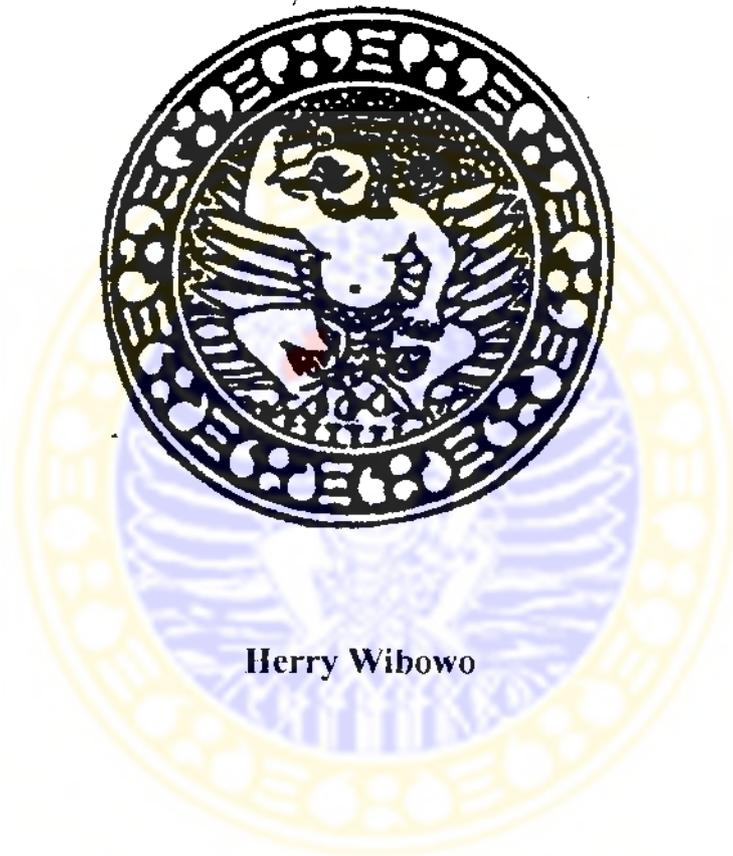


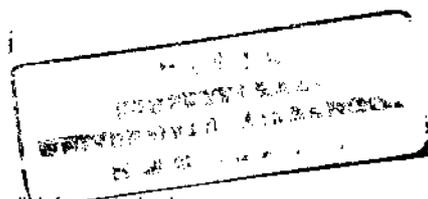
Tesis

**PENGARUH SODIUM DIKLOFENAK TERHADAP
PEMBENTUKAN KALUS PADA PENYEMBUHAN
FRAKTUR KRURIS TIKUS PUTIH JANTAN
(*RATTUS NORVEGICUS*)**



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2006



Tesis

**PENGARUH SODIUM DIKLOFENAK TERHADAP
PEMBENTUKAN KALUS PADA PENYEMBUHAN
FRAKTUR KRURIS TIKUS PUTIH JANTAN
(*RATTUS NORVEGICUS*)**



**Herry Wibowo
090214764M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2006**

**PENGARUH SODIUM DIKLOFENAK TERHADAP
PEMBENTUKAN KALUS PADA PENYEMBUHAN FRAKTUR
KRURIS TIKUS PUTIH JANTAN
(*RATTUS NORVEGICUS*)**

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister

Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Klinik

Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh

Herry Wibowo

090214764M

PROGRAM PASCASARJANA

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2006

iii

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

TANGGAL 20 April 2006

Oleh :

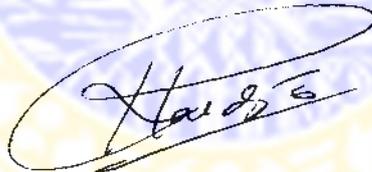
Pembimbing Ketua



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

NIP 130 325 838

Pembimbing



Rahardjo, dr

NIP 130 287 001

PANITIA PENGUJI TESIS

- Ketua : Prof H Kuntoro, dr, MPH, Dr.PH
- Anggota : Prof Dr Djoko Rocshadi, dr, SpB, SpOT, FICS
- Dr Paulus Liben, dr, MS
- Dr Sunarko Setyawan, dr, MS
- Hamzah, dr, MS, SpFK
- Rahardjo, dr



UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT, karena hanya dengan limpahan rahmat dan karuniaNya, penulisan usulan penelitian ini dapat penulis selesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada Prof Dr Djoko Roeshadi,dr,SpB,SpOT (K) selaku pembimbing ketua atas segala arahan, saran dan asupan yang diberikan .

Terima kasih sebesar – besarnya dan penghargaan yang setinggi – tingginya saya ucapkan kepada dr Rahardjo sebagai pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah meluangkan waktunya untuk memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya penulis tujukan kepada :

Prof Dr Med Puruhito,dr, SpBTKV (K) selaku Rektor Universitas Airlangga, atas ijin untuk mengikuti program magister.

Prof Dr Med H Moh Amin,dr,SpP (K) selaku Direktur Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan yang untuk mengikuti pendidikan magister.

Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Magister Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof H Kuntoro, dr, MPH, Dr PH selaku konsultan metodologi penelitian atas bimbingannya.

Dr Paulus Liben,dr,MS, Dr Sunarko Setyawan,dr,MS, Hamzah,dr,MS,SpFK selaku tim penguji atas arahan dan bimbingan.

Untuk istri tercinta, Dr Prihartini Widiyanti, drg, M.Kes yang telah dengan sabar dan penuh pengertian mendampingi secara moril, memberi segala dukungan, doa dan cintanya yang tak terhingga kepada penulis.

Untuk Ananda Tersayang, Tarissa Diandra Putri Wibowo, sebagai pemberi semangat dalam pendidikan

Kepada kedua orangtua yang selalu memberi dukungan, doa dan nasehat yang tak putus-putusnya kepada penulis.

Dan akhirnya, kepada pihak manapun yang membantu dalam studi penulis, namun karena kekhilafan tidak dapat disebutkan satu persatu penulis ucapkan terima kasih yang tak terhingga.

Akhir kata, saran dan masukan untuk melengkapi usulan penelitian ini, sangat penulis harapkan dan semoga tulisan ini bermanfaat bagi semua pihak.

Semoga Allah SWT melimpahkan rahmatNya kepada kita semua. Amin.

Surabaya, April 2006

RINGKASAN

**Pengaruh Sodium Diklofenak Terhadap Pembentukan Kalus Pada Penyembuhan
Fraktur Kruris Tikus Putih Jantan
(*Rattus norvegicus*)
Herry Wibowo**

Kasus fraktur yang disertai rasa nyeri, panas dan bengkak seringkali diatasi dengan obat golongan NSAID yang salah satunya adalah Sodium Diklofenak. Terdapat fenomena perlambatan penyembuhan fraktur yang disertai pemberian Sodium Diklofenak melalui penghambatan siklooksigenase yang mengakibatkan penghambatan produksi prostaglandin. Untuk mengetahui efek pemberian Sodium Diklofenak terhadap pembentukan kalus (diameter dan kekuatan kalus) pada penyembuhan fraktur maka dilakukan suatu penelitian eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only control group design* dengan tikus coba yaitu *Rattus norvegicus* galur Wistar jantan usia 2 bulan dan berat 200 gram yang sehat fisik.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia, Laboratorium Anatomi dan Histologi dan Laboratorium Dasar FK UNAIR menggunakan 36 tikus jantan galur Wistar, usia 2 bulan, berat 200 gram dan sehat fisik. Sampel dibagi dalam 2 kelompok : kelompok perlakuan yaitu sampel yang diberikan preparat Sodium Diklofenak 1,8 mg/200g per hari per oral selama 4 minggu dan kelompok kontrol yaitu sampel yang diberikan larutan CMC Na 0,5% 9 mg/ kg BB per hari per oral selama 4 minggu. Setelah mencapai waktu 4 minggu (28 hari) semua sampel di-*euthanasia* dengan anestesi dalam (menggunakan ether) lalu diambil tulang beserta kalusnya untuk diukur diameter kalus

dengan *Dissecting Microscope* dan kekuatan kalus dengan alat Autograf.

Hasil yang diperoleh adalah tampak kekuatan kalus yaitu ($57,476 \pm 0,661$) N pada kelompok perlakuan dan kekuatan kalus yaitu ($76,595 \pm 0,375$) N pada kelompok kontrol.

Sedangkan pada diameter kalus pada kelompok perlakuan ($4,524 \pm 0,512$) mm dan diameter kalus pada kelompok kontrol ($7,381 \pm 0,590$) mm. Hasil ini menunjukkan perbedaan yang signifikan pada rerata kekuatan kalus antara kelompok perlakuan yang diberi sodium diklofenak 1,8 mg/200g dengan kelompok kontrol yang diberi larutan CMC Na 0,5% 9 mg/kg BB. Pada kelompok perlakuan rerata kekuatan kalus lebih rendah daripada pada kelompok kontrol. Demikian pula pada diameter kalus tampak perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan (yang diberi Sodium Diklofenak) dengan kelompok kontrol (yang diberi larutan CMC Na 0,5%). Pada kelompok perlakuan rata-rata diameter kalus lebih rendah daripada pada kelompok kontrol.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian Sodium Diklofenak 9 mg / kg BB pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus*) menurunkan rata-rata kekuatan dan diameter kalus yang berakibat terhadap penurunan pembentukan kalus. Penurunan pembentukan kalus ini akan memperlambat penyembuhan fraktur.

SUMMARY

The Influence of Sodium Diclofenac To The Callus Formation in The Cruris Fracture Healing of White Mice Male (*Rattus norvegicus*)

Herry Wibowo

Fracture case which always followed by pain, febris and swelling oftenly has been treated using NSAID, which one of them is Sodium Diclofenac. There is a phenomena of delayed fracture healing in the group with Sodium Diklofenac. This mechanism is through the inhibition of cyclooxygenase by Sodium Diclofenac which yield the inhibition of prostaglandine production. To know the effect of Sodium Diklofenac to the callus formation (callus diameter and callus strength) in the fracture healing then the experimental laboratory research has been carried out. Type of research design that has been used was post test only kontrol group design with the sample which is *Rattus norvegicus* Wistar Strain male 2 month old 200 gram in weight and in good physical condition.

This research has been carried out in Biochemistry Laboratory, Anatomy and Histology Laboratory, and Basic Laboratory Medical Faculty Airlangga University using 36 male rats Wistar Strain, 2 month old, 200 gram in weight, and in good physical condition. Sample has been divided into 2 group : treatment group that has been given Sodium Diklofenac 1,8 mg/ 200g Weight per day per oral for 4 weeks and control group that has been given CMC Na 0,5% solution 9 mg/ kg Weight per day per oral for 4 weeks.

After 4 weeks (28 days) all sample has been euthanased with deep anaesthesia (using ether) then has been taken their bone and also the callus to be examine the callus diameter using Dissecting Microscope and callus strength using Autograph.

Result which were obtained showed callus strength ($57,476 \pm 0,661$) N in treatment group and callus strength ($76,595 \pm 0,375$) N in control group. Mean while callus diameter of treatment group were ($4,524 \pm 0,512$) mm and the callus diameter of control group ($7,381 \pm 0,590$) mm. It seem the significant difference of the callus strength between treatment group (which has been given sodium diklofenac) and control group (which has been given CMC Na 0,5% solution). In the treatment group the mean of callus strength was lower than in the control group. It seem also a significant difference of callus diameter between treatment group (which has been given Sodium Diklofenac) and control group (which has been given CMC Na 0,5% solution). In the treatment group the mean of callus diameter is lower than in the control group.

The conclusion of this research was that the Sodium Diklofenak 9 mg / kg Weight conferral to the male rat Wistar Strain (*Rattus norvegicus*) decreased the mean of callus strength and callus diameter that has been impact to the descent of callus formation. The descent of callus formation could retard the fracture healing.

ABSTRACT

The Influence of Sodium Diclofenac To The Callus Formation in The Cruris Fracture Healing of White Rat Male (*Rattus novergicus*)

Herry Wibowo

Sodium Diklofenac was concerned as drug of choice for the pain, febris and swelling. But unfortunately, the benefit of Sodium Diclofenac to cope the pain has been followed by the phenomena of delayed fracture healing. Many author mentioned the effect of Sodium Diclofenac on fracture healing, but the effect of Sodium Diclofenac on quality of callus (callus strength and callus diameter) remain not clear. This experimental study was performed to know the mechanism of Sodium Diclofenac's effect on callus.

Forty two *Rattus novergicus* rats were assigned into two groups. First 18 rats as treatment group has been given Sodium Diklofenak 9 mg / kg weight per day per oral for four weeks, and last 18 rats as control group has been given CMC Na 0,5% solution 9 mg / kg Weight per day per oral for four weeks. All groups were measured callus strength using Autograph and callus diameter using Dissecting Microscope and the result were compared.

It seemed significant difference of callus strength mean and callus diameter mean. The callus strength and callus diameter mean in the treatment group is lower than callus strength and callus diameter mean in the control group.

This study indicate that Sodium Diclofenac could retard fracture healing by inhibiting cyclooxygenase that would impact in inhibition of prostaglandine production as the important mediator for fracture healing.

Keywords : Sodium Diclofenac, Callus Strength, Callus Diameter, Fracture Healing



DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia.....	v
Ucapan terima kasih.....	vi
Ringkasan.....	viii
Summary.....	x
Abstrak.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	
DAFTAR GAMBAR.....	xix
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Tulang.....	5
2.2 Sel Tulang.....	6
2.2.1 Osteoprogenitor.....	6
2.2.2 Osteoblas.....	7
2.2.3 Osteosit.....	10
2.2.4 Osteoklas.....	11
2.3 Proses Penyembuhan Patah Tulang.....	16
2.4 Sifat Dasar Obat NSAID.....	21
2.4.1 Inflamasi.....	22
2.4.2 Rasa nyeri.....	23
2.5 Sodium Diklofenak.....	23
2.5.1 Farmakodinamik.....	23
2.5.2 Farmakokinetik.....	24
2.6 Efek Prostaglandin dan Thromboksen.....	25

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual.....	31
3.2 Dasar Teori.....	32
3.3 Hipotesis Penelitian.....	33

BAB 4 MATERI DAN METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian.....	34
4.2 Besar Sampel Dan Alokasi Random.....	35
4.2.1 Penentuan besar sampel.....	35
4.2.2 Alokasi random.....	35
4.3 Variabel Penelitian.....	36
4.3.1 Variabel bebas.....	36
4.3.2 Variabel tergantung.....	36
4.3.3 Variabel kendali.....	36
4.3.4 Variabel moderator.....	36
4.4 Definisi Operasional Variabel.....	36
4.5 Bahan Dan Instrumen Penelitian.....	40
4.5.1 Bahan Penelitian.....	40
4.5.2 Instrumen Penelitian.....	41
4.6 Prosedur Penelitian.....	41
4.6.1 Aklimatisasi.....	41
4.6.2 Pembagian kelompok hewan coba.....	41
4.6.3 Penimbangan berat badan.....	42
4.6.4 Pelaksanaan perlakuan.....	42
4.7 Lokasi Dan Waktu Penelitian.....	44
4.8 Analisis Data Statistik.....	44

BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Data Penelitian.....	46
5.2 Hasil Uji Statistik Deskriptif.....	50
5.3 Hasil Uji Homogenitas.....	51
5.4 Hasil Uji Normalitas.....	51
5.5 Hasil Uji Beda Dua Sampel.....	52
5.6 Hasil Analisis Dengan Statistik Non-Parametrik.....	53
5.6.1 Uji beda kekuatan kalus.....	53
5.6.2 Uji beda diameter kalus.....	53

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Karakter NSAID.....	55
6.2 Karakter Sodium Diklofenak.....	56
6.3 Pengaruh Pemberian Sodium Diklofenak Terhadap Kualitas Kalus	56

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan.....	59
7.2 Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN.....	67

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Data hasil pengukuran kekuatan kalus (KK) dan diameter kalus (DK) dari kelompok perlakuan (kelompok 1) dan kelompok kontrol (kelompok 2).....	47
Tabel 5.2	Statistik deskriptif kekuatan kalus (N) dan diameter kalus (mm) dari kelompok perlakuan dan kontrol.....	50
Tabel 5.3	Uji Homogenitas dengan Levene's test pada tikus.....	51
Tabel 5.4	Uji distribusi data kelompok terhadap kekuatan kalus dan diameter kalus.....	52
Tabel 5.5	Uji beda <i>Independent sample</i> terhadap berat tikus.....	52
Tabel 5.6	Data hasil uji t- <i>Independent sample</i> kekuatan kalus.....	53
Tabel 5.7	Data hasil uji Mann-Whitney diameter kalus.....	53

DAFTAR GAMBAR

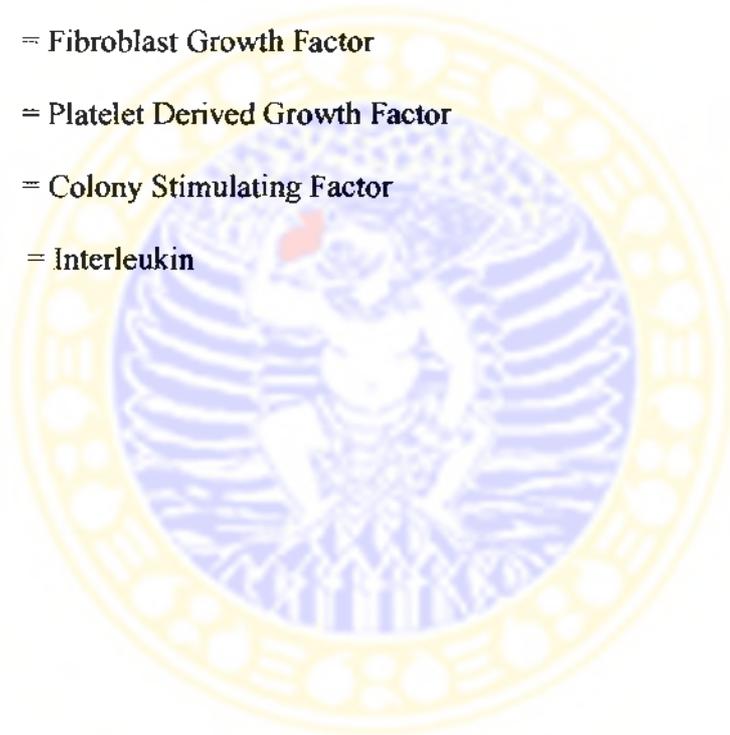
Gambar 4.1 Alat Dissecting Microscope merk Spenser.....	37
Gambar 4.2 Alat Autograf Shimadzu.....	38
Gambar 4.3 Hewan coba Rattus norvegicus.....	39
Gambar 4.4 Timbangan Torbal®.....	40
Gambar 4.5 Sungkup Anestesi.....	42
Gambar 4.6 Melakukan frakturasi tulang tibia tikus.....	43
Gambar 4.7 Pengukuran Kekuatan Kalus.....	43
Gambar 4.8 Pengukuran Diameter Kalus.....	43
Gambar 5.1 Rerata Kekuatan Kalus.....	48
Gambar 5.2 Rerata Diameter Kalus.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Data Analisis hasil Penelitian Pendahuluan.....	67
Lampiran 2 Perhitungan dosis hewan coba menggunakan tabel konversi Laurence & Bacharach (1964) (Tabel 1).....	68
Lampiran 3 Konversi perhitungan dosis sodium diklofenak untuk hewan coba.....	69
Lampiran 4 Pemberian maksimal volume larutan obat pada perlakuan hewan coba berdasar tabel Ritchel (1974) (Tabel 2).....	70
Lampiran 5 Cara membuat larutan obat sodium diklofenak.....	71
Lampiran 6 Frakturasi hewan coba.....	72
Lampiran 7 Pengukuran diameter kalus dan pengukuran kekuatan kalus.....	73
Lampiran 8 Data berat tikus.....	74
Lampiran 9 Data Hasil Pengukuran Kekuatan Kalus (KK) dan Diameter Kalus (DK) dari kelompok perlakuan (Kelompok 1) dan kelompok kontrol (kelompok 2).....	75
Lampiran 10 Lampiran Pengolahan Data Statistik.....	76

DAFTAR SINGKATAN

1. TNF = Tumor Necrosis Factor
2. TGF = Transforming Growth Factor
3. PG = Prostaglandin
4. VEGF = Vascular Endothelial Growth Factor
5. OC = Osteocalcin
6. NSAID = Non Steroid Anti Inflammatory Drugs
7. FGF = Fibroblast Growth Factor
8. PDGF = Platelet Derived Growth Factor
9. CSF = Colony Stimulating Factor
10. IL = Interleukin



BAB 1

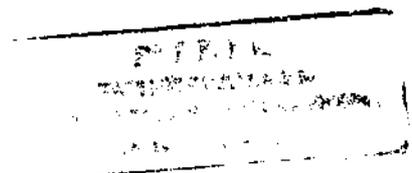
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Dalam praktek sehari – hari obat *non steroid anti inflammatory drugs* (NSAID) banyak dipakai untuk mengobati rasa nyeri karena patah tulang (Apley dan Solomon, 1997, Aronson dan Cornell, 1999, Joseph dan Richard, 1996, Tornskvist, *et al*, 1984). Di Amerika lebih dari 35 juta NSAID diresepkan tiap tahun dan lebih dari 1 % populasi di Amerika menggunakan NSAID. Di Australia lebih dari 20 % menggunakan obat NSAID sebagai obat anti nyeri dan anti inflamasi.

Pada kasus patah tulang biasanya disertai rasa nyeri, sehingga sering digunakan NSAID, yang salah satunya adalah sodium diklofenak, yang mempunyai efek untuk menghilangkan rasa nyeri, panas dan bengkak melalui penghambatan sintesis prostaglandin (Apley dan Solomon, 1997, Tornskvist *et al*, 1984). Aplikasi oral diklofenak secara *significant* memperpanjang periode penyembuhan fraktur (Beck *et al*, 2003)

Proses penyembuhan patah tulang meliputi beberapa fase yaitu : 1. fase kerusakan jaringan dan pembentukan hematoma ; 2. fase inflamasi dan proliferasi selular ; 3. fase pembentukan *soft callus* ; 4. *hard callus* ; 5. fase *consolidation* ; 6. fase remodeling (Apley dan Solomon, 1997, Joseph dan Richard, 1996, Miller, 2000, Tornskvist *et al*, 1984).



Pada fase II (fase inflamasi) terbentuk prostaglandin yang mempunyai efek menstimuli mediator nyeri, meningkatkan dilatasi pembuluh darah, meningkatkan aliran pembuluh darah ke jaringan yang mengalami inflamasi dan meningkatkan migrasi fagosit melalui pembuluh darah (<http://www.effrom.com>).

Pada fase III (fase kalus lunak) disekresi prostaglandin yang berperan dalam meningkatkan aktifitas osteoklas dan merangsang pengumpulan osteoklas baru. Dengan aktifitas yang meningkatkan dan pengumpulan osteoklas yang banyak, jaringan tulang mati akan cepat dibersihkan dari daerah patah tulang sehingga terbentuk rongga, yang kemudian diikuti dengan pembentukan pembuluh darah baru, penempatan osteoblas, pelepasan zat aktif dan pembentukan matrik tulang baru pada rongga tersebut (Apley dan Solomon, 1997, Aronson dan Charles, 1999, Joseph dan Richard, 1996). Aktifitas osteoblast didahului oleh aktifitas osteoklast, sehingga bila ada gangguan aktifitas osteoklast maka aktifitas osteoblast juga terganggu.

Prostaglandin terbentuk cukup banyak pada daerah fraktur pada stadium inflamasi dan stadium pembentukan kalus lunak. Prostaglandin terbentuk pada proses penyembuhan tulang akan merangsang pengumpulan osteoklas dan meningkatkan aktifitasnya (Joseph dan Richard, 1996). Pemberian sodium diklofenak akan menghambat enzim siklooksigenase. Menurut penelitian terdahulu (Suhana R, 2002) menyebutkan bahwa pemberian NSAID akan mengganggu proses penyembuhan fraktur. Hal ini akibat adanya gangguan aktifitas osteoklast dan osteoblast. Sehingga kualitas kalus pada penyembuhan fraktur menurun. Pemberian asam mefenamat untuk penanganan nyeri pada penderita fraktur akan menghambat sintesis prostaglandin.

Pemberian sodium diklofenak mengakibatkan terhambatnya aktifitas dan pengumpulan osteoklast, berkurangnya atau tidak terbentuknya rongga-rongga. Revaskularisasi di rongga tersebut berkurang atau tidak terbentuk yang mengakibatkan gangguan penempatan osteoblast.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah sodium diklofenak dapat menurunkan kualitas kalus (diameter dan kekuatan kalus) pada penyembuhan fraktur ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Mengetahui efek pemberian sodium diklofenak terhadap pembentukan kalus pada penyembuhan fraktur.

1.3.2. Tujuan khusus

- a. Membuktikan bahwa pemberian sodium diklofenak dapat menurunkan kualitas kalus (diameter kalus) kruris tikus.
- b. Membuktikan bahwa pemberian sodium diklofenak dapat menurunkan kualitas kalus (kekuatan kalus) kruris tikus.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Manfaat Praktis

Mengetahui pengaruh sodium diklofenak terhadap penyembuhan fraktur, sehingga dapat menjadi pertimbangan dalam pemberian sodium diklofenak sebagai salah satu obat NSAID pada kasus fraktur.

2. Manfaat Teoritis

Memberikan acuan teori tentang pengaruh sodium diklofenak terhadap penyembuhan fraktur.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Tulang

Tulang adalah jaringan yang sangat dinamik dan teratur mulai dari pengaturan kristal apatit di tingkat molekul hingga pola tekanan pada susunan trabekular di tingkat organ. Sinergi molekul, selular dan susunan jaringan yang menghasilkan kekuatan regangan tapi mempunyai efisiensi penggunaan materi sehingga relatif ringan sebagai penyusun kerangka (Buckwalter, 2000). Tulang merupakan lempengan mineral yang tersusun dengan teratur secara lamellar, relatif hiposelular, stress oriented terdiri atas tulang kortikal dan spongiosa. Tulang tersusun atas lapisan osteon yang disebut sistem Havers yaitu susunan melingkar berbentuk silinder mengitari saluran pembuluh darah sentral dan berhubungan dengan sistem Havers. Saluran ini berisi kapiler, arteriola, venula, nervi dan saluran limfe. Di antara osteon terdapat susunan lamella interstitialis serat penyusun lamella saling berhubungan tapi tidak pernah memotong lapisan semen. Lapisan semen merupakan pembentuk tepi osteon. Nutrisi tulang diperoleh melalui sirkulasi intraoseous (Buckwalter, 1995).

Tulang tersusun atas matriks dan selular, matriks tulang merupakan 90% dari seluruh massa tulang. Menurut bentuk tulang dikelompokkan sebagai tulang panjang, tulang pipih dan tulang pendek. Secara utuh tulang terdiri atas sumsum tulang (*hematopoietic marrow*) ditunjang dan dikitari jaringan tulang dan periosteum.

Tulang kortikal disebut juga tulang kompakta yang merupakan sebagian besar penyusun rangka (80%). Tulang kortikal mengalami pergantian melalui resorpsi dan deposisi tulang yang terjadi secara lambat. Tulang kortikal mempunyai modulus elastisitas tinggi dan mampu menahan tekanan mekanik berupa beban tekukan dan puntiran (Chu, 1998). Tulang spongiosa atau cancellous mempunyai densitas lebih rendah dari tulang kortikal, modulus elastisitas lebih kecil, dan mengalami pertukaran melalui resorpsi dan deposisi lebih cepat. Tulang tersusun atas trabekula dihubungkan oleh lamella tersusun sejajar. Tulang spongiosa terdapat pada daerah metafisis dan epifisis tulang panjang serta pada bagian dalam tulang pendek. Tulang *immature* atau *woven bone* mempunyai susunan tidak beraturan, jumlah sel yang banyak, dan merupakan hasil pembentukan tulang yang terjadi secara cepat (*rapid bone formation*) seperti pada penyembuhan patah tulang. Susunan tulang *immature* tidak terorganisasi, distribusi susunan serabut kolagen dan osteositnya tidak beraturan. Susunan lamellar tidak terdapat pada *woven bone*. Tulang *immature* terbentuk pada proses penyembuhan patah tulang dan keadaan *turn over* tulang tinggi. Tulang *immature* dijumpai pada tulang kortikal dan spongiosa (Buckwalter, 1995).

2.2 Sel Tulang

2.2.1. Osteoprogenitor

Sel osteoprogenitor merupakan populasi sel induk, berkembang dari mesenkim, yang memiliki daya mitotik dan kemampuan untuk berkembang menjadi sel tulang dewasa. Sel ini mirip sel mesenkin dan pada mikroskop cahaya tampak berbentuk gelondong, dengan inti pucat memanjang dan mempunyai sedikit sitoplasma. Sel-sel ini biasanya ditemukan pada permukaan tulang di lapisan dalam periosteum, pada endosteum dan dalam saluran vaskular dari tulang kompakta. Ada dua jenis sel

osteoprogenitor, satu jenis (preosteoblas) memiliki sedikit retikulum endoplasma dan akan menghasilkan osteoblas, dan yang lain (preosteoklas) mengandung lebih banyak mitokondria dan ribosom bebas serta menghasilkan osteoklas (Leeson, 1990).

2.2.2. Osteoblas

Osteoblas berhubungan dengan pembentukan tulang. Osteoblas berasal dari prekursor mesenchymal lokal dan berbentuk garis kecil (20 μ m) sebagai sel kuboid sepanjang permukaan trabekula dan sistem Havers dimana tulang baru berada. Osteoblas mengandung banyak alkalin fosfatase dan berperan penting untuk produksi dan mineralisasi matriks tulang (Apley & Solomon, 1993).

Sel osteoblas berkembang dibawah pengaruh faktor pertumbuhan (*growth factor*) dan factor lainnya, dimana sel asal (*stem cell*) osteoblas akan berdiferensiasi menjadi preosteoblas dan kemudian berakhir dengan osteoblas matang (*mature osteoblast*) (Wong et al, 1999)

Fungsi utama osteoblas yang telah diketahui dengan jelas adalah yang berkaitan dengan penambahan matriks tulang dan mineralisasinya. Pada saat osteoblas membentuk lamel tulang, osteoblas mensekresi matriks pada bagian basal sel. Dalam suatu penelitian menggunakan *immunochemistry* dan hibridisasi *in situ* menunjukkan bahwa sekresi dari osteoblas menghasilkan semua bahan utama matriks tulang. Sel osteoblas matang akan mensintesis matriks tulang yang berupa protein seperti misalnya : kolagen tipe I, fosfoprotein, osteokalsin, proteoglikan dan beberapa faktor pertumbuhan yang selanjutnya mengatur aktifitas sel tersebut. Aktifitas osteoblas dapat dideteksi dengan peningkatan kadar enzim alkalin fosfatase (ALP) dan osteokalsin (Riggs & Melton, 1995)

Terdapat beberapa langkah dalam pembentukan tulang yang berada dibawah kontrol osteoblas, yaitu : 1) sintesa dan proses intraseluler kolagen tipe I ; 2) sekresi dan proses ekstraseluler ; 3) pembentukan mikrofibril, fibril, dan fiber yang berasal dari kolagen ; 4) maturasi matriks kolagen dengan rangkaian nukleasi dan pertumbuhan kristal hidroksiapatit (Olugbenga et al,2000)

Molekul kolagen membentuk fibril yang diatur dalam sistem pengaturan yang menakjubkan dan fibril membentuk simpul fiber diantara satu dan yang lainnya seperti sebuah kabel yang memberikan kekuatan terhadap regangan pada tulang. Terdapat tingkat pengaturan yang lebih tinggi dalam jaringan, dimana fiber dujajarkan dalam tulang kompakta dan trabekula pada tulang *concellous* sepanjang tulang yang mendapat regangan dari beban mekanis. Hal ini memberikan kekuatan maksimum untuk sejumlah material yang minimum, yang menunjukkan, selama pembentukan tulang, aktifitas osteoblas berhubungan dengan regangan mekanis dan reaksinya dalam suatu jaringan kerja. (Riggs & Melton, 1995)

Telah ditemukan beberapa data yang mendukung hipotesis yang menerangkan bahwa osteoblas mengeluarkan faktor terlarut sesudah terpapar oleh suatu *agent*, misalnya PTH dan selanjutnya faktor ini menstimulasi resorpsi tulang oleh osteoklas. Dengan kata lain, regulasi hormonal pada resorpsi tulang terjadi melalui sebuah mekanisme yang dimediasi oleh osteoblas. Saat ini telah ditemukan 10 sampai 15 faktor yang telah diisolasi, yang diduga berperan dalam mengontrol semua aspek pada fungsi osteoblas (Liu et al 1998)

Hasil penelitian yang sekarang telah banyak dipahami adalah bahwa osteoklas mengeluarkan *growth factor* selama prosese resorpsi. Faktor-faktor ini selanjutnya menyebar pada jarak dekat disekitarnya dan menstimulasi sel mesenkimal untuk

mengadakan proliferasi dan selanjutnya mengadakan diferensiasi menjadi preosteoblas dan osteoblas (Liu et al,1998)

Sejumlah *growth factor* yang telah ditemukan dan diproduksi oleh tulang atau diisolasi dari matriks tulang, yaitu, *transforming growth factor* β 1,2 dan 3 (TGF- β 1,2,3) ; *bone morphogenetic protein* 1 sampai 7 (BMP 1 sampai 7); *insulin-like growth factor* (IGF); *acidic dan basic fibroblast growth factor* (aFGF dan bFGF) (Xing et al, 2003)

Dalam beberapa tahun ini telah terbentuk suatu pemahaman tentang peran osteoblas dalam pembentukan tulang. Bagian penting tersebut dapat disimpulkan menjadi beberapa penjelasan antara lain : 1) osteoblas berasal dari sel osteoprogenitor yang berasal dari mesenkim dan sumber dari diferensiasi osteosit; 2) osteoblas mempunyai kemampuan untuk mensintesa kolagen tipe I dan mengatur mineralisasi kedalam bentuk kristalin yang spesifik; 3) osteoblas adalah *autocrine regulatory cells*.

Sel-sel ini dapat mensintesa dan dapat mengandapkan growth faktor dalam matriks tulang, yang mana saat dikeluarkan dalam proses resorpsi tulang, merestimulasi aktivitas selanjutnya dari osteoblas; 4) osteoblas memediasi signal sistemik untuk pengerahan dan aktifitas osteoklas (Xing et al,2003 ; Olubenga et al, 2000)

PTH menunjukkan perannya pada osteoblas yang berkenaan dengan mediator ion, transpor asam amino, stimulasi camp, regulasi sintesa kolagen dan pengikat reseptor spesifik, 1,25-dihidroksivitamin D juga menunjukkan perannya dalam menstimulasi sintesa matriks, alkaline fosfatase dan produksi protein spesifik, serta pengikatan pada reseptor (Martini et al, 2000)

2.2.3. Osteosit

Osteosit adalah osteoblas yang terpendam dalam matriks tulang. Osteosit terletak dalam lacuna tulang, dimana antar osteosit dapat saling berhubungan melalui sitoplasma. Fungsi dari sistem ini masih belum jelas, mungkin hormon parathyroid ikut berperan dalam proses ini. Osteosit ikut berperan dalam resorpsi tulang (*osteocytic osteolysis*) dan transpor ion Calcium. Terdapat juga suatu petunjuk tentang sensitifitas mereka terhadap rangsangan mekanis dan penyampaian informasi tentang perubahan tekanan dan regangan yang terjadi pada tulang, yang selanjutnya mengirimkan suatu pesan kimia (*chemical messages*) kepada sel permukaan (osteoblast) yang selanjutnya akan mengeluarkan faktor pertumbuhan atau sitokin yang mempunyai efek meningkatkan atau menurunkan kepadatan tulang melalui proses pembentukan dan penyerapan tulang (Aubin & Bonnelye, 2002 ; Wong et al, 1999).

Selain itu osteosit berfungsi juga mendeteksi adanya kerusakan tulang (*bone damage*), yang lebih lanjut melaporkan ke sel permukaan melalui pesan kimia dan pada akhirnya merangsang terbentuknya beberapa sitokin yang berfungsi merangsang proliferasi sel precursor osteoklas untuk membentuk osteoklas, yang kemudian melakukan penyerapan tulang. Proses penyerapan tulang secara normal selalu diikuti oleh aktifitas sel osteoblas untuk membentuk tulang sehingga kepadatan tulang dapat dipertahankan (Favus, 1993).

Pada osteoblas yang aktif, kalsifikasi matriks tulang bukan suatu proses yang statis dan sel osteosit ditemukan terbenam dalam tulang pada bagian lakuna osteositik. Terdapat sebuah ruang diantara membran plasma dan matriks tulang, keduanya yaitu dalam lakuna dan kanalikuli, terisi dengan cairan ekstra seluler (Riggs & Melton, 1995).

Pada sajian histologi terlihat bahwa osteosit ini mengkerut, tetapi bentuk sebenarnya dapat diperkirakan berdasarkan bentuk lakuna, yang merupakan tempat tinggalnya. Lakuna pada satu pihak berbentuk lonjong tidak teratur dan berbentuk bikonveks pada tepinya. Tonjolan-tonjolan halus sitoplasma, osteosit menjulur ke dalam kanalikuli. Ikatan ini diduga memungkinkan aliran ion dan molekul antar sel. Pada tulang dewasa hampir seluruh tonjolan ini telah ditarik kembali, tetapi kanalikuli tetap ada sebagai sarana untuk dilalui metabolit dari peredaran darah dan osteosit (Leeson, 1990).

2.2.4. Osteoklas

Osteoklas adalah sel raksasa berinti banyak yang besar dan jumlah anak intinya sangat bervariasi. Terdapat dekat dengan permukaan tulang, seringkali dalam lekukan dangkal yang dikenal sebagai *lacuna howship*. Osteoklas berasal dari sel mononuclear hematopoetik dalam sum-sum tulang yang disebut *osteoclast progenitor*. Selanjutnya atas pengaruh *Macrophage Colony-Stimulating Factors* (MCSF) menjadi *osteoclast precursor*. Prekursor osteoklas mononuclear dapat bersirkulasi dalam aliran darah. Osteoklas precursor ini masih merupakan sel mononuclear, dengan pengaruh 1,25 dihidroksivitamin D dan beberapa sitokin mengadakan fusi membentuk sel multinuclear osteoklas, yang selanjutnya berfungsi meresorpsi tulang (Fuller et al, 1998; Riggs & Melton, 1995).

Seperti telah dijelaskan diatas, pada permukaan endosteum tulang precursor tersebut melakukan proliferasi, bergabung untuk membentuk sel multinukleus, membentuk batas bergerigi (*ruffled border*), dan melakukan resorpsi tulang. Terdapat suatu bukti yang menunjukkan sebuah sel stem pluripoten yang mempunyai suatu kemampuan untuk merespon suatu rangsangan sehingga dapat berdiferensiasi menjadi

sebuah granulosit, monosit atau osteoklas. Kemungkinan besar sel stem tersebut adalah sebuah rangkaian *colony forming unit for the granulocyte-macrophage* (CFU-GM) (Favus, 1993).

Permukaan tulang dekat osteoklas sering hilang sebagian mineralnya, dan ada kemungkinan bahwa sel-sel ini terlibat dalam resorpsi tulang, meskipun mekanisme kerjanya belum jelas. Osteoklas mengeluarkan kolagenase dan enzim proeolitik lain yang menyebabkan matriks tulang melepaskan bagian substansi dasar yang mengapur. Sesudah proses resorpsi selesai, osteoklas menghilang, mungkin berdegenerasi atau berubah lagi menjadi sel asalnya (Riggs & Melton, 1995).

Karbonik anhidrase II, merupakan marker untuk aktifitas osteoklas yang dihubungkan dengan resorpsi tulang. Karbonik anhidrase terdapat pada permukaan dalam batas bergerigi (*ruffled border*) dan juga terdapat pada sitoplasma. Keberadaan enzim ini pada batas bergerigi begitu penting, saat batas bergerigi menjadi tempat pengasaman yang aktif. Karbonik anhidrase mungkin berperan pada pengasaman dengan menggunakan metabolisme CO_2 untuk memproduksi ion hydrogen dan ditranspor melalui batas bergerigi menuju tempat resorpsi oleh H^+ -ATPase jenis vakuolar (Fuller et al, 1998; Riggs & Melton, 1995).

Terdapat beberapa *agent* yang dapat mengaktifkan osteoklas, antara lain : paratiroid hormon (PTH), interleukin-1, *tumor necrosis factor* (TNF), *transforming growth factor- α* (TGF- α), dan 1,25-dihidroksivitamin D. Beberapa *agent* berperan dalam aktifitas osteoklas, antara lain kalsitonin, γ -interferon (γ -IFN), dan *transforming growth factor- β* (TGF- β) terdapat beberapa *agent* dari beberapa faktor yang telah disebutkan diatas, yang tidak spesifik untuk osteoklas. Sebagai contoh, 1,25-dihidroksivitamin D hanya meningkatkan penggabungan dari osteoklas tapi juga menambah penggabungan

makrofag untuk membentuk polikarion. Selanjutnya beberapa factor termasuk kategori spesifik, contohnya adalah kalsitonin. Kalsitonin menyebabkan kontraksi sitoplasmik pada membran sel osteoklas, dan hal ini berhubungan dengan kemampuannya untuk menghambat resorpsi tulang (Xing et al, 2003; Wong et al, 1999).

Penelitian terbaru mengungkapkan tentang prekursor osteoklas utama yaitu *haemopoetic blast cells* diketahui menghasilkan *tartrate-resistance acid phosphatase* (TRAP) melalui induksi hormon paratiroid yang dapat dijadikan marker untuk diferensiasi osteoklas, meskipun pada penggunaan TRAP sebagai marker dianggap kurang reliable, karena dari penelitian in vitro TRAP juga dihasilkan oleh sel yang lain termasuk makrofag. Marker diferensiasi osteoklas yang lain adalah *calcitonin receptor-positive (CTRP) cells*, yang dihasilkan oleh *haemopoetic precursor*. (Aubin & Bonnelye, 2002; Wong et al, 1999).

Tulang secara selular tersusun atas osteoblas yang berasal dari sel mesenchymal. Osteoblast mempunyai lebih banyak endoplasmik retikulum, golgi apparatus dan mitokondria dari pada sel-sel yang lain (sesuai dengan peranan dalam sintesis dan sekresi matriks tulang). Lebih *berdifferentiated*, sel-sel yang aktif bermetabolisme terdapat digaris permukaan tulang dan sel-sel yang kurang *active* di resting regions atau sel-sel terperangkap dipertahankan dalam *ionic milieu of bone*. Osteoblas berdiferensiasi secara “*in vivo*” dipengaruhi oleh interleukin, *platelet-derived growth factor* (PDGF) dan *insulin derived growth factor* (IDGF). Osteoblas memproduksi kolagen type I, osteokalsin (dirangsang oleh 1,25-dihydroxy vitamin D). Osteoblas mempunyai reseptor-efektor untuk : 1. PTH; 2. 1,25-dihydroxy vitamin D ; 3. Glucocorticoids; 4. Prostaglandin ; dan 5. Esterogen). Aktifitas osteoblas dihambat oleh kalsitonin.

Osteosit lebih dari 90% pada tulang mature dan menjaga mempertahankan tulang. Sel osteosit berasal dari osteoblas yang telah terperangkap di dalam matriks tulang. Osteosit mempunyai ratio nucleus-sitoplasma meningkat, dengan proses sitoplasma saling berhubungan satu sama lainnya dan tidak seaktif osteoblas dalam menghasilkan matriks tulang. Osteosit mempunyai peranan penting dalam mengontrol konsentrasi kalsium dan phosphor ekstraselular, mereka secara langsung dirangsang oleh kalsitonin dan dihambat oleh PTH.

Osteoklas berfungsi sebagai resorpsi tulang, berbentuk irregular, giant cell, multinukleus, berasal dari jaringan hematopoitik (monosit progenitor membentuk giant cell dengan fusi), dan tonjolan plasma (lipatan membran plasma yang berfungsi untuk meningkatkan area permukaan resorpsi) dan di kelilingi oleh "clear zone". Resorpsi tulang terjadi dalam "howship's lacunae" dan terjadi lebih cepat dari pada pembentukan tulang.

Pembentukan tulang dan resorpsi tulang berpasangan atau berhubungan. Osteoklas mengikat permukaan tulang melalui pengikatan sel-protein (intergins). Osteoklas menghasilkan ion-ion hidrogen melalui karbonik anhidrase sehingga PH menjadi rendah, dan menyebabkan peningkatan kelarutan hidroxyapatit crystals dan matriks organik dilepas oleh "proteolitik digestion". Osteoklas mempunyai reseptor khusus untuk kalsitoni mengizinkan osteoklas secara langsung mengatur ulang reseption.

Sel osteoprogenitor dalam perkembangannya merupakan sel induk yang akan menjadi osteoblas. Sel-sel mesenchymal lokal terletak di haversian canal, endosteum dan periosteum. Sel ini menunggu stimulus untuk berdiferensiasi menjadi osteoblas.

"Lining cells" sempit, terdiri dari sel-sel pipih yang membentuk suatu bungkus atau selimut di sekitar tulang.

Matriks tulang terdiri dari komponen organik 40% dan komponen inorganik 60%. Komponen organik lebih dari 40% dari berat kering tulang terdiri dari kollagen, proteoglikans, noncollagenous matrix protein (glycoprotein, phospholipids, phosphoprotein) dan growth faktor serta sitokinin.

Kollagen bertanggung jawab untuk *tensile strength* tulang. Lebih dari 90% matrix tulang terdiri dari kollagen type I. Proteoglicans bertanggung jawab untuk *compressive strength* dari tulang dan menghambat mineralisasi. Matrix protein meningkatkan mineralisasi dan pembentukan tulang, terdiri dari : osteocalcin, osteopontin dan lain-lain. Osteokalsin dihasilkan oleh osteoblas yang berfungsi menarik osteoklas dan secara langsung berhubungan dengan pengaturan densitas tulang. Osteonektin disekresi oleh platelet dan osteoblas berfungsi dalam mengatur kalsium atau pengumpulan mineral dalam matrix. Osteonektin adalah suatu protein yang berfungsi untuk mengikat sel mirip suatu integrin.

Growth factor dan sitokin hadir dalam jumlah kecil pada matrix tulang meliputi (1). Transforming growth factor beta (TGF- β), (2). Insulin like growth factor (IGF), (3). Interleukins (IL-1, IL-6); dan (4) Bone morphogenic proteins (BMP). Protein-protein ini membantu diferensiasi sel-sel tulang, aktivasi, pertumbuhan dan perputaran.

Komponen organik (mineral) lebih dari 60% dari berat kering tulang terdiri dari calcium hydroxy apatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) dan osteocalcium phosphat (brushite). Komponen ini bertanggung jawab untuk "*compressive strength*" dari tulang. *Mineralisasi primer* terjadi dalam gaps kollagen, *mineralisasi sekunder* terjadi di perifer.

2.3 Proses Penyembuhan Patah Tulang

Penyembuhan patah tulang merupakan proses yang sangat kompleks, mencakup sejumlah proses selular, fisiologi dan dipengaruhi tekanan mekanik. Proses ini dimulai dari tahap inflamasi, kemotaksis, proliferasi dan diferensiasi serta berakhir dengan terbentuknya struktur dengan kemampuan menahan beban mekanik. Proses penyembuhan patah tulang terbagi menjadi beberapa fase. Proses penyembuhan patah tulang menurut Buckwalter (2000) melalui 6 fase yaitu : (1) Hematom dan inflamasi, (2) Angiogenesis dan pembentukan kartilago (*cartilage formation*), (3) Kalsifikasi kartilago , (4) *Cartilage removal* ,(5) Pembentukan tulang (*bone formation*) dan (6) Remodeling.

1. Hematoma

Setelah patah tulang, hal pertama yang terjadi adalah hematoma. Terbentuk *blood clot* (gumpalan darah) yang berasal dari pembuluh darah yang mengalami laserasi (perluasan) dalam tulang atau periosteum. Gumpalan darah mulai terbentuk pada lokasi patah tulang dan berkembang terbentuk anyaman fibrin yang berperan dalam stabilitas mekanis. Gumpalan ini berperan sebagai *signalling molecules* yang mempunyai kemampuan untuk memulai kaskade seluler penyembuhan patah tulang. Sel radang mensekresi sitokin, seperti interleukin-1 (IL-1) dan interleukin-6 (IL-6). Degranulasi platelet pada gumpalan darah melepaskan *signalling molecules* seperti *transforming growth factor-beta* (TGF- β) dan *platelet-derived growth factor* (PDGF) yang penting bagi proliferasi dan diferensiasi sel. Tulang yang nekrotik diresorpsi oleh osteoklas dan hematoma diresorpsi oleh makrofag.

2. Angiogenesis dan pembentukan kartilago

Setelah hematoma diresorpsi, jaringan granulasi berkembang dari periosteum dan endosteum. Setelah ini terbentuk sempurna, sel pluripoten bermigrasi menjadi jaringan granulasi. Dua minggu setelah patah tulang, proliferasi sel turun dan khondrosit hipertropik menjadi tipe sel dominan pada kalus khondroid. Pemeriksaan dengan mikroskop elektron menunjukkan struktur membran yang menyerupai tunas untuk membentuk *vesicularized bodies*. Bagian ini disebut vesikel matriks, yang pindah ke matriks ekstraseluler dimana *vesicularized bodies* berperan dalam pengaturan kalsifikasi. Vesikel matriks mengeluarkan fosfatase yang dibutuhkan untuk mendegradasi matriks fosfodiester untuk melepaskan ion fosfat dan kalsium. Ekspresi kuantitatif aktivitas protease menunjukkan puncak pada semua tipe protease sekitar 14 hari setelah patah tulang dengan puncak alkaline phosphatase yang tercapai 3 hari setelahnya.

3. Kalsifikasi kartilago

Jaringan granulasi kemudian menjadi khondrosit dan osteosit yang menghasilkan kartilago dan tulang. Struktur sekitar patah tulang mengeras yang kemudian disebut kalus. Pada tikus coba, pada penyembuhan patah tulang pembentukan tulang intramembran dan endokondral dimulai lebih dari 7-10 hari. Kalsifikasi kalus terjadi pada lempeng pertumbuhan (*growth plate*). Sekitar 9 hari setelah patah tulang, tampak khondrosit panjang yang proliferasi yang akan mengalami mitosis dan terbagi. Pada pertengahan minggu kedua setelah penyembuhan patah tulang, kartilago terdapat berlimpah pada lokasi patah tulang dan jaringan khondroid mulai terbentuk untuk melakukan kalsifikasi. Kalus dapat dibagi menjadi dua yaitu kalus lunak dan kalus keras. Kalus lunak adalah kalus yang

terbentuk pada saat osifikasi endokondral dan kalus keras adalah yang terbentuk pada saat osifikasi intramembran. Fase kalus lunak (*stage of soft callus*), aktifitas osteoblas (*osteogenesis*) kondroblas (*chondrogenesis*), sel endotel (*angiogenesis*), dan osteoklas (*osteoclastogenesis*), akan berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk kalus eksternal dan internal yang berlangsung 3 – 4 minggu. Sel preperasi yang berperan dalam proses penyembuhan fraktur adalah sel-sel osteogenik yang berproliferasi dari lapisan periosteum yang kemudian membentuk kalus eksternal dan yang berproliferasi dari lapisan endosteum yang membentuk kalus internal (Salter, 1999). Lapisan periosteum (membran vaskular *fibrous* yang berada pada permukaan luar diafisis) sebagian besar terdiri dari jaringan penyangga irregular yang padat sebagai *outer fibrous layer*, sedangkan *inner osteogenic layer* tersusun atas osteoblas dan osteoklas. Lapisan endosteum (membran *non- fibrous* yang berada dalam kavitas medulari dan trabekula dari epifisis) sebagian besar tersusun dari osteoblas dan osteoklas. Pertumbuhan yang dicerminkan dari diameter kalus (*appositional growth*) muncul pada *osteogenic layer* dari periosteum (Davenport, www.linkpublishing.com/FTP/bonestudy.pdf). Sedangkan peran serta *fibroblast – like* (sel mesenkim) yang bersifat pluripoten itu dapat berdeferensiasi menjadi kondroblas. Pada saat itu secara klinis kondisi daerah fraktur tidak terasa nyeri lagi dan terfiksir satu sama lain. Hubungan antara fragmen yang sudah stabil itu disebut *sticky*.

4. *Cartilage removal*

Pada saat kartilago terkalsifikasi, kartilago akan menjadi target pertumbuhan kearah dalam pembuluh darah. Pembuluh darah ini akan membawanya ke sel perivaskuler, yang merupakan progenitor osteoblas.

5. Pembentukan tulang

Kemudian kartilago yang telah terkalsifikasi pada kalus sangat identik dengan spongiosa primer yang dijumpai di lempeng pertumbuhan dan kemudian diresorpsi oleh sel penyerap-jaringan yang terkalsifikasi (khondroblast, osteoklast), anyaman tulang yang menggantikannya sangat identik dengan spongiosa sekunder lempeng pertumbuhan. Seiring dengan waktu kalus kemudian menjadi *woven bone* yang dilakukan oleh osteoblas.

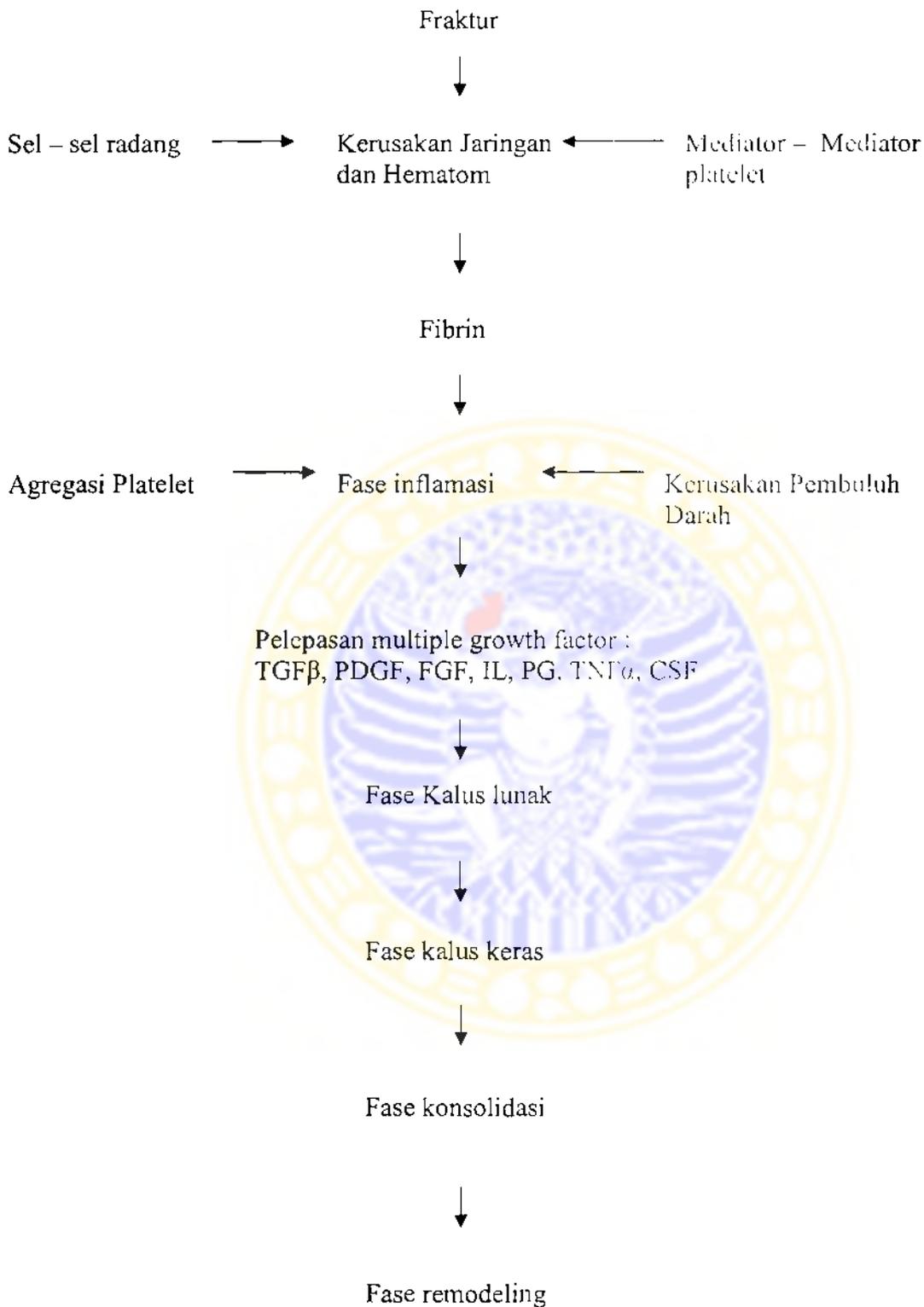
6. Remodeling tulang

Woven bone ini mulai mengalami remodeling menjadi tulang lamellar. Remodeling tulang terjadi hingga beberapa bulan. Pada tahap ini, patah tulang telah menyatu.

Pada binatang percobaan tikus proses penyembuhan fraktur yaitu : hematoma (0 – 2 hari), inflamasi (8 jam setelah fraktur 7 hari), kalus (8 – 21), konsolidasi (21 – 27 hari) dan *remodelling* (> 31 hari).

Sel yang *undifferentiated* pada kalus berkembang pada hari ke – 5. *Soft callus* menyatu dan mulai menyelubungi 2 ujung tulang patah. Pada tahap ini, tampak tulang subperiosteal yang pertama. Pada hari ke-7 terbentuk kartilago. Pada hari-1 muncul aktivitas resorpsi pada tulang yang patah untuk mengisi celah antara 2 ujung tulang. Kalus sentral masih didominasi oleh sel fibroblastik dan fibrocartiliginous. Pada hari-15, celah fraktur dipenuhi oleh kalus yang terdiri dari sebagian besar kartilago. Pada hari ke-21 terjadilah osifikasi pada area yang luas (*woven bone*). Kalus eksternal berkurang ukurannya. Dua ujung tulang yang patah menyatu dalam 28 hari (Dunham , 1992). Fraktur pada metatarsal *Rattus norvegicus* galur wistar dewasa mencapai union dalam 3 – 4 minggu (Dodds *et al*, 1984).

Skema proses penyembuhan fraktur :



2.4 Sifat Dasar Obat NSAID

Obat – obat golongan ini sebagian besar mempunyai efek terapi yang tergantung dari penghambatan biosintesis prostaglandin. Golongan obat ini menghambat enzim siklooksigenase sehingga konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin G2 terganggu. Mekanisme utama obat golongan NSAID adalah penghambatan siklooksigenase, suatu enzim yang berperan dalam biosintesis prostaglandin (Jackson dan Morrow, 2001). NSAID menghambat produksi prostaglandin yang berperan dalam inflamasi (Melmon *et al*, 1992).

Ada beberapa golongan NSAID, yaitu : (Goodman dan Gilman's, 2001).

1. Asam karboksilat :

- a. Asam asetat : - derivat asam fenilasetat : diklofenak, fenklofenak.
- derivat asam asetat inden / indol : indometasin, sulindak, tolmetin.
- b. Derivat Asam salisilat : aspirin, beronilat, diflunisal, salsalat.
- c. Derivat Asam propionat : asam triapofenat, fenbufen, fenoprofen, flubiprofen, ibuprofen, ketoprofen, naproksen.
- d. Derivat Asam fenamat : asam mefenamat, meklofenamat

2. Asam enolat :

- a. derivat pirazolon : azapropazon, fenilbutazon, oksifenbutazon.
- b. derivat oksikam : piroksikam

2.4.1 Inflamasi

Fenomena inflamasi sampai sekarang belum dapat dijelaskan secara rinci pada tingkat bioseluler. Fenomena inflamasi ini meliputi kerusakan mikrovaskuler, meningkatnya permeabilitas kapiler dan migrasi leokosit ke jaringan radang. Gejala proses inflamasi yang sudah dikenal adalah kalor, rubor, tumor, dolor, dan *functio laesia*. Selama berlangsungnya fenomena inflamasi banyak mediator kimiawi yang dilepaskan secara lokal antara lain histamin, 5 – hidroksitriptamin (5 HT), faktor kemotaktik, bradikinin, leukotrien, dan prostaglandin. Dengan migrasi sel fagosit ke daerah ini, maka membran lisosim pecah dan melepaskan enzim pemecah. Obat tersebut dapat dikatakan tidak berefek terhadap mediator kimiawi tersebut kecuali prostaglandin.

Secara invitro terbukti bahwa prostaglandin E₂ (PGE₂) dan prostasiklin (PGI₂) dalam jumlah nomogram, menimbulkan eritema, vasodilatasi dan peningkatan aliran darah lokal. Histamin dan bradikinin dapat meningkatkan permeabilitas vaskular, tetapi efek vasodilasinya tidak besar. Dengan penambahan sedikit prostaglandin, efek eksudasi plasma histamin dan bradikinin akan lebih jelas. Migrasi leukosit ke jaringan radang merupakan aspek penting dalam proses inflamasi. Prostaglandin sendiri tidak bersifat kemotaktik, tetapi produk lain dari asam arakinodat yakni leukotrien B₄ merupakan zat kemotaktik yang sangat poten. Obat ini tidak menghambat sistem lipoksigenase yang menghasilkan leukotrien sehingga golongan obat ini tidak menekan migrasi sel. Walaupun demikian pada dosis tinggi terlihat juga penghambat migrasi sel tanpa mempengaruhi enzim lipooksigenase.

Obat yang menghambat biosintesis prostaglandin maupun leukotrien tentu akan lebih poten menekan inflamasi (Goodman dan Gilman's, 2001; Wilmana, 1991).

2.4.2 Rasa nyeri

Prostaglandin hanya berperan pada nyeri yang berkaitan dengan kerusakan jaringan atau inflamasi. Penelitian telah membuktikan bahwa prostaglandin menyebabkan sensititas reseptor nyeri terhadap stimulasi mekanik dan kimiawi seperti bradikinin dan histamin merangsangnya dan menimbulkan nyeri yang nyata.

Obat ini tidak mempengaruhi hiperalgesia atau nyeri yang ditimbulkan oleh efek langsung prostaglandin. Ini menunjukkan bahwa sintesis prostaglandin yang dihambat oleh golongan obat ini (Wilmana, 1991).

Nyeri pada sistem muskuloskeletal akibat dari fraktur atau trauma disebabkan oleh serabut saraf rusak atau disekresikan prostaglandin pada stadium inflamasi dan pembentukan kalus, dan sering diobati dengan NSAID.

2.5 Sodium Diklofenak

2.5.1. Farmakodinamik

Diklofenak merupakan suatu derivat *asam phenylacetic*, yaitu suatu *nonsteroid anti – inflammatory drug* (NSAID), yang tersedia dalam bentuk diklofenak sodium (*enteric coated*) tablet dan diklofenak potasium tablet.

Diklofenak mempunyai efek farmakologi yang mirip dengan NSAID yang lain. Obat ini berfungsi sebagai anti inflamasi, analgetik dan anti piretik. Mekanismenya belum diketahui secara jelas tetapi efek yang tampak berhubungan dengan penghambatan sintesis prostaglandin pada jaringan

UNAIR
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIR MATA
SURABAYA

tubuh dengan menghambat *cyclooxygenase*, suatu enzim yang memecah (mengkatalisis) pembentukan *prostaglandin precursor (endoperoxides)* dan asam arachidonat. Pada mukosa gaster dapat timbul ulkus dan perdarahan karena penghambatan sintesis prostaglandin (contoh : prostaglandin E, prostacyclin) juga menghambat *platelet aggregation* dan menimbulkan waktu perdarahan yang memanjang (Goodman dan Gilman's, 2001; Melmon dan Morrelli's, 1992).

2.5.2. Farmakokinetik

a. Absorpsi

Sodium diklofenak dengan cepat dan hampir komplet diabsorpsi dengan GI tract. Obat melalui metabolisme pertama di liver dengan hanya 50 – 60 % dosis sodium diklofenak mencapai sirkulasi sistemik. Konsentrasi puncak dalam plasma umumnya terjadi dalam 1 jam (antar 0,33 – 2 jam) atau 2 – 3 jam (diantara 1 – 4 jam), setelah pemberian obat oral. Dosis tunggal 100 mg sodium diklofenak pada manusia, rata – rata konsentrasi puncak plasma 417 ng/ml umumnya terjadi dalam 2 – 3 jam.

b. Distribusi

Distribusi diklofenak di jaringan dan cairan tubuh manusia tidak khas, sedangkan pada tikus pemberian diklofenak intra vena didistribusikan secara luas, konsentrasi paling tinggi pada kandung empedu, liver, darah, jantung, paru , dan ginjal. Konsentrasi paling rendah pada adrenal, thyroid, kelenjar ludah, pankreas, limpa, otot dan medulla spinalis.

Diklofenak secara luas di dalam plasma berikatan dengan protein terutama albumin, kurang lebih 99 – 99,8 %.

c. Metabolisme

Pada pemberian per oral pada setiap individu sehat, *elimination half life* dari obat kira – kira 1,2 – 2 jam.

Pada pemberian per oral atau IV, diklofenak diekskresi dalam urine dan feses, dalam jumlah kecil diekskresi dalam bentuk tak berubah. Ekskresi melalui feses terjadi terutama melalui kandung empedu. Konjugat diklofenak yang tidak berubah diekskresi melalui kandung empedu, sedangkan metabolisme hidroksi diekskresi lewat urin. Pada binatang percobaan metabolisme diklofenak diketahui melalui sirkulasi enterohepatik.

Pada orang dewasa yang sehat pemberian diklofenak peroral atau IV, kurang lebih 50 – 70 % dari dosis diekskresi ke urin dan 30 - 35 % diekskresi dalam feses dalam 96 jam dan 20 – 30 % dosis yang diekskresi melalui urin dalam bentuk konjugasi 4 – hydroxydiclofenac (Goodman dan Gilman's, 2001; Melmon dan Morrelli's, 1992).

2.6 Efek Prostaglandin dan Thromboksen

Prostaglandin dan Thromboxanes mempunyai 4 efek utama pada otot halus : pernafasan, pencernaan, *reproductive*, dan pembuluh darah.

A. Otot halus :

1. Vaskular-TXA₂ adalah sel otot halus mitogen dan satu – satunya eicosanoid yang mempunyai efek pada vascular. TXA₂ adalah vasokonstriktor poten. Prostaglandin merangsang fase dilatasi dengan menurunkan kalsium intraseluler otot halus. Prostasiklin disintesis oleh otot halus dan sel endotel. PGI₂ lebih stabil namun

merupakan produk yang inaktif, sedangkan PGE_2 adalah vasodilator endotel.

2. Saluran gastrointestinal – sebagian besar prostaglandin dan tromboxan mengaktifkan otot halus gastrointestinal. Otot longitudinal dikontraksikan oleh PGI_2 dan $\text{PGF}_{2\alpha}$. Sedangkan otot sirkular dikontraksikan PGI_2 dan PGE_2 , dan direlaksasikan oleh PGE_2 .
3. Saluran pernafasan – otot halus saluran pernafasan direlaksasi oleh PGE_1 , PGE_2 dan PGI_2 dan dikontraksikan oleh TXA_2 dan $\text{PGF}_{2\alpha}$.

B. Platelet dan sel darah

Agregasi platelet dipengaruhi oleh eikosanoid. PGE_1 dan PGI_2 efektif menghambat agregasi sedangkan TXA_2 merupakan agregator platelet yang poten. Platelet melepaskan TXA_2 selama aktivasi dan agregasi.

C. Ginjal

Medulla dan cortex ginjal mensintesis prostaglandin. Komponen ini berperan penting dalam autoregulasi fungsi ginjal dengan memodifikasi haemodinamik ginjal dan fungsi glomerular dan tubular. Fungsi pengaturan sangat penting bagi kerja ginjal seperti ditunjukkan dengan penurunan fungsi ginjal yang berkaitan dengan penggunaan inhibitor siklooksigenase pada pasien manula dan pasien dengan penyakit ginjal. Produk eikosanoid utama dari cortex ginjal adalah PGE_2 dan PGI_2 . PGE_1 , PGE_2 dan PGI_2 meningkatkan filtrasi glomerular melalui efek vasodilatasi. Prostaglandin juga meningkatkan sekresi air dan sodium. TXA_2

meningkatkan transport air pada ginjal. PGE_2 terlibat pada ekskresi fosfat ginjal.

D. Organ reproduksi

1. Organ reproduksi wanita

Prostaglandin mempunyai pengaruh penting pada organ reproduksi wanita yang meliputi :

a. Aborsi : PGE_2 dan $\text{PGF}_{2\alpha}$. Mempunyai aksi oksitoksik yang merangsang kontraksi uterus selama kehamilan.

b. Dismenorea : PGE_2 dan $\text{PGF}_{2\alpha}$ meningkatkan sintesis endometrial selama menstruasi dengan disertai kontraksi uterus yang memicu rasa sakit sistemik.

c. PGE_2 dan $\text{PGF}_{2\alpha}$ menghasilkan prostasin yang menimbulkan nausea, vomiting, diare, penurunan tekanan darah, peningkatan denyut jantung preeklamsia- eklamsia atau penyakit jantung dan ginjal. Bahkan beberapa menyebabkan kematian fetus intra uterin dan perdarahan pospartum.

2. Organ reproduksi pria

PGE_1 pada beberapa kasus menyebabkan ereksi yang berkepanjangan dan priapism, dan meningkatkan ereksi pada keadaan merelaksasi otot halus corpora cavernosa.

E. Susunan saraf pusat dan susunan saraf perifer

1. Demam

PGE₁-PGE₂ meningkatkan suhu tubuh apalagi jika dimasukkan dalam ventrikel serebral.

2. Tidur

PGD₂ menyebabkan tidur alami saat diinjeksikan ke ventrikel serebral.

3. Neurotransmisi

Komponen PGE menghambat pelepasan nor epineprin dari ujung saraf post ganglionik simpatetik.

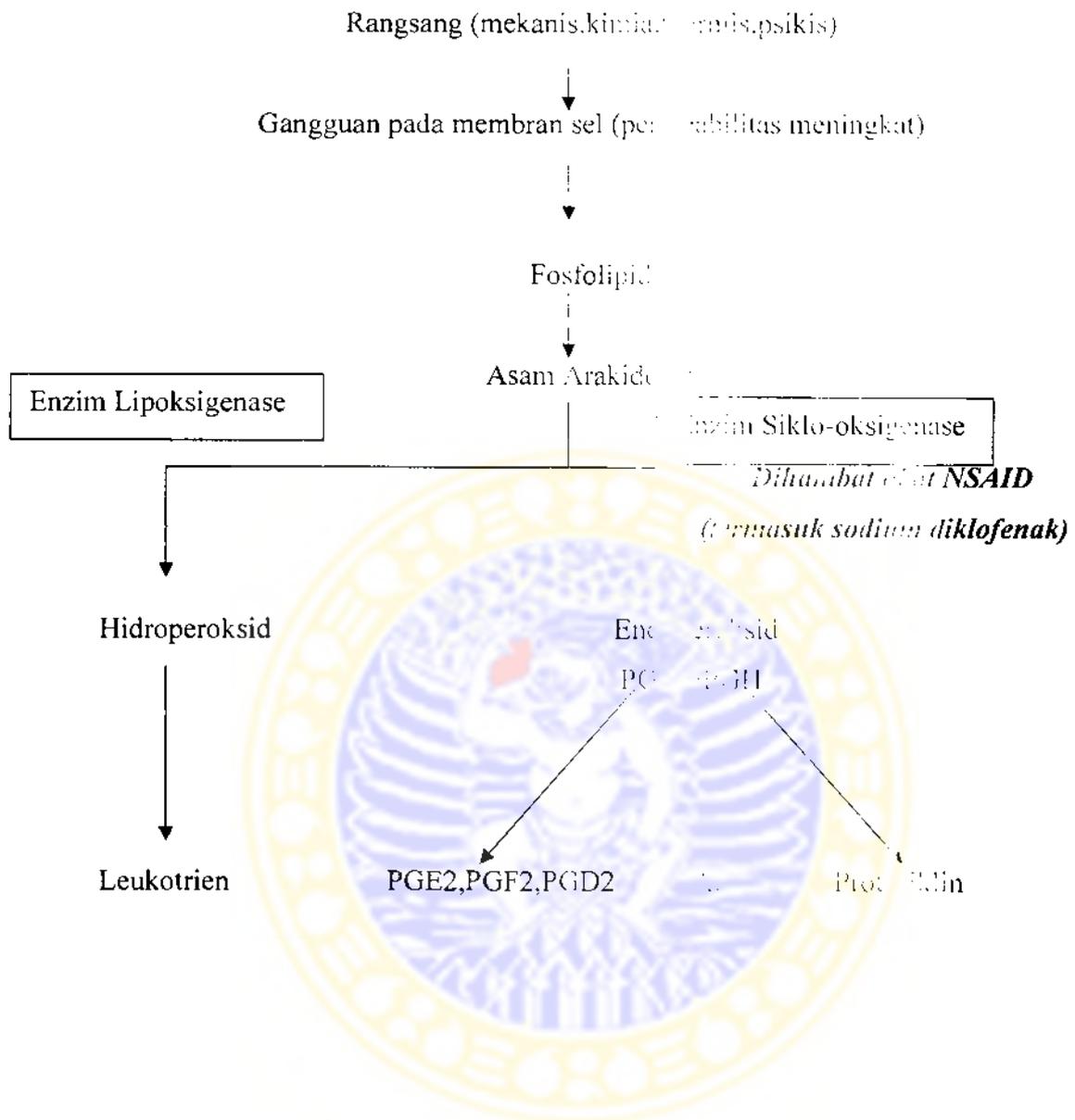
F Organ neuroendokrin

Uji in vitro dan in vivo menunjukkan bahwa eikosanoid mempengaruhi sekresi neuro hormon. PGE merangsang pelepasan hormon pertumbuhan, prolaktin, SH, ACTH, FSH dan LH

G. Metabolisme tulang

Prostaglandin sangat berlimpah pada jaringan skeletal dan dihasilkan oleh osteoblas dan sel hematopoetik disekelilingnya. Efek mayor prostaglandin secara in vivo adalah untuk meningkatkan bone turn over yaitu stimulasi resorpsi tulang dan pembentukan tulang. Prostaglandin mendukung kekuatan mekanik tulang dan beberapa perubahan pada inflamasi tulang. Prostaglandin juga berperan dalam hilangnya tulang pada saat menopause.

Skema titik tangkap hambatan prostaglandin :

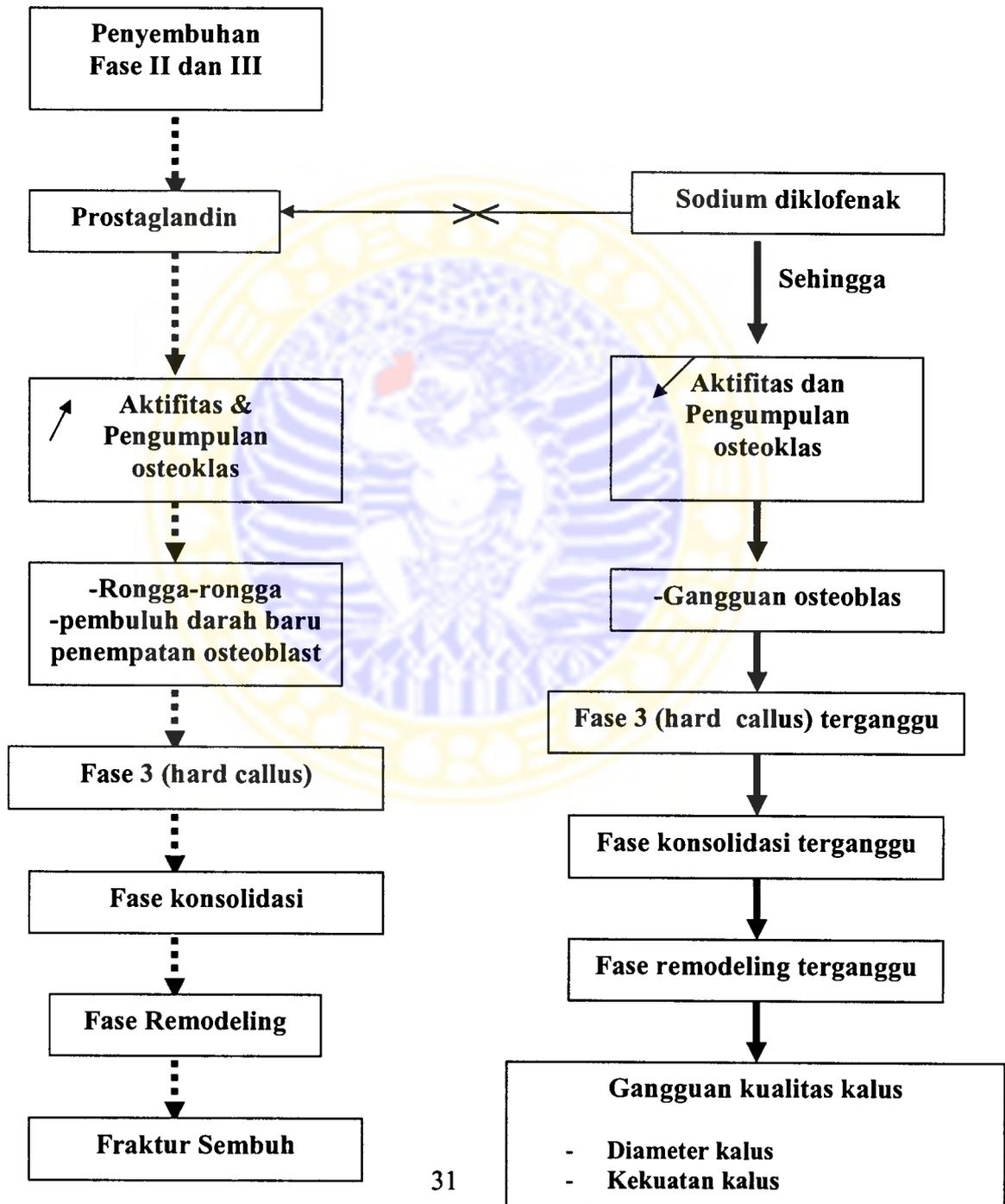


BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Berdasarkan kerangka konseptual penelitian di atas maka dapat disusun suatu bagan sebagai berikut :



3.2 Dasar Teori

1. Pada fraktur terjadi kerusakan jaringan dan hematoma di daerah sekitar fraktur.
2. Fase inflamasi (Fase II) terbentuk prostaglandin. Pada fase kalus lunak (Fase III) juga disekresi prostaglandin. Prostaglandin disini berperan dalam meningkatkan aktifitas osteoklas dan merangsang pengumpulan osteoklas baru. Jaringan tulang yang mati akan dibersihkan dari daerah fraktur. Setelah itu diikuti pembentukan pembuluh darah baru, penempatan osteoblas, pelepasan zat aktif dan pembentukan matrik tulang baru. Aktifitas osteoblas didahului oleh aktifitas osteoklas, sehingga bila ada gangguan aktifitas osteoklas maka aktifitas osteoklas juga terganggu (Apley AG,1997, Joseph AB,1996,Ogden JA,1996)
3. Sodium diklofenak salah satu obat golongan NSAID secara spesifik menghambat siklooksigenase yang mengakibatkan produksi prostaglandin terganggu. Pemberian sodium diklofenak mengakibatkan terhambatnya aktifitas dan pengumpulan osteoklas, berkurang atau tidak terbentuk yang mengakibatkan gangguan penempatan osteoblas
4. Penurunan produksi prostaglandin menyebabkan permeabilitas pembuluh darah di sekitar daerah fraktur menurun (vasokonstriksi). Dengan menurunnya permeabilitas pembuluh darah menurun mengakibatkan hipovaskularisasi di daerah fraktur. Sehingga menurunkan kualitas kalus (diameter dan kekuatan kalus).

3.3 Hipotesis Penelitian

Sodium diklofenak menurunkan kualitas kalus (diameter dan kekuatan kalus) pada penyembuhan fraktur.

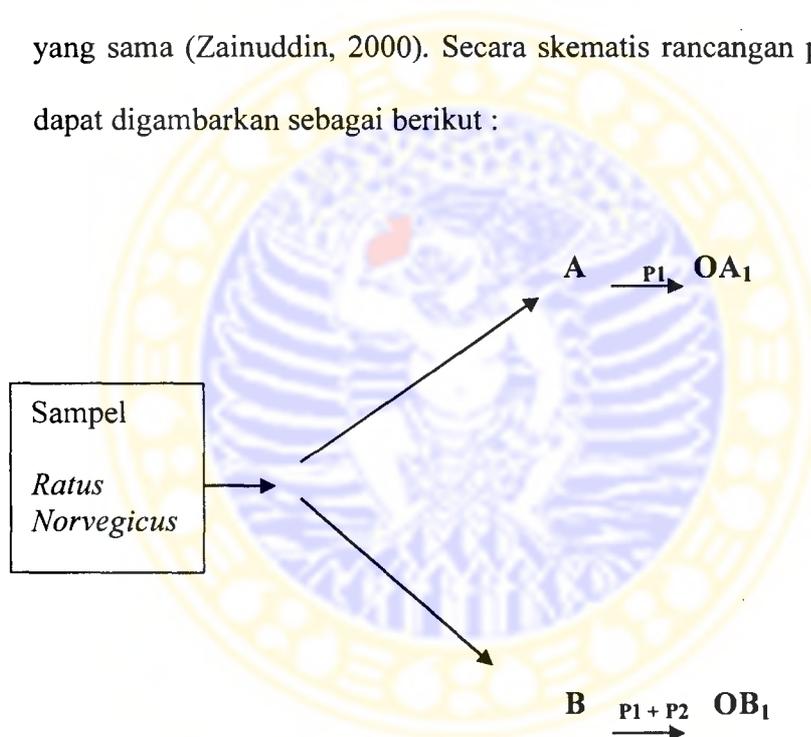


BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dilakukan studi eksperimental laboratoris dengan *post test only control group design*. Dalam rancangan penelitian eksperimental ini tanpa pengukuran awal (pretest), tetapi hanya posttest saja. Hal ini dilakukan karena diasumsikan tiap unit populasi adalah “homogen”, itu berarti semua karakteristik antar unit populasi adalah sama, karena berasal dari satu populasi yang sama (Zainuddin, 2000). Secara skematis rancangan penelitian tersebut dapat digambarkan sebagai berikut :



R : Random

A : Kelompok kontrol

P₁ : Perlakuan fraktur

B : Kelompok perlakuan

P₂ : Pemberian preparat sodium diklofenak

OA₁ : Kelompok kontrol setelah P₁ tanpa pemberian sodium diklofenak

OB₁ : Kelompok perlakuan setelah P₁ dengan pemberian sodium
Diklofenak

4.2 Besar Sampel dan Alokasi Random

4.2.1 Penentuan besar sampel

Sampel penelitian ditentukan dengan random sampling. Besar sampel ditentukan berdasarkan perhitungan rumus besar sampel dari Higgins dan Kleinbaum (1985) dengan formulasi sebagai berikut :

$$n = \frac{1}{(1-f)} \left| \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 Sc^2}{(Xc - Xt)^2} \right|$$

Keterangan :

n = besar sampel

Z α = harga standar α 0,05 = 1,65

Z β = harga standar β 0,1 = 1,28

Xc = nilai rata-rata kelompok kontrol

Xt = nilai rata-rata kelompok perlakuan

Sc = standar deviasi kelompok kontrol

Hasil perhitungan adalah 10 ekor tikus dalam tiap kelompok. Rincian perhitungan dilampirkan pada lampiran 1.

4.2.2 Alokasi random

Alokasi random yang digunakan adalah *random sampling*. Penentuan sampel dilakukan randomisasi menurut *random number*.

Sampel yang diambil secara acak dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu :

1. Kelompok perlakuan : sampel yang diberikan preparat sodium diklofenak 1,8 mg/200 gram BB/ hari selama 28 hari dengan dosis pemberian 1 kali sehari.
2. Kelompok kontrol : sampel yang diberikan larutan CMC Na 0,5% selama 28 hari dengan dosis pemberian 1 kali sehari.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Sodium diklofenak per oral.

4.3.2 Variabel tergantung

Diameter kalus dan kekuatan kalus.

4.3.3 Variabel kendali

Jenis hewan coba, jenis kelamin hewan coba, kesehatan fisik hewan coba, pemeliharaan dan perawatan hewan coba.

4.3.4 Variabel moderator

Barat badan tikus.

4.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel-variabel dalam penelitian ini didefinisikan sebagai berikut :

1. Sodium diklofenak

Pemberian sodium diklofenak 1,8 mg/200 gram BB/hari dilakukan setelah frakturasi pada kelompok perlakuan, sedangkan pada kelompok kontrol diberikan larutan CMC Na 0,5%. Pada pemberian sodium

diklofenak secara per sonda dengan menggunakan *Nasogastric tube* ukuran no 8 yang dimasukkan melalui mulut sampai ke dalam lambung. Sodium diklofenak yang digunakan dengan dosis 1,8/200gram BB tikus/hari (Laurence dan Bacharah, 2001) sesuai tabel konversi pada lampiran 2 dan 3. Volume larutan obat yang diberikan untuk setiap hewan coba adalah 2 ml sesuai dengan aturan pemberian volume larutan menurut Donatus dan Nurlaila (1986), seperti pada lampiran 4. Cara pembuatan larutan obat terlampir pada lampiran 5

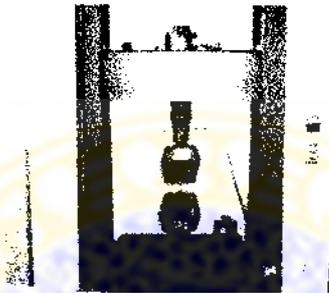
2. Diameter kalus : Jarak antar dua tepi kalus yang diukur yang melalui pusat kalus yang diukur dengan alat *Dissecting Microscope merk Spencer^R* tipe 501909 American Company Instrument Division Buffalo New York USA th 1987. Satuannya milimeter. Tata cara pengukuran diameter kalus terdapat pada lampiran 7.



Gambar 4.1

Alat *Dissecting Microscope merk Spencer^R* tipe 501909 American Company Instrument Division Buffalo New York USA th 1987.

3. Kekuatan kalus : Pembebanan yang diberikan dengan gaya tegak lurus pada suatu struktur yang seimbang yang menghasilkan dua momen yang sama dengan metode *three point bending test*. Alat yang digunakan adalah Autograf (*Shimadzu*), dengan satuan yang didapat adalah N (Newton). Tata cara pengukuran kekuatan kalus terdapat pada lampiran 7.



Gambar 4.2
Autograf Shimadzu

4. Jenis hewan coba : Jenis hewan coba adalah *Rattus norvegicus* galur wistar, dari UPT hewan percobaan Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Dipilih tikus *Rattus norvegicus* galur wistar, dengan pertimbangan bahwa binatang tersebut :
- a. Murah dan mudah pemeliharaannya
 - b. Sudah dewasa dalam waktu yang relatif singkat
5. Jenis kelamin hewan coba : Jantan. Pemeliharaan hewan coba yang keseluruhannya berjenis kelamin jantan didasarkan pada pertimbangan sebagai berikut :
- a. Dengan menggunakan hewan coba yang keseluruhannya berjenis kelamin jantan bisa menghindari efek dari siklus estrogen yang dapat mempengaruhi hasil penelitian.

- b. Dengan menggunakan hewan coba yang keseluruhannya berjenis kelamin jantan, dimaksudkan agar sample lebih homogen.
6. Umur hewan coba adalah *Rattus norvegicus* galur wistar berumur sekitar 3 bulan, karena pada umur tersebut tikus telah dewasa.



Gambar 4.3
Hewan coba *Rattus norvegicus*

7. Kesehatan fisik hewan coba
Ditandai dengan gerakan aktif hewan coba, bulu tidak kusam, berat badan tidak turun lebih dari 10 % selama aklimatisasi (selama 7 hari di laboratorium Biokimia FK Unair) dan berespon terhadap rangsangan di sekeliling.
8. Pemeliharaan dan perawatan hewan coba
Dilakukan dalam kandang 30 X 20 X 15 cm masing-masing 1 ekor hewan coba. Kandang terbuat dari plastik yang ditutup dengan anyaman kawat serta beralaskan sekam. Setiap hari sekali sekam diganti untuk menjaga kebersihan kandang. Makanan yang digunakan adalah makanan hewan jenis BR- produksi PT. Comfeed dan diberi minum Aqua (Smith, Mangkoewidjojo, 1998).

9. Berat badan hewan coba adalah sekitar 200 gram . Berat badan diukur dengan timbangan Torbal[®](*torsion balance*) *Fischer scientific* tahun 1980. Dengan ketelitian satu angka dibelakang koma.



Gambar 4.4
Timbangan Torbal[®]

4.5 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.5.1 Bahan penelitian

1. Hewan coba
Hewan coba adalah *Rattus norvegicus* galur wistar jenis kelamin jantan umur sekitar 3 bulan, berat sekitar 200 gram dalam kondisi sehat fisik.
2. Bahan perlakuan
 - a. Preparat sodium diklofenak (tablet) 100 mg *original* produksi PT Novartis
 - b. Placebo untuk kelompok kontrol berupa bahan suspensor CMC Na (Carboxy Methyl Cellulose Natrium) dalam 0,5% larutan pelarut.
3. Bahan pemeriksaan
 - a. Larutan ether

b. Kipas dan kasa

c. Kertas label

4.5.2 Instrumen penelitian

1. Kandang ukuran 30 x 20 x 15 cm
2. *Dissecting microscope Spencer*
3. Autograf (*Shimadzu*)
4. Sonde (*nasogastric tube no.8*)
5. Gunting dan pisau bedah
6. Benang
7. Sungkup untuk anestesi inhalasi
8. Timbangan Torbal

4.6. Prosedur penelitian

4.6.1. Aklimatisasi

Aklimatisasi hewan coba selama 7 hari dalam kondisi laboratorium.

4.6.2. Pembagian kelompok hewan coba

Dilakukan randomisasi 36 ekor tikus, dibagi menjadi 2 kelompok masing-masing terdiri dari 18 ekor, yaitu :

Kelompok 1 (kelompok perlakuan) = 18 ekor tikus

Kelompok 2 (kelompok kontrol)= 18 ekor tikus

4.6.3. Penimbangan berat badan

Penimbangan berat badan dilakukan pada pagi hari sebelum perlakuan pertama kali. Penimbangan dilakukan dengan timbangan Torbal[®] dengan satuan gram dan ketelitian satu angka dibelakang koma.

4.6.4. Pelaksanaan perlakuan

Semua kelompok yang terdiri dari 36 ekor tikus dibius dengan larutan ether dengan menggunakan sungkup. Anestesi dilakukan dengan cara titrasi. Anestesi mulai bekerja sekitar 2 menit ditandai dengan mata tikus mulai menutup, gerakan menjadi lambat. Kemudian dilakukan frakturasi dan imobilisasi tulang tungkai bawah salah satu sisinya dengan cara seperti tertulis pada lampiran 6.



Gambar 4.5
Sungkup Anestesi

Untuk kelompok 1 setelah frakturasi tikus akan ditambah perlakuan pemberian sodium diklofenak 1,8 mg/200 gram BB/ hari peronde dengan cara dan dosis seperti pada lampiran 2. Lama pemberian untuk kelompok 1 yaitu 28 hari. Kelompok 2 setelah frakturasi tikus diberi larutan placebo berupa larutan CMC Na 0,5% peronde dengan volume larutan sama dengan volume larutan sodium diklofenak. Pada hari ke 28

semua tikus di *sacrifice* dengan cara tikus dibius dengan ether (anastesi dalam) sampai tikus mati. Kemudian diukur diameter kalus dan kekuatan kalus.



Gambar 4.6

Melakukan frakturasi tulang tibia tikus

4.6.5. Pengukuran kekuatan dan diameter kalus

Pengukuran kekuatan kalus menggunakan autograf (*Shimadzu*), sedangkan pengukuran diameter kalus menggunakan *Dissecting microscope* Spencer. Cara pengukuran terdapat pada lampiran 7.



Gambar 4.7

Pengukuran Kekuatan Kalus



Gambar 4.8

Pengukuran Diameter Kalus

4.7 Lokasi Dan Waktu Penelitian

Laboratorium Biokimia FK UNAIR , Laboratorium Anatomi dan Histologi FK UNAIR dan Laboratorium Dasar UNAIR.

Waktu perlakuan adalah sebagai berikut :

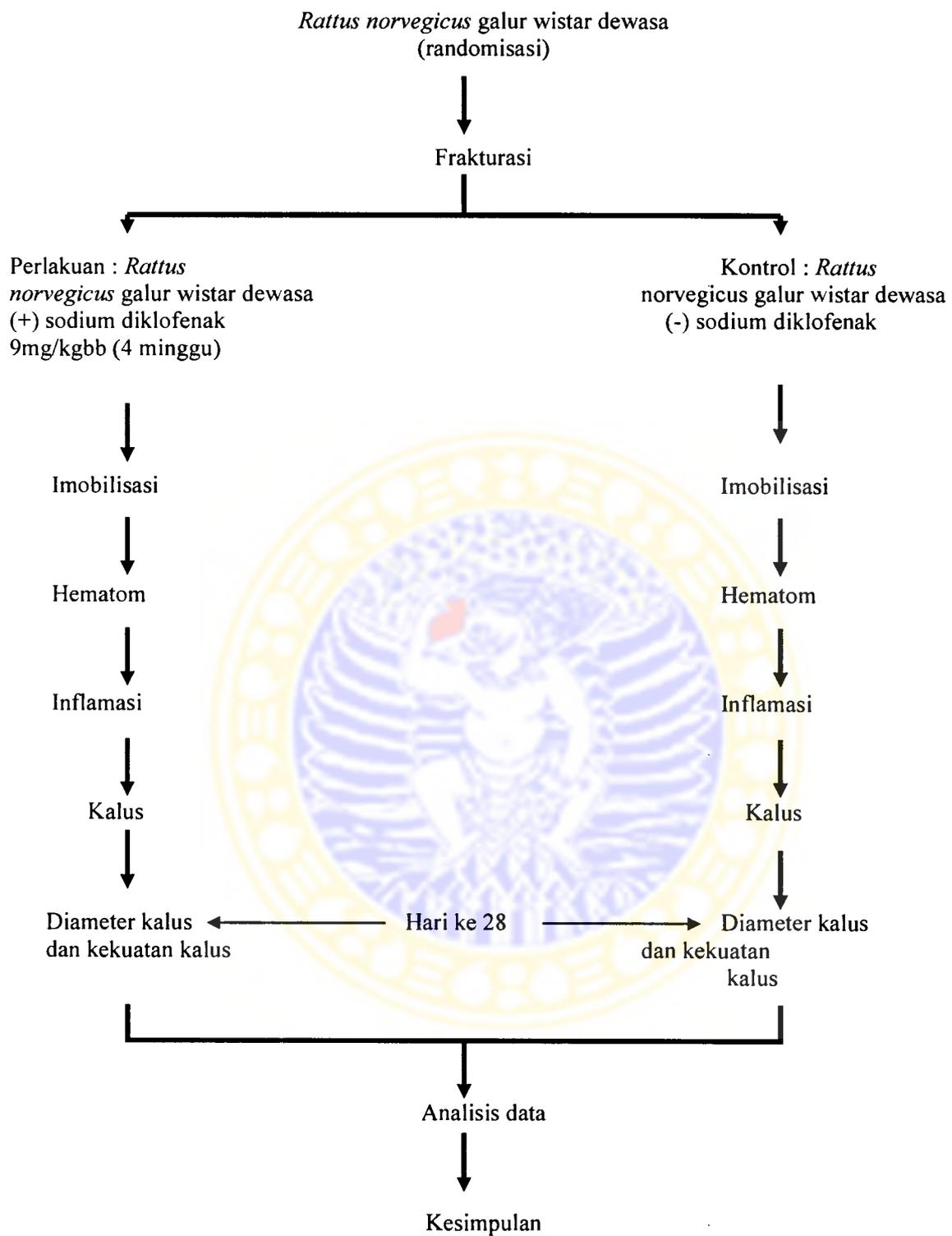
- a. 7 hari pertama digunakan sebagai tahap aklimasi hewan coba
- b. Semua kelompok difrakturisasi, diberikan perlakuan dengan pembagian kelompok perlakuan (Sodium diklofenak) dan kelompok kontrol (Larutan CMC Na) selama 4 minggu. Pada hari ke 28 dilakukan *sacrifice* dan diukur diameter dan kekuatan kalus.

Waktu yang diperlukan untuk melakukan penelitian sampai dengan selesainya pelaporan hasil penelitian adalah 8 minggu.

4.8 Analisis Data Statistik

Data yang terkumpul dilakukan perbandingan antara kelompok perlakuan yang mendapat sodium diklofenak dengan kelompok kontrol yang tidak mendapat sodium diklofenak. Kemudian data dianalisis untuk mencari perbedaan menggunakan uji *two independent samples t test*, dan hasil uji bermakna bila diperoleh $p \leq 0,05$. Analisis statistik yang dilakukan adalah analisis deskriptif, uji homogenitas, uji normalitas dan uji beda.

Bila dalam uji normalitas hasilnya tidak berdistribusi normal maka digunakan uji Mann-Whitney-U.

Skema Penelitian :

ANALISIS HASIL PENELITIAN

Data hasil penelitian eksperimental tentang pengaruh sodium diklofenak terhadap kualitas kalus pada penyembuhan fraktur kruris tikus putih jantan merupakan data hasil pengukuran kekuatan dan berat kalus tulang tibia hewan coba yang diukur menggunakan *Shimadzu* dan *Dissecting microscope* Spencer. Data yang telah terkumpul dideskripsikan dan diolah dengan program SPSS 10.0 for windows.

5.1. Data Penelitian

Hasil pengukuran kekuatan dan diameter kalus adalah pengukuran yang telah dilakukan pada kelompok hewan coba sebagai berikut :

1. Kelompok hewan coba yang mendapat dosis sodium diklofenak 1,8 mg / 200 gram BB / hari selama 28 hari.
2. Kelompok kontrol

Setelah mendapat perlakuan berupa pemberian sodium diklofenak dalam 28 hari data sebagai berikut , tertera pada tabel 5.1 :

Kelompok 1 : Kelompok yang mendapatkan perlakuan pemberian sodium diklofenak 1,8 mg / 200 gram BB / hari selama 28 hari.

Kelompok 2 : Kelompok kontrol

KK : Kekuatan Kalus (N)

DK : Diameter Kalus (mm)

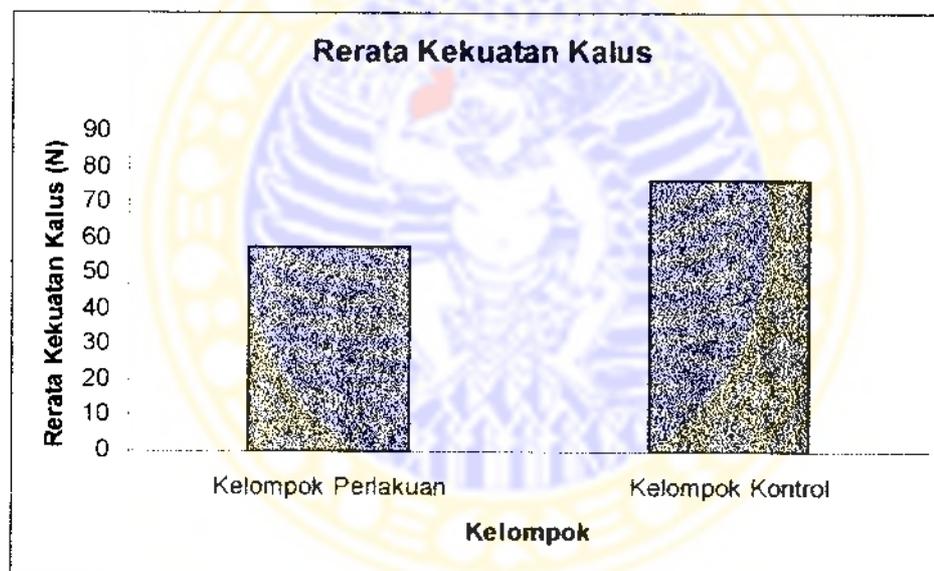
Tabel 5.1

Data hasil pengukuran kekuatan kalus (KK) dan diameter kalus (DK) dari kelompok perlakuan (kelompok 1) dan kelompok kontrol (kelompok 2)

Observasi	Kelompok 1		Kelompok 2	
	KK	DK	KK	DK
1	58	5	76	7
2	58	4	76	8
3	57.5	4	76.5	7
4	57.5	4	76.5	6
5	58	5	77	7
6	59	4	76.5	8
7	58	5	77	8
8	58	4	77	7
9	58.5	4	77	7
10	58	5	76.5	8
11	57.5	5	76.5	7
12	57	5	76	7
13	57	4	76	8
14	57	4	76.5	7
15	56.5	5	76.5	7
16	56.5	5	77	7
17	57	5	77	8
18	57	5	76.5	8

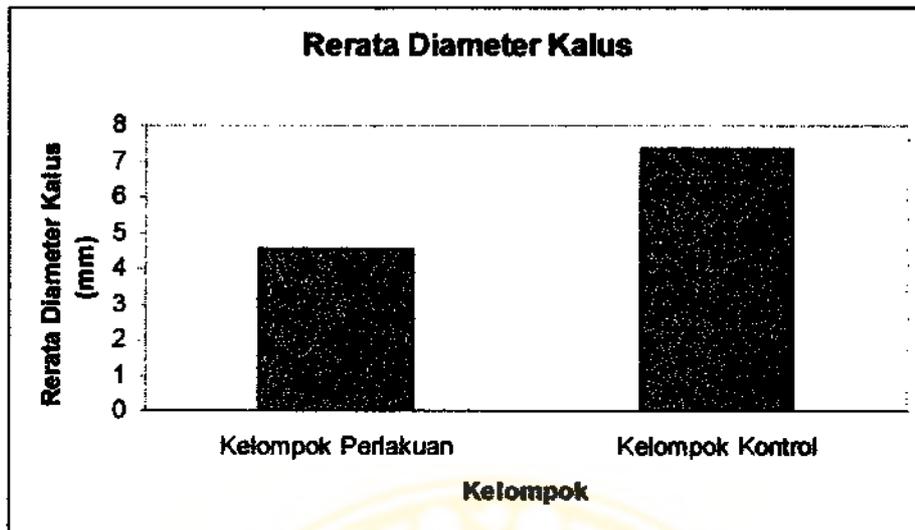
Tabel 5.1 menunjukkan hasil observasi kekuatan dan diameter kalus yang dilakukan pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol untuk menyelidiki pengaruh pemberian sodium diklofenak terhadap pembentukan kalus pada penyembuhan fraktur kruris tikus putih jantan. Hasil observasi menunjukkan kekuatan kalus tertinggi pada kelompok perlakuan (kelompok 1) tercatat pada observasi ke 6, yang memiliki kekuatan kalus sebesar 59 N dengan diameter kalus sebesar 4 mm. Sedangkan pada observasi yang dilakukan pada kelompok kontrol (kelompok 2), hasil pengukuran untuk kekuatan kalus tertinggi tercatat sebesar 77 N terjadi pada observasi 5, 7, 8, 9, 16 dan 17.

Grafik rerata kekuatan kalus



Gambar 5.1 Rerata kekuatan kalus

Jika dianalisis secara umum rerata kekuatan kalus yang tercatat pada observasi yang dilakukan pada dua kelompok observasi (kelompok perlakuan dan kelompok kontrol) dapat dilihat dalam gambar 5.1 diatas. Dari data observasi yang dilakukan rata-rata kekuatan kalus (KK) untuk kelompok perlakuan (kelompok 1) sebesar 57,556 N sedangkan observasi yang dilakukan pada kelompok kontrol rata-rata kekuatan kalus (KK) dalam penelitian ini sebesar 76,556 N.

Grafik rerata diameter kalus**Gambar 5.2 Rerata diameter kalus**

Untuk rerata diameter kalus yang dilakukan di dua kelompok observasi rata-rata Diameter Kalus (DK) untuk kelompok perlakuan (kelompok 1) sebesar 4,556 mm sedangkan pada kelompok kontrol rata-rata Diameter Kalus (DK) sebesar 7,333 mm dapat dilihat pada gambar 5.2.

5.2. Hasil Uji Statistik Deskriptif

Data hasil penelitian selanjutnya dianalisa secara deskriptif yang bertujuan untuk memperoleh gambaran yang jelas.

Tabel 5.2 Statistik deskriptif kekuatan kalus (N) dan diameter kalus (mm) dari kelompok perlakuan dan kontrol.

	Kelompok Perlakuan	Kelompok Kontrol
Kekuatan Kalus Terendah	56,500 N	76,000 N
Kekuatan Kalus Tertinggi	59,000 N	77,000 N
Rata-rata Kekuatan Kalus	57,556	76,556
Simpangan Baku Kekuatan Kalus	0,684	0,379
Diameter Kalus Terendah	4,000 mm	6,000 mm
Diameter Kalus Tertinggi	5,000 mm	8,000 mm
Rata-rata Diameter Kalus	4,556	7,333
Simpangan Baku Diameter Kalus	0,511	0,594

Pada tabel 5.2 menjelaskan hasil statistik deskriptif dari hasil observasi yang dilakukan pada kelompok tikus putih yang diberi sodium diklofenak dan kelompok kontrol. Dari tabel 5.2 dapat dilihat bahwa kekuatan kalus terendah yang terukur pada observasi yang dilakukan pada kelompok perlakuan tercatat sebesar 56,5 N, sedangkan pada kelompok kontrol tercatat sebesar 76 N. Pada observasi yang dilakukan untuk mengukur kekuatan kalus tertinggi yang tercatat pada kelompok perlakuan sebesar 59 N, sedangkan pada kelompok kontrol kekuatan tertinggi tercatat sebesar 77 N. Data diameter kalus terendah pada kelompok perlakuan tercatat sebesar 4 mm dan kelompok kontrol 6 mm, sedangkan untuk diameter kalus tertinggi yang berhasil diobservasi dalam penelitian ini didapatkan data sebesar 5 mm pada kelompok perlakuan dan pada kelompok kontrol diameter kalus tertinggi sebesar 8 mm. Dari observasi yang dilakukan pada dua

kelompok pengukuran untuk kekuatan kalus diketahui nilai rata-rata kekuatan kalus untuk kelompok perlakuan dan kelompok kontrol masing-masing sebesar 57,556 N dan 76,556 N. Rata-rata untuk diameter kalus yang diobservasi pada kelompok perlakuan sebesar 4,556 mm dan kelompok kontrol sebesar 7,333 mm. Sedangkan nilai simpangan baku (standar deviasi) observasi pada dua kelompok pengukuran untuk kekuatan kalus diketahui simpangan baku kekuatan kalus untuk kelompok perlakuan dan kelompok kontrol masing-masing sebesar 0,684 dan 0,379. Simpangan baku untuk diameter kalus yang diobservasi pada kelompok perlakuan sebesar 0,511 dan kelompok kontrol sebesar 0,594.

5.3 Hasil Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah varians sampel berbeda atau tidak. Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan uji Levene seperti tampak pada tabel 5.4 Hasil uji homogenitas secara singkat adalah sebagai berikut.

Tabel 5.3 Uji Homogenitas dengan Levene's Test Berat Tikus

	F	Sig.
Berat tikus	0,036	0,851

Sumber:lampiran

Berdasarkan tabel 5.4 di atas tampak bahwa berat tikus kelompok perlakuan dan kelompok kontrol adalah homogen ($p > 0,05$).

5.4 Hasil Uji Normalitas

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

kekuatan kalus dan diameter kalus semua kelompok dilakukan dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* tampak pada tabel 5.5

Tabel 5.4 Hasil uji distribusi data kelompok terhadap kekuatan kalus dan diameter kalus

	Prob. Kekuatan Kalus	Prob. Diameter Kalus
Kelompok Treatment	0,098	0,000
Kelompok Kontrol	0,017	0,000

Sumber : Lampiran 10

Berdasarkan hasil uji normalitas data dengan menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* diketahui bahwa data kekuatan kalus berdistribusi normal, karena mempunyai nilai probabilitas $> 0,01$. Sedangkan data diameter kalus menunjukkan data yang tidak berdistribusi normal (Prob. $< 0,01$).

5.5 Hasil Uji Beda Dua Sampel

Uji beda dua sampel dilakukan untuk mengetahui apakah rata-rata sampel berbeda atau tidak. Uji beda dua sampel dilakukan dengan menggunakan uji beda *Independent Sample* seperti tampak pada tabel 5.6 Hasil uji beda secara singkat adalah sebagai berikut.

Tabel 5.5 Uji beda *Independent sample* terhadap Berat Tikus

	T hitung	Signifikansi
Berat tikus	0,833	0,411

Sumber:lampiran

Berdasarkan tabel 5.6 tampak bahwa tidak ada perbedaan antara berat tikus kelompok perlakuan (dengan pemberian Sodium Diklofenak) dengan berat tikus kelompok kontrol (tanpa pemberian sodium Diklofenak). Hal tersebut dapat dilihat dari nilai signifikansi uji t = 0,411 yang lebih besar daripada toleransi kesalahan ($\alpha = 0,05$).

5.6 Hasil Analisis Dengan Statistik Parametrik dan Statistik Non – Parametrik

Pada metode statistik parametrik, uji beda dua sampel dilakukan dengan menggunakan uji t, hanya saja uji t mensyaratkan data bertipe interval atau rasio, serta data mengikuti distribusi normal atau dianggap normal. Jika salah satu syarat tersebut tidak terpenuhi, maka uji t harus diganti dengan menggunakan uji statistik non-parametrik yang khusus digunakan untuk dua sampel bebas.

5.6.1 Uji beda kekuatan kalus

Data kekuatan kalus berdistribusi normal sehingga uji beda dua sampel dilakukan dengan menggunakan uji t .

Tabel 5.6 Data hasil uji t – *Independent sample* Kekuatan Kalus

	t hitung	Signifikansi
Kekuatan Kalus	-103,117	0,000

Sumber: Lampiran 10

Berdasarkan hasil uji beda dua sisi diatas diketahui bahwa nilai signifikansi $t < 0,01$ sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang signifikan antara rata-rata kekuatan kalus pada kelompok perlakuan pemberian sodium diklofenak 1,8 mg/ 200 gr dengan kelompok kontrol.

5.6.2 Uji beda diameter kalus

Data diameter kalus tidak berdistribusi normal sehingga menggunakan uji statistik non-parametrik dengan menggunakan uji Mann-Whitney .

Tabel 5.7 Data hasil uji Mann-Whitney Diameter Kalus

	Z hitung	Signifikansi
Diameter Kalus	-5,288	0,000

Sumber: Lampiran 10

Berdasarkan hasil uji beda dua sisi diatas diketahui bahwa nilai z hitung $> z$ tabel dengan tingkat kesalahan sebesar 1% dengan kesimpulan terdapat perbedaan yang signifikan pada rata-rata diameter kalus akibat perlakuan pemberian sodium diklofenak 1,8 mg / 200 gr dibandingkan dengan rata-rata kekuatan kalus pada kelompok kontrol.



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Karakter NSAID

Farmakologis NSAID berperan dalam proses inflamasi, bekerja menurunkan sintesis mediator *eicosanoid* (seperti prostaglandin dan golongan tromboksan) melalui penghambatan enzim siklooksigenase, suatu enzim yang memecah (mengkatalisis) pembentukan prostaglandin prekursor (endoperoxides) dan asam arachidonat dan mengurangi munculnya gejala klinis (Colville-Nash dan Gilroy, 2001). Prostaglandin menyatu dengan penyembuhan tulang dan berperan dalam respon inflamasi, dapat meningkatkan aktivitas osteoklas dan resorpsi tulang dan sekaligus meningkatkan aktivitas osteoblas dan pembentukan tulang baru. Sebagaimana NSAID lain yang menghambat enzim COX, prostaglandin juga menghambat penyembuhan tulang (Harder dan An, 2003). Obat anti inflamasi adalah agent yang digunakan pada klinis pada pasien trauma, patah tulang, mengikuti pembedahan karena efek analgesiknya. NSAID mempunyai efek anti inflamasi, analgesik dan antipiretik. Beberapa peneliti menunjukkan perlambatan penyembuhan patah tulang pada tibia secara histologis pada tikus yang diberikan NSAID (Allen *et al*, 1980; Giordano *et al*, 1999). Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Suhana, 2002 menjelaskan bahwa efek NSAID pada sintesis prostaglandin akan mengganggu kualitas kalus dan mengganggu proses penyembuhan patah tulang. Analisa biomekanik pada kalus tulang dianggap sebagai metode terbaik untuk mengevaluasi penyembuhan patah tulang dan penggunaan NSAID.

6.2 Karakter Sodium Diklofenak

Sodium Diklofenak, adalah jenis NSAID yang paling banyak digunakan, yang diturunkan dari asam fenilasetik dan ditujukan bagi penanganan kondisi kesakitan akut dan kronik, post-operasi dan inflamasi post-trauma, karena Sodium Diklofenak dapat menghilangkan rasa sakit dan menurunkan reaksi inflamasi dan edema (Kantor, 1986; Todd dan Sorkin, 1988). Mayoritas efek anti inflamasi Sodium Diklofenak berkaitan dengan penghambatan sintesis prostaglandin. Sodium Diklofenak adalah inhibitor kuat siklooksigenase secara *in vivo* dan *in vitro*. Sodium Diklofenak menurunkan sintesis prostaglandin dan juga tromboksan dan prostasiklin (Ku *et al*, 1975; Takayama *et al*, 1993; Todd dan Sorkin, 1988). Diklofenak dapat mengganggu proses konsolidasi dan metabolisme *osseous*, memicu penghambatan maturasi kalus dan menurunkan rigiditas tulang (Muller *et al*, 2004).

6.3 Pengaruh Pemberian Sodium Diklofenak Terhadap Kualitas Kalus

Menurut penelitian terdahulu (Suhana R, 2002) menyebutkan bahwa pemberian NSAID akan mengganggu proses penyembuhan fraktur. Hal ini akibat adanya gangguan aktifitas osteoklast dan osteoblast.

Beck *et al*, 2003 melakukan penelitian menggunakan tikus wistar yang telah dilakukan *transverse osteotomy* pada proksimal tibia kaki kirinya. Tikus coba dibagi menjadi 4 kelompok masing – masing 10 tikus yang terdiri dari kelompok 1 merupakan kelompok kontrol (tanpa pemberian obat), kelompok 2 diberikan tramadol (20mg/kg BB/hari), kelompok 3 diberikan sodium diklofenak (5 mg/kg BB/hari) selama 7 hari dilanjutkan dengan 14 hari tanpa obat apapun, kelompok 4 diberikan sodium diklofenak

(5 mg/kg BB/ hari) lebih dari 21 hari. Pada hari ke 21 tikus dibunuh tiap kakinya di X-ray, tulang tibianya di CT scan, *three point bending* dan histologi. Hasilnya menunjukkan bahwa tikus yang diterapi dengan sodium diklofenak 5 mg/kg BB/ hari mengalami penghambatan penyembuhan patah tulang (nilai densitas tulang, kekuatan tulang, kekakuan tulang yang tertinggi didapatkan pada kelompok 1 sebagai kelompok kontrol) jika dibandingkan dengan tikus yang diterapi tramadol 20mg/kg BB/hari atau tanpa obat apapun (kontrol). Sedangkan pada kelompok yang diberikan sodium diklofenak (kelompok 3 dan 4) mempunyai nilai densitas tulang, kekuatan tulang, kekakuan tulang yang lebih rendah dibandingkan kelompok yang diterapi dengan tramadol (kelompok 2). Kesimpulannya pemberian sodium diklofenak secara significant menghambat penyembuhan patah tulang pada tikus.

Akman *et al*, 2002 melakukan penelitian mengenai efek Sodium Diklofenak pada *union* patah tulang tibia tikus. Terdapat tiga kelompok yaitu : kontrol, diklofenak 1 mg/kg BB/hari, diklofenak 2 mg/kg BB. *Closed diaphyseal fracture* dilakukan pada tulang tibia kanan tikus. Kemudian dilakukan klinis, radiologis, histologis setelah minggu ke-2, minggu ke-4, dan minggu ke-6. Pada akhir minggu ke-2, pemeriksaan klinis menunjukkan perbedaan antara dua kelompok perlakuan dan kontrol. Pada kelompok kontrol tampak bentukan kalus yang lebih stabil.

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya pengaruh pemberian sodium diklofenak terhadap terganggunya kualitas kalus yang dilihat dari kekuatan kalus dan diameter kalus pada tikus jantan galur wistar. Berdasarkan hasil uji beda dua sisi diatas diketahui bahwa nilai z hitung $>$ z tabel dengan tingkat kesalahan sebesar 1% dengan kesimpulan, H_0 ditolak yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan pada rata-rata diameter kalus

akibat perlakuan pemberian sodium diklofenak 1,8 mg/kg BB/hari dibandingkan dengan rata-rata kekuatan kalus pada kelompok kontrol.

Sodium Diklofenak dapat memicu perubahan metabolisme tulang dan penyembuhan patah tulang karena Sodium Diklofenak mempengaruhi fase inflamasi penyembuhan (Keller *et al*, 1987). Melalui penghambatan siklooksigenase Sodium Diklofenak menurunkan sintesis pertama mediator inflamasi, termasuk prostaglandin yang bertanggungjawab terhadap aspek kemotaksis dari fase pertama penyembuhan patah tulang, kemudian mengurangi jumlah sel pada lokasi patah tulang dan mengabsorpsi kembali jaringan dan memungkinkan memodifikasi jumlah sel penting yang bertugas memperbaiki (*repair cells*) untuk pembentukan kalus tulang (Cerqueira, 2000). NSAID sebagai penyebab penurunan prostaglandin dan sintesis tromboksan mungkin mempengaruhi neoangiogenesis, sehingga semakin sedikit oksigen yang dialirkan ke sel mesenkim. Pada kondisi ini akan ada kecenderungan untuk terjadinya diferensiasi menjadi kondroblas dan fibroblas bertanggungjawab untuk sintesis matriks ekstraseluler tanpa afinitas kalsium. Oleh karena itu, kalus tulang yang *immature* dan *less mineralized* akan terbentuk (Allen *et al*, 1980).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Sodium Diklofenak dengan dosis 1,8 mg/200g dapat menurunkan kualitas kalus penyembuhan fraktur.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode pengukuran secara biokimia yaitu pengukuran kadar osteokalsin. Karena proses pembentukan tulang (*bone formation*) dapat diidentifikasi melalui pengukuran osteokalsin serum.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara biomolekuler terhadap sel tulang dengan perlakuan yang sama (pemberian Sodium diklofenak) sehingga akan diperoleh penjelasan yang lebih rinci mengenai efek Sodium Diklofenak terhadap kekuatan kalus hingga ke tingkat seluler atau molekuler.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian Sodium Diklofenak dengan dosis dan durasi pemberian obat sehingga dapat diketahui dosis dan durasi pemberian obat yang paling tepat yang menyebabkan penurunan kualitas kalus.

DAFTAR PUSTAKA

- Akman S, Gogus A, Sener N, Bilgic B, Aksoy B dan Seckin F. Effect of diklofenac sodium on union of tibial fractures in rats. Second Orthopaedic and Trauma Clinic, Sisli Etfal Hastanesi. *Adv Ther.* 2002 May – Jun ;19 (3) : 119 – 25.
- Allen HL, Wase A dan Bear WT, 1980. Indomethacin and aspirin : Effect of on non steroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. **Acta Orthop Scand** 51: 595 – 600
- Apley AG, Solomon L dan Mankin HJ, 1997. How Fracture heal. In: **Apley's System of Orthopaedics and Fracture.** 7th ed. Butherworth Heinemann: p 518 – 520.
- Aoroson J dan Cornell CN. Bone healing and grafting. In : Beaty JH, ed. **Orthopaedic Knowledge Update 6.** Rasemont Illinois : American Academy of Orthopaedic Surgeons. 1999 : p 25 – 36.
- Aubin JE., Bonnelye E. 2002. *Osteoprotegerin and its Ligand: A New Paradigm for Regulation of Osteoclastogenesis and Bone Resorbtion.* (Online). Available at : <http://www.medscape.Com/viewarticle/40891>. Tanggal akses : 30-9-2003.
- Avioli LV dan Krane SM , 1990. **Metabolic Bone Disease and Clinically related Disorders,** 2nd ed., Philadelphia-London- Toronto - Montreal - Sydney - Tokyo, p 8-15, 21-24
- Beck A, Krischak G, Sorg T, Augat P, Farker K, Merkel U, Kinzl L dan Claes L, 2003. Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing in **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery.** Springer – Verlag Heidelberg volume 123, number 7 : pp 327 -332.

- Bronner F dan Worrel RV, 1991. **A Basic Science Primer in Orthopaedics**, Williams and Wilkins, Baltimore- Hongkong - London - Munich - San Fransisco - Sydney - Tokyo, pp 14, 24, 53, 186.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR dan Recker R, 1995. Bone Biology, **J Bone Joint Surg (Am)**, 77(8): 1256-1272
- Buckwalter JA, Einhorn TA dan Simon SR, 2000. **Orthopaedic Basic Science, Biology and Biomechanic of The Musculoskeletal System**, 2nd ed., American Academy of Orthopaedic Surgeon, p 320-355.
- Cerqueira NF, 2000. **Efeito do diclofenaco de sodio sobre a cicatrizacao de anastomoses termino-terminais em arterias carotidas em coelhos: avaliacao anatomo-patologica e da forza de rupture.**[Tese]. Botucatu-SP, Brasol, Faculdade de Madicina Veterinaria e Zootecnia, 160 p
- Chu S, 1998. Basic Science, **Electronic Textbook**, www.worldortho.com. Tanggal akses 5 Juni 2004. Pk 12.00 WIB.
- Colville- Nash PR dan Gilrory DW, 2001. **Potensial adverse effects of cyclooxygenase-2 inhibition : Evidence from animal models of inflammation.** **BioDrugs 15(1): 1-9**
- Crenshaw AH, 1996. Biology of Freacture Healing (Bone Regeneration) in **Campbels Operative Orthopaedics Vol 2, 8th ed.**, Mosby Year Book, 735-737.
- Davenport S, www.linkpublishing.com/FTP/bonestudy.pdf. **Study of Bone.** Tanggal akses 26 Juni 2004. Pk. 12.30 WIB.
- Dodds RA, Caterall A, Bitensky L dan Chayen J, 1984. **Effects of fracture healing of an antagonist of vitamin K cycle.** **Calcif. Tissue Int. 36 : 233-238.**

- Duncan RL dan Tumer CH,1995. Mechanotransduction and the functional respons of bone to mechanical strain. **Calcif Tissue Int 57** : 344-358.
- Dunham J, 1992. **Metabolism of Fracture Callus in Bone Volume 5, Fracture and regeneration**, CRC Press Inc,Florida USA, hal 10-12.
- Einhorn TA, 2003. COX-2: Where are we in 2003 ? The role of cyclooxygenase 2 in bone repair. **Arthritis Res Ther 2003;5(1)** : 5-7 Epub 2002 Oct 21.
- Favus MJ. 1993. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2nd Ed. New York: Raven Press Ltd, p. 3-80.
- Fuller K, Owens JM., Chamber TJ. 1998. *Induction of Osteoclast Formation by Parathyroid Hormone Depends on an Action on Stromal Cells*. **Journal of Endocrinology** 158. p. 341-350.
- Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, Mielke C, Phippard D, Svagr B, Cullinane D dan Einhorn TA, 2003. Differential inhibition of fracture healing by non –selective and cyclooxygenase-2 selective non steroidal anti inflammatory drugs. **J Orthop Res 2003 Jul; 21(4)**: 670-5
- Giordano V, Giordano M dan Knackfuss I.G, 1999. Influencia do tenoxicam no processo de consolidacao de fractura de tibia. Estudo experimental em ratos. **Rev Bras Ortop 34**: 395 – 400.
- Goodman dan Gilman's,1996**The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th Mc Graw-Hill** p 617-624.
- Guyton AJ , 1996. **Text Book of Medical Physiology**, 9th ed, WB Saunders Co.USA, p 45

- Duncan RL dan Tumer CH,1995. Mechanotransduction and the functional respons of bone to mechanical strain. **Calcif Tissue Int** 57 : 344-358.
- Dunham J, 1992. **Metabolism of Fracture Callus in Bone** Volume 5, Fracture and regeneration, CRC Press Inc,Florida USA, hal 10-12.
- Einhorn TA, 2003. COX-2: Where are we in 2003 ? The role of cyclooxygenase 2 in bone repair. **Arthritis Res Ther** 2003;5(1) : 5-7 Epub 2002 Oct 21.
- Favus MJ. 1993. *Primer on the Metabolic Bone Deseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2nd Ed. New York: Raven Press Ltd, p. 3-80.
- Fuller K, Owens JM., Chamber TJ. 1998. *Induction of Osteoclast Formation by Parathyroid Hormone Depends on an Action on Stromal Cells*. **Journal of Endocrinology** 158. p. 341-350.
- Gerstenfeld LC, Thiede M, Seibert K, Mielke C, Phippard D, Svagr B, Cullinane D dan Einhorn TA, 2003. Differential inhibition of fracture healing by non –selective and cyclooxygenase-2 selective non steroidal anti inflammatory drugs. **J Orthop Res** 2003 Jul; 21(4): 670-5
- Giordano V, Giordano M dan Knackfuss I.G, 1999. Influencia do tenoxicam no processo de consolidacao de fractura de tibia. Estudo experimental em ratos. **Rev Bras Ortop** 34: 395 – 400.
- Goodman dan Gilman's,1996**The Pharmacological Basis of Therapeutics** 9th Mc Graw-Hill p 617-624.
- Guyton AJ , 1996. **Text Book of Medical Physiology**, 9th ed, WB Saunders Co.USA, p 45

- Keller J, Bunker C, Andreassen TT, Bak B dan Lucht U, 1987. Bone repair inhibited by indomethacin effects on bone metabolism and strength of rabbit osteotomies. **Acta Orthop Scand** 58: 379-383.
- Martini FH., William CO., Claire WG., Kathleen W., Ralph TH. 2001. *Fundamentals of Anatomy & Physiology*. New Jersey : Pentrice Hall inc, p. 597-967.
- Melmon KL, Morrelli HF, Hoffman BB dan Nierenberg DW, 1992. **Clinical Pharmacology Basic Principles in Therapeutics**, 3rd ed, McGraw Hill, New York, 488.
- Miller, 2000. **Review of Orthopaedics**, 3th ed., Philadelphia-Sounders, p 10,18-21.
- Muller SS, 1991. **Efeito da subnutricao na consolidacao da fratura da tibia no rato: estudo radiologico anatomopatologico e bioquimico.** [Tese]. Botucatu-SP, Brasil, Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), 175p.
- Ogden J.A, Ganey TM et al..1996. *Healing Respons* in Rockwood and Green's Fractures in Children, vol 3, 4th edition, Lippincot-Raven, p.44-47.
- Olubenga A., Baljit SM., Susanne C., Hindupur K. 2001. *a New Role in the Regulation of Osteoclastic Bone Resorbtion.* **The Journal of Cell Biology**. 146 : 1161-1172.
- Paralkar VM, Borovecki F, Ke HZ, Cameron KO, Lefker B, Grasser WA, Owen TA, Li M, DaSilva-Jardine P, Zhou M, Dunn RL, Dumont F, Korsmeyer R, Krasney P, Brown TA, Plowchalk D, Vukicevic S dan Thompson DD, 2003. An EP2 receptor-selective prostaglandin E2 agonist induces bone healing. **Proc Natl Acad Sci U.S.A** 2003 May 27;100(11) :6736-40.
- Riggs BL., Joseph LM. III. 1995. **Osteoporosis Etiology, Diagnosis, and Management.** Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, p.1-99, 319-330.

- Smith JB, Mangkoewidjojo S, 1998. **Pemeliharaan, pembiakan, dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis.** UI Press, Jakarta, p. 1-57.
- Suhana R. 2002. **Pengaruh Pemberian Natrium Diklofenak Terhadap Pembentukan Kalus Dilihat dari Jumlah Osteoblast pada Penyembuhan Patah Tulang Tibia Kelinci.** Tesis Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung, p. 27-33.
- Takayama F, Egashira T, Kudo Y dan Yamanaka Y, 1993. Effects of anti-free radical interventions on phosphatidylcholine hydroperoxide in plasma after ischemia-reperfusion in the liver of rats. **Biochem Pharmacol** 46: 1749 – 1757.
- Todd PA dan Sorkin EM, 1988. Diclofenac sodium : reappraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. **Drugs** 35: 244-285
- Tornkvist Hans, T.Sam Lindholm, Pelle Netz, Lennart Stromberg dan Tom C Lindholm BS, 1984. Effect of Ibuprofen and Indomethacin on bone metabolism in : **Clinical Orthopaedics and related Research, number 187, p 255-259.**
- Understanding NSAID – Induced Ulcers, <http://www.elfstom.com/arthritis/arthritis/Articles/nsaids/action.html>, 1997, pp : 1 – 4.
Tanggal akses 26 Juni 2004. Pk 12.30 WIB.
- Wilmana PF, 1991. **Analgesik-Antipiretik, Farmakologi dan Terapi,** Universitas Indonesia, edisi 3, 183-185.
- Wong B., Simon F., Yungwon C. 1999. **TRANCE is Necessary and Sufficient for Osteoblast-Mediated Activation of Bone Resorption in Osteoclasts.** *J Exp Med.* 188. p. 997-1001.

Xing, Lianping, Louise Carlson and Beryl Story. 2003. *Expression of Either NF- κ B P50 or P52 in Osteoclast Precursor is Required for IL-1 Induced Bone Resorption.*

Journal of Bone and Mineral Research. 18, p. 260-268.

Zainuddin M, 2000. Metode Sampling dan Ukuran Sampel , Rancangan Penelitian.

Metodologi Penelitian. Airlangga University Press, Surabaya, hal 50-53.



Lampiran 1

Data Analisis Hasil Penelitian Pendahuluan

Besar sampel penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Higgins dan Klinbaum (1985). Berdasarkan penelitian pendahuluan, didapatkan hasil :

$$n = \frac{1}{(1-f)} \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S_c^2}{(X_c - X_t)^2}$$

$$Z_{\alpha} = 1,65$$

$$Z_{\beta} = 1,28$$

$$\text{Diameter kalus } X_t = 4,4$$

$$X_c = 7$$

$$n = 3,67 \text{ dibulatkan menjadi } 4$$

$$\text{Kekuatan kalus } X_t = 66,08$$

$$X_c = 95,08$$

$$n = 17,34 \text{ dibulatkan menjadi } 18$$

Diambil jumlah n terbesar yaitu 18

Lampiran 2

Perhitungan dosis hewan coba menggunakan tabel konversi Laurence & Bacharach (1964) sebagai berikut :

Tabel 1, konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan dan manusia (Laurence & Bacharach, 1964 *cit* Donatus & Nurlaila, 1986)

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmot 400 gr	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 gr	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 gr	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,00267	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

Lampiran 3

Konversi perhitungan dosis sodium diklofenak untuk hewan coba adalah sebagai berikut :

Faktor konversi sesuai tabel : 0,018

Dosis sodium diklofenak sebagai standart pemberian adalah 100mg / hari

Dosis sodium diklofenak untuk hewan coba adalah :

$$0,018 \times 100\text{mg} / \text{hari} = 1,8 \text{ mg} / 200 \text{ gr bb tikus} / \text{hari}$$

$$9\text{mg} / \text{kg BB} / \text{hari}$$



Lampiran 4

Pemberian maksimal volume larutan obat pada perlakuan hewan coba berdasar tabel

Ritchel (1974) sebagai berikut :

Tabel 2. Volume maksimal larutan obat yang dapat diberikan pada hewan coba

(Ritchel, 1974 cit Donatus dan Nurlaila, 1986)

Hewan	Volume maksimum sesuai jalur pemberian				
	i.v	i.m	i.p	s.c	p.o
Mencit (20-30 gr)	0,5	0,05	1,0	0,5-1,0	1,0
Tikus (100gr)	1,0	0,1	2,0-5,0	2,0-5,0	5,0
Hamster (50 gr)	-	0,1	1,0-2,0	2,5	2,5
Marmot (250 gr)	-	0,25	2,0 -5,0	5,0	10,0
Merpati (300 gr)	2,0	0,5	2,0	2,0	10,0
Kelinci (2500 gr)	5,0-10,0	0,5	10,0-20,0	5,0-10,0	20,0
Kucing (3000 gr)	5,0-10,0	1,0	10,0-20,0	5,0-10,0	50,0
Anjing (5000 gr)	10,0-20,0	5,0	20,0-50,0	10,0	100,0

Lampiran 5

Cara membuat larutan obat sodium diklofenak :

1 tablet mengandung 100 mg sodium diklofenak. Dosis obat untuk 1 ekor tikus dengan berat 200 gram : 1,8 mg.

Suspending agent : CMC Na (*Carboxy Methyl Cellulose Natrium*) yang dibuat terlebih dahulu berupa larutan CMC Na 0,5%. 0,5 gram CMC Na dalam 100 ml aquadest.

Volume larutan sodium diklofenak yang akan diberikan per tikus per hari : 2 ml/200g BB tikus.

Volume larutan CMC Na 0,5% yang digunakan untuk melarutkan 1 tablet sodium diklofenak : $100/1,8 \times 2 \text{ ml} = 55,6 \text{ ml}$

Cara : 1 tablet sodium diklofenak yang telah dihaluskan dilarutkan kedalam 55,6 ml CMC Na 0,5%, 2 ml larutan tersebut berarti mengandung 1,8 mg sodium diklofenak yang sesuai dengan dosis untuk tikus dengan 200 gram.

Lampiran 6

Frakturasi hewan coba

Frakturasi hewan coba adalah jenis frakturasi transfersal pada salah satu sisi tulang tibia sepertiga tengah diafisis ekstremitas inferiornya dengan cara terbuka. Setelah tikus dibius dengan larutan ether, daerah kruris tikus kanan dicukur. Daerah operasi didisinfeksi dengan larutan povidon iodine 10%, ditutup dengan doek steril. Kemudian dibuat insisi memanjang sepanjang 1 cm. Kulit dibuka otot disisihkan, kemudian setelah tampak tulang tibia dan fibula, tulang tersebut digunting, setelah itu area operasi ditutup dengan jahitan primer dengan menggunakan Prolene 5.0. Luka operasi dirawat dengan pemberian salep antibiotika, kemudian ekstremitas yang difrakturasi difiksasi dengan menggunakan plaster cast of paris yang meliputi kedua sendi proksimal dan distal dari garis fraktur. Jaringan kalus pada tulang tibia didapat setelah hewan coba dikorbankan dengan cara anaestesi dalam dengan ether (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988)

Lampiran 7

Pengukuran diameter kalus

1. Pengukuran diameter kalus menggunakan *Dissecting Microscope Spence* :
Tulang tibia yang telah dibersihkan dari artefak, kemudian ditentukan area kalusnya, ditandai dengan jaringan berwarna putih yang menebal dari pertengahan diafisis tulang tibia.
2. Tulang tibia dipotong 2 cm dengan area kalus tepat ditengahnya.
3. Tulang tersebut diletakkan diatas obyek glass yang telah diberi skala pengukuran (mm). Dalam satuan millimeter.
4. Pengukuran menggunakan skala pembesaran 10 kali.
5. Dengan menggunakan pinset, dibawah dissecting mickroskop dicari diameter kalus yang paling tebal kemudian diukur dan dicatat.

Pengukuran kekuatan kalus

Kekuatan kalus dengan metode *three point bending test* yaitu suatu metode pembebanan yang diberikan dengan gaya yang tegak lurus pada suatu struktur yang menghasilkan dua momen yang sama. Alat yang digunakan adalah autograf (*Shimadzu*), dengan satuan yang didapat adalah N.

Lampiran 8**Data Berat Tikus**

Kelompok Perlakuan	Kelompok Kontrol
1. 206 gram	1. 206 gram
2. 204 gram	2. 204 gram
3. 204 gram	3. 204 gram
4. 204 gram	4. 205 gram
5. 204 gram	5. 206 gram
6. 205 gram	6. 206 gram
7. 205 gram	7. 205 gram
8. 205 gram	8. 205 gram
9. 204 gram	9. 205 gram
10. 205 gram	10. 204 gram
11. 206 gram	11. 204 gram
12. 206 gram	12. 204 gram
13. 204 gram	13. 204 gram
14. 204 gram	14. 205 gram
15. 206 gram	15. 205 gram
16. 206 gram	16. 204 gram
17. 205 gram	17. 204 gram
18. 205 gram	18. 204 gram

Lampiran 9

Data hasil pengukuran kekuatan kalus (KK) dan diameter kalus (DK) dari kelompok perlakuan (kelompok 1) dan kelompok kontrol (kelompok 2).

KELOMPOK 1 : Kelompok yang mendapatkan perlakuan pemberian sodium diklofenak 2 cc

KELOMPOK 2 : Kelompok kontrol

KK : Kekuatan Kalus (N)

DK : Diameter Kalus (mm)

<i>Observasi</i>	Kelompok 1		Kelompok 2	
	KK	DK	KK	DK
1	58	5	76	7
2	58	4	76	8
3	57.5	4	76.5	7
4	57.5	4	76.5	6
5	58	5	77	7
6	59	4	76.5	8
7	58	5	77	8
8	58	4	77	7
9	58.5	4	77	7
10	58	5	76.5	8
11	57.5	5	76.5	7
12	57	5	76	7
13	57	4	76	8
14	57	4	76.5	7
15	56.5	5	76.5	7
16	56.5	5	77	7
17	57	5	77	8
18	57	5	76.5	8

Lampiran 10 : Lampiran Pengolahan Data Statistik**STATISTIK DESKRIPTIF****Descriptive Statistics**

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
STRGTH_T	18	56.50	59.00	57.5556	.6836
STRGTH_C	18	76.00	77.00	76.5556	.3792
DIMTR_T	18	4.00	5.00	4.5556	.5113
DIMTR_C	18	6.00	8.00	7.3333	.5941
Valid N (listwise)	18				

UJI NORMALITAS**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
STRGTH_T	.187	18	.098	.929	18	.244
STRGTH_C	.225	18	.017	.815	18	.010**
DIMTR_T	.363	18	.000	.639	18	.010**
DIMTR_C	.324	18	.000	.752	18	.010**

** . This is an upper bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

UJI HOMOGENITAS DAN UJI BEDA DUA SAMPEL BERAT KALUS T-Test**Group Statistics**

	treatment	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
control	treatment	18	204.8889	.8324	.1962
	control	18	204.6667	.7670	.1808

Independent Samples Test

Equal variances assumed	control	Levene's Test for Equality of Variances	F	.036
			Sig.	.851
		t-test for Equality of Means	t	.833
			df	34
			Sig. (2-tailed)	.411
			Mean Difference	.2222
			Std. Error Difference	.2668
95% Confidence Interval of the Difference	control	t-test for Equality of Means	Lower	-.3199
			Upper	.7644
			t	.833
			df	33.775
Equal variances not assumed	control	t-test for Equality of Means	Sig. (2-tailed)	.411
			Mean Difference	.2222
			Std. Error Difference	.2668
			95% Confidence Interval of the Difference	Lower
	Upper	.7645		

Parametric Tests

T-Test : Kekuatan Kalus

Independent Samples Test

Kekuatan Kalus	Equal variances assumed	Levene's Test for Equality of Variances	F	6.890
			Sig.	.013
		t-test for Equality of Means	t	-103.117
			df	34
			Sig. (2-tailed)	.000
			Mean Difference	-19.0000
			Std. Error Difference	.1843
			95% Confidence Interval of the Difference	Lower Upper
				-19.3745 -18.6255
		Equal variances not assumed	t-test for Equality of Means	t
	df		26.557	
	Sig. (2-tailed)		.000	
	Mean Difference		-19.0000	
	Std. Error Difference		.1843	
		95% Confidence Interval of the Difference	Lower Upper	
			-19.3784 -18.6216	

Non Parametric Tests

Mann-Whitney Test : DIAMETER KALUS

Ranks

	KELOMPOK	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Diameter Kalus	Treatment	18	9,50	171,00
	Control	18	27,50	495,00
	Total	36		

Test Statistics^b

	Diameter Kalus
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	171,000
Z	-5,288
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

b. Grouping Variable: KELOMPOK