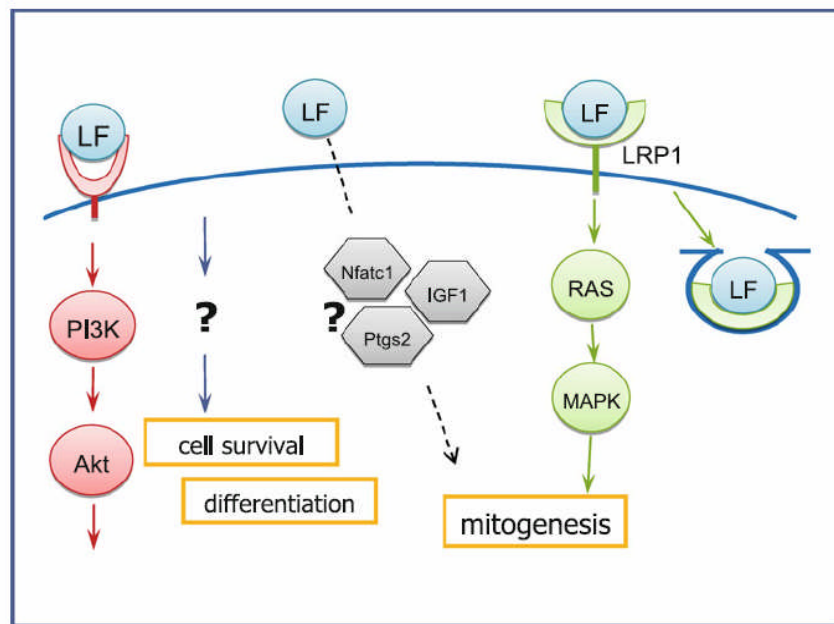
Laktoferin merupakan glikoprotein yang mengikat besi 80 k Da yang merupakan golongan sejenis dari trasferin. <sup>41</sup> . Laktoferin dihasilkan sel epitelial dari kelenjar eksokrin dan granula neutophilic dari sel leukosit <sup>42</sup> . Kosentrasi laktoferin yang paling tinggi ditemukan pada susu kolostrum <sup>7</sup> . Kadar laktoferin dalam sirkulasi darah adalah 2-7 µg/ml yang normal dihasilkan dari sel netrofil selama terjadi proses inflamasi <sup>43</sup> . Pada tulang , laktoferin berfungsi sebagai *growth factor* yang menyebabkan proliferasi sel osteoblast dan menghambat pertumbuhan osteoclast in vitro dan mendorong pertumbuhan tulang in vivo <sup>44</sup>

### 2.6.1 Efek laktoferin terhadap osteoblas

Penelitian tentang laktoferin mempunyai efek penyembuhan tulang dibuktikan dengan meningkatnya sel osteoblas dengan ditandai peningkatan *alkali fosfatase* dan *osteocalcin*<sup>45</sup>. Laktoferin mengikat zat besi memiliki efek mitogenesis terhadap sel osteoblast, sel osteoblast mengalami proliferasi karena efek dari *iron-depleted* (apo) dan *iron-loaded* (holo)<sup>15</sup>.

Reseptor dari laktoferin terdiri dari *Lactoferrin Receptor Lipoprotein 1* dan *2* (LRP1 dan LRP2) yang merupakan termasuk *multiligand* yang terdapat pada sel osteoblas<sup>8</sup>.

LRP1 merupakan ligand yang utama yang menyebabkan sel *osteoblast mitogenic*. *Receptor Associated Protein* (RAP) 39 kDa adalah *intraseluler chaperone* di biosintesa dari LRP1 dan 2, yang mencegah terjadi premature *ligand binding* selama *receptor trafficking* selain itu juga dapat menghambat *ligand binding* dengan reseptor sel yang sama<sup>9</sup>. RAP berfungsi membantu laktoferin melalui proses *endocytosis* memasuki membran sitoplasma dari sel osteoblast dan mengaktifkan *Lactoferrin Receptor Lipoprotein 1* (LRP 1). Menurut penelitian laktoferin akan mempengaruhi proses transkripsi dari sel osteoblast<sup>8</sup>.



Gambar 11 . Mekanisme laktoferin di osteoblast <sup>14</sup>.

Laktoferin berikat dengan LRP1 reseptor di sel osteoblast akan terjadi endositosis dari laktoferin-LRP1 kompleks hal ini terjadi juga dengan p42/44 MAP kinase . Inhibisi MAPK akan menghambat efek mitogenik laktoferin didalam osteoblast. Laktoferin juga mengaktifkan PI3K yang mendorong m RNA dari IGF1, Nfatc 1 dan PTgs2. Adapun mekanisme laktoferin mengaktifkan diferensiasi menjadi sel osteblast belum diketahui <sup>14</sup>.

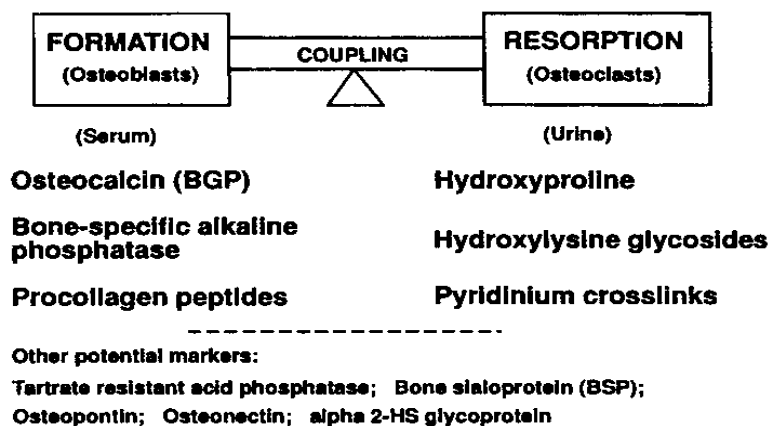
#### 2.6.2. Efek laktoferin pada osteoclast

Laktoferin menghambat terjadinya osteoclastogenesis tetapi tidak menghambat kerja sel osteoclast yang mature.. Efek menghambat osteoclastogenesis baru mulai timbul dari dosis 10 µg / ml . Pada dosis 100 µg / ml maka proses ini akan berhenti total <sup>11</sup>. Hal disebabkan efek laktoferin menghambat *receptor*

*activatorfor nuklear factor kB ligand* (RANKL) yang mendorong terjadinya *osteoclastogenesis* <sup>45</sup>.

## 2.7 Pengukuran formasi tulang

Remodeling tulang dapat diketahui dengan pemeriksaan enzim atau matrik protein yang diproduksi oleh osteoblas atau osteoklas. Osteokalsin adalah suatu protein Gla *g-carboxyglutamic acid*, adalah petanda (marker) dari formasi tulang. Merupakan suatu vitamin K dan vitamin D-dependent-protein yang diproduksi oleh osteoblas <sup>46,47</sup>.



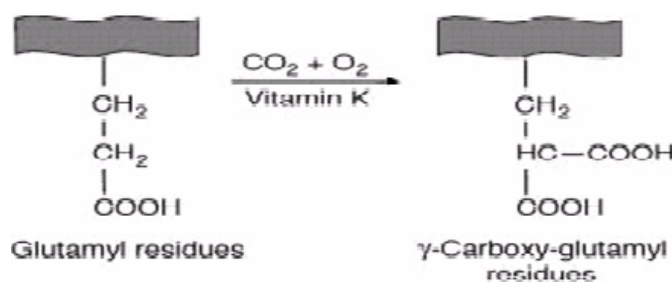
Gambar 12. Marker Biokimia pada Metabolisme Tulang <sup>46</sup>.

### 2.7.1 Osteokalsin

Osteokalsin adalah sebuah *polipeptida-49-residue* (5-8 kDa) dimana banyak terdapat pada berbagai spesies. Pada manusia gen osteokalsin terdapat pada kromosom 1 (Iq25-q31) dan diregulasi pada level transkripsi oleh *1,25-dihydroxy vitamin D3* <sup>46,47</sup>.



berhubungan dengan kaskade koagulasi adalah sebuah *Co-factor* esensial untuk *post-translational  $\gamma$  carboxylation* dari osteokalsin. Selama *carboxylation* terjadi, proses grup kedua carboxyl bertambah dan menjadi spesifik glutamil residu (Glu) pada posisi 17,18, dan 24 pada bentukan residu  *$\gamma$  carboxylation*. Modifikasi ini berguna nantinya untuk perubahan formasi, kestabilan rantai  $\alpha$ -helical-protein dan memberikan efek afinitas yang besar untuk kalsium dan hidroksiapatit<sup>46,47</sup>.



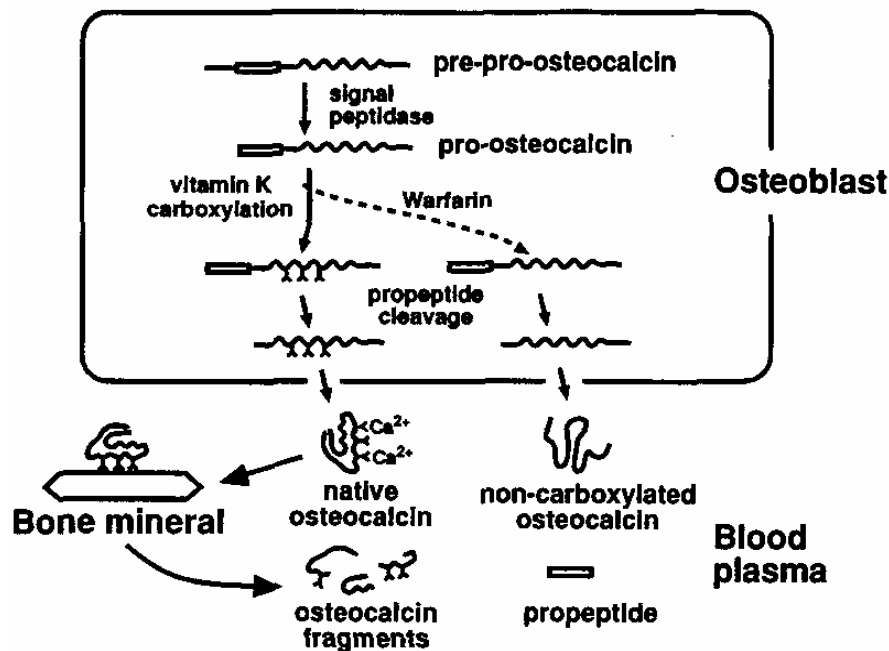
Gambar 14. Proses Hidroksilasi *Glutamyl-residues*<sup>46</sup>.

#### 2.7.1.2 Sintesis dan katabolisme osteokalsin

Osteokalsin diketahui dan diterima sebagai produk spesifik dari osteoblas. Setelah diproduksi, sebagian akan bergabung pada matrix tulang dan sebagian akan beredar pada sistim sirkulasi. Saat ini disamping hal tersebut terdapat beberapa laporan, dimana terjadi ekspresi osteokalsin mRNA pada megakariosit dan adiposit. Tapi perlu dicatat bahwa ekspresi ini dilaporkan secara *in vitro*, bukan *in vivo*<sup>46,47</sup>.

Skema gambar 15 menggambarkan biosintesis dan metabolisme osteokalsin serum yang dapat diambil dari komponen plasma atau marker serum dari formasi tulang. Sintesa osteokalsin secara spesifik diproduksi sebagian besar

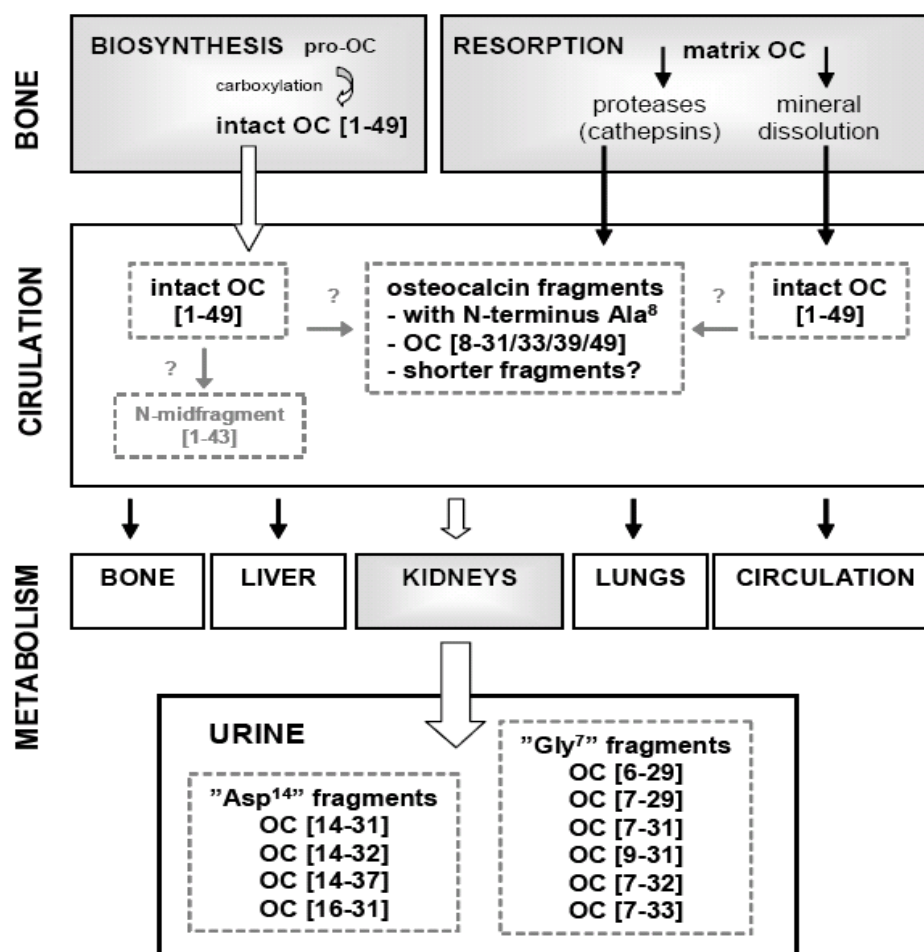
oleh osteoblas dan sedikit oleh odontoblas. Secara umum seperti protein lainnya, osteokalsin mempunyai sinyal yang mengarahkan dirinya kedalam retikulum endoplasma untuk memberikan pro-osteokalsin (terdiri dari 26 *aminoacid propeptide* N-terminal) kepada rantai 49-residue osteokalsin<sup>46</sup>.



Gambar 15. Metabolisme Osteokalsin<sup>46</sup>.

Sebelum sekresi dari osteoblas, residu glutamic-acid diproses karboksilasi oleh *vit-K-dependen enzyme* menjadi bentukan *g-carboxyglutamic acid* (Gla) dimana osteokalsin manusia terdiri dari maksimal tiga Gla residu per molekul. Kemudian terjadi pemecahan propeptida dan sekresi jumlah besar *native-osteocalcin* yang berguna untuk meningkatkan mineral matrik, proses ini dibantu oleh *calcium-binding properties of Gla residue*. Warfarin menghambat proses karboksilasi yang berfungsi untuk sekresi *non-carboxylated-osteocalcin* dan situasi ini mirip pada pasien defisiensi vit K. Maka terjadilah *under-carboxylated*

molekul, yang seperti halnya mengakibatkan tidak terbentuknya matriks dengan proporsi yang baik. Sebagian besar immunoasay untuk osteokalsin mengenal *native* dan *non-carboxylated molecule* dan hal ini dapat mengganggu interpretasi. Beberapa usaha dilakukan untuk mendeteksi serum *osteocalcin-carboxylation* dengan penggunaan hidroksi apatit *binding in vitro*<sup>46,47</sup>.



Gambar 16. Sirkulasi Osteokalsin<sup>47</sup>

Fungsi sebenarnya dari osteokalsin belum diketahui secara pasti, tetapi pada penelitian Ducy dan kawan-kawan didapatkan "*osteocalcin knockout*" pada kelinci, dimana digambarkan bahwa terdapat abnormalitas fenotipe pada umur 6

bulan, seiring dengan peningkatan marker formasi tulang. Ini diduga bahwa Osteokalsin mungkin berhubungan dalam regulasi fungsi osteoblas. Sebagian besar Osteokalsin disekresi oleh osteoblas yang dideposit pada matrix tulang ekstraseluler, serum osteokalsin mewakili fraksi dari total Osteokalsin yang tidak diabsorpsi oleh hidroksiapatit<sup>46</sup>.

Serum osteokalsin mempunyai waktu paruh pendek dan terhidrolis dalam ginjal dan hepar. Dalam sirkulasinya osteokalsin mempunyai 2 fragmen yaitu : *C-terminal-fragment* (dapat dipecah dengan mudah) dan *N-terminal mid-fragment* yang lebih stabil dan kuat. Hal ini dikarenakan residu 19-20 dan 43-44 sulit dihidrolisis. Dan diduga bahwa *arginyl-arginyl* residu yang terdapat pada posisi 19-20 terproteksi dari proteolisis karena hubungan mereka dengan *Gla-helix* atau proteksi ini berasal daripada *highly negatively charged  $\gamma$  carboxyglutamyl residues* pada posisi 17,21, dan 24. Sedangkan pada posisi 43 dan 44 lebih labil berhubungan dengan *C-terminal  $\beta$ -sheet*. Garnero dan kawan-kawan menggunakan antibodi monoklonal untuk mengidentifikasi sirkulasi fragmen pada individu sehat dan pasien dengan penyakit metabolik tulang. Dengan hasil terdapat sangat banyak bentukan imunoreaktif dari molekul yang *intact* dan *N-terminal mid-fragment* baik pada individu yang normal ataupun osteoporotik. Dalam sirkulasi dalam bentuk intak-osteokalsin dan *N-terminal mid-osteokalsin* serta fragmen fragmennya, sedangkan untuk metabolisme terdapat terutama pada tulang, kemudian hati, ginjal, paru dan sirkulasi tubuh. Sebagai tambahan mereka juga menemukan peningkatan *N-terminal mid-fragment* pada pasien penyakit Pagets dan pasien gagal ginjal kronik<sup>46,47</sup>.

Deteksi intak atau fragmen osteokalsin cukup penting untuk kepentingan laboratorium dimana diperiksa dengan *Commercial Assay* (Incstar, CIS ELSA-osteo-nat (1-49), CIS ELSA-osteo (1-43), Nichols (1-49, 1-43), yang dikenal saat ini. *Assay* ini hanya mendeteksi intak osteokalsin yang sensitif terhadap pemeriksaan degradasi in vitro<sup>46,47</sup>.

### 2.7.2 *Bone Alkali phosphatase*

Aktifitas *bone alkali phosphatase* ( BALP ) merupakan indikator dari differensiasi dari sel osteoblast . Merupakan marker dari sel osteoblast yang matur, untuk membentuk suatu sel osteoblast diperluka 2 tahap. Tahap pertama yaitu proliferasi dan biosintesa dari matrik ekstraselluler dan diikuti fase kedua yaitu differensiasi dari sel. Pada tahap pertama , jaringan matrik yang mature dan protein spesifik yang berhubungan dengan fenotipe dari sel dari tulang akan dapat dideteksi dengan mengukur osteocalcin. Pada tahap kedua , matriks akan mengalami mineralisasi dan serum *bone alkali phosphatase* akan dihasilkan.<sup>14</sup>