

TESIS

**PERBANDINGAN PEMBENTUKAN TULANG
BARU OLEH *DEMINERALIZED BONE MATRIX*
(*DBM*) DAN TULANG KANSELOUS BEKU
KERING (*FREEZE DRIED*) YANG DITANAM
PADA OTOT TIKUS PUTIH**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

SULIS BAYUSENTONO

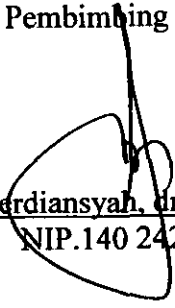
**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 26 AGUSTUS 2009**

Oleh

Pembimbing Ketua


Ferdiansyah, dr., SpOT
NIP.140 242 331

Pembimbing


Troef Soemarno, dr., MS., SpPA (K)
NIP. 130 675 538

Mengetahui

**Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga**


Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD
NIP. 130 541 984

Telah diuji pada tanggal 26 Agustus 2009

PANITIA PENGUJI TESIS

KETUA : Prof. Dr. Djoko Roeshadi, dr., SpOT

ANGGOTA :

1. Ferdiansyah, dr., SpOT
2. Troef Soemarno, dr., MS., SpPA (K)
3. Prof. Dr. Paulus Liben, dr., MS
4. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., Mkes
5. Prof. H. Ari Gunawan, dr., MS., Ph. D

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmat dan karuniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada dokter Ferdiansyah, SpOT, pembimbing ketua yang dengan sepenuh hati telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada dokter Troef Sumarno, MS, SpPA, sebagai pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya juga saya sampaikan kepada Prof. Dr. Djoko Roeshadi, dr., SpB., SpOT, sebagai guru dan pendidik yang dengan sabar selalu memberi nasihat, dorongan, saran dan motivasi kepada saya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, Prof. Dr. Fasichul Lisan, Apt.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Muhammad Amin dr., SpP (K).
3. Ketua TKPSM Program Pascasarjana Pendidikan Magister Fakultas Kedokteran Unair, Prof. Dr. Harjanto JM, dr., MS., AIF atas kesempatan yang diberikan kepada kami untuk melaksanakan ujian tesis.
4. Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar, Prof. Retno Handajani, dr., MS., PhD yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk menyelesaikan studi di Program Pascasarjana ini.
5. Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Unair, Prof. Dr. Kuntaman, dr., MS., SpMK (K), atas bantuan yang telah diberikan.
6. Wakil Dekan II Fakultas Kedokteran Unair, Choesnan Efendi, dr., MS., AIF, atas bantuan yang telah diberikan.

7. Ketua Departemen Orthopaedi dan Traumatologi Fakultas Kedokteran Unair, Erwin Ramawan, dr., SpOT, atas dukungan yang telah diberikan.
 8. Seluruh senior dan staf pengajar di bagian Orthopaedi dan Traumatologi atas ilmu dan didikan yang diberikan kepada kami.
 9. Para penguji tesis ini atas penilaian dan masukan yang diberikan kepada kami.
 10. Ketua Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya, Ferdiansyah, dr., SpOT dan staf pegawai khususnya bpk. Lesmono atas peminjaman fasilitas bank jaringan.
 11. Ketua Departemen Biokimia dan Pegawai Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair atas peminjaman fasilitas laboratorium selama penelitian kami.
 12. Ketua Departemen Patologi Anatomi dan Pegawai Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Unair atas peminjaman fasilitas laboratorium selama penelitian kami.
 13. Ketua Departemen Anatomi dan Histologi Fakultas Kedokteran Unair atas peminjaman alat mikroskop dan gratikul.
 14. Rekan-rekan PPDS I Orthopaedi dan Traumatologi Fakultas Kedokteran Unair yang telah membantu proses pembedahan hewan coba dan pengumpulan bahan.
 15. Para sekretaris dan karyawan di bagian Orthopaedi dan Traumatologi atas kerjasama dan bantuannya.
 16. Istriku Yuani, dr dan anak-anakku Attar, Nawfa yang dengan penuh kesabaran dan doa senantiasa memberi dukungan demi keberhasilan pendidikan penulis.
 17. Kedua orang tua kami H. Sukatman dan Hj Sri Sularsih atas dukungan moril maupun materiil yang tak terhingga serta doa dan restunya yang tak pernah berhenti.
 18. Adik-adikku Yesi, Ria, Maya, Vivi atas dukungannya terhadap keluarga sehingga penelitian ini bisa selesai.
 19. Semua pihak yang turut membantu dan mendukung selama pendidikan yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu.
- Akhirnya dengan segenap kerendahan mohon maaf atas segala kekurangan dari karya ini.

Surabaya, 7 Agustus 2009

RINGKASAN

Perbandingan Pembentukan Tulang Baru Oleh Demineralized Bone Matrix (DBM) Dan Tulang Kancelous Beku Kering (Freeze Dried) Yang Ditanam Pada Otot Tikus Putih

Salah satu penanganan terhadap kondisi tulang yang berkaitan dengan hilangnya sebagian dari tulang (defek) adalah dengan menggunakan donor tulang. Penggunaan *autograft* mempunyai keterbatasan sehingga dikembangkan donor tulang *allograft* dan pengganti. Salah satu donor tulang pengganti yang semakin populer digunakan adalah *allograft demineralized bone matrix (DBM)*. DBM bekerja melalui dua mekanisme yaitu osteokonduksi dan osteoinduksi namun demikian kemampuan osteoinduksinya masih dipertanyakan. Sementara di lain pihak penggunaan donor tulang beku kering yang hanya mempunyai satu mekanisme kerja secara osteokonduksi telah luas digunakan di klinik.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboatoris yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan osteoinduksi dari DBM dan mencoba membandingkan kemampuannya membentuk tulang baru dengan *allograft* beku kering (*freeze dried*) dengan konsep osifikasi heterotopik. Ada dua indikator yang akan diukur yaitu luas matriks dan jumlah sel-sel osteoblast yang terbentuk oleh *allograft DBM* dan *allograft* beku kering yang ditanam pada lapisan perimisium otot adduktor femur tikus putih.

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *The Post-test only Control Group Design*. Sumber donor di dapatkan dari tulang *metaphysis* femur tikus putih sejenis dan dilakukan pengolahan menjadi butiran-butiran kasar (*granule*) DBM dan beku kering (*freeze-dried*). Hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebanyak 18 ekor dibagi menjadi 3 kelompok pengamatan sehingga masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus putih yang masing-masing mendapat perlakuan penanaman DBM dan beku kering. Kelompok pengamatan terdiri dari kelompok minggu ke-2, ke-4 dan ke-6. Setelah tikus di *sacrifice*, selanjutnya bahan dikumpulkan dan dilakukan pemeriksaan secara histologis dengan pengecatan hematosilin-eosin untuk menilai luas matriks tulang dan jumlah sel-sel osteoblasnya.

Dari hasil penelitian didapatkan nilai rata-rata untuk luas matriks pada minggu ke-2 sebesar $(2,45 \pm 0,53)$ mm², pada minggu ke-4 sebesar $(0,92 \pm 0,86)$ mm² dan pada minggu ke-6 sebesar $(1,42 \pm 1,65)$ mm². Nilai rata-rata untuk jumlah osteoblas pada minggu ke-2 sebesar $(12,33 \pm 1,92)$ perlapang pandang, pada minggu ke-4 sebesar $(5,60 \pm 5,66)$ perlapang pandang dan pada minggu ke-6 sebesar $(4,53 \pm 5,69)$ perlapang pandang.

Selanjutnya dilakukan uji statistik dengan menggunakan uji *T one-sample test* dengan *p onetailed* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna pada jumlah sel-sel osteoblas antara kelompok *demineralized bone matrix (DBM)* dan kelompok *freeze dried (FD)* pada kelompok satu (P1) dengan nilai $p \leq 0,05$ ($p=0,00$), kelompok dua (P2) dengan nilai $p = 0,004565$ dan kelompok tiga (P3) dengan nilai $p = 0,0542$. Pada luas matriks tulang antara kelompok *demineralized bone matrix (DBM)* dan kelompok *freeze dried (FD)* pada kelompok satu (P1) didapatkan perbedaan yang bermakna dengan nilai $p \leq 0,05$ ($p=0,00005$), pada kelompok dua (P2) dengan nilai $p = 0,0377$ dan kelompok tiga (P3) dengan nilai $p = 0,0441$.

Dengan demikian pada penelitian ini menunjukkan bahwa *demineralized bone matrix (DBM)* dapat merangsang pembentukan tulang baru lebih baik dibandingkan dengan allograft kanselous beku kering (*freeze dried*) melalui mekanisme osteoinduksi.

SUMMARY

A Comparison of New Bone Formation between Demineralized Bone Matrix (DBM) and Freeze Dried Graft in White Rats (*Rattus norvegicus*) Muscle

One of the treatment for partial bone loss is the use of bone donor. The use of autograft is generally limited, so that allograft bone donor and substitutes are developed. One of the more popularly used substitute bone donor is allograft demineralized bone matrix (DBM). DBM works through two mechanisms, i.e., osteoconduction and osteoinduction. However, its osteoinductive capacity remains questionable, while, on the other hand, the use of freeze-dried allograft donor, which has only one osteoconductive working mechanism, has been widely used in clinical setting.

The objective of this study was to identify DBM osteoinductive capacity and to compare its capacity in new bone formation with freeze-dried allograft using the concept of heterotopic ossification. There were two measured indicators, i.e., the size of the matrix and the number of osteoblasts formed by DBM allograft and freeze-dried allograft implanted within perimysial layer of the adductor muscle in white rats.

Donor source was obtained from femoral metaphyseal bone from the same type of rats and were processed into DBM and freeze-dried granules. The experimental animals were 18 white rats (*Rattus norvegicus*), divided into three observation groups, each comprising 6 white rats. Each of those rats received DBM and freeze-dried implantation. Observation group consisted of group week 2, 4, and 6. After the rats were being sacrificed, the materials were collected and observed histologically using hematoxylin-eosin to assess the size of the matrix and the number of osteoblasts.

Data showed the profiles of osteoblasts and bone matrix in DBM group in all three observation times, while in freeze-dried group there were no profiles of osteoblasts and bone matrix. The mean value for bone matrix in group 1 (P1) was $(2,45 \pm 0,53) \text{mm}^2$, in group 2 (P2) was $(0,92 \pm 0,86) \text{mm}^2$ and group 3 (P3) was $(1,42 \pm 1,65) \text{mm}^2$. Regarding number of osteoblasts in group 1 (P1) was $(12,33 \pm 1,92)$ one view in 400x magnitude, group 2 (P2) was $(5,60 \pm 5,66)$ one view in 400x magnitude and group 3 (P3) was $(4,53 \pm 5,69)$ one view in 400x magnitude.

Statistical test using T one-sample test and p one tailed showed significant difference in the number of osteoblasts between demineralized bone matrix (DBM) and freeze-dried (FD) group in group 1 (P1) with p value of ≤ 0.05 ($p = 0.0000$), in groups two (P2) with p value = 0,004565 and three (P3) with p value = 0,0542. Regarding bone matrix, there was significant difference with $p \leq 0.05$ ($p = 0.0005$) between demineralized bone matrix (DBM) and freeze-dried (FD) groups in group 1 (P1), group 2 (P2) with p value = 0,0377 and group 3 (P3) with p value = 0,0441.

This study has proved that demineralized bone matrix (DBM) can stimulate new bone formation better than freeze-dried allograft through osteoinductive mechanism.

ABSTRACT

A Comparison of New Bone Formation between Demineralized Bone Matrix (DBM) and Freeze Dried Graft in White Rats (*Rattus norvegicus*) Muscle

Background : One alternative for the treatment of extensive bone defects is the use of bone graft. Autogenous bone remains the established standard bone grafting material. However, the availability of bone for harvest is limited. Demineralized bone matrix was ideally used as bone graft substitute because it has osteoinductive and osteoconductive mechanism. On the other hand, freeze dried allograft, which has osteoconductive mechanism, has been widely used in clinic. The purpose of the study was to ascertain that demineralized bone matrix (DBM) is better than Freeze dried allograft in new bone formation through osteoinductive mechanism.

Materials and Methods : Eighteen male white rats of 60 days old and weighing about 200-300 gram received standard pellet for rodents and water ad libitum. The rats were divided into three observation groups, each was surgically implanted with a graft in the adductor muscle. Each group consisted six tights implanted with demineralized bone matrix and the other side tight implanted with freeze dried allograft and sacrificed 2nd weeks, 4th weeks and 6th weeks after implantation (6 rats/period). Histological examination have been performed to asses the number of osteoblast cells and bone matrix formation. The data were tested for normality using Kolmogorov-Smirnov test and the result was analyzed with T one-sample test.

Results : There were osteoblast cells and matrix formation in muscle transplanted by demineralized bone matrix (DBM) in all groups and no osteoblast cell and matrix formation were seen in muscle transplanted with freeze dried allograft

Conclusion : Demineralized bone matrix (DBM) was better than freeze dried in new bone formation through osteoinductive mechanism

Keywords : demineralized bone matrix (DBM), bone morphogenetic proteins (BMPs), freeze dried allograft

DAFTAR ISI**Halaman**

Sampul Dalam	i
Prasyarat Gelar	ii
Lembar Persetujuan	iii
Lembar Penetapan Panitia Penguji	iv
Ucapan Terima Kasih	v
Ringkasan	vi
Summary	vii
Abstrak	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN	xiii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 7
2.1 Anatomi, Histologi, Biokimia dan Metabolisme Tulang	7
2.2 Penyembuhan Tulang	9
2.3 Donor Tulang	14
2.3.1 Definisi	14
2.3.2 Prinsip dan fungsi	15
2.3.3 Autograft	18

2.3.4 Allograft	18
2.3.5 Xenograft	20
2.3.6 Demineralized bone matrix	20
2.3.7 Donor tulang beku kering (<i>freeze dried</i>)	23
2.3.8 <i>Bone morphogenetic protein</i> (BMPs)	26
2.3.9 Penyatuan donor tulang (<i>Bone graft Incorporation</i>)	28
2.4 Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	35
 BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	 37
3.1 Kerangka Konseptual	37
3.2 Dasar Teori	38
3.3 Hipotesis Penelitian	42
 BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	 43
4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian	43
4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi	44
4.2.1 Unit eksperimen	44
4.2.2 Replikasi	45
4.3 Variabel Penelitian	46
4.3.1 Klasifikasi variabel	46
4.3.2 Definisi operasional	47
4.4 Bahan Penelitian	48
4.4.1 Hewan coba	48
4.4.2 Makanan dan minuman hewan coba	48
4.4.3 Bahan untuk perlakuan	49
4.4.4 Unit analisis	49
4.5 Instrumen Penelitian	49
4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian	51
4.7 Prosedur Penelitian	51
4.7.1 Tahap persiapan	51
4.7.1.1 Aklimatisasi	51

4.7.1.2 Pembagian kelompok hewan coba	51
4.7.1.3 Pembuatan sediaan bahan donor tulang	53
4.7.1.4 Pembiusan	53
4.7.2 Tahap perlakuan	53
4.7.3 Tahap pengumpulan data	54
4.8 Analisis Data	55
4.9 Alur Penelitian	56
 BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN	 57
5.1 Data Penelitian	57
5.2 Hasil Histologi	59
5.3 Analisis Data dan Hasil Penelitian	60
5.4 Hasil Uji Normalitas	62
5.5 Hasil Uji Beda Variabel Jumlah Osteoblast dan Luas Matriks ...	63
5.5 Perbandingan Jumlah Osteoblas dan Luas Matriks Tulang Antara Minggu ke-2,4 dan 6 Pada Kelompok DBM	66
 BAB 6 PEMBAHASAN	 67
6.1 Metodologi Penelitian	67
6.2 Sampel dan Besar Sampel	69
6.3 Pembuatan Bahan Donor Tulang	70
6.4 Perlakuan Hewan Coba	71
6.5 Pembuatan Sediaan Histologi	74
6.6 Pembahasan Hasil Penelitian	75
6.6.1 Uji normalitas	75
6.6.2 Perbandingan pembentukan tulang baru	75
 BAB 7 PENUTUP	 79
Kesimpulan	79
Saran	79

Daftar Pustaka	80
Lampiran	85

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Perbandingan bahan-bahan dalam donor tulang	14
Tabel 2.2	Tahapan induksi tulang oleh donor tulang	30
Tabel 2.3	Pembagian taksonomi <i>Rattus norvegicus</i>	35
Tabel 2.4	Data biologis <i>Rattus norvegicus</i>	36
Tabel 4.1	Perlakuan dan Pengamatan Hewan Coba	51
Tabel 5.1	Umur dan Berat Badan dari tiap-tiap kelompok	57
Tabel 5.2	Statistik deskriptif jumlah osteoblas dan luas matriks tulang kelompok <i>DBM</i>	60
Tabel 5.3	Hasil uji normalitas data jumlah osteoblas dan luas matriks tulang kelompok <i>DBM</i>	62
Tabel 5.4	Perbandingan jumlah osteoblas antara kelompok <i>DBM</i> dengan kelompok <i>FD</i>	63
Tabel 5.5	Perbandingan luas matriks tulang antara kelompok <i>DBM</i> dengan kelompok <i>FD</i>	64
Tabel 5.6	Perbandingan jumlah osteoblas antara minggu ke-2, 4 dan 6 pada kelompok <i>DBM</i>	65
Tabel 5.7	Perbandingan luas matriks tulang antara minggu ke-2, 4 dan 6 pada kelompok <i>DBM</i>	66



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Penampang tulang kortikal dan kanselous	7
Gambar 2.2 Penampang tulang kanselous	9
Gambar 2.3 Fase inflamasi	10
Gambar 2.4 Pembentukan <i>soft callus</i> dari fase perbaikan	11
Gambar 2.5 Fase adaptasi	12
Gambar 2.6 Proses remodeling	13
Gambar 2.7 Penggunaan donor tulang untuk fusi tulang vertebra	17
Gambar 2.8 Ilustrasi dari mekanisme kerja BMPs	28
Gambar 3.1 Skema kerangka konsep penelitian	37
Gambar 5.1 Gambaran histologi pada minggu ke-2	58
Gambar 5.2 Gambaran histologi DBM pada minggu ke-4 dan ke-6	59
Gambar 5.3 Rerata jumlah sel-sel osteoblas	60
Gambar 5.4 Rerata luas matriks tulang	61

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data hasil penelitian	85
Lampiran 2. Perbandingan hasil histologi antara DBM dan beku kering minggu ke-2, ke-4 dan ke-6	87
Lampiran 3. Uji kenormalan data	88
Lampiran 4. Hasil uji statistik	89
Lampiran 5. Proses seleksi dan pengolahan sediaan donor tulang	93
Lampiran 6. Prosedur Pembedahan	96
Lampiran 7. Tahapan Pembuatan Sediaan Histologi	97
Lampiran 8. Proses penanaman donor ke dalam otot	100
Lampiran 9. Proses pengambilan bahan untuk diolah menjadi donor tulang	101
Lampiran 10. Proses pengolahan donor tulang DBM	102
Lampiran 11. Proses pengambilan hasil	103
Lampiran 12. Proses pengolahan donor tulang beku kering	104
Lampiran 13. Keterangan kelaikan etik (<i>ethical clearence</i>).....	105

DAFTAR SINGKATAN

DBM	: Demineralized bone matrix
FD	: Freeze dried
BMPs	: Bone morphogenetic proteins
GDFs	: Growth differentiation factors
TGF- β	: Transforming growth factor- β
AATB	: Standar American Association of Tissue Banks
PDGF	: Platelet derivate growth factors
PMN	: Polymorphonuclear Neutrophilic
IL-1	: Interleukin-1
IL-6	: Interleukin-6
FGF	: Fibroblast growth factor

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penanganan terhadap kondisi tulang tertentu setelah trauma seperti *delayed union*, *nonunion*, *malunion* dan keadaan lain yang berkaitan dengan hilangnya sebagian dari tulang (defek) masih menimbulkan tantangan tersendiri. Pada umumnya penderita trauma adalah orang muda sehingga beban biaya yang dikeluarkan untuk kesehatan dan dampak sosial ekonominya menjadi tinggi. Walaupun mayoritas patah tulang dapat sembuh normal tetapi 5%-10% menyisakan masalah pada proses penyembuhannya. Kunci kesuksesan penyembuhan tulang adalah stabilitas biomekanik dan fungsi biologis dari tulang. Banyak kondisi yang dapat mengganggu proses penyembuhan seperti kondisi vaskularisasi yang kurang baik, infeksi, ketidakstabilan mekanik dan penyakit-penyakit sistemik (Termaat dkk, 2005).

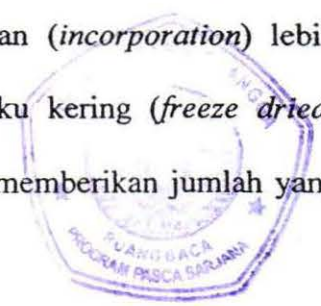
Untuk mendapatkan stabilitas mekanik, pada sebagian besar kasus cukup dengan mengembalikan panjang tulang (*alignment*) dan fiksasi stabil pada tulang namun pada sebagian yang lain diperlukan donor tulang (*bone graft*) atau bahan pengganti donor tulang (*bone-graft substitutes*) untuk mengisi defek atau kekosongan pada tulang yang hilang (Finkemeier, 2002; Altundal, 2005). Pilihan lain dapat menggunakan teknik *bone callus distraction* atau yang lebih populer dengan istilah teknik Ilizarov (DeCoster dkk, 2004).

Permintaan donor tulang tampaknya akan semakin meningkat seiring dengan semakin luasnya indikasi penggunaannya. Donor tulang dapat mengurangi angka

morbiditas pada pasien akibat *nonunion* dan *delayed union* dan menjadi salah satu alternatif pemecahan masalah yang berkaitan dengan defek tulang akibat trauma atau setelah reseksi tumor. Selain itu donor tulang dapat juga berperan dalam *arthrodesis* persendian. Sehingga pada keadaan hilangnya sebagian tulang tetapi jaringan ekstremitas dinilai masih hidup (*viable*), tindakan amputasi dapat dihindari (Brown dan Cruess, 1982). Dengan demikian dapat menurunkan angka kecacatan yang akan berdampak pada nilai produktivitas ekonomi.

Peningkatan permintaan terhadap donor tulang dapat dilihat di USA, tahun 1994 lebih dari 5.000 kemudian pada tahun 2001 prosedur ini meningkat sampai kira-kira 22.000. Perkiraan biaya yang dikeluarkan untuk prosedur ini sampai tahun 2002 diperkirakan telah mencapai lebih dari 600 juta dolar (Greenwald dkk, 2003). Di RSUD Dr Soetomo sendiri tercatat perkembangan produksi *allograft* tulang beku kering (*freeze dried*) menunjukkan peningkatan dari tahun ke tahun. Pada tahun 2001 telah diproduksi sebanyak 148 sediaan dari beberapa jenis jaringan dan pada tahun 2006 mencapai jumlah 199 sediaan (Laporan tahunan bank jaringan RSUD Dr Soetomo, 2007).

Ada banyak pilihan donor tulang yang dapat digunakan antara lain *autograft* kanselous atau kortikal dan *allograft* beku kering (*freeze-dried*) dari tulang kadaver. *Autograft* kanselous memberikan semua persyaratan donor tulang yaitu osteokonduktif, osteoinduktif dan osteogenesis namun memberikan keterbatasan kekuatan struktural dan kemampuan untuk mempertahankan fiksasinya. *Autograft* kortikal sebaliknya dapat memberikan integritas struktural tetapi kemampuan penyatuan (*incorporation*) lebih lambat dibandingkan dengan tulang kanselous. *Allograft* beku kering (*freeze dried*) memberikan kemudahan penggunaannya, mudah didapat dan memberikan jumlah yang



lebih besar tetapi masih mempunyai risiko terjadinya transmisi penyakit dan reaksi hipersensitivitas. Oleh karena itu penggunaan *autograft* kortikokanselous dari tulang krista iliaka masih merupakan standar emas. Namun demikian sebuah penelitian meta-analisis menemukan 40% pasien setelah operasi masih mengeluh nyeri sampai 5 tahun sesudahnya. Untuk alasan inilah muncul pengganti donor tulang (*bone graft substitutes*) untuk menambah maupun meningkatkan prosedur donor tulang (Malay, 2005). Donor tulang pengganti yang ideal diharapkan mempunyai kemampuan osteoinduksi dan osteokonduksi untuk regenerasi tulang tetapi tidak menimbulkan efek samping (Vaughan dan Kay, 2006; Wolfe, 1999).

Bahan pengganti donor tulang yang sudah dikenal dapat digolongkan menjadi tiga kelompok utama yaitu : *demineralized bone matrix (DBM)*, keramik dan material komposit (Beaman dkk, 2006). Salah satu alternatif donor tulang pengganti adalah menggunakan *allograft demineralized bone matrix (DBM)*. Teknik ini berdasarkan pada penemuan awal bahwa matriks organik tulang masih mengandung sejumlah protein yang mampu merangsang osteogenesis *heterotopic* dengan mekanisme ossifikasi endokondral. Protein matriks ini disebut *Bone Morphogenetic Protein (BMPs)* (Yaedu dkk, 2004). *DBM* juga dikatakan mempunyai risiko kecil untuk transmisi penyakit oleh karena mengalami pemrosesan lebih lanjut dari *allograft* beku kering (North American Spine Society Public Education Series, 2006).

Di masa mendatang tampaknya penggunaan donor tulang *demineralized bone matrix (DBM)* akan semakin populer dan terus berkembang. Hal ini karena kemampuannya membentuk tulang baru melalui dua mekanisme yaitu osteokonduksi dan osteoinduksi (Altundal, 2005). Penggunaan bahan ini sebenarnya telah lama populer

terutama di bidang maxillo-fasial. Namun demikian penggunaan di bidang Orthopaedi masih terbatas karena kemungkinan hasil yang diharapkan terlalu tinggi dan adanya metode alternatif yang lebih dulu populer seperti autografi dan perangsangan pertumbuhan tulang melalui teknik Ilizarov (Delloye, 1999).

Meskipun DBM telah secara luas diterima sebagai salah satu donor tulang pengganti di klinik, tetapi kemampuan induksinya masih dipertanyakan. Pada beberapa penelitian secara histologi menampakkan pembentukan tulang baru lebih disebabkan oleh proses osteokonduksi daripada osteoinduksi. Regenerasi tulang terjadi oleh pertumbuhan sel-sel tulang dari *host* dan DBM bertindak sebagai *scaffolding* daripada secara *de novo* merangsang diferensiasi sel-sel mesenkimal (Groeneveld dan Burger, 2000).

Berdasarkan pada keadaan di atas, penelitian ini mencoba mengetahui respon pembentukan matriks tulang baru oleh *demineralized bone matrix (DBM)* sekaligus berupaya membandingkan dengan donor tulang *allograft* kancellous beku kering (*freeze dried*) yang ditanamkan pada otot tikus.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana pembentukan tulang baru dengan *allograft demineralized bone matrix (DBM)* yang ditanam di dalam otot tikus dibandingkan dengan *allograft* kancellous beku kering (*freeze dried*)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengungkap bahwa *allograft demineralized bone matrix (DBM)* dapat merangsang pembentukan tulang baru lebih baik dibandingkan dengan *allograft* kanselous beku kering (*freeze dried*)

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membuktikan bahwa *allograft demineralized bone matrix (DBM)* dapat melakukan rekrutmen dan merangsang diferensiasi sel-sel mesenkimal menjadi osteoblas lebih baik dibandingkan *allograft* kanselous beku kering (*freeze dried*)
2. Membuktikan bahwa *allograft demineralized bone matrix (DBM)* dapat menghasilkan matriks tulang lebih banyak dibandingkan *allograft* kanselous beku kering (*freeze dried*)

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Bila penelitian ini terbukti maka akan dapat memberikan informasi pengetahuan bahwa *allograft demineralized bone matrix (DBM)* dapat merangsang pembentukan tulang baru lebih baik dibandingkan *allograft* kanselous beku kering (*freeze dried*)

1.4.2 Manfaat Praktis

Bila terbukti bahwa *allograft demineralized bone matrix (DBM)* dapat merangsang pembentukan tulang baru serta mempunyai efek yang lebih baik dibandingkan *allograft*

beku kering (*freeze dried*) maka diharapkan dapat memberikan manfaat pada pengembangan biomaterial bank jaringan.

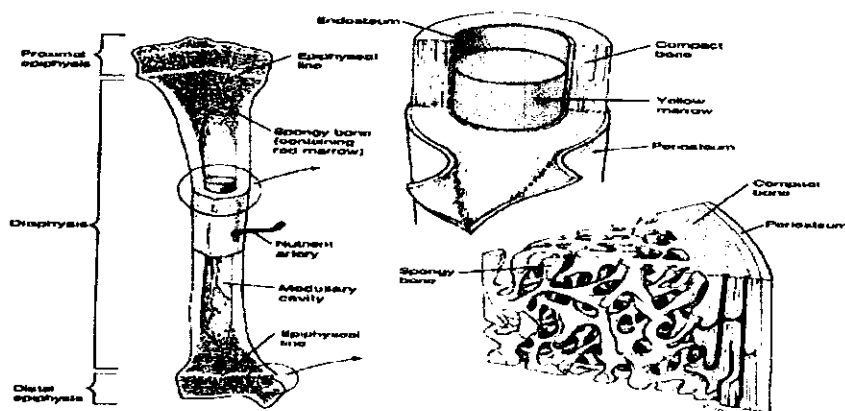
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Anatomi, Histologi, Biokimia dan Metabolisme Tulang

Tulang dilihat dari penampakan struktur luarnya dapat diklasifikasikan sebagai 1) tulang panjang atau tulang tubular misalnya tulang femur, 2) tulang pendek atau tulang kuboid misalnya tulang karpal, 3) tulang datar misalnya tulang skapula. Masing-masing tulang terdiri dari bagian yang padat pada sisi luarnya yang disebut korteks dan bagian yang berongga-rongga pada sisi dalam yang disebut trabekular. Tulang ditutupi oleh suatu lapisan yang disebut periosteum. Pada anak-anak lapisan ini lebih tebal dan kendor sedangkan pada dewasa lebih tipis dan terikat erat pada korteks. Keadaan inilah yang menyebabkan patah tulang pada anak-anak sembuh lebih cepat daripada dewasa.

Terdapat tiga sistem vaskularisasi pada tulang panjang yaitu 1) vaskuler aferen terdiri dari arteri metaphysis dan nutrien yang bersama-sama memberikan vaskuler duapertiga bagian dalam korteks dan arteri periosteum yang memberikan vaskuler sepertiga luar korteks, 2) vaskuler eferen yang terdiri dari sistem vena, 3) vaskuler intermediet yang terdiri dari kapiler-kapiler di dalam korteks.



Gambar 2.1 Penampang tulang kortikal dan kanselous (Spence, 1990)

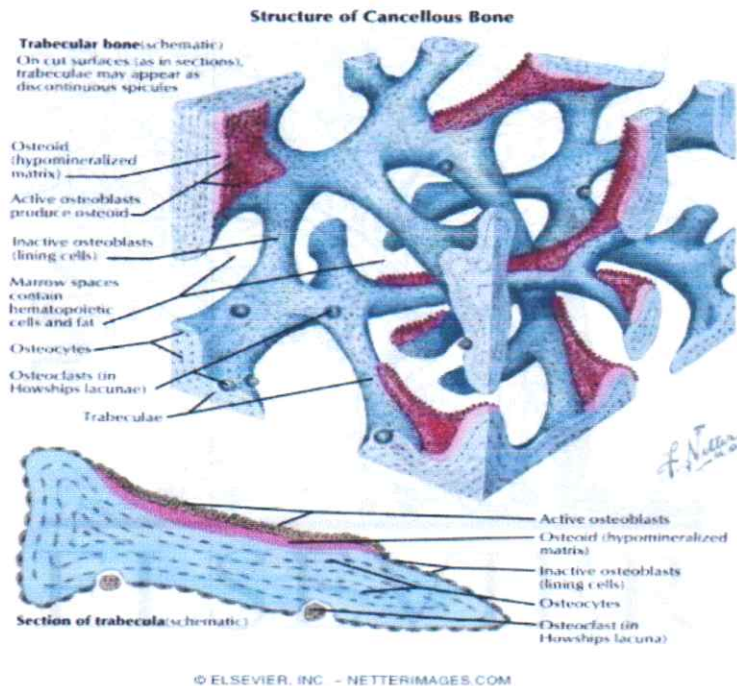
Dilihat dari struktur mikroskopiknya tulang dapat diklasifikasikan sebagai 1) tulang *immature* (tulang *non lamellar*, tulang *woven*, tulang *fiber*), 2) tulang *mature* (tulang *lamellar*). Tulang *lamellar* tersusun atas bagian kortikal yang padat dan tulang kancellous yang berongga-rongga seperti lapisan busa.

Tulang *woven* ditemukan selama perkembangan embrional, pada penyembuhan fraktur (pembentukan kalus) serta pada keadaan patologis seperti hiperparatiroid dan *Paget's disease*. Pada pembentukan tulang model ini yang pertama terbentuk adalah endokondral kemudian secara bertahap dengan meningkatnya umur digantikan oleh tulang yang matang (*mature*). Tulang ini terdiri dari berkas kolagen yang tersusun acak, yang selanjutnya akan mengalami *remodeling* dan berubah menjadi tulang kortikal dan kancellous.

Pada tulang kortikal *lamellar* ditandai dengan adanya lapisan mikroskopis yang tersusun konsentris dan adanya pembentukan sistem *Havers* atau *Osteon*. Serabut kolagen tersusun secara konsentris di sekitar sistem *Havers*. Susunan ini akan menambah kekuatan dari tulang kortikal. Pada tulang kancellous serat kolagen tersusun paralel terhadap panjang aksis dari trabekula. Tulang kancellous memiliki berat massa seperempat dari tulang kortikal tetapi mempunyai luas permukaan delapan kali lebih besar sehingga kemampuan *modeling* dan *remodeling* delapan kali lebih besar daripada tulang kortikal (Salter, 1999).

Komponen seluler tulang terdiri dari sel prekursor osteogenik : osteoblas, osteoklas, osteosit dan elemen hematopoetik sumsum tulang. Osteoblas adalah sel pembentuk tulang, *mature*, dan aktif secara metabolik. Sel ini mensekresi *osteoid* yang selanjutnya mengalami mineralisasi dan menentukan kekuatan serta rigiditas tulang. Osteosit adalah

osteoblas yang terperangkap dalam matriks tulang, sedang osteoklas adalah sel yang meresorpsi tulang melalui pengaturan hormonal dan mekanisme selular.



Gambar 2.2 Penampang tulang kanselous (Ovalle dan Nahirney, 2007)

Tulang terdiri dari elemen organik dan inorganik, di mana 20% beratnya adalah air dan sisanya merupakan inorganik kalsium fosfat (65-70%) dan matriks organik protein dan kolagen (30-35%). Kandungan inorganik tulang utama adalah kalsium fosfat diikuti fosfat kalsium karbonat serta sedikit magnesium, fluoride dan sodium. Tulang merupakan kerangka kolagen di mana mineral kalsium utamanya berupa hidroxyapatit.

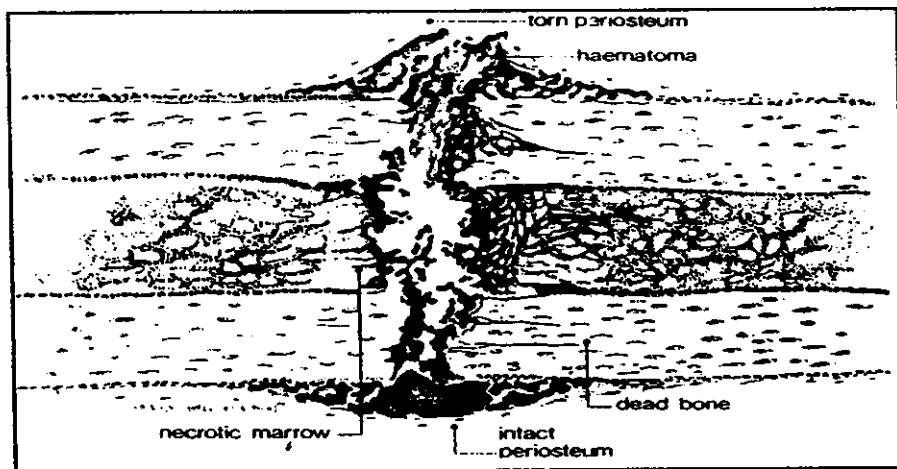
2.2 Penyembuhan Tulang

Proses penyatuan donor tulang dengan resipiennya adalah serupa dengan proses penyembuhan tulang akibat fraktur pada tulang panjang. Penyembuhan fraktur



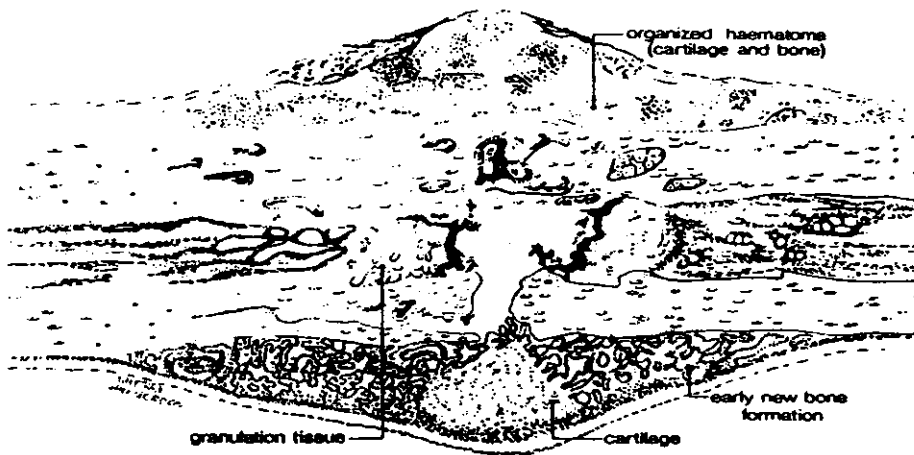
mengembalikan jaringan seperti sifat-sifat fisik dan mekanik sebelumnya di mana faktor biokimia, mekanik dan biofisika terlihat dalam proses ini. Proses penyembuhan tulang terdiri dari tiga tahap berbeda namun saling tumpang tindih di antaranya : 1) fase inflamasi, 2) fase perbaikan dan 3) fase adaptasi (*modeling* dan *remodeling*).

Inflamasi akut terjadi dalam 24-48 jam setelah fraktur. Selama fase inflamasi terbentuk hematoma, terjadi nekrosis dari tulang dan sel-sel yang mati melepas mediator-mediator aktif, faktor pertumbuhan dan sitokin-sitokin lainnya ke lokasi fraktur. Sitokin-sitokin ini akan mempengaruhi perpindahan sel, proliferasi, diferensiasi dan sintesis matriks tulang. Faktor pertumbuhan akan merekrut sel-sel fibroblast, sel-sel mesenkimal dan sel-sel osteoprogenitor ke lokasi fraktur. Inflamasi akan mengaktifkan mekanisme seluler yang dibutuhkan untuk perbaikan. Jaringan seluler berusaha membuat jembatan yang menghubungkan fragmen fraktur. Secara perlahan hematoma diserap dan tumbuh kapiler-kapiler baru memasuki area tersebut.



Gambar 2.3 Fase inflamasi. Hematom di invasi oleh sel-sel inflamasi dan periosteum terangkat. Osteoklas mulai melakukan absorpsi tulang yang nekrotik (Babak, 2000).

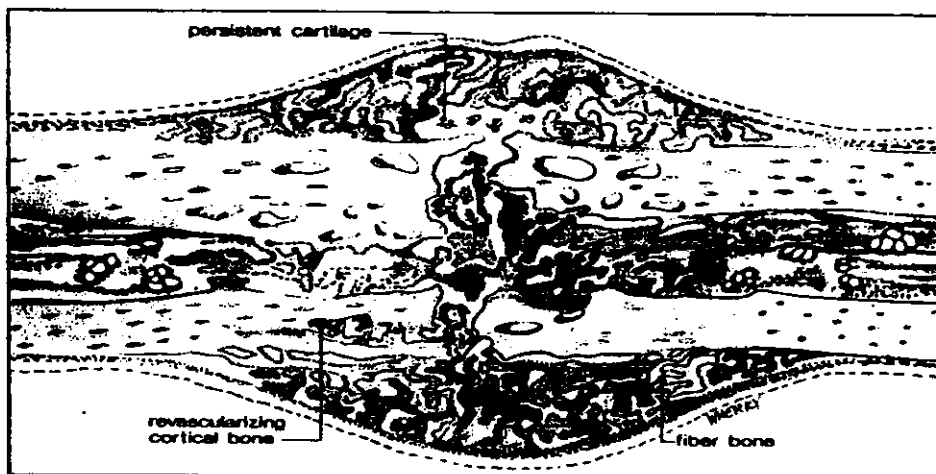
Fase perbaikan terjadi dalam 2 hari sampai 2 minggu. Pada fase ini, celah fraktur menjadi hiperseluler, terutama sel-sel kondrogenik dan osteogenik. Sel-sel ini mulai membentuk tulang dan tulang rawan (*cartilage*). Di antara populasi sel ini juga terdapat sel-sel osteoklas yang mulai melakukan pembersihan terhadap tulang-tulang yang mati. Proses ini ditandai dengan tampak gambaran kalus halus di sekitar fraktur (*soft callus*). Selanjutnya osteoblas dan kondroblast muncul di celah fraktur. *Soft callus* dirubah melalui proses ossifikasi endokondral menjadi tulang *woven* di mana serat kolagennya tersebar. Keseluruhan proses ini dikendalikan oleh protein induksi antara lain: *fibroblast growth factors*, *transforming growth factor-beta* dan *bone morphogenetic protein (BMP)*.



Gambar 2.4 Pembentukan *soft callus* dari fase perbaikan. Hematom mulai mengorganisasi dan diinvasi oleh kondroblast dan fibroblast yang ada di matrik untuk pembentukan kalus. Osteoblas bertanggungjawab untuk mineralisasi pada *soft callus* (Babak, 2000)

Fase terakhir adaptasi telah dimulai sejak fase perbaikan. Tulang *woven* diubah bentuknya menjadi tulang *lamelar* dengan proses pengaturan matriks kolagen. Selama proses ini, bentuk tulang dikembalikan dan kanal medula diperbaiki. Terjadi proses

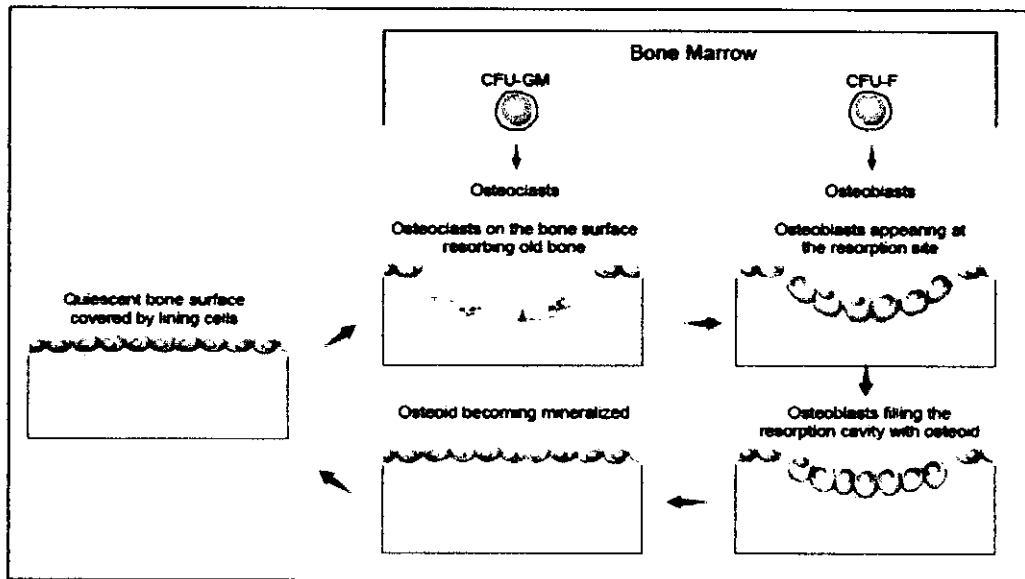
pembentukan tulang dan penyerapan yang berjalan terus menerus sampai terjadi repopulasi kanal medula.



Gambar 2.5 Fase adaptasi. Pada fase ini kalus yang berlebihan akan diresorpsi. Osteoblas dan osteoklas melakukan aktivitas remodeling sampai didapatkan daerah fraktur menjadi stabil (Babak, 2000)

Proses penyembuhan fraktur di atas berlangsung bila ada pergerakan. Dalam keadaan tanpa gerakan bahkan gerakan mikro, penyembuhan fraktur berlangsung tanpa melalui pembentukan jaringan pengikat ataupun fibrokartilage. Terbentuk area nekrotik yang luas di kedua sisi fraktur, diikuti *remodeling* dan *haversian* melalui pembentukan lubang resorpsi dengan arah longitudinal oleh osteoklas (*cutting cone*). Di tengah lubang ini kemudian terbentuk pembuluh kapiler yang dilalui sel-sel mesenkim dan prekursor osteoblas. Osteoblas selanjutnya membentuk *osteoid* yang kemudian memenuhi lubang dan membentuk *osteon*.

Penyatuan donor tulang dengan tulang sekitarnya juga melalui proses di mana tulang yang nekrosis perlahan diserap kemudian secara simultan diganti oleh tulang baru. Proses penyatuan ini disebut *creeping substitution*. Sel mesenkim primitif berdiferensiasi menjadi osteoblas yang memproduksi osteoid di tengah area nekrosis.



Gambar 2.6 Proses remodeling, siklus yang terdiri dari resorpsi tulang mati oleh osteoklas dan diikuti dengan pembentukan tulang baru oleh osteoblas (Manolagas dan Jilka, 1995)

Yaedu dkk (2004) mendapatkan pembentukan tulang baru pada tulang yang ditanam di dalam otot adduktor femur tikus pada hari ke-14 setelah implantasi secara histologis mulai tampak tanda-tanda resorpsi. Beberapa area resorpsi di dalam donor tulang menunjukkan aktivitas osteoblas yang sedang berdiferensiasi dan sejumlah matriks tulang baru. Pada bagian dalam mulai diisi dengan jaringan yang hipervaskuler dan dipenuhi sel sedangkan bagian luar tampak jaringan penghubung semakin menipis. Pada pengamatan hari ke-28 setelah implantasi didapatkan peningkatan area resorpsi dan meningkatnya pembentukan tulang baru ataupun jaringan myeloid (Yaedu dkk, 2004).

2.3 Donor Tulang

2.3.1 Definisi

Donor tulang merupakan suatu prosedur mengambil tulang dari donor dan menempatkannya pada lokasi fraktur atau defek pada tulang. Donor tulang dapat merangsang pertumbuhan tulang baru, penghubung sebuah celah pada tulang, memberikan dukungan dan bantuan pada proses penyembuhan (Wood, 2007).

Berdasarkan dari asal donor tulang diperoleh maka terdapat beberapa istilah antara lain *autograft* jika jaringan ditransplantasikan dari satu tempat ke tempat lain dalam satu individu. *Allograft* jika jaringan ditransplantasikan dari individu yang secara genetik berbeda tetapi sama spesiesnya. *Xenograft* jika jaringan ditransplantasikan dari satu spesies ke spesies yang berbeda. *Isograft* jika jaringan ditransplantasikan dari individu satu ke individu lain yang kembar identik. Perbandingan bahan-bahan dalam donor ini dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1 Perbandingan bahan-bahan dalam donor tulang (Greenwald, 2003)

BAHAN DONOR	KEKUATAN STRUKTUR	OSTEO KONDUKSI	OSTEO INDUKSI	OSTEO GENESIS
Autograft				
• Kancelous	Tidak	+++	+++	+++
• kortikal	+++	+++	+++	+++
Allograft				
Kancelous				
• Frozen	Tidak	++	+	Tidak
• Freeze-	Tidak	++	+	Tidak

dry				
Kotikal				
• Frozen	+++	+	Tidak	Tidak
• Freeze-dry	+	+	Tidak	Tidak
Allograft	Tidak	+	++	Tidak
DBM				

Selain itu donor tulang juga dapat dibedakan berdasar penempatannya secara anatomis. Jika sebuah jaringan donor ditempatkan ke lokasi yang secara anatomis sama disebut *orthotopic*, sedangkan jika ditransplantasikan ke lokasi yang secara anatomis tidak sama disebut *heterotopic* (Goldberg, 2005).

Donor tulang dapat juga diklasifikasikan berdasarkan struktur anatominya : kortikal atau kanselous. Tulang kortikal memiliki osteoblas dan osteosit lebih sedikit, lebih sedikit luas perunit beratnya dan terbatas pertumbuhan vaskuler dan remodelingnya bila dibandingkan tulang kanselous. Keuntungan tulang kortikal adalah kelebihan pada kekuatan strukturnya (Goldberg, 2005).

2.3.2 Prinsip dan fungsi

Fungsi primer dari donor tulang adalah merangsang penyembuhan dari defek tulang melalui pembentukan tulang baru dan menunjang secara struktural. Material donor tulang memberikan kisi-kisi atau bantalan (*latticework* atau *scaffolding*) sehingga tulang baru dapat tumbuh melalui tiga prinsip mekanisme yaitu osteogenesis, osteoinduksi dan osteokonduksi (Beaman dkk, 2006).

Osteogenesis merupakan hasil transplantasi dari sel-sel prekursor osteogenik yang mampu membentuk tulang baru. Proses fisiologis ini bisa merupakan hasil sintesis dari sel-sel donor atau sel-sel host. Sel-sel permukaan yang bertahan hidup selama transplantasi dapat menghasilkan tulang baru. Tulang baru ini dapat menjadi awal penting untuk perkembangan kalus selama fase awal transplantasi. Tulang kancellous oleh karena area permukaannya yang luas mempunyai potensi yang lebih besar untuk membentuk tulang baru daripada tulang kortikal.

Osteoinduksi adalah proses pembentukan tulang baru dengan cara rekrutmen secara aktif dari sel-sel pluripoten host yang kemudian berdiferensiasi menjadi kondroblast dan osteoblas (Wolfe dkk, 1999). Jadi, setiap material yang dapat merangsang proses ini dapat dianggap osteoinduktif. Transformasi ini dimediasi oleh faktor-faktor pertumbuhan di dalam bahan donor tulang khususnya oleh bahan protein di dalam matriks tulang yang disebut *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)* (Beaman dkk, 2006).

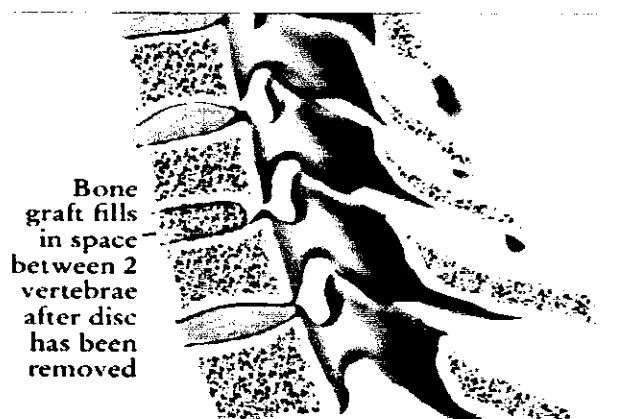
Konsep osteoinduksi ini diperkenalkan pertama kali oleh Marshall R. Urist pada tahun 1960-an. Pada saat itu diketahui bahwa matriks tulang khususnya pada *DBM* berisi bahan yang dapat merangsang pembentukan tulang baru saat ditanamkan di luar skeletal. Urist dan kawan-kawannya selanjutnya mengenali sebuah protein yang dinamakan *bone Morphogenetic protein (BMP)* (De Long, 2007). Protein ini mempunyai peranan penting dalam diferensiasi sel stem menjadi sel osteoblas dan juga penting dalam penyembuhan patah tulang dan remodeling tulang.

Osteokonduksi terjadi saat bahan yang ditanam berfungsi sebagai bantalan (*scaffolding*) untuk memfasilitasi pertumbuhan pembuluh darah dan perpindahan (migrasi) dari sel-sel *host* yang mampu melakukan osteogenesis. Jadi dikatakan sebagai

osteokonduksi jika donor tulang mampu menyediakan bentukan penghubung (*scaffolding*) untuk pertumbuhan ke dalam donor tulang dari kapiler *host*, jaringan perivaskuler dan sel osteoprogenitor dari resipien yang masih tersisa. Saat tulang baru terbentuk sebagian ataupun keseluruhan dari donor tulang akan diserap melalui proses yang disebut *creeping substitution* (Beaman dkk, 2006).

Keberhasilan penyatuan bahan donor tulang bergantung pada proses pembentukan tulang baru, penyatuan struktur dari donor tulang dan adaptasi remodeling tulang terhadap stress mekanik. Proses ini melalui beberapa tahap yang mirip dengan yang terjadi pada proses penyembuhan tulang. Lamanya waktu yang dibutuhkan sampai terjadi penyatuan bergantung kepada lingkungan alamiah tulang, jenis bahan donor tulang yang digunakan dan strukturnya.

Prosedur donor tulang digunakan dalam banyak kondisi klinik dan termasuk fusi tulang (*arthrodesis* ekstremitas dan spinal), stabilisasi fraktur (terutama pada kasus-kasus *delayed union* dan *non union*) dan perbaikan dari defek-defek tulang (Beaman dkk, 2006).



Gambar 2.7 Penggunaan donor tulang untuk fusi tulang vertebra (North American Spine Society Public Education Series, 2006)

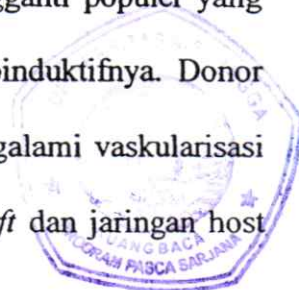
2.3.3 Autograft

Autograft memiliki beberapa keuntungan dibandingkan *allograft* atau *xenograft*. Bahan ini memiliki kapasitas osteogenik yang lebih besar dan sesuai secara biologis (*biocompatible*). Potensial osteogenik yang tinggi dari tulang kancellous bahkan juga dapat digunakan untuk merangsang pertumbuhan tulang ke dalam material berpori. Donor tulang kancellous mudah dibentuk, cepat bervaskularisasi, mudah diperoleh biasanya berupa potongan dari krista iliaka. Sayangnya, jumlahnya terbatas, juga tidak dapat digunakan pada daerah *stress bearing*, serta pengambilannya menimbulkan morbiditas seperti nyeri, hematoma, infeksi, trauma saraf, hernia dan bahkan trauma uretra.

Tulang kortikal (kompak) digunakan bila penyangga mekanik dibutuhkan. Lokasi donor yang sering digunakan adalah fibula, kosta dan krista iliaka. Sayangnya sifat-sifat biologisnya sangat kurang dibandingkan dengan tulang kancellous dan semakin kompak semakin lambat invasi vaskulernya. Donor tulang diganti oleh jaringan lokal melalui *creeping substitution*, di mana donor tulang berperan sebagai kerangka untuk pertumbuhan jaringan fibrovaskuler.

2.3.4 Allograft

Karena morbiditas yang berhubungan dengan *autograft* serta karena keterbatasan lokasi donor yang ada, maka upaya pencarian bahan alternatif terus dikembangkan. *Allograft* (transplantasi tulang dari kadaver) merupakan bahan pengganti populer yang utamanya sebagai bahan osteokonduktif tetapi kurang bahan osteoinduktifnya. Donor tulang ini dikelilingi oleh jaringan granulasi fibrovaskuler dan mengalami vaskularisasi dan invasi sel-sel prekursor osteogenik. Penghubung antara *allograft* dan jaringan host



adalah lokasi aktivitas osteoklas dan resorpsi tulang. Keseimbangan antara osteolisis dan osteogenesis harus dipertahankan agar penyatuan donor tulang dapat terjadi.

Allograft mempunyai keterbatasan khusus antara lain kemungkinan transmisi penyakit, penambahan beban biaya, respon imun dari host dan potensi penolakan (rejeksi) jaringan serta ketidakkonsistenan hasil penyatuan donor tulang. Risiko transmisi penyakit ini dapat diabaikan karena kemajuan metode sterilisasi jaringan dan prosedur prosesing bahan (Beaman dkk, 2006), perbaikan standar bank jaringan juga sangat mengurangi risiko ini (Matsumine, 2004).

Allograft menunjukkan kapasitas osteogenik yang lebih rendah, kecepatan resorpsi yang lebih tinggi, dan respon alergi yang lebih besar, serta lebih sedikit revaskularisasi dari donor tulang dibandingkan *autograft*. Hal ini terjadi karena sel-sel dan protein yang berperan dalam pertumbuhan terbuang pada saat proses pembersihan dan desinfeksi. Walaupun begitu, *allograft* menawarkan beberapa kelebihan. *Allograft* dapat dipotong-potong dan dicampur dengan *autograft*. *Allograft* bahkan dapat digunakan sebagai donor tulang yang luas meliputi seluruh sendi dalam pembedahan tumor.

Kira-kira sepertiga dari donor tulang yang digunakan di Amerika Utara adalah *allograft*. *Allograft* merupakan bahan alternatif terhadap donor tulang autogenous untuk menghindari *morbidity* pada donor. Meskipun transmisi penyakit masih merupakan risiko utama dan kerugian dari penggunaan material *allograft* tetapi hanya sedikit laporan kasus yang berkaitan dengan prosedur *allograft* tiap tahunnya (Nunamaker dan Rhinelander, 1985).

2.3.5 *Xenograft*

Donor tulang senogenik berasal dari spesies lain, menunjukkan permasalahan yang serupa dengan *allograft*. Donor tulang ini menimbulkan respon antigen dengan kegagalan yang tinggi. Partial deproteinasi dan *deffattie* akan menurunkan respon antigenik namun akan mempengaruhi kapasitas osteoinduktifnya.

2.3.6 *Demineralized bone matrix (DBM)*

DBM mulai populer sejak 30 tahun yang lalu setelah penemuan Marshal R Urist tahun 1965 yang menunjukkan bahwa *DBM* dapat merangsang pembentukan tulang baru yang ditanam pada otot tikus. *DBM* dapat diperoleh dari tulang kortikal ataupun kortikokanselous melalui proses ekstraksi asam hidroklorid untuk membuang bahan-bahan mineralnya tetapi masih menyisakan kandungan organik dan proteinnya (Vaugan and Kay, 2007). *DBM* ini merupakan *allograft* yang mengalami pemrosesan lebih jauh dan karena itu mempunyai risiko transmisi penyakit lebih kecil. Namun akibat proses yang dialaminya, donor ini tidak dapat memberikan kekuatan pada lokasinya (North American spine society Public Education Series, 2006).

Donor tulang ini telah menunjukkan menjadi *inducer* yang poten untuk pembentukan tulang baru. Rangkaian peristiwa ini melibatkan transformasi dari sel-sel mesenkimal yang belum berdiferensiasi atau sel-sel retikuler dari sumsum tulang menjadi kondroblas, osteoblas dan hematositoblas yang akan menghasilkan tulang endokondral (Beaman dkk, 2006).

Matriks tulang berisi sejumlah sitokin-sitokin osteogenik yang penting, namun demikian bahan-bahan ini tertutup oleh komponen mineral tulang dan hanya dilepaskan

secara perlahan saat osteoklas melarutkan matriksnya. Urist dkk berupaya mengembangkan metode pelepasan mineral tulang dengan metode yang berbeda, yaitu menggunakan asam klorida. Potongan tulang kortikal yang telah didemineralisasi ditanam diotot tikus dan berhasil menunjukkan pembentukan kartilage dan tulang baru lengkap dengan fungsi sumsum tulangnya. Fenomena ini dinamakan *heterotopic bone formation*. Cara ini dilakukan sebagai upaya mengisolasi dan menemukan sifat-sifat khas beberapa bahan induksi yang ada di matriks tulang sehingga pembentukan tulang yang terjadi murni karena bahan osteoinduksi bukan karena proses osteokonduksi sel-sel tulang dari *host* (Yim, 1999). Urist dkk juga telah menunjukkan bahwa komponen aktif dari *DBM* adalah protein tertentu dengan berat molekul rendah (antara 15.000 sampai 18.000 dalton). Protein ini kemudian dinamakan *bone morphogenetic proteins* (BMP's) (Bolande dan Balian, 1986; Yim, 1999). BMP's aktif pada *DBM* membangkitkan sinyal-sinyal osteoinduktif yang mampu merangsang pembentukan tulang baru serta merangsang sel-sel mesenkimal dari *host* untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas (Altundal dan Sayrak, 2005; Yim, 1999).

Faktor-faktor yang mempengaruhi kemampuan osteoinduksi dari donor tulang *DBM* dapat dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu yang berhubungan dengan donor dan yang berhubungan dengan pemrosesannya. Faktor yang berhubungan dengan donor antara lain umur donor dan waktu antara setelah kematian (*post mortem*) dengan pengambilan bahan donor. Menurut Urist (1994) kemampuan osteoinduksi dari bahan *DBM* human mulai menurun setelah melewati umur 40 tahun. Penelitian lain menemukan kemampuan osteoinduksi dari tikus muda lebih besar daripada tikus yang berumur lebih tua. Hal ini dapat disebabkan oleh karena kemampuan osteoinduksi matriks tulang

dirusak oleh kerja enzim *protease endogenous*. Metode pemrosesan bahan DBM yang dikenal ada dua cara yaitu metode Urist dan metode Reddi dan Huggins. Kedua metode tersebut sama-sama menggunakan pelarut asam hidroklorida sebagai cara untuk mendemineralisasikan matriks tulang. Tetapi pada cara Urist menggunakan proses *freeze dried* atau lyophilisasi sebelum melakukan penyimpanan. Dari kedua cara tersebut tidak ada bukti statistik yang signifikan membedakan hasil keduanya (Kearney dan Lomas, 1997).

Berdasarkan bentuk dan ukuran bahan donor dapat berupa serbuk tulang (*bone powder*) dengan ukuran partikel 45-2500 μm ataupun balok kecil tulang (*bone chips*) dengan ukuran panjang 0,3-3 cm. Tidak ada penelitian yang menunjukkan hasil yang sama antara ukuran partikel donor tulang dan potensi osteoinduksi dari DBM. Urist (1979) menemukan semakin kecil ukuran partikel semakin berkurang kemampuan osteoinduksinya karena rentan terjadi phagositosis, sedangkan peneliti yang lain menemukan ukuran partikel tidak mempengaruhi kemampuan osteoinduksinya (Kearney dan Lomas, 1997).

Potensi osteoinduksi dari berbagai macam jaringan tubuh yang didekalsifikasi ternyata berbeda. Bagian diaphysis tulang panjang (humerus, femur, tibia dan fibula), dentin dan plasenta menunjukkan kemampuan osteoinduksi yang tinggi sedangkan tulang dari kalvarium, skapula, pelvis dan kartilage menunjukkan osteoinduksi yang kurang bagus (Yim, 1999).

DBM berisi kolagen tipe 1, protein non kolagen dan faktor-faktor pertumbuhan osteoinduktif. Sampai pertengahan tahun 1990-an, telah semakin jelas bahwa terdapat sedikitnya 15 BMPs yang merupakan bagian dari *transforming growth factor- β* (TGF- β),

selain itu juga terdapat *GDFs* (*growth differentiation factors*) dan *TGF- β 1, 2 dan 3*. Jadi saat *DBM* ditanam pada hewan coba, semua faktor-faktor yang berpotensi sebagai osteoinduktif akan bersama-sama bekerja untuk menghasilkan respon osteogenik. Ternyata dari beberapa penelitian tentang efek osteoinduktif dari *DBM* inipun menunjukkan adanya temuan klinis yang tidak sama. Hal ini diduga berkaitan dengan preparasi bahan dan metode pemrosesannya (De Long dkk, 2007).

Menurut *Standar American Association of Tissue Banks (AATB)*, tulang harus berisi kurang dari 8% kalsium untuk dapat dikatakan telah didemineralisasi. Biasanya demineralisasi menggunakan 0,5-0,6 asam hidroklorida. Komponen mineral dari tulang utamanya adalah *hidroxyapatit* yang hanya larut dibawah nilai pH 4. Saat tulang diberikan pelarut asam hidroklorida maka *hidroxyapatit* tersebut akan ikut larut dan kalsium fosfat akan menjadi buffer asam. Saat pH ditingkatkan diatas empat maka pada saat itu proses demineralisasi akan berhenti (Delloye, 1999).

Kerugian dari *DBM* ini antara lain secara radiologi tampak radiolusen, berkurangnya kekuatan dan rigiditasnya dan juga membutuhkan kecermatan dalam mempersiapkan bahannya serta derajat osteoinduksinya bergantung pada bahan dan pemrosesannya sebagaimana telah diuraikan diatas (Wolfe dkk, 1999; Beaman dkk. 2006).

2.3.7 Donor tulang beku kering (*freeze dried*)

Jaringan akan mengalami autolisis segera setelah kematian oleh karena reaksi biokimiawi. Sebagian besar proses ini disebabkan oleh enzim-enzim yang secara alamiah ada di lisosom sel. Jadi untuk mengawetkan bahan- bahan yang penting untuk fungsi

jaringan dari donor perlu menghentikan aktivitas enzim-enzim tersebut. Cara yang langsung dapat menghentikan enzim-enzim ini adalah mendenaturasikan dengan bahan kimia atau dengan mendidihkannya. Namun dengan mendenaturasi protein juga akan mengubah bahan-bahan biologi yang penting dari jaringan tersebut (O-Philip, 2002).

Jaringan atau tulang yang langsung dikeringkan dengan metode konvensional dapat menyebabkan bahan menjadi menyusut, relatif tidak larut dan dapat mengalami perubahan kimiawi permanen. Untuk memperpanjang waktu pengawetan dan menghindari efek-efek seperti di atas, jaringan kemudian dibekukan terlebih dahulu untuk selanjutnya dikeringkan (*freeze drying* = lyophilisasi) (O-Philip, 2002).

Freeze drying atau lyophilisasi merupakan teknik unik yang mengkombinasikan proses pembekuan dan pengeringan. Dapat pula didefinisikan sebagai teknik untuk mendapatkan keadaan kering dengan membekukan bahan basah dan melakukan sublimasi pada bahan es yang dihasilkan. Dengan kata lain adalah proses membuang air dari jaringan donor yang telah dibekukan melalui proses sublimasi yaitu mengubah air dalam jaringan yang sudah mengalami kristalisasi (es) menjadi uap tanpa melalui fase cair atau pencairan. Proses ini menguntungkan karena air dibuang tanpa mengalami denaturasi fisik maupun kimiawi. Hasil akhir adalah produk yang secara kimiawi stabil pada suhu ruangan tanpa meninggalkan air yang dapat menyebabkan reaksi kimia berikutnya.

Prosedur *freeze drying* ini biasanya dibagi menjadi tiga tahap yaitu : pembekuan dari jaringan (*freezing*), pengeringan primer dengan cara sublimasi terhadap jaringan yang membeku (*primary drying*), dan akhirnya pengeringan sekunder untuk membuang sisa-sisa air yang terkandung dengan teknik pemanasan (*secondary drying*). Hasil akhir

dari proses ini adalah produk yang tidak boleh memiliki kandungan air lebih dari 5% dari berat kering.

Secara biomekanik donor tulang jenis ini lebih lemah daripada yang hanya dibekukan (*deep-frozen grafts*). Sebuah kombinasi *freeze drying* dan irradiasi menyebabkan penurunan kekuatan kompresi, *bending* dan *torsio* antara 10%-70%. Sehingga donor tulang jenis ini jarang digunakan sebagai donor tulang struktural tetapi lebih sering dipakai untuk mengisi rongga atau gap pada tulang (Ferdiansyah, 2007)

Secara biologis sel-sel donor tulang yang telah mengalami proses ini akan mati. Namun demikian masih mungkin untuk mempertahankan sel-sel kondrosit dan osteosit tetap hidup dengan bahan kryoprotektif. Akan tetapi hal ini masih kontroversial. Pada proses beku kering konvensional tidak memungkinkan sel-sel tetap hidup sehingga donor tulang beku kering tidak mempunyai kemampuan osteogenik. Dengan kata lain donor tulang beku kering tidak mampu menghasilkan tulang baru dengan sendirinya. Pada beberapa penelitian donor ini masih mempunyai kemampuan osteokonduksi dan kekuatan struktural. Melalui pemrosesannya yang bertahap, bahan donor ini juga mampu menurunkan terjadinya reaksi imun (Delloye, 1999).

Jadi pada akhir proses beku kering terhadap allograft akan didapatkan produk berupa *framework* kolagen yang berisi hidroxyapatit, tetap memiliki kekuatan mekanik, berkurangnya kandungan mikroba dan berkurangnya kemampuan antigenik (O-Philip, 2002).

Beberapa indikasi penggunaan donor tulang beku kering ini adalah untuk merangsang penyembuhan pada nonunion, merangsang fusi pada spinal, mengisi rongga setelah kuretase tumor tulang jinak dan sebagainya (Ferdiansyah, 2007).

Donor tulang beku kering yang tidak mengalami demineralisasi akan membentuk tulang baru secara osteokonduksi seperti pada donor tulang beku segar (*fresh frozen bone*). Secara teoritis seharusnya donor tulang demikian juga memiliki potensi osteoinduksi, oleh karena *BMPs* secara fisiologis akan dibuka oleh osteoklas. Tetapi hanya sedikit bukti histologis yang menunjukkan demikian. Penelitian lain menunjukkan bahwa donor tulang yang tidak mengalami demineralisasi hanya berfungsi sebagai *scaffolding* untuk membentuk tulang baru dengan cara osteokonduksi. Sedangkan penelitian lainnya mengungkapkan bahwa mineralisasi mungkin dapat menghambat pembentukan tulang dengan cara mengganggu pelepasan *BMPs* (Delloye, 1999).

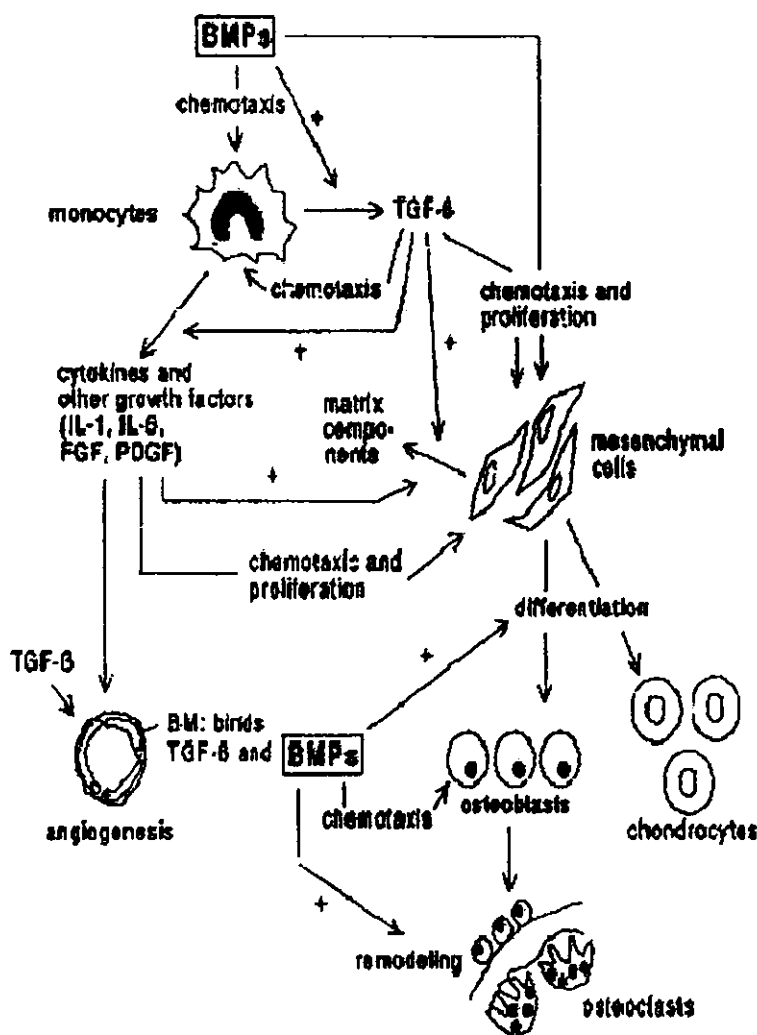
2.3.8 *Bone morphogenetic proteins (BMPs)*

Fenomena induksi tulang yang digambarkan pertama kali oleh Urist pada tahun 1965, telah berhasil menemukan kunci pembentukan tulang baru pada otot tikus. Fenomena ini menggambarkan adanya sebuah protein yang terperangkap pada matriks tulang yang sangat berperan pada pembentukan tulang. Protein ini dinamakan *Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)*.

Sampai akhir tahun 1980-an telah ditemukan tidak hanya satu protein saja yang berperan tetapi merupakan suatu grup protein didalam matriks tulang yang bertanggungjawab untuk terjadinya osteoinduksi. Selanjutnya lebih dari enambelas *BMPs* yang berbeda telah diidentifikasi dan dinamakan *BMP-1* sampai *BMP-16* dan dibagi menjadi beberapa sub tipe. Kecuali *BMP-1*, yang lain merupakan bagian dari keluarga *transforming growth factor- β (TGF- β)*, sebuah grup dari faktor pertumbuhan dan diferensiasi yang memainkan peran penting selama embriogenesis dan perbaikan jaringan

setelah lahir. Sedangkan *BMP-1* sendiri merupakan *proteinase* yang terlibat dalam proses pembentukan kolagen dari prokolagen.

Osteoinduksi *BMPs* mempunyai kemampuan memberikan sinyal awal untuk diferensiasi dari sel-sel stem mesenkimal menjadi osteoblas. Setelah implantasi bahan donor tulang pada otot tikus, *BMPs* yang ada didalam matriks tulang akan merangsang pembentukan tulang endokondral. Selanjutnya sebuah rangkaian kejadian yang khas dapat diamati pada pembentukan tulang endokondral yang dirangsang oleh *BMPs* yaitu rekrutmen dan proliferasi dari monosit dan sel-sel mesenkimal, kemudian berdiferensiasi menjadi kondroblast, kondrosit dan kalsifikasi matriks kartilage, invasi vaskuler dan akhirnya remodeling dari tulang yang baru dibentuk disertai dengan pembentukan sumsum tulang (gambar 2.8) (Termaat, 2005)



Gambar 2.8 Ilustrasi dari mekanisme kerja *BMPs* pada perbaikan tulang (Zipfel dkk, 2003)

2.3.9 Penyatuan donor tulang (*Bone graft incorporation*)

Sebagaimana telah dijelaskan sebelumnya bahwa pada pertengahan tahun 1960-an Urist dkk pertama kali melaporkan adanya proses perangsangan pembentukan tulang baru di luar sistem skeletal dengan *DBM*. Pada proses ini *DBM* mampu mengaktifkan berbagai faktor osteoinduksi antara lain *BMPs*, *TGF-β* dan faktor-faktor pertumbuhan lainnya seperti *IL-1*, *IL-6*, *FGF* dan *PDGF*. Faktor-faktor ini telah terbukti mampu merangsang

proliferasi osteoblas dan diferensiasi secara *in vitro* dan memacu pembentukan tulang baru saat dimasukkan secara *in vivo*. Proses penyatuan donor tulang ini melibatkan beberapa tingkatan fase antara lain :

Fase I : Proliferasi dan kemotaksis sel mesenkimal (hari ke-0 sampai ke-4)

Beberapa menit setelah penanaman *DBM* terbentuklah hematoma (bekuan darah) yang menghasilkan serabut-serabut fibrin. Agregasi trombosit melepaskan berbagai faktor pertumbuhan antara lain *TGF- β* dan *PDGF* dan terdapat plasma fibronectin yang berikatan dengan matriks tulang dari donor. *TGF- β* mempunyai berbagai efek yang membantu merangsang tulang termasuk merangsang tulang lain untuk menghasilkan faktor-faktor pertumbuhan dan merangsang produksi berbagai komponen kartilago dan tulang serta menyebabkan proliferasi dan kemotaksis osteoblas. *PDGF* adalah mitogen dominan untuk sel-sel jaringan ikat dan juga memainkan peran di dalam pengaturan diferensiasi dan pertumbuhan sel. Terakhir, peptida fibronectin mempunyai kemotaktik yang poten dan mungkin efek mitogenik juga. Oleh karena itu dalam beberapa menit setelah implantasi, tahapan induksi tulang telah dimulai melalui pelepasan berbagai faktor kemotaktik dan mitogenik (tabel 2.2) :



Tabel 2.2 Tahapan induksi tulang oleh donor tulang

Time After Implantation	Cellular Events	Molecular Processes
1 min	blood clot formation, platelet aggregation	fibrin network formation, platelet release of TGF β & PDGF, plasma fibronectin binding to implanted matrix
1 hr	PMNL arrival by chemotaxis	release of collagenase, elastase, & other enzymes; release of collagenous peptides
3–18 hrs	accumulation of PMNLs	continued proteolysis w/ release of fibroblast chemotactic factors
Day 1	mesenchymal cell chemotaxis, cell attachment to the implanted matrix	release of fibronectin peptides
Day 2	continued mesenchymal cell chemotaxis, matrix-to-cell signal transduction	initiation of nucleic acid & protein synthesis, release of further growth factors
Day 3	mesenchymal cell proliferation	^3H -thymidine incorporation into DNA, Type III collagen synthesis
Day 5	chondroblast differentiation	increased $^{35}\text{SO}_4$ incorporation proteoglycans
Day 7	chondrocyte differentiation, synthesis & secretion of matrix	Type II collagen synthesis, cartilage-specific proteoglycan synthesis
Day 9	chondrocyte hypertrophy, cartilage matrix calcification, vascular invasion of calcified matrix	increased ^{45}Ca incorporation, increased alkaline phosphatase activity, Type IV collagen synthesis, detection of laminin & factor VIII
Days 10–12	osteoblast differentiation, bone formation, bone mineralization	Type I collagen synthesis, bone-specific proteoglycan synthesis, peak in ^{45}Ca incorporation, peak in alkaline phosphatase activity
Days 12–18	increased osteoclastic activity, bone remodeling & dissolution of implanted matrix	increased lysosomal enzyme activity, release of collagenases & proteases
Day 21	bone marrow differentiation	increased ^{59}Fe incorporation into heme

* Adapted with permission from Reddi, et al.

Selama 18 jam berikutnya, terdapat kedatangan dan akumulasi dari sel inflamasi seperti monosit yang dikendalikan oleh faktor kemotaktik. Juga terdapat pelepasan kolagenase dan elastase, yang menghasilkan dua faktor kemotaktik yang dikenal sebagai kolagen dan peptida fibronectin. Jadi rangsangan kemotaktik dimulai segera setelah implantasi. Setelah pembentukan hematoma dan inflamasi, terdapat periode yang sebagian besar dikendalikan oleh peptida dan beberapa faktor pertumbuhan. Sel mesenkimal tiba dan diikuti perlekatan ke matriks yang ditanamkan. Interaksi ini diperantarai oleh fibronectin dan protein-protein lain yang melekat pada sel. Saat proses kemotaktik mendekati lengkap, terjadi dua aktivitas yaitu : 1) sintesa asam nukleat dan protein diaktifkan untuk persiapan proliferasi sel berikutnya 2) tahap induksi tulang lebih jauh terjadi melalui pelepasan beberapa faktor pertumbuhan tambahan. Sel mesenkimal menyerupai fibroblast selanjutnya berproliferasi pada hari ke-3 dan ke-4 setelah implantasi. Sekali lagi proliferasi ini sebagian besar dikendalikan oleh efek mitogen dari faktor-faktor pertumbuhan yang dilepaskan sebelumnya. Hubungan erat antara matriks

yang ditanam dengan sel-sel mesenkimal terus berkembang dan merangsang sinyal-sinyal antara matriks dan permukaan sel untuk memulai diferensiasi sel-sel mesenkimal. Tahap ini menandai perubahan ke fase kedua dari induksi tulang yaitu diferensiasi sel mesenkimal menjadi kartilage.

Tahapan induksi tulang *DBM* mempunyai banyak kesamaan dengan penyembuhan fraktur dan penyatuan donor tulang. Banyak peneliti menulis bahwa tahapan dimulai dengan terbentuknya hematoma diikuti dengan pelepasan beberapa bahan kemotaktik, faktor-faktor angiogenik dan faktor-faktor pertumbuhan dari agregasi trombosit dan jaringan lunak yang rusak. Jadi tampaknya fase inflamasi pada tahap awal dan diikuti dengan akumulasi sel-sel mesenkimal merupakan tahap awal universal pada induksi tulang.

Fase II : diferensiasi sel mesenkimal menjadi kartilage (hari ke-5 sampai ke-9)

Lima hari setelah implantasi matriks tulang, sel-sel awal dan marker molekuler petanda diferensiasi kartilage mulai tampak. Secara histologi kondroblast mulai ada hari ke-5, menandai dimulainya fase diferensiasi. Pada hari ke-7 kondrosit jelas dan terdapat sintesis lebih lanjut dan sekresi matriks kartilagenous. Pada hari ke-9 terdapat gambaran kartilage yang matang yaitu adanya kondrosit hipertropi, erosi matriks kartilage dan mineralisasi dari matriks trabekula yang tersisa. Marker molekuler yang sesuai dari peningkatan penyatuan kalsium dan meningkatnya aktivitas alkaline fosfatase mulai tampak. Akhirnya invasi vaskuler dari kartilage baru yang terbentuk terjadi. Keadaan ini tampak secara histologi dan juga disertai dengan deteksi kolagen tipe IV, laminin dan faktor VIII (semua ini umumnya komponen pembuluh darah). Invasi vaskuler ini

menandai transisi dari fase diferensiasi kartilago ke fase akhir induksi tulang yaitu diferensiasi prekursor osteogenik menjadi tulang.

Fase III : diferensiasi sel mesenkimal menjadi tulang (Hari ke-10 sampai ke-21)

Hari ke-10 setelah implantasi *DBM*, osteoblas pertama mulai tampak dan pembentukan tulang baru dapat diamati pada permukaan dari sisa-sisa matriks kartilago. Peristiwa-peristiwa seluler ini berhubungan dengan proses molekuler sesuai dengan peristiwa pembentukan tulang termasuk sintesa kolagen tipe I, sintesa proteoglycan dan puncak penyatuan kalsium dan aktivitas alkalin fosfatase.

Pada hari ke-12 sampai ke-18, sel-sel osteoklas dapat diamati secara histologi dan mulai melakukan proses remodeling. Osteoklas dan osteoblas bekerja bersama-sama untuk menggantikan tulang awal secara bertahap dan kartilago sisa dengan tulang murni. Proses molekuler yang diharapkan dengan meningkatnya aktivitas enzim lisosomal dan pelepasan kolagenase dan protease secara bersamaan tampak. Pada hari ke-21 diferensiasi sumsum tulang terjadi dan tampak erytrosit, granulosit dan megakariosit berjajar.

Sebagaimana telah diterangkan di atas tahapan induksi tulang *DBM* dikendalikan oleh faktor-faktor pertumbuhan yang terstruktur. Namun demikian penyatuan donor tulang lebih kompleks dengan melibatkan dua proses yaitu resorpsi graft yang nekrotik dan revaskularisasi graft yang terjadi secara bersamaan dengan tahapan induksi tulang. Kronologis dari tahapan induksi tulang sangat mirip dengan yang disebutkan di atas tetapi dapat sangat bervariasi tergantung jenis tulang donor yang digunakan. Terdapat perbedaan penyatuan tulang donor antara tulang kancellous dan kortikal. Yang pertama

menggambarkan tahapan awal universal dari induksi tulang pada masing-masing jenis donor tulang. Pembentukan hematoma, akumulasi sel-sel inflamasi dan kemotaksis fibroblast (Zipfel dkk, 2003).

Kesamaan didapatkan pada 2 minggu awal tetapi perbedaan terjadi pada akhir minggu kedua, pada percobaan dengan anjing, menunjukkan terjadinya kematian sel-sel di dalam tulang donor yang tidak bisa dicapai oleh respon vaskuler. Pada saat ini perbedaan penyatuan donor tulang antara kortikal dan kancellous menjadi jelas.

Pada donor tulang kancellous, respon vaskuler lebih besar daripada donor tulang kortikal. Keseluruhan dari bahan donor tulang kancellous dapat mengalami revaskularisasi secara lengkap dalam waktu 1-2 minggu. Populasi sel pada lingkungan ini didominasi oleh sel osteoblas, namun tidak diketahui asal sel-sel ini apakah dihasilkan dari resipien ataukah merupakan keturunan dari sel-sel yang ditransplantasikan bersama donor tulang. Pada semua keadaan, sel-sel ini membatasi tepi-tepi dari trabekula dari donor tulang dan membentuk osteoid yang mengelilingi dan menyelimuti tulang donor yang mati. Tulang mati yang telah dikelilingi osteoid ini akhirnya diserap oleh osteoklas. Secara radiografi tulang ini awalnya tampak mempunyai densitas lebih tinggi dan kemudian menjadi kurang densitasnya saat osteoklas melakukan remodeling. Keadaan ini mirip terjadi juga pada donor *allograft* kancellous. Akan tetapi di sini respon vaskuler lebih kurang dan sel-sel dari donor tulang pada awalnya mengalami kematian.

Pada donor tulang kortikal perbedaan utamanya berkisar pada jumlah revaskularisasi dan kelengkapan proses remodeling yang terjadi. Tulang kortikal tidak dapat mengalami revaskularisasi secepat tulang kancellous. Revaskularisasi membutuhkan waktu sekitar 2 bulan. Keadaan ini disebabkan oleh struktur tulang kortikal yang tidak

memungkinkan mempunyai area kontak penetrasi vaskuler yang besar antara tulang donor dan resipien. Revaskularisasi berjalan melalui sistem Havers dan kanal Volkman. Mengikuti proses revaskularisasi pada tepi-tepi dari donor tulang selanjutnya bagian dalam mengikuti dengan cepat. Revaskularisasi bagian dalam donor tulang kortikal akan memulai proses *creeping substitution*. Pada proses ini pertama kali akan dilakukan resorpsi pada bahan tulang donor sebelum digantikan dengan bahan tulang baru yang hidup. Pada percobaan dengan anjing fase resorpsi telah tampak meningkat di atas normal setelah 2 minggu, meningkat dengan pasti sampai 4 minggu berikutnya. Kemudian berjalan menurun sampai satu tahun. Evaluasi histologi dari data ini menunjukkan bahwa proses resorpsi berjalan terus sehingga sistem Havers bagian perifer dan lamella di sekitarnya mengalami remodeling yang pertama kali dan selanjutnya sistem Havers bagian dalam juga mengalami remodeling tanpa bersesuaian dengan lamellanya. Dengan demikian area-area dari tulang kortikal yang tertinggal dan mati bercampur dengan tulang baru yang mengalami remodeling. Hasil keseluruhan menunjukkan bahwa pada ujung-ujung tulang donor mengalami remodeling lebih lengkap daripada di daerah sentralnya. Kelengkapan dan kecepatan dari penyatuan ini tampaknya berhubungan dengan aktivitas remodelingnya, sedangkan hubungan antara kecepatan remodeling ini dengan stres pembebanan (*weight bearing*) tidak jelas.

Penyatuan donor tulang *allograft* kortikal sedikit berbeda dengan *autograft* kortikal. Pada umumnya revaskularisasi lebih sedikit dan pembentukan tulang kurang luas. Resorpsi dapat memainkan bagian yang lebih besar pada penyatuan donor tulang. Sementara itu rangkaian *allograft* kortikal menunjukkan respon inflamasi untuk beberapa minggu. Jenis sel utama pada saat ini adalah limfosit. Respon inflamasi setidaknya

selama 1-2 bulan, selama ini sebuah jaringan fibrous mengelilingi *allograft*. Secara bertahap donor tulang akan menyatu dengan jaringan host. Periode waktu penyatuan *allograft* merupakan salah satu indikasi donor tulang diterima atau direjeksi. Pembentukan kalus juga merupakan tanda baik tetapi mungkin tidak tampak saat menggunakan internal fiksasi yang rigid (Nunamaker dan Rhinelander, 1985).

2.4 Tikus (*Rattus norvegicus*)

Rattus norvegicus mempunyai nama lain tikus liar, tikus Norwegia atau tikus coklat dan hewan ini semarga dengan tikus laboratorium. *Rattus norvegicus* berasal dari China Utara yang kemudian menyebar dan ditemukan di Eropa Timur sekitar abad ke-18. Akan tetapi, tikus liar atau tikus coklat mempunyai nama ilmiah lain yaitu *Rattus rattus*. Tikus ini mirip dengan tikus Norwegia tetapi jarang dipakai sebagai hewan laboratorium. Tikus liar (*Rattus rattus*), lama hidupnya 4-5 tahun, sedangkan tikus laboratorium jarang hidup lebih dari 3 tahun. Tikus laboratorium (*Rattus norvegicus*) lebih cepat dewasa, tidak memperlihatkan perkawinan musiman dan lebih mudah berkembang biak. Tikus laboratorium jantan jarang berkelahi, sama seperti mencit. Bulu tikus laboratorium berwarna putih dengan mata berwarna merah. *Rattus norvegicus* ini mempunyai urutan pembagian taksonomi seperti tampak pada tabel dibawah ini :

Tabel 2.3: Pembagian taksonomi *Rattus norvegicus* (Myers dan Armitage, 2004).

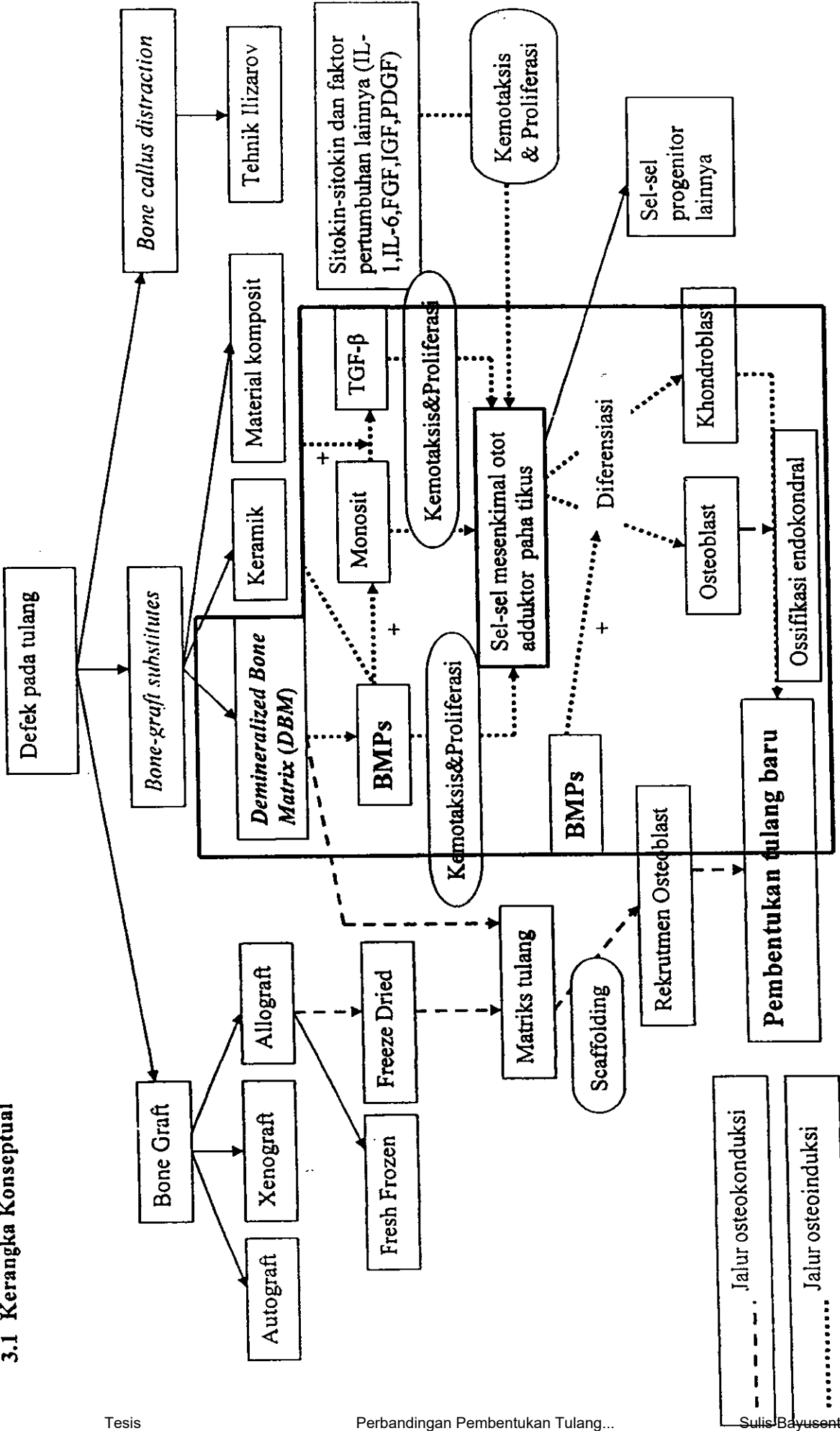
Kingdom	: Animalia
Phylum	: Chordata
Subphylum	: Vertebrata
Class	: Mammalia
Order	: Rodentia
Suborder	: Myomorpha
Family	: Muridae
Subfamily	: Murinae
Genus	: Rattus
Species	: Rattus norvegicus

Tikus mempunyai formula gigi 1 0 0 3 (ICPM) = 16, sedangkan kelenjar saliva terdiri dari kelenjar submaxillaris dan sublingualis. Karena ukuran tubuhnya lebih besar dari mencit tikus lebih disukai untuk berbagai penelitian. Berbeda dengan hewan laboratorium lainnya, tikus tidak pernah muntah, disamping itu tikus tidak memiliki kelenjar empedu. Lambung tikus terdiri dari dua bagian yaitu nonglandular dan glandular dan *small intestine* terdiri dari duodenum, jejunum dan ileum. Pada umur 2 bulan berat badannya dapat mencapai 200-300 gram. Tikus tergolong hewan yang mudah dipegang tetapi bila dibanding mencit tikus kurang *photophobic* (Kusumawati, 2003). Data biologis tikus dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

Tabel 2.4: Data biologis *Rattus norvegicus*

Lama Hidup	: 2-3 tahun, dapat sampai 4 tahun
Lama Bunting	: 20-22 hari
Umur Disapih	: 21 hari
Umur Dewasa	: 40-60 hari
Siklus Kelamin	: poliestrus
Siklus Estrus	: 4-5 hari
Lama Estrus	: 9-20 jam
Berat Dewasa	: 300-400 gram jantan; 250-300 gram betina
Berat Lahir	: 5-6 gram
Jumlah anak	: rata-rata 9, dapat 20
Suhu (rektal)	: 36-39°C (rata-rata 37,5°C)
Perkawinan Kelompok	: 3 betina dengan 1 jantan
Aktivitas	: Nokturnal (malam)

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 : Skema Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

Pada kasus-kasus defek tulang yang luas ataupun patah tulang *nonunion* sering diperlukan pemberian donor tulang untuk merangsang pembentukan tulang baru. Standar emas untuk donor tulang adalah menggunakan *autografi* tulang. Namun donor tulang demikian memberikan keterbatasan jumlah tulang yang bisa didapat dan dapat menimbulkan potensi morbiditas pada daerah donor (Finkemeier, 2002). Salah satu alternatif bahan pengganti untuk mengisi defek tulang yang luas atau yang sulit sembuh adalah Demineralized Bone Matrix (*DBM*) (Yaedu dkk, 2004).

Penggunaan *DBM* sebagai bahan alternatif ini mulai populer setelah Marshal R Urist tahun 1965 berhasil menunjukkan adanya sejumlah protein dalam matriks tulang yang dapat merangsang pembentukan tulang baru. Bahan-bahan organik dalam matriks tulang ini mampu merangsang osteogenesis *heterotopic* dengan mekanisme ossifikasi endokondral. Protein matriks ini dinamakan *bone morphogenetic proteins* atau *BMPs* (Yaedu dkk, 2004).

DBM mampu bertindak sebagai osteokonduktif dan osteoinduktif. Bahan ini tidak memberikan penopang struktural akan tetapi dapat mengisi defek tulang dan rongga (Finkemeier, 2002). Meskipun protein di dalam *DBM* memberikan efek induksi, tetapi struktur kolagen di dalam *DBM* juga memberikan peranan osteokonduksi (Zhang dkk, 1997). *DBM* dan beberapa bahan donor tulang substitusi lain juga telah digunakan sebagai *scaffolding* ataupun bahan tambahan yang penting bagi pembentukan *scaffolding* untuk fusi tulang. Tujuan dari penggunaan sebagai *scaffolding* ini adalah untuk merangsang osteogenesis melalui osteokonduksi dan memberikan sebuah sistem pengantaran bagi bahan osteoinduksi. Matriks ekstraseluler seperti kolagen dan

glycosaminoglycan dapat membantu diferensiasi sel-sel osteoprogenitor dan mengikat faktor-faktor pertumbuhan yang bersifat osteogenik (Pilitsis dkk, 2002).

Matriks tulang berisi sejumlah sitokin osteogenik yang penting, namun demikian bahan-bahan ini tertutup oleh komponen mineral tulang dan hanya dilepaskan secara perlahan saat osteoklas melarutkan matriks. Urist dkk berupaya mengembangkan metode pelepasan mineral tulang dengan cara melarutkan kandungan mineral tulang yang berupa hidroxyapatit dengan asam klorida. Cara ini dilakukan sebagai upaya membebaskan dan melepaskan beberapa bahan induksi yang ada di matriks tulang yang kemudian diberi nama *bone morphogenetic proteins* (BMP's) (Yim, 1999). DBM berisi kolagen tipe 1, protein non kolagen dan faktor-faktor pertumbuhan osteoinduktif yang ada di dalam matriks tulang yang telah mengalami dekalsifikasi. Sampai saat ini telah dikenal enambelas BMPs yang berbeda dan ditandai dengan istilah *BMP-1* sampai *BMP-16* dan dibagi menjadi beberapa sub tipe. Kecuali *BMP-1*, yang lain merupakan bagian dari keluarga *transforming growth factor- β* (*TGF- β*), sebuah grup dari faktor pertumbuhan dan diferensiasi yang memainkan peran penting selama *embriogenesis* dan perbaikan jaringan setelah lahir, sedangkan BMP-1 sendiri merupakan *proteinase* yang terlibat dalam proses pembentukan kolagen dari prokolagen (Termaat dkk, 2005).

Proses pertumbuhan tulang baru yang melibatkan DBM ini disebut sebagai ossifikasi endokondral karena melalui pembentukan tulang kartilage dulu sebelum menjadi tulang (Zhang dkk, 1997). Zhang juga menambahkan bahwa pada umumnya implantasi dari DBM melibatkan sejumlah fase yaitu fase inflamasi sesaat (hari pertama), diikuti dengan perpindahan dan proliferasi dari sel-sel progenitor mesenkimal (hari ke-2 sampai ke-4) selanjutnya terjadi diferensiasi sel mesenkimal menjadi kondroblast (hari

ke-5 sampai ke-7) yang menghasilkan matriks kartilage yang akan mengalami kalsifikasi pada hari ke-11 atau ke-12. Setelah kartilage mengalami mineralisasi berikutnya pembuluh darah - pembuluh darah akan masuk dan akhirnya jaringan kartilage akan digantikan dengan jaringan tulang oleh osteoblas

Proses osteoinduksi dimulai ketika *BMPs* dapat dilepaskan dari matriks tulang dengan bantuan asam klorida. *BMPs* ini mempunyai kemampuan memberikan sinyal awal untuk diferensiasi dari sel-sel stem mesenkimal menjadi osteoblas. Setelah implantasi bahan donor tulang yang mengandung *BMPs* akan merangsang kemotaksis monosit ke tempat penanaman DBM. Selanjutnya monosit akan mengeluarkan *Transforming growth factor- β* (TGF- β), sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan lainnya yang akan merangsang kemotaksis dan proliferasi dari sel-sel mesenkimal di tempat penanaman bahan donor tulang. Sel-sel mesenkimal ini kemudian berdiferensiasi menjadi osteoblas, khondroblas dan sel-sel progenitor lainnya. Proses diferensiasi ini juga dipengaruhi oleh *BMPs*. Osteoblas akan mensekresikan matriks tulang yang akhirnya terbentuk tulang baru. Selain melalui jalur tersebut kolagen yang masih tersisa di dalam matriks tulang dapat menjadi *scaffolding* atau teralis ataupun *framework* bagi konduksi sel-sel osteoblas *host* masuk ke dalam tempat donor tulang guna membentuk tulang baru (Termaat dkk, 2005).

Freeze drying atau lyophilisasi merupakan tehnik unik yang mengombinasikan proses pembekuan dan pengeringan guna mendapatkan produk berupa *framework* kolagen yang berisi *hidroxyapatit*, tetap memiliki kekuatan mekanik, berkurangnya kandungan mikroba dan berkurangnya kemampuan antigenik. Pada proses beku kering konvensional tidak memungkinkan sel-sel tetap hidup sehingga donor tulang beku kering

tidak mempunyai kemampuan osteogenik (Delloye, 1999). Donor tulang jenis ini tidak mengalami demineralisasi dan hanya berfungsi sebagai *scaffolding* untuk membentuk tulang baru dengan cara osteokonduksi melalui matriks tulang yang ada (Delloye, 1999).

3.2 Hipotesis Penelitian

Allograft demineralized bone matrix (DBM) dapat merangsang pembentukan tulang baru lebih baik dibandingkan dengan *allograft* kanselous beku kering (*freeze dried*)

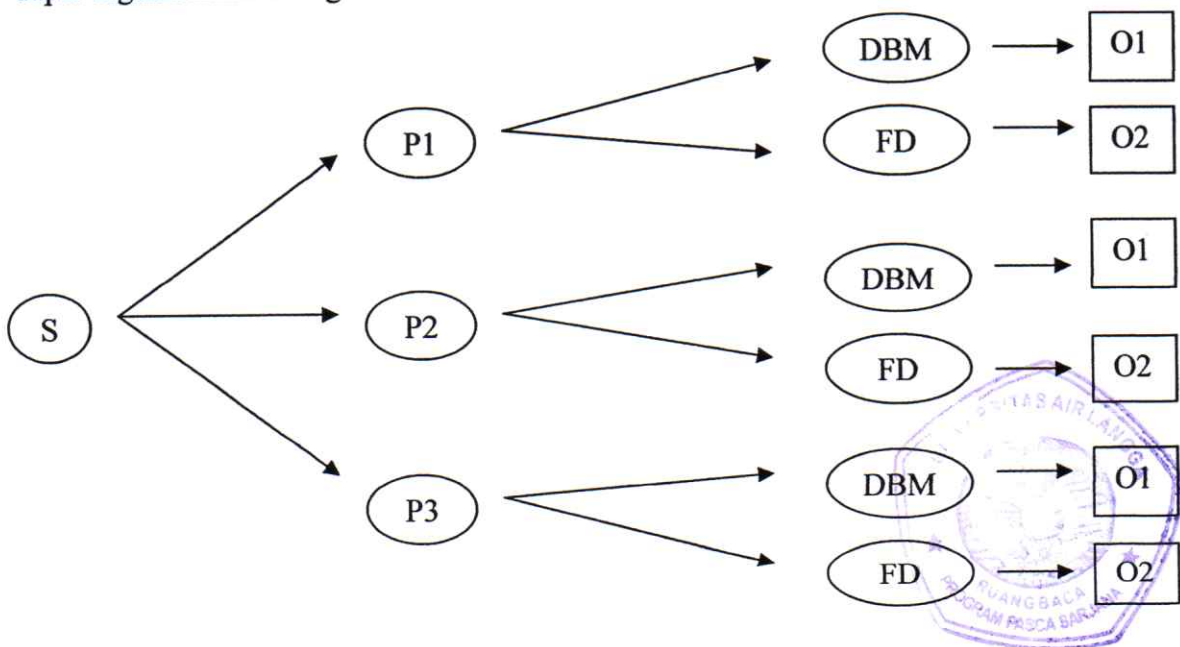
BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini tergolong penelitian eksperimental laboratoris karena semua kelompok mendapatkan perlakuan, dengan menggunakan rancangan penelitian faktorial dan perbedaan akan dianalisis dengan menggunakan uji statistik *T one-sample test one tailed* untuk mengetahui perbedaan luas matriks tulang dan jumlah osteoblas antara kelompok yang mendapatkan *DBM* dan *allograft* kanselous beku kering.

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *The Post-test only Control Group Design*. Subyek penelitian terdiri dari hewan coba sebanyak 18 ekor yang dibagi dalam 3 (tiga) kelompok secara random berdasarkan waktu pengamatan. Masing-masing waktu pengamatan akan menilai perbedaan luas matriks tulang yang terbentuk dan jumlah osteoblas antara kelompok otot adduktor femur yang mendapatkan *DBM* dan *allograft* kanselous beku kering. Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut:



Keterangan :

S : *Sampling*

P1 : Kelompok perlakuan 1 (dilakukan penanaman *DBM* pada 6 otot adduktor *femur* dan *allograft* kanselous beku kering pada 6 otot adduktor *femur*, diterminasi pada minggu kedua)

P2 : Kelompok perlakuan 2 (dilakukan penanaman *DBM* pada 6 otot adduktor *femur* dan *allograft* kanselous beku kering pada 6 otot adduktor *femur*, diterminasi pada minggu keempat)

P3 : Kelompok perlakuan 3 (dilakukan penanaman *DBM* pada 6 otot adduktor *femur* dan *allograft* kanselous beku kering pada 6 otot adduktor *femur*, diterminasi pada minggu keenam)

DBM : *Allograft demineralized bone matrix*

FD : *Allograft* kanselous beku kering (*freeze-dried allograft*)

O1 : Pengamatan jumlah osteoblas dan luas matriks tulang pada otot adduktor *femur* yang ditanami dengan *DBM*

O2 : Pengamatan jumlah osteoblas dan luas matriks tulang pada otot adduktor *femur* yang ditanami dengan *allograft* kanselous beku kering

4.2 Unit Eksperimen dan Replikasi

4.2.1 Unit eksperimen

Unit eksperimen adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dari tempat penangkaran, mata merah jernih, usia sekitar 50-60 hari, berat badan sekitar 200-300 gram yang diukur dengan timbangan torbal (*Torsion Balance*), dengan kondisi sehat

yang ditandai dengan gerakannya yang aktif, kotoran (faeces) tidak lembek, berat badan tidak turun lebih dari 10% selama aklimatisasi dan berespon terhadap rangsangan sekeliling yang ditentukan oleh dokter hewan (Malole, 1989; Kusumawati, 2003).

4.2.2 Replikasi

Jumlah replikasi total pada penelitian ini adalah 18 ekor tikus putih yang terbagi dalam 3 kelompok, masing-masing kelompok 6 ekor tikus yang dipilih acak dengan sistem undian. Jumlah replikasi minimal ditentukan berdasarkan rumus Federer (1955) :

$$(k-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

k : jumlah macam perlakuan

$$(r-1) \geq 3$$

r : jumlah replikasi untuk tiap kelompok

$$r \geq 4$$

Jadi jumlah sampel minimal per kelompok adalah 4 ekor tikus.

Namun dalam penelitian kemungkinan bisa terjadi kesalahan yang menyebabkan hewan coba mati atau terjadi kesalahan sewaktu proses akhir pemeriksaan (f) sekitar 20%, maka besar sampel dikoreksi dengan menggunakan rumus Higgins dan Kleinbaum (1985) :

$$(1/1-f) \times r$$

f : persentase kemungkinan binatang coba gagal

Jadi besar sampel menjadi :

$$\left(\frac{1}{1-0,2} \right) \times 4 = 5 \text{ ekor per kelompok perlakuan.}$$

$$1 - 0,2$$

Karena dalam percobaan ini menggunakan bagian otot paha tikus yang satu sisi akan ditanami dengan *DBM* sedangkan sisi yang lain ditanami dengan donor tulang kanselous beku kering (*freeze dried*) maka untuk memudahkan dibulatkan menjadi 6 ekor tikus.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel

A. Variabel Bebas (independen)

1. Jenis allograft
2. Lama penanaman bahan donor ke dalam otot adduktor femur tikus

B. Variabel Tergantung (dependen)

1. Luas matriks tulang
2. Jumlah osteoblas

C. Variabel Kendali

1. Umur tikus
2. Jenis kelamin tikus
3. Berat badan tikus
4. Makanan dan minuman tikus
5. Perawatan dan sanitasi kandang
6. Waktu perlakuan
7. Teknik operasi
8. Dosis obat

4.3.2 Definisi operasional

Variabel-variabel yang digunakan pada penelitian ini dapat didefinisikan sebagai berikut :

1. Jenis *allograft* adalah donor tulang dari hewan sejenis yang digunakan untuk perlakuan pada penelitian ini yaitu *allograft demineralized bone matrix (DBM)* dan *allograft kancellous beku kering (Freeze Dried Allograft)*.
2. *Demineralized Bone Matrix (DBM)* adalah *allograft* dari tikus sejenis yang dipotong berbentuk butiran-butiran (*granule*) yang selanjutnya mengalami pemrosesan berupa pembuangan bahan-bahan mineralnya dengan bahan asam klorida tetapi masih menyisakan kandungan organik dan proteinnya.
3. *Allograft kancellous beku kering (Freeze Dried Allograft)* adalah *allograft* dari tulang kancellous tikus sejenis yang dipotong berbentuk butiran-butiran (*granule*) yang selanjutnya mengalami pemrosesan berupa pasteurisasi dan pengeringan dalam *deep-freezer* selama 24 jam sehingga tinggal menyisakan kandungan mineralnya saja.
4. Lama penanaman bahan donor ke dalam otot adduktor femur tikus merupakan waktu pengamatan terhadap perlakuan yaitu minggu kedua, minggu keempat dan minggu keenam.
5. Luas matriks tulang adalah luas rata-rata trabekular matriks tulang dari lima lapang pandang yang dapat diamati pada pemeriksaan mikroskopik dengan pembesaran 400x dengan pewarnaan Hematosilin-Eosin (HE) dengan satuan milimeter persegi.

6. Jumlah osteoblas adalah rerata jumlah sel-sel tulang osteoblas pada jaringan matriks tulang yang dihitung dalam lima lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 400x dan pewarnaan Hematosilin-Eosin (HE) dengan satuan perlapang pandang.

4.4 Bahan Penelitian

4.4.1 Hewan coba

Pada penelitian ini digunakan tikus jantan putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar dari tempat penangkaran, mata merah jernih, usia sekitar 50-60 hari, berat badan sekitar 200-300 gram yang diukur dengan timbangan torbal (*Torsion Balance*), dengan kondisi sehat yang ditandai dengan gerakannya yang aktif, kotoran (faeces) tidak lembek, berat badan tidak turun lebih dari 10% selama aklimatisasi dan berespon terhadap rangsangan sekeliling serta dirawat dalam kondisi yang sama di Laboratorium Biokimia FK Unair dengan pengawasan seorang dokter hewan sebagai supervisor (Malole, 1989; Kusumawati, 2003).

4.4.2 Makanan dan minuman hewan coba

1. Makanan yang diberikan pada hewan coba adalah pakan ternak jenis PAR-G Pellet produksi Japfa Comfeed Indonesia Sidoarjo dengan takaran 20 gram / hari / hewan coba
2. Minuman yang diberikan pada hewan coba adalah air yang berasal dari PDAM dan diberikan secara adlibitum dengan menggunakan botol khusus. Botol khusus

ini mengeluarkan air yang berada di dalamnya jika disedot oleh hewan coba (Malole, 1989).

4.4.3 Bahan untuk perlakuan

1. Demineralized Bone Matrix (*DBM*) (lihat lampiran 5)
2. *Allograft* Kancellous Beku kering (*Freeze Dried Allograft*) (lihat lampiran 5)

4.4.4 Unit analisis

Unit analisis untuk pemeriksaan variabel adalah sediaan histologis dengan pewarnaan HE (*haematoxylin-eosin*) yang digunakan untuk menghitung luas matriks tulang dan jumlah osteoblas.

4.5 Instrumen Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi :

1. Alat untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba
 - a. Kandang plastik polypropilen ukuran 30 cm x 40 cm x 15 cm dengan ventilasi dan penyinaran relatif lama dan suhu ruangan sekitar 32°C. Masing-masing berisi 6 ekor hewan coba. Kandang ditutup dengan anyaman kawat serta beralaskan sekam. Setiap 2 hari sekali diganti untuk menjaga kebersihan kandang (Malole, 1989).
 - b. Botol minum
 - c. Tempat makan dari aluminium
 - d. Antibiotik profilaksis diberikan Ampicillin 25 mg/ kg intramuskuler.

- e. Sirup amoksilin, sirup asam mefenamat dan salep mata gentamycin
 - f. Solusio betadin dan tensoplast
 - g. Plaster coklat
 - h. Timbangan
 - i. Alas dari kayu yang digunakan untuk memfiksasi tikus saat perlakuan
 - j. Alat operasi menggunakan peralatan bedah dasar (miniset), yaitu pinset anatomis dan sirurgis, *scalpel* atau *mesh* 11 dan 15, gunting, klem dan *needle holder* serta benang jahit yang diserap dan tidak, *handschoen* dan *doek* untuk mempersempit lapangan operasi. Semua peralatan dalam keadaan steril.
 - k. Material *DBM* dan tulang kanselous beku kering berbentuk butiran-butiran (*granule*) yang akan ditanam di dalam lapisan perimysium otot adduktor femur tikus juga dalam keadaan steril.
2. Alat untuk pembiusan dan pengambilan sampel :
- a. Premedikasi menggunakan atropin sulfat 0,2 mg/kg dan diazepam 1,0 mg/kg intramuskuler, yang dilanjutkan dengan pembiusan menggunakan ketamin (ketalar) dengan dosis 20 mg/ kg intramuskuler pada daerah quadrisep kiri (efek sekitar 3-6 menit), dilanjutkan dengan *maintenance* 10 mg/kg intramuskuler setiap ada reaksi dari tikus. Kemudian tikus dipuasakan sampai 6 jam post operasi (Malole, 1989).
 - b. Hewan coba dilakukan *sacrifice* dengan menggunakan larutan eter. Setelah itu dilakukan eksisi jaringan pada tegmentum otot *adduktor femur* yang mendapat perlakuan.
3. Alat untuk pembuatan preparat histologi

Pemeriksaan histologis spesimen otot adduktor femur femur tikus yang telah diberi perlakuan oleh *DBM* dan *allograft* kanselous beku kering dengan cara bagian yang akan diamati diambil untuk kemudian dilakukan pemrosesan dan pewarnaan dengan hematosilin-eosin.

4.6 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di 3 tempat yaitu di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan coba serta pengambilan jaringan dan Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran untuk pemrosesan dan pemeriksaan histologi serta Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo Surabaya untuk pembuatan sediaan *DBM* dan donor tulang kanselous beku kering . Waktu penelitian direncanakan selama 7 bulan yaitu Desember 2008- Juli 2009.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Tahap persiapan

4.7.1.1 Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 1 minggu di kandang laboratorium Biokimia FK Unair. Bila ada yang sakit dikeluarkan dari penelitian (Malole, 1989).

4.7.1.2 Pembagian kelompok hewan coba

Penelitian dilakukan secara eksperimental di dalam laboratorium. Penelitian ini menggunakan 2 faktor perlakuan yaitu pemberian bahan *DBM* dan *allograft* beku kering dan waktu pengamatan yaitu 2, 4 dan 6 minggu. Tikus dibagi menjadi 3 kelompok

pengamatan yang masing-masing dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan. Masing-masing kelompok pengamatan terdiri dari 6 ekor tikus yang akan ditanami *DBM* pada otot adduktor femur kanannya sebanyak 3 ekor tikus dan otot adduktor femur kirinya sebanyak 3 ekor tikus. Sedangkan *allograft* kanselous beku kering akan ditanam pada otot adduktor femur kiri sebanyak 3 ekor tikus dan otot adduktor femur kanannya sebanyak 3 ekor tikus. Sehingga pada masing-masing kelompok pengamatan akan didapatkan 6 otot adduktor femur akan ditanami *DBM* dan 6 otot adduktor femur lainnya akan ditanami *allograft* kanselous beku kering.

Secara lebih sederhana kelompok pengamatan tikus tersebut dapat digambarkan dalam tabel 4.1 berikut ini :

Tabel 4.1 Perlakuan dan Pengamatan Hewan Coba

PERLA KUAN PENG MATAN	DBM (OTOT ADDUKTOR FEMUR)	SISI PENANAMAN	BEKU KERING (OTOT ADDUKTOR FEMUR)	SISI PENANAMAN
MINGGU -2	6	3 kanan 3 kiri	6	3 kiri 3 kanan
MINGGU-4	6	3 kanan 3 kiri	6	3 kiri 3 kanan
MINGGU-6	6	3 kanan 3 kiri	6	3 kiri 3 kanan

4.7.1.3 Pembuatan sediaan bahan donor tulang

Bahan donor tulang terdiri dari DBM dan freeze dried yang diperoleh dari tulang tikus sejenis dan telah mengalami pemrosesan di bank jaringan RSUD Dr Soetomo Surabaya

4.7.1.4 Pembiusan

Hewan coba dilakukan premedikasi dengan menggunakan atropin sulfat 0,2 mg/kg dan diazepam 1,0 mg/kg intramuskuler. Kemudian dilanjutkan dengan pembiusan menggunakan ketamin (ketalar) dengan dosis 20 mg/kg intramuskuler pada daerah quadrisep kiri (efek sekitar 3-6 menit), dilanjutkan dengan *maintenance* 10 mg/kg intramuskuler setiap ada reaksi dari tikus. Kemudian tikus dipuasakan sampai 6 jam post operasi.

4.7.2 Tahap perlakuan

1. Setelah hewan coba dibius, dilakukan penanaman *DBM* dan *freeze dried* pada lapisan perimisium otot adduktor femur femur kanan tikus yang dibuat dengan pisau bedah (*surgical knife*) ukuran 11, dengan cara dibuat luka dengan diameter 1 cm dari lateral ke medial kemudian diperdalam lapis demi lapis, *fascia* otot dibuka dan diperlebar dengan gunting.
2. Material *DBM* dan *freeze dried* yang akan digunakan kemudian ditanam ke dalam lapisan perimisium dari otot adduktor femur. Material donor tulang ini berbentuk butiran-butiran (*granule*). Setelah selesai kemudian dilakukan penutupan luka

dengan benang *absorbable* ukuran 5.0 dan kulit dari otot dijahit dengan benang nilon 4.0

3. *Pasca* operasi, luka ditutup dengan jahitan simpul benang absorbable 4.0. untuk otot dan jahitan satu-satu dengan nilon 3.0 untuk kulit dan diolesi betadin. Dilakukan perawatan luka setiap hari dengan salep mata gentamycin selama 5 hari, antibiotik sirup amoksisilin dengan dosis 27 mg/200 gBB sehari selama 5 hari dan analgesik sirup asam mefenamat dengan dosis 27 mg/200 gBB sehari selama 5 hari.

Besarnya dosis sirup Amoksisilin dan Asam Mefenamat didapat dari penghitungan dengan menggunakan rumus konversi dosis obat yang digunakan oleh manusia dan tikus (Paget G, 1964). Dimana :

$$\text{Dosis obat pada tikus (rat)} = 0,018 \times \frac{\text{Dosis obat pada manusia}}{\text{dengan berat 200 g}} \quad \text{dengan berat 70 kg}$$

Apabila dosis obat pada manusia adalah 3 kali 500 mg atau 1.500 mg sehari, maka

dosis pada tikus (rat) adalah : $0,018 \times 1.500 \text{ mg} = 27 \text{ mg/200 g BB sehari}$

4.7.3 Tahap pengumpulan data

1. Hewan coba dilakukan *sacrifice* pada minggu ke-2, 4 dan 6 dengan menggunakan larutan eter. Kemudian dilakukan eksisi pada jaringan otot adduktor femur yang mendapat perlakuan, kemudian jaringan ditaruh di dalam wadah yang berisi larutan Buffer Formalin 10%. Selanjutnya dikirim ke laboratorium Patologi-

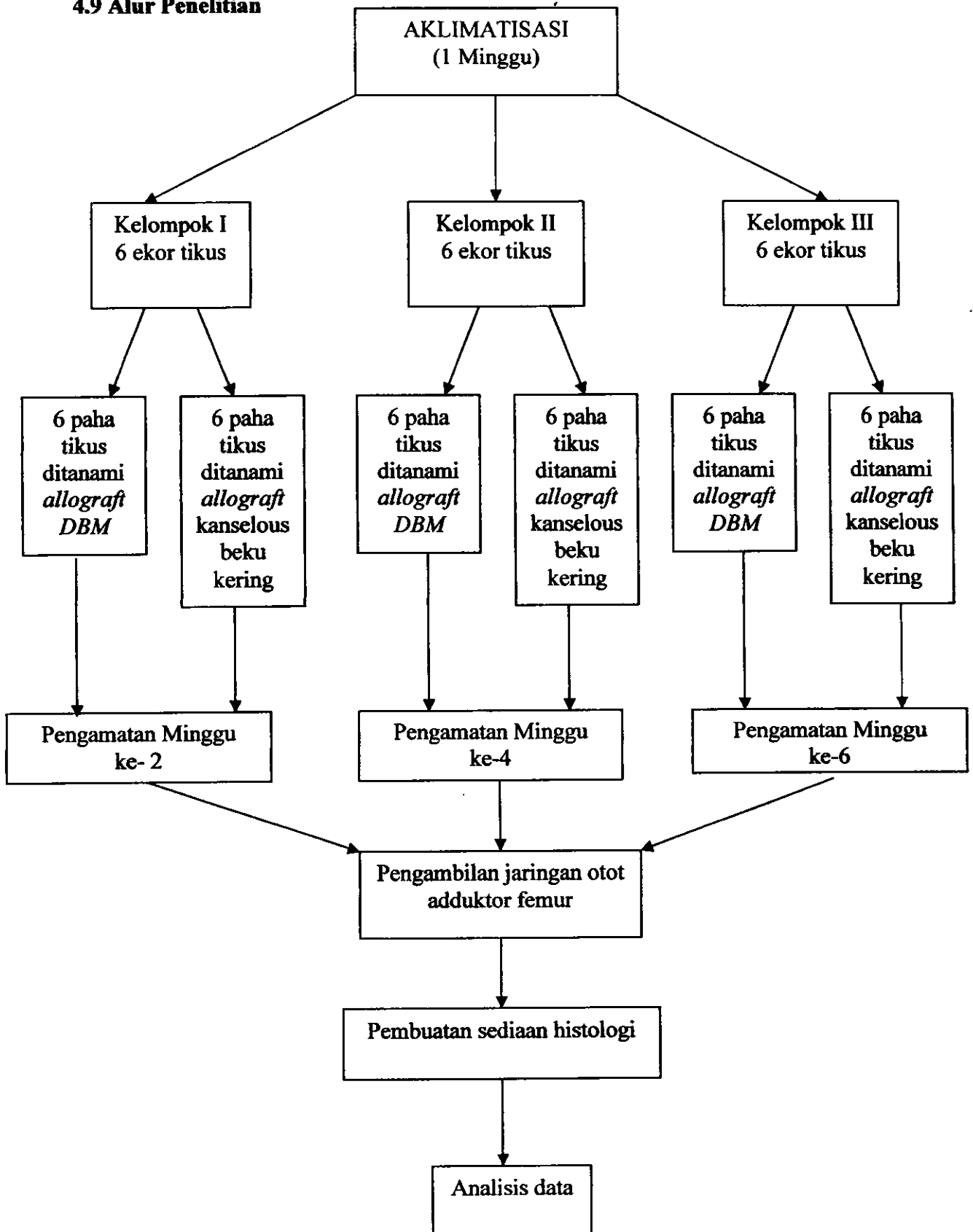


Anatomi untuk dilakukan pembuatan sediaan histologi sedangkan mayat tikus dikubur di lokasi yang tersedia.

2. Pemeriksaan histologis spesimen otot adduktor femur femur tikus yang telah diberi perlakuan oleh *DBM* dan *allograft* kanselous beku kering dengan cara bagian yang akan diamati di potong dengan menggunakan *microtome* untuk kemudian dilakukan pemrosesan dan pewarnaan dengan hematosilin-eosin di Laboratorium Patologi-Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.8 Analisis Data

Hasil penelitian merupakan data parametrik yang akan diuji dengan uji statistik *T one- sample test* untuk mengetahui perbedaan matriks tulang dan osteoblas antara kelompok yang mendapatkan *DBM* dan freeze-dried *allograft* yang diberlakukan pada tiap kelompok pengamatan berdasarkan waktu. ($\alpha:0,05$). Setelah itu dilanjutkan dengan analisis variansi satu arah (*Anova oneway*) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jumlah sel-sel osteoblas dan luas matriks tulang antar waktu pengamatan pada kelompok *DBM*.

4.9 Alur Penelitian

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

Data baku hasil penelitian eksperimental tentang perbandingan pembentukan tulang baru oleh *demineralized bone matrix (DBM)* dan tulang kanselous beku kering (*freeze dried*) pada otot tikus putih yang diamati pada minggu ke-2, minggu ke-4 dan minggu ke-6 kemudian dikumpulkan dan diolah sesuai dengan tujuan dan hipotesis penelitian yang telah dibuat. Data ini merupakan hasil penghitungan jumlah rerata osteoblas dalam lima lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 400 kali menggunakan *ocular micrometer (Graticule)* yang mempunyai ketelitian sampai 0,01 mm. dan pengukuran rerata luas matriks tulang dengan menggunakan *software* komputer *Motic Images Plus 2.0*. Data baku ini kemudian disusun dan diolah dengan bantuan komputer menggunakan program pengolahan data SPSS versi 15.0.

5.1 Data Penelitian

Seluruh hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini dikelompokkan secara acak (*random sampling*) menjadi tiga kelompok, yaitu :

- P1 : Kelompok perlakuan 1 (dilakukan penanaman *DBM* pada 6 otot adduktor femur dan *allograft* kanselous beku kering pada 6 otot adduktor femur, diterminasi pada minggu kedua)
- P2 : Kelompok perlakuan 2 (dilakukan penanaman *DBM* pada 6 otot adduktor femur dan *allograft* kanselous beku kering pada 6 otot adduktor femur, diterminasi pada minggu keempat)

P3 : Kelompok perlakuan 3 (dilakukan penanaman *DBM* pada 6 otot adduktor femur dan *allograft* kanselous beku kering pada 6 otot adduktor femur, diterminasi pada minggu keenam)

Sebelum perlakuan, semua hewan coba dilakukan pengukuran berat badan dengan menggunakan timbangan *torsion balance*. Adapun data umur dan berat badan hewan coba adalah sebagai berikut :

Tabel 5.1 : Umur (bln) dan Berat Badan (g) dari tiap-tiap kelompok

Kel	No.tikus	Umur (bln)	Berat Badan (g)
1	1	3	226
	2	3	254
	3	3	240
	4	3	259
	5	3	220
	6	3	282
2	7	3	268
	8	3	220
	9	3	224
	10	3	254
	11	3	201
	12	3	205
3	13	3	225
	14	3	261
	15	3	203
	16	3	245
	17	3	245
	18	3	235

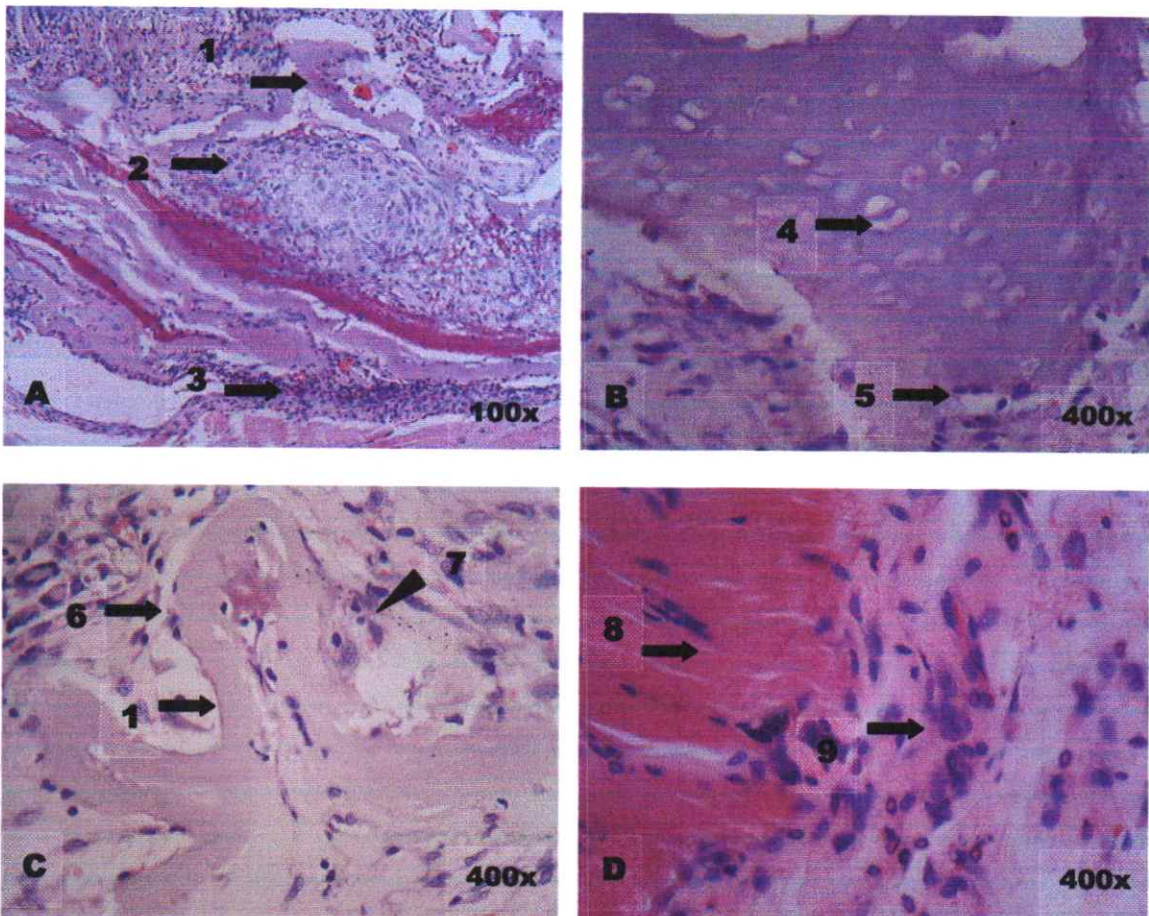
Ket: Kel 1 = minggu ke-2; Kel 2 = minggu ke-4; Kel 3 = minggu ke-6

Setelah mendapat perlakuan kemudian dilakukan *sacrifice* pada minggu ke-2 pada kelompok satu, minggu ke-4 pada kelompok dua dan minggu ke-6 pada kelompok ketiga selanjutnya bahan diamati secara mikroskopik, maka diperoleh data rerata jumlah

sel osteoblas dan rerata luas matriks tulang dalam lima lapang pandang seperti yang tercantum pada lampiran 1.

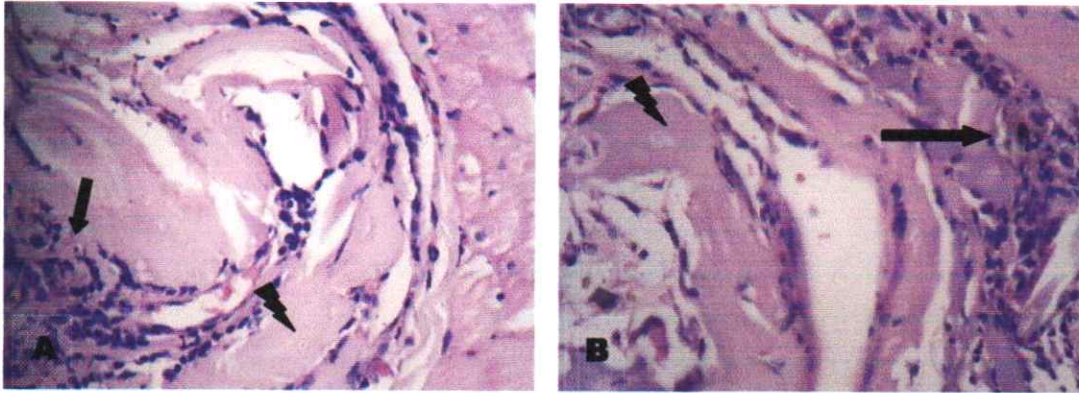
5.2 Hasil Histologi

Dari hasil pengamatan histologi pada minggu kedua tampak jelas gambaran trabekular-trabekular matriks tulang dan sel osteoblas pada kelompok DBM, sedangkan pada kelompok beku kering (*freeze dried*) tidak didapatkan bentukan matriks tulang maupun sel osteoblas sebagaimana yang tampak pada gambar di bawah ini:



Gambar 5.1 : Dua minggu setelah penanaman donor tulang. (A,B,C)Kelompok DBM (D)Kelompok beku kering (1)trabekula dari matrik tulang yang terbentuk (2)matrik kartilage dengan sel kondrosit yang mengalami hipertropi (3,9)sel mononuklear (4)lakuna kartilage/kanal nutrien (5,6)sel osteoblas sedang melakukan proses mineralisasi (7)area yang mengalami resorpsi oleh sel mononuklear (8) sel otot bergaris

Pada sediaan histologi pada minggu keempat dan keenam masih didapatkan gambaran trabekular matriks tulang dan sel osteoblas pada kelompok DBM meskipun tidak sebanyak pada waktu pengamatan minggu kedua. Pada kelompok beku kering tetap tidak ditemukan gambaran matriks tulang dan sel osteoblas.



Gambar 5.2 : (A) empat minggu setelah penanaman DBM (B) enam minggu setelah penanaman DBM, tampak area resorpsi oleh sel mononuklear yang semakin luas (anak panah), matriks tulang dengan osteositnya (anak kilat)

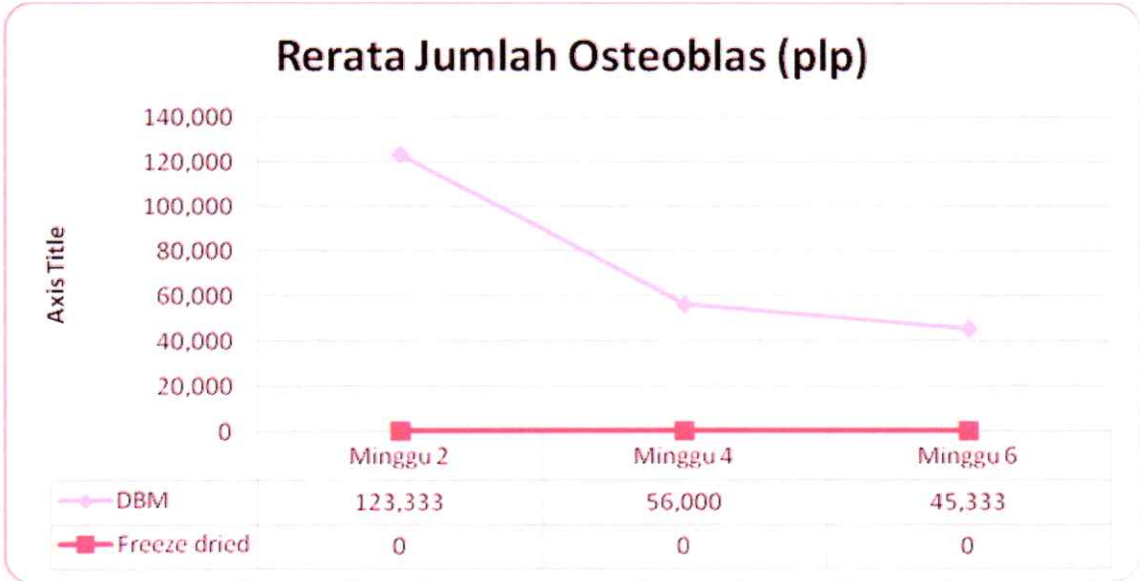
5.3 Analisis Data dan Hasil Penelitian

Dari pengamatan histologi diatas selanjutnya dilakukan pengumpulan data hasil penelitian dan 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 sel osteoblas dalam lima lapang pandang dan rerata luas matriks tulang dalam lima lapang pandang pada kelompok *demineralized bone matrix (DBM)* tampak seperti tercantum pada tabel di bawah ini:

Tabel 5.2: Statistik deskriptif jumlah osteoblas (plp) dan luas matriks tulang (mm²) kelompok *demineralized bone matrix (DBM)*

Kelompok	Data	Jumlah osteoblas (plp)	Luas matriks tulang (mm ²)
P1	Mean	12,3333	2,4500
	Std deviasi	1,91694	0,53092
	N	6	6
P2	Mean	5,6000	0,9160
	Std deviasi	5,65685	0,85830
	N	5	5
P3	Mean	4,5333	1,4200
	Std deviasi	5,68882	1,64555
	N	6	6

Dari data deskriptif diatas kemudian digambarkan dalam bentuk gambar grafik untuk lebih menjelaskan keadaan masing-masing waktu pengamatan, sebagaimana yang tampak dibawah ini:



Gambar 5.3: Rerata jumlah sel osteoblas yang dihitung dalam lima lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Terlihat pada kelompok *DBM* pada tiap waktu pengamatan (warna biru) jumlah osteoblas jauh lebih banyak dibandingkan dengan kelompok *freeze dried* (warna merah) yang tidak didapatkan sel osteoblas.



Gambar 5.4: Rerata luas matrik tulang yang dihitung dalam lima lapang pandang mikroskop dengan pembesaran 400 kali.

Terlihat pada kelompok *DBM* pada tiap waktu pengamatan (warna biru) luas matriks tulang jauh lebih luas dibandingkan dengan kelompok *freeze dried* (warna merah) yang tidak terbentuk matriks tulang.

5.4 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 jumlah sel osteoblas dan rerata luas matriks tulang kelompok *demineralized bone matrix* (DBM) dilakukan dengan menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test* menghasilkan data seperti tampak pada tabel di bawah ini :

Tabel 5.3: Hasil uji normalitas data jumlah osteoblas dan luas matriks tulang kelompok *demineralized bone matrix (DBM)*

Kelompok	p Osteoblas	p Matrik tulang
P1	0,979	0,964
P2	0,994	0,798
P3	0,705	0,628

Dari hasil *Kolmogorov-Smirnov test* seperti yang tercantum pada tabel di atas, menunjukkan bahwa jumlah sel-sel osteoblas dan luas matriks tulang dari tiap-tiap kelompok yang diuji berdistribusi normal. Hal ini terlihat dari besarnya nilai p dari tiap-tiap kelompok $>0,05$.

5.5 Hasil Uji Beda Variabel Jumlah Osteoblas dan Luas Matrik Tulang

Untuk melihat perbedaan jumlah osteoblas antara kelompok *demineralized bone matrix (DBM)* dan kelompok *freeze dried (FD)* pada tiap waktu pengamatan seharusnya menggunakan uji *T two-sample test* pada masing-masing kelompok sampel tetapi karena pada kelompok *freeze dried* tidak ditemukan osteoblas (jumlah osteoblas = 0) maupun bentukan matriks tulang (luas matriks tulang = 0 mm²) maka digunakan uji *T one-sample test one tailed*. Uji ini dilakukan dengan cara membandingkan rata-rata jumlah sel osteoblas dalam kelompok DBM dengan suatu nilai standar tertentu atau nol. Pada pengujian menggunakan *T one-sample test* dengan *test value* sama dengan nol maka didapatkan hasil pengamatan jumlah osteoblas dengan menggunakan *p one tailed* seperti tampak pada tabel di bawah ini :

Tabel 5.4: Perbandingan jumlah osteoblas antara kelompok DBM dengan kelompok *freze dried*

Waktu Pengamatan	Jenis Allograf	N	$\bar{x}$	SD	t-test (one sample)
Minggu ke-2	DBM	6	12,33	1,92	t= 15,76
	FD	6	0	-	P one tailed = 0,0000
Minggu ke-4	DBM	5	5,60	5,66	t= 2,21
	FD	5	0	-	P one tailed = 0,004565
Minggu ke-6	DBM	6	4,53	5,69	t= 1,95
	FD	6	0	-	P one tailed = 0,0542

Hasil uji statistik dengan menggunakan uji *T one-sample test* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok *demineralized bone matrix (DBM)* dan kelompok *freeze dried (FD)* pada minggu ke-2, ke-4 dan ke-6 dengan nilai $p \leq 0,05$.

Dari rata-rata jumlah sel-sel osteoblas yang ditemukan pada tiap waktu pengamatan kelompok *demineralized bone matrix (DBM)*, tampak paling banyak pada minggu ke-2 (P1) selanjutnya pada minggu ke-4 (P2) dan minggu ke-6 (P3) masih didapatkan sel-sel osteoblas tetapi menunjukkan penurunan dibandingkan dengan minggu ke-2 (P1).

Luas matriks tulang pada kelompok DBM setelah dilakukan uji dengan *T one-sample tes one tailed* didapatkan hasil seperti tampak pada tabel di bawah ini:

Tabel 5.5: Perbandingan luas matriks tulang antara kelompok DBM dengan kelompok *freeze dried*

Waktu Pengamatan	Jenis Allograf	N	$\bar{x}$	SD	t-test (one sample)
Minggu ke-2	DBM	6	2,45	0,53	t= 11,30
	FD	6	0	-	P one tailed = 0,00005
Minggu ke-4	DBM	5	0,92	0,86	t= 2,39
	FD	5	0	-	P one tailed = 0,0377
Minggu ke-6	DBM	6	1,42	1,65	t= 2,11
	FD	6	0	-	P one tailed = 0,0441

Hasil uji statistik dengan menggunakan uji *T one-sample test* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok *demineralized bone matrix (DBM)* dan kelompok *freeze dried (FD)* pada minggu ke-2, ke-4 dan ke-6 dengan nilai $p \leq 0,05$.

Dari rata-rata luas matriks tulang yang ditemukan pada tiap waktu pengamatan kelompok *demineralized bone matrix (DBM)*, tampak paling banyak pada minggu ke-2 (P1) selanjutnya menurun pada minggu ke-4 (P2) akan tetapi pada minggu ke-6 (P3) didapatkan luas matriks tulang lebih banyak daripada yang didapatkan pada kelompok minggu ke-4 (P2).

Selanjutnya dilakukan uji statistik untuk mengetahui perbedaan yang terjadi pada kelompok DBM antar kelompok waktu pengamatan terhadap kedua variabel tergantung dengan analisis variansi satu arah (*Oneway Anova*).

5.6 Perbandingan Jumlah Osteoblas & Luas Matriks Tulang Antara Minggu ke-2, 4 dan 6 Pada Kelompok DBM

Analisis variansi satu arah (*Oneway Anova*) ditujukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan jumlah sel-sel osteoblas dan luas matriks tulang minimal antar waktu pengamatan pada kelompok DBM. Hasil analisis variansi satu arah untuk jumlah sel-sel osteoblas tampak seperti yang tercantum pada tabel dibawah ini :

Tabel 5.6 : Perbandingan Jumlah Osteoblas antara minggu ke-2, 4, dan 6 pada kelompok DBM

Minggu	N	Jumlah Osteoblas				Uji Statistik (<i>Oneway Anova</i>)
		Rerata	SD	Min	Maks	
2	6	12,33	1,92	10,40	14,80	F=4,789 p=0,026*
4	5	5,60	5,66	0,00	14,40	
6	6	4,53	5,69	0,00	14,00	

Keterangan : * signifikan pada $\alpha=0,05$

Hasil analisis dengan *Oneway Anova* menunjukkan adanya perbedaan jumlah sel-sel osteoblas minimal antar sepasang waktu pengamatan. Analisis lanjut dengan LSD (*Least Significance difference*) didapatkan perbedaan yang terjadi antara minggu ke-2 dengan minggu ke-4, dan antara minggu ke-2 dengan minggu ke-6. Tidak ada perbedaan jumlah osteoblas antara minggu ke-4 dengan minggu ke-6.

Sedangkan hasil penghitungan dengan uji statistik *Oneway Anova* terhadap variabel luas matriks tulang kami dapatkan sebagai berikut :

Tabel 5.7: Perbandingan luas matriks tulang antara minggu ke-2, 4, dan 6 pada kelompok DBM

Minggu	N	Luas Matriks				Uji Statistik (Brown-Forsythe)
		Rerata	SD	Min	Maks	
2	6	2,45	0,53	1,76	3,20	Statistic=2,790 p=0,116
4	5	,92	0,86	0,00	2,28	
6	6	1,42	1,65	0,00	3,82	

Hasil analisis dengan *Oneway Anova* menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna luas matriks tulang antara minggu ke-2, ke-4 dan ke-6.

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.

6.1 Metodologi Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan *allograft demineralized bone matrix (DBM)* dapat merangsang pembentukan tulang baru lebih baik dibandingkan dengan allograft kancellus beku kering (*freeze dried*). Bentuk penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, sebanyak 18 ekor hewan coba dibagi dalam 3 (tiga) kelompok waktu pengamatan yang dipilih secara acak (randomisasi). Randomisasi sampel merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi oleh suatu penelitian eksperimental murni (*true eksperimental*) disamping kontrol terhadap variabel perancu (Notoatmojo, 2002).

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *The Post-test only Control Group Design*, karena pengaruh perlakuan (intervensi) yaitu ditanami *allograft demineralized bone matrix (DBM)* terhadap kelompok perlakuan diukur pada akhir penelitian yang selanjutnya dibandingkan dengan data dari kelompok yang ditanami tulang kancellous beku kering sebagai 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.

6.2 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang dipakai pada penelitian ini adalah *Rattus norvegicus* jantan dengan usia sekitar 50-60 hari dan berat badan sekitar 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 50-60 hari berat badannya dapat mencapai 200-300 gram. Pada usia ini *Rattus norvegicus* digolongkan dalam usia dewasa muda dimana pada usia tersebut mereka tahan terhadap penyakit serta cepat merespon penyembuhan luka (Malole, 1989). Sedangkan dipilih yang jantan dengan alasan agar penelitian ini tidak terpengaruh oleh hormone estrogen yang akan mempengaruhi kerja osteoblas melalui reseptor-reseptornya. (Bostrom dkk, 1999)

Sesuai dengan rumus dari Federer (1955) tentang besar sampel, maka didapatkan jumlah sampel minimal sebesar 4 ekor. Namun dalam penelitian ini kemungkinan bisa terjadi kesalahan yang menyebabkan hewan coba mati atau terjadi kesalahan sewaktu proses akhir pemeriksaan (f) sekitar 20% maka besar sampel dikoreksi dengan menggunakan rumus Higgins dan Kleinbaum (1985) didapatkan 5 ekor. Karena dalam percobaan ini menggunakan bagian paha tikus yang satu sisi akan ditanami dengan DBM sedangkan sisi yang lain dengan donor tulang beku kering maka untuk memudahkan dibulatkan menjadi 6 ekor. Jumlah sampel keseluruhan sebanyak 18 ekor yang terbagi menjadi 3 (tiga) kelompok, sehingga tiap kelompok terdiri dari 6 ekor hewan coba.

Sampai dengan selesainya penelitian didapatkan satu hewan coba mati pada kelompok pengamatan minggu ke-4 karena infeksi pada lukanya. Walaupun demikian besar sampel yang dipakai untuk penelitian ini masih memenuhi kriteria jumlah sampel minimal.

Semua hewan coba sebelum dikelompokkan secara acak memiliki umur dan berat badan yang hampir sama (tabel 5.1) sehingga memenuhi unsur homogen.

6.3 Pembuatan Bahan Donor Tulang

Sebelum penelitian, terlebih dahulu dilakukan pembuatan sediaan *demineralized bone matrix (DBM)* dan *allograft* kanselous beku kering. Oleh karena penelitian ini menggunakan konsep donor tulang *allograft* dimana jaringan ditransplantasikan dari individu yang memiliki spesies sama maka penelitian ini menggunakan tulang tikus sejenis untuk diolah menjadi bahan baku donor tulang yang akan ditanam pada hewan coba.

Prosedur seleksi donor dan pengolahannya menggunakan prosedur standar yang biasa dikerjakan oleh pusat biomaterial bank jaringan RS Dr Soetomo Surabaya kemudian bahan akan dikirim ke BATAN Research Tissue Bank (BRTB) untuk dilakukan sterilisasi dengan sinar gamma. Tahap-tahap pengolahan donor tulang meliputi proses seleksi donor, pengambilan jaringan donor, karantina dan prosesing di bank jaringan sesuai dengan jenis donor yang diharapkan (lampiran 5).

Pada penelitian ini, untuk membuat donor tulang *demineralized bone matrix (DBM)* menggunakan formula yang dikenalkan oleh Marshal R Urist (1975) yang diuraikan lebih detail oleh C.J. Yim (1999). Secara prinsip dalam pembuatan donor tulang ini meliputi tahap-tahap sebagai berikut, bahan donor berupa tulang dicuci dengan

methanol atau khloroform tanpa melalui proses pasteurisasi kemudian dilakukan demineralisasi dengan cairan HCL selanjutnya dilakukan pengeringan dengan tehnik lyophilisasi (lampiran 5).

Pada pembuatan bahan donor tulang ini tidak boleh dilakukan proses pasteurisasi agar protein dan enzim BMP's yang berperan pada proses osteoinduksi didalamnya tidak rusak (lampiran 10). Kelemahan tehnik ini adalah adanya kesulitan untuk memisahkan dan membersihkan sisa-sisa *soft tissue* yang masih melekat di tulang dan membutuhkan waktu pemrosesan yang lebih lama agar bersih.

Sedangkan pada proses pembuatan donor tulang kanselous beku kering (*freeze dried*), melalui tahap-tahap berikut, setelah bahan donor dicuci selanjutnya dilakukan pasteurisasi agar *soft tissue* yang masih melekat dapat terlepas dari tulangnya (lampiran 12). Setelah itu baru dapat dilakukan pengeringan dengan tehnik lyophilisasi. Pada pengolahan jenis donor ini tampak lebih sederhana, cepat dan tidak memerlukan waktu yang lama untuk menjadi bahan donor yang siap digunakan. Namun dengan adanya tahap pasteurisasi maka protein BMP's mengalami kerusakan sehingga hanya menyisakan matriks tulangnya saja. Dengan demikian kemampuan donor jenis ini hanya sebagai osteokonduksi. Hal ini terbukti pada kelompok kontrol tidak didapatkan bentukan sel-sel osteoblas dan matriks tulang.

6.4 Perlakuan Hewan Coba

Donor tulang dapat bekerja melalui tiga prinsip mekanisme yaitu: osteogenesis, osteoinduksi dan osteokonduksi. Seperti yang diuraikan sebelumnya bahwa *demineralized bone matrix (DBM)* memiliki kemampuan membentuk tulang baru melalui dua

mekanisme yaitu osteokonduksi dan osteoinduksi. Hal ini terjadi karena di dalam DBM masih terkandung komponen aktif berupa protein yang disebut *bone morphogenetic proteins (BMP's)*.

Seperti yang telah ditunjukkan oleh Urist dan Yim, untuk mengisolasi kemampuan osteoinduksi dari donor tulang *demineralized bone matrix (DBM)*, maka bahan donor ini ditanam di otot tikus dengan harapan mampu merangsang osteogenesis *heterotopic*. Pada penelitian ini dipilih otot paha tikus oleh karena merupakan otot yang mempunyai lapisan-lapisan otot paling tebal. Sehingga dengan demikian, selain diharapkan lebih memudahkan dalam menanamkan bahan donor juga diharapkan mempunyai kandungan sel mesenkimal yang lebih banyak (lampran 6 dan 8).

Hewan coba dari masing-masing kelompok pengamatan kemudian dibagi menjadi dua kelompok perlakuan. Masing-masing hewan coba mendapat donor tulang berupa butiran-butiran kasar (*granule*) dengan jumlah yang hampir sama. Setelah mendapat perlakuan semua hewan coba dirawat sesuai dengan prosedur perawatan dan dipelihara di dalam kandang khusus.

Pada penelitian ini pengamatan dilakukan pada minggu ke-2, ke-4 dan ke-6 dan diharapkan telah terjadi pembentukan tulang baru melalui mekanisme osifikasi endokondral (Lomas dan Kearney, 1997). Berdasarkan hasil penelitian terdahulu mendapatkan bahwa pada minggu ke-2 setelah penanaman donor tulang akan mulai didapatkan gambaran osteoblas dan proses pembentukan tulang baru (Zipfel dkk, 2003). Hal ini terbukti secara histologi didapatkan gambaran kartilage yang mulai diserap dan digantikan tulang, tampak sel-sel kondrosit mulai membesar dan matang (*mature*) dan tampak osteoblas berjajar ditepi matriks kartilage. Pada minggu ke-4 diharapkan telah

terbentuk tulang baru dan mulai tampak diferensiasi sumsum tulang (Zipfel dkk, 2003). Hal ini terbukti secara histologi gambaran kartilage yang terserap mulai banyak, adanya osteoblas, osteoklas yang sedang melakukan proses remodeling disertai adanya gambaran sumsum tulang dan eritrosit yang berjajar. Akan tetapi hasil yang didapat tidak konsisten diantara preparat histologi yang diamati. Begitu juga hasil yang didapat pada minggu ke-6 yang diharapkan proses remodeling telah selesai dengan ditandai gambaran kartilage yang sudah menghilang dan digantikan matriks tulang yang luas dengan sel-sel osteoblas dan osteositnya. Tampak gambaran kartilage masih ada pada beberapa preparat histologi, sel-sel kondroblasnya tampak membesar (hipertropi) dan didapatkan matriks tulang walaupun tidak lebih luas daripada pengamatan minggu ke-4.

Keadaan ini kemungkinan disebabkan karena beberapa faktor yang dapat mempengaruhi ossifikasi secara endokondral antara lain keadaan nutrisi, hormonal dan respon terhadap stress fisik (pembebanan) (Salter, 1999). Faktor ini didasari karena bahan donor ditanam didalam otot yang bukan merupakan area pembebanan secara fisiologis sehingga kemungkinan faktor ini yang menyebabkan hambatan ossifikasi yang terjadi. Selain itu karena pengamatan dilakukan pada hewan coba yang berbeda ada kemungkinan didapatkan faktor-faktor pengganggu selama proses pemeliharaan, pengambilan bahan histologi maupun pada saat pembuatan preparat histologinya. Selama dalam pengamatan didapatkan satu hewan coba mengalami infeksi dan mati dari kelompok minggu ke-4.

6.5 Pembuatan Sediaan Histologi

Setelah perlakuan penanaman donor tulang selesai dilaksanakan, maka hewan coba *disacrifice* untuk kemudian dilakukan pembuatan sediaan histologi dari otot adduktor paha di laboratorium patologi anatomi. Pemotongan sediaan dilakukan dengan *microtome* dengan arah melintang dari otot *Rattus norvegicus* yang telah dipotong. Selanjutnya sediaan diwarnai dengan hematosilin-eosin (HE) dan dibaca secara mikroskopik dengan pembesaran 400x (lampiran 7).

Sediaan histologi dibuat untuk menghitung jumlah osteoblas yang terdapat pada satu lapangan pandang mikroskop cahaya memakai pembesaran 400x, dilakukan penghitungan terhadap 5 lapang pandang. Hasil dari 5 kali pengamatan ini kemudian dijumlahkan dan diambil nilai rata-ratanya. Selain itu juga dilakukan penghitungan luas matriks tulang dengan alat *graticule* dengan cara yang sama. Semua sediaan baik DBM maupun beku kering (*freeze dried*) diperlakukan sama. Pengamatan dilakukan secara bersama-sama oleh peneliti dengan dipandu oleh pembimbing seorang spesialis patologi anatomi. Sebelum dilakukan analisis secara statistik hasil pengamatan histologi dimintakan pendapat kedua kepada ahli patologi lainnya dalam bidang muskuloskeletal.

Secara histologi didapatkan perbedaan yang jelas pada pembentukan tulang baru melalui mekanisme ossifikasi endokondral antara sediaan DBM dan beku kering (*freeze dried*). Pada sediaan DBM didapatkan sel-sel osteoblas dan bentukan matriks tulang pada semua waktu pengamatan sedangkan pada sediaan beku kering tidak didapatkan gambaran tersebut.

6.6 Pembahasan Hasil Penelitian

Hasil penelitian yang didapat kemudian diolah dan dianalisa dengan metode statistika kemudian diinterpretasikan lebih lanjut sehingga dapat menjawab tujuan dan hipotesis yang dibuat.

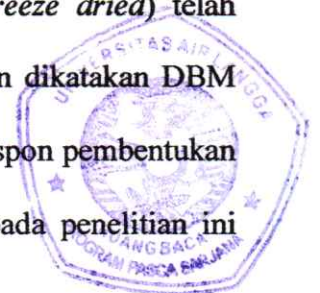
6.6.1 Uji normalitas

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. Seharusnya uji normalitas dilakukan terhadap variabel tergantung, yaitu: jumlah osteoblas dan luas matriks tulang baik dari kelompok DBM maupun beku kering (*freeze dried*). Namun karena hasil yang didapat pada kelompok beku kering adalah nol maka hanya data dari kelompok DBM yang diuji normalitasnya.

Dari hasil uji normalitas yang dilakukan menggunakan *Kolmogorov Smirnov Tests* terhadap kedua variabel tersebut diatas pada kelompok DBM diperoleh nilai $p > 0,05$ (Tabel 5.3). Hal ini berarti bahwa data kedua variabel tersebut adalah normal (Santoso, 2005), sehingga persyaratan uji statistik parametrik telah terpenuhi.

6.6.2 Perbandingan pembentukan tulang baru

Demineralized bone matrix (DBM) maupun beku kering (*freeze dried*) telah digunakan secara luas sebagai donor tulang. Pada beberapa penelitian dikatakan DBM lebih superior daripada *freeze dried* (CJ Yim, 1999). Untuk melihat respon pembentukan tulang baru sebenarnya dapat dilihat melalui banyak cara, namun pada penelitian ini



evaluasi dilakukan secara histologi dengan melihat dua variabel, yaitu: jumlah sel-sel osteoblas dan luas matriks tulang yang terbentuk pada dua kelompok perlakuan.

Dari data hasil penelitian didapatkan pembentukan matriks tulang baru disertai adanya sel-sel osteoblas pada kelompok *Demineralized bone matrix (DBM)* melalui proses ossifikasi endokondral. Sedangkan pada kelompok beku kering (*freeze dried*) tidak didapatkan bentukan matriks tulang baru maupun sel-sel osteoblas.

Dari hasil penghitungan dengan uji *T one-sample test* dengan *p one tailed* didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok *demineralized bone matrix (DBM)* dan kelompok *Freeze dried (FD)* pada waktu pengamatan minggu ke-2 (P_1) ($p < 0,05$).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Reddi AH dkk (1987) proses pembentukan tulang baru dari perekrutan sel-sel mesenkimal sampai terbentuk sumsum tulang melalui beberapa fase dan membutuhkan waktu sekitar 2-3 minggu (tabel 2.2). Hal ini sesuai dengan yang didapatkan pada penelitian ini yaitu gambaran matriks kartilage yang mulai membesar (hipertropi) disertai mulai munculnya sel-sel osteoblas dari tepi yang akan mengisi rongga-rongga matriks kartilage yang mulai kosong.

Begitu juga pada kelompok waktu pengamatan minggu ke-4 dan ke-6 didapatkan perbedaan yang bermakna antara kelompok DBM dan beku kering dengan nilai *p onetailed* $\leq 0,05$. Masih didapatkan bentukan sel-sel osteoblas dan matriks tulang pada beberapa preparat dari kelompok DBM, secara histologi didapatkan jaringan kartilage mulai menghilang secara bertahap, meningkatnya area resorpsi dan meningkatnya pembentukan matriks tulang baru disertai adanya jaringan myeloid (Hamata dkk, 2004).

Pada penelitian ini masih didapatkan sel-sel osteoblas dan pembentukan matriks tulang baru tetapi matriks tulang yang terbentuk tidak lebih luas dari kelompok minggu ke-2.

Untuk melihat perbedaan pembentukan matriks tulang dan sel-sel osteoblas antar waktu pengamatan minggu ke-2, ke-4 dan ke-6 digunakan analisis variansi satu arah (*Oneway Anova*). Hasil uji statistik terhadap luas matriks tulang menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$) dengan nilai $p = 0,116$ pada ketiga waktu pengamatan.

Pada hasil uji statistik dengan menggunakan *least significance difference* terhadap jumlah sel-sel osteoblas di kelompok DBM pada minggu ke-2 terhadap minggu ke-4 menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai $p = 0,033$ dan pada minggu ke-2 dan ke-6 dengan nilai $p = 0,012$ ($p \leq 0.05$). Sedangkan di kelompok DBM pada minggu ke-4 dan ke-6 menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai $p = 0,713$ ($p > 0,05$).

Penurunan volum matriks tulang diatas dapat disebabkan oleh beberapa faktor sebagaimana telah diuraikan oleh Urist bahwa kemampuan osteoinduksi dari donor tulang DBM dapat dikelompokkan menjadi dua kategori yaitu yang berhubungan dengan donor dan yang berhubungan dengan pemrosesannya. Faktor yang berhubungan dengan donor antara lain umur donor dan waktu antara setelah kematian (*post mortem*) dengan pengambilan bahan donor. Pada percobaan ini menggunakan bahan donor dari tikus sejenis dengan umur dan berat badan yang hampir sama dan bahan donor diambil segera setelah tikus di *sacrifice*.

Kemungkinan lain yang berperan adalah ukuran partikel dari bahan donor. Urist (1979) menemukan semakin kecil ukuran partikel semakin berkurang kemampuan osteoinduksinya karena rentan terjadi phagositosis oleh sel-sel mononuklear.

Faktor lain yang bisa berperan adalah proses pengambilan jaringan dan pemotongan histologi karena sangat menentukan kuantitas dari matriks tulang yang akan diamati. Hal ini bisa terjadi disebabkan oleh karena induksi tulang yang ditanam pada jaringan otot tikus terbatas hanya pada lokasi penanaman donor tulang. Dengan demikian kuantitas dari matriks kartilage, matriks tulang dan jaringan myeloid yang terbentuk tergantung pada volume matriks dan kondisi lingkungan mikro tempat donor tulang ditanam (Hamata dkk, 2004).

Selain itu bisa terjadi oleh karena bahan donor tulang tidak ditanam pada area yang fisiologis sehingga tidak mengalami proses remodeling tulang yang akan berakhir dengan proses penyerapan kembali secara spontan oleh jaringan (Salter, 1999).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Allograft demineralized bone matrix (DBM) dapat merangsang pembentukan tulang baru lebih baik dibandingkan dengan *allograft* kancellous beku kering (*freeze dried*) melalui mekanisme osteoinduksi.

7.2 Saran

1. Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang metode pengolahan *demineralized bone matrix (DBM)* yang lebih efektif dan efisien
2. Perlu penelitian lebih lanjut tentang mekanisme dan tahap-tahap osteoinduksi dari *demineralized bone matrix* baik secara imunohistokimia maupun radiologis
3. Perlu penelitian lebih lanjut penggunaan secara klinis untuk melihat kecepatan dan efektifitas pembentukan tulang baru oleh *demineralized bone matrix (DBM)*

DAFTAR PUSTAKA

- American Academy of Orthopaedics Surgeons, 2003. **Bone Graft Substitutes : Facts, Fictions & Applications**. 70th Annual Meeting. February 5-9, 2003. New Orleans Louisiana. Published in J. Bone Joint Surgery Am 83 (suppl 2.) p98-102. 2001, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 14 January 2008.
- Altundal H, Sayrak H, 2005. **Effect of Demineralized Bone Matrix on Resorption of Autogenous Cortical Bone Graft in Rats**. Turk J Med Sci 35: 209-216. available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 30 August 2007.
- Babak S, 2000. **Bone Healing . Treatment and Rehabilitation of Fractures**. Edited by Hoppenfeld S and Murthy VL. Lippincott Williams & Wilkins, p2-3.
- Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JF, Kransdorf MJ, Menke DM, DeOrion JK, 2006. **Imaging Characteristics of Bone graft Materials**. Education Exhibit. Radiographics 26:373-88, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 1 August 2008
- Bolander ME dan Balian G, 1986. **The use of demineralized bone matrix in the repair of segmental defects**. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous bone graft. J. Bone Joint Surg. Am. 68:1264-74, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 12 March 2007.
- Bostrom M, Beskey A, Kaufman J, Einhorn T, 1999. **Form and Function of Bone**. Orthopaedic Basic Science. Biology and Biomechanics of The Musculoskeletal System. 2nd edit.p327

- Brown KLB and Cruess RL, 1982. Bone and Cartilage Transplantation in Orthopaedic Surgery. A review. The Journal of Bone and Joint Surgery. Vol 64-A No 2 February, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 1 January 2008
- DeCoster TA, Gehlert RJ, Mikola EA, Pirela-Cruz A, 2004. Management of Posttraumatic Segmental Bone Defects. J Am Acad Orthop Surg, Vol 12, No 1, January/February. 28-38, available at <http://www.jaaos.org/dbm>, cited on 13 march 2008
- De Long WG, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders r, 2007. Bone Grafts and Bone Graft Substitutes in Orthopaedic Trauma Surgery. A Critical Analysis. JBJS F.00465. 89: 649-58, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 1 August 2008
- Delloye Ch, 1999. The use of freeze-dried mineralized and demineralised bone. Advances in tissue banking vol 3. World scientific publishing. P45-61.
- Depaula, 2005. Effect of hydrogen peroxide cleaning procedures on bone graft osteoinductivity and mechanical properties. Musculoskeletal transplant foundation, edison USA, University of medicine and dentistry of new jersey.
- Kusumawati D, 2003. Bahan ajar tentang hewan coba. Fakultas kedokteran hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR and Vigorita VJ, 1984. The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. J. Bone Joint Surg. Am. 66:274-79, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 21 June 2007.

- Ferdiansyah, 2007. Use of freeze-dried irradiated bones in orthopaedic surgery. Radiation in tissue banking. Basic science and clinical applications of irradiated tissue allografts. Published by world scientific publishing. P317-325
- Finkemeier CG, 2002. Bone grafting and Bone graft Substitutes. J.Bone Joint Surg. 84:454-64, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 21 June 2007
- Goldberg VM, 2005. Biology of Bone grafts. Bone Regeneration and Repaired, Biology and Clinical Application. Human Pers New Jersey.
- Groeneveld EHJ dan Burger EH, 2000. Review Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. European Journal of Endocrinology 142 : 9-21
- Hamata MM, Yunomae A, Cestari TM, Francisco de Assis G dan Taga R, 2004. A Stereological analysis of the heterotopic osteogenesis induced by allogenic bone matrix graft in rat subcutaneous tissue. Laboratory of histology, Department of Biological Sciences, Bauru School of entity university of Sao Paulo Brazil. Brazil J morphol Sci 21(2):81-88
- Karma MB, 2005. Porous hydroxyapatite sebagai pengganti donor tulang biokompatibilitas dan biodegradasi. Penelitian tesis, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Kearney JN dan Lomas RJ, 1997. Principles of freeze drying. Advances in tissue banking vol 3. World scientific publishing. P243-60.
- Laporan tahunan bank jaringan Rumah Sakit Dr Soetomo Surabaya Jawa Timur Indonesia, 2006
- Malole MBM, Pramono CSU. 1989. Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium : Penggunaan Tikus (Rat) di laboratorium. pp.104-12.

- Malay DS, 2005. A Closer Look At Bone Graft Substitutes. Podiatry Today - ISSN: 1045-7860 - Volume 18 - Issue 1 - January 2005 - Pages: 28 - 34
- Manolagas SC dan Jilka RL, 1995. Bone marrow, Cytokines and Bone Remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of Osteoporosis. The New England Journal of Medicine. Feb.2. Vol. 332 No.5, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 20 January 2008
- Matsumine, A, et al, 2004. Calsium Hydroxyapatite Ceramic Implants in Bone Tumor Surgery. A. Long Term follow-up Study. The journal of bone & joint surgery (BR), January: 86-B 719-25.
- Myers P and Darmitage, 2004. Rattus norvegicus. http://animaldiversity.ummz.umichh.edu/site/accounts/information/rattus_norvegicus.html. accessed September 13, 2009.
- North American Spine Society, 2006. The Brochure for general information and understanding. North American spine society Public education Series. www.spine.org disclaimer, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 12 January 2008
- Paget G, Barnes JM. 1964. Toxicity Test. In : Laurence DR, Bacharach AL. Evaluation Drug Activities: Pharmacometries. Vol.1. London : Academic Press, p.161
- Pilitsis JG, Lucas DE, Rengachary SE, 2002. Bone healing and spinal fusion. *Department of Neurosurgery, Wayne State University, Detroit, Michigan* Neurosurg Focus 13 (6):Article 1, 2002.
- Salter, RB, 1999. Textbook of Disorders and Injuries of the Musculoskeletal system. Third Edition USA.

- Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Harman HJ, 2005. Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J. Bone Joint Surg. Am.* 87:1367-78
- Vaugan & kay, 2007. Proportional Osteoinduction of Demineralized Bone Matrix Donor tulang Materials, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 18 July 2007
- Willemer HM, 1997. Principles of freeze drying. *Advances in tissue banking vol 3.* World scientific publishing. P227-40.
- Wolfe MW, Salked SL, Cook SD, 1999. Bone Morphogenetic Proteins in the Treatment of Non-unions and Bone Defects: Historical Perspective and Current Knowledge. *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal.* 12: 1-6.
- Rodgers WB, 2005. Bone Marrow Aspirated and Demineralized Bone Matrix Composite: Synergistic Bone Healing, W.B.Rodgers, available at <http://www.wmt.com/dbm>, cited on Download 17 Juli 2007
- Yaedu RFY, Heterotopic osteogenesis induced by implantation of allogenic bone matrix donor tulang to mouse muscle perimysium. A morphometric study. *Cienc Odontol Bras* 2004 jan./mar.; 7 (1): 21-30, available at <http://www.jbjs.org/dbm>, cited on 30 August 2007
- Yim, CJ, 1999. Biology of demineralised bone and its clinical use. *Advances in tissue banking vol 3.* World scientific publishing. P87-102.
- Zhang, M., Powers, R., and Wolfenbarger, L., A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix, *J. Periodontol.*, 68:1076-1084, 1997.

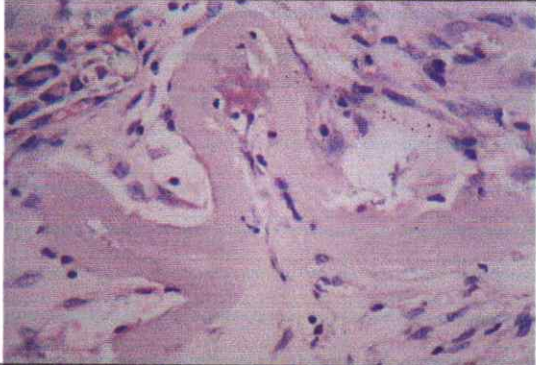
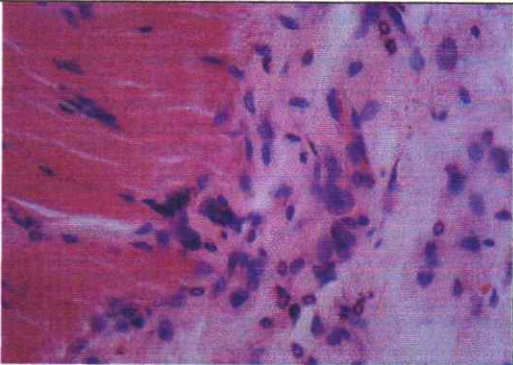
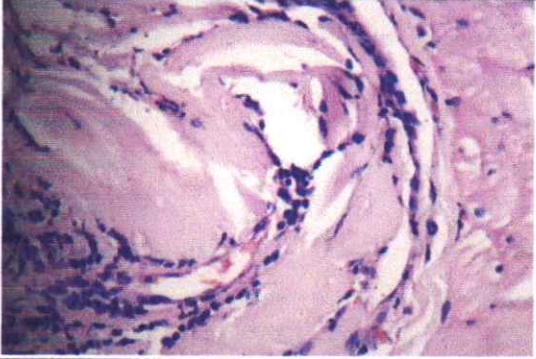
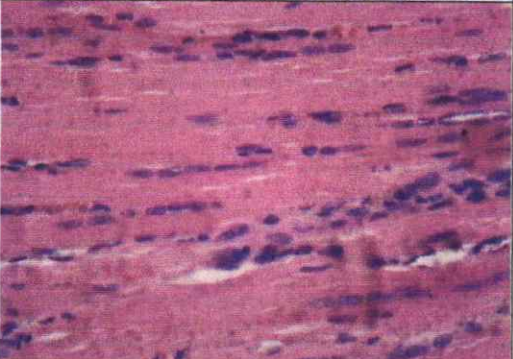
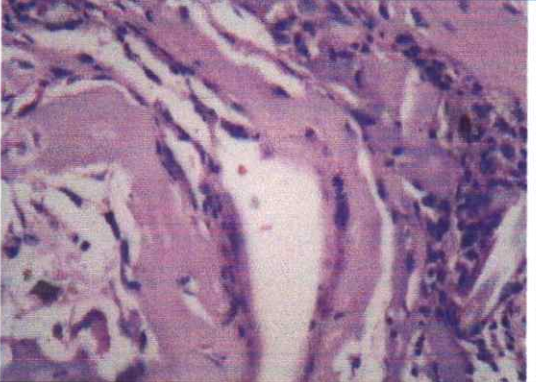
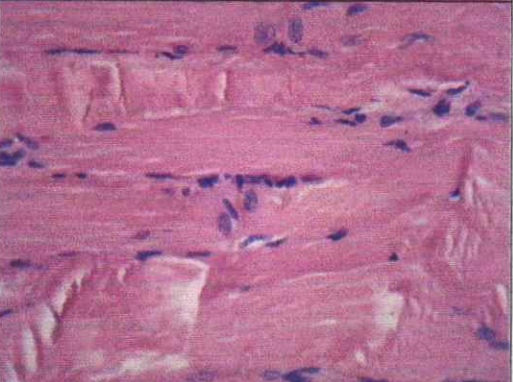
Zipfel GJ, Guiot B, Fessler RG, 2003. Bone grafting. *Neurosurgery Focus of Department of Neurosurgery, University of Florida, Gainesville, Florida* 14 (2):Article 8.

Lampiran 1. Data Hasil Penelitian

PENGAMATAN HISTOLOGI								
MINGGU	JUMLAH OSTEOLAST							
	KODE	I	II	III	IV	V	Jumlah	Rata-rata
M-2	I DD	12	8	18	10	10	58	11,6
	I SF	0	0	0	0	0	0	0
	2 DD	15	15	8	14	10	62	12,4
	2 SF	0	0	0	0	0	0	0
	3 DD	12	10	8	14	8	52	10,4
	3 SF	0	0	0	0	0	0	0
	4 DF	0	0	0	0	0	0	0
	4 SD	22	16	16	8	10	72	14,4
	5 DF	0	0	0	0	0	0	0
	5 SD	20	12	8	18	16	74	14,8
	6 DF	0	0	0	0	0	0	0
	6 SD	10	8	12	12	10	52	10,4
M-4	7 DD	8	0	0	0	0	8	1,6
	7 SF	0	0	0	0	0	0	0
	8 DD	0	0	0	0	0	0	0
	8 SF	0	0	0	0	0	0	0
	9 DD	-	-	-	-	-	-	-
	9 SF	-	-	-	-	-	-	-
	10 DF	0	0	0	0	0	0	0
	10 SD	18	6	0	0	0	24	4,8
	11 DF	0	0	0	0	0	0	0
	11 SD	-	-	12	16	8	36	7,2
	12 DF	0	0	0	0	0	0	0
	12 SD	12	18	16	14	12	72	14,4
M-6	13 DD	0	0	0	0	0	0	0
	13 SF	0	0	0	0	0	0	0
	14 DD	8	16	20	8	18	70	14
	14 SF	0	0	0	0	0	0	0
	15 DD	0	0	0	0	0	0	0
	15 SF	0	0	0	0	0	0	0
	16 DF	0	0	0	0	0	0	0
	16 SD	4	6	6	8	4	28	5,6
	17 DF	0	0	0	0	0	0	0
	17 SD	8	8	8	6	8	38	7,6
	18 DF	0	0	0	0	0	0	0
	18 SD	0	0	0	0	0	0	0

PENGAMATAN HISTOLOGI								
MINGGU	LUAS MATRIKS							
	KODE	I	II	III	IV	V	Jumlah	Rata-rata
M-2	1 DD	1,7	2,5	2,6	1,5	3,7	12	2,4
	1 SF	0	0	0	0	0	0	0
	2 DD	2,6	3,3	2,6	4,3	1,9	14,7	2,94
	2 SF	0	0	0	0	0	0	0
	3 DD	1,9	1,9	1,9	1,5	1,6	8,8	1,76
	3 SF	0	0	0	0	0	0	0
	4 DF	0	0	0	0	0	0	0
	4 SD	4,5	2,9	2,1	3	3,5	16	3,2
	5 DF	0	0	0	0	0	0	0
	5 SD	1,8	1,8	4	1,2	2,4	11,2	2,24
	6 DF	0	0	0	0	0	0	0
	6 SD	2,1	2,4	2,4	1,9	2	10,8	2,16
M-4	7 DD	2,1	0	0	0	0	2,1	0,42
	7 SF	0	0	0	0	0	0	0
	8 DD	0	0	0	0	0	0	0
	8 SF	0	0	0	0	0	0	0
	9 DD	-	-	-	-	-	-	-
	9 SF	-	-	-	-	-	-	-
	10 DF	0	0	0	0	0	0	0
	10 SD	2,1	2,6	0	0	0	4,7	0,94
	11 DF	0	0	0	0	0	0	0
	11 SD	0	0	1,7	1,8	1,2	4,7	0,94
	12 DF	0	0	0	0	0	0	0
	12 SD	1,7	2	2,4	2,9	2,4	11,4	2,28
M-6	13 DD	0	0	0	0	0	0	0
	13 SF	0	0	0	0	0	0	0
	14 DD	3,5	3,2	3,7	4,7	4	19,1	3,82
	14 SF	0	0	0	0	0	0	0
	15 DD	0	0	0	0	0	0	0
	15 SF	0	0	0	0	0	0	0
	16 DF	0	0	0	0	0	0	0
	16 SD	2,6	2,3	2,4	1,9	2,6	11,8	2,36
	17 DF	0	0	0	0	0	0	0
	17 SD	2,4	2,7	3,1	1,5	2	11,7	2,34
	18 DF	0	0	0	0	0	0	0
	18 SD	0	0	0	0	0	0	0

Lampiran 2. Gambaran Hasil Histologi

WAKTU PENGAMATAN	DEMINERALIZED BONE MATRIX	FREEZE DRIED
Minggu ke-2		
Minggu ke-4		
Minggu ke-6		

Lampiran 3. Uji Kenormalan Data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jumlah osteoblas/lp minggu 2	jumlah osteoblas/lp minggu 4	jumlah osteoblas/lp minggu 6
N		6	5	6
Normal	Mean	12.3333	5.6000	4.5333
Parameters(a,b)	Std. Deviation	1.91694	5.65685	5.68882
Most Extreme	Absolute	.193	.189	.287
Differences	Positive	.177	.189	.287
	Negative	-.193	-.161	-.213
Kolmogorov-Smirnov Z		.472	.422	.704
Asymp. Sig. (2-tailed)		.979	.994	.705

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		luas matriks (mm2) minggu 2	luas matriks (mm2) minggu 4	luas matriks (mm2) minggu 6
N		6	5	6
Normal	Mean	2.4500	.9160	1.4200
Parameters(a,b)	Std. Deviation	.53092	.85830	1.64555
Most Extreme	Absolute	.204	.289	.306
Differences	Positive	.204	.289	.306
	Negative	-.155	-.144	-.212
Kolmogorov-Smirnov Z		.500	.646	.749
Asymp. Sig. (2-tailed)		.964	.798	.628

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.



Lampiran 4. Hasil Uji Statistik

T-Test

One-Sample Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
luas matriks (mm2) minggu 2	6	2.4500	.53092	.21675
luas matriks (mm2) minggu 4	5	.9160	.85830	.38384
luas matriks (mm2) minggu 6	6	1.4200	1.64555	.67179
jumlah osteoblas/lp minggu 2	6	12.3333	1.91694	.78259
jumlah osteoblas/lp minggu 4	5	5.6000	5.65685	2.52982
jumlah osteoblas/lp minggu 6	6	4.5333	5.68882	2.32245

One-Sample Test

	Test Value = 0					
	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
luas matriks (mm2) minggu 2	11.3034125	5	9.47348E-05	2.45	1.892829723	3.007170277
luas matriks (mm2) minggu 4	2.38638789	4	0.07546334	0.916	0.149721013	1.981721013
luas matriks (mm2) minggu 6	2.1137444	5	0.088202149	1.42	0.306900475	3.146900475
jumlah osteoblas/lp minggu 2	15.75967	5	1.87074E-05	12.33333333	10.32162607	14.3450406
jumlah osteoblas/lp minggu 4	2.21359436	4	0.091260244	5.6	1.423912265	12.62391226
jumlah osteoblas/lp minggu 6	1.95196097	5	0.10839766	4.533333333	-1.43671654	10.50338321

Measure: jumlah osteo/lp

Minggu	Dependent Variable
1	osteo2
2	osteo4
3	osteo6

Oneway

Descriptives

jumlah osteoblas/lp

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	12,3333	1,91694	,78259	10,3216	14,3450	10,40	14,80
2	5	5,6000	5,65685	2,52982	-1,4239	12,6239	,00	14,40
3	6	4,5333	5,68882	2,32245	-1,4367	10,5034	,00	14,00
Total	17	7,6000	5,69561	1,38139	4,6716	10,5284	,00	14,80

Test of Homogeneity of Variances

jumlah osteoblas/lp

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,616	2	14	,108

ANOVA

jumlah osteoblas/lp

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	210,853	2	105,427	4,789	,026
Within Groups	308,187	14	22,013		
Total	519,040	16			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: jumlah osteoblas/lp
LSD

(I) waktu	(J) waktu	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	6,73333*	2,84105	,033	,6399	12,8268
	3	7,80000*	2,70883	,012	1,9901	13,6099
2	1	-6,73333*	2,84105	,033	-12,8268	-,6399
	3	1,06667	2,84105	,713	-5,0268	7,1601
3	1	-7,80000*	2,70883	,012	-13,6099	-1,9901
	2	-1,06667	2,84105	,713	-7,1601	5,0268

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Oneway

Measure: luas matriks (mm2)

Minggu	Dependent Variable
1	luas2
2	luas4
3	luas6

Descriptives

luas matriks (mm2)

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	6	2,4500	,53092	,21675	1,8928	3,0072	1,76	3,20
2	5	,9160	,85830	,38384	-,1497	1,9817	,00	2,28
3	6	1,4200	1,64555	,67179	-,3069	3,1469	,00	3,82
Total	17	1,6353	1,24355	,30161	,9959	2,2747	,00	3,82

Test of Homogeneity of Variances

luas matriks (mm2)

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7,662	2	14	,006

ANOVA

luas matriks (mm2)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6,848	2	3,424	2,678	,104
Within Groups	17,895	14	1,278		
Total	24,743	16			

Robust Tests of Equality of Means

luas matriks (mm2)

	Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Brown-Forsythe	2,790	2	8,754	,116

a. Asymptotically F distributed.

Lampiran 5. Prosedur Seleksi dan pengolahan Sediaan Donor Tulang

Sebelum penelitian, dilakukan pembuatan sediaan Demineralized Bone Matrix dan Kancelous Beku kering terlebih dahulu. Prosedur seleksi donor dan pengolahannya menggunakan prosedur yang biasa dikerjakan oleh Pusat Biomaterial Bank Jaringan Dr. Soetomo Surabaya yang disesuaikan dengan standar yang diberlakukan oleh BATAN Research Tissue Bank (BRTB).

1. Seleksi donor

Tikus putih yang akan diambil tulang kancelousnya sejenis dengan hewan coba baik umur, berat dan kondisi kesehatannya

2. Pengambilan jaringan donor

Dikerjakan dalam keadaan steril setelah tikus dilakukan *sacrifice*. Bahan donor diambilkan dari tulang kondilus femur tikus.

3. Karantina

Setelah jaringan diambil dimasukkan ke dalam kantong plastik steril kemudian ditutup dan dimasukkan ke dalam kontainer yang berisi es. Selanjutnya kontainer dikirim ke bank jaringan.

4. Prosesing

Proses pembuatannya sendiri dilakukan secara terpisah dengan metode yang berbeda sesuai dengan jenis donor tulang yang diinginkan.

Untuk donor tulang kancelous beku kering (*freeze dried allograft*) :

- Tahap pencucian :

Tulang dicuci dengan air destilasi sampai bersih dari darah dan bone marrow.

- Tahap pasteurisasi :

Tulang dimasukkan ke dalam air yang telah didestilasi kemudian dimasukkan ke dalam water bath shaker selama 5 jam dan dipanaskan sampai mencapai suhu 60°C . Air diganti setiap 1 jam atau bila terlihat banyak lemak di permukaan.

- Tahap diseksi

Tulang dibersihkan dari jaringan lunak yang menempel. Jaringan lunak yang akan dibuang terlebih dahulu dimasukkan ke dalam kantong plastik dan ditutup rapat.

- Tahap freeze-drying

Tulang yang telah disimpan minimal 24 jam didalam deep-freezer diletakkan di ruang pengeringan dan kemudian dikeringkan dalam waktu 12-24 jam sampai kadar air <5%

- Tahap pembuatan butiran (*granule*)

Bagian cancellous dari tulang dipisahkan kemudian dipecah dan dijadikan butiran-butiran dengan alat pemecah tulang

- Tahap pengepakan :

Bahan graft dibungkus dengan plastik polyethylen

- Sterilisasi

Memanfaatkan radiasi sinar gamma pada *freeze dried graft*

- Penyimpanan dan distribusi

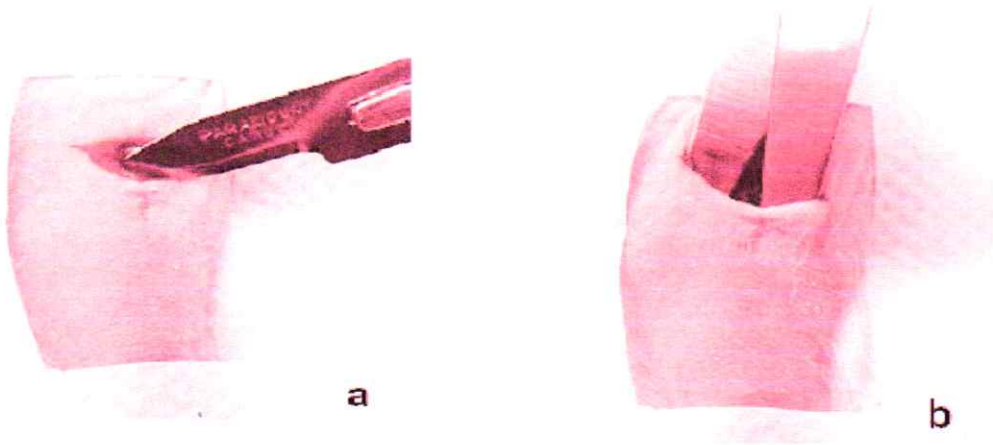
Freeze dried alograft dapat disimpan dalam suhu kamar, berukuran kecil, sifat biomekanik sedikit berkurang, mudah didistribusikan.

Untuk donor tulang DBM :

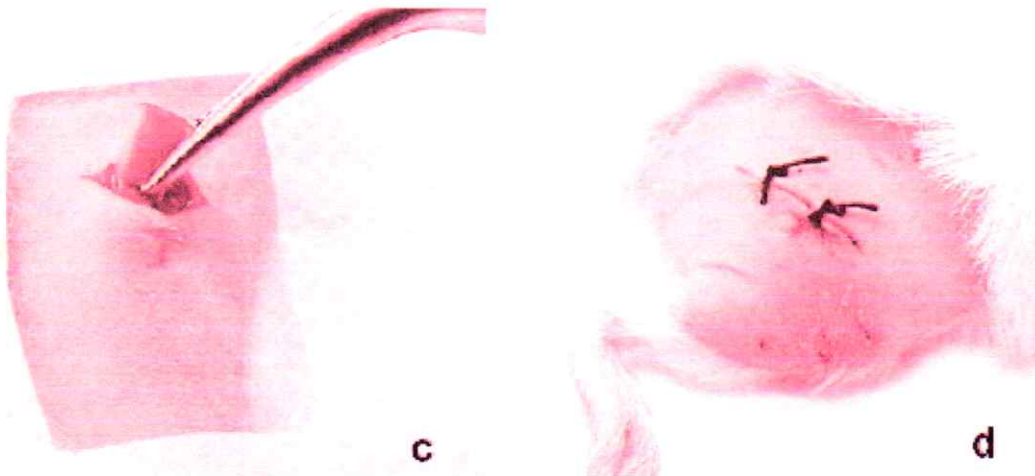
- Bahan diambil dari bagian epikondilus femur tikus putih yang sejenis yang telah disacrifice
- Semua jaringan lunak yang melekat dibuang dan tulang dicuci dengan air steril

- Dilakukan ekstraksi (defatting) selama 5 jam dengan larutan hexan
- Bersihkan jaringan lunak yang tersisa di tulang dan pisahkan bagian cancelous tulang kemudian pecahkan tulang cancelous menjadi butiran-butiran (*granule*)
- Freeze drying I
Simpan dipendingin -40°C selama 1-3 hari kemudian disublimasi didalam kondisi vakum selama 12-24 jam
- Demineralisasi dengan 0,5-0,6 HCL untuk 3-4 jam (50 ml Hcl per gram tulang), kemudian disentrifus ($>1500\text{ rpm}$) untuk 5 menit ulangi 3 kali
- Bahan graft dibilas dengan phosphate buffering solution dan dicuci dengan air suling sampai didapatkan pH 6,9
- freeze-drying II yaitu untuk membuang kandungan air setelah pencucian pada tahap penyesuaian
- Packing
- Sterilisasi radiasi
- Labeling (*Yaedu, dkk, 2004*)

Lampiran 6. Prosedur Pembedahan



Gambar a) insisi 1 cm pada daerah tegmentum tikus ; b) Diperdalam lapis demi lapis dengan gunting sampai didapatkan otot adduktor



Gambar c) Penanaman bahan donor tulang ke dalam lapisan otot; d) Otot kembali dijahit

Lampiran 7. Tahapan Pembuatan Sediaan Histologi

Tahapan pembuatan sediaan histopatologi menurut *manual of histologic and special staining technics* (1960) melalui beberapa tahap kerja sebagai berikut :

1. Fiksasi

Salah satunya dapat dilakukan dengan menggunakan larutan formaline netral 10% dengan tujuan agar mudah melakukan proses pemotongan, mempertahankan struktur serta komponen sel seperti semula, menampilkan perbedaan refraksi komponen jaringan serta untuk mencegah proses pembusukan atau mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur

2. Dekalsifikasi

Setelah dilakukan fiksasi, jaringan kalsifikasi/ tulang yang akan diperiksa kemudian dilunakkan dengan cara mencuci potongan jaringan dengan air mengalir dalam beberapa jam

3. Dehidrasi

Merendam jaringan ke dalam alkohol dengan konsentrasi yang meningkat, mulai dari alkohol 70%, 80%, 90%, 96% dan alkohol absolut. Tujuannya untuk menghilangkan sisa air dalam jaringan dan memberi suasana alkohol.

4. *Clearing*

Merendam jaringan ke dalam xylol, tahap ini dilakukan dengan tujuan agar jaringan menjadi transparan atau mengklarifikasi jaringan yang akan diblok.

5. *Impregnasi*

Pertama jaringan dimasukkan ke dalam campuran parafin cair dan xylol dengan perbandingan 1: 1 pada suhu 65⁰ C selama 30 menit. Kemudian jaringan dimasukkan ke dalam parafin murni (dalam bentuk cairan) dengan suhu 55-58⁰ C sebanyak tiga kali masing-masing selama 3 menit. Tujuan agar konsistensi jaringan sama dengan bahan blok.

6. *Embedding*

Proses infiltrasi jaringan dengan parafin cair, dituangkan ke dalam cetakan, kemudian jaringan dimasukkan ke dalamnya dengan posisi yang diatur sebaik mungkin, lalu dianginkan hingga parafin menjadi beku. Tujuannya untuk memberikan suatu penyangga agar jaringan dapat dipotong dengan mikrotom tanpa menimbulkan distorsi yang berarti pada susunannya.

7. *Pemotongan (section)*

Jaringan yang telah diblok parafin dipotong menggunakan mikrotom, dengan tebal sayatan antara empat sampai enam mikron, dengan hasil irisan yang disebut ribbon

8. *Mounting I*

Hasil irisan (ribbon) dimasukkan ke dalam water bath dengan suhu 56°C , sehingga dalam beberapa saat akan mekar, dalam keadaan ini jaringan dilekatkan pada kaca sediaan dengan menggunakan perekat campuran asam cuka, albumin dan aquadestilata dengan perbandingan 1 : 1 : 5

9. *Deparafinisasi*

Mula-mula dimasukkan ke dalam larutan xylol I, selama tiga menit lalu xylol II selama tiga menit. Kemudian dimasukkan secara berturutan ke dalam alkohol absolut, alkohol 95%, 80%, dan alkohol 70% masing-masing dua kali selama satu menit. Tujuannya untuk melarutkan sisa parafin.

10. *Hidrasi*

Mencuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kejenuhan, kemudian dibilas dengan aquadestilata.

11. *Pewarnaan*

Sediaan dibersihkan dari kristal merkuri klorida dengan iodine dan direndam dengan larutan sodium tiosulfat, setelah itu dicuci dengan air yang mengalir selama 10 – 20 menit, lalu dibilas dengan aquadestilata. Pewarnaan dilanjutkan dengan larutan haematoxylin yang bertujuan menampakkan warna dasar yang kontras dengan inti sel sehingga mudah dalam mengidentifikasi

sel. Kemudian diubah langsung pada larutan eosin selama 30 – 60 menit atau bahkan lebih lama. Dehidrasi dengan alkohol 95% kemudian alkohol absolut.

12. Clearing

Dilakukan dengan merendam dalam larutan xylol I, selama tiga menit dan xylol II selama tiga menit

13. Mounting II

Merupakan suatu proses meletakkan kaca penutup jaringan (cover glass) di atas kaca sediaan. Mula-mula perekat balsam kanada ditetaskan secukupnya di kaca penutup (cover glass) kemudian dilekatkan pada kaca sediaan dan dijaga agar tidak ada gelembung udara masuk di sela-sela antara dua kaca tersebut. Sisa-sisa perekat yang berasal dari sediaan dibersihkan agar cepat kering dan sediaan dianginkan selama 24 - 48 jam di oven. Hasil dari pewarnaan ini, inti sel berwarna merah, fibril kolagen berwarna biru.

14. Labelling

Masing-masing sediaan diberi label sesuai dengan nomor urut sampel gunanya supaya memudahkan pemeriksaan ulang dan agar bahan tidak tertukar. Selanjutnya dilakukan pengamatan secara mikroskopis.

Lampiran 8. Proses Penanaman Donor ke Dalam Otot



Tikus coba dipelihara di kandang plastik polypropilen ukuran 30 cm x 40 cm x 15 cm dan diberi nomor kode percobaan



Persiapan terhadap tikus coba sebelum dilakukan penanaman bahan donor tulang ke dalam ototnya



Bahan donor berupa butiran-butiran kasar (*granule*) ditanam di dalam lapisan perimisum otot adductor



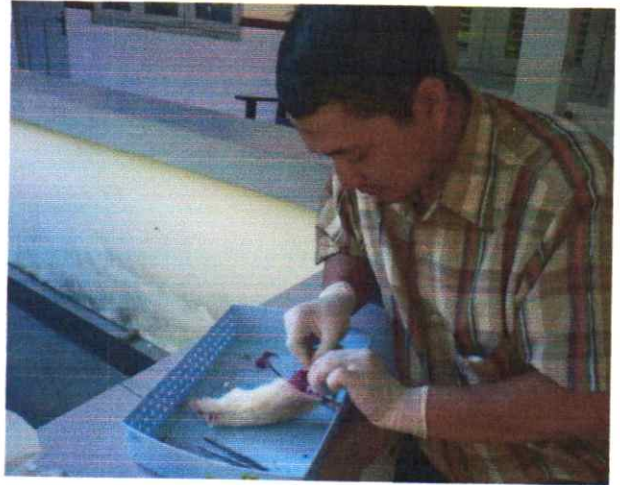
Luka kembali dijahit dan diolesi dengan salep gentamycin sampai luka kering



Lampiran 9. Proses Pengambilan Bahan Untuk Diolah Menjadi Donor Tulang



Tikus yang akan diambil tulangnya disacrieffe dengan eter di dalam wadah tertutup



Peneliti mengambil tulang paha sebagai bahan baku untuk diolah menjadi donor tulang DBM dan *Freeze dried*



Tulang yang telah diambil selanjutnya dibersihkan dari jaringan lunak yang menempel dengan khloroform atau methanol secara berulang-ulang



Kontainer sebagai wadah untuk transportasi bahan baku donor tulang ke bank jaringan untuk diolah menjadi donor tulang

Lampiran 10. Proses Pengolahan Donor Tulang DBM



Bahan donor terbungkus dalam kantong steril selama penyimpanan dalam lemari es



Bahan donor dicuci dengan air suling



Donor tulang sedang dilakukan proses beku kering dengan alat vakum



Cairan HCL sebagai bahan untuk melakukan proses demineralisasi

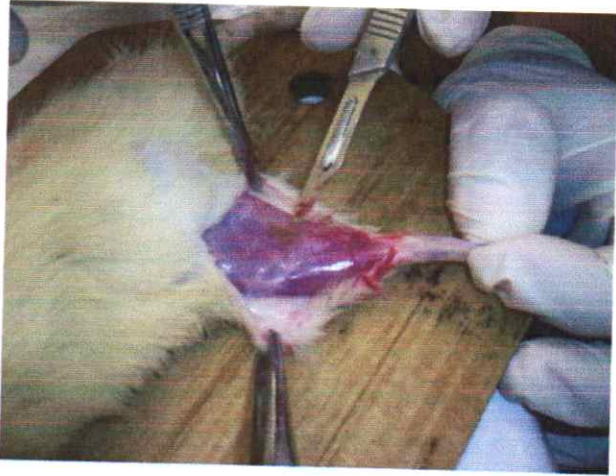


Sentrifuse digunakan untuk mempercepat pemisahan antara matriks tulang dan mineralnya

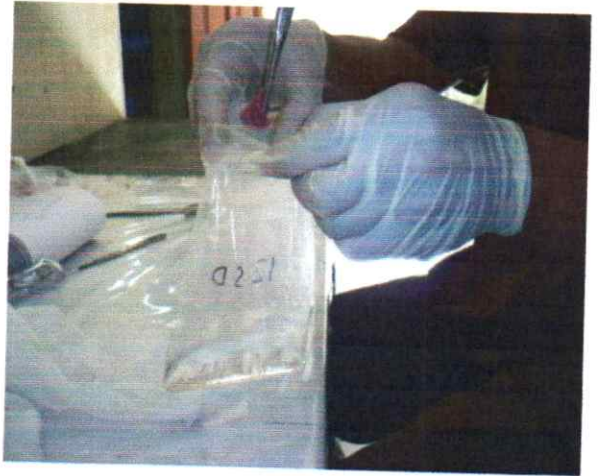


Donor tulang yang sudah jadi siap digunakan

Lampiran 11. Proses Pengambilan Hasil



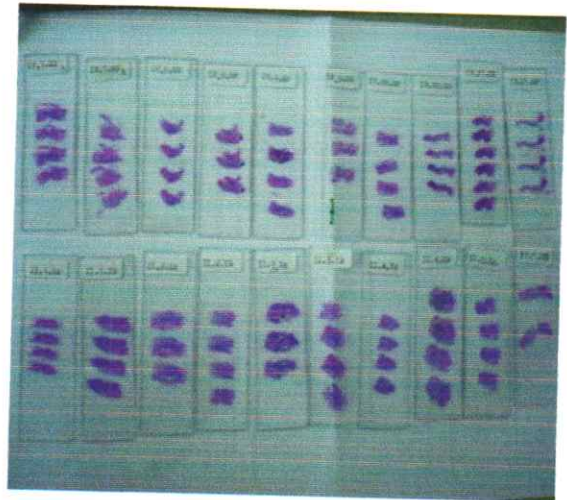
Keadaan donor tulang yang telah ditanam di paha setelah dua minggu (pada kelompok satu)



Hasil dimasukkan ke dalam kantong plastik yang telah diberi kode dan berisi formalin 10%



Hasil siap dikirim ke laboratorium patologi anatomi untuk dibuat sediaan histologi



Hasil berupa preparat histologi yang siap diamati

Lampiran 12. Proses Pengolahan Donor Tulang Beku Kering (Freeze dried)



Bahan donor tulang sedang dipasteurisasi agar mudah melepaskan sisa-sisa jaringan lunaknya



Bahan donor setelah keluar dari pasteurisasi tampak berwarna putih bersih siap dilakukan proses beku kering

Lampiran 13. Keterangan Kelaikan Etik (Ethical Clearence)

**KOMISI ETIK PENELITIAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
*Animal Care and Use Committee (ACUC)***

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
" ETHICAL CLEARENCE "**

No : 043-KE

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA,
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :**

**PENELITIAN BERJUDUL : PERBANDINGAN PEMBENTUKAN TULANG BARU
OLEH *DEMINERALIZED BONE MATRIX* (DBM) DAN
TULANG KANSELOUS BEKU KERING (*FREEZE
DRIED*) YANG DITANAM PADA OTOT TIKUS PUTIH**

PENELITI UTAMA : Sulis Bayusentono, dr.

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN : PROGRAM PASCASARJANA
PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

DINYATAKAN : LAIK ETIK

**Mengetahui,
Dekan FKH Unair,**

Surabaya, 29 Agustus 2008

Ketua,

**Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes., Drh.
NIP. 132014464**

**Prof. Romziah Sidik, Ph.D., drh.
NIP. 130687305**

TESIS

**PERBANDINGAN PEMBENTUKAN TULANG
BARU OLEH *DEMINERALIZED BONE MATRIX*
(*DBM*) DAN TULANG KANSELOUS BEKU
KERING (*FREEZE DRIED*) YANG DITANAM
PADA OTOT TIKUS PUTIH**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

SULIS BAYUSENTONO

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

**PERBANDINGAN PEMBENTUKAN TULANG
BARU OLEH *DEMINERALIZED BONE MATRIX*
(*DBM*) DAN TULANG KANSELOUS BEKU
KERING (*FREEZE DRIED*) YANG DITANAM
PADA OTOT TIKUS PUTIH**

TESIS

**Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Oleh :
Sulis Bayusentono
090415353M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
Tanggal 15 Agustus 2009**