

- LOW LEVEL RADIATION
- LASERS
- FRACTURES - HEALING
TESIS

**PENGARUH SINAR LASER ENERGI RENDAH TERHADAP
PEMBENTUKAN KALUS PADA PROSES PENYEMBUHAN
RAKTUR TULANG TIBIA TIKUS PUTIH (*RATTUS NOVERGICUS*)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

Kk

TKD 01/07

Sih

P



Masri Sihombing

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**



TESIS

**PENGARUH SINAR LASER ENERGI RENDAH
TERHADAP PEMBENTUKAN KALUS PADA PROSES
PENYEMBUHAN FRAKTUR TULANG
TIBIA TIKUS PUTIH JANTAN (*RATTUS NOVERGICUS*)**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**MASRI SIHOMBING
NIM :090314995M**

**PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**

**TESIS INI TELAH DISETUJUI DAN DINYATAKAN
LULUS PADA TANGGAL 29 MARET 2006**

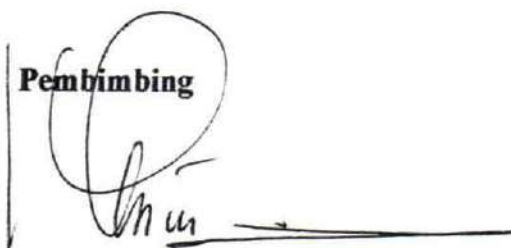
Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Djoko Roeshadi, dr. SpOT. FICS

Pembimbing



Prof. Suhartono Taat Putra, dr., MS

UCAPAN TERIMA KASIH

Dengan mengucapkan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, saya akhirnya dapat menyelesaikan tesis yang berjudul : **Pengaruh Sinar Laser Energi Rendah Terhadap Proses Penyembuhan Fraktur Tulang Tibia Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*)**. Tesis ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar magister dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar pada Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga dan sekaligus merupakan karya akhir saya dalam menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Spesialis-I Ilmu Bedah Orthopaedi dan Traumatologi di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Saya menyadari sepenuhnya bahwa tanpa bantuan dan bimbingan baik dalam hal konsultasi maupun dukungan moril dari para pembimbing, senior, teman sejawat maupun keluarga, semua ini tidak akan dapat terselesaikan. Oleh karena itu pada kesempatan ini saya ingin mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi tingginya kepada pihak-pihak yang telah membantu saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Pertama-tama saya ingin mengucapkan terima kasih kepada para pembimbing dan penguji tesis saya, Prof. DR .Djoko Roeshadi, dr.SpOT. FICS, Prof Suhartono Taat, dr, Prof Ari Gunawan, dr.,Ph.D., Paulus Liben, dr., Pikanto Wibowo, dr.Sp BK, R.Endang Joewarini, dr.SpPA, dr.H.Muh. Cholil Munif yang telah memberikan bimbingan dan konsultasi pada penelitian ini. Juga tidak lupa saya ucapkan terimakasih kepada Almarhum Abdurrahman, dr. SpOT yang telah memberikan bimbingan dan konsultasi pada awal-awal penelitian ini. Semoga amal dan jasa almarhum diterima disisi Tuhan Yang Maha Esa.

Selanjutnya saya ingin mengucapkan terima kasih kepada para guru-guru saya, seluruh staf serta rekan-rekan sejawat di bagian Orthopaedi dan Traumatologi FK Unair, serta pihak-pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan dalam penelitian ini, yaitu : Rektor Unair, Dekan Unair beserta Staf, Direktur Program Pascasarjana Unair, dan Direktur RSUD Dr Soetomo.

Tidak lupa juga saya ucapkan terima kasih kepada isteri beserta anak-anak tercinta Evy Christiani, Ruth Natalia dan Samuel Andersen, kedua orang tua saya serta kedua mertua saya yang telah memberikan dukungan moril dan semangat dalam setiap kesempatan, baik selama proses penelitian ini maupun selama saya menempuh program pendidikan dokter spesialis ini.

Akhirnya kepada semua pihak dan teman sejawat yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang telah membantu selama masa pendidikan Program Magister, saya ucapkan terimakasih yang setulusnya. Semoga Tuhan Yang Maha Esa senantiasa melimpahkan rahkmat-Nya. Amin.

Surabaya, Maret 2006

Penulis

RINGKASAN

Pengaruh Sinar Laser Energi Rendah

Terhadap Pembentukan Kalus Pada Proses Penyembuhan Fraktur Tulang Tibia

Tikus Putih (*Rattus Novergicus*)

Masri Sihombing

Penggunaan laser energi rendah (*low level laser*) dalam dunia medis untuk mempercepat penyembuhan luka akhir-akhir ini semakin sering dilakukan karena energi foton yang dihasilkan oleh laser energi rendah diketahui mempunyai efek biostimulasi pada jaringan dengan cara merangsang proliferasi dan diferensiasi sel mesenkim sehingga penyembuhan luka dan pembentukan jaringan baru lebih cepat tercapai. Tetapi sampai saat ini pengaruh laser energi rendah terhadap penyembuhan fraktur tulang masih tetap samar perdebatan karena dari sekian banyak penelitian yang telah dilakukan hasilnya berbeda antara satu peneliti dengan peneliti lainnya. Ada yang menyebutkan bahwa laser energi rendah (*low level laser*) dapat mempercepat penyembuhan fraktur tulang dengan cara merangsang proliferasi dan diferensiasi osteoblas. Pada penelitian lain disebutkan bahwa laser energi rendah (*low level laser*) tidak ada pengaruhnya terhadap proses penyembuhan fraktur tulang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh sinar laser energi rendah (*low level laser*) terhadap pembentukan kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*). Sebanyak 60 ekor tikus *Rattus novergicus* dilakukan frakturasi pada 1/3 bagian tengah tulang tibia kiri dan kemudian dilakukan immobilisasi dengan gip (*plaster cast*). Sepuluh ekor disinari laser energi rendah (*low level laser*) dengan dosis penyinaran 0,5 joule selama 1 minggu, 10 ekor dengan dosis penyinaran 0,5 joule selama 2 minggu, dan 10 ekor lainnya dengan dosis penyinaran 0,5 joule selama 3 minggu. Setiap minggu dilakukan evaluasi pembentukan kalus pada kelompok perlakuan dan kontrol. Kalus yang terbentuk diwarnai dengan pengecatan rutin Hato eosin (HE) untuk melihat banyaknya osteoblas yang terbentuk dan juga dengan pengecatan imunohistokimia untuk melihat banyaknya osteoblas yang mengekspresikan

TGF- β . Selanjutnya dilakukan pengukuran tebal kalus yang terbentuk pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan menggunakan *ocular micrometer (graticule)*. Selain penghitungan jumlah osteoblas dan osteoblas yang mengekspresikan TGF- β serta pengukuran tebal kalus, pada penelitian ini juga dilakukan juga pengukuran kadar alkali fosfatase yang terdapat dalam darah hewan coba.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan adanya peningkatan jumlah osteoblas, jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β dan tebal kalus pada kelompok tikus yang disinari dengan laser energi rendah (*low level laser*) baik pada minggu I, minggu II dan minggu III penyinaran. Hasil analisa statistik menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan terhadap variabel osteoblas (minggu I $p = 0,218$; minggu II $p = 0,019$; minggu III $p = 0,014$), osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (minggu I $p = 0,022$; minggu II $p = 0,043$; minggu III $p = 0,000$) dan tebal kalus (minggu I $p = 0,169$; minggu II $p = 0,001$; minggu III $p = 0,015$), sedangkan variabel alkali fosfatase tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan (minggu I $p = 0,870$; minggu II $p = 0,434$; minggu III $p = 0,328$). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa laser energi rendah (*low level laser*) dapat meningkatkan kualitas kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus *Rattus norvegicus* dengan cara meningkatkan jumlah osteoblas, jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β dan tebal kalus.

SUMMARY

The Effect of Low Level Laser in Callus Formation of *Rattus Novergicus*' Tibia Fracture Healing

The use of low level laser therapy to stimulate wound healing has been familiar in medical practice to day. It is believed that photon which is produced by the laser can reduce the process of proliferating and differentiating mesenchymal cell in the wounded tissue so the healing can be achieved faster. But until now, the low level laser's effect in the healing is still debated. Research which had been held on rat's tibia fracture showed that low level laser enhanced the proliferation and differentiation of osteoblasts. On the other hand, many researchs showed that low level laser did nothing on rat's tibia fracture healing.

This study was intended to know the effect of low level laser therapy in callus formation on rat's tibia fracture healing. Sixty *Rattus novergicus* which had been divided random sampling into control and test group were fractured at the left middle third of tibia bone and immobilized with plaster of cast. Ten *Rattus novergicus* from test group were irradiated by low level laser with 0,5 joule daily energy dose for 7 days. The other ten from the same group were irradiated by the same daily energy dose for 14 days, and the rest from the test group were irradiated with 0,5 joule daily energy dose for 21 days. After each seven days irradiation, ten rats from each group were sacrificed and analyzed histologically and chemically. The callus were performed by routine HE and histochemistry staining to see the osteoblasts, TGF- β , thickness of the callus and alkaline phosphatase.

Statistical analyzing showed a significantly increasing of osteoblasts, TGF- β , thickness of the callus. The osteoblasts' p score showed less than 0,05 ($p=0,218$ after 1 week irradiation, $p=0,019$ after 2 weeks irradiation and $p=0,014$ after 3 weeks irradiation). The TGF- β 's p score showed $p=0,022$ after 1 week irradiation, $p=0,043$ after 2 weeks irradiation and $p=0,000$ after 3 weeks irradiation) and thickness of the callus' p score showed $p=0,169$ after 1 week irradiation, $p=0,001$ after 2 weeks irradiation and $p=0,015$ after 3 weeks irradiation). But the low level laser didn't make difference of

kali fosfatase between test and control groups ($p=0,870$ after 1 week irradiation, $p=0,434$ after 2 weeks irradiation and $p=0,328$ after 3 weeks irradiation). This experimental study showed that low level laser can enhanced the quality of fracture healing by stimulating the proliferation and differentiation of osteoblas at the fracture site.

ABSTRACT

This study was performed to know the effect of low level laser therapy in callus formation on rat's tibia fracture healing. Sixty *Rattus novergicus* which had been divided random sampling into control and test group were fractured at the left middle third of tibia bone and immobilized with plaster of cast. Ten *Rattus novergicus* from test group were irradiated by low level laser with 0,5 joule daily energy dose for 7 days. The other ten from the same group were irradiated by the same daily energy dose for 14 days, and the rest from the test group were irradiated with 0,5 joule daily energy dose for 21 days. After each seven days irradiation, ten rats from each group were sacrificed and analyzed histologically and chemically. The callus were performed by routine HE and histochemistry staining to see the osteoblas, TGF- β , thickness of the callus and alkaline phosphatase. Statistical analyzing showed a significantly increasing of osteoblas, TGF- β , thickness of the callus. The osteoblas' p score showed less than 0,05 (p=0,218 after 1 week irradiation, p=0,019 after 2 weeks irradiation and p=0,014 after 3 weeks irradiation). The TGF- β 's p score showed p=0,022 after 1 week irradiation, p=0,043 after 2 weeks irradiation and p=0,000 after 3 weeks irradiation) and thickness of the callus' p score showed p=0,169 after 1 week irradiation, p=0,001 after 2 weeks irradiation and p=0,015 after 3 weeks irradiation). But the low level laser didn't make difference of alkaline phosphatase between test and control groups (p=0,870 after 1 week irradiation, p=0,434 after 2 weeks irradiation and p=0,328 after 3 weeks irradiation). This experimental study showed that low level laser can enhanced the quality of fracture healing by stimulating the proliferation and differentiation of osteoblas at the fracture site.

Key word: low level laser;; osteoblas; callus; fracture healing

DAFTAR ISI

	Halaman
ingkasan	i
aftar isi	vi
aftar gambar	ix
aftar tabel	xi
aftar lampiran	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	4
1.3 Tujuan penelitian	5
1.4 Manfaat penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Struktur tulang	6
2.2 Sel tulang	8
2.3 Metabolisme tulang	16
2.4 <i>Bone turnover</i>	17
2.5 Penyembuhan fraktur (<i>fracture healing</i>)	17
2.6 Faktor yang mempengaruhi penyembuhan fraktur	23
2.7 Sinar laser	25
2.8 Reaksi jaringan terhadap sinar laser	30
2.9 Pengaruh klinis laser energi rendah	36

AB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konseptual	44
3.2 Hipotesa penelitian	47

AB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan penelitian	48
4.2 Populasi sampel dan besar sampel	50
4.3 Variabel penelitian	51
4.4 Defenisi operasional	51
4.5 Bahan dan instrumen penelitian	53
4.6 Lokasi dan waktu penelitian	54
4.7 Analisa data	54

B 5. ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian	55
5.2 Analisis data dan hasil penelitian	57
5.3 Hasil uji normalitas	61
5.4 Hasil uji homogenitas	62
5.5 Hasil uji beda variabel tebal kalus	62

B 6 PEMBAHASAN

6.1 Metodologi penelitian	76
6.2 Pembahasan hasil penelitian	80

AB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan 88

7.2 Saran 88

AFTAR PUSTAKA 89

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Diferensiasi sel mesenkim	9
Gambar 2.2 Diferensiasi osteoklas progenitor	12
Gambar 2.3 Proses penyerapan tulang oleh osteoklas	14
Gambar 2.4 Tahapan penyembuhan fraktur	22
Gambar 2.5 Aktivitas penyerapan tulang oleh osteoklas	23
Gambar 2.6 Proses terbentuknya energi <i>photon</i>	27
Gambar 2.7 Proses pembentukan <i>adenosine triphosphate</i> (ATP)	31
Gambar 2.8 Reaksi primer	34
Gambar 2.9 Reaksi sekunder	36
Gambar 2.10 Mekanisme sinar laser	43
Gambar 3.1 Skema kerangka penelitian	46
Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian	49
Gambar 5.1 Grafik rerata berat badan tikus percobaan	57
Gambar 5.2 Grafik rerata jumlah osteoblas (plp)	59
Gambar 5.3 Grafik rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β	59
Gambar 5.4 Grafik kadar alkali fosfatase	60
Gambar 5.5 Grafik rerata tebal kalus	60
Gambar 5.6 Grafik pertumbuhan tebal kalus pada kontrol	64
Gambar 5.7 Grafik pertumbuhan tebal kalus pada kontrol	65
Gambar 5.8 Grafik rerata osteoblas	67
Gambar 5.9 Grafik rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β	68

ambar 5.10 Grafik rerata alkali fosfatase	68
ambar 5.11 Grafik rerata penambahan tebal kalus	69
ambar 5.12 Hubungan lama penyinaran dengan rerata osteoblas	72
ambar 5.13 Hubungan lama penyinaran dengan rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β	73
ambar 5.14 Hubungan lama penyinaran dengan alkali fosfatase	74
ambar 5.15 Hubungan lama penyinaran dengan tebal kalus	75

DAFTAR TABEL

	Halaman
bel 2.1 Faktor yang mempengaruhi penyembuhan fraktur	25
bel 2.2 Jenis dan aplikasi klinis sinar laser	28
bel 5.1 Data statistik umur dan berat badan	56
bel 5.2 Statistik deskriptif jumlah osteoblas (plp)	58
bel 5.3 Hasil uji normalitas	61
bel 5.4 Hasil uji homogenitas berat badan	62
bel 5.5 Hasil penghitungan uji beda	63
bel 5.6 Hasil analisa regresi	63
bel 5.7 Hasil penghitungan uji multivariate antar waktu dan kelompok	65
bel 5.8 Hasil penghitungan uji multivariate dibandingkan dengan waktu dan kelompok	66
bel 5.9 Hasil uji univariat	69
bel 5.10 Hasil uji independent sample t-test	70
bel 5.11 Hasil analisis regresi linier	71

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Data pengukuran osteoblas	93
Lampiran 2 Jumlah osteoblas	95
Lampiran 3 Data hasil pengukuran kadar alkali fosfatase	97
Lampiran 4 Data hasil pengukuran tebal kalus	98
Lampiran 5 Statistik deskriptif	100
Lampiran 6 Uji normalitas data dengan NPar Test	101
Lampiran 7 Uji beda dengan Independent Sample T-test	103
Lampiran 8 Uji regresi linier	104
Lampiran 9 Uji multivariat	107
Lampiran 10 Statistik deskriptif respon variabel terhadap laser	122
Lampiran 11 Uji beda terhadap respon variabel kelompok laser	120
Lampiran 12 Uji regresi linier	129
Lampiran 13 Prosedur pengecatan TGF- β secara imunohistokimia	135
Lampiran foto	139

BAB 1

PENDAHULUAN

1 Latar Belakang

Penggunaan laser energi rendah (*low level laser*) untuk mempercepat penyembuhan luka pada jaringan lunak sering dilakukan oleh para praktisi klinis terutama yang bergerak dalam bidang rehabilitasi medik, kosmetika, dermatologi dan kedokteran. Hal ini didasari oleh karena energi *photon* yang dihasilkan laser energi rendah diketahui mempunyai efek biostimulasi pada jaringan dengan cara merangsang proliferasi dan diferensiasi sel mesenkim sehingga penyembuhan luka dan pembentukan jaringan lunak baru lebih cepat tercapai (Jefrey R.Basford, 1993). Di bidang orthopaedi, efek biostimulasi yang ditimbulkan oleh laser energi rendah untuk merangsang dan mempercepat penyembuhan fraktur tulang masih perlu penelitian lebih lanjut. Penelitian terhadap proses penyembuhan fraktur tulang dengan menggunakan binatang coba yang menerima laser energi rendah memberikan hasil yang berbeda antara satu peneliti dengan peneliti lain. Trelles M.A, et al. tahun 1987, T.Yakoobi, et al. tahun 1996 dan Garavello, et al. tahun 2003 melaporkan laser energi rendah dapat mempercepat penyembuhan fraktur tulang tibia tikus. Di pihak lain, Hall G., et al. tahun 1994, David R., et al tahun 1996, Mariko Usuba, et al tahun 1998 dan Schlager A., et al. tahun 2000 dalam penelitiannya melaporkan bahwa laser energi rendah tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus. Sampai saat ini pengaruh laser energi rendah terhadap proses penyembuhan fraktur tulang tersebut masih terus diperdebatkan.



Pemaparan laser energi rendah dapat mengakibatkan perubahan suhu dan kimiawi pada jaringan yang terpapar. Perubahan suhu yang besar bisa menimbulkan kerusakan jaringan karena berbagai senyawa yang terdapat dalam sel terutama protein akan mulai mengalami denaturasi pada suhu di atas 40°C , koagulasi pada suhu di atas 68°C , karbonisasi pada suhu di atas 100°C dan karbonisasi pada suhu di atas 500°C (T.Oshiro, 1988). Selain itu, kerusakan jaringan juga dapat terjadi akibat pembentukan senyawa radikal bebas seperti *reactive oxygen species* (ROS) dan *nitric oxide* (NO) yang dihasilkan oleh pemaparan laser energi rendah. Senyawa radikal bebas pada keadaan fisiologis tidak membahayakan karena sel punya mekanisme untuk menetralkannya dengan cara membentuk anti oksidan (*scavenger*), tetapi bila produksinya berlebihan, akibatnya akibat paparan laser energi rendah, maka mekanisme homeostatis tersebut tidak dapat bekerja sehingga terjadi kerusakan jaringan. Oleh karena itu penggunaan laser energi rendah untuk tujuan terapi pada jaringan hidup baik itu hewan maupun manusia harus dilandasi teori yang sah agar efek samping yang ditimbulkan tidak merugikan.

Jika suatu tulang mengalami fraktur, akan terjadi serangkaian proses mulai dari inflamasi radang, penyembuhan fraktur sampai kembali bentuk tulang ke keadaan sebelum fraktur (*remodeling*) (Rockwood, 1991). Waktu yang dibutuhkan oleh tulang untuk bisa kembali ke keadaan semula bervariasi antara 3 bulan sampai 1 tahun, bahkan beberapa jenis fraktur membutuhkan waktu sampai 2 tahun. Bila masa penyembuhan tulang ini bisa dipersingkat, penderita tidak terlalu lama istirahat sehingga bisa lebih cepat melakukan aktivitas sehari-hari. Oleh karena itu, para peneliti telah mencoba berbagai cara yang bisa mempercepat penyembuhan fraktur tulang dengan cara mempelajari dan menganalisis setiap proses yang terjadi pada penyembuhan fraktur tulang. Dari beberapa

Penelitian yang telah dilakukan ada berbagai faktor yang dapat merangsang dan mempercepat penyembuhan fraktur tulang, antara lain adalah gelombang elektromagnetik (Basset, C.A.L. 1962). Teori ini pertama kali dicoba oleh Trelles M.A pada tahun 1987 dengan cara melakukan penyinaran laser energi rendah pada tulang tibia tikus yang sengaja dipatahkan. Peneliti menemukan terjadi peningkatan aktivitas osteosit pada tulang tikus yang diberi sinar laser energi rendah sehingga proses penulangan lebih cepat tercapai pada kelompok yang disinari laser energi rendah dibanding kelompok kontrol. Pada tahun 1994, Saito dari Chiba-Jepang menemukan pengaruh yang positif terhadap percepatan regenerasi celah palatum durum tikus yang disinari dengan laser energi rendah. Penelitian lebih lanjut dilakukan oleh A. Barber, et al. tahun 2003 di Tel Aviv Sourasky Medical Center Israel terhadap tulang tikus yang sengaja dipatahkan kemudian diberi sinar laser energi rendah untuk merangsang pembentukan kalus. Dari hasil penelitian ini didapatkan ada perbedaan waktu yang signifikan antara kelompok yang diberi sinar laser dengan kelompok yang tidak diberi sinar laser.

Proses penyembuhan fraktur melibatkan peran sel mesenkim yang merupakan asal dari osteoblas yang berfungsi untuk membentuk jaringan tulang baru. Hal ini dapat terlaksana bila sel mesenkim dapat beraktivitas untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi osteoblas yang aktif. Peranan osteoblas pada penyembuhan patah tulang sangat besar terutama dalam fase pembentukan kalus. Pada fase ini osteoblas membutuhkan energi dalam bentuk ATP cukup banyak untuk mensintesis protein yang merupakan komponen utama dalam penyusunan matriks dan kolagen. Bila ATP yang tersedia cukup banyak akan terjadi peningkatan aktivitas osteoblas sehingga proses penyembuhan fraktur lebih cepat tercapai. Osteoblas aktif ditandai oleh meningkatnya kadar TGF- β

n alkali fosfatase pada sel tersebut. Hal ini dapat dilakukan dengan cara memberi paparan laser energi rendah pada daerah fraktur sehingga aktivitas osteoblas untuk membentuk kalus menjadi meningkat. Dengan demikian diharapkan kualitas kalus yang terbentuk akibat paparan laser energi rendah juga lebih baik karena ATP untuk sintesis protein lebih banyak. Pembentukan kalus menurut Buckwalter dimulai sejak hari ke-9 paska fraktur yang ditandai oleh peningkatan aktivitas proliferasi osteoblas dan setelah minggu ke-2 paska fraktur proliferasi osteoblas menurun perlahan sampai akhirnya mengalami hipertropi (Buckwalter, 2000). Kalus yang terbentuk pertama kali adalah kalus yang masih lembut (*soft callus*). *Soft callus* ini secara klinis belum bisa mempertahankan kedua fragmen tulang yang patah menjadi stabil. Fragmen tulang yang patah secara klinis dikatakan stabil bila kedua fragmen tulang telah tersambung oleh kalus keras (*hard callus*). Hal ini terjadi kurang lebih mulai minggu ke-8 sampai minggu ke-12 paska fraktur. Selanjutnya kalus keras ini akan digantikan oleh jaringan tulang yang sebenarnya melalui proses *remodeling*.

2 Rumusan Masalah

1. Apakah laser energi rendah dapat mempercepat pembentukan kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus ?
2. Apakah laser energi rendah dapat meningkatkan kuantitas kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus ?

3 Tujuan Penelitian

3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh sinar laser energi rendah terhadap pembentukan kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus.

3.2 Tujuan Khusus

- a. Membuktikan pengaruh sinar laser energi rendah terhadap kecepatan pembentukan kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus .
- b. Membuktikan pengaruh sinar laser energi rendah terhadap peningkatan jumlah osteoblas pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus.
- c. Membuktikan pengaruh sinar laser energi rendah terhadap peningkatan jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus.
- d. Membuktikan pengaruh sinar laser energi rendah terhadap ketebalan kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus .
- e. Membuktikan pengaruh sinar laser energi rendah terhadap perubahan kadar enzim alkali fosfatase pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus.

4 Manfaat Penelitian

Bila terbukti laser energi rendah dapat mempercepat dan meningkatkan kuantitas kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus, maka penyinaran fraktur tulang dengan laser energi rendah dapat dijadikan sebagai salah satu pilihan untuk digunakan dalam penatalaksanaan fraktur tulang.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

1 Struktur Tulang

Tulang merupakan komponen utama yang menyusun sistem muskuloskeletal pada manusia. Sekitar 15% dari berat total tubuh manusia normal terdiri dari tulang, di mana 10% disusun oleh matriks organik dan 65% merupakan komponen non organik (Vincent Vigorita, 1999). Matriks organik tulang disusun oleh protein dan sel-sel tulang (osteoblas, osteoklas dan osteosit), sedangkan komponen non organik yang menyusun tulang sebagian besar merupakan kalsium hidroksi apatit $\{Ca_{10}(PO_4)(OH)_2\}$ yang membuat struktur tulang menjadi keras dan kuat. Kalsium hidroksi apatit ini selain berperan untuk menguatkan dan mengeraskan jaringan tulang juga dapat menyimpan 99% cadangan kalsium tubuh, 85% fosfat dan 65% magnesium (Andrew Rosenberg, 1999). Selain bahan di atas, tulang juga mengandung air sebesar 20% dari berat totalnya (Riksen, et al. 1994).

Kuantitas dan kualitas tulang mengalami perubahan sesuai dengan perjalanan waktu dalam kehidupan seseorang. Pertumbuhan dan perkembangan tulang dimulai sejak lahir dalam kandungan dan mencapai puncak sekitar umur 20 tahun. Pada umur sekitar 30 tahun pertumbuhan tulang mulai berhenti dan akan terus menurun kualitasnya sesuai dengan pertambahan waktu. Wanita yang mengalami *menopause* dalam fase pertumbuhannya dimana terjadi defisiensi hormon estrogen yang cukup bermakna penurunan kualitas tulang ini sangat jelas terlihat. Dikatakan bahwa wanita yang berusia atas 70 tahun akan kehilangan hampir separuh massa tulangnya. Hal ini berbeda

ngan laki-laki pada usia yang sama dimana kehilangan kualitas tulang hanya berkisar 10-30% dari massa tulang (Melton, 1995). Kualitas tulang manusia ditentukan oleh berbagai faktor antara lain : faktor genetik, jenis kelamin, konsumsi diet kalsium sehari-hari dan juga latihan fisik (Nieves, 1995).

Tulang yang merupakan bagian dari sistem muskuloskeletal mempunyai peran yang sangat penting bagi manusia. Menurut Robert B. Salter (1999), fungsi tulang pada manusia ada 5, yaitu: (1) sebagai penyangga tubuh; (2) sebagai tempat penyimpanan mineral kalsium, fosfat, natrium dan magnesium; (3) tempat diproduksi sel-sel darah (eritrosit, leukosit, trombosit); (4) melindungi organ tubuh; dan (5) tumpuan gaya mekanis yang diterima oleh tubuh.

Secara makroskopis, bentuk tulang yang berjumlah 206 buah itu dibagi atas 2 jenis, yaitu : tulang kortikal atau tulang kompakta (*dense bone*) dan tulang trabekular atau tulang spongiosa (*cancellous bone*). Jumlah dan komposisi matriks ekstra seluler pada kedua jenis tulang tersebut sama, tetapi susunan osteosit, *canaliculi* dan lamelanya berbeda. Perbedaan yang lain juga terdapat dalam hal kemampuan menahan beban mekanis yang diterima oleh tubuh. Tulang kortikal pada umumnya lebih tahan terhadap beban mekanis yang arahnya searah dengan sumbu tulang (*compression force*) dibandingkan dengan tulang spongiosa, tetapi kurang tahan terhadap beban yang tegak lurus dengan sumbu tulang (*tension force*), demikian juga sebaliknya (Charles Rockwood, 1991). Tulang kortikal tersusun oleh beberapa unit fungsional yang disebut *osteon* (*Haversian system*). Setiap *osteon* mengandung osteosit yang terdapat dalam suatu *lacuna* dan disusun secara melingkar pada *lamella concentric* membentuk suatu terowongan yang disebut *central canal* (*Haversian's canal*). Terowongan ini

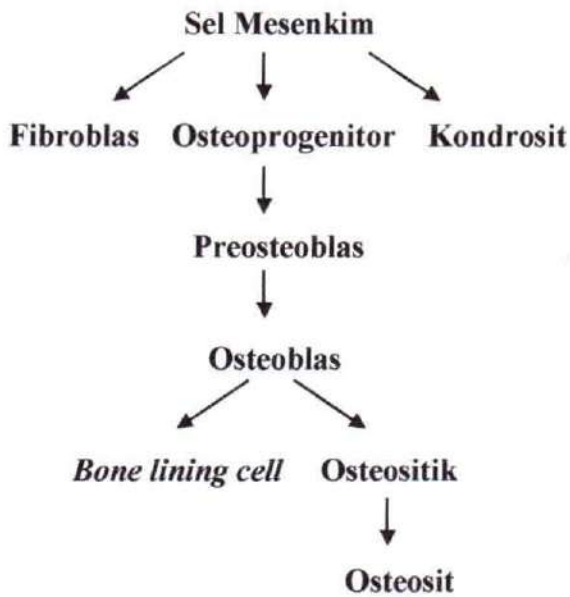
asanya mengandung banyak pembuluh darah kecil yang memberi nutrisi kepada osteosit yang terdapat di bagian luar jaringan tulang kortikal, sedangkan di bagian dalamnya dinutrisi oleh pembuluh darah yang mengalir melalui *perforating canal* (*canals of Volkman*). Hal ini berbeda dengan tulang spongiosa, dimana sel osteosit mendapatkan nutrisi melalui proses difusi yang terjadi sepanjang *canaliculi* (Martini, 2001).

2 Sel Tulang

Sel yang membentuk tulang berasal dari sel mesenkim dan sel stem hematopoetik. Melalui proses proliferasi dan diferensiasi, dari kedua sumber sel tulang dihasilkan berbagai jenis sel yang berfungsi untuk membentuk dan menyerap jaringan tulang secara terus menerus. Selain itu sel tulang yang dihasilkan dari proses diferensiasi tersebut mempunyai peran untuk menjaga keseimbangan mineral dan reparasi tulang (Sespati, 2002). Proliferasi dan diferensiasi sel mesenkim dan sel stem hematopoetik ini menjadi berbagai jenis sel tulang terjadi secara kontinu dan dirangsang oleh berbagai sitokin dan faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang disekresi oleh platelet, makrofag dan sel tulang itu sendiri.

Ada 4 macam sel yang terlibat secara langsung dalam proses penyembuhan (*healing*) dan *remodeling* tulang, yaitu : osteoblas, osteoklas, sel permukaan (*bone lining cell*), dan osteosit. Osteoblas mempunyai peran dalam pembentukan matriks tulang. Osteosit merupakan osteoblas *mature* yang terperangkap dalam matriks tulang dan bertanggungjawab terhadap pemeliharaan dan keseimbangan matriks tulang. *Bone lining cell* merupakan sel tulang inaktif yang melapisi permukaan tulang, sedangkan osteoklas

ng berukuran besar dan berinti banyak berfungsi untuk menyerap tulang (Eriksen, et al. 1999).



Gambar 2.1 Diferensiasi sel mesenkim menjadi fibroblas, kondrosit, osteoblas dan osteosit (Joseph A. Buckwalter, 2000).

2.1 Osteoblas

Osteoblas berasal dari sel mesenkim yang berfungsi untuk membentuk matriks tulang, memproduksi faktor pertumbuhan (*growth factor*) yang diperlukan untuk proliferasi dan diferensiasi sel, seperti: *transforming growth factor-beta* (TGF- β), *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), *fibroblast growth factor* (FGF), *platelet derived growth factor* (PDGF) dan *bone morphogenic proteins* (BMPs), membentuk kolagen terutama kolagen tipe-I dan ikut serta dalam proses mineralisasi tulang (Vincent & Vigorita, 1999). Secara mikroskopis, osteoblas mempunyai variasi bentuk mulai dari bentuk bulat, elips atau polyhedral dengan inti yang eksentris dan berukuran 20-30 mikrometer. Bila sedang aktif, sitoplasmanya mengandung berbagai organel intraseluler seperti: retikulum endoplasmik kasar, badan golgi dan mitokondria. Seperti yang telah

diketahui ketiga organel tersebut berkaitan erat dengan aktivitas sintesis protein dalam sel. Secara histokimia, aktivitas osteoblas yang meningkat ditandai oleh peningkatan kadar alkali fosfatase dan osteokalsin dalam darah yang dapat diperiksa secara laboratoris (Wespati, 2002).

Pada penelitian eksperimental secara *in vitro*, didapatkan 3 fase perkembangan osteoblas, yaitu : (1) fase proliferasi, ditandai oleh sekresi hormon pertumbuhan seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β), *fibronectin* dan kolagen tipe-I; (2) fase maturasi, ditandai oleh sekresi protein osteopontin dan alkali fosfatase; dan (3) fase mineralisasi yang ditandai oleh sekresi osteoklasin, sialoprotein, dan pembentukan hidroksi apatit (Vincent J. Vigorita, 1999).

Beberapa jenis hormon dan sitokin diketahui mempunyai hubungan yang erat dengan proliferasi dan aktivitas osteoblas dalam membentuk matriks tulang. Diduga hal ini dapat terjadi karena pada permukaan osteoblas terdapat reseptor spesifik untuk hormon estrogen, hormon paratiroid (PTH) dan vitamin D. Seperti yang telah diketahui transport asam amino, transport ion dan produksi c-AMP oleh osteoblas dipengaruhi oleh kadar hormon paratiroid (PTH) dalam darah. PTH berpengaruh langsung pada osteoblas dalam pengaturan kadar protein kolagen tipe-I, sekresi alkalin fosfatase, osteokalsin dan osteopontin. Hormon PTH bersama dengan 1,25 dihidroksi kolekalsiferol menentukan kadar kalsium dalam darah dengan cara mengatur penyerapan kalsium pada tulang dan usus. Jenis sitokin seperti interleukin-1 (IL-1), *bone morphogenetic protein* (BMP), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), *tumor necrosis factor* (TNF), *platelet derived growth factor* (PDGF) dan prostaglandin E-2 (PGE-2) ikut berperan dalam meningkatkan aktivitas osteoblas (Joseph A. Buckwalter, 2000).

2.2 Osteosit

Osteoblas yang telah berhenti berkalsifikasi dan terpendam dalam matriks tulang disebut osteosit. Dari semua jenis sel tulang, osteosit merupakan komponen terbanyak dengan jumlahnya hampir 90% dari seluruh jumlah sel yang menyusun tulang. Pada manusia normal, jumlah osteosit diperkirakan 10 kali lebih banyak dari jumlah osteoblas (Vincent J. Vigorita). Bila dilihat dibawah mikroskop elektron, osteosit mempunyai inti yang menonjol dan sitoplasma yang memanjang sampai menembus matriks tulang yang berfungsi untuk menghubungkan antara sesama osteosit maupun dengan osteoblas. Pada matriks tulang jonjotan sitoplasma ini membentuk suatu saluran yang disebut *canaliculi*. Hubungan ini memungkinkan rangkaian osteosit dapat mengatur pembentukan tulang dengan cara transfer ion antara matriks tulang dengan cairan ekstrasvaskuler.

Osteosit yang terletak dalam lakuna berfungsi sebagai sensor stress mekanik yang diterima oleh tulang dan kemudian meneruskannya ke osteoblas melalui suatu pesan kimia (*chemical message*) dengan cara mensekresi sitokin *insulin-like growth factor-1* (IGF-1). Pesan kimia berupa IGF-1 ini akan merangsang *resting* osteoblas menjadi osteoblas aktif yang menyebabkan terjadinya pembentukan tulang. Selain itu osteosit juga berfungsi mendeteksi adanya kerusakan tulang (*bone damage*), yang kemudian akan dilaporkan ke sel permukaan (*bone lining cell*) melalui pesan kimia, dan pada akhirnya merangsang terbentuknya beberapa sitokin yang berfungsi merangsang proliferasi sel prekursor osteoklas untuk melakukan penyerapan tulang. Proses penyerapan tulang secara normal selalu diikuti oleh aktivitas osteoblas untuk membentuk tulang, sehingga massa tulang dapat dipertahankan (Favus, 1996).

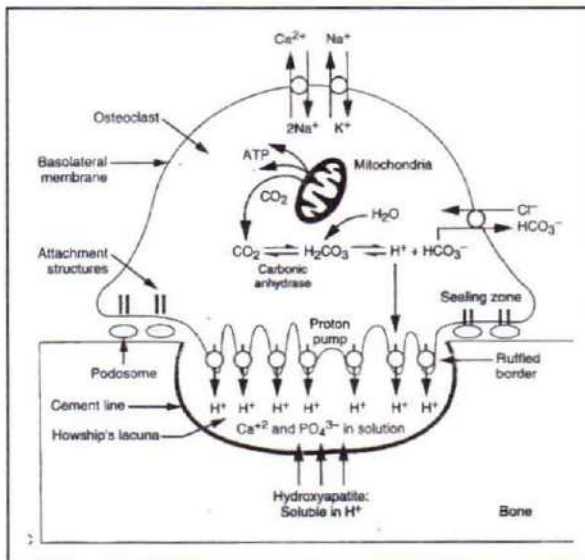
2.3 Osteoklas

Osteoklas merupakan sel tulang yang paling besar ukurannya dengan jumlah inti lebih dari satu (*multinucleated*). Sel ini berasal dari sel *monocytic precursor* sumsum tulang yang disebut : *osteoclast progenitor cell* dan biasanya terletak di atas permukaan tulang dalam suatu lekukan yang disebut *Howship's lacuna* serta bertanggungjawab dalam penyerapan tulang (Martini, 2001). Diferensiasi *osteoclast progenitor* menjadi *osteoclast precursor* dimungkinkan berkat adanya sitokin yang disekresi oleh makrofag yaitu *macrophage colony stimulating factor* (MCSF). *Osteoclast precursor* ini masih merupakan sel mononuklear tetapi dengan bantuan 1,25 D dan beberapa jenis sitokin lain lain mengadakan fusi membentuk sel multinuklear osteoklas, yang selanjutnya berfungsi resorpsi tulang. Aktivitas resorpsi tulang dapat terjadi karena dalam sitoplasmanya banyak ditemukan enzim asam fosfatase yang digunakan untuk menghancurkan kolagen dan matriks tulang. Selain itu dalam sitoplasma osteoklas yang sedang aktif banyak mengandung mitokondria, ribosom dan lisosom dengan enzim asam hidrolasenya.



ambar 2.2 Diferensiasi osteoklas progenitor (monosit) menjadi osteoklas sampai mengalami apoptosis. Proses diferensiasi ini dimediasi oleh hormonal dan sitokin seperti *macrophage colony stimulating factor* (MCSF), *interleukin-6* (IL-6), Vit. D₃ (1.25 D₃), *parathyroid hormone* (PTH), *prostaglandin E₂* (PGE₂), dan *transforming growth factor α* (TGF-β) (Vigorita, 1999).

Proses penyerapan tulang dimulai dengan melekatnya osteoklas pada permukaan tulang melalui suatu reseptor protein yang disebut *integrin* atau *vitronectin receptor* ($\alpha_3\beta_3$). Setelah osteoklas melekat pada permukaan tulang, *integrin* akan menginduksi osteoklas untuk mensekresi *enzim kinase* yang berperan sebagai sinyal intraseluler. Osteoklas akan memanjangkan plasma membrannya menutupi permukaan tulang yang disebut *ruffled border*. Kemudian ion hydrogen (H^+) yang ada di dalam sitoplasma osteoklas akan dipompakan ke daerah yang dilingkupi oleh *ruffled border*, sehingga suasana di dalam *ruffled border* menjadi asam. Suasana asam ini akan memudahkan osteoklas untuk menghancurkan kalsium hidroksiapatit. Selain ion H^+ , osteoklas juga akan mensekresikan ke daerah *ruffled border* berbagai enzim lisosomal seperti: *cathepsin* yang dapat menghancurkan kolagen, *metil metalo proteinase* (MMPs) dan *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP). Enzim lisosomal ini akan terus disekresikan ke dalam *ruffled border* selama osteoklas belum berpindah tempat. Setelah menyerap tulang, bagian besar osteoklas akan mati secara terprogram (*apoptosis*) (Vincent J. Vigorita, 1999). Dikatakan bahwa osteoklas mempunyai masa hidup yang relatif pendek yakni 10-hari (Buckwalter, 2000).



Gambar 2.3 Proses penyerapan tulang oleh osteoklas. Ion hydrogen (H^+) akan dipompakan ke ruangan yang dibentuk *ruffled border* dengan permukaan tulang yang mengakibatkan suasana asam. Suasana asam ini membuat kalsium hidroksi apatit menjadi lebih mudah dihancurkan oleh osteoklas. Pada saat yang bersamaan osteoklas juga mensekresikan enzim lisosomal seperti cathepsin, MMPS dan TRAP yang berfungsi untuk mendegradasi kolagen (Vigorita, 1999).

Aktivitas penyerapan tulang oleh osteoklas dipengaruhi oleh kadar hormon paratiroid (PTH) dalam plasma darah. PTH meningkatkan resorpsi tulang dengan rantaranan sinyal yang diberikan oleh osteoblas kepada osteoklas, sebab osteoklas sendiri tidak mempunyai reseptor spesifik terhadap PTH. Sinyal tersebut berupa sitokin interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) dan tumor necrosis factor (TNF) yang dapat merangsang diferensiasi, proliferasi dan aktivasi osteoklas. Selain IL-1, IL-6 dan TNF, diferensiasi *osteoclast precursor cell* menjadi osteoklas juga dapat melalui suatu sistem yang disebut *receptor activator of nuclear factor- κ B ligand* (RANK-L). Pada permukaan membran osteoklas terdapat reseptor menyerupai TNF yang disebut *receptor activator of nuclear factor kappa* (RANK). Osteoblas akan mensekresi protein yang berfungsi sebagai *ligan* terhadap RANK sehingga reseptor RANK yang terdapat pada permukaan

osteoclast precursor cell menjadi teraktivasi. Sistem RANK-L ini menyebabkan diferensiasi *osteoclast precursor cell* menjadi osteoklas. Di sisi lain, osteoblas di bawah pengaruh hormon estrogen, TGF- β dan *bone morphogenic protein* (BMP) juga menghasilkan suatu protein yang disebut *osteoprotegerin* (OPG) yang dapat menginaktivkan sistem RANK-L sehingga osteoklas aktif tidak terbentuk (Joseph Dipro, 2001).

Pada keadaan dimana kadar hormon estrogen menurun dalam jangka waktu lama misalnya menopause, aktivitas osteoklas menjadi lebih dominan dibanding aktivitas osteoblas. Keadaan ini akan membuat densitas tulang menjadi berkurang dan rapuh yang disebut dengan osteoporosis. Hal ini terjadi akibat OPG yang disekresi oleh osteoblas tidak mampu lagi mengimbangi sistem RANK-L sehingga aktivitas penyerapan tulang oleh osteoklas menjadi tidak terkendali. Osteoklas yang aktif juga semakin banyak jumlahnya karena osteoklas yang mestinya memasuki proses apoptosis menjadi berkurang akibat jumlah *transforming growth factor*- β (TGF- β) yang dihasilkan oleh osteoblas sedikit.

3 Metabolisme Tulang

Keseimbangan mineral pada tulang dikendalikan oleh kerjasama antara hormon paratiroid (PTH), kalsitonin (CT) dan 1,25-dihidroksi vitamin D. Ketiga jenis hormon tersebut berperan dalam hal absorpsi, resorpsi dan deposisi ion kalsium dari usus serta sekresi dan reabsorpsi ion kalsium dan fosfat oleh ginjal (Joseph A. Buckwalter, 2000). Hormon prolaktin, insulin, glukokortikoid dan beberapa jenis sitokin yang disekresi oleh makrofag, platelet dan fibroblas juga ikut berpengaruh dalam mengatur metabolisme tulang secara keseluruhan (Favus, 1993).

Hormon paratiroid yang disekresi oleh *chief cell* glandula paratiroid berfungsi mengatur keseimbangan kadar kalsium dalam plasma. Bila kadar kalsium plasma rendah sekresi hormon ini akan ditingkatkan dan bila kalsium plasma tinggi sekresinya akan diturunkan. Selain fungsi di atas, hormon paratiroid juga mempunyai peran untuk : merangsang diferensiasi osteoklas progenitor (*osteoclastic progenitor cell*) menjadi osteoklas, meningkatkan proses penyerapan tulang, meningkatkan sintesis 1,25-dihidroksi vitamin D melalui peningkatan absorpsi kalsium pada usus dan reabsorpsi pada ginjal serta menurunkan reabsorpsi fosfat oleh tubulus renalis.

Vitamin D yang dibentuk dari provitamin D3 (*cholecalciferol*) melalui reaksi hidroksilasi pada tubulus proksimalis ginjal mempunyai peran menjaga ketersediaan kalsium dan fosfat yang diperlukan dalam pembentukan tulang. Proses hidroksilasi pada ginjal ini ditingkatkan oleh kehadiran hormon paratiroid. Oleh sebab itu apabila terjadi defisiensi vitamin D pada tubuh seseorang misalnya karena kekurangan hormon paratiroid akan mengakibatkan terjadinya penurunan kualitas mineral tulang (*osteomalacia*) dan juga penurunan laju pembentukan tulang.

Bone Turnover

Bentuk dan kualitas tulang terus menerus mengalami siklus pergantian (*turnover*) yang bertujuan untuk menjaga integritas dan keseimbangan kalsium dalam tubuh. Siklus pergantian tersebut dilaksanakan melalui proses pembentukan (*modeling*) dan pembentukkan kembali (*remodeling*). Pembentukan tulang (*bone modeling*) terjadi selama periode pertumbuhan, pada waktu tulang menerima beban mekanis yang lebih dan pada waktu terjadi fraktur, sedangkan pembentukkan kembali tulang (*bone remodeling*) terjadi pada waktu proses pertumbuhan sudah terhenti (Frost, 1990). Menurut penelitian Kanis pada tahun 1995, 10-15% dari seluruh massa tulang akan mengalami proses *remodeling* dan sisanya relatif stabil. Proses *remodeling* merupakan suatu fenomena berpasangan (*coupling phenomenon*) antara penyerapan (*bone absorption*) yang dilakukan oleh osteoklas dan pembentukan (*bone formation*) yang dilakukan oleh osteoblas. Setiap siklus *remodeling* (*bone modeling unit* = BMU) berlangsung selama 3-4 bulan yang terdiri dari aktivitas penyerapan selama 2-3 minggu pertama dan selanjutnya diikuti oleh aktivitas pembentukkan (Boyce, et al. 1989).

5 Penyembuhan Fraktur (*Fracture Healing*)

Fracture healing merupakan suatu proses regenerasi, dimana terjadi proses pergantian tulang yang rusak dengan jaringan tulang baru tanpa pembentukan jaringan parut (sikatriks). Di dalam buku disebutkan, *fracture healing* merupakan proses regenerasi karena tulang yang mengalami kerusakan akan diganti dengan jaringan tulang baru. Hal ini tidak seperti jaringan yang lain, yang apabila mengalami kerusakan sebagian akan diganti dengan sikatriks.

Proses penyembuhan fraktur secara umum dibagi atas 3 fase, yaitu : (1) fase inflamasi (*inflammatory phase*); (2) fase reparasi (*reparative phase*); dan (3) fase perbaikan bentuk (*remodeling phase*) (Rockwood C.A, 1991). Menurut Yeo Li (1995) penyembuhan fraktur dibagi atas 6 fase, yaitu: (1) fase hematoma yang terjadi segera setelah fraktur sampai 12 jam berikutnya; (2) fase inflamasi mulai 24 jam sampai 48 jam pertama; (3) fase granulasi mulai hari ke-2 sampai hari ke-12; (4) fase kalus lunak yang terbentuk mulai minggu ke-1 sampai minggu ke-4; (5) fase kalus keras mulai minggu ke-5 sampai bulan ke-3; dan (6) fase remodeling yang dapat berlangsung selama 1 sampai 2 tahun. Dalam buku lain disebutkan proses penyembuhan fraktur dibedakan atas 6 tahap, yaitu: (1) *initial stage* yang merupakan fase pembentukan haematoma dan reaksi inflamasi; (2) *subsequent stage* yang di dalamnya terdapat proses angiogenesis dan pembentukan kolagen; (3) *stage of cartilage calcification*; (4) *stage of cartilage removal*; (5) *stage of bone formation*; dan (6) *stage of bone remodeling* (Susan M.Day, 2000). Untuk lebih menyederhanakan dan memudahkan kita dalam memahami proses penyembuhan fraktur, kita akan lebih menitik beratkan pada pembagian atas fase inflamasi, fase reparasi dan fase *remodeling*.

5.1 Fase inflamasi (*inflammatory phase*)

Pecahnya pembuluh darah akibat adanya kerusakan jaringan mengakibatkan terjadinya vasokonstriksi pembuluh darah, pembentukan bekuan darah (*clotting hematoma*) dan agregasi trombosit. Bekuan darah yang terbentuk ini mengandung banyak sel inflamasi yang akan mensekresi sitokin *interleukin-1* (IL-1) dan *interleukin-6* (IL-6) sehingga terjadi reaksi inflamasi (Susan M.Day, 2000). Pada saat yang bersamaan

mbosit yang teragregasi akan mengeluarkan berbagai macam mediator sitokin dan *growth factors* {*platelet-derived growth factor* (PDGF) , *insulin-like derived growth factor-1* (IGF-1), *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor-beta* (TGF- β)} untuk merangsang proliferasi dan diferensiasi sel mesenkim menjadi sel fibroblas dan osteoblas (Rockwood C.A, 1991). Sementara itu, neutropil dan makrofag akan bermigrasi ke daerah jejas dan mensekresikan *transforming growth factor-beta* (TGF- β), *heparin-binding epidermal growth factor* (HB-EGF) dan *fibroblast growth factor* (FGF) untuk merangsang terjadinya proses inflamasi. Faktor-faktor pertumbuhan (*growth factors*) yang disekresi ini mengakibatkan tertariknya endotel, fibroblast dan makrofag ke tempat jejas sehingga terbentuk jaringan seperti granulasi yang kaya akan pembuluh darah yang disebut *provisional matrix*. Dengan terbentuknya *provisional matrix* ini maka kebutuhan nutrisi dan oksigen pada daerah jejas akan tercukupi sehingga reaksi inflamasi dapat teratasi.

5.2 Fase reparasi (*reparative phase*)

Fase ini dimulai dengan terbentuknya hematoma yang banyak mengandung sel inflamasi. Sel inflamasi yang terdapat dalam hematoma akan mensekresikan sitokin dan faktor pertumbuhan (*growth factor*) untuk merangsang migrasi sel mesenkim ke tempat fraktur. Selain merangsang migrasi, faktor pertumbuhan yang disekresikan ini juga menyebabkan sel mesenkim mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi fibroblas dan osteoblas. Pada permulaan fase reparasi keadaan disekitar fraktur bersifat asam, tetapi akan segera berubah menjadi netral atau sedikit basa. Bila suasana basa telah tercapai, fibroblas dan osteoblas akan aktif bekerja untuk mensintesa jaringan fibrous, kartilago

n tulang muda (*woven bone*) yang disebut kalus (*fracture callus*) (Rockwood C.A, 1991). Kalus yang terbentuk pada daerah periosteum tulang disebut kalus keras (*hard callus*) dan kalus yang terdapat pada bagian medulla tulang disebut kalus lunak (*soft callus*).

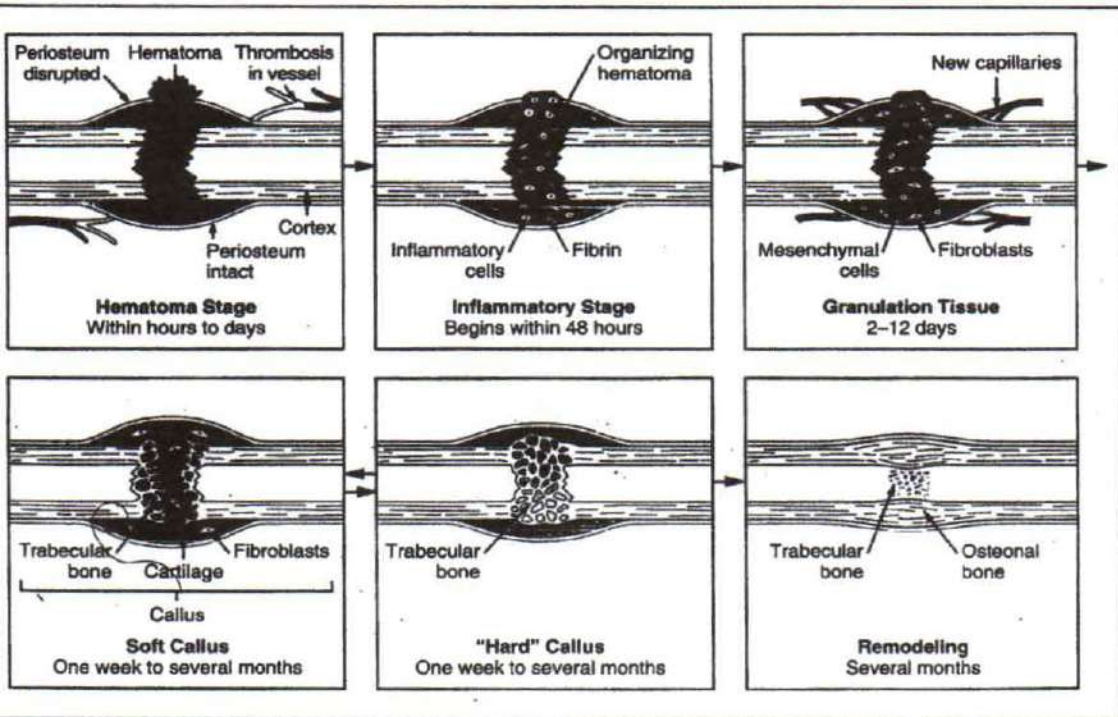
Selanjutnya kalus akan dimineralisasi oleh osteoblas dan kondrosit melalui pembentukan matriks yang banyak mengandung serat kolagen tipe-I. Pada serat kolagen tipe-I terdapat daerah putus-putus yang disebut *hole zone*, yaitu tempat dimana terjadinya deposisi kristal kalsium hidroksiapatit. Proses mineralisasi ini membutuhkan kerjasama osteoblas dan kondrosit. Pada keadaan dimana konsentrasi glikosaminoglikan tinggi, osteoblas membutuhkan bantuan kondrosit untuk mensekresikan enzim proteoglikanase sehingga mencegah pembentukan glikosaminoglikan yang berlebihan. Juga pada awal proses mineralisasi osteoblas dan kondrosit bersama-sama membentuk vesikel (*matrix vesicles*) pada membran sel yang banyak mengandung kalsium fosfat untuk disekresikan dalam matriks. Di dalam vesikel ini juga banyak terdapat enzim protease dan alkaline fosfatase untuk mendegradasi kelebihan proteoglikan pada matriks.

5.3. Fase perbaikan bentuk (*remodeling phase*)

Proses *remodeling* adalah suatu proses berkesinambungan yang terdiri dari aktivitas pembentukan (*bone formation*) dan penyerapan tulang (*bone resorption*). Proses ini dimulai dengan aktivitas osteoklas yang menyerap tulang dan diikuti oleh aktivitas osteoblas untuk mengisi bagian yang diserap. Dengan demikian tulang akan diuraikan dan dibentuk kembali selama hidup, sehingga keutuhan tulang dapat dipertahankan. Proses ini berjalan secara berpasangan dan dalam keseimbangan antara penyerapan dan

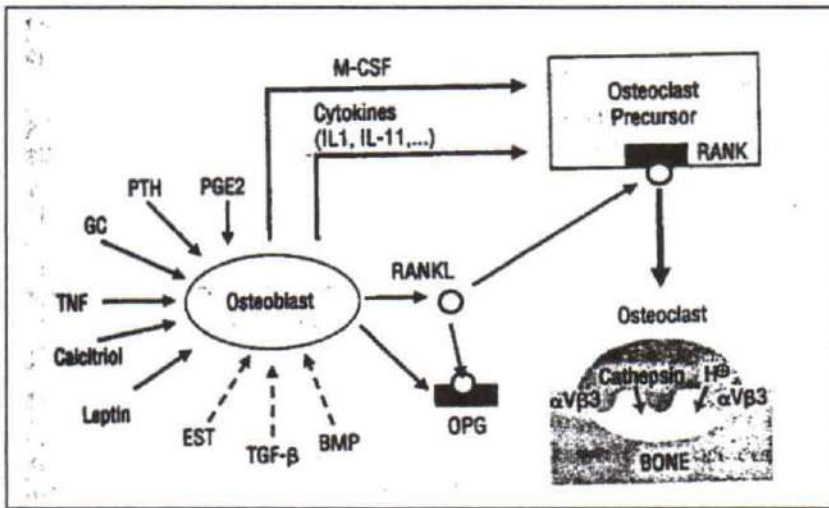
pembentukan tulang sehingga sering disebut fenomena berpasangan (*coupling phenomenon*).

Fase *remodeling* ditandai oleh aktivitas penyerapan dan penggantian tulang muda (*trabecular bone*) dengan tulang lamellar (*lamellar bone*) yang dilakukan oleh kerjasama osteoblas dan osteoklas. Penelitian pada tulang dengan menggunakan radioisotop menunjukkan bahwa aktivitas penyerapan dan pembentukan tulang pada fraktur bisa berlangsung 6-9 tahun (Rockwood C.A, 1991). Aktivitas penyerapan tulang oleh osteoklas dan pembentukan tulang oleh osteoblas dipengaruhi suasana elektronegatif di daerah fraktur. Jika tulang menerima beban mekanis akan terjadi suasana elektropositif pada permukaan yang cembung (*convex*) dan elektronegatif pada permukaan yang cekung (*concave*). Pada permukaan tulang yang cembung akan terjadi peningkatan aktivitas penyerapan oleh osteoklas, sedangkan pada permukaan yang cekung terjadi peningkatan aktivitas pembentukan tulang oleh osteoblas. Hal ini menerangkan postulat Wolff (*Wolff's Law*) yang menyatakan bahwa permukaan tulang yang menerima beban mekanis lebih besar akan mengalami penebalan, sedangkan permukaan tulang yang sedikit menerima beban mekanis akan mengalami penyerapan.



Ambar 2.4 Tahapan penyembuhan fraktur dan perkiraan waktu yang dibutuhkan mulai fase hematoma sampai fase remodeling (Yeo Li, 1994).

Aktivitas penyerapan dan pembentukan tulang seperti tersebut di atas merupakan aktivitas seluler, yang dipengaruhi oleh faktor-faktor sistemik berupa sistem hormonal seperti : estrogen, paratiroid, kalsitonin dan kortikosteroid. Selain pengaruh faktor hormonal, metabolisme tulang juga dipengaruhi oleh homeostatis Ca (kalsium) dalam serum dan adanya faktor lokal seperti : mediator lokal dan faktor mekanik.



Gambar 2.5 Aktivitas penyerapan tulang yang dilakukan sel osteoklas dikontrol osteoblas melalui jalur OPG/RANK/RANK-L. Diferensiasi osteoklas precursor menjadi osteoklas dapat terjadi bila reseptor RANK yang terdapat pada osteoklas precursor berikatan dengan ligan yang disekresi oleh osteoblas. Di samping itu osteoblas juga mensekresikan osteoprotegerin yang bersifat inhibisi terhadap RANKL. Anak panah yang berada di sisi kiri osteoblas meningkatkan aktivitas penyerapan tulang melalui rangsangan osteoblas untuk mensekresi RANKL, sementara anak panah yang terputus-putus mengurangi aktivitas penyerapan tulang dengan menghambat jalur RANKL. Osteoklas menempel pada permukaan tulang melalui integrin ($\alpha V\beta 3$) yang kemudian akan mensekresikan ion H^+ dan enzim cathepsin untuk mendegradasi kolagen (Joseph T. Dipiro).

5 Faktor Yang Mempengaruhi Penyembuhan Fraktur

Tulang yang fraktur tidak selalu dapat sambung kembali sesuai dengan waktu yang diharapkan. Kadangkala tulang yang fraktur membutuhkan waktu lebih lama dari biasanya (*delayed union*) atau menyambung tapi tidak sesuai dengan posisi anatomi yang diharapkan (*malunion*), bahkan fragmen tulang yang fraktur tidak terjadi penyambungan sama sekali (*non union*). Hal ini dapat terjadi karena penyembuhan fraktur tulang dipengaruhi oleh faktor lokal dan faktor sistemik (Joseph A. Buckwalter, 2000).

Faktor lokal yang dapat mempengaruhi penyembuhan fraktur antara lain : (1) besarnya gaya mekanis yang menyebabkan fraktur. Semakin besar gaya yang menyebabkan fraktur semakin luas kerusakan tulang yang terjadi. (2) Tipe fraktur. Garis fraktur yang sederhana lebih mudah menyambung daripada fraktur yang multiple. (3) besarnya kerusakan jaringan lunak. (4) Banyaknya pembuluh darah yang rusak. Pembuluh darah sangat dibutuhkan untuk memberi nutrisi dan oksigen terhadap jaringan yang sehat dan yang sedang mengalami gangguan. (5) Reposisi atau imobilisasi yang tidak adekuat. Reposisi dan imobilisasi fraktur yang tidak adekuat akan menyebabkan fraktur lebih sukar untuk menyambung. (6) Ada tidaknya jaringan tulang yang mati. (7) Ada tidaknya infeksi pada tulang. Infeksi tulang sangat sulit untuk diatasi, oleh karena itu sebaiknya hindari terjadinya infeksi pada tulang yang fraktur.

Faktor sistemik yang mempengaruhi penyembuhan fraktur adalah : (1) Usia penderita. Fraktur yang terjadi pada anak-anak atau orang yang sedang mengalami pertumbuhan lebih mudah sembuh dari pada orang dewasa. Hal ini karena pada anak-anak atau remaja aktivitas proliferasi dan diferensiasi sel-sel tulang lebih daripada orang dewasa. (2) Penyakit sistemik yang menyertai. Adanya penyakit sistemik akan menurunkan imunitas penderita secara umum sehingga penyembuhan fraktur menjadi lebih lama. (3) Status gizi penderita. Pada penderita malnutrisi fraktur tulang lebih lama untuk sembuh karena protein yang diperlukan untuk mensintesa faktor pertumbuhan tidak tersedia sehingga aktivitas metabolisme sel tulang menjadi terganggu.

Tabel 2.1 Faktor yang mempengaruhi penyembuhan fraktur (Rockwood, 1991)

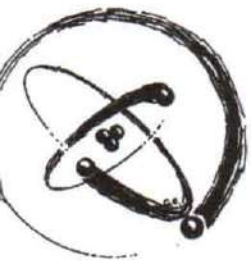
Penyembuhan fraktur	
Meningkatkan	Menghambat
Usia muda	Usia tua
Hormon thyroid	Malnutrisi
Hormon insulin	Infeksi sistemik
<i>Growth factor</i>	Anemia
Vitamin A	Hyperglukemia
Vitamin D	Kortikosteroid
Kalsitonin	Alkohol
Medan listrik	Merokok
Gelombang ultrasonik	
Sinar ultra violet	
Oksigen hiperbarik	
Latihan fisik	

7 Sinar Laser

Istilah laser yang merupakan singkatan dari *light amplification by stimulated emission of radiation* pertama kali diperkenalkan pada tahun 1960 oleh Dr Theodore Maiman yang bekerja sebagai seorang peneliti di *Hughes Research Laboratory, Malibu, California*. Maiman pada waktu itu berhasil menciptakan suatu jenis sinar monokromatis yang mempunyai daya lebih besar dari daya yang dihasilkan oleh sinar ultraviolet. Konsep emisi radiasi sinar laser yang ditemukan oleh Maiman ini diilhami oleh teori kuantum atom yang dilontarkan oleh Albert Einstein pada tahun 1917 (Jimmie Kert, D, 1989).

Sinar laser dihasilkan dengan cara menembakkan energi ke dalam suatu medium yang berisi gas atau kristal padat. Gas atau kristal yang dipakai sebagai medium untuk membangkitkan sinar laser biasanya mempunyai lintasan elektron luar yang stabil, misalnya campuran gas helium dengan neon, krypton, argon dan karbon dioksida. Energi yang diserap oleh elektron akan menyebabkan lintasannya menjadi tidak stabil sehingga

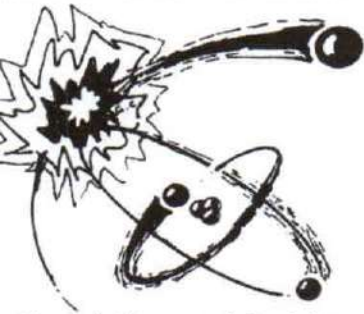
elektron akan berpindah ke lintasan yang lebih luar dengan energi yang lebih besar. Perpindahan elektron ke lintasan yang lebih luar disebut dengan elektron tereksitasi (*excited electron*). Eksitasi suatu elektron tidak dapat bertahan lama karena elektron tersebut akan kembali ke lintasan semula yang lebih stabil. Kembalinya elektron tersebut ke lintasan yang lebih stabil menghasilkan energi ke sekitarnya. Energi yang dipancarkan disebut dengan energi *photon* (T. Ohshiro 1995).



(a) Atom dalam keadaan stabil



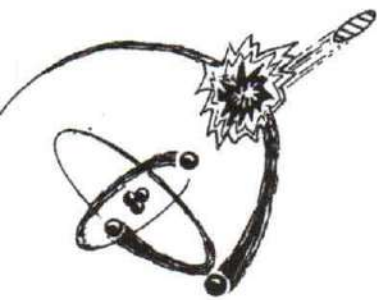
(b) Energi *photon* yang mengarah ke atom



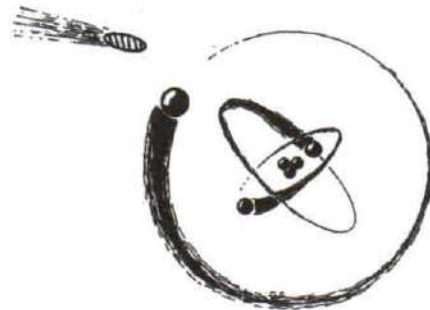
Energi diserap oleh elektron terluar



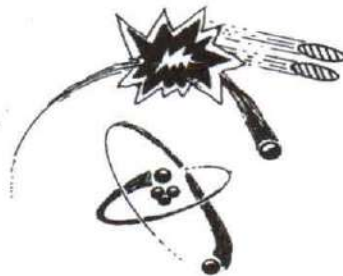
(d) Atom dalam keadaan tereksitasi



Elektron kembali ke lintasan semula sambil mengeluarkan energi



(f) Energi mengenai lintasan elektron yang lain



(g) Demikian seterusnya hingga menghasilkan energi *photon* yang makin lama makin bertambah banyak

Gambar 2.7 Proses terbentuknya energi *photon* yang dihasilkan oleh emisi sinar laser

Medium yang digunakan untuk membangkitkan sinar laser dapat berupa gas atau benda padat tergantung untuk apa laser itu digunakan. Dalam dunia medis medium yang sering digunakan adalah campuran antara gas Helium (He) dan gas Neon (Ne) dengan panjang gelombang (λ) 632,8 nanometer (nm) karena efek biostimulasinya terhadap jaringan lebih menonjol dan tidak menimbulkan kerusakan jaringan yang bermakna.

Tabel 2.2 Jenis dan aplikasi klinis sinar laser (T.Ohshiro, 1995)

Jenis laser	Daya keluar (Output power)	Panjang gelombang	Aplikasi klinis
Helium Neon (HeNe)	< 100 mW	632,8 nm	Biostimulasi
Argon (Ar)	< 10 W	488-514,5 nm	Koagulasi jaringan
Krypton (Kr)	< 5 mW	476,531,647 nm	Dipakai dalam ophthalmologi
Karbon dioksida (CO ₂)	sampai 100 W	10,600 nm	Incisi jaringan (pisau bedah)
Karbon monooksida (CO)	sampai 100 W	53 μ m	Incisi jaringan
Nitrogen (N ₂)	30 MW	337 nm	Dipakai dalam dermatologi

Berbeda dengan sinar biasa, sinar laser mempunyai ciri khas yang tidak dimiliki oleh sinar manapun. Menurut Jimmie Kert, M.D (1999), sinar laser mempunyai 3 sifat khusus yang tidak dimiliki oleh jenis sinar lainnya. Ketiga sifat tersebut adalah : (1) *monokromatis*, yaitu bila dilewatkan pada kaca prisma sinar tersebut tidak akan mengalami dispersi sehingga warnanya tetap sama baik pada waktu memasuki maupun setelah keluar dari kaca prisma; (2) *koheren*, yaitu panjang dan besar gelombang tetap

ma sehingga energi yang dihasilkan tetap konstan; dan (3) *unidireksional*, yaitu sinar tersebut tetap konsentris walaupun dipancarkan dari jarak jauh.

Secara umum sinar laser menurut kekuatan energi yang dihasilkan dibagi atas 3 bagian, yaitu: sinar laser kekuatan tinggi (*high level laser*) yang dapat menghasilkan energi antara 3000 sampai 10000 miliwatt, sinar laser kekuatan sedang (*medium level laser*) yang dapat menghasilkan energi sebesar 500 sampai 3000 miliwatt, dan sinar laser energi rendah (*low level laser*) yang menghasilkan energi antara 1 sampai 500 miliwatt.

Pengertian sinar laser energi rendah (*low level laser*) adalah sinar laser yang dapat menghasilkan energi sebesar 1-4 joule (watt/detik), daya keluar (*output power*) 1-75 miliwatt, dan hanya mengakibatkan perubahan temperatur lokal sebesar 0,5 - 0,75 °C (Jeffrey R. Basford, 1988). Sedangkan menurut Jimmie Kert (1989), laser energi rendah (*low level laser*) adalah jenis sinar laser yang mempunyai kekuatan energi sedemikian rupa sehingga bila diserap oleh tubuh tidak akan menimbulkan perubahan suhu di atas suhu normal tubuh (36,5° C).

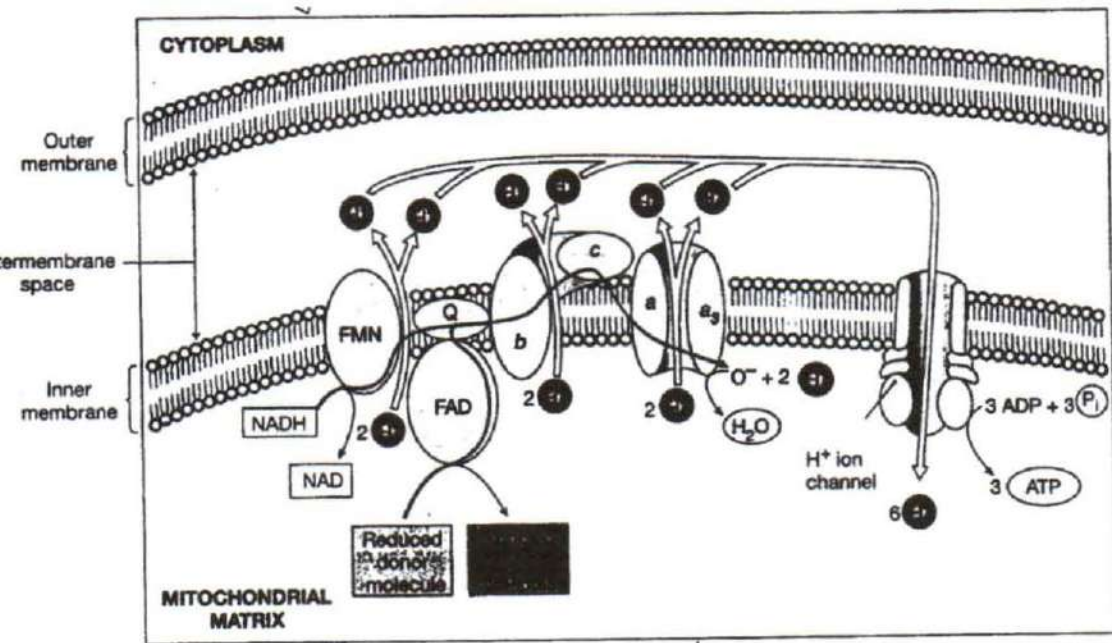
Pemanfaatan sinar laser energi rendah (*low level laser*) di dunia kedokteran diperkenalkan oleh seorang ilmuwan berkebangsaan Honggaria bernama Endre Mester yang melakukan penelitian pada tahun 1962 melaporkan hasil penelitiannya yang mengatakan bahwa sinar laser energi rendah dapat merangsang penyembuhan luka pada berbagai bagian tubuh. Sejak saat itu banyak penelitian dilakukan untuk membuktikan lebih lanjut pengaruh sinar laser energi rendah untuk merangsang penyembuhan luka.

3 Reaksi Jaringan Terhadap Sinar Laser

Pemaparan sinar laser terhadap suatu jaringan akan mengakibatkan terjadinya reaksi tubuh terhadap sinar tersebut, yaitu : diserap (*absorption*), dipendarkan (*scatter*), ditransmisikan (*transmission*), dan dipantulkan (*reflection*). Reaksi fotobiologi terjadi bila cahaya dengan panjang gelombang tertentu diserap oleh jaringan melalui suatu reseptor cahaya yang terdapat dalam sel. Dari gambaran grafik cahaya (*photon spectrum*) yang dihasilkan oleh kecepatan sintesis protein dan rangsangan pertumbuhan yang dilakukan pada *E. Koli (escherichia coli)* melalui paparan gelombang cahaya tertentu diduga bahwa penyerapan cahaya ditingkat sel dilakukan oleh suatu molekul yang disebut molekul foto akseptor (*photo acceptor molecule*). Penelitian selanjutnya pada tahun 1995 yang menggunakan sinar laser energi rendah sebagai sumber cahaya diketahui bahwa molekul tersebut merupakan suatu molekul protein yang terlibat erat dalam reaksi rantai respirasi (*respiratory chain reaction*) mitokondria, yaitu : enzim sitokrom-c oksidase (*cytochrome-c oxydase*). Enzim ini adalah suatu *hemoprotein* yang terdapat dalam mitokondria dan berperan dalam proses perpindahan elektron dari satu molekul ke molekul lain (Robert K.Murray, 2003). Cahaya yang diserap oleh foto akseptor ini mengakibatkan perubahan keseimbangan elektron ditingkat molekul berupa perubahan dalam reaksi reduksi-oksidasi (*redox*) dan percepatan perpindahan elektron pada reaksi rantai respirasi (Tina I. Karu,2003).

Reaksi reduksi-oksidasi (*redox*) merupakan suatu reaksi kimia yang terjadi pada proses pembentukan *adenosine triphosphate (ATP)* oleh mitokondria. Reaksi ini biasanya terjadi selalu berpasangan karena setiap molekul kehilangan satu elektron (peristiwa oksidasi) akan diikuti oleh penambahan satu elektron pada molekul lain (peristiwa

duksi). Proses perpindahan elektron dari satu molekul ke molekul ini diikuti juga oleh perubahan energi pada tingkat molekul. Molekul yang membebaskan elektron akan mendapat tambahan energi berupa energi panas dan energi kimia yang berguna untuk membentuk ATP. ATP merupakan sumber energi penting bagi sel untuk melakukan berbagai macam aktivitas seperti pembentukan protein (*cytokine*) dan proliferasi sel (Martini, 2001).



Gambar 2.7 Proses pembentukan *adenosine triphosphate* (ATP) yang dihasilkan melalui reaksi fosforilasi oksidatif dalam rantai respirasi sel atau yang disebut juga dengan *electron transport system* (ETS). (Martini, 2001)

Perubahan yang terjadi pada tingkat seluler tergantung besarnya energi sinar laser yang diserap oleh foto akseptor. Penyerapan laser energi rendah oleh foto akseptor mengakibatkan terjadinya reaksi primer pada mitokondria dan reaksi sekunder dalam sitoplasma dan inti sel. Reaksi primer adalah reaksi yang terjadi dalam mitokondria berupa percepatan perpindahan elektron pada rantai respirasi. Reaksi primer ini akan

mengakibatkan terjadinya reaksi sekunder berupa penguatan penghantaran sinyal seluler (*cellular signaling*) dalam sitoplasma dan inti sel.

3.1 Reaksi Primer

Terdapat beberapa hipotesis yang bisa menjelaskan terjadinya reaksi primer dalam mitokondria yang dipaparkan laser energi rendah. Sampai saat ini setidaknya ada 5 hipotesis yang mencoba menjelaskan terjadinya reaksi primer tersebut, yaitu : (1) hipotesis perubahan reduksi-oksidasi (*redox properties alteration hypothesis*); (2) hipotesis singlet oksigen (*singlet-oksigen hypothesis*); (3) hipotesis nitrit oksid (*NO hypothesis*); (4) hipotesis anion superoksid (*superoxide anion hypothesis*); dan (5) hipotesis panas lokal transien (*transient local heating hypothesis*).

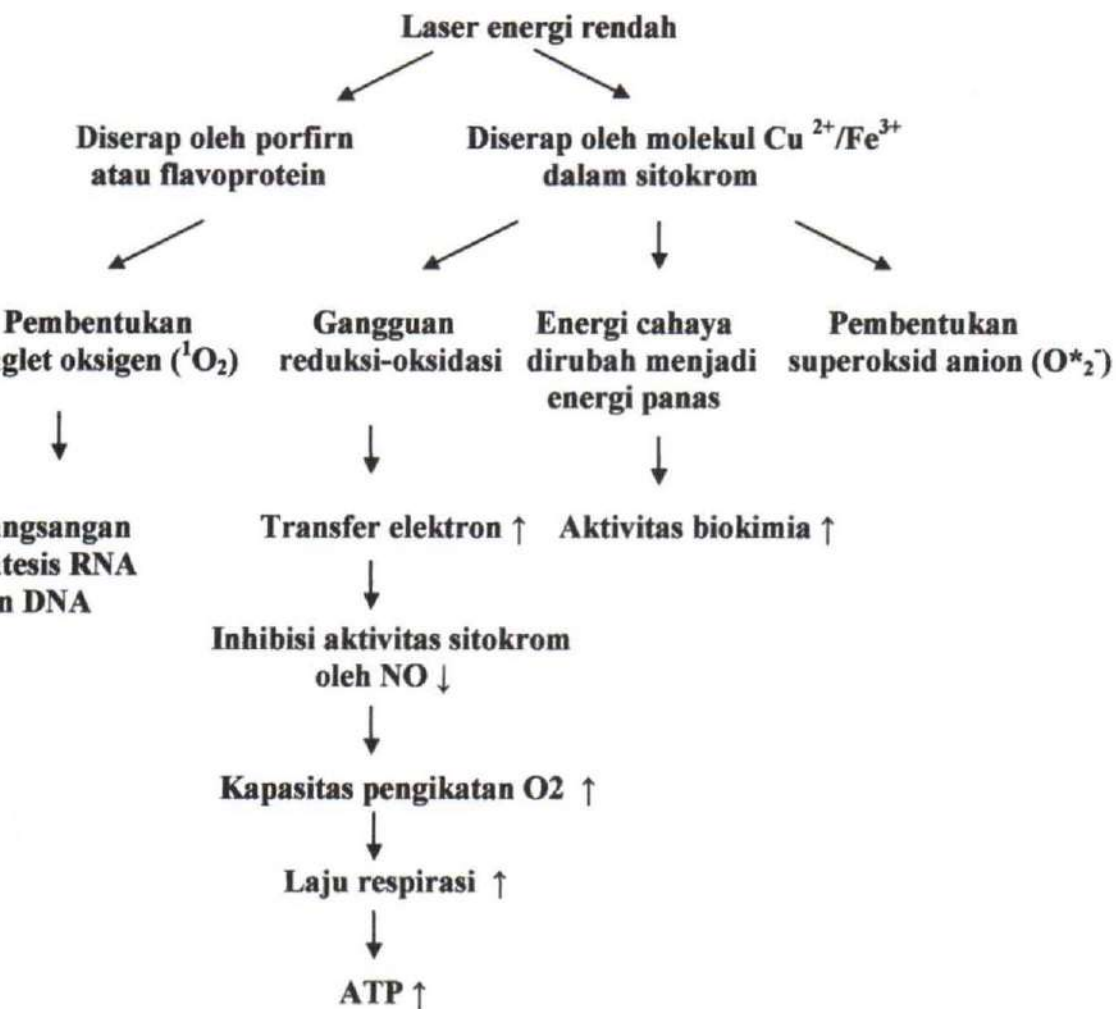
Hipotesis perubahan reduksi-oksidasi (*redox properties alteration hypothesis*) yang diusulkan oleh Tiina I.Karu tahun 1988 mengatakan bahwa rangsangan yang terjadi pada molekul yang terdapat dalam enzim sitokrom-c oksidasi (*copper* dan *heme*) setelah dipapar dengan laser energi rendah akan mengakibatkan perubahan reaksi reduksi-oksidasi rantai respirasi berupa percepatan perpindahan elektron .

Hipotesis singlet oksigen (*singlet-oksigen hypothesis*) mengatakan bahwa protein yang terkait dalam reaksi rantai respirasi seperti porfirin dan flavoprotein bila dipaparkan laser energi rendah dapat mengakibatkan terbentuknya radikal bebas singlet oksigen (O_2) yang pada kuantitas tertentu dapat meningkatkan laju sintesis DNA (*deoxyribonucleic acid*) dan RNA (*ribonucleic acid*).

Dalam kondisi fisiologi aktivitas dari enzim sitokrom-c oksidase pada rantai respirasi dihambat secara reversibel oleh nitrit oksid (NO). Efek inhibisi enzim sitokrom-

oksidase oleh NO dapat diminimalkan dengan cara paparan sinar laser energi rendah (hipotesis). Mekanisme ini dapat dijelaskan bahwa bila enzim sitokrom c-oksidadase ini dipaparkan sinar laser energi rendah akan meningkatkan laju transfer elektron tingkat molekuler yang berakibat terjadinya peningkatan kapasitas pengikatan O_2 (O_2 -binding) dan laju respirasi sel. Pada keadaan patologis dimana konsentrasi NO tinggi akibat aktivitas makrofag yang meningkat akan terjadi hambatan dalam sistem respirasi sel. Hipotesis anion superoksida (*superoxide anion hypothesis*) mengatakan bahwa sinar laser energi rendah selain meningkatkan laju rantai respirasi juga dapat meningkatkan pembentukan senyawa anion superoksida (O_2^*). Pembentukan senyawa anion superoksida (O_2^*) ini bergantung status metabolik mitokondria.

Bila elektron pada suatu molekul tereksitasi karena paparan dengan suatu sinar, maka energi yang dihasilkan oleh molekul tersebut akan dikonversi menjadi energi panas sehingga temperatur di sekitar tempat tersebut meningkat (*transient local heating hypothesis*). Peningkatan temperatur lokal ini dapat mengakibatkan perubahan struktural protein dan memacu aktivitas biokimia tingkat sel. Oleh karena itu besarnya energi panas yang dihasilkan akibat paparan dengan sinar laser ini dapat dicegah dengan cara mengatur intensitas dan dosis radiasi secara cermat.



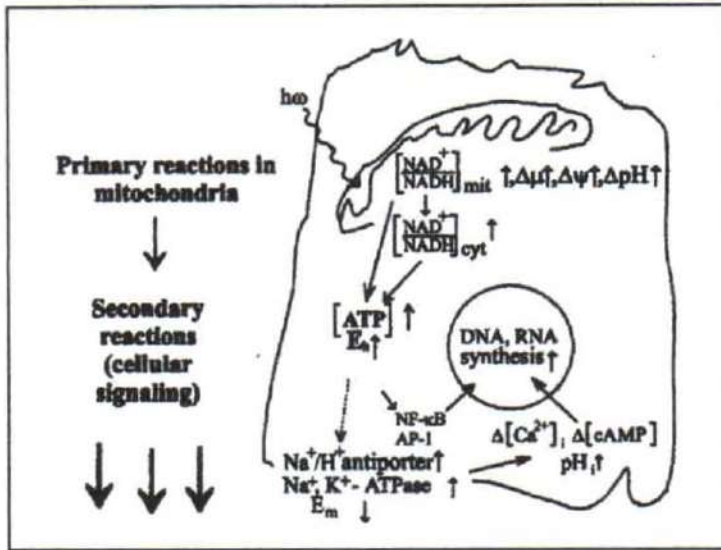
ambar 2.8 Reaksi primer yang terjadi setelah sinar laser energi rendah diabsorpsi oleh porfirin/flavoprotein dan sitokrom pada rantai respirasi dalam mitokondria (Tiina I.Karu, 2003).

2.2 Reaksi Sekunder

Mekanisme terjadinya peningkatan sintesis DNA dan RNA dalam nukleus akibat adanya rangsangan cahaya yang diterima oleh fotoakseptor pada rantai respirasi dalam mitokondria dapat terjadi karena adanya hantaran sinyal intra seluler (*cellular signaling*) yang menghubungkan mitokondria dengan sitoplasma dan inti sel. Tahapan penghantaran sinyal intra seluler ini terjadi dalam suatu mekanisme yang disebut dengan reaksi sekunder (*dark reaction*).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Tiina I.Karu pada tahun 2002 menyebutkan bahwa peningkatan sintesis DNA dan RNA terjadi melalui 3 jalur. Jalur pertama terjadi melalui mekanisme kontrol kadar ATP intra seluler yang dilakukan oleh faktor transkripsi sebagai akseptor. Kadar ATP intra seluler ini lebih banyak ditentukan oleh keseimbangan antara proses reaksi reduksi oksidasi rantai respirasi dibandingkan dengan proses sintesis ATP sendiri. Seperti telah diketahui bahwa perubahan kadar ATP intra seluler sekecil apapun dapat mempengaruhi aktivitas metabolisme sel secara keseluruhan.

Jalur kedua dan ketiga dipengaruhi oleh status reduksi oksidasi seluler yang melibatkan faktor transkripsi yaitu : *nuclear factor kappa B* (NF- κ B) dan *activator protein-1* (AP-1). Faktor transkripsi ini berfungsi meningkatkan modulasi ekspresi gen melalui peningkatan transduksi sinyal seluler dalam inti sel. Telah diketahui bahwa senyawa yang berperan sebagai oksidan dapat merangsang sistem sinyal seluler sedangkan senyawa yang berperan sebagai reduktan membuat laju sistem sinyal seluler tidak bekerja. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa ekspresi gen yang berinteraksi oleh status reduksi oksidasi merupakan mekanisme yang penting dalam fisiologi sel.



Gambar 2.9 Mekanisme reaksi sekunder yang menimbulkan sinyal seluler antara mitokondria dengan inti dan sitoplasma sel. $h\nu$ = paparan laser energi rendah, $E_h \uparrow$ = reaksi reduksi oksidasi yang mengarah ke oksidasi, $[]$ = konsentrasi intra seluler (Tiina I.Karu, 2003).

Respon biologi yang dihasilkan oleh reaksi primer dalam mitokondria maupun reaksi sekunder dalam inti dan sitoplasma sel yang terjadi akibat paparan dengan laser energi rendah tergantung besarnya dosis radiasi, panjang gelombang sinar yang dipakai, kontinuitas (pulsasi atau continue), dan intensitas penyinaran.

Pengaruh Klinis Laser Energi Rendah

Sel dalam kondisi patologis lebih berespon terhadap laser energi rendah dibandingkan sel normal. Pada berbagai penelitian disebutkan bahwa pada kondisi patologis sel lebih peka terhadap peningkatan perpindahan energi dan aktivitas metabolik (meida Lopez, 1999).

0.1 Mempercepat Penyembuhan Fase Inflamasi

Jejas akut yang terjadi pada jaringan tubuh akan menyebabkan rusaknya integritas pembuluh darah, syaraf, jaringan lunak dan jaringan ikat pada tempat yang terkena jejas. Tubuh akan segera memberikan respon dengan cara mengerahkan sel inflamasi ke tempat terjadinya jejas. Pada tempat jejas, berbagai sel inflamasi seperti: neutrofil, makrofag dan monosit akan mensekresikan mediator inflamasi seperti: bradikinin, serotonin, histamin dan prostaglandin sehingga menimbulkan gejala inflamasi berupa: *dolor*, *calor*, *rubor*, dan *functio laesa*. Dengan penyinaran laser energi rendah pada tempat terjadinya jejas, gejala inflamasi tersebut dapat dikurangi dan dipercepat penyembuhannya dengan cara:

a. Stabilisasi membran sel.

Laser energi rendah dapat meningkatkan produksi senyawa ROS (*reactive oxygen species*) yang bila berada dalam bentuk triplet oksigen dapat menyerap energi cahaya sehingga terbentuk singlet oksigen. Senyawa ROS ini dapat meningkatkan konsentrasi kalsium pada mitokondria.

b. Peningkatan sintesis ATP.

Aktivitas enzim sitokrom-c oksidase yang terdapat pada rantai respirasi mengalami peningkatan bila terpapar oleh radiasi laser energi rendah. Enzim ini berperan penting dalam tahapan sintesa ATP oleh mitokondria.

c. Vasodilatasi pembuluh darah.

Histamin, serotonin dan nitrit oksid yang terbentuk pada sel yang mengalami iskemik menyebabkan vasodilatasi pembuluh darah sehingga aliran darah pada tempat tersebut meningkat. Peningkatan aliran darah ini mencukupi

kebutuhan nutrisi dan oksigen kepada sel yang rusak sehingga mempercepat perbaikan sel dan pembuangan debris sel yang rusak.

d. Meningkatkan aktivitas leukosit.

Peningkatan aktivitas leukosit menyebabkan pembersihan sel atau jaringan yang mati melalui peristiwa fagositosis menjadi lebih cepat sehingga perbaikan jaringan lebih cepat tercapai.

e. Meningkatkan sintesis prostaglandin.

Laser energi rendah dapat memfasilitasi perubahan prostaglandin G-2 dan prostaglandin H-2 menjadi prostaglandin I-2 (*prostacyclin*). Seperti yang telah diketahui bersama bahwa prostaglandin I-2 (*prostacyclin*) ini mempunyai efek vasodilatasi terhadap pembuluh darah dan juga anti inflamasi yang kerjanya mirip *cyclo oxygenase inhibitor-I* (Cox-I) atau *cyclo oxygenase inhibitor-II* (Cox-II).

f. Mengurangi pembentukan *interleukin-1* (IL-1).

Interleukin-1 (IL-1) merupakan sitokin yang diproduksi oleh berbagai jenis sel terutama sel inflamasi dan mempunyai efek merangsang terjadinya inflamasi pada jaringan.

g. Merangsang *angiogenesis*.

Pengaruh laser energi rendah terhadap pembentukan pembuluh darah kapiler baru dan pembuluh limfe menunjukkan peningkatan yang signifikan sehingga membuat proses perbaikan dan penyembuhan jaringan menjadi lebih cepat. Hal ini terjadi karena dengan pemaparan laser energi rendah terjadi peningkatan nitrit oksid (NO), sitokin *vasculo endothelial growth factor* (VEGF) dan *interferon gamma* (INF- γ).

h. Normalisasi temperatur lokal.

Pada tempat yang mengalami inflamasi biasanya terjadi peningkatan suhu akibat ekstrasvasi pembuluh darah sebagai respon terhadap reaksi inflamasi. Dengan penyinaran laser energi rendah, peningkatan temperatur lokal ini dapat segera dinormalisasi dengan cara meningkatkan evaporasi panas di tempat jejas.

i. Meningkatkan kadar *superoxide dismutase* (SOD).

Sinar laser energi rendah diketahui dapat meningkatkan kadar *superoxide dismutase* (SOD) pada jaringan yang mengalami jejas. SOD bersama dengan sitokin anti inflamasi lainnya dapat mempercepat berakhirnya proses inflamasi. Dijelaskan pula bahwa interaksi SOD dengan *reactive oxygen species* (ROS) dapat menetralkan pengaruh negatif radikal bebas yang timbul akibat penyinaran laser energi rendah.

j. Mengurangi pembentukan *C-reactive protein* (CRP) dan *neopterin*.

Pada penelitian terhadap penderita rheumatoid arthritis yang dilakukan penyinaran laser energi rendah didapatkan kadar protein petanda inflamasi (*inflammation marker*) seperti *C-reactive protein* (CRP) dan *neopterin* rendah. Penurunan petanda inflamasi ini membuktikan bahwa laser energi rendah dapat mempercepat penyembuhan reaksi inflamasi.

2.2 Mengurangi Rasa Nyeri

a. Meningkatkan pembentukan *b-endorphin*.

Peningkatan neurotransmitter endogen ini telah banyak diteliti dan dilaporkan dalam berbagai penelitian.

b. Menghambat depolarisasi transmisi syaraf aferen.

Pengurangan rasa nyeri oleh laser energi rendah terjadi melalui penghambatan transmisi sinyal pada serabut syaraf aferen yang menghantarkan rangsangan sensoris.

c. Meningkatkan produksi nitrit oksid.

Nitrit oksid mempunyai pengaruh langsung maupun tidak langsung terhadap pengurangan rasa nyeri. Nitrit oksid ini diperlukan dalam membangkitkan terjadinya potensial aksi pada membran sel syaraf dan secara tidak langsung meningkatkan perfusi dan oksigenasi sel syaraf karena efek vasodilatornya.

d. Meningkatkan potensial aksi sel syaraf.

Potensial aksi sel syaraf pada keadaan normal berkisar antara -70 mV sampai -20 mV. Bila potensial aksi yang terjadi besarnya kurang dari -20 mV akan terjadi stimulasi pada sel syaraf. Laser energi rendah membantu menyeimbangkan kadar potensial aksi berkisar antara -70 mV.

e. Membantu pertumbuhan akson dan regenerasi sel syaraf yang rusak.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa laser energi rendah dapat membantu pertumbuhan akson dan regenerasi sel syaraf yang mengalami kerusakan.

f. Mengurangi pembentukan bradikinin.

Bradikinin menyebabkan stimulasi reseptor nosiseptif syaraf aferen yang terdapat pada kulit dan organ viscera sehingga timbul rasa nyeri. Laser energi rendah diketahui dapat mengurangi pembentukan bradikinin dengan cara

menurunkan kadar kalikrein plasma , meningkatkan enzim kininase-II dan NO (*nitrit oxyde*).

g. Meningkatkan pelepasan asetil kolin.

Laser energi rendah dapat menormalkan transduksi sinyal pada syaraf otonom, syaraf somatik dan syaraf sensoris yang rusak dengan cara meningkatkan sekresi asetil kolin.

h. Normalisasi *ion-channel*.

Laser energi rendah membantu normalisasi konsentrasi ion Ca^{2+} , Na^{+} dan K^{+} pada sel syaraf yang rusak sehingga rasa nyeri yang timbul akibat kerusakan sel syaraf ini berkurang.

9.3 Mempercepat Penyembuhan Jaringan

a. Meningkatkan infiltrasi leukosit.

Laser energi rendah dapat meningkatkan aktivitas leukosit seperti neutropil, monosit, dan limfosit sehingga infiltrasi sel inflamasi ke dalam jaringan tersebut dapat berlangsung dengan cepat.

b. Meningkatkan aktivitas makrofag.

Laser energi rendah mempunyai efek meningkatkan aktivitas makrofag dalam hal fagositosis, sekresi faktor pertumbuhan dan stimulasi pembentukan kolagen.

c. Meningkatkan neovaskularisasi.

Laser energi rendah dapat meningkatkan proses neovaskularisasi melalui aktivasi endotel. Neovaskularisasi yang meningkat ini mengakibatkan perfusi dan

oksigenasi jaringan yang rusak menjadi lebih bagus sehingga proses penyembuhan jaringan menjadi lebih cepat.

d. Mempercepat epitelialisasi.

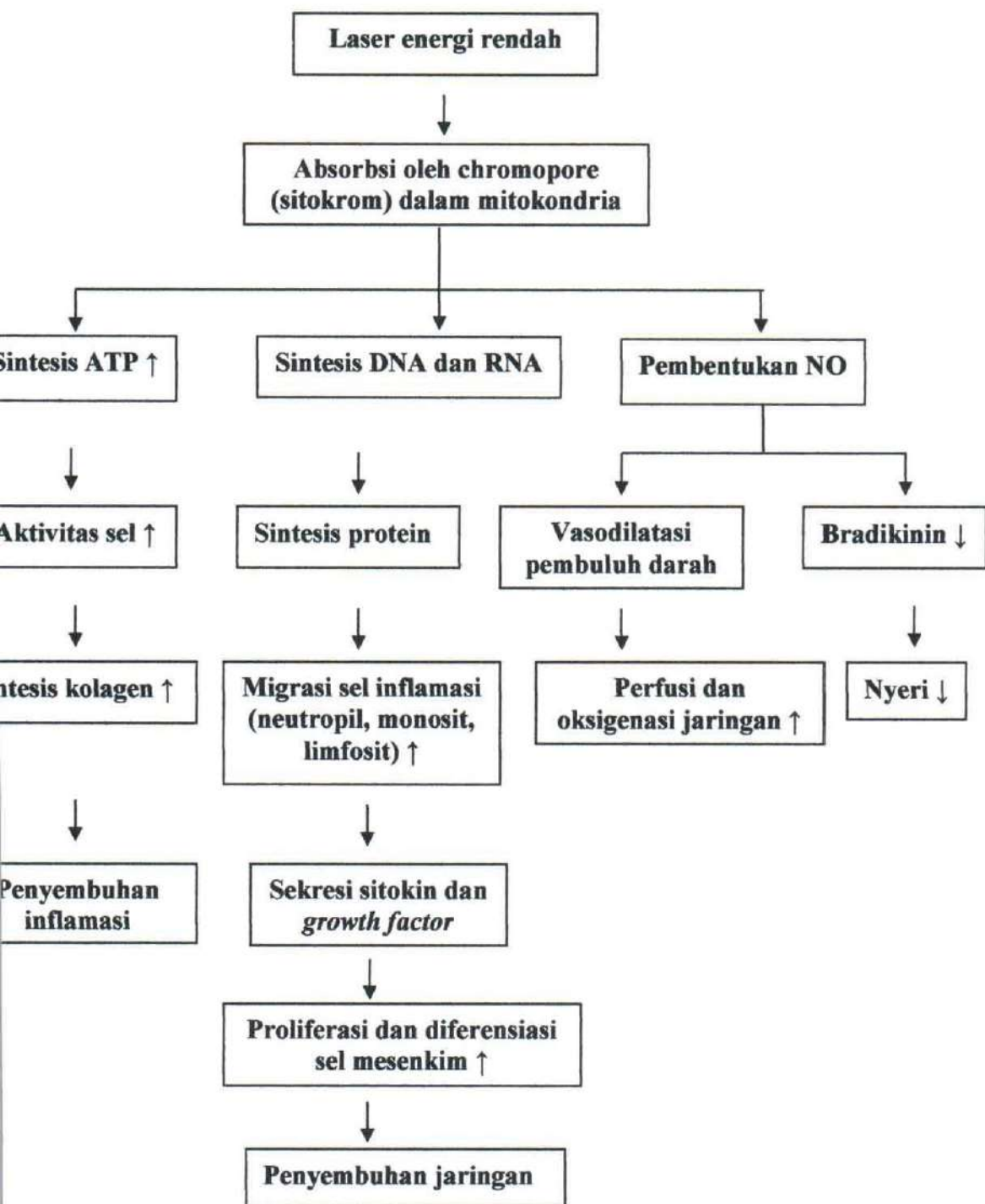
Laser energi rendah dapat merangsang regenerasi epitelial sehingga mempercepat penyembuhan luka, mengurangi pembentukan jaringan parut (sikatrik) dan memperkecil resiko terjadinya infeksi.

e. Meningkatkan proliferasi fibroblas.

Laser energi rendah dapat meningkatkan proliferasi fibroblas dan pembentukan kolagen yang dimediasi oleh fibroblas.

f. Meningkatkan sekresi faktor pertumbuhan.

Pada penyinaran dengan laser energi rendah didapatkan peningkatan sekresi faktor pertumbuhan yang merangsang sintesis DNA pada fibroblas, osteoblas, endotel dan miosit 2 sampai 5 kali lebih banyak.



ambar 2.10 Mekanisme sinar laser energi rendah dalam mempercepat penyembuhan inflamasi, mengurangi rasa nyeri dan mempercepat fase penyembuhan jaringan (modifikasi dari Richard Martin, 2003).

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

1 Kerangka Konseptual

Pada peristiwa fraktur tulang yang rusak bukan hanya tulangnya saja tetapi juga jaringan ikat dan pembuluh darah di sekitar tulang yang fraktur. Robeknya pembuluh darah akan mengakibatkan pembentukan bekuan darah (*clotting haematom*) di sekitar fraktur yang memicu terjadinya serangkaian proses mulai dari reaksi inflamasi, proses penyembuhan (*healing*) sampai terbentuknya jaringan tulang baru (*remodeling*).

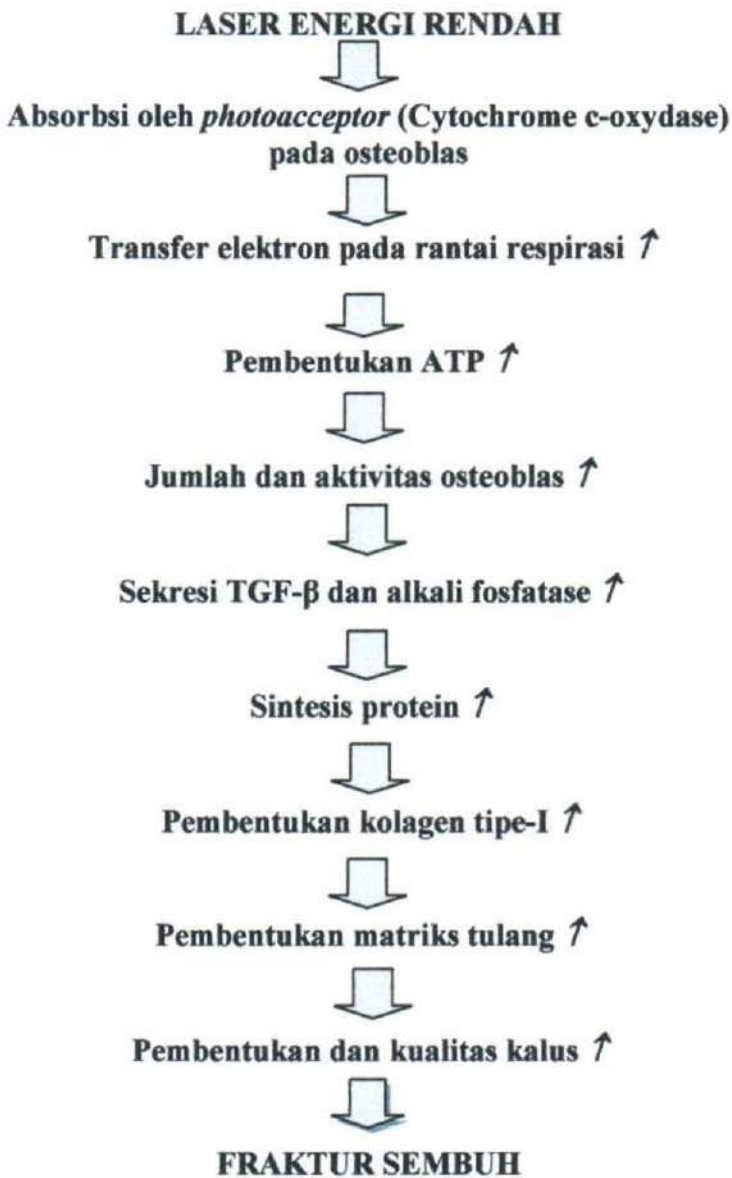
Jika pada jaringan yang rusak diberi paparan laser energi rendah dengan dosis tertentu, maka energi *photon* yang dihasilkan oleh sinar tersebut akan diserap oleh reseptor cahaya yang terdapat dalam mitokondria. Pada sel yang mempunyai inti (sel *kariotik*), reseptor cahaya tersebut merupakan suatu protein yang disebut *photoacceptor*. Dari berbagai analisa yang dilakukan terhadap *action spectrum* yang terjadi dalam mitokondria diduga bahwa *photoacceptor* tersebut adalah suatu enzim yang terlibat dalam reaksi reduksi oksidasi pada rantai respirasi sel, yaitu enzim *cytochrome c- oxydase* (Tiina I. Karu,2003).

Penyerapan energi *photon* yang dihasilkan sinar laser energi rendah oleh *photoacceptor* (*cytochrome c-oxydase*) pada rantai respirasi dalam mitokondria akan mengakibatkan transfer elektron dari *nicotinamide adenin dinukleotid hydrogenase* (NADH) menuju O_2 menjadi lebih cepat sehingga *adenosine triphosphate* (ATP) yang terbentuk menjadi lebih cepat dan lebih banyak. ATP ini akan digunakan oleh osteoblas untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi osteoblas yang aktif. Osteoblas yang sudah dewasa (*mature*) dan aktif akan mensekresi berbagai macam sitokin antara lain

kali fosfatase dan *transforming growth factor-beta* (TGF- β) yang diperlukan dalam proses penyembuhan fraktur. Osteoblas kemudian akan membentuk kalus diantara dua fragmen tulang sehingga terjadi penyambungan (*union*). Kemudian kalus yang terbentuk ini lambat laun akan mengalami mineralisasi sehingga terbentuk jaringan tulang baru.

Berdasarkan uraian yang telah disebutkan di atas, secara skematis kerangka

konseptual dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual

Hipotesa Penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka dan kerangka konseptual yang telah diuraikan sebelumnya, maka diajukan hipotesis penelitian sebagai berikut :

- 2.1 Laser energi rendah mempercepat pembentukan kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus putih.
- 2.2 Laser energi rendah meningkatkan kualitas kalus pada proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus putih.

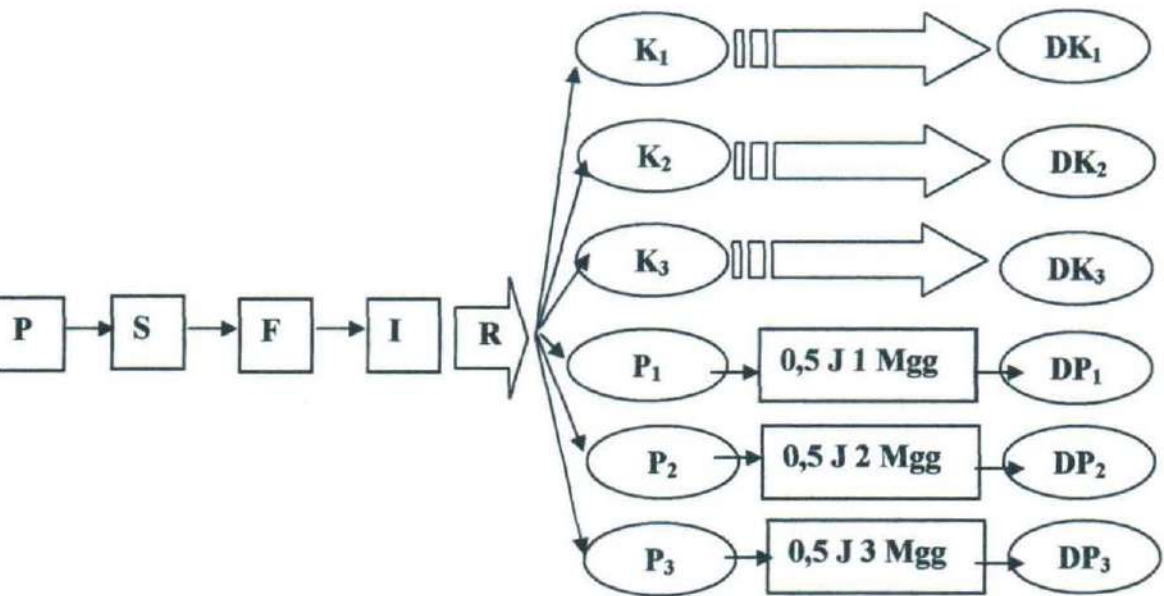
BAB 4

METODE PENELITIAN

1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan menggunakan studi eksperimental laboratoris dengan *Post test only control group design*, yaitu penelitian eksperimental dimana kelompok kontrol dan kelompok perlakuannya dirandomisasi sedemikian rupa sehingga pengaruh intervensi pada kelompok perlakuan dapat diukur dan dibandingkan dengan kelompok kontrolnya (Zainuddin, 2000). Pada penelitian ini, hewan coba yang diambil dari populasi melalui randomisasi dilakukan frakturasi pada tulang tibia kiri 1/3 bagian tengah. Randomisasi ini memungkinkan semua hewan coba mendapat kemungkinan yang sama untuk dimasukkan sebagai kelompok kontrol maupun sebagai kelompok coba. Kelompok hewan coba yang termasuk anggota kelompok perlakuan diberi paparan sinar laser energi rendah (*low level laser*) yang selanjutnya bersama dengan kelompok kontrol dievaluasi pembentukan kalus yang terjadi.

Secara skematis rancangan penelitian ini dapat digambarkan sebagai berikut:



Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian

eterangan :

- | | |
|---|--------------------------------------|
| P : populasi | S : sampel |
| F : frakturasi 1/3 tengah tulang tibia kiri | I : immobilisasi dengan plaster gips |
| R : randomisasi | K ₁ : kelompok kontrol 1 |
| K ₂ : kelompok kontrol 2 | K ₃ : kelompok kontrol 3 |
| P ₁ : kelompok penyinaran 0,5 joule selama 1 minggu | |
| P ₂ : kelompok penyinaran 0,5 joule selama 2 minggu | |
| P ₃ : kelompok penyinaran 0,5 joule selama 3 minggu | |
| DK ₁ : hasil pengukuran pada kelompok kontrol-1 | |
| DK ₂ : hasil pengukuran pada kelompok kontrol-2 | |
| DK ₃ : hasil pengukuran pada kelompok kontrol-3 | |
| DP ₁ : hasil pengukuran pada kelompok penyinaran selama 1 minggu | |
| DP ₂ : hasil pengukuran pada kelompok penyinaran selama 2 minggu | |
| DP ₃ : hasil pengukuran pada kelompok penyinaran selama 3 minggu | |

2 Populasi Sampel dan Besar Sampel

2.1 Populasi Sampel

Sampel pada penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih jantan yang berasal dari UPT Hewan Percobaan Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Tikus yang menjadi obyek pada penelitian ini harus memenuhi kriteria sebagai berikut :

1. *Rattus novergicus* galur Wistar.
2. Jenis kelamin jantan.
3. Umur 2-3 bulan.
4. Berat badan 190 – 210 gram.
5. Sehat ditandai dengan gerakan aktif.

2.2 Besar Sampel

Besar sampel ditetapkan dengan menggunakan rumus Higgins dan Klinbaum (1985) dengan formulasi seperti di bawah ini :

$$N = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 QD^2}{d^2}$$

terangan :

N : besar sampel $Z\alpha$: deviasi standar untuk α $Z\beta$: deviasi standar untuk β

Untuk grup yang berpasangan (*matching*), $QD^2 / d^2 = 1$, maka : $N = (Z\alpha + Z\beta)^2$.
 Apabila $\alpha = 0,05$ dan $\beta = 0,10$, maka : $Z\alpha = 1,65$ dan $Z\beta = 1,28$ sehingga besar sample
 per kelompok adalah ≈ 9 ekor tikus. Untuk menghindari kekurangan sampel karena *drop*
 out, maka setiap kelompok dibulatkan menjadi 10 ekor, sehingga jumlah keseluruhan
 sampel menjadi 60 ekor.

Variabel Penelitian

.1 Variabel Bebas

Sinar laser energi rendah

.2 Variabel Tergantung

1. Jumlah osteoblas
2. Jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β
3. Kadar alkali fosfatase
4. Tebal kalus

.3 Variabel Kendali

1. Jenis sinar laser energi rendah
2. Panjang gelombang sinar laser energi rendah
3. Dosis sinar laser
4. Jenis hewan coba
5. Frakturasi hewan coba
6. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba

Defenisi Operasional Variabel

1. Sinar laser energi rendah adalah sinar laser jenis Galium-Arsenicum (Gal-As) yang dapat menghasilkan energi sebesar 1 – 500 mW (*miliwatt*) dan bila dipaparkan pada jaringan tubuh tidak menghasilkan panas lebih dari 36,5⁰ C.
2. Panjang gelombang sinar laser yang digunakan pada penelitian ini adalah 632,8 nm (*nanometer*).

3. Dosis sinar laser yang dipaparkan untuk setiap ekor tikus sebesar 0,5 joule pada kelompok P-1 selama 7 hari, 0,5 joule pada kelompok P-2 selama 14 hari dan 0,5 joule pada kelompok P-3 selama 21 hari.
4. Penyinaran laser energi rendah mulai dilakukan 1 hari setelah frakturasi tulang tibia kiri hewan coba. Setiap penyinaran berlangsung selama 1 menit.
5. Frakturasi hewan coba dilakukan dengan cara membuat insisi vertikal kulit di bagian anterior kruris kiri, kemudian mengidentifikasi tulang tibia untuk dilakukan pemotongan pada 1/3 bagian tengah secara tertutup (*closed transverse fracture os tibia sinistra*) menggunakan gunting. Penggungtingan tersebut harus menimbulkan garis fraktur transversal komplit. Setelah tulang tibia terpotong kemudian kulit ditutup kembali dengan jahitan kulit dan difiksasi menggunakan *plaster cast of Paris* yang meliputi sendi proksimal dan distal garis fraktur.
6. Kualitas kalus ditentukan berdasarkan pengukuran jumlah rerata osteoblas pada 5 lapangan pandang mikroskopis dengan pembesaran 400x, jumlah rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β pada 5 lapangan pandang mikroskopis dengan pembesaran 400x, kadar alkali fosfatase yang diambil dari serum darah tikus, dan tebal kalus yang didapat dengan cara mengukur rerata tebal kalus pada 5 tempat yang telah ditentukan menggunakan *ocular micrometer (Graticule)*.
7. Jumlah rerata osteoblas diperoleh dengan cara melakukan pengamatan mikroskop dengan pembesaran 400 kali sebanyak 5 lapangan pandang.

8. Jumlah rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β diperoleh dengan cara melakukan pengamatan mikroskop dengan pembesaran 400 kali sebanyak 5 lapangan pandang.
9. Kadar alkali fosfatase diukur di Laboratorium Kesehatan Daerah Jawa Timur dengan menggunakan satuan unit per liter.
10. Rerata tebal kalus diperoleh dengan cara mengukur tebal kalus menggunakan *ocular micrometer (Graticule)* dengan pembesaran 100 kali sebanyak 5 lapangan pandang.
11. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba dilakukan dengan menempatkan seluruh hewan coba pada sebuah kandang dengan ukuran 30 x 40 x 15 cm, dimana setiap kandang diisi 5 ekor yang diberi makanan standar dan minum aqua.

5 Bahan dan Instrumen Penelitian

5.1 Bahan penelitian

5.1.1 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* galur *istar*, jenis kelamin jantan, umur 2- 3 bulan dengan berat badan berkisar 190 sampai 200 gram.

5.1.2 Instrumen Penelitian

1. Laser Gal-As dengan panjang gelombang 632,8 nm (*nanometer*)
2. Timbangan Torbal (*torsion balance*)
3. Mikroskop cahaya

4. Gunting dan pisau bedah
5. *Ether anaestheticus* untuk pembiusan
6. Stoples untuk pembiusan
7. *Plaster cast* (gips)
8. *Ocular micrometer (Graticule)*

5 Lokasi dan Waktu Penelitian

5.1 Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Airlangga .

5.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini direncanakan berlangsung selama 6 bulan dengan rincian 3 bulan tahap persiapan dan 3 bulan tahap pelaksanaan.

7 Analisa Data

Data yang dikumpulkan pada akhir penelitian dari kelompok perlakuan dan dari kelompok kontrol akan dibandingkan dan dianalisa menggunakan uji statistik *dependent t-test* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara P.1-K.1, P.2-K2 , P.3-K.3

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

Data baku hasil penelitian eksperimental proses penyembuhan fraktur tulang yang dilakukan terhadap binatang coba selama 3 minggu dikumpulkan dan diolah sesuai dengan tujuan dan hipotesis penelitian yang telah dibuat. Data ini merupakan hasil penghitungan jumlah rerata osteoblas dalam satu lapangan pandang mikroskop dengan pembesaran 400 kali, penghitungan jumlah rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β pengukuran kadar alkali fosfatase dalam serum darah, pengukuran tebal kalus dengan menggunakan *ocular micrometer (Graticule)* yang mempunyai ketelitian sampai 0,01 mm. Data baku ini kemudian disusun dan diolah dengan bantuan komputer menggunakan program pengolah data SPSS versi 12.0

1. Data Penelitian

Seluruh hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini dikelompokkan dengan teknik (*random sampling*) menjadi 6 kelompok, yaitu :

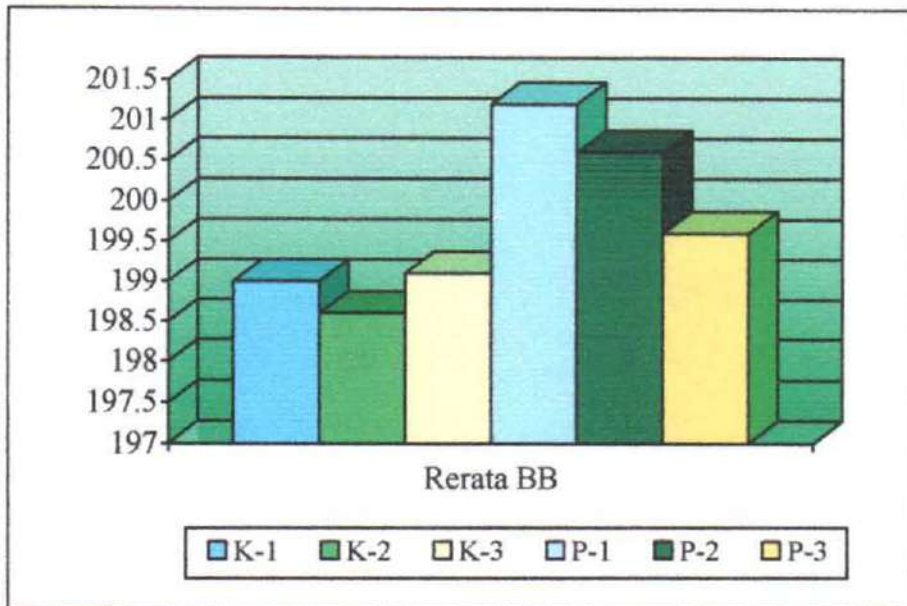
1. Kelompok kontrol K-1: kelompok hewan coba yang tidak mendapat perlakuan penyinaran laser energi rendah dan dievaluasi pada akhir minggu ke-1.
2. Kelompok kontrol K-2 : kelompok hewan coba yang tidak mendapat perlakuan penyinaran laser energi rendah dan dievaluasi pada akhir minggu ke-2
3. Kelompok kontrol K-3: kelompok hewan coba yang tidak mendapat perlakuan terapi penyinaran laser energi rendah dan dievaluasi pada akhir minggu ke-3.

4. Kelompok perlakuan P-1: kelompok hewan coba yang mendapat perlakuan berupa penyinaran laser energi rendah sebesar 0,5 joule selama 1 minggu secara terus menerus dan dievaluasi pada akhir minggu ke-1.
5. Kelompok perlakuan P-2: kelompok hewan coba yang mendapat perlakuan berupa penyinaran laser energi rendah sebesar 0,5 joule selama 2 minggu dan dievaluasi pada akhir minggu ke-2.
6. Kelompok perlakuan P-3: kelompok hewan coba yang mendapat perlakuan berupa penyinaran laser energi rendah sebesar 0,5 joule selama 3 minggu dan dievaluasi pada akhir minggu ke-3.

Sebelum perlakuan, semua hewan coba baik yang ada dalam kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan dilakukan penimbangan berat badan dengan menggunakan timbangan *torsion balance*. Adapun data umur dan berat badan hewan percobaan diperoleh data seperti yang tercantum pada lampiran 1.

Tabel 5.1 : Data umur (bln) dan berat badan (gr) yang diukur dengan timbangan *torsion balance* dari tiap-tiap kelompok tikus percobaan.

Kelompok	N	Umur (Bln)	BB Minimum	BB Maximum	Rata-rata
K-1	10	3	190	205	199,0
K-2	10	3	190	204	198,6
K-3	10	3	194	202	199,1
P-1	10	3	196	205	201,2
P-2	10	3	196	204	200,6
P-3	10	3	194	203	199,6



Grafik 5.1 Rerata berat badan tikus pada kelompok Kontrol-1 (K-1), Kontrol-2 (K-2), Kontrol-3 (K-3), Perlakuan-1 (P-1), Perlakuan-2 (p-2) dan Perlakuan-3 (p-3).

Setelah mendapat perlakuan terapi penyinaran laser energi rendah tiap hari secara terus menerus selama 3 minggu, diperoleh data rerata osteoblas dalam satu lapangan pandang, rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , kadar alkali fosfatase serum sebelum dan selama penelitian dan rerata tebal kalus seperti yang ditunjukkan pada lampiran 2.

Analisis Data dan Hasil Penelitian

Data hasil penelitian selanjutnya dianalisa secara deskriptif yang bertujuan untuk memperoleh gambaran yang lebih jelas mengenai distribusi dan simpangan baku dari masing-masing variabel penelitian. Hasil statistik deskriptif terhadap jumlah rerata osteoblas dalam satu lapangan pandang, jumlah rerata osteoblas yang mengekspresikan

TGF- β dalam satu lapangan pandang, kadar alkali fosfatase dan tebal kalus tampak seperti yang tercantum pada tabel 5.2 di bawah ini.

Tabel 5.2: Statistik deskriptif jumlah osteoblas (plp), jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp), kadar alkali fosfatase (u/ltr) dan tebal kalus (μm) dari tiap-tiap kelompok.

Kel	Data	Jml osteoblas (plp)	Jml osteoblas ekspresif TGF- β (plp)	Kadar alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (μm)
K.1	Mean	19.4200	0.1600	93.000	9.2600
	Std.deviasi	1.5361	0.1578	7.8599	0.7604
	N	10	10	10	10
K.2	Mean	25.0400	0.5600	123.000	15.3200
	Std.deviasi	3.3676	.3373	12.000	.8011
	N	10	10	10	10
K.3	Mean	31.4600	1.0600	145.200	22.3400
	Std.deviasi	2.7032	0.2319	22.1500	2.4368
	N	10	10	10	10
P.1	Mean	21.7400	.4800	80.1000	19.4400
	Std.deviasi	2.3191	0.3425	6.8386	1.0987
	N	10	10	10	10
P.2	Mean	37.3200	1.9600	108.5000	33.0600
	Std.deviasi	1.2372	0.6381	13.4102	2.2589
	N	10	10	10	10
P.3	Mean	48.4200	3.7200	149.000	43.4600
	Std.deviasi	1.6478	1.2831	29.5597	4.7245
	N	10	10	10	10

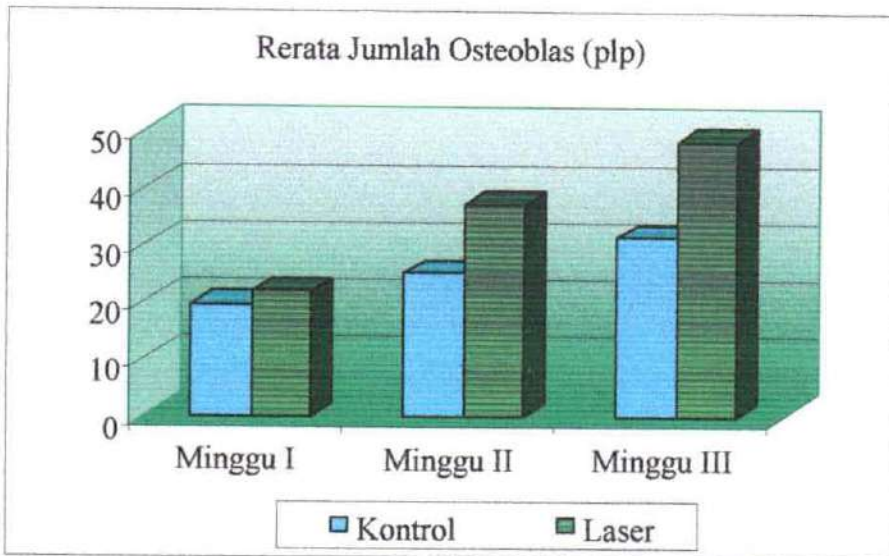


Fig 5.2: Rerata osteoblas yang dihitung dalam satu lapangan pandang mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Terlihat pada kelompok yang disinari dengan laser energi rendah (warna merah) jumlah osteoblas lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol (warna biru).

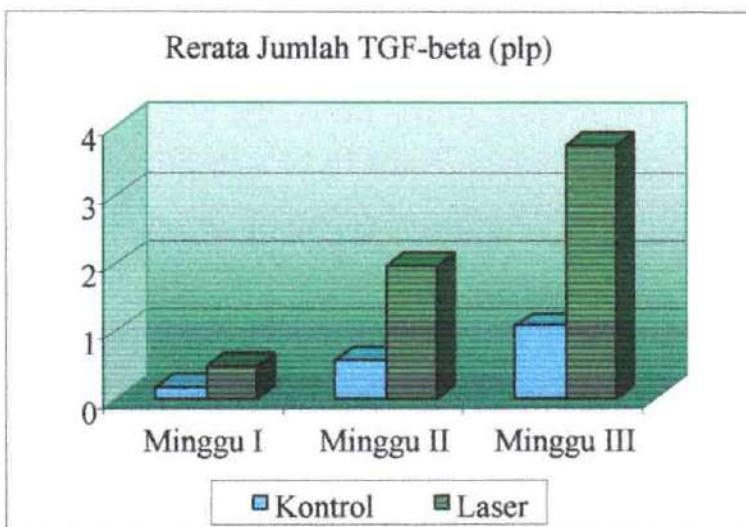


Fig 5.3: Rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β dihitung dalam satu lapangan pandang mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Terlihat pada kelompok yang disinari dengan laser energi rendah (warna merah) jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol (warna biru).

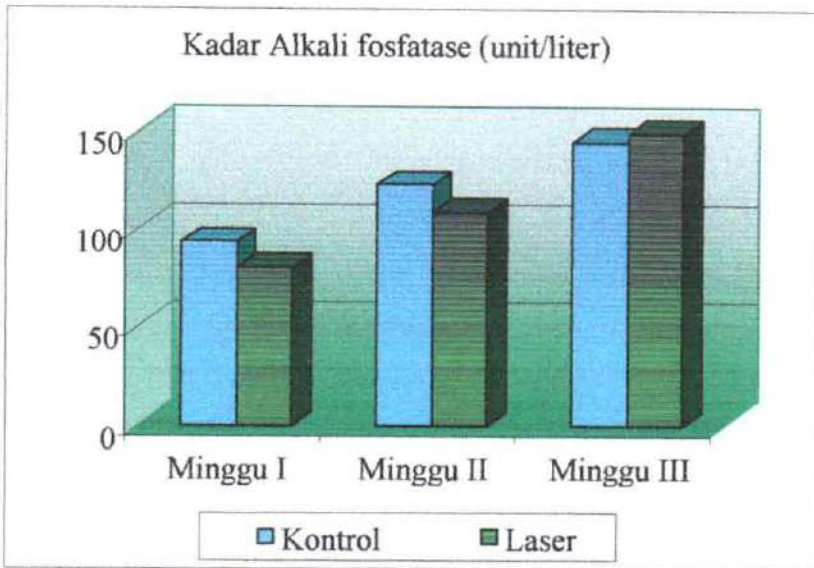


Fig 5.4: Kadar alkali fosfatase dalam darah tikus percobaan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan setelah dilakukan frakturasi pada tulang tibia kiri. Terlihat pada minggu I dan minggu II, kadar alkali fosfatase pada kelompok yang disinari dengan laser energi rendah (warna merah) lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol (warna biru muda). Setelah minggu III, peningkatan kadar alkali fosfatase lebih besar pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol.

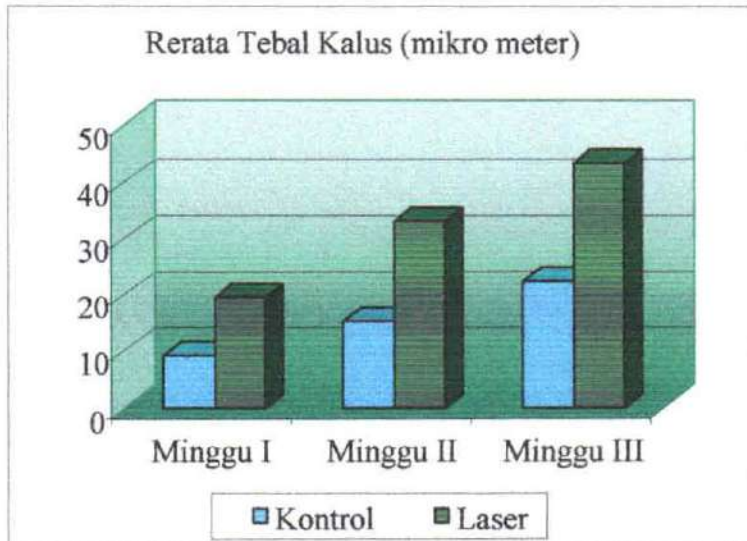


Fig 5.5: Rerata tebal kalus yang diukur dengan menggunakan ocular micrometer (graticule) pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Terlihat tebal kalus rata-rata lebih besar pada kelompok yang disinari dengan laser energi rendah (warna merah) dibandingkan kelompok kontrol (warna biru).

5. Hasil Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis ini berdistribusi normal atau tidak, karena pengujian dengan menggunakan statistik parametrik mensyaratkan data harus berdistribusi normal.

Uji normalitas terhadap rerata osteoblas, rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , kadar alkali fosfatase dan rerata tebal kalus yang dilakukan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test* menghasilkan data seperti tampak pada tabel 5.4.

Tabel 5.3 : Hasil Uji Normalitas Jumlah Osteoblas (plp), Jumlah Osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp), dan Tebal Kalus (mm) dari tiap-tiap kelompok (lihat lampiran 6).

Kel	p Osteoblas	p Osteoblas ekspresi TGF- β	p Alkali fosfatase	P Tebal kalus
K.1	0.974	0.587	0.819	0.447
K.2	0.997	0.574	0.981	0.511
K.3	0.612	0.809	0.981	0.691
P.1	0.768	0.992	0.997	0.674
P.2	0.627	0.983	0.513	0.502
P.3	0.544	0.756	0.957	0.772

Dari hasil *Kolmogorov-Smirnov test* seperti yang tercantum pada tabel diatas, menunjukkan bahwa jumlah osteoblas, jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , kadar fosfatase dan tebal kalus dari tiap-tiap kelompok yang diuji berdistribusi normal. Hal ini terlihat dari besarnya nilai p dari tiap-tiap kelompok > 0.05 .

Demikian pula hasil uji *Kolmogorov-Smirnov test* untuk kelompok data respon padatan tulang, respon ketebalan tulang kortikal maupun data respon kekuatan tulang dari berbagai dosis yang diuji berdistribusi normal ($p > 0,05$).

5.4. Hasil Uji Homogenitas

Untuk melakukan analisis dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) varian sampel harus sama, karena jika berbeda maka pengambilan sampel akan bias. Untuk itu dilakukan uji homogenitas dengan alat uji *Levene's test* yang berpedoman pada nilai signifikansi atau nilai probabilitas (p). Jika $p < 0,05$ berarti distribusi data varian sampel tersebut tidak homogen dan jika $p > 0,05$ berarti data tersebut berdistribusi homogen.

Tabel 5.4: Hasil Uji Homogenitas Berat badan (gr)

Variabel	F	P
Berat badan (gr)	0.607	0.695

Dari data hasil uji homogenitas (*Levene's test*) berat badan di atas didapatkan bahwa hewan coba yang dipergunakan dalam penelitian ini mempunyai nilai signifikansi atau probabilitas (p) $> 0,05$ yaitu 0.695, sehingga hewan coba yang dipakai dalam penelitian ini mempunyai varian populasi yang sama.

5.5. Hasil Uji Beda Variabel Kalus

Untuk melihat pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan kalus pada minggu I, minggu II dan minggu III dilakukan uji beda dengan *independent sample t-test* terhadap masing-masing kelompok sampel. Uji ini dilakukan dengan cara membandingkan rata-rata pertumbuhan kalus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan seperti tampak pada tabel 5.6 di bawah ini.

bel 5.5 : Hasil Uji Beda terhadap pertumbuhan kalus antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pada minggu I, minggu II dan minggu III.

Variabel	F	P
Kalus minggu I	2.052	0.169
Kalus minggu II	14.478	0.001
Kalus minggu III	7.227	0.015

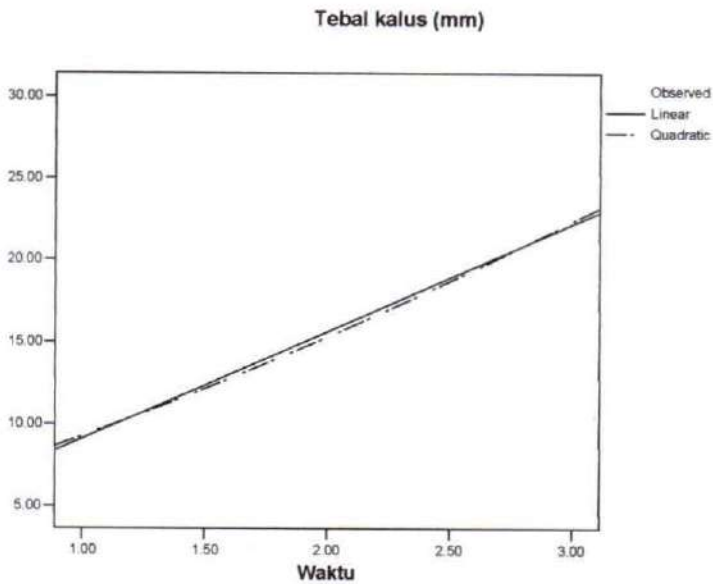
Hasil uji statistik dengan menggunakan *independent sample t-test* menunjukkan tidak ada pengaruh yang bermakna terhadap pertumbuhan kalus pada minggu I antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan ($p = 0,169$), tetapi pada minggu II dan minggu III terdapat perbedaan yang bermakna antara kontrol dan perlakuan (minggu I : $p = 0,001$ dan minggu II : $p = 0,015$).

Setelah diketahui bahwa ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan perlakuan terhadap pertumbuhan kalus pada minggu II dan minggu III, selanjutnya dilakukan uji estimasi pertumbuhan kalus terhadap lamanya waktu penyinaran dengan menggunakan analisa regresi. Uji ini bertujuan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan kalus baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan sesuai dengan bertambahnya waktu. Dari hasil analisa regresi yang dilakukan didapatkan hasil seperti yang tercantum pada tabel 5.6.

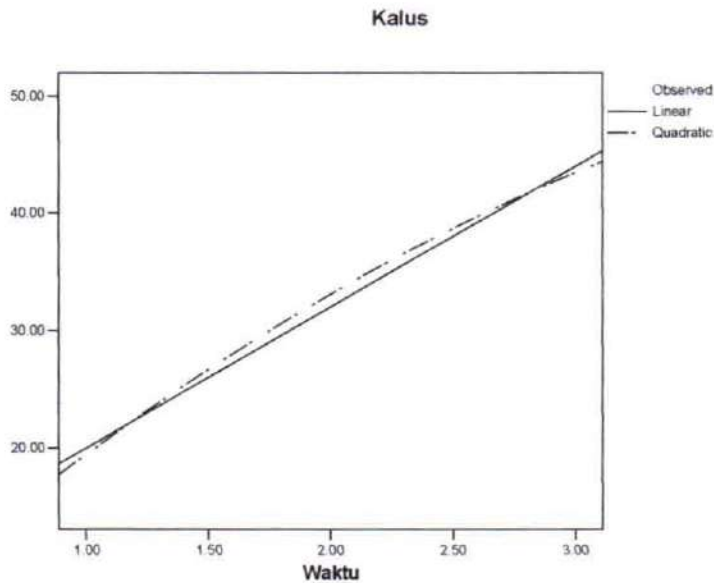
bel 5.6: Hasil Analisa Regresi terhadap pertumbuhan kalus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

kelompok	Metode	Konstanta	Koefisien regresi	T	Signifikansi T
Kontrol	Linier	2.560000	6.540000	19.056	0.0000
	Kuadratik	4.160000	0.480000	0.802	0.4294
Laser	Linier	7.966667	12.010000	17.140	0.0000
	Kuadratik	2.600000	-1.610000	-1.346	0.1896

Dari tabel di atas didapatkan koefisien regresi pada kelompok kontrol dengan metode linier sebesar 6,54, sedangkan pada kelompok perlakuan nilainya hampir dua kali dari kontrol yaitu 12,01. Hal ini berarti bahwa dengan waktu yang sama pertumbuhan kalus pada kelompok perlakuan lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol.



Grafik 5.6: Grafik pertumbuhan kalus pada kelompok kontrol



Grafik 5.7: Grafik pertumbuhan kalus pada kelompok penyinaran dengan laser energi rendah.

4 Hasil Analisis Multi Varian

Analisis multi varian ini ditujukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pengaruh perlakuan antar kelompok maupun antar waktu terhadap variabel tergantung.

Ini dilakukan dengan menguji variabel tergantung yaitu jumlah osteoblas, jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , kadar alkali fosfatase dan tebal kalus menggunakan *multivariate tests*. Hasil dari uji ini tampak seperti yang tercantum pada tabel 5.8.

Tabel 5.7: Hasil Uji Multivariat untuk variabel osteoblas (plp), osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp), alkali fosfatase (u/ltr) dan tebal kalus (mm) dilihat dari pengaruh antar waktu dan kelompok.

Efek	Test signifikansi	F	P
Waktu	Hotelling's Trace	212,642	0,000
Kelompok	Hotelling's Trace	270,168	0,000
Waktu*Kelompok	Hotelling's Trace	25,421	0,000

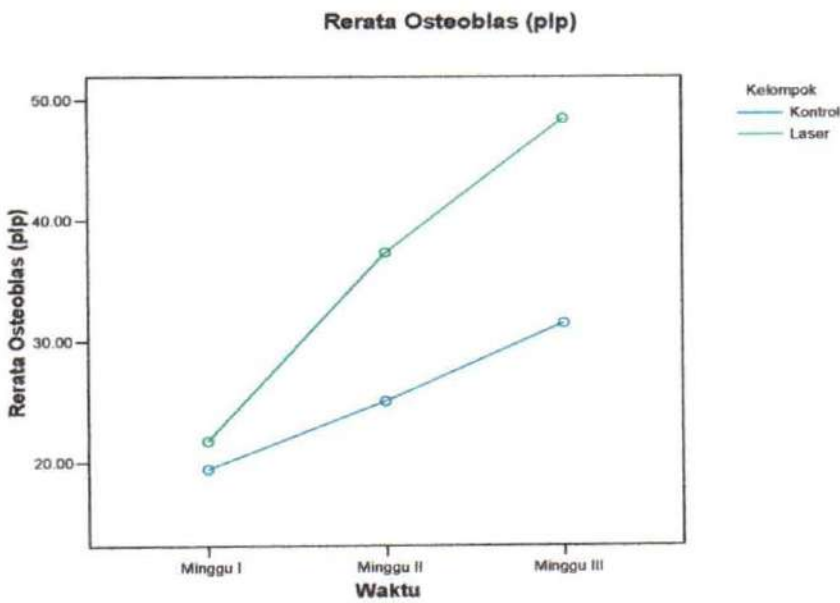
Dari hasil perhitungan dengan menggunakan uji multivariat menunjukkan bahwa dapat perbedaan rerata hasil pengukuran baik jumlah osteoblas, jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , kadar alkali fosfatase maupun tebal kalus pada berbagai waktu dan berbagai kelompok dengan $p=0,000$ untuk waktu ($p<0,05$) dan $p=0,000$ untuk kelompok ($p<0,05$). Begitu juga waktu dan kelompok secara bersama-sama mempengaruhi secara bermakna terhadap jumlah osteoblas (plp), jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , kadar alkali fosfatase maupun tebal kalus dengan $p=0,000$ ($p<0,05$).

Setelah diketahui bahwa ada perbedaan pengaruh yang bermakna diantara keenam kelompok sampel pada keseluruhan variabel, selanjutnya akan dianalisis antar kelompok sampel mana yang berbeda dengan menggunakan uji beda pengaruh secara individu melalui *Pairwise comparisons test*. Hasil dari uji tersebut tampak seperti yang tercantum pada tabel 5.9.

Tabel 5.8: Hasil perhitungan uji multivariat untuk variabel osteoblas (plp), osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp), alkali fosfatase (u/ltr) dan tebal kalus (mm) dibandingkan dengan waktu dan kelompok.

Efek	Variabel Tergantung	F	P
Waktu	Osteoblas	368.192	.000
	TGF- β	54.550	.000
	Alkali fosfatase	61.240	.000
	Tebal kalus	288.804	.000
Kelompok	Osteoblas	325.171	.000
	TGF- β	81.183	.000
	Alkali fosfatase	3.100	.084
	Tebal kalus	671.983	.000
Waktu * Kelompok	Osteoblas	54.754	.000
	TGF- β	17.413	.000
	Alkali fosfatase	1.715	.190
	Tebal kalus	26.302	.000

Dari tabel di atas terlihat bahwa waktu berpengaruh secara signifikan terhadap pengaruh variabel tergantung yang ditunjukkan dengan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$), tetapi kelompok tidak mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap alkali fosfatase baik secara sendiri ($p=0,084$ ($p>0,05$)) maupun secara bersama-sama dengan waktu ($p=0,190$ ($p>0,05$)). Hal ini berarti tidak terdapat perbedaan kadar alkali fosfatase yang bermakna antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan akibat penyinaran dengan laser energi rendah.



Grafik 5.8: Grafik rerata osteoblas (plp) pada kelompok kontrol (warna biru) dan kelompok perlakuan (warna hijau) minggu I, II dan III.

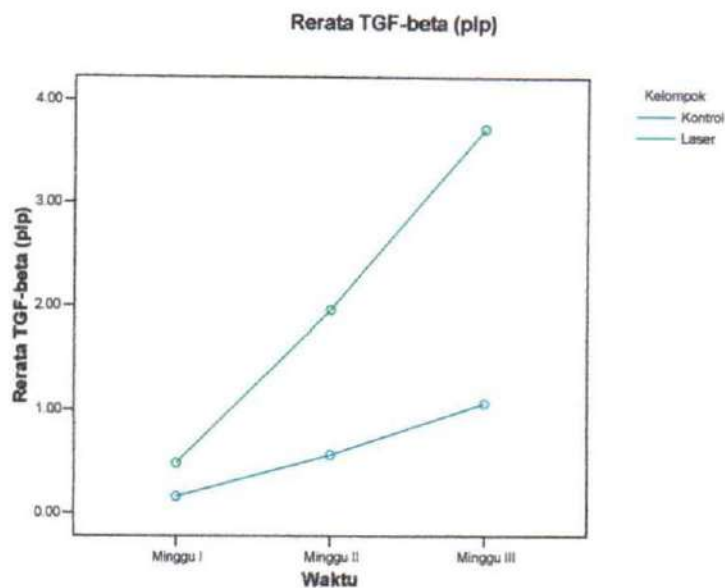


Fig 5.9: Grafik rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (p/p) pada kelompok kontrol (warna biru) dan kelompok perlakuan (warna hijau) minggu I, II dan III.

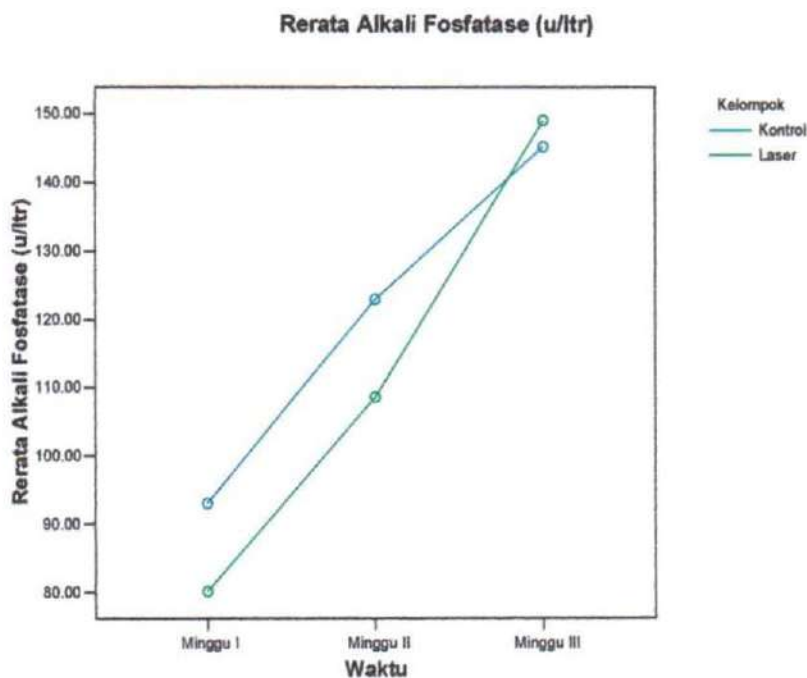
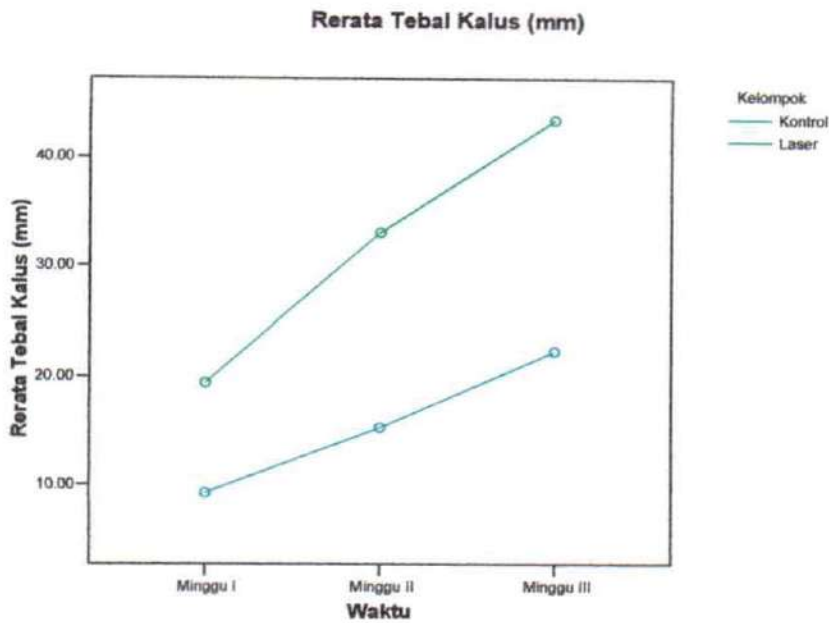


Fig 5.10: Grafik rerata kadar alkali fosfatase (u/ltr) pada kelompok kontrol (warna biru) dan kelompok perlakuan (warna hijau) minggu I, II dan III.



Grafik 5.11: Grafik rerata pertambahan tebal kalus (mm) pada kelompok kontrol (warna merah) dan kelompok perlakuan (warna hijau) minggu I, II dan III.

Untuk melihat pengaruh antar waktu terhadap respon osteoblas, respon osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , respon alkali fosfatase dan respon tebal kalus dilakukan dengan menggunakan uji univariat. Dari uji yang dilakukan didapatkan pengaruh yang signifikan terhadap keseluruhan variabel tergantung dengan $p=0,000$ ($p<0,05$) seperti yang tercantum pada tabel 5.10 di bawah ini.

Tabel 5.9: Hasil Uji Univariat untuk variabel osteoblas (plp), osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp), alkali fosfatase (u/ltr) dan tebal kalus (mm).

Efek	Variabel dependen	F	P
Waktu	Osteoblas	559.938	.000
	TGF- β	36.361	.000
	Alkali fosfatase	32.689	.000
	Tebal kalus	152.046	.000

Setelah diketahui bahwa ada pengaruh antar waktu pada kelompok perlakuan, selanjutnya dilakukan uji beda dengan menggunakan *independent sample t-test* terhadap variabel tergantug osteoblas, osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , alkali fosfatase dan tebal kalus pada minggu I, minggu II dan minggu III. Dari uji beda yang dilakukan didapatkan hasil seperti yang tercantum pada tabel 5.11.

Tabel 5.10: Hasil Uji *Independent Sample T-test* variabel tergantug respon osteoblas, respon osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , respon alkali fosfatase dan respon tebal kalus pada minggu I, II dan III.

Variabel	Minggu I		Minggu II		Minggu III	
	F	p	F	p	F	p
Osteoblas	1,633	0,218	6,691	0,019	7,400	0,014
TGF- β	6,260	0,022	4,721	0,043	21,721	0,000
Alkali fosfatase	0,028	0,870	0,641	0,434	1,011	0,328
Tebal kalus	2,052	0,169	14,478	0,001	7,227	0,015

Dari tabel di atas terlihat bahwa pada minggu I penyinaran dengan laser energi rendah tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap variabel osteoblas $\{p=0,218 (>0,05)\}$, alkali fosfatase $\{p=0,870 (>0,05)\}$ dan tebal kalus $\{p=0,169 (>0,05)\}$, kecuali pada variabel osteoblas ekspresi TGF- β yang ditunjukkan dengan nilai $p < 0,022 (<0,05)$. Pada minggu II dan minggu III penyinaran dengan laser energi rendah terhadap kelompok perlakuan memberikan pengaruh yang bermakna kecuali pada alkali fosfatase (minggu I: $p=0,870$, minggu II: $p=0,434$, minggu III: $p=0,328$).

Besarnya respon perubahan variabel osteoblas (plp), osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp), alkali fosfatase (u/ltr) dan tebal kalus (mm) akibat penyinaran dengan laser energi rendah dapat diketahui melalui uji analisis regresi linier masing-masing variabel. Analisis ini digunakan untuk tujuan peramalan, dimana hasil analisis ini akan dapat digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh sebuah

variabel bebas (laser energi rendah) terhadap variabel tergantung (osteoblas, osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , alkali fosfatase dan tebal kalus).

Hasil analisis regresi linier antara perlakuan penyinaran laser energi rendah dengan osteoblas, osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , alkali fosfatase dan tebal tampak pada tabel 5.12.

Tabel 5.11 Hasil Analisis Regresi Linier terhadap osteoblas (plp), osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp), alkali fosfatase (u/ltr) dan tebal kalus (mm).

Variabel	Konstanta	Koefisien regresi	p
Osteoblas	9,147	13,340	0,000
TGF- β	-1,187	1,620	0,000
Alkali fosfatase	43,633	34,450	0,000
Tebal kalus	7,967	12,010	0,000

Dari hasil analisis regresi linier tersebut didapatkan $p=0,000$ ($p<0,05$) bagi keseluruhan variabel tergantung. Hal ini menjelaskan bahwa penyinaran dengan laser energi rendah larutan berpengaruh secara bermakna terhadap kualitas kalus.

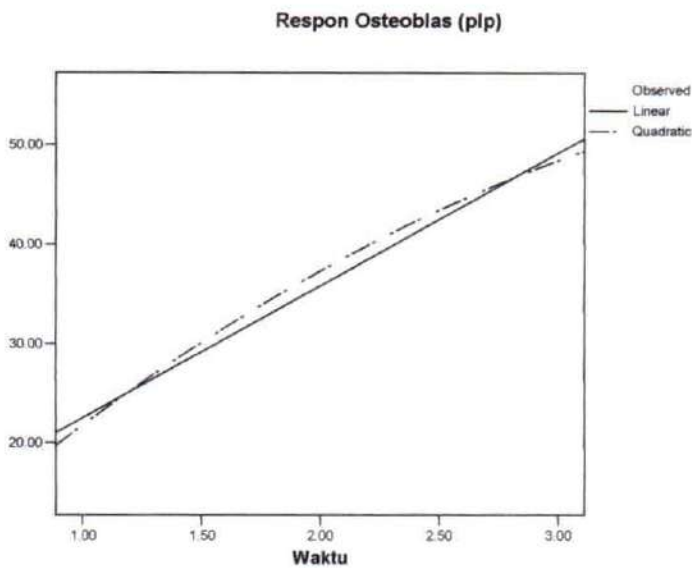
estimating equation (persamaan regresi) yang didapat dari analisis regresi diatas adalah sebagai berikut :

Rerata osteoblas (plp)

$$\text{Rerata osteoblas (plp)} = 9,147 + (13,340 \times \text{lama penyinaran})$$

Dimana rerata osteoblas dalam satuan lapangan pandang (plp) dan lama penyinaran dalam minggu. Konstanta sebesar 9,147 menyatakan bahwa jika tidak ada perlakuan berupa penyinaran dengan laser energi rendah ($X=0$) maka hasil pengukuran rerata osteoblas per lapangan pandang yang diharapkan adalah 9,147. Sedangkan koefisien regresi sebesar 13,340 menyatakan bahwa setiap penambahan waktu

penyinaran selama 1 minggu, akan meningkatkan rerata osteoblas per lapangan pandang sebesar 13,340.

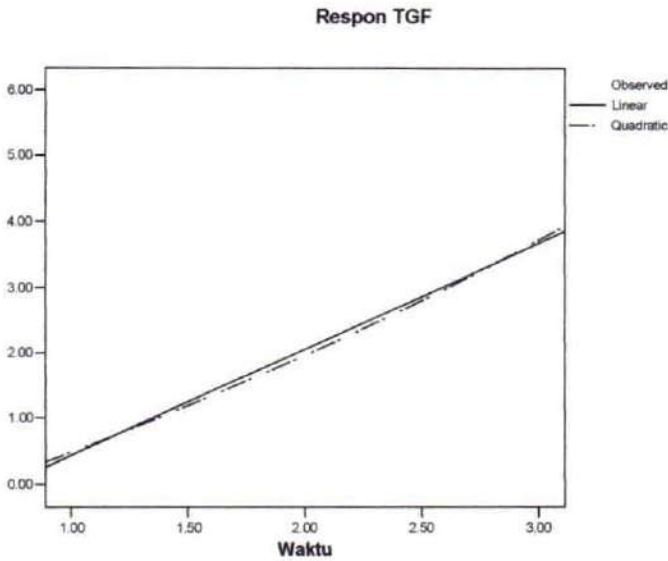


Grafik 5.12: Hubungan antara lama penyinaran laser energi rendah dengan rerata osteoblas

Rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp)

$$\text{TGF-}\beta = -1,187 + (1,162 \times \text{lama penyinaran})$$

Dimana rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β dalam satuan lapangan pandang dan lama penyinaran dalam minggu. Konstanta sebesar -1,187 menyatakan bahwa jika tidak ada perlakuan berupa penyinaran dengan laser energi rendah ($X=0$) maka hasil pengukuran Rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp) yang diharapkan adalah 1,187. Karena konstanta adalah bilangan tetap maka tanda “-“ (negatif) di depan angka tidak diperhitungkan. Koefisien regresi sebesar 1,162 menyatakan bahwa setiap penambahan waktu penyinaran selama 1 minggu akan meningkatkan rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp) sebesar 1,162.



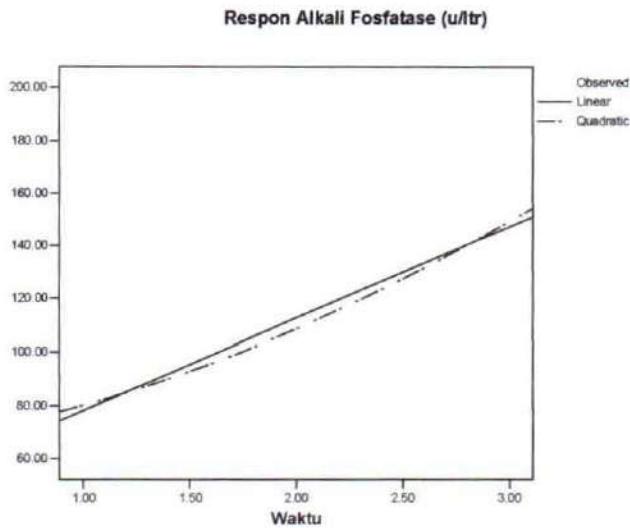
grafik 5.13: Hubungan antara lama penyinaran laser energi rendah dengan rerata proliferasi sel yang mengekspresikan TGF- β

Alkali fosfatase.

$$\text{Alkali fosfatase} = 43,633 + (34,450 \times \text{lama penyinaran})$$

Dimana alkali fosfatase dalam unit per liter dan lama penyinaran dalam minggu.

konstanta sebesar 43,633 menyatakan bahwa jika tidak ada perlakuan berupa penyinaran dengan laser energi rendah ($X=0$) maka hasil pengukuran kadar alkali fosfatase yang diharapkan adalah 43,633 u/ltr. Sedangkan koefisien regresi sebesar 34,45 menyatakan bahwa setiap penambahan waktu penyinaran selama 1 minggu akan meningkatkan kadar alkali fosfatase sebesar 34,45 u/ltr.



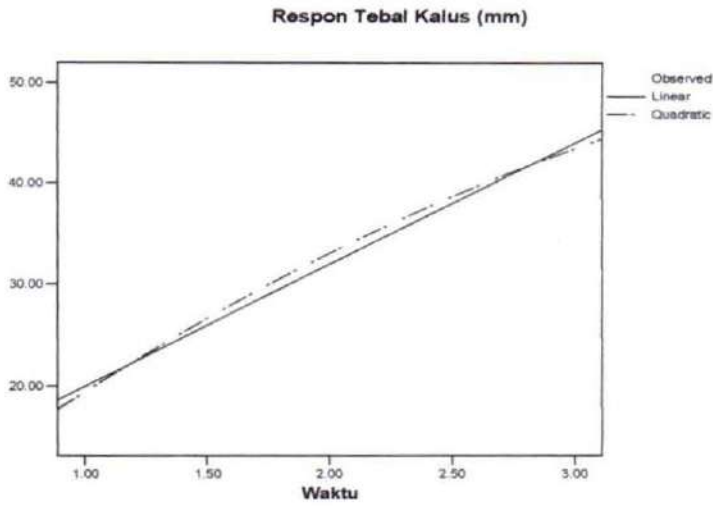
afik 5.14: Hubungan antara lama penyinaran laser energi rendah dengan alkali
ifosfatase

Tebal kalus.

$$\text{Tebal kalus} = 7,967 + (12,01 \times \text{lama penyinaran})$$

Dimana tebal kalus dalam milimeter dan lama penyinaran dalam minggu.

onstanta sebesar 7,967 menyatakan bahwa jika tidak ada perlakuan berupa penyinaran
ngan laser energi rendah ($X=0$) maka hasil pengukuran tebal kalus yang diharapkan
alah 7,967 mm. Sedangkan koefisien regresi sebesar 12,01 menyatakan bahwa setiap
nambahan waktu penyinaran selama 1 minggu akan meningkatkan tebal kalus sebesar
01 mm.



afik 5.15: Hubungan antara lama penyinaran laser energi rendah dengan pertambahan tebal kalus.

Dari keempat persamaan regresi tersebut, jelas terlihat bahwa setiap penambahan lama penyinaran selama 1 minggu akan mengakibatkan peningkatan jumlah rerata osteoblas, jumlah rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , alkali fosfatase dan tebal kalus.

BAB 6

PEMBAHASAN

Pembahasan pada bab ini diuraikan berdasarkan analisis hasil penelitian dan dihubungkan dengan konsep dan teori yang sudah ada. Pendekatan pembahasan di bawah ini dilakukan dengan menunjuk rumusan masalah dan hipotesis yang telah dibuat pada bab sebelumnya.

1. Metodologi Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan pengaruh sinar laser energi rendah terhadap proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* strain *Wistar*). Bentuk penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris karena adanya perlakuan berupa penyinaran dengan laser energi rendah terhadap salah satu kelompok yang telah terpilih sebagai kelompok perlakuan melalui randomisasi. Randomisasi sampel merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi oleh suatu penelitian eksperimen murni (*true eksperimental*) disamping kontrol terhadap variabel perancu (Soekidjo Notoatmojo, 2002). Kontrol terhadap variabel perancu dapat dilakukan dengan cara menggunakan unit eksperimen yang homogen, mencegah semaksimal mungkin masuknya faktor-faktor dari luar dan menggunakan rancangan penelitian yang sistematis.

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *The Post-test only Control Group Design*, karena pengaruh perlakuan (intervensi) akibat penyinaran dengan laser energi rendah terhadap kelompok perlakuan diukur pada akhir penelitian yang

anjutnya dibandingkan dengan data dari kelompok kontrol. Dengan rancangan ini kita dapat melihat pengaruh langsung suatu intervensi terhadap kelompok perlakuan, tetapi kita tidak dapat menentukan seberapa besar perubahan itu terjadi sebab pretes tidak dilakukan untuk menentukan data awal.

Bentuk intervensi yang dilakukan terhadap hewan coba pada penelitian ini berupa iradiasi langsung garis fraktur tulang tibia tikus menggunakan laser energi rendah dengan dosis sebesar 0,5 joule. Pemilihan dosis sebesar 0,5 joule didasarkan pada besarnya dosis minimal yang masih efektif untuk mendapatkan efek biostimulasi dari laser (Laakso et al., 1993).

3.1. Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* jantan dengan usia antara 2 – 3 bulan dan berat badan antara 200 – 300 gram. Alasan pemilihan hewan coba ini adalah karena *Rattus norvegicus* tahan terhadap segala perlakuan, murah, mudah didapat dan mudah pemeliharaannya dibandingkan dengan hewan coba lainnya. Pada usia 2 – 3 bulan, berat badannya dapat mencapai 200 – 300 gram. Pada usia ini *Rattus norvegicus* digolongkan di dalam usia dewasa muda, dimana pada usia tersebut mereka tahan terhadap penyakit, serta cepat dalam merespon penyembuhan luka (Malole, 1989).

Sesuai dengan rumus dari Higgins dan Klinbaum (1985) tentang besar sampel, maka didapatkan jumlah sampel minimal dengan $\alpha = 0,05$ dan $\beta = 0,10$ adalah 9. Jumlah sampel keseluruhan yang digunakan pada penelitian ini adalah 60 ekor *Rattus norvegicus* yang dibagi menjadi 6 kelompok, sehingga tiap kelompok terdiri dari 10 ekor. Sampai dengan selesainya penelitian tidak ada hewan coba yang drop out atau mati. Dengan

jumlah besar sampel yang dipakai untuk penelitian ini sudah memenuhi kriteria jumlah sampel minimal.

2. Frakturasi Tulang Tibia Kiri Tikus Putih Jantan

Pemilihan tulang tibia kiri 1/3 bagian tengah sebagai tempat frakturasi didasarkan pada kemudahan untuk melakukan tindakan bedah karena dekat dengan permukaan kulit sehingga tidak terlalu banyak melakukan kerusakan jaringan sehingga kadar trauma yang diterima tikus tidak besar. Fraktur pada tulang tibia juga relatif lebih mudah terjadi dibanding tulang dibagian tubuh lainnya.

3. Imobilisasi Tulang Tibia

Untuk mengurangi nyeri dan mempercepat terjadinya penyembuhan fraktur, maka setelah dilakukan frakturasi dilanjutkan dengan immobilisasi memakai *plaster gips* yang melewati dua sendi, yaitu: sendi paha dan sendi lutut. Tepat pada daerah *fracture* dibuat lubang dengan diameter $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$ cm untuk tempat masuknya *beam* dari laser energi rendah. Diharapkan dengan immobilisasi ini kedua ujung fragmen tulang akan tetap terfiksasi sehingga penyembuhan fraktur akan lebih cepat terjadi.

4. Penyinaran Laser Energi Rendah

Hewan coba dari kelompok perlakuan disinari dengan laser energi rendah sebesar 1 joule selama 1 menit setiap hari terus menerus sampai 3 minggu. Pada akhir minggu pertama dilakukan evaluasi penghitungan rerata osteoblas, penghitungan rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , pengukuran kadar alkali fosfatase dan pengukuran tebal

us pada kelompok K-1 dan P-1. Penghitungan rerata osteoblas dan penghitungan rata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β dilakukan dengan cara menghitung jumlah osteoblas yang terdapat pada satu lapangan pandang mikroskop cahaya memakai pembesaran 400 sebanyak 5 kali pengamatan. Hasil dari 5 kali pengamatan ini dijumlahkan kemudian diambil nilai rata-ratanya. Pengukuran kadar alkali fosfatase dilakukan dengan cara mengambil serum darah tikus dari hasil pengendapan darah yang diambil dari pembuluh darah besar (*vena cava superior*), kemudian diukur melalui alat di Laboratorium Kesehatan Daerah (Labkesda) Jawa Timur. Pengukuran tebal kalus dilakukan secara mikroskopis menggunakan alat pengukur *oculometre (graticule)* dengan tingkat ketelitian 0,01 mm. Seperti halnya dengan jumlah osteoblas per lapangan pandang, pengamatan tebal kalus juga dilakukan sebanyak 5 kali pengamatan kemudian diambil nilai rata-ratanya. Tempat pengukuran tebal kalus dilakukan dengan cara mengukur jarak terjauh dari tepi luar cortex sampai batas terluar dari kalus.

5. Pembuatan Sediaan Histologi dan Imunohistokimia

Setelah perlakuan penyinaran laser energi rendah selesai dilaksanakan, maka hewan coba dikorbankan (*sacrifice*) kemudian dilakukan pembuatan sediaan histologi dan imunohistokimia dari potongan distal tibia. Pemotongan sediaan dilakukan dengan *rotome* pada sumbu sagital daerah *weight bearing Rattus norvegicus*, yaitu pada sudut -135° dari sumbu panjang tulang femur.

Masing-masing potongan kemudian dibuat menjadi dua sediaan, yaitu untuk sediaan histologi yang diwarnai dengan HE, dan sediaan imunohistokimia yang diwarnai dengan antibodi primer TGF- β pada tikus (*rat*). Sediaan histologi dibuat

untuk menghitung jumlah osteoblas dan mengukur tebal kalus, sedangkan sediaan imunohistokimia untuk menghitung jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β . Perbedaan dari sediaan histologi maupun sediaan imunohistokimia dapat dilihat jelas perbedaan antara masing-masing kelompok pada tiap-tiap variabel.

Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian yang telah diolah dan dianalisis dengan metode statistik diinterpretasi lebih lanjut sesuai dengan tujuan dan hipotesis penelitian yang telah dibuat. Interpretasi data ini bertujuan untuk mengambil kesimpulan yang lebih umum sehingga dapat digeneralisasikan secara jelas tentang arti dari hasil penelitian tersebut (*statistic inferensial*). Pembahasan ini juga dimaksudkan untuk menjelaskan permasalahan penelitian yang diutarakan pada awal penelitian sehingga tujuan penelitian dapat tercapai.

5.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui bahwa data yang diperoleh pada hasil penelitian berdistribusi normal. Hal ini dilakukan untuk memenuhi salah satu persyaratan pengujian parametrik, yaitu: normalitas data. Uji normalitas dilakukan terhadap variabel tergantung, yaitu: jumlah osteoblas per satuan lapangan pandang, jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , kadar alkali fosfatase dan tebal kalus. Uji ini juga dilakukan terhadap variabel tergantung yang terdapat pada kelompok perlakuan.

Dari hasil uji normalitas yang dilakukan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Tests* terhadap keempat variabel tersebut di atas diperoleh nilai $p > 0,05$ (Tabel 5.4). Hal ini

tuk menghitung jumlah osteoblas dan mengukur tebal kalus, sedangkan sediaan imunohistokimia untuk menghitung jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β . Baik dari sediaan histologi maupun sediaan imunohistokimia dapat dilihat jelas perbedaan antara masing-masing kelompok pada tiap-tiap variabel.

2 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian yang telah diolah dan dianalisis dengan metode statistik interpretasi lebih lanjut sesuai dengan tujuan dan hipotesis penelitian yang telah dibuat. Interpretasi data ini bertujuan untuk mengambil kesimpulan yang lebih umum sehingga dapat digeneralisasikan secara jelas tentang arti dari hasil penelitian tersebut (*statistic inferensial*). Pembahasan ini juga dimaksudkan untuk menjelaskan permasalahan penelitian yang diutarakan pada awal penelitian sehingga tujuan penelitian dapat tercapai.

2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui bahwa data yang diperoleh pada hasil penelitian berdistribusi normal. Hal ini dilakukan untuk memenuhi salah satu persyaratan pengujian parametrik, yaitu: normalitas data. Uji normalitas dilakukan terhadap variabel tergantung, yaitu: jumlah osteoblas per satuan lapangan pandang, jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , kadar alkali fosfatase dan tebal kalus. Uji ini juga dilakukan terhadap variabel tergantung yang terdapat pada kelompok perlakuan.

Dari hasil uji normalitas yang dilakukan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Tests* terhadap keempat variabel tersebut di atas diperoleh nilai $p > 0,05$ (Tabel 5.4). Hal ini

artinya bahwa data keempat variabel tersebut adalah normal (Singgih Santoso, 2005), sehingga persyaratan uji statistik parametrik telah terpenuhi.

2.2 Pengaruh penyinaran laser energi rendah terhadap kecepatan pembentukan tulang

Penyinaran dengan laser energi rendah dikatakan dapat mempercepat proses penyembuhan fraktur tulang tibia tikus melalui peningkatan laju proliferasi osteoblas (Caravello Freitas, 2003). Hasil penelitian yang dilakukan oleh T.Yaakobi terhadap tulang tibia tikus percobaan didapatkan adanya peningkatan aktivitas osteoblas mulai hari ke-5 paska fraktur yang ditandai oleh meningkatnya kadar enzim alkali fosfatase dalam darah. Selain itu pada hari ke-9 sampai hari ke-18 didapatkan juga peningkatan kadar kalsium dua kali lebih besar pada kelompok dibandingkan kontrol pada daerah fraktur (Yaakobi, 1996). Pada penelitian lain disebutkan percepatan proses penyembuhan fraktur tulang disebabkan karena adanya peningkatan aktivitas makrofag pada daerah fraktur sehingga fase inflamasi lebih cepat selesai (Tang X.M, 1986).

Berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya, pada penelitian ini terlihat adanya penurunan kadar alkali fosfatase dibandingkan sebelum frakturasi baik pada kelompok kontrol maupun pada kelompok perlakuan. Hal ini terjadi karena pada awal frakturasi terjadi fase inflamasi dimana sel tulang termasuk osteoblas terutama di daerah *fracture* banyak mengalami nekrosis yang akan diabsorpsi oleh makrofag, tetapi setelah fase inflamasi selesai osteoblas kembali aktif berproliferasi dan mensekresi *growth factor* dan metabolit lainnya termasuk alkali fosfatase (Vincent J.Vigorita, 1999).

Sebelum tulang tibia tikus difrakturasi, rata-rata kadar alkali fosfatase dalam darah sebesar 173,8 unit/liter. Setelah dilakukan frakturasi, pada kelompok kontrol rata-rata kadar alkali fosfatase minggu I=93 unit/liter, minggu II=123 unit/liter, minggu III=145,2 unit/liter, sedangkan pada kelompok perlakuan rata-rata kadar alkali fosfatase minggu I=130,1 unit/liter, minggu II=108,5 unit/liter, minggu III=149 unit/liter (lampiran 4). Fakta ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Barushka O. et.al tahun 1995 pada tikus yang disinari dengan laser energi rendah. Mereka menggambarkan adanya peningkatan alkali fosfatase hampir dua kali lipat pada kelompok tikus yang disinari dengan laser dibandingkan dengan kelompok kontrol. Peningkatan alkali fosfatase juga diikuti oleh peningkatan kadar kalsium di daerah fraktur mulai hari ke-11 pembedahan.

Dari data di atas juga terlihat bahwa rata-rata kadar alkali fosfatase pada kelompok kontrol lebih besar dibandingkan dengan kelompok perlakuan, kecuali pada minggu ke-3 kelompok perlakuan sedikit lebih besar dari kelompok kontrol. Hal ini seolah-olah menggambarkan adanya pengaruh negatif dari laser energi rendah terhadap kadar alkali fosfatase. Tetapi bila kita lihat dari minggu II ke minggu III, peningkatan alkali fosfatase justru lebih banyak pada kelompok yang disinari dengan laser energi rendah, yaitu 149 unit/liter dibandingkan 145,2. Menurut Susan M.Day tahun 1999 dalam *Orthopaedic Basic Science : Bone Injury, Regeneration, and Repair*; aktivitas enzim proteolitik termasuk alkali fosfatase meningkat mulai hari ke-14 setelah fraktur dan mencapai puncak pada hari ke-14. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang ada, dimana mulai awal minggu II sudah terlihat peningkatan alkali fosfatase baik pada kontrol maupun perlakuan. Peningkatan

zim alkali fosfatase ini diperlukan oleh osteoblas untuk mendegradasi proteoglikan yang terdapat dalam matrik ekstra seluler dalam persiapan proses kalsifikasi.

Hasil analisis data yang dilakukan dengan uji *independent sample t-test* terhadap variabel tergantung tebal kalus menggambarkan adanya pengaruh yang signifikan bila dibandingkan dengan laser energi rendah. Hal ini terlihat dari besarnya nilai signifikansi p pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Pada minggu I penilaian, pertambahan tebal kalus pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak berbeda secara statistik ($p=0,169$ ($p>0,05$)). Perbedaan ketebalan kalus pada kelompok perlakuan mulai tampak pada minggu II ($p=0,010$) dan minggu III penyinaran ($p=0,015$). Hasil ini hampir sama dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Garavello I. et.al (*Journal of Histology and Pathology : The Effect of Low Laser Irradiation on Angiogenesis in Injured Rat Tibia*; Januari 2004). Mereka mendapatkan adanya peningkatan deposisi matriks tulang pada hari ke-7 penyinaran dengan laser energi rendah karena mulai pada saat itu terjadi peningkatan aktivitas pembentukan pembuluh darah baru (*angiogenesis*) di daerah tersebut sehingga sel mesenkim banyak mendapat nutrisi yang diperlukan untuk aktivitasnya.

Data di atas diperkuat oleh hasil analisis regresi linier yang menggambarkan adanya perbedaan yang signifikan antara pertambahan tebal kalus pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Dari persamaan regresi $Y=A+BX$; dimana Y adalah tebal kalus, A konstanta, B koefisien regresi dan X waktu (minggu) seperti yang tercantum pada tabel 5.7 didapatkan nilai konstanta pada kelompok kontrol 2,56 dan kelompok perlakuan 7,96, sedangkan nilai koefisien regresi pada kelompok kontrol sebesar 6,54 dan kelompok perlakuan 12,01. Bila angka-angka di atas dimasukkan ke

am persamaan regresi, kita dapat mengartikan bahwa setiap penambahan waktu penyinaran selama satu minggu ($X=1$) akan menghasilkan tebal kalus sebesar 9,1 mikron pada kelompok perlakuan $\{(Y = 2,56 + (6,54 \times 1))\}$ dan 19,98 mikron pada kelompok kontrol $\{(Y = 7,97 + (12,01 \times 1))\}$. Hal ini berarti bahwa penyinaran fraktur tulang dengan laser energi rendah dapat meningkatkan kecepatan pembentukan kalus dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tetapi penelitian ini belum bisa menjelaskan pada kelompok mana kalus lebih dulu terbentuk, karena pada evaluasi pertama dilakukan (hari ke-7 penyinaran) baik pada kelompok perlakuan maupun pada kelompok kontrol kalus sudah terbentuk. Seharusnya pengamatan pembentukan kalus dilakukan setiap hari agar dapat diketahui pada kelompok mana kalus lebih dulu terbentuk.

Dari hasil analisis data penelitian dengan uji *independent sample t-test* pada kelompok perlakuan, terlihat bahwa penyinaran dengan laser energi rendah tidak memberikan pengaruh yang bermakna terhadap respon kadar alkali fosfatase darah tikus pada minggu I ($p=0,870$), minggu II ($p=0,434$) maupun pada minggu III ($p=0,328$). Demikian juga hasil uji statistik yang diperoleh menggunakan uji multivariat, faktor kelompok baik secara sendiri maupun bersama-sama dengan faktor waktu tidak berpengaruh secara bermakna terhadap respon alkali fosfatase akibat penyinaran laser energi rendah yang ditandai dengan nilai signifikansi $p=0,084$ untuk faktor kelompok ($p>0,05$) dan nilai signifikansi $p=0,190$ untuk faktor kelompok*waktu ($p>0,05$). Tetapi faktor waktu secara sendiri berpengaruh signifikan terhadap kadar alkali fosfatase dengan nilai $p=0,000$ ($p<0,05$). Fakta ini dapat diartikan bahwa penyinaran laser energi rendah pada proses penyembuhan fraktur tidak berpengaruh secara langsung terhadap

peningkatan kadar alkali fosfatase. Peningkatan alkali fosfatase terjadi karena maturitas osteoblas yang bertanggungjawab langsung terhadap sintesa alkali fosfatase.

2.3 Pengaruh penyinaran laser energi rendah terhadap peningkatan kuantitas kalus

Kalus adalah jaringan tulang muda yang terbentuk pada daerah fraktur dan mengandung jaringan ikat kolagen (terutama kolagen I dan III), matriks ekstraseluler dan glikoprotein (proteoglikan dan glikosaminoglikan). Pada penelitian ini, kalus yang terbentuk dinilai dan dibandingkan kualitasnya antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Penilaian kualitas kalus didasarkan pada variabel jumlah rerata osteoblas per lapangan pandang, jumlah rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β per lapangan pandang, dan tebal kalus.

Menurut Charles A. Rockwood (1993), kondrosit dan osteoblas memegang peranan penting dalam proses pembentukan kalus. Kondrosit dan osteoblas akan mengaktifkan diri dalam sel itu sendiri yang bertanggungjawab terhadap pembentukan matriks dan glikoprotein. Dia juga menyebutkan bahwa mediator lokal seperti : faktor pertumbuhan (*growth factor*), tekanan oksigen (*oxygen tension*) di daerah fraktur dan stress fisik berpengaruh terhadap kualitas kalus yang terbentuk. Mediator lokal yang ikut berperan dalam proses pembentukan kalus antara lain: *acidic fibroblast growth factor* (aFGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF) dan *transforming growth factor beta* (TGF- β). *growth factor* yang dihasilkan oleh platelet ini berfungsi untuk merangsang proliferasi osteoblas dan kondrosit (Charles A. Rockwood, 1993).

Hasil analisis yang dilakukan menggunakan *independent sample t-test* terhadap respon penyinaran laser energi rendah menunjukkan adanya pengaruh yang cukup bermakna pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Pada minggu I penyinaran, pengaruh laser energi rendah belum memberikan perbedaan yang signifikan terhadap semua variabel dependen pada kelompok perlakuan kecuali TGF- β . Hal ini dapat kita lihat dari besarnya nilai signifikansi p pada masing-masing variabel dependen, yaitu : $p=0,218$ untuk osteoblas, $p=0,022$ untuk osteoblas yang mengekspresikan TGF- β , $p=0,870$ untuk alkali fosfatase dan $p=0,169$ untuk tebal kalus. Kita dapat melihat bahwa nilai signifikansi p pada semua variabel dependen lebih besar dari 0,05 kecuali pada variabel TGF- β . Hal ini berarti bahwa pada minggu I perlakuan, sinar laser energi rendah belum memberikan perbedaan yang bermakna terhadap percepatan proliferasi osteoblas antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, tetapi sudah mulai merangsang aktivasi gen osteoblas untuk menghasilkan faktor pertumbuhan *transforming growth factor beta* (TGF- β). Hasil ini hampir sama dengan hasil penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Trelles M.A et.al tahun 1987 tentang penyinaran tulang tibia tikus coba menggunakan laser energi rendah jenis Helium-Neon (He-Ne Laser) dengan dosis 2,4 mJ/cm² setiap kali penyinaran. Mereka mendapatkan adanya peningkatan vaskularisasi dan pembentukan kalus yang signifikan pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini disebabkan karena laser energi rendah dapat mengaktivasi fungsi sel mesenkim terutama osteoblas, kondrosit dan osteosit untuk membentuk matriks kolagen.

Pada minggu II, penyinaran dengan laser energi rendah sudah memberikan pengaruh signifikan terhadap kualitas kalus yang terdapat pada kelompok perlakuan

bandingkan kelompok kontrol. Hal ini terlihat dari besarnya nilai signifikansi p untuk variabel jumlah rerata osteoblas sebesar 0,190 ($p < 0,05$), jumlah rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β sebesar 0,043 ($p < 0,05$) dan tebal kalus sebesar 0,001 ($p < 0,05$). Tetapi untuk variabel kadar alkali fosfatase, penyinaran dengan laser energi rendah tidak memberikan pengaruh yang bermakna pada kelompok perlakuan karena nilai signifikansi p -nya lebih besar dari 0,05 yaitu: 0,434.

Setelah minggu III penyinaran, kita dapat melihat perbedaan yang signifikan pada kualitas kalus yang terbentuk antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Kualitas kalus pada kelompok perlakuan jauh lebih baik dibandingkan dengan kualitas kalus yang terbentuk pada kelompok kontrol. Hal ini dapat kita lihat dari besarnya nilai p untuk masing-masing variabel dependen yang lebih kecil dari 0,05, yaitu : variabel jumlah osteoblas $p=0,14$; variabel osteoblas yang mengekspresikan TGF- β $p=0,000$; dan variabel tebal kalus $p=0,15$. Untuk variabel alkali fosfatase, penyinaran dengan laser energi rendah tidak memberikan perbedaan yang bermakna karena nilai signifikansi p -nya lebih besar dari 0,05 yaitu: 0,328.

Dari hasil analisa data respon variabel dependen terhadap penyinaran laser energi rendah mulai minggu I sampai minggu III, kita dapat melihat adanya pengaruh yang signifikan pada kualitas kalus yang terbentuk pada kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Hampir semua variabel dependen yang diukur pada kelompok perlakuan berbeda secara bermakna, kecuali variabel alkali fosfatase yang nilai signifikansi p -nya mulai minggu I sampai minggu III selalu lebih besar dari 0,05 (minggu I $p=0,870$; minggu II $p=0,434$; minggu III $p=0,328$). Pada penelitian ini, alkali fosfatase yang diukur tidak bisa menggambarkan secara spesifik aktivitas osteoblas karena selain

ang, organ lain juga bisa mensekresi alkali fosfatase kedalam darah, yaitu: hepar, ginjal dan usus (Joseph A. Buckwalter, 1999). Seharusnya pada penelitian ini yang diukur adalah *bone spesific alkali fosfatase* (BSAP), karena salah satu tanda biokimia (*biochemical marker*) untuk menilai aktivitas pembentukan tulang (*bone formation*) yang dilakukan oleh osteoblas adalah meningkatnya kadar *bone spesific alkaline phosphatase* (SAP).

DAFTAR PUSTAKA

- ameida Lopez L. Human gingival fibroblast enhanced by LLLT. Analysis in vitro of the cellular proliferation of human gingival fibroblast with low level laser. Dissertation at Universidade do Vale Paralba, Sao Paolo, Brazil. 1999.
- Barber , et al. Advances in Laser Therapy for Bone Repair. The Journal of Laser Therapy Millennium Edition 2003;(12): 47-54.
- Anderson, S, carati, C et al. Low Level Laser Therapy as a treatment for postmastectomy lymphoedema. WALT 2002, Tokyo Japan.
- Asset, C.A.L. : Current Concept of bone formation. Journal of Bone and Joint Surgery. 1962; (44 A):1217-44.
- Tombe, A R et al. The effect of low level laser irradiation on osteoblastic cells. Clinical Orthopaedic Res. 2001;(4):3-14.
- vid R., et al. Effect of low power He-Ne laser on fracture healing in rats. Lasers in Surgery and Medical. 1996; 19(4):458-64.
- ortbudak, O et al. Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. Clinical Oral Implant Res. 2002; (13) :288-92.
- nyo, M. Theoretical and Experimental Basis of Biostimulation by Bioptron, Bioptron AG, Monchaltorf, Switzerland, 1990.
- rus, Murray J. Primer on The Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. 3rd Ed. New York : Raven Press Ltd.,1996.

- Travello-Freitas I, et al. Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *Journal of Photochemical and Photobiology B*: 2003 May-Jun; 70(2):81-9.
- Abel, C.P. The effect of low level laser therapy on slow healing wounds and ulcers. Health Sciences. Darwin, Northern Territory, 1995.
- Uzzardella, G A et al. Laser stimulation on bone defect healing : An in vitro study. *Laser Medical Science* 2002 (17).
- Wall G., et al. Effect of low level energy laser irradiation on wound healing. An experimental study in rats. *Swedia Dental Journal*. 1994;18(1-2):29-34.
- Frederic R. Basford. Laser Therapy: Scientific Basis and Clinical Role. *Journal of Lasers in Orthopaedic Surgery*. May 1993 ;16(5):541-47.
- Joseph A. Buckwalter, et.al. *Orthopaedic Basic Science, Biology and biomechanic of the musculoskeletal system*, 2nd ed. American Academy of Orthopaedic Surgeon, 2000.
- Archie Kert, M.D. et al. *Clinical Laser Therapy : Low Level Laser Therapy*. Scandinavian Medical Laser Technology, 1989.
- Norman S. Hosmer Dw, Klar J. and Lwanga Ks. *Adequacy of sample size in Health Studies*. New York. John Willey & Sons, 1990.
- Hariko Usuba, et al. Effect of low level laser therapy (LLLT) on viscoelasticity of the contracted knee joint: Comparison with whirlpool treatment in rats. 2000;(2):81-85.
- Richard Martin, B.S, C.L.T. Laser-Accelerated Inflammation/Pain Reduction and Healing. *Practical Pain Management*, Nov/Dec.2003.
- Rockwood, et al. *Rockwood and Green's : Fractures in Adult*, 3rd Ed. Lippincot Company, 1991.

- to S., et al. Stimulatory Effect of Low Power Laser Irradiation on Bone Regeneration in Midpalatal Suture During Expansion in Rat. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopaedics*. May 1997;115(5):525-32.
- Blager A., et al. Low power laser light in the healing of burns: a comparison between two different wavelengths (635 nm and 690 nm) and a placebo group. *Lasers Surgery Medicine*. 2000;27(1):39-42.
- na I.Karu. 2003. *Biomedical Phototonics Handbook : Low Power Laser Therapy*. Available at <http://www.isantroit.ru/dls/PUBL/300.pdf>.
- elles M.A, et al. Bone Fracture Consolidates Faster with Low Power Laser. *Lasers in Surgery and Medical*. 1987;7(1):36-45.
- Yaakobi, et al. Promotion of Bone Repair in the Cortical Bone of the Tibia in Rats by Low energy Laser (He-Ne) irradiation. *Calcified Tissue International* 1996 October; 58(4):297-300
- ncient J.Vigorita : *Orthopaedic Pathology*. Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- Yeo Li, et al. Staging of healing of femoral fractures in children. *Canada Association Radiology Journal* 1994 ; (45): 16-19.
- inuddin, M. *Metodologi Penelitian*. Surabaya : Universitas Airlangga, 2000.

mpiran 1

Data umur (bln) dan berat badan (gr) yang diukur dengan timbangan *torsion balance* dari tiap-tiap kelompok tikus percobaan.

Kelompok	No.	Umur (bln)	Berat Badan (gr)
K.1	1	3	198
	2	3	203
	3	3	190
	4	3	202
	5	3	200
	6	3	205
	7	3	200
	8	3	198
	9	3	194
	10	3	200
K.2	1	3	190
	2	3	204
	3	3	198
	4	3	201
	5	3	201
	6	3	200
	7	3	200
	8	3	192
	9	3	200
	10	3	200
K.3	1	3	200
	2	3	198
	3	3	198
	4	3	202
	5	3	201
	6	3	200
	7	3	202
	8	3	196
	9	3	194
	10	3	200
P.1	1	3	202
	2	3	202
	3	3	196
	4	3	199
	5	3	205
	6	3	197
	7	3	205
	8	3	204
	9	3	200
	10	3	202

P.2	1	3	204
	2	3	199
	3	3	203
	4	3	196
	5	3	202
	6	3	198
	7	3	198
	8	3	204
	9	3	201
	10	3	201
P.3	1	3	202
	2	3	196
	3	3	203
	4	3	200
	5	3	200
	6	3	201
	7	3	202
	8	3	198
	9	3	194
	10	3	200

mpiran 2

rata osteoblas (plp), rerata osteoblas yang mengekspresikan TGF- β (plp), rerata kadar alkali fosfatase serum (unit/liter) dan rerata tebal kalus dari tiap-tiap kelompok.

Kelompok	Jenis kelompok	Nomor sampel	Variabel			
			Jumlah Osteoblas (plp)	TGF- β (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
kontrol	K-1	1	22.2	0	99	8.4
		2	19.2	0.2	82	9.6
		3	19	0	90	7.8
		4	20	0.2	93	10
		5	17.6	0.4	108	8.6
		6	21.4	0.2	86	9.6
		7	19.8	0	92	9.2
		8	17.4	0	90	10.2
		9	18.2	0.2	102	9.6
		10	19.4	0.4	88	9.6
	K-2	1	28.2	0.8	126	15.2
		2	25.6	0	123	14
		3	25.8	0	137	16.2
		4	29	1	140	14.8
		5	24	0.4	132	15.2
		6	23.4	0.8	129	15
		7	20.2	0.6	115	15
		8	19.8	0.6	109	16
		9	29.6	0.6	115	15
		10	24.8	0.8	104	16.8
	K-3	1	28.8	1.2	173	22.2
		2	27.6	0.8	167	28
		3	29	1.0	173	22.8
		4	34.2	1.2	160	21.8
		5	33.2	1.4	147	21
		6	34	1.4	137	22.4
		7	33.4	0.8	118	21.8
		8	34.2	1.0	126	24.2
		9	31.8	0.8	136	20
		10	28.4	1.0	115	19.2
perlakuan	P-1	1	18.6	0.6	87	17.6
		2	17.4	1	74	17.8
		3	23.6	0	86	20
		4	23.8	0.8	72	20.2
		5	24	0.2	90	18.6
		6	21.8	0.8	70	20.8
		7	22	0.4	82	20.2

		8	23.8	0.4	80	19.2
		9	20.2	0.6	84	19.8
		10	22.2	0	76	20.2
	P-2	1	36.8	2.2	120	28.8
		2	34.2	1.8	123	30.2
		3	38	2.2	102	32
		4	37	1.2	94	35
		5	38.4	1.4	103	34.6
		6	37	1.2	90	35
		7	37.8	3.2	101	35
		8	38.4	2.4	102	34.4
		9	37.6	1.6	123	31.6
		10	38	2.4	127	34
	P-3	1	47.4	4.2	167	35.8
		2	48.2	5.4	181	37.4
		3	52.4	2.4	128	41.6
		4	47.6	2	145	43.4
		5	49.2	3	112	47.6
		6	47.6	3	175	48.4
		7	46.8	3.8	112	48
		8	49.6	5.6	126	47.6
		9	48.2	2.8	149	39.2
		10	47.2	5	195	45.6

mpiran 3

ta pengukuran osteoblas (plp) dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 x.

kelompok	No	Evaluasi I	Evaluasi II	Evaluasi III	Evaluasi IV	Evaluasi V	Rerata
K-1	1	21	24	21	20	25	22.2
	2	15	22	20	22	17	19.2
	3	20	22	19	19	15	19
	4	16	25	20	17	22	20
	5	16	15	20	20	17	17.6
	6	20	18	24	20	25	21.4
	7	18	22	22	20	17	19.8
	8	17	20	18	16	16	17.4
	9	22	16	18	18	17	18.2
	10	16	19	24	18	20	19.4
K-2	1	25	30	26	28	32	28.2
	2	24	26	26	30	22	25.6
	3	19	29	31	26	24	25.8
	4	25	29	30	33	28	29
	5	28	20	24	24	24	24
	6	19	21	25	17	35	23.4
	7	18	17	22	26	18	20.2
	8	17	20	27	18	17	19.8
	9	30	35	32	28	23	29.6
	10	30	21	32	21	20	24.8
K-3	1	31	25	29	30	29	28.8
	2	28	30	26	24	30	27.6
	3	30	28	27	32	28	29
	4	34	36	34	31	36	34.2
	5	36	30	32	36	32	33.2
	6	38	34	28	34	36	34
	7	35	36	30	34	32	33.4
	8	35	36	36	28	36	34.2
	9	29	34	34	32	30	31.8
	10	26	30	28	30	28	28.4
P-1	1	20	18	19	21	15	18.6
	2	14	18	20	15	20	17.4
	3	20	22	20	28	28	23.6
	4	28	20	27	24	20	23.8
	5	22	25	18	27	28	24
	6	20	24	24	19	22	21.8
	7	19	26	22	20	23	22
	8	23	22	26	28	20	23.8
	9	18	24	22	20	17	20.2

	10	22	20	26	23	20	22.2
P-2	1	36	39	36	40	33	36.8
	2	34	40	34	30	33	34.2
	3	42	34	40	36	38	38
	4	40	35	37	38	35	37
	5	39	36	41	33	43	38.4
	6	34	42	34	37	38	37
	7	36	44	38	36	35	37.8
	8	37	35	42	38	40	38.4
	9	38	37	35	40	38	37.6
	10	35	38	42	38	37	38
P-3	1	49	46	49	43	50	47.4
	2	51	46	47	53	44	48.2
	3	56	53	54	49	50	52.4
	4	49	46	50	51	42	47.6
	5	46	51	53	48	48	49.2
	6	50	47	44	46	51	47.6
	7	52	44	44	46	48	46.8
	8	55	50	49	45	49	49.6
	9	44	46	50	49	52	48.2
	10	49	48	44	50	45	47.2

mpiran 4

mlah osteoblas (plp) yang mengekspresikan TGF- β dengan mikroskop cahaya
mbesaran 400 x.

kelompok	No	Evaluaasi	Evaluaasi	Evaluaasi	Evaluaasi	Evaluaasi	Rerata
		I	II	III	IV	V	
K-1	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	1	0	0	0	0.2
	3	0	0	0	0	0	0
	4	0	1	0	0	0	0.2
	5	1	0	0	1	0	0.4
	6	0	0	1	0	0	0.2
	7	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0.2
	10	0	1	0	1	0	0.4
K-2	1	3	1	0	0	0	0.8
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	4	1	1	0	1	2	1
	5	1	1	0	0	0	0.4
	6	2	1	1	0	0	0.8
	7	0	0	2	1	0	0.6
	8	0	0	0	2	1	0.6
	9	1	0	1	0	1	0.6
	10	4	0	0	0	0	0.8
K-3	1	1	2	1	0	2	1.2
	2	1	0	2	1	0	0.8
	3	0	1	1	2	1	1.0
	4	1	2	1	0	2	1.2
	5	2	1	1	2	1	1.4
	6	1	2	2	1	1	1.4
	7	0	2	1	0	1	0.8
	8	2	1	0	1	1	1.0
	9	1	0	2	0	1	0.8
	10	1	2	1	1	0	1.0
P-1	1	0	1	1	1	0	0.6
	2	1	2	2	0	0	1
	3	0	0	0	0	0	0
	4	2	0	1	1	0	0.8
	5	0	0	1	0	0	0.2
	6	1	0	2	0	1	0.8
	7	0	1	0	0	1	0.4
	8	1	0	0	0	1	0.4

	9	1	0	1	1	0	0.6
	10	0	0	0	0	0	0
P-2	1	6	2	1	2	0	2.2
	2	2	3	0	2	2	1.8
	3	3	3	2	2	1	2.2
	4	2	0	0	3	1	1.2
	5	1	2	2	2	0	1.4
	6	3	1	1	1	0	1.2
	7	2	3	4	3	4	3.2
	8	2	2	3	1	2	2.4
	9	0	3	3	2	0	1.6
	10	4	3	1	3	1	2.4
P-3	1	6	4	9	2	0	4.2
	2	7	3	7	4	6	5.4
	3	2	5	2	1	2	2.4
	4	2	2	0	4	2	2
	5	3	2	6	0	4	3
	6	2	2	6	4	1	3
	7	5	8	2	3	4	3.8
	8	4	8	6	6	4	5.6
	9	3	2	3	4	2	2.8
	10	6	3	4	6	6	5

mpiran 5

ta Hasil Pengukuran Kadar Alkali Fosfatase (unit/liter)

o	Pre frakturasi	K-1	K-2	K-3	P-1	P-2	P-3
	63	99	126	173	87	120	167
	208	82	123	167	74	123	181
	225	90	137	173	86	102	128
	195	93	140	160	72	94	145
	288	108	132	147	90	103	112
	82	86	129	137	70	90	175
	239	92	115	118	82	101	112
	134	90	109	126	80	102	126
	145	102	115	136	84	123	149
0	159	88	104	115	76	127	195

Lampiran 6

Hasil pengukuran tebal kalus (mikron) dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x

kelompok	No	Evaluasi I	Evaluasi II	Evaluasi III	Evaluasi IV	Evaluasi V	Rerata
K-1	1	8	8	7	10	9	8.4
	2	10	9	10	11	8	9.6
	3	10	8	9	8	8	8.6
	4	12	10	10	8	10	10
	5	7	9	9	10	8	8.6
	6	12	11	6	9	10	9.6
	7	10	8	8	12	8	9.2
	8	10	9	8	11	8	9.2
	9	10	9	9	10	10	9.6
	10	8	10	11	8	11	9.6
K-2	1	15	17	14	14	16	15.2
	2	15	14	13	15	13	14
	3	17	17	14	17	16	16.2
	4	14	12	17	17	14	14.8
	5	12	17	16	16	15	15.2
	6	15	12	14	19	15	15
	7	16	15	12	16	16	15
	8	14	17	19	15	15	16
	9	16	13	14	14	18	15
	10	14	18	18	16	18	16.8
K-3	1	20	25	22	24	20	22.2
	2	26	30	26	24	34	28
	3	20	18	24	24	28	22.8
	4	18	26	24	21	20	21.8
	5	20	20	22	21	22	21
	6	18	24	20	24	26	22.4
	7	20	26	20	21	22	21.8
	8	25	26	16	28	26	24.2
	9	19	20	19	22	20	20
	10	24	17	17	20	18	19.2
P-1	1	18	18	16	21	15	17.6
	2	14	20	20	15	20	17.8
	3	22	22	20	18	18	20
	4	20	18	17	24	22	20.2
	5	22	15	18	20	18	18.6
	6	19	23	20	22	20	20.8
	7	21	18	20	21	21	20.2
	8	20	19	19	22	16	19.2
	9	24	19	20	18	18	19.8
	10	19	23	20	21	18	20.2

P-2	1	26	39	26	30	23	28.8
	2	34	30	24	30	33	30.2
	3	32	34	30	36	28	32
	4	30	35	37	38	35	35
	5	39	36	31	33	34	34.6
	6	34	32	34	37	38	35
	7	36	34	38	32	35	35
	8	34	35	32	38	33	34.4
	9	28	37	35	30	28	31.6
	10	35	38	32	28	37	34
P-3	1	39	35	36	35	34	35.8
	2	37	34	40	35	41	37.4
	3	42	39	44	43	40	41.6
	4	45	46	40	42	44	43.4
	5	46	48	49	45	50	47.6
	6	47	51	48	46	50	48.4
	7	49	48	49	46	48	48
	8	46	47	49	47	49	47.6
	9	38	39	40	41	38	39.2
	10	48	48	44	43	45	45.6

mpiran 7
 tistik Deskriptif

*Descriptive Statistics
 Report*

Grup	Waktu	Statistik	Variabel			
			Osteoblas (plp)	TGF- β (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
ontrol	Minggu I	Mean	19.4200	.1600	93.0000	9.2600
		Std. Deviation	1.53608	.15776	7.85988	.76041
		N	10	10	10	10
	Minggu II	Mean	25.0400	.5600	123.0000	15.3200
		Std. Deviation	3.36756	.33731	12.00000	.80111
		N	10	10	10	10
	Minggu III	Mean	31.4600	1.0600	145.2000	22.3400
		Std. Deviation	2.70317	.23190	22.14999	2.43685
		N	10	10	10	10
aser	Minggu I	Mean	21.7400	.4800	80.1000	19.4400
		Std. Deviation	2.31910	.34254	6.83862	1.09869
		N	10	10	10	10
	Minggu II	Mean	37.3200	1.9600	108.5000	33.0600
		Std. Deviation	1.23720	.63805	13.41020	2.25891
		N	10	10	10	10
	Minggu III	Mean	48.4200	3.7200	149.0000	43.4600
		Std. Deviation	1.64776	1.28305	29.55973	4.72445
		N	10	10	10	10

Empiran 8

Normalitas

NPar Tests
One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

Kontrol Minggu I

		Osteo- blas (plp)	TGF- β (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	19.4200	.1600	93.0000	9.2600
	Std. Deviation	1.53608	.15776	7.85988	.76041
Most Extreme Differences	Absolute	.153	.245	.200	.273
	Positive	.153	.245	.200	.127
	Negative	-.101	-.200	-.087	-.273
Kolmogorov-Smirnov Z		.483	.774	.632	.862
Asymp. Sig. (2-tailed)		.974	.587	.819	.447

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Kelompok = Kontrol Minggu I

Kontrol Minggu II

		Osteo- blas (plp)	TGF (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	25.0400	.5600	123.0000	15.3200
	Std. Deviation	3.36756	.33731	12.00000	.80111
Most Extreme Differences	Absolute	.126	.247	.148	.260
	Positive	.125	.152	.148	.260
	Negative	-.126	-.247	-.100	-.158
Kolmogorov-Smirnov Z		.398	.782	.466	.821
Asymp. Sig. (2-tailed)		.997	.574	.981	.511

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Kelompok = Kontrol Minggu II

Kontrol Minggu III

		Osteo- blas (plp)	TGF (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	31.4600	1.0600	145.2000	22.3400
	Std. Deviation	2.70317	.23190	22.14999	2.43685
Most Extreme Differences	Absolute	.240	.202	.148	.225
	Positive	.219	.202	.144	.225
	Negative	-.240	-.131	-.148	-.112
Kolmogorov-Smirnov Z		.759	.639	.468	.712
Asymp. Sig. (2-tailed)		.612	.809	.981	.691

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Kelompok = Kontrol Minggu III

Laser Minggu I

		Osteo- blas (plp)	TGF- beta (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	21.7400	.4800	80.1000	19.4400
	Std. Deviation	2.31910	.34254	6.83862	1.09869
Most Extreme Differences	Absolute	.210	.137	.126	.228
	Positive	.165	.119	.126	.145
	Negative	-.210	-.137	-.116	-.228
Kolmogorov-Smirnov Z		.665	.433	.397	.722
Asymp. Sig. (2-tailed)		.768	.992	.997	.674

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Kelompok = Laser Minggu I

Laser Minggu II

		Osteo- blas (plp)	TGF- beta (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	37.3200	1.9600	108.500 0	33.0600
	Std. Deviation	1.23720	.63805	13.4102 0	2.25891
Most Extreme Differences	Absolute	.237	.147	.259	.261
	Positive	.191	.145	.259	.195
	Negative	-.237	-.147	-.204	-.261
Kolmogorov-Smirnov Z		.750	.464	.819	.826
asymp. Sig. (2-tailed)		.627	.983	.513	.502

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Kelompok = Laser Minggu II

Laser Minggu III

		Osteo- blas (plp)	TGF- beta (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	48.4200	3.7200	149.000 0	43.4600
	Std. Deviation	1.64776	1.28305	29.5597 3	4.72445
Most Extreme Differences	Absolute	.253	.213	.161	.210
	Positive	.253	.213	.161	.148
	Negative	-.163	-.141	-.129	-.210
Kolmogorov-Smirnov Z		.800	.672	.510	.663
asymp. Sig. (2-tailed)		.544	.756	.957	.772

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Kelompok = Laser Minggu III

mpiran 9

Beda dengan *Independent Sample T-test**Independent Samples T-Test*

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Kalus Minggu I	Equal variances assumed	2.052	.169	-24.093	18	.000
	Equal variances not assumed			-24.093	16.013	.000

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Kalus Minggu II	Equal variances assumed	14.478	.001	-23.406	18	.000
	Equal variances not assumed			-23.406	11.229	.000

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Kalus Minggu III	Equal variances assumed	7.227	.015	-12.564	18	.000
	Equal variances not assumed			-12.564	13.472	.000

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	2902.0827	1451.0413
Residuals	27	257.6720	9.5434
F		152.04646	Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
Constant	18.450000	4.835426	1.467860	3.816	.0007
Constant**2	-1.610000	1.196458	-.517668	-1.346	.1896
Constant)	2.600000	4.258224		.611	.5466

Empiran 11 : Uji Multivariate

1.1 General Linear Model

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Waktu	1.00	Minggu I	20
	2.00	Minggu II	20
	3.00	Minggu III	20
Kelompok	a	Kontrol	30
	b	Laser	30

Multivariate Tests(c)

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.998	5747.023(a)	4.000	51.000	.000
	Wilks' Lambda	.002	5747.023(a)	4.000	51.000	.000
	Hotelling's Trace	450.747	5747.023(a)	4.000	51.000	.000
	Roy's Largest Root	450.747	5747.023(a)	4.000	51.000	.000
Waktu	Pillai's Trace	.994	12.834	8.000	104.000	.000
	Wilks' Lambda	.028	63.530(a)	8.000	102.000	.000
	Hotelling's Trace	34.023	212.642	8.000	100.000	.000
	Roy's Largest Root	34.000	442.001(b)	4.000	52.000	.000
Kelompok	Pillai's Trace	.955	270.168(a)	4.000	51.000	.000
	Wilks' Lambda	.045	270.168(a)	4.000	51.000	.000
	Hotelling's Trace	21.190	270.168(a)	4.000	51.000	.000
	Roy's Largest Root	21.190	270.168(a)	4.000	51.000	.000
Waktu * Kelompok	Pillai's Trace	.846	9.533	8.000	104.000	.000
	Wilks' Lambda	.190	16.487(a)	8.000	102.000	.000
	Hotelling's Trace	4.067	25.421	8.000	100.000	.000
	Roy's Largest Root	4.020	52.258(b)	4.000	52.000	.000

Exact statistic

The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Design: Intercept+Waktu+Kelompok+Waktu * Kelompok

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Osteoblas	5978.493(a)	5	1195.699	234.213	.000
	TGF	88.659(b)	5	17.732	45.022	.000
	Alkali	38633.933(c)	5	7726.787	25.802	.000
	Kalus	7767.253(d)	5	1553.451	260.439	.000
Intercept	Osteoblas	56059.267	1	56059.267	10980.849	.000
	TGF	105.073	1	105.073	266.782	.000
	Alkali	813869.067	1	813869.067	2717.762	.000
	Kalus	34024.491	1	34024.491	5704.270	.000
Baktu	Osteoblas	3759.381	2	1879.691	368.192	.000
	TGF	42.969	2	21.485	54.550	.000
	Alkali	36678.433	2	18339.217	61.240	.000
	Kalus	3445.281	2	1722.641	288.804	.000
kelompok	Osteoblas	1660.056	1	1660.056	325.171	.000
	TGF	31.974	1	31.974	81.183	.000
	Alkali	928.267	1	928.267	3.100	.084
	Kalus	4008.203	1	4008.203	671.983	.000
Baktu * kelompok	Osteoblas	559.056	2	279.528	54.754	.000
	TGF	13.716	2	6.858	17.413	.000
	Alkali	1027.233	2	513.617	1.715	.190
	Kalus	313.769	2	156.885	26.302	.000
Error	Osteoblas	275.680	54	5.105		
	TGF	21.268	54	.394		
	Alkali	16171.000	54	299.463		
	Kalus	322.096	54	5.965		
Total	Osteoblas	62313.440	60			
	TGF	215.000	60			
	Alkali	868674.000	60			
	Kalus	42113.840	60			
Corrected Total	Osteoblas	6254.173	59			
	TGF	109.927	59			
	Alkali	54804.933	59			
	Kalus	8089.349	59			

R Squared = .956 (Adjusted R Squared = .952)

R Squared = .807 (Adjusted R Squared = .789)

R Squared = .705 (Adjusted R Squared = .678)

R Squared = .960 (Adjusted R Squared = .956)

2 Estimated Marginal Means

2.1 Waktu

Estimates

Dependent Variable	Waktu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
osteoblas	Minggu I	20.580	.505	19.567	21.593
	Minggu II	31.180	.505	30.167	32.193
	Minggu III	39.940	.505	38.927	40.953
F-beta	Minggu I	.320	.140	.039	.601
	Minggu II	1.260	.140	.979	1.541
	Minggu III	2.390	.140	2.109	2.671
alkali fosfatase	Minggu I	86.550	3.870	78.792	94.308
	Minggu II	115.750	3.870	107.992	123.508
	Minggu III	147.100	3.870	139.342	154.858
tebal kalus	Minggu I	14.350	.546	13.255	15.445
	Minggu II	24.190	.546	23.095	25.285
	Minggu III	32.900	.546	31.805	33.995

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)
Osteoblas	Minggu I	Minggu II	-10.600(*)	.715	.000
		Minggu III	-19.360(*)	.715	.000
	Minggu II	Minggu I	10.600(*)	.715	.000
		Minggu III	-8.760(*)	.715	.000
	Minggu III	Minggu I	19.360(*)	.715	.000
		Minggu II	8.760(*)	.715	.000
TGF-beta	Minggu I	Minggu II	-.940(*)	.198	.000
		Minggu III	-2.070(*)	.198	.000
	Minggu II	Minggu I	.940(*)	.198	.000
		Minggu III	-1.130(*)	.198	.000
	Minggu III	Minggu I	2.070(*)	.198	.000
		Minggu II	1.130(*)	.198	.000
alkali fosfatase	Minggu I	Minggu II	-29.200(*)	5.472	.000
		Minggu III	-60.550(*)	5.472	.000
	Minggu II	Minggu I	29.200(*)	5.472	.000
		Minggu III	-31.350(*)	5.472	.000
	Minggu III	Minggu I	60.550(*)	5.472	.000
		Minggu II	31.350(*)	5.472	.000
Tebal kalus	Minggu I	Minggu II	-9.840(*)	.772	.000
		Minggu III	-18.550(*)	.772	.000
	Minggu II	Minggu I	9.840(*)	.772	.000
		Minggu III	-8.710(*)	.772	.000
	Minggu III	Minggu I	18.550(*)	.772	.000
		Minggu II	8.710(*)	.772	.000

ed on estimated marginal means

he mean difference is significant at the .05 level.

adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Wilk's trace	.994	12.834	8.000	104.000	.000
Wilks' lambda	.028	63.530(a)	8.000	102.000	.000
Pillai's trace	34.023	212.642	8.000	100.000	.000
Roy's largest root	34.000	442.001(b)	4.000	52.000	.000

Each F tests the multivariate effect of Waktu. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Exact statistic

The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Univariate Tests

Dependent variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Osteoblas	Contrast	3759.381	2	1879.691	368.192	.000
	Error	275.680	54	5.105		
TGF-beta	Contrast	42.969	2	21.485	54.550	.000
	Error	21.268	54	.394		
Alkali Fosfatase	Contrast	36678.433	2	18339.217	61.240	.000
	Error	16171.000	54	299.463		
Tebal kalus	Contrast	3445.281	2	1722.641	288.804	.000
	Error	322.096	54	5.965		

Each F tests the effect of Waktu. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among estimated marginal means.

2.2 Kelompok

Estimates

Dependent variable	Kelompok	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
Osteoblas	Kontrol	25.307	.413	24.480	26.134
	Laser	35.827	.413	35.000	36.654
TGF-beta	Kontrol	.593	.115	.364	.823
	Laser	2.053	.115	1.824	2.283
Alkali Fosfatase	Kontrol	120.400	3.159	114.066	126.734
	Laser	112.533	3.159	106.199	118.868
Tebal kalus	Kontrol	15.640	.446	14.746	16.534
	Laser	31.987	.446	31.093	32.881

Pairwise Comparisons

dependent variable	(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)
Osteoblas	Kontrol	Laser	-10.520(*)	.583	.000
	Laser	Kontrol	10.520(*)	.583	.000
TGF-beta	Kontrol	Laser	-1.460(*)	.162	.000
	Laser	Kontrol	1.460(*)	.162	.000
Alkali Fosfatase	Kontrol	Laser	7.867	4.468	.084
	Laser	Kontrol	-7.867	4.468	.084
Tebal kalus	Kontrol	Laser	-16.347(*)	.631	.000
	Laser	Kontrol	16.347(*)	.631	.000

based on estimated marginal means

The mean difference is significant at the .05 level.

Adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Wilks' trace	.955	270.168(a)	4.000	51.000	.000
Pillai's lambda	.045	270.168(a)	4.000	51.000	.000
Hotelling's trace	21.190	270.168(a)	4.000	51.000	.000
Roy's largest root	21.190	270.168(a)	4.000	51.000	.000

Each F tests the multivariate effect of Kelompok. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Exact statistic

Univariate Tests

dependent variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Osteoblas	Contrast	1660.056	1	1660.056	325.171	.000
	Error	275.680	54	5.105		
TGF-beta	Contrast	31.974	1	31.974	81.183	.000
	Error	21.268	54	.394		
Alkali Fosfatase	Contrast	928.267	1	928.267	3.100	.084
	Error	16171.000	54	299.463		
Tebal kalus	Contrast	4008.203	1	4008.203	671.983	.000
	Error	322.096	54	5.965		

Each F tests the effect of Kelompok. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

2.3 Waktu * Kelompok

dependent variable	Waktu	Kelompok	Mean	Std. Error
Osteoblas	Minggu I	Kontrol	19.420	.715
		Laser	21.740	.715
	Minggu II	Kontrol	25.040	.715
		Laser	37.320	.715
	Minggu III	Kontrol	31.460	.715
		Laser	48.420	.715
TGF-beta	Minggu I	Kontrol	.160	.198
		Laser	.480	.198
	Minggu II	Kontrol	.560	.198
		Laser	1.960	.198
	Minggu III	Kontrol	1.060	.198
		Laser	3.720	.198
Alkali Fosfatase	Minggu I	Kontrol	93.000	5.472
		Laser	80.100	5.472
	Minggu II	Kontrol	123.000	5.472
		Laser	108.500	5.472
	Minggu III	Kontrol	145.200	5.472
		Laser	149.000	5.472
tebal kalus	Minggu I	Kontrol	9.260	.772
		Laser	19.440	.772
	Minggu II	Kontrol	15.320	.772
		Laser	33.060	.772
	Minggu III	Kontrol	22.340	.772
		Laser	43.460	.772

3 Post Hoc Tests

3.1 Waktu

Multiple Comparisons

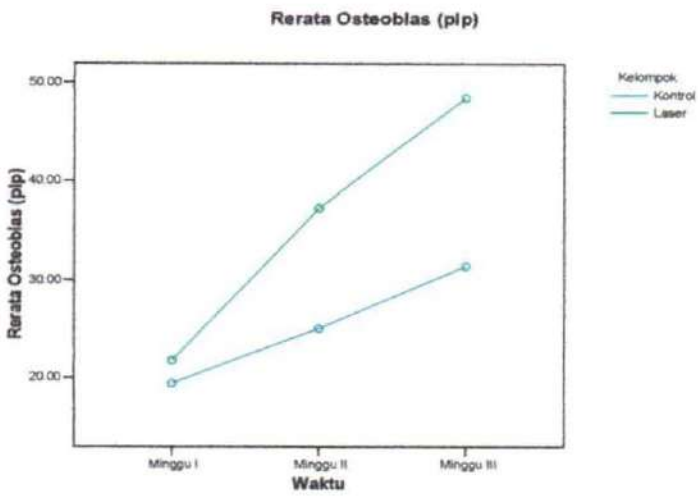
Dependent Variable		(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
osteoblas	Tukey HSD	Minggu I	Minggu II	-10.6000(*)	.71451	.000
			Minggu III	-19.3600(*)	.71451	.000
		Minggu II	Minggu I	10.6000(*)	.71451	.000
			Minggu III	-8.7600(*)	.71451	.000
		Minggu III	Minggu I	19.3600(*)	.71451	.000
			Minggu II	8.7600(*)	.71451	.000
GF-beta	Tukey HSD	Minggu I	Minggu II	-.9400(*)	.19846	.000
			Minggu III	-2.0700(*)	.19846	.000
		Minggu II	Minggu I	.9400(*)	.19846	.000
			Minggu III	-1.1300(*)	.19846	.000
		Minggu III	Minggu I	2.0700(*)	.19846	.000
			Minggu II	1.1300(*)	.19846	.000
alkali sfatse	Tukey HSD	Minggu I	Minggu II	-29.2000(*)	5.47232	.000
			Minggu III	-60.5500(*)	5.47232	.000
		Minggu II	Minggu I	29.2000(*)	5.47232	.000
			Minggu III	-31.3500(*)	5.47232	.000
		Minggu III	Minggu I	60.5500(*)	5.47232	.000
			Minggu II	31.3500(*)	5.47232	.000
tebal kalus	Tukey HSD	Minggu I	Minggu II	-9.8400(*)	.77232	.000
			Minggu III	-18.5500(*)	.77232	.000
		Minggu II	Minggu I	9.8400(*)	.77232	.000
			Minggu III	-8.7100(*)	.77232	.000
		Minggu III	Minggu I	18.5500(*)	.77232	.000
			Minggu II	8.7100(*)	.77232	.000

based on observed means.

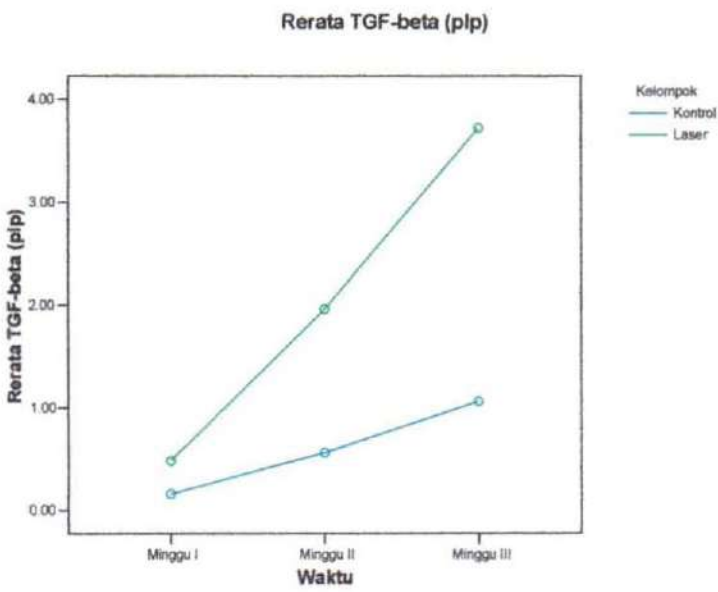
The mean difference is significant at the .05 level.

4 Profile Plots

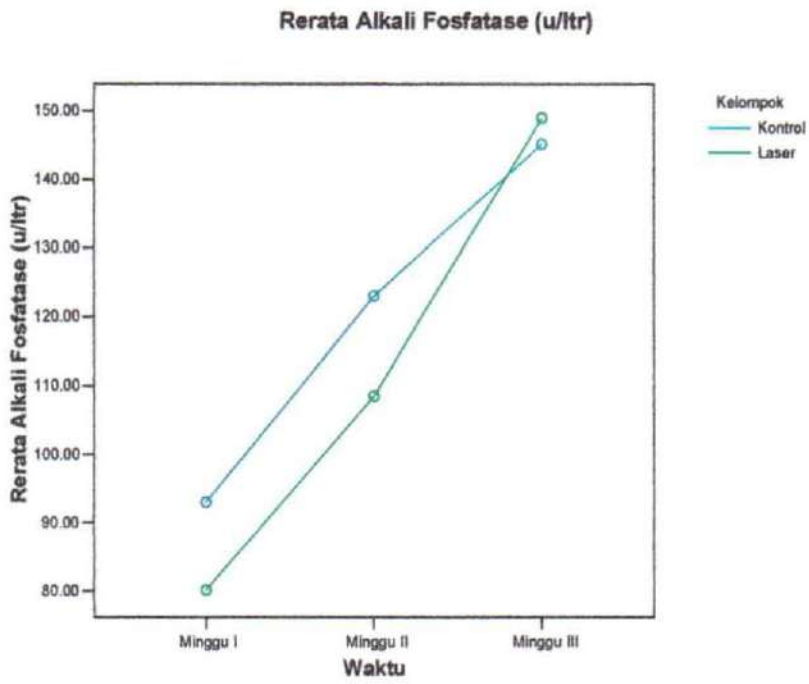
4.1 Osteoblas



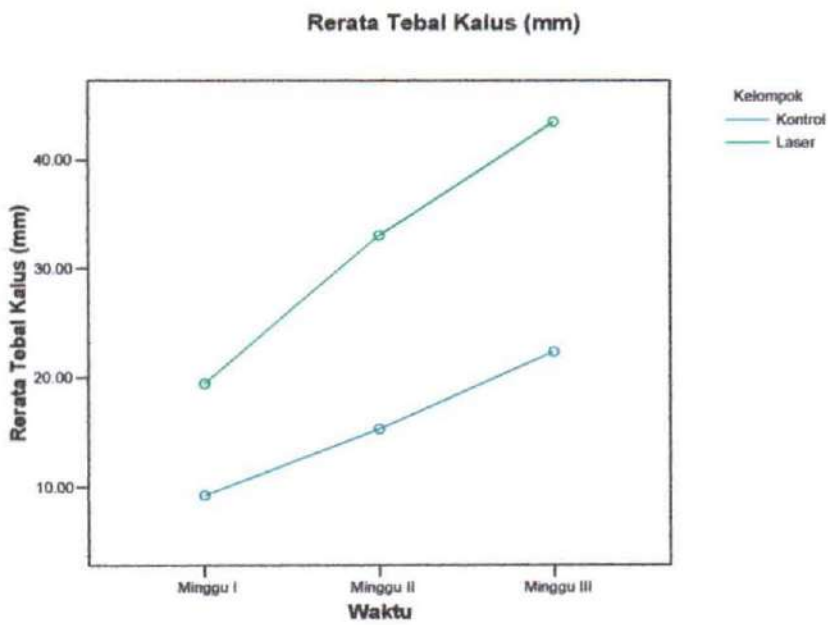
4.2 TGF- β



4.3 Alkali fosfatase



4.4 Tebal kalus



Empiran 12 : Statistik Deskriptif Respon Kelompok Perlakuan Terhadap Sinar Laser Energi Rendah

Descriptive Statistics

Variabel	Waktu	Mean	Std. Deviation	N
Respon Osteoblas	Minggu I	21.7400	2.31910	10
	Minggu II	37.3200	1.23720	10
	Minggu III	48.4200	1.64776	10
Respon TGF-beta	Minggu I	.4800	.34254	10
	Minggu II	1.9600	.63805	10
	Minggu III	3.7200	1.28305	10
Respon Alkali fosfatase	Minggu I	80.1000	6.83862	10
	Minggu II	108.5000	13.41020	10
	Minggu III	149.0000	29.55973	10
Respon Tebal kalus	Minggu I	19.4400	1.09869	10
	Minggu II	33.0600	2.25891	10
	Minggu III	43.4600	4.72445	10

Multivariate Tests(c)

Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Intercept	Pillai's Trace	.999	4566.308(a)	4.000	24.000	.000
	Wilks' Lambda	.001	4566.308(a)	4.000	24.000	.000
	Hotelling's Trace	761.051	4566.308(a)	4.000	24.000	.000
	Roy's Largest Root	761.051	4566.308(a)	4.000	24.000	.000
Waktu	Pillai's Trace	1.082	7.362	8.000	50.000	.000
	Wilks' Lambda	.013	47.047(a)	8.000	48.000	.000
	Hotelling's Trace	69.778	200.611	8.000	46.000	.000
	Roy's Largest Root	69.672	435.448(b)	4.000	25.000	.000

Exact statistic

The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Design: Intercept+Waktu

Tests of Between-Subjects Effects

Source	Dependent Variable	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	Osteoblas	3592.563(a)	2	1796.281	559.938	.000
	TGF	52.619(b)	2	26.309	36.361	.000
	Alkali	23980.067(c)	2	11990.033	32.689	.000
	Kalus	2902.083(d)	2	1451.041	152.046	.000
Intercept	Osteoblas	38506.501	1	38506.501	12003.273	.000
	TGF	126.485	1	126.485	174.811	.000
	Alkali	379912.533	1	379912.533	1035.769	.000
	Kalus	30694.405	1	30694.405	3216.294	.000
Waktu	Osteoblas	3592.563	2	1796.281	559.938	.000
	TGF	52.619	2	26.309	36.361	.000
	Alkali	23980.067	2	11990.033	32.689	.000
	Kalus	2902.083	2	1451.041	152.046	.000
Error	Osteoblas	86.616	27	3.208		
	TGF	19.536	27	.724		
	Alkali	9903.400	27	366.793		
	Kalus	257.672	27	9.543		
Total	Osteoblas	42185.680	30			
	TGF	198.640	30			
	Alkali	413796.000	30			
	Kalus	33854.160	30			
Corrected Total	Osteoblas	3679.179	29			
	TGF	72.155	29			
	Alkali	33883.467	29			
	Kalus	3159.755	29			

R Squared = .976 (Adjusted R Squared = .975)

R Squared = .729 (Adjusted R Squared = .709)

R Squared = .708 (Adjusted R Squared = .686)

R Squared = .918 (Adjusted R Squared = .912)

1 Estimated Marginal Means

aktu

Estimates

Dependent Variable	Waktu	Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
osteoblas	Minggu I	21.740	.566	20.578	22.902
	Minggu II	37.320	.566	36.158	38.482
	Minggu III	48.420	.566	47.258	49.582
TGF	Minggu I	.480	.269	-.072	1.032
	Minggu II	1.960	.269	1.408	2.512
	Minggu III	3.720	.269	3.168	4.272
alkali	Minggu I	80.100	6.056	67.673	92.527
	Minggu II	108.500	6.056	96.073	120.927
	Minggu III	149.000	6.056	136.573	161.427
kalus	Minggu I	19.440	.977	17.436	21.444
	Minggu II	33.060	.977	31.056	35.064
	Minggu III	43.460	.977	41.456	45.464

Pairwise Comparisons

Dependent Variable	(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.(a)
Osteoblas	Minggu I	Minggu II	-15.580(*)	.801	.000
		Minggu III	-26.680(*)	.801	.000
	Minggu II	Minggu I	15.580(*)	.801	.000
		Minggu III	-11.100(*)	.801	.000
	Minggu III	Minggu I	26.680(*)	.801	.000
		Minggu II	11.100(*)	.801	.000
TGF-beta	Minggu I	Minggu II	-1.480(*)	.380	.001
		Minggu III	-3.240(*)	.380	.000
	Minggu II	Minggu I	1.480(*)	.380	.001
		Minggu III	-1.760(*)	.380	.000
	Minggu III	Minggu I	3.240(*)	.380	.000
		Minggu II	1.760(*)	.380	.000
alkali fosfatase	Minggu I	Minggu II	-28.400(*)	8.565	.003
		Minggu III	-68.900(*)	8.565	.000
	Minggu II	Minggu I	28.400(*)	8.565	.003
		Minggu III	-40.500(*)	8.565	.000
	Minggu III	Minggu I	68.900(*)	8.565	.000
		Minggu II	40.500(*)	8.565	.000
Tebal kalus	Minggu I	Minggu II	-13.620(*)	1.382	.000
		Minggu III	-24.020(*)	1.382	.000
		Minggu II	13.620(*)	1.382	.000
	Minggu II	Minggu III	-10.400(*)	1.382	.000
		Minggu I	24.020(*)	1.382	.000
	Minggu III	Minggu II	10.400(*)	1.382	.000

based on estimated marginal means

a mean difference is significant at the .05 level.

adjustment for multiple comparisons: Least Significant Difference (equivalent to no adjustments).

Multivariate Tests

	Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
Wilk's trace	1.082	7.362	8.000	50.000	.000
Pillai's lambda	.013	47.047(a)	8.000	48.000	.000
Hotelling's trace	69.778	200.611	8.000	46.000	.000
Roy's largest root	69.672	435.448(b)	4.000	25.000	.000

Each F tests the multivariate effect of Waktu. These tests are based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

Exact statistic

The statistic is an upper bound on F that yields a lower bound on the significance level.

Univariate Tests

Dependent Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Osteoblas	Contrast	3592.563	2	1796.281	559.938	.000
	Error	86.616	27	3.208		
TGF-beta	Contrast	52.619	2	26.309	36.361	.000
	Error	19.536	27	.724		
Alkali fosfatase	Contrast	23980.067	2	11990.033	32.689	.000
	Error	9903.400	27	366.793		
Gagal kalus	Contrast	2902.083	2	1451.041	152.046	.000
	Error	257.672	27	9.543		

Each F tests the effect of Waktu. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

2 Post Hoc Tests

Waktu

Multiple Comparisons

Dependent Variable		(I) Waktu	(J) Waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Osteoblas	Tukey HSD	Minggu I	Minggu II	-15.5800(*)	.80100	.000
			Minggu III	-26.6800(*)	.80100	.000
		Minggu II	Minggu I	15.5800(*)	.80100	.000
			Minggu III	-11.1000(*)	.80100	.000
		Minggu III	Minggu I	26.6800(*)	.80100	.000
			Minggu II	11.1000(*)	.80100	.000
TGF-beta	Tukey HSD	Minggu I	Minggu II	-1.4800(*)	.38041	.002
			Minggu III	-3.2400(*)	.38041	.000
		Minggu II	Minggu I	1.4800(*)	.38041	.002
			Minggu III	-1.7600(*)	.38041	.000
		Minggu III	Minggu I	3.2400(*)	.38041	.000
			Minggu II	1.7600(*)	.38041	.000
Alkal Fosfatase	Tukey HSD	Minggu I	Minggu II	-28.4000(*)	8.56496	.007
			Minggu III	-68.9000(*)	8.56496	.000
		Minggu II	Minggu I	28.4000(*)	8.56496	.007
			Minggu III	-40.5000(*)	8.56496	.000
		Minggu III	Minggu I	68.9000(*)	8.56496	.000
			Minggu II	40.5000(*)	8.56496	.000
tebal kalus	Tukey HSD	Minggu I	Minggu II	-13.6200(*)	1.38155	.000
			Minggu III	-24.0200(*)	1.38155	.000
		Minggu II	Minggu I	13.6200(*)	1.38155	.000
			Minggu III	-10.4000(*)	1.38155	.000
		Minggu III	Minggu I	24.0200(*)	1.38155	.000
			Minggu II	10.4000(*)	1.38155	.000

based on observed means.

The mean difference is significant at the .05 level.

3 NPar Tests

3.1 WAKTU = Minggu I

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Osteoblas (plp)	TGF-beta (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	21.7400	.4800	80.1000	19.4400
	Std. Deviation	2.31910	.34254	6.83862	1.09869
Most Extreme Differences	Absolute	.210	.137	.126	.228
	Positive	.165	.119	.126	.145
	Negative	-.210	-.137	-.116	-.228
Kolmogorov-Smirnov Z		.665	.433	.397	.722
Asymp. Sig. (2-tailed)		.768	.992	.997	.674

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Waktu = Minggu I

3.2 Waktu = Minggu II

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Osteo- blas (plp)	TGF- beta (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	37.3200	1.9600	108.500 0	33.0600
	Std. Deviation	1.23720	.63805	13.4102 0	2.25891
Most Extreme Differences	Absolute	.237	.147	.259	.261
	Positive	.191	.145	.259	.195
	Negative	-.237	-.147	-.204	-.261
Kolmogorov-Smirnov Z		.750	.464	.819	.826
Asymp. Sig. (2-tailed)		.627	.983	.513	.502

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Waktu = Minggu II

3.3 Waktu = Minggu III

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Osteo- blas (plp)	TGF- beta (plp)	Alkali fosfatase (u/ltr)	Tebal kalus (mm)
		10	10	10	10
Normal Parameters(a,b)	Mean	48.4200	3.7200	149.000 0	43.4600
	Std. Deviation	1.64776	1.28305	29.5597 3	4.72445
Most Extreme Differences	Absolute	.253	.213	.161	.210
	Positive	.253	.213	.161	.148
	Negative	-.163	-.141	-.129	-.210
Kolmogorov-Smirnov Z		.800	.672	.510	.663
Asymp. Sig. (2-tailed)		.544	.756	.957	.772

Test distribution is Normal.

Calculated from data.

Waktu = Minggu III

Empiran 13: Uji Beda terhadap Respon Variabel Kelompok Laser

1 Minggu I

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
osteoblas	Kontrol	10	19.4200	1.53608	.48575
	Laser	10	21.7400	2.31910	.73336
GF-beta	Kontrol	10	.1600	.15776	.04989
	Laser	10	.4800	.34254	.10832
Alkali fosfatase	Kontrol	10	93.0000	7.85988	2.48551
	Laser	10	80.1000	6.83862	2.16256
Tebal kalus	Kontrol	10	9.2600	.76041	.24046
	Laser	10	19.4400	1.09869	.34744
Waktu	Kontrol	10	1.0000	.00000(a)	.00000
	Laser	10	1.0000	.00000(a)	.00000

Waktu = Minggu I

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
osteoblas	Equal variances assumed	1.633	.218	-2.637	18	.017
	Equal variances not assumed			-2.637	15.622	.018
GF-beta	Equal variances assumed	6.260	.022	-2.683	18	.015
	Equal variances not assumed			-2.683	12.654	.019
Alkali fosfatase	Equal variances assumed	.028	.870	3.915	18	.001
	Equal variances not assumed			3.915	17.662	.001
Tebal kalus	Equal variances assumed	2.052	.169	-24.093	18	.000
	Equal variances not assumed			-24.093	16.013	.000

2 Waktu = Minggu II

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
osteoblas	Kontrol	10	25.0400	3.36756	1.06492
	Laser	10	37.3200	1.23720	.39124
GF-beta	Kontrol	10	.5600	.33731	.10667
	Laser	10	1.9600	.63805	.20177
Alkali fosfatase	Kontrol	10	123.0000	12.00000	3.79473
	Laser	10	108.5000	13.41020	4.24068
Tebal kalus	Kontrol	10	15.3200	.80111	.25333
	Laser	10	33.0600	2.25891	.71433

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
osteoblas	Equal variances assumed	6.691	.019	-10.824	18	.000
	Equal variances not assumed			-10.824	11.386	.000
GF-beta	Equal variances assumed	4.721	.043	-6.134	18	.000
	Equal variances not assumed			-6.134	13.666	.000
Alkali fosfatase	Equal variances assumed	.641	.434	2.548	18	.020
	Equal variances not assumed			2.548	17.782	.020
Tebal kalus	Equal variances assumed	14.478	.001	-23.406	18	.000
	Equal variances not assumed			-23.406	11.229	.000

Waktu = Minggu II

3 Waktu = Minggu III

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
osteoblas	Kontrol	10	31.4600	2.70317	.85482
	Laser	10	48.4200	1.64776	.52107
TGF-beta	Kontrol	10	1.0600	.23190	.07333
	Laser	10	3.7200	1.28305	.40574
Alkali fosfatase	Kontrol	10	145.2000	22.14999	7.00444
	Laser	10	149.0000	29.55973	9.34761
Tebal kalus	Kontrol	10	22.3400	2.43685	.77060
	Laser	10	43.4600	4.72445	1.49400

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)
Osteoblas	Equal variances assumed	7.400	.014	-16.941	18	.000
	Equal variances not assumed			-16.941	14.877	.000
TGF-beta	Equal variances assumed	21.721	.000	-6.451	18	.000
	Equal variances not assumed			-6.451	9.587	.000
Alkali fosfatase	Equal variances assumed	1.011	.328	-.325	18	.749
	Equal variances not assumed			-.325	16.684	.749
Tebal kalus	Equal variances assumed	7.227	.015	-12.564	18	.000
	Equal variances not assumed			-12.564	13.472	.000

Waktu = Minggu III

Empiran 14 : Uji Regresi Linier Untuk Respon Kelompok Peralkuan Terhadap Sinar Laser Energi Rendah

1.1 Respon Osteoblas

pendent variable.. Respon Osteoblas Method.. LINEAR

Stepwise Deletion of Missing Data

Multiple R .98355
 Square .96737
 Adjusted R Square .96620
 Standard Error 2.07077

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	3559.1120	3559.1120
Residuals	28	120.0667	4.2881

F = 829.99836 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
Waktu	13.340000	.463039	.983548	28.810	.0000
Constant)	9.146667	1.000278		9.144	.0000

pendent variable.. Resosteo Method.. QUADRATI

Stepwise Deletion of Missing Data

Multiple R .98816
 Square .97646
 Adjusted R Square .97471
 Standard Error 1.79109

Analysis of Variance:

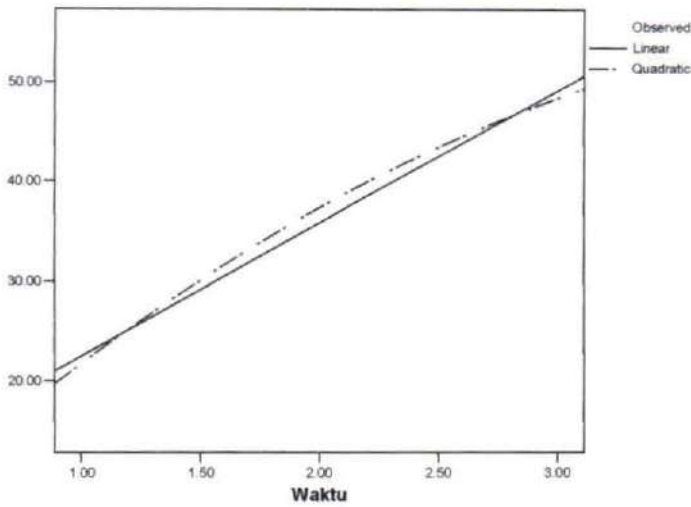
	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	3592.5627	1796.2813
Residuals	27	86.6160	3.2080

F = 559.93807 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
Waktu	22.300000	2.803498	1.644161	7.954	.0000
Waktu**2	-2.240000	.693686	-.667460	-3.229	.0033
Constant)	1.680000	2.468846		.680	.5020

Respon Osteoblas (pip)



2 Respon TGF- β

pendent variable.. TGF- β
 stwise Deletion of Missing Data

Method.. LINEAR

Multiple R .85290
 Square .72744
 Adjusted R Square .71770
 Standard Error .83808

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	52.488000	52.488000
Residuals	28	19.666667	.702381

F = 74.72868 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
Waktu	1.620000	.187401	.852899	8.645	.0000
(Constant)	-1.186667	.404832		-2.931	.0067

pendent variable.. TGF
 stwise Deletion of Missing Data

Method.. QUADRATI

Multiple R .85396
 Square .72925
 Adjusted R Square .70919
 Standard Error .85062

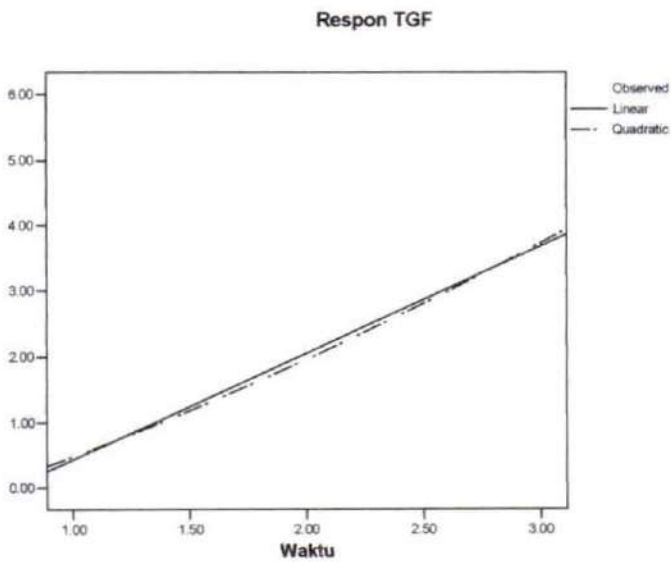
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	52.618667	26.309333
Residuals	27	19.536000	.723556

F = 36.36118 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
Waktu	1.060000	1.331432	.558070	.796	.4329
Waktu**2	.140000	.329444	.297885	.425	.6742
Constant)	-.720000	1.172500		-.614	.5443



3 Respon Alkali fosfatase

pendent variable.. Alkali fosfatase

Method.. LINEAR

Stepwise Deletion of Missing Data

Multiple R .83697
 Square .70052
 Adjusted R Square .68982
 Standard Error 19.03701

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	1	23736.050	23736.050
Residuals	28	10147.417	362.408

F = 65.49543 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
aktu	34.450000	4.256805	.836971	8.093	.0000
(constant)	43.633333	9.195749		4.745	.0001

pendent variable.. Alkali fosfatase

Method.. QUADRATI

Stepwise Deletion of Missing Data

Multiple R .84126
 Square .70772
 Adjusted R Square .68607
 Standard Error 19.15183

Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	23980.067	11990.033
Residuals	27	9903.400	366.793

F = 32.68886 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
aktu	10.250000	29.977356	.249026	.342	.7351
aktu**2	6.050000	7.417472	.594038	.816	.4218
(constant)	63.800000	26.398976		2.417	.0227

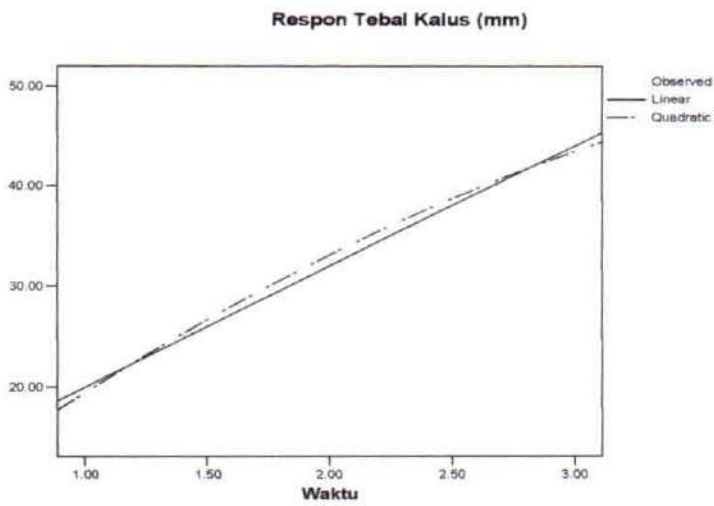
Analysis of Variance:

	DF	Sum of Squares	Mean Square
Regression	2	2902.0827	1451.0413
Residuals	27	257.6720	9.5434

R-squared = 152.04646 Signif F = .0000

----- Variables in the Equation -----

Variable	B	SE B	Beta	T	Sig T
Waktu	18.450000	4.835426	1.467860	3.816	.0007
Waktu**2	-1.610000	1.196458	-.517668	-1.346	.1896
(Constant)	2.600000	4.258224		.611	.5466



Empiran 15: Prosedur Pengecatan TGF- β Secara ImunohistokimiaProsedur Pengecatan TGF- β Secara Imunohistokimia

Deparafinisasi:

Xylol : 3 x @ 5 menit

Alkohol absolute : 2 x @ 3 menit

Alkohol 96% : 2 x @ 3 menit

Alkohol 80% : 1 x 3 menit

Alkohol 70% : 1 x 3 menit

Air : dicuci dengan air mengalir sampai sisa-sisa alkohol hilang

Trypsin 0,025% treatment

Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 15-30 menit

Dicuci dengan PBS 2 x @ 5 menit

H₂O₂ 3% pada suhu ruang selama kurang lebih 10 menit

Dicuci dengan PBS 2 x @ 5 menit

Diinkubasi dengan primer Ab (TGF- β) selama kurang lebih 1 jam

Dicuci dengan PBS 2 x @ 5 menit

Diinkubasi dengan secondary Ab/Link (DAKO LSAB kit) selama 30menit

Dicuci dengan PBS 2 x @ 5 menit

Diinkubasi dengan streptavidin HRP (DAKO LSAB kit) selama 30 menit

Dicuci dengan PBS 2 x @ 5 menit

Diinkubasi dengan DAB Chromogen 6-10 menit

Dicuci dengan PBS 2 x @ 5 menit

Dicuci aquadest

Dicuci air kran

Diinkubasi Meyer's Hemaatoxylin 10-15 menit

Direndam dalam air sampai biru

Dikeringkan di udara pada suhu ruang

Mounting (ditetesi bahan mounting misalnya Entellan dan ditutup cover glass).

mpiran Foto



Foto 1 Tikus ditempatkan dalam kandang plastik berukuran 30 x 40 x 15 cm yang diberi alas sekam dan ditutup anyaman kawat. Tiap kandang diisi 5 ekor tikus yang diberi makanan standard dan minum aqua.

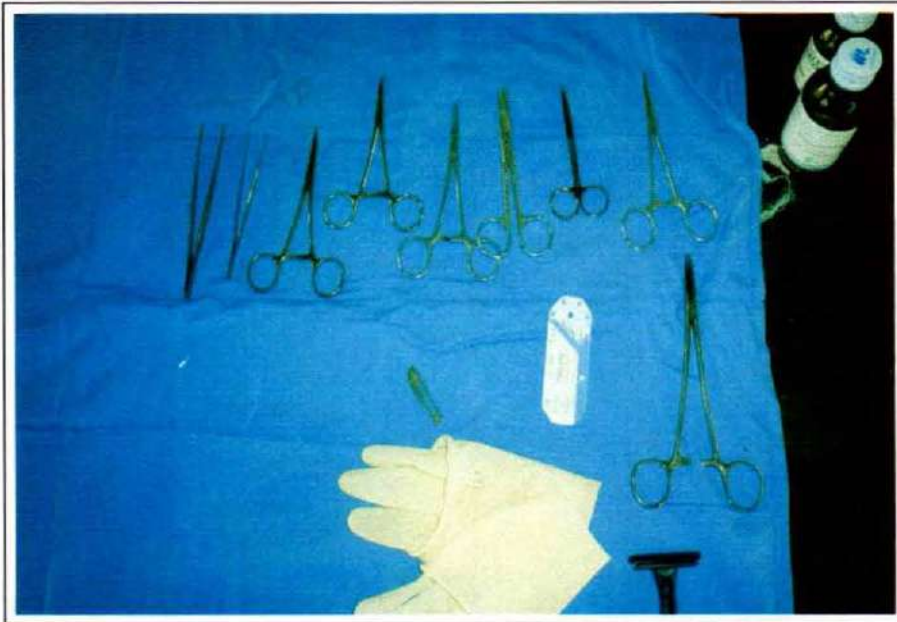


Foto 2 Peralatan yang dibutuhkan untuk frakturasi tulang tibia hewan coba.



Foto 3 Pembiusan dilakukan dengan cara memasukkan hewan percobaan ke dalam tabung kaca berisi kapas yang telah dibasahi dengan ether.

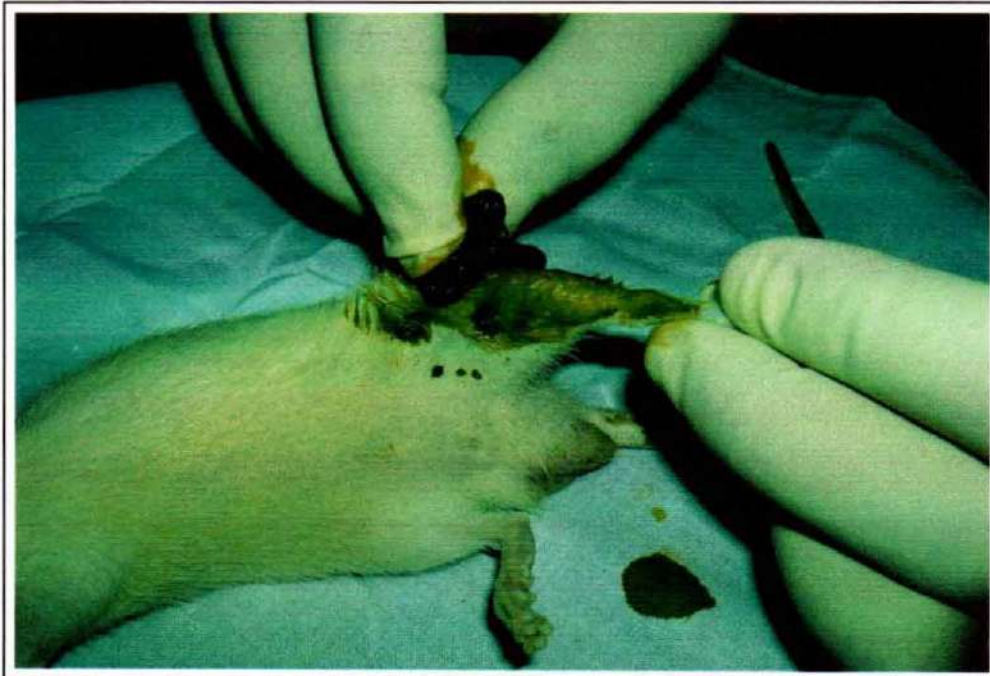


Foto 4.a Desinfeksi kruris kiri tikus dengan larutan betadine sebelum dilakukan tindakan operatif.

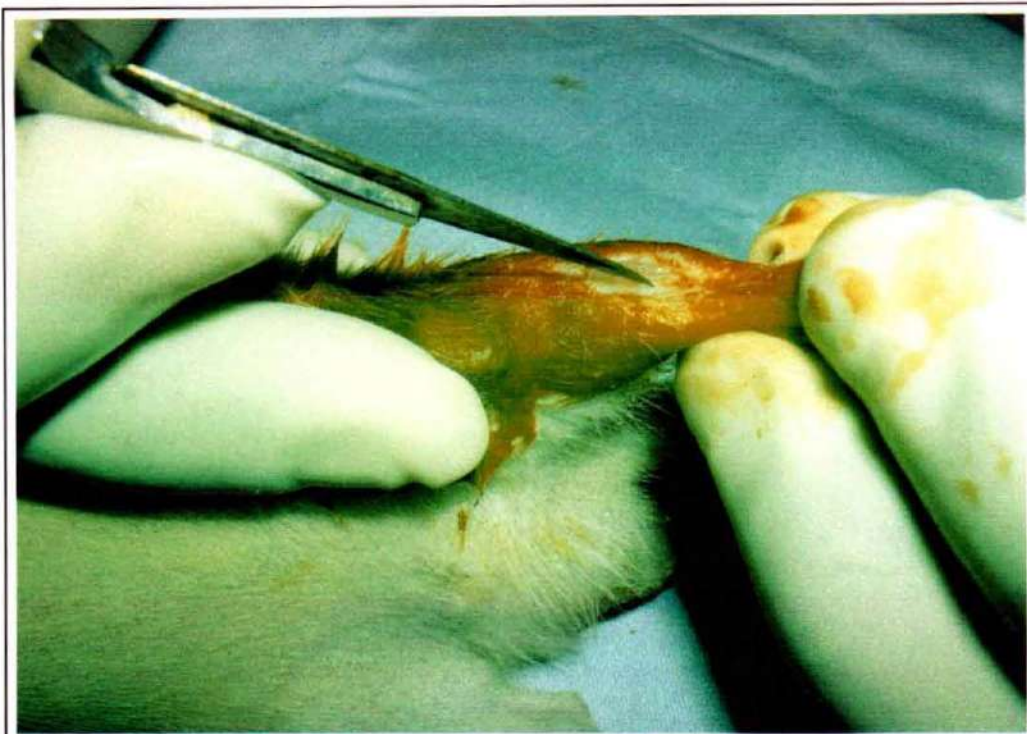


Foto 4.b Incisi kulit dilakukan di bagian ventral kruris kiri tepat di atas krista tibia



Foto 4.c Lapisan otot dipisahkan secara tumpul sampai terlihat tulang tibia

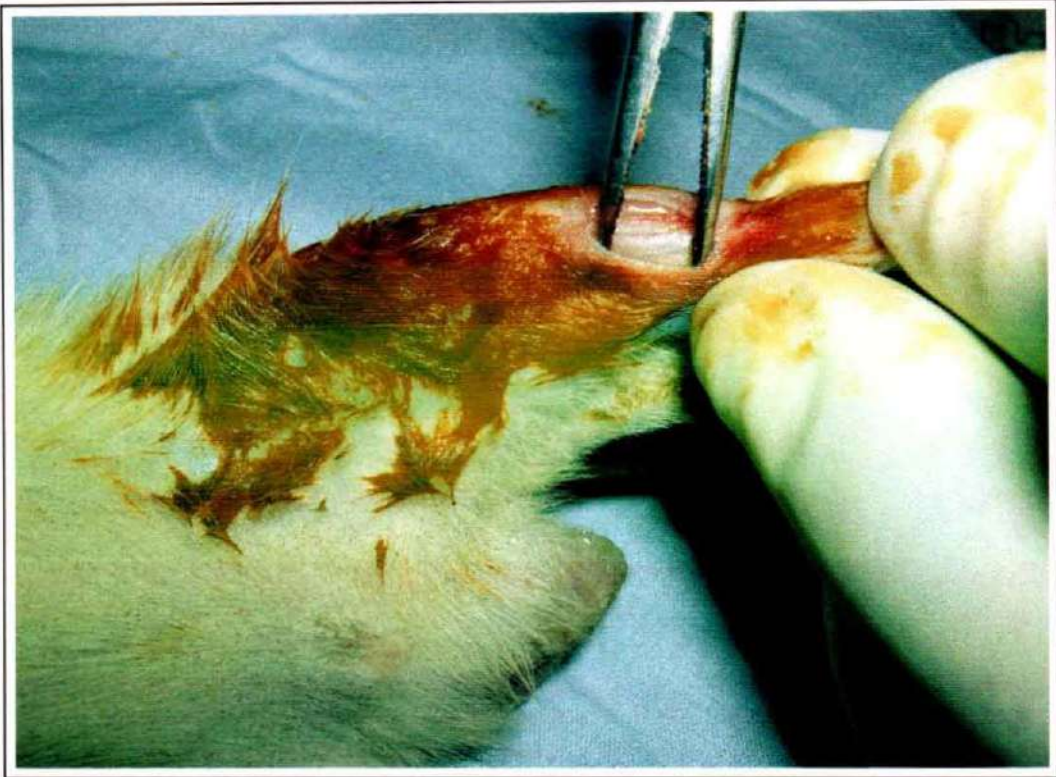


Foto 4.d Tulang tibia dibebaskan dari otot sekitarnya secara tumpul

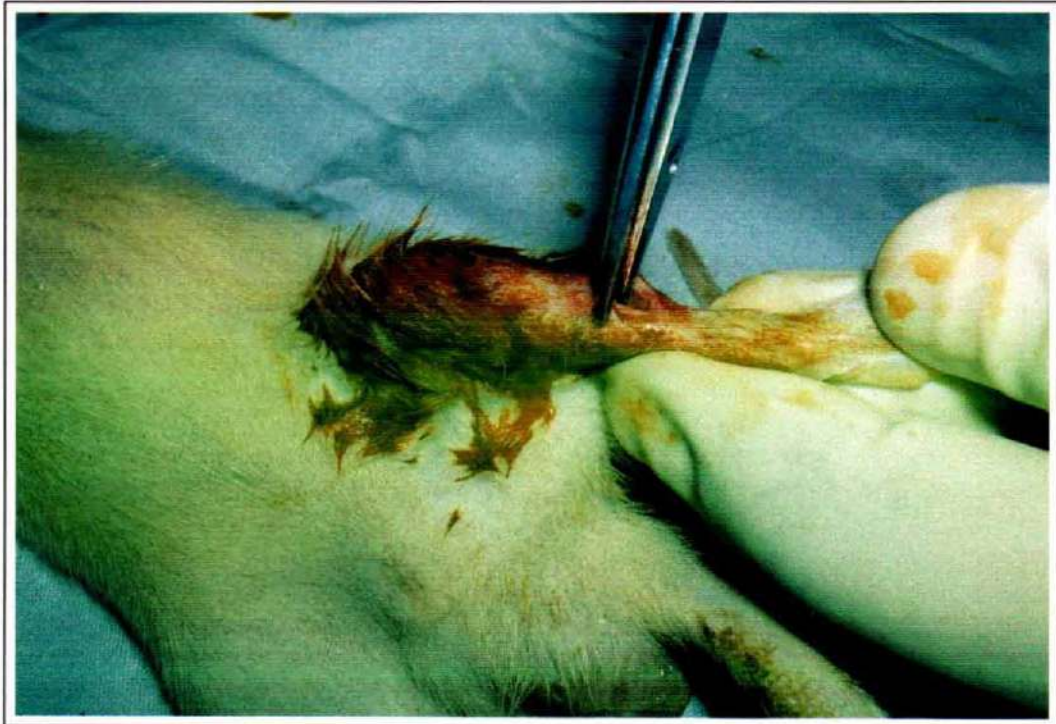


Foto 4.e Tulang dipatahkan dengan cara menggantung pada daerah 1/3 tengah sehingga didapatkan fraktur tibia transverse komplrit.



Foto 4.f Tulang tibia kiri setelah difrakturasi

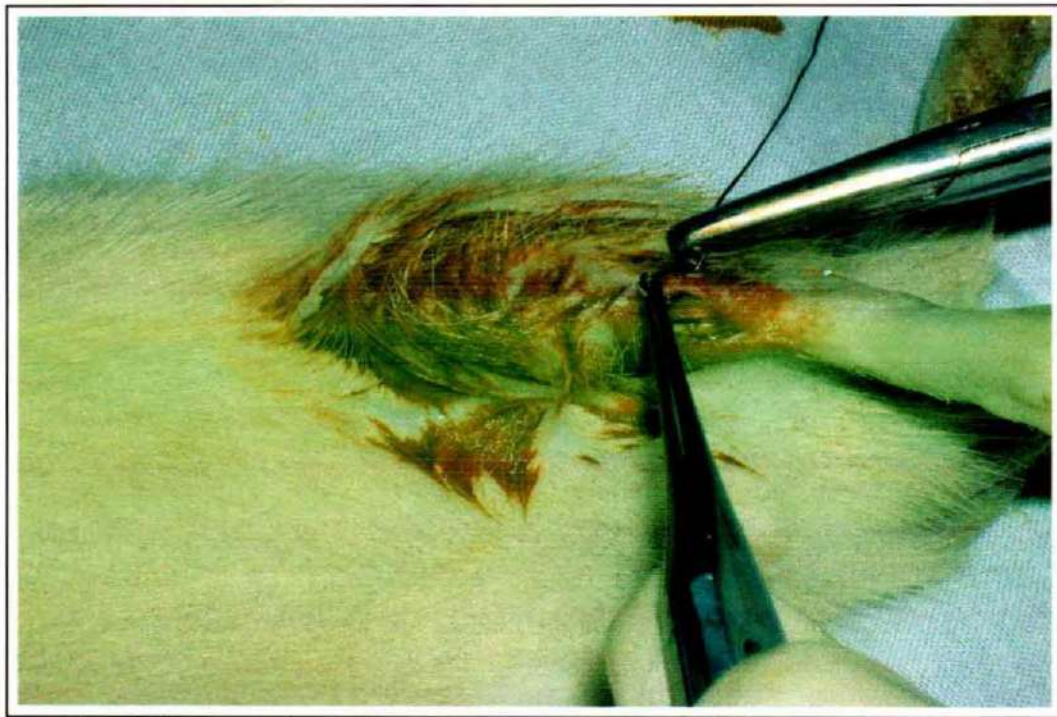


Foto 4.g Luka operasi dijahit menggunakan benang silk 3.0



Foto 4.h Fraktur diimobilisasi dengan pemasangan gips melewati sendi proksimal dan distal dari garis fraktur

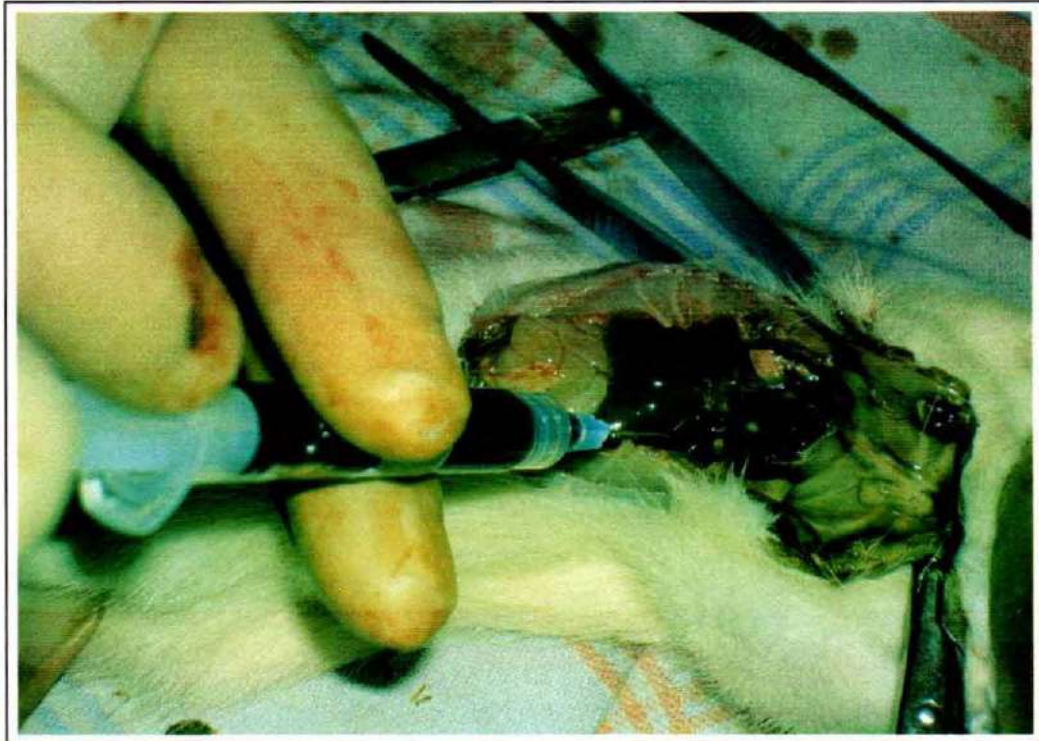


Foto 5: Pengambilan sampel darah dari jantung hewan coba menggunakan jarum 3 cc untuk pemeriksaan alkali fosfatase.

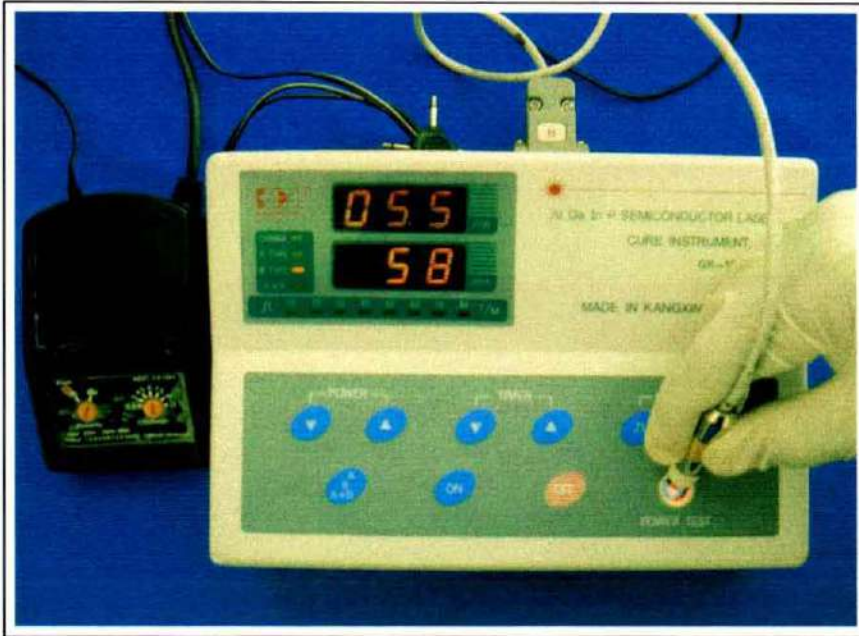


Foto 6: Sinar laser energi rendah Al Ga In P Semikonduktor Laser GX-100 buatan Kangxing Laser yang dapat mengeluarkan sinar laser dengan dosis 0,5 joule.



Foto 7: Penyinaran laser energi rendah dilakukan langsung ke *fracture site* dengan cara menempelkan *beam* dari *probe* laser melalui lubang yang dibuat tepat di atas daerah fraktur.

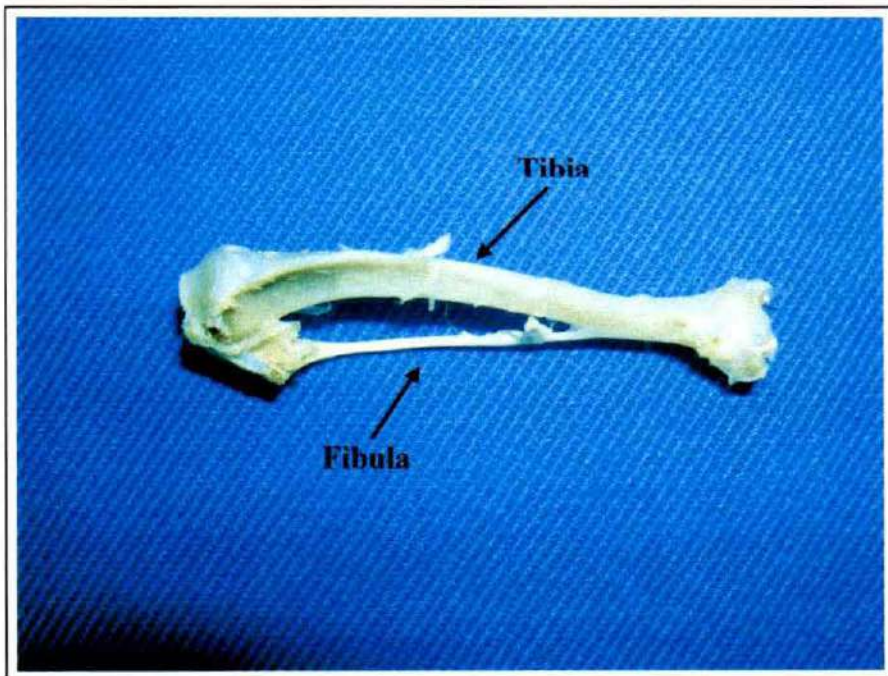


Foto 8.a Tulang tibia tikus yang tidak fraktur



Foto 8: Gambar tulang tibia tikus yang sudah mengalami *healing* ditandai oleh terbentuknya kalus seperti yang ditunjukkan oleh anak panah.

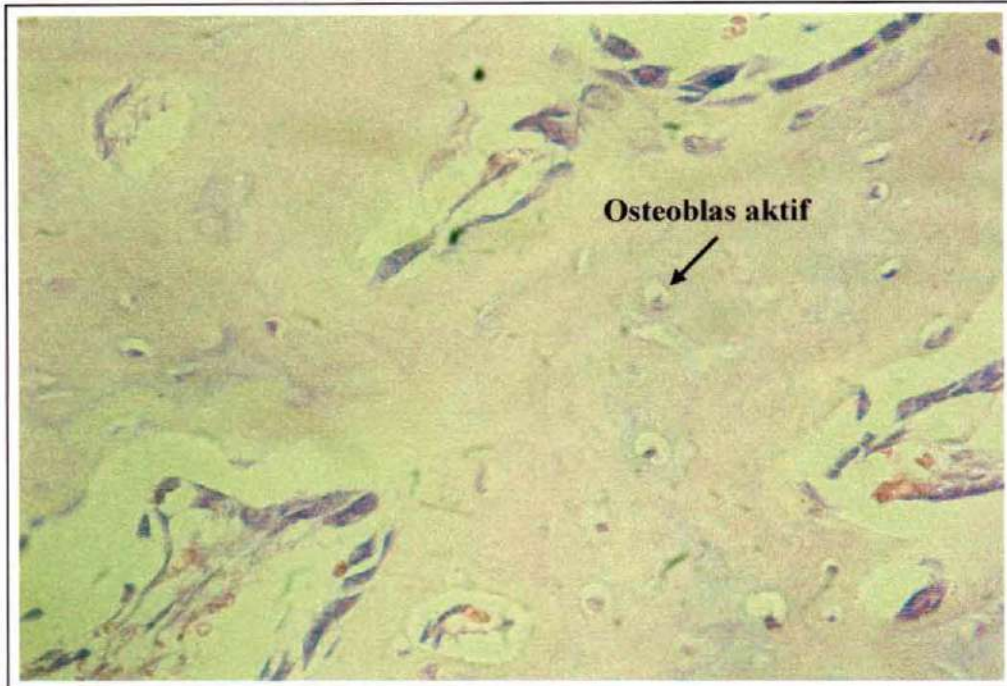


Foto 9.a Osteoblas pada kelompok kontrol minggu I dengan pewarnaan HE pembesaran 400 kali.

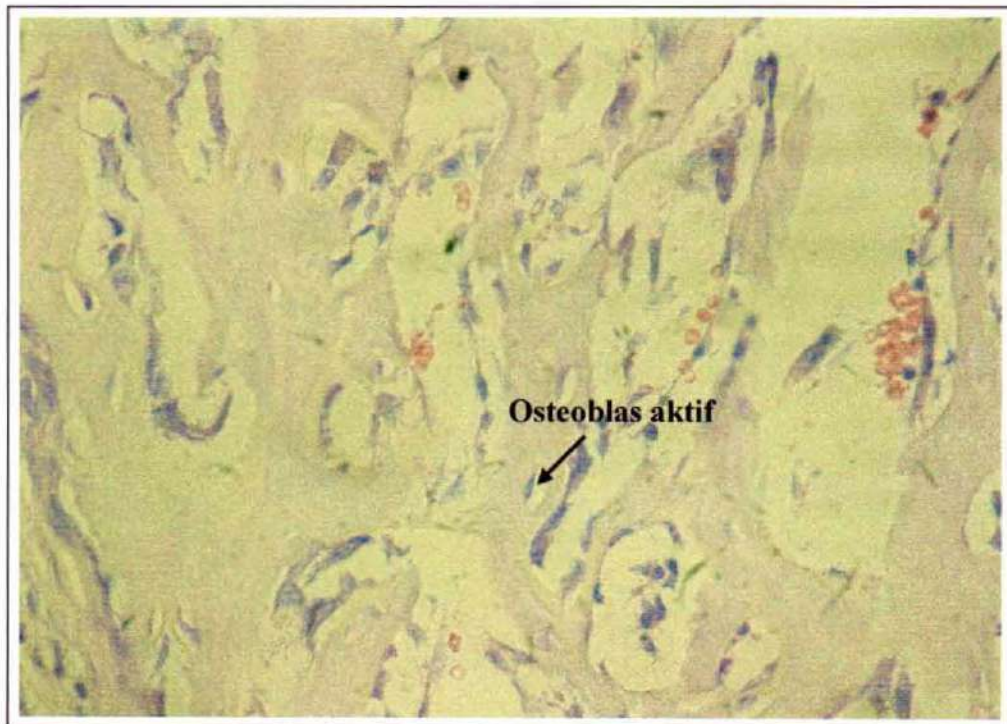


Foto 9.b Osteoblas pada kelompok penyinaran laser minggu I dengan pewarnaan HE pembesaran 400 kali.



Foto 9.c Osteoblas pada kelompok kontrol minggu II dengan pewarnaan HE pembesaran 400 kali.

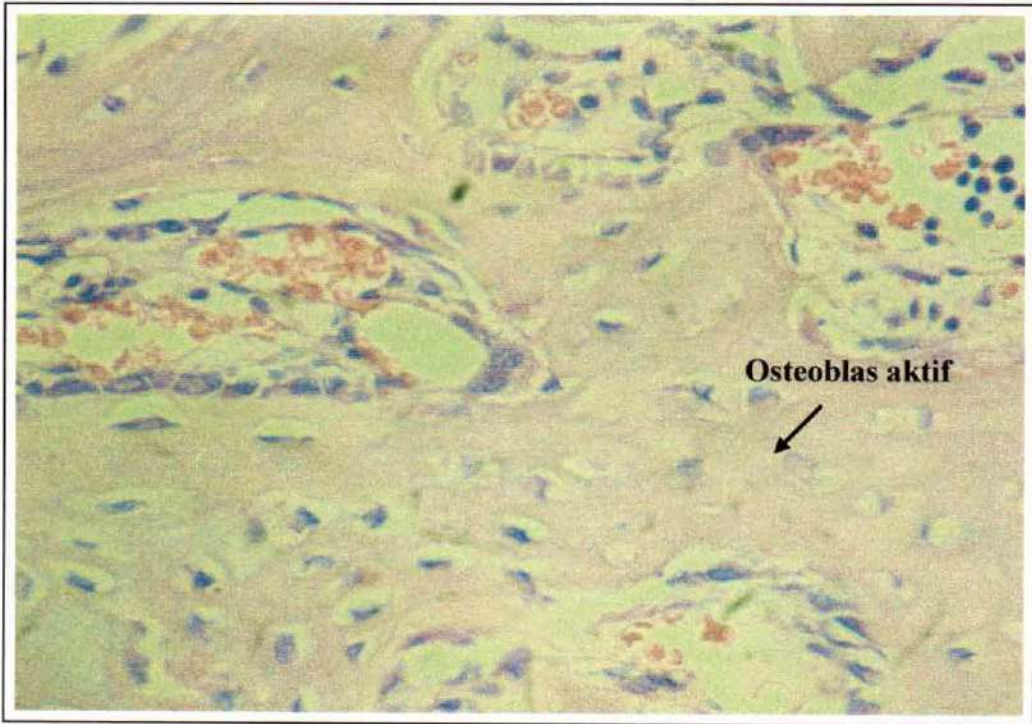


Foto 9.d Osteoblas pada kelompok penyinaran laser minggu II dengan pewarnaan HE pembesaran 400 kali.

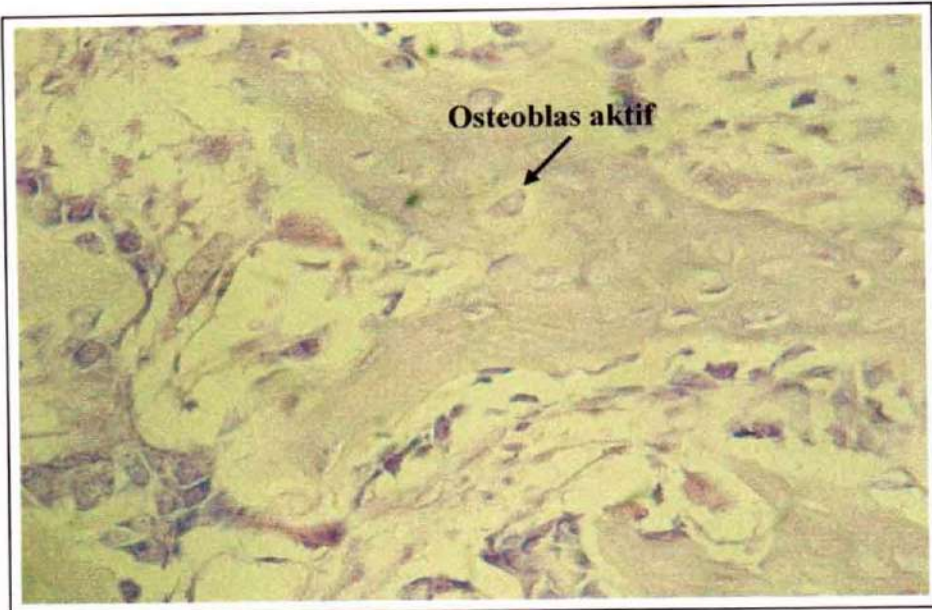


Foto 9.e Osteoblas pada kelompok kontrol minggu III dengan pewarnaan HE pembesaran 400 kali.

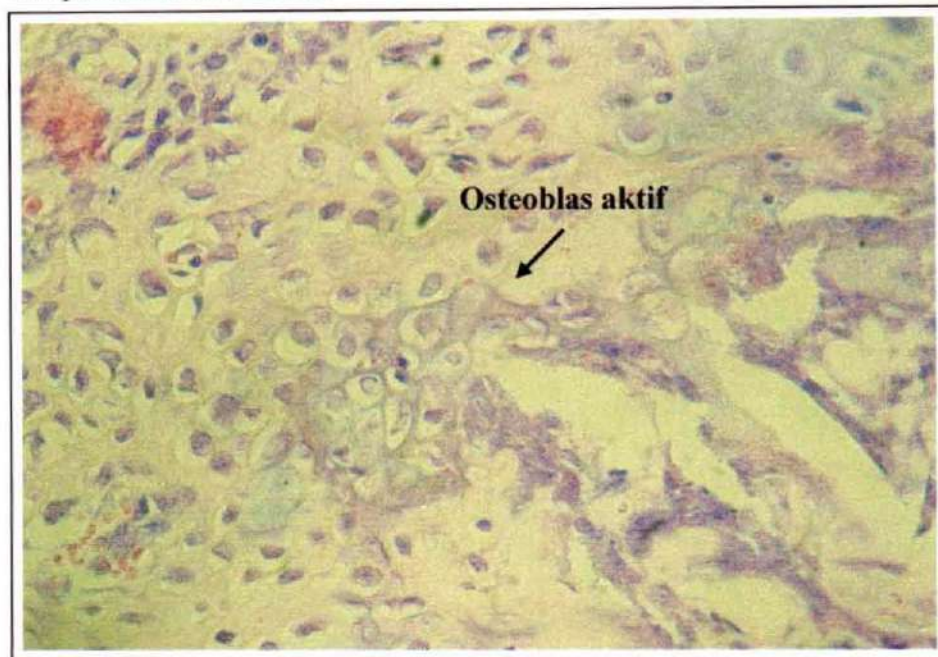


Foto 9.f Osteoblas pada kelompok penyinaran laser minggu III dengan pewarnaan HE pembesaran 400 kali.

Foto 9: Osteoblas dengan pewarnaan HE pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dievaluasi minggu I, II dan minggu III. Terlihat jumlah osteoblas rata-rata lebih banyak pada perlakuan (kelompok yang disinari dengan laser energi rendah) dibandingkan dengan kelompok kontrol. Osteoblas pada masing-masing preparat diperlihatkan oleh tanda anak panah.

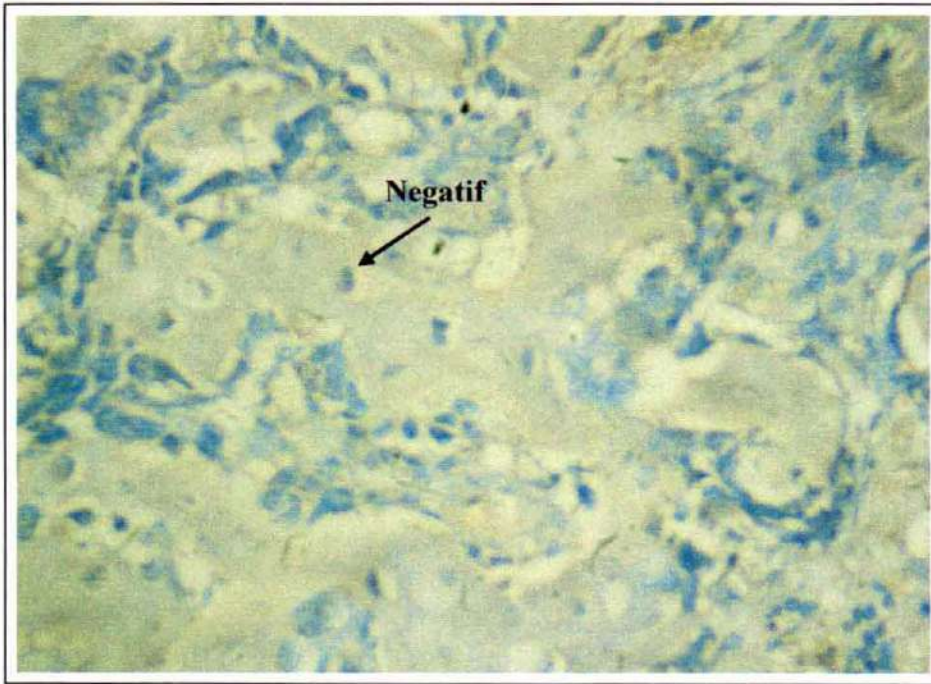


Foto 10.a Osteoblas yang tidak mengandung TGF- β dengan pewarnaan imunohistokimia pada kelompok kontrol minggu I.

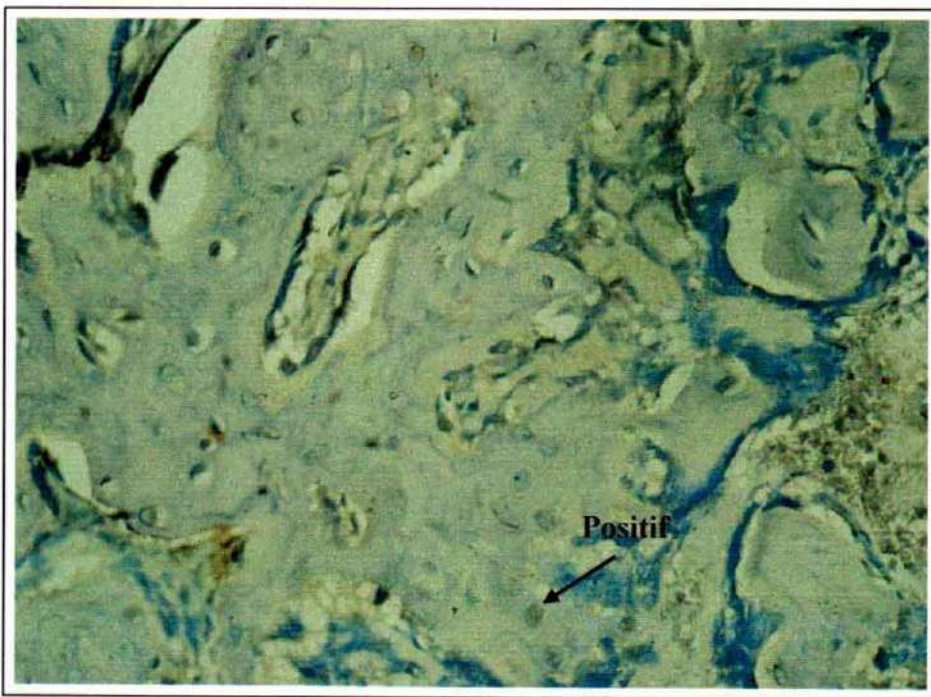


Foto 10.b Osteoblas yang mengandung TGF- β pada kelompok penyinaran laser minggu I dengan pewarnaan imunohistokimia terlihat berwarna kuning kecoklatan.

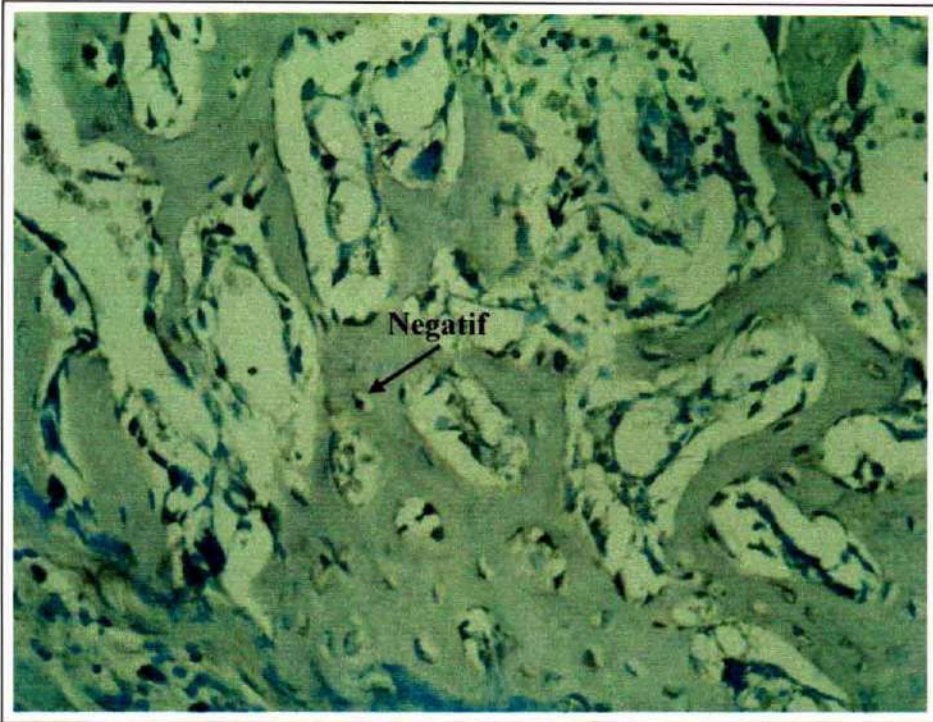


Foto 10.c Osteoblas yang tidak mengandung TGF- β dengan pewarnaan imunohistokimia pada kelompok kontrol minggu II.

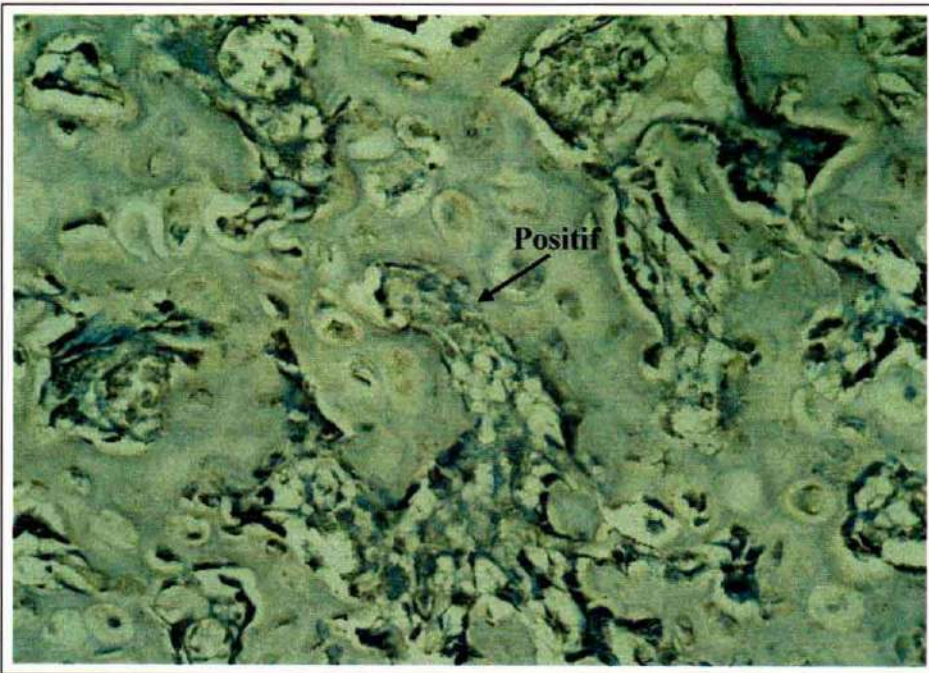


Foto 10.d Osteoblas yang mengandung TGF- β dengan pewarnaan imunohistokimia pada kelompok kontrol minggu II.

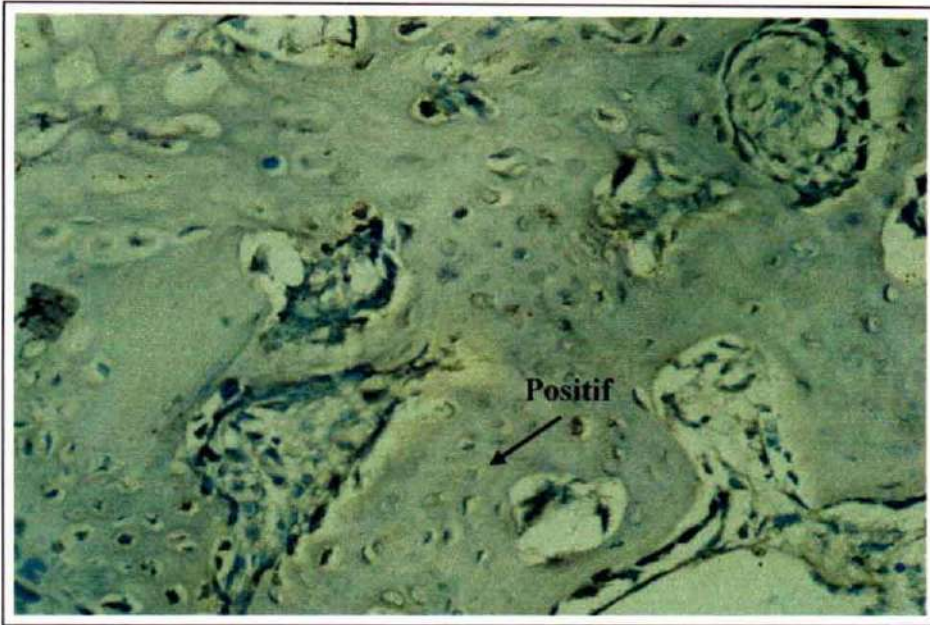


Foto 10.e Osteoblas yang mengandung TGF- β dengan pewarnaan imunohistokimia pada kelompok kontrol minggu III.

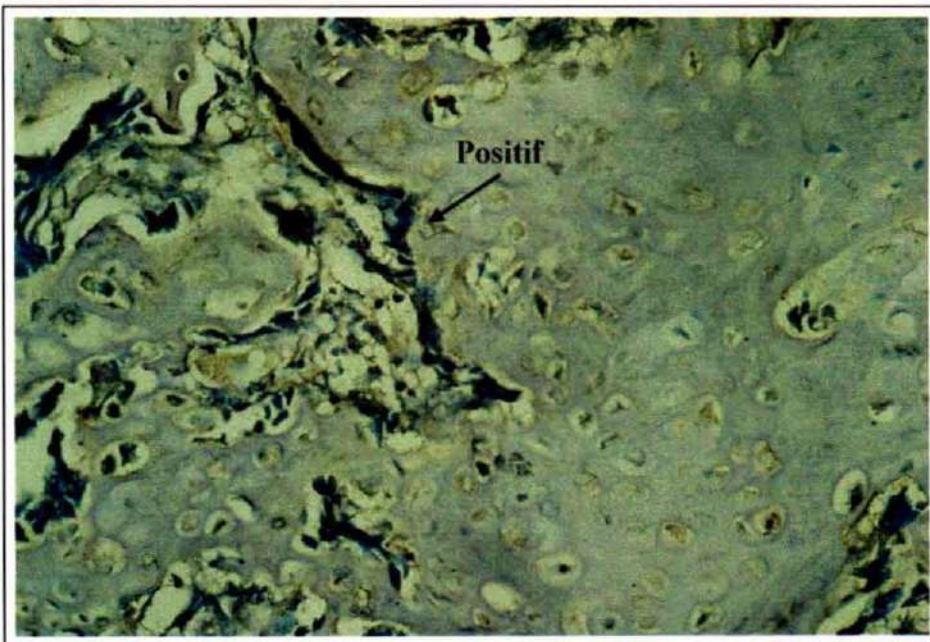


Foto 10.f Osteoblas yang mengandung TGF- β dengan pewarnaan imunohistokimia pada kelompok penyinaran laser minggu II.

Foto 10 Osteoblas dengan pewarnaan imunohistokimia pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang dievaluasi minggu I, II dan minggu III. Terlihat jumlah osteoblas yang mengekspresikan TGF- β rata-rata lebih banyak pada perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Osteoblas yang mengekspresikan TGF- β dengan pewarnaan imunohistokimia terlihat warna coklat kehitaman seperti yang diperlihatkan oleh tanda anak panah.

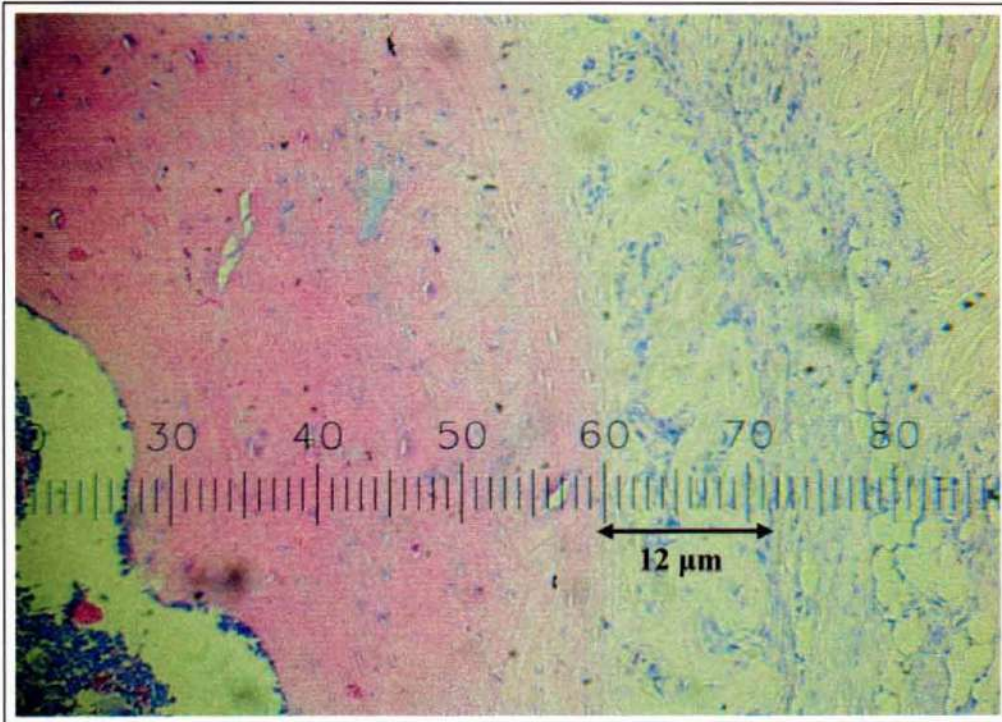


Foto 11.a Tebal kalus pada kelompok kontrol minggu I.

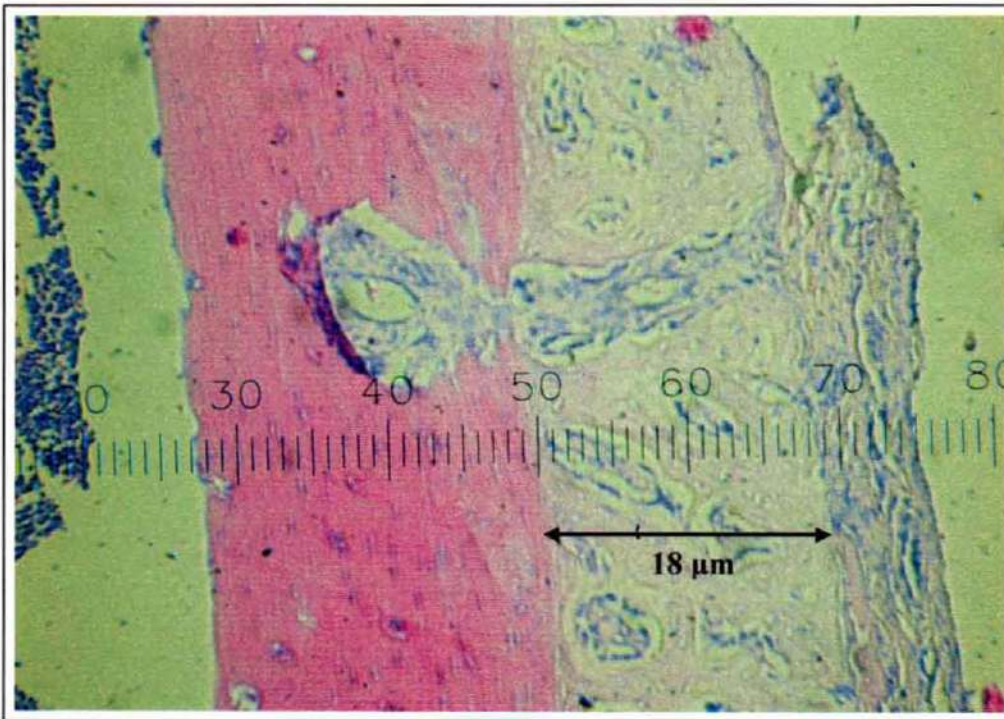


Foto 11.b Tebal kalus pada kelompok penyinaran laser minggu I.

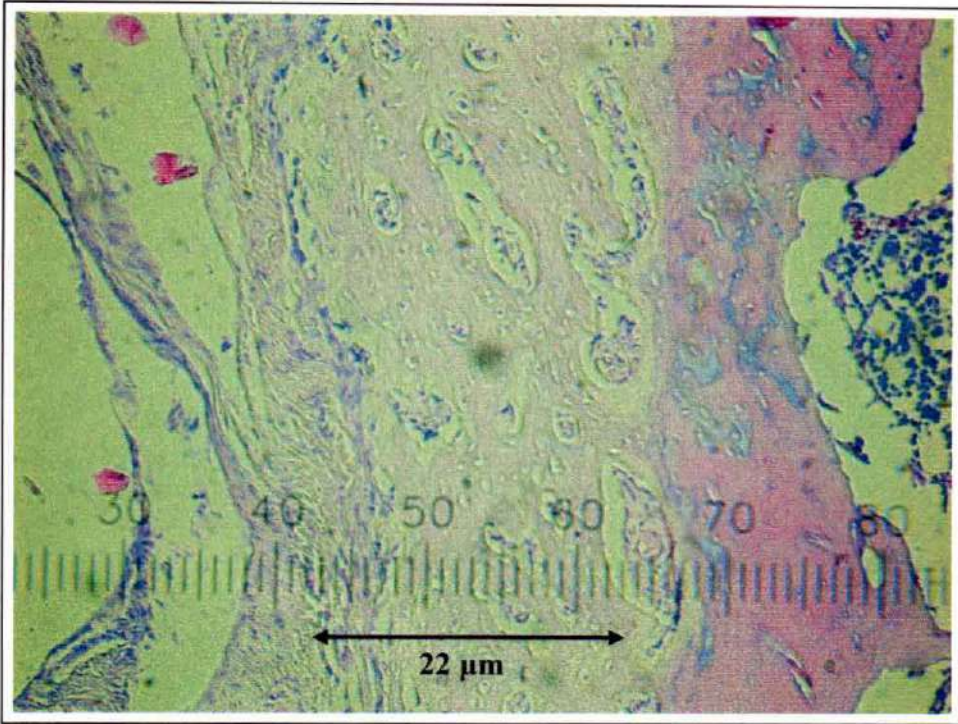


Foto 11.c Tebal kalus pada kelompok kontrol minggu II.

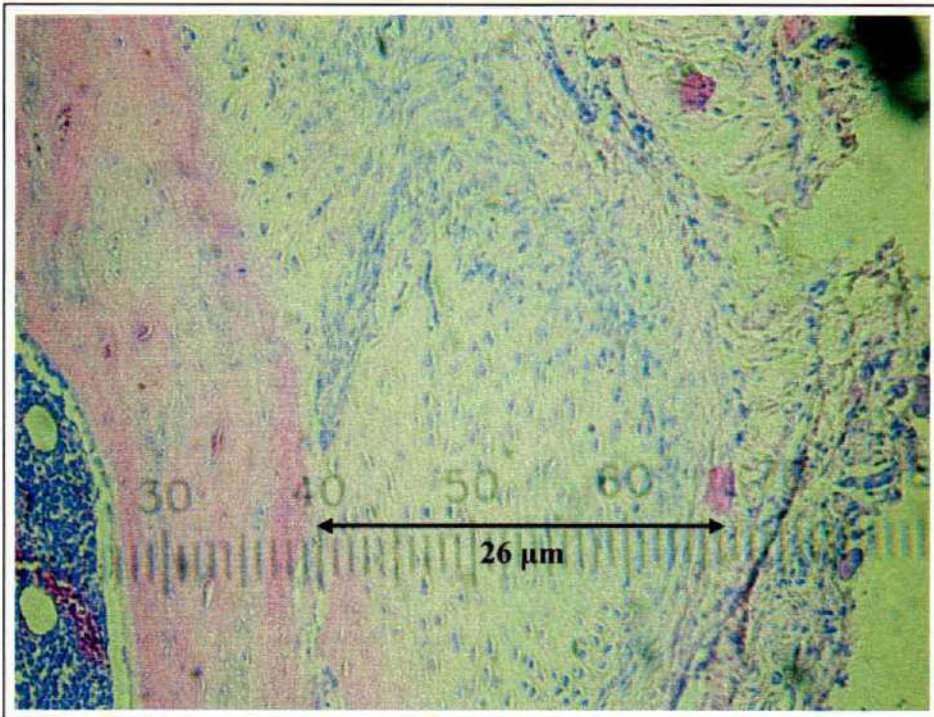


Foto 11.d Tebal kalus pada kelompok penyinaran laser minggu II.

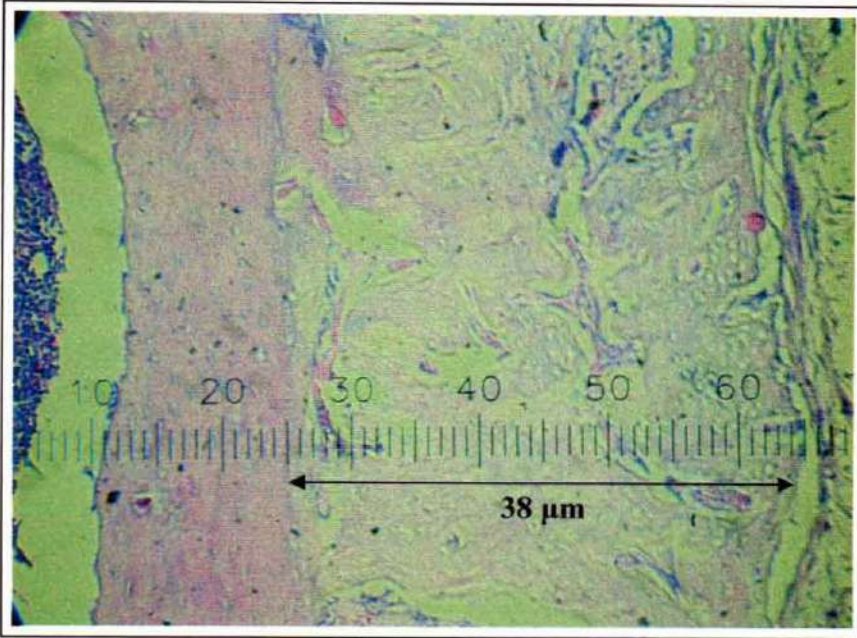


Foto 11.e Tebal kalus pada kelompok kontrol minggu III.

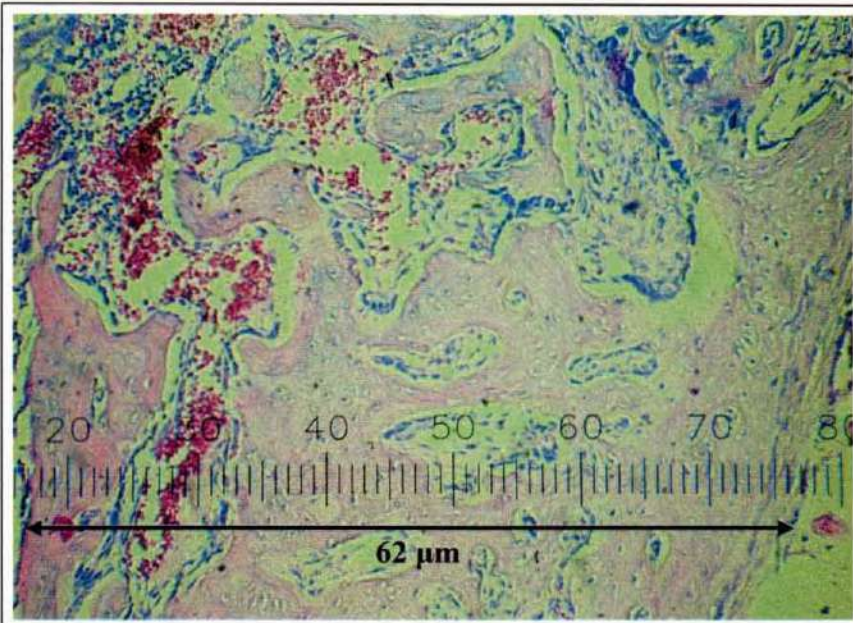


Foto 11.f. Tebal kalus pada kelompok penyinaran laser minggu III.

Foto 11 Tebal kalus yang diukur dengan *ocular micrometer (graticule)*. Terlihat tebal kalus rata-rata lebih besar pada kelompok perlakuan (kelompok yang disinari dengan laser energi rendah) dibandingkan dengan kelompok kontrol seperti diperlihatkan anak panah.