

Media Medika Muda

Copyright©2016 by Medical Faculty of Diponegoro University

Volume 1, Nomor 3

ISSN 1858-3318

September – Desember 2016

ARTIKEL ASLI



PENGARUH SUBSTITUSI TULANG DENGAN HIDROKSIAPATIT (HAp) TERHADAP PROSES REMODELING TULANG

Indah Lestari Vidyahayati¹⁾, Anne Handrini Dewi²⁾, Ika Dewi Ana²⁾

THE EFFECT OF BONE SUBSTITUTION AND HYDROXIAPATIT (Hap) TO THE BONE REMODELLING PROCESS

ABSTRACT

Background: Tissue damage by apatness, trauma, or diseases need a restoration to repair its function in a perfect condition. Several exerts have done to find materials on tissue substitution, include developing hidroxyapatite material (HAp). HAp represent bioactive material which has ability on osteoconductive, bioactivity, and biocompatibility in bone formation process. The aim of this research is to know the effect of bone substituton with hidroxyapatite (HAp) on bone histology image on rats tibia (*Rattus Sprague-Dawley*).

Methods: Research done with 15 male rats *Sprague-Dawley*, age 3 months, and made a defect on the right and left tibia. Each size 3 mm x 1,5 mm x 1 mm. The right defect as the treatment given by hidroxyapatite implantation and the left tibia as a control site without implantation. Each of the subject killed after 1, 2, 3, 4, and 8 weeks. The defect area has taken and made on histology image, than noticed and counted the amount of osteoblast, and osteoclast cells using fase contrast microscope. Data being analyzed by SPS 2000 with Two Way Anava method.

Results: The result shows that bone substitution with hidroxyapatite is not significant on the activity of osteoblast or osteoclast showed by the $p > 0,05$, but the between time analysis show signification on osteoclast ($p < 0,05$). Investigation on histology image shows the increase on new bone formation activity on the defect.

Conclusion: The bone substituton with hidroxyapatite (HAp) may increase the new bone formation activity on the defect of rats tibia (*Rattus Sprague-Dawley*).

Key words: Bone substitution, hidroxyapatite, bone cells, histology image

ABSTRAK

Latar belakang: Kerusakan jaringan oleh patah jaringan, trauma, atau penyakit memerlukan restorasi untuk memperbaiki fungsinya seperti sediakala. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menemukan bahan-bahan substitusi jaringan, termasuk mengembangkan bahan hidroxyapatite (HAp). HAp merupakan bahan bioaktif yang memiliki kemampuan osteokonduktif, bioaktivitas, dan biokompatibilitas dalam proses pembentukan tulang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh substitusi tulang dengan hidroksiapatit (HAp) pada gambaran histologis tulang pada tibia tikus (*Rattus Sprague Dawley*).

Metode: Penelitian dilakukan dengan 15 tikus jantan *Sprague Dawley*, usia 3 bulan, dengan membuat defek di tibia kanan dan tibia kiri. Setiap defek berukuran 3 mm x 1,5 mm x 1 mm. Sebagai perlakuan diberikan implantasi hidroksiapatit pada defek tibia kanan dan tibia kiri sebagai situs kontrol tanpa implantasi. Masing-masing subjek didekapitasi setelah 1, 2, 3, 4, dan 8 minggu. Daerah defek diambil dan dibuat gambaran histologi, kemudian dilakukan pengamatan dan penghitungan jumlah sel osteoblas, dan osteoklas menggunakan mikroskop kontras fase. Data dianalisis oleh SPS 2000 dengan metode *Two Way Anava*.

Hasil: Penelitian menunjukkan bahwa substitusi tulang dengan hidroksiapatit tidak signifikan pada aktivitas osteoblas atau osteoklas ditunjukkan dengan $p > 0,05$, tapi analisis antar waktu menunjukkan signifikansi pada osteoklas ($p < 0,05$). Investigasi pada gambaran histologi menunjukkan peningkatan pada aktivitas pembentukan tulang baru pada defek tulang.

Simpulan: Substitusi tulang dengan hidroksiapatit (HAp) meningkatkan aktivitas pembentukan tulang baru pada defek tulang tibia tikus (*Rattus Sprague-Dawley*).

Kata kunci: Substitusi tulang; hidroxyapatite; sel-sel tulang; gambar histologi

¹⁾ Bagian Ilmu Penyakit Gigi & Mulut, Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang

²⁾ Bagian Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

PENDAHULUAN

Kelainan dan kerusakan jaringan tubuh oleh trauma, infeksi, kelainan saat lahir, maupun penyakit, termasuk neoplasma, dapat menyebabkan kecacatan struktur yang akan menimbulkan gangguan fungsi tubuh. Keadaan ini memerlukan restorasi guna mengembalikan fungsi seperti semula.^{1,2} Berbagai upaya dilakukan guna mencari material pengganti jaringan yang rusak tersebut. Autograf, sebagai alternatif *gold* standar, merupakan upaya penggantian jaringan dengan donor dan resipien diambil dari satu individu. Melalui upaya ini, osteokonduksi autograf baik dan risiko transmisi penyakit dapat diminimalkan. Namun demikian, jumlah dan besar jaringan donor terbatas sehingga kebutuhan tidak terpenuhi. Bagian donor yang diambil juga akan mengalami morbiditas disamping bentuk jaringan donor sering tidak sesuai.^{3,4,5} Pada perkembangan selanjutnya dikembangkan juga bahan sintesis seperti hidroksiapatit yang mampu mendorong pembentukan tulang baru dan mengisi defek skeletal.^{3,6}

Material pengganti tulang yang ideal paling tidak memenuhi persyaratan yaitu pori interkoneksi pada ukuran yang cukup untuk pertumbuhan tulang; mendukung pertumbuhan kapiler darah, jaringan perivaskular, dan sel osteoprogenitor; osteoinduktif dan osteokonduktif; mendukung diferensiasi osteoblas; bersifat biokompatibel, bioresorpsi, biodegradasi; mengandung kompleks ion kalsium dari cairan tubuh; radiolusen; memiliki kekuatan mekanik; dan bebas penyakit.^{2,5,9,10} Salah satu material yang memiliki syarat tersebut adalah hidroksiapatit.

Hidroksiapatit (HAp) dengan rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, merupakan material komponen jaringan keras tubuh seperti tulang dan gigi. HAp termasuk dalam kategori material bioaktif kaya Ca dan PO_4 sehingga mampu memperoleh respon biologi spesifik antara jaringan dan material.⁸ Produk HAp dapat dikategorikan dalam bentuk blok dan granula yang diperoleh melalui proses sintering kimiawi dengan porositas 100–300 m yang cukup untuk pertumbuhan tulang.^{7,11} HAp memiliki biokompatibilitas yang tinggi sehingga diharapkan memiliki kemampuan bioaktivitas juga.¹² Namun demikian, bentuk sintesis hidroksiapatit memperlihatkan kesamaan kimiawi

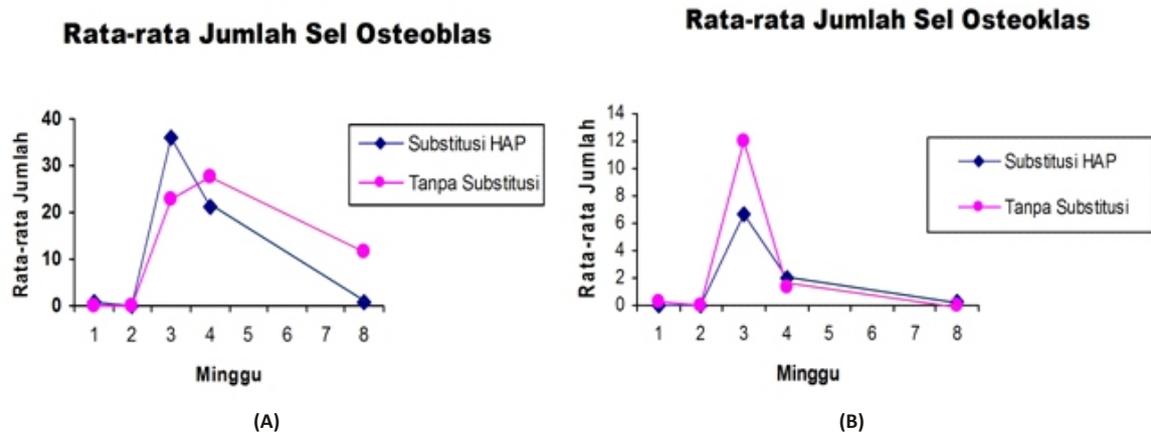
dan gambaran kristal yang mirip dengan kristal apatit tulang tetapi tidak identik. Kristalinitas HAp hasil sintering kimiawi masih terlalu tinggi walaupun kekuatan mekanikal cukup baik.^{11,13}

Penyembuhan fraktur tulang merupakan proses yang sangat kompleks, dan untuk mendapatkan hasil penyembuhan yang baik paling tidak melewati tahap inflamasi, perbaikan, adaptasi, dan remodeling.^{10,13,14} Inflamasi pada minggu pertama banyak terdapat deposit netrofil sebagai komponen leukosit terbanyak.¹⁴ Proses selanjutnya merupakan tahap perbaikan dengan adanya aktifitas aposisi tulang oleh osteoblas dan resorpsi oleh osteoklas secara bersamaan (*coupled*).^{10,14,15} Penyembuhan tulang dapat berlangsung dalam 3 sampai 4 bulan, bahkan beberapa tahun hingga ruang sumsum tulang pulih kembali seperti semula sebelum terjadinya patah tulang.^{16,17}

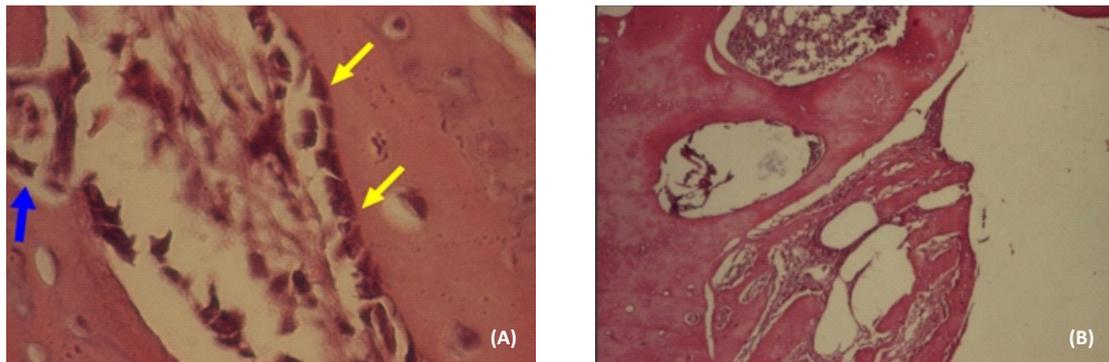
Penelitian ini diarahkan untuk melakukan kajian histologis pada jaringan sekitar tulang tibia tikus *Rattus Sprague Dawley* (*Rattus SD*) dengan adanya substitusi tulang menggunakan HAp. Salah satu tolok ukur keberhasilan implantasi dengan material bioaktif adalah kemampuan osteoinduksi dan osteokonduksi material.^{2,10} Gambaran histologis dapat digunakan untuk mengetahui keberhasilan substitusi tulang dengan mengamati reaksi jaringan sekitar implan dan mampu tidaknya HAp memacu pertumbuhan tulang dengan parameter aktivitas sel osteoblas, dan osteoklas.

METODE

Subjek penelitian berjumlah 15 ekor tikus *Rattus SD* (*Sprague Dawley*) jantan, usia 3 bulan, dengan berat badan 250 – 300 g yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan dan kontrol. Pembedahan dimulai dengan melakukan sayatan membujur di tibia mesial kanan tikus (perlakuan) dan tibia mesial kiri tikus (kontrol) hingga mencapai tulang. Tulang dibuka dengan menggunakan *round bur* dan *fissure bur* serta dilakukan irigasi dengan aquadest steril untuk menghilangkan debris tulang sehingga didapatkan defek tulang (3 mm x 1,5 mm x 1 mm). HAp kimiawi yang telah disterilkan diisikan pada defek tulang dengan ekskavator dan dimampatkan dengan burnisher agar mengisi defek dengan baik sesuai kontur. Tulang tibia mesial tikus sebelah kiri sebagai kontrol positif dibuat defek tulang yang



Gambar 1. 1a. Grafik rata-rata jumlah sel osteoblas antara kelompok perlakuan substitusi HAp dengan yang tidak disubstitusi Hap; 1b. Grafik rata-rata jumlah sel osteoklas antara kelompok perlakuan substitusi HAp dengan yang tidak disubstitusi HAp.



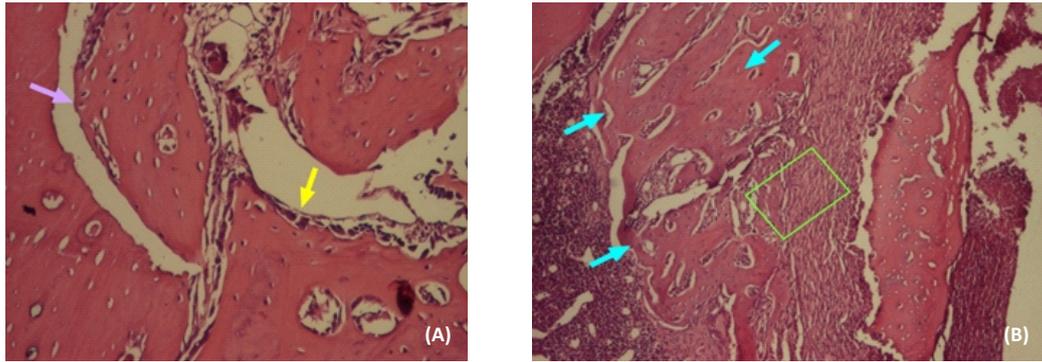
Gambar 2. 2a. Gambaran histologis pasca implantasi pada minggu ke-3 memperlihatkan osteoblas berderet-deret di tepi tulang (panah kuning) dan tampak adanya sel osteoklas pada Lakuna Howship (panah biru). Perbesaran 400x; 2b. Gambaran histologis minggu ke-3 pasca implantasi memperlihatkan spikula tulang yang mulai terbentuk dan terlihat menutupi defek dari arah periosteum pada satu sisi. Perbesaran 200x.

yang imatur. Gambaran minggu ke-4 pasca perlakuan juga menunjukkan masih aktifnya osteoblas yang berderet di sepanjang trabekula tulang yang berasal dari diferensiasi jaringan mesenkhim di sekitarnya. Tampak pada gambar beberapa osteoblas yang terjebak dalam lakuna belum mengalami pengerutan dan susunan masih tersebar (Gambar 3). Gambaran histologis pada perlakuan menunjukkan pertumbuhan trabekula tulang yang lebih teratur bila dibandingkan dengan gambaran pada kontrol (Gambar 4).

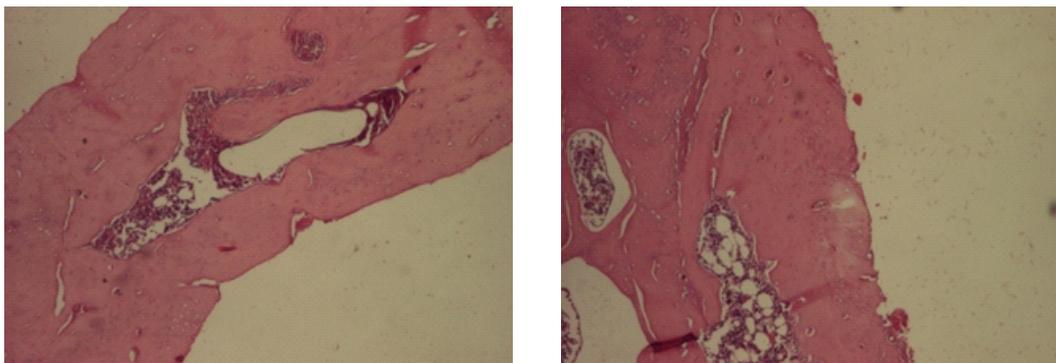
Pada pengamatan minggu ke-8, terlihat jaringan tulang baru baik pada kelompok perlakuan HAp maupun pada kelompok kontrol tidak menunjukkan perbedaan. Defek tulang telah tertutup oleh tulang baru, tetapi pada kelompok

perlakuan tulang baru yang terbentuk lebih rapi dan batas terlihat lebih halus menyatu dengan tulang lama (Gambar 4). Pada tulang baru yang terbentuk memperlihatkan tulang yang masih muda, akan tetapi pada kelompok kontrol masih terdapat jaringan ikat mesenkhim yang belum berdiferensiasi. Pada gambaran antara minggu ke-3 sampai minggu ke-8, baik pada perlakuan maupun kontrol memperlihatkan adanya osteosit yang mengalami pengerutan sehingga lakuna terlihat kosong dan nukleus berada di tepi dinding lakuna.

Pada analisis grafik jumlah rata-rata sel osteoklas (Gambar 1b) memperlihatkan aktivitas osteoklas mengalami peningkatan signifikan pada minggu ke-3 baik pada perlakuan maupun kontrol. Hal ini diperkuat dengan uji Anava yang dilakukan



Gambar 3. 3a. Gambaran histologis perlakuan pada minggu ke-4 memperlihatkan banyak pertumbuhan tulang baru dengan trabekula tulang tersusun menyebar dan mulai memenuhi defek tulang. Tampak osteoblas dan osteoklas masih aktif (panah kuning). Perbesaran 400x; 3b. Gambaran histologis kontrol pada minggu ke-4 memperlihatkan pertumbuhan trabekula tulang yang tidak teratur. Jaringan ikat tampak padat dan menyatu dengan trabekula tulang baru (kotak hijau). Perbesaran 200x.



Gambar 4. Gambaran histologis perlakuan (kiri) dan kontrol (kanan) pada minggu ke-8 pasca implantasi. Perbesaran 200x.

bahwa terdapat perbedaan signifikan faktor waktu terhadap aktivitas osteoklas ditunjukkan F_{hitung} sebesar 10,789 dengan p sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Analisis statistik memperlihatkan perbedaan signifikan terjadi antara minggu ke-1 dengan minggu ke-3 pasca implantasi, sementara penurunan terjadi pada minggu ke-4 dan ke-8 pasca implantasi. Aktivitas osteoklas meningkat seiring dengan meningkatnya aktivitas osteoblas. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa fase aposisi terjadi bersamaan dengan fase resorpsi yang ditunjukkan pada fase remodeling tulang, osteoklas teraktivasi di mana osteoblas memproduksi tulang baru di tempat tersebut.^{10,15} Namun demikian, analisis Anava antarperlakuan hidroksiapatit tidak menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan dengan kontrol yang ditunjukkan oleh F_{hitung} sebesar 0,731 dengan p sebesar 0,593 ($p > 0,05$). Hal ini membuktikan bahwa

tidak terdapat pengaruh bermakna perlakuan substitusi hidroksiapatit terhadap aktivitas osteoklas.

Aktivitas osteoklas dalam meresorpsi tulang dilakukan dengan memproduksi asam fosfat resisten tartrat dan ion hidrogen (asam hidroklorid) yang memiliki pH lemah dan meningkatkan kelarutan kristal HAp dan matriks organik, juga mengeluarkan kolagenase dan enzim proteolitik, serta hidrolase lisosomal yang menyebabkan matriks tulang melepaskan sebagian substansi dasar kalsium fosfat dalam mineral tulang.^{10,14} Proses pembentukan osteoklas pada substitusi hidroksiapatit menunjukkan adanya perbedaan bermakna dari waktu ke waktu, dan penurunan osteoklas ditunjukkan mulai terjadi pada minggu ke-4. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat hasil yang kontras dengan pernyataan bahwa pada substitusi dengan hidroksiapatit tidak

keseluruhannya dapat diresorpsi jaringan.^{18,19} Hasil pada penelitian ini memperlihatkan bahwa proses resorpsi berjalan lebih baik ditunjukkan dengan hasil yang bermakna dari uji statistik antar waktu.

Salah satu aspek yang dibutuhkan bahan material substitusi tulang adalah biokompatibilitas. Biokompatibilitas yang baik akan diikuti oleh bioaktivitas yang sangat berpengaruh terhadap proses resorpsi atau integrasi material substitusi di sekitar tulang, juga berpengaruh terhadap aktivasi dan dukungan proses aposisi tulang baru.^{2,9,12} Pada penelitian yang dilakukan, memperlihatkan aktivitas pembentukan tulang baru yang ditunjukkan oleh osteoblas dan proses resorpsi yang terjadi oleh osteoklas. Hal ini menunjukkan bahwa hidroksiapatit memiliki bioaktivitas dan biokompatibilitas yang baik.

Tulang memiliki material anorganik terbanyak berupa Ca dan PO₄ dalam hidroksiapatit tulang yang memiliki gugus heksagonal. Namun demikian, mineral apatit tulang bukan merupakan substansi kristal murni. Hidroksiapatit kimiawi termasuk dalam kategori bahan bioaktif yang kaya akan kalsium dan fosfat yang diharapkan dapat dikembangkan sebagai material substitusi tulang. Pada kenyataannya, bentuk sintesis hidroksiapatit memperlihatkan kesamaan kimiawi dan gambaran kristal yang mirip dengan hidroksiapatit tulang tetapi tidak identik dengan hidroksiapatit alami dalam tulang.^{11,13} Hal ini kemungkinan menjadi faktor yang mempengaruhi proses pembentukan tulang baru pasca implantasi hidroksiapatit tidak memiliki pengaruh bermakna terhadap aktivitas osteoblas.

SIMPULAN

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa substitusi tulang dengan HAp tidak berpengaruh secara signifikan terhadap aktivitas remodeling tulang oleh osteoblas dan osteoklas yang ditunjukkan dengan rata-rata jumlah sel osteoblas, dan osteoklas yang tidak berbeda secara signifikan antara kelompok perlakuan substitusi HAp dengan kelompok kontrol yang tidak disubstitusi. Substitusi HAp memperlihatkan gambaran pembentukan tulang baru yang lebih baik dari minggu ke minggu ditandai dengan penutupan area defek yang lebih sempurna pada akhir penelitian dibandingkan pada kontrol. Untuk

pengembangan lebih lanjut agar HAp kimiawi dapat digunakan sebagai material implantasi tulang maka masih harus dilakukan serangkaian penelitian. tulang maka masih harus dilakukan serangkaian penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abdurrahman. Peranan Bank Jaringan dalam Penyediaan Biomaterial. The First Indonesian Tissue Bank Scientific Meeting and Workshop on Biomaterial Application 2001. Surabaya : RSUD Dr. Soetomo : 7.
2. Gogolewski, S. Nonmetallic Materials for Bone Substitutes. *European Cells and Materials* 2001; 1 (2) : 54.
3. Wirjokusumo, S. Aplikasi Klinis Biomaterial di Bidang Bedah Mulut. The First Indonesian Tissue Bank Scientific Meeting and Workshop on Biomaterial Application 2001. Surabaya : RSUD Dr. Soetomo : 43-8.
4. Parikh, S.N. Bone Graft Substitutes : Past, Present, Future. *J. Postgrad. Med* 2002; 48 : 142-48.
5. Matsumine, A., Myoui, A., Kusuzaki, K., Araki, N., et al.. Calcium Hydroxyapatite Ceramic Implants in Bone Tumour Surgery : A Long-Term Follow-Up Study. *J. of Bone and Joint Surgery* 2004; 86 (B) : 719-21.
6. Darwono, A. B. Pengalaman Graft-tulang di RSPAD Gatot Soebroto. The First Indonesian Tissue Bank Scientific Meeting and Workshop on Biomaterial Application 2001. Surabaya : RSUD Dr. Soetomo : 42a-42c.
7. Annusavice, K. J. Philips' Science of Dental Materials. alih bahasa : Budiman, J. A., Purwoko, Susi. ed. 10. Jakarta : EGC, 2003 : 556-61.
8. Hench, Larry L. Bioceramics : From Concept to Clinic. *J. of the American Ceramic Society* 1991; 74 (7) : 1487-95.
9. Kalfas, I. H. Principles of Bone Healing. *Neurosurg Focus* 2001; 10 (4) : 1-3.
10. Brinker, M. R., O'Connor, D. P. Basic Sciences. dalam Miller, M. D. Review of Orthopaedics. 4th ed. Philadelphia : Saunders Elsevier, 2004 : 2-16.
11. Suzuki, Y., Matsuya, S., Udoh, K., Nakagawa, M., Koyano, K., Ishikawa, K. Fabrication of Hydroxyapatite Monolith from Gypsum in The Presence of Ammonium Phosphate. in Okazaki, M., Ishikawa, K., Yamashita, K., Doi, Y., Ban, S. (eds): *Archives of Bioceramics Research* 2003; 3. Japan : Organizing Committee of Asian Bioceramics : 77-8.
12. Kon, M., Hirakata, L. M., Miyamoto, Y., Asaoka, K. Evaluation of Bioceramics Containing -Tricalcium Phosphate. in Okazaki, M., Ishikawa, K., Yamashita, K., Doi, Y., Ban, S. (eds): *Archives of Bioceramics Research* 2003; 3. Japan : Organizing Committee of Asian Bioceramics : 77-82.
13. Vuola, J. Natural Coral and Hydroxyapatite as Bone Substitutes : An Experimental and Clinical Study. Academic Dissertation. Helsinki : Departement of Plastic Surgery Helsinki University Central Hospital. 2001.
14. Ross, M. H., Kaye, G. I., Pawlina, W. *Histology: a Text and Atlas (with Cell and Molecular Biology)*. 4th ed. New York : Lippincot Williams and Wilkins, 2003 : 186-203.
15. Cirotteau. Resources for Osteoporosis treatment : Osteoporosis Surgery. http://www.osteoporosis-surgery.com/english/moyens_main.htm. 2001. Diunduh 15/03/2007.
16. Robbins dan Kumar. Buku Ajar Patologi. alihbahasa: Staff

- Pengajar Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. ed. 4. Jakarta : EGC, 1995 :57-60.
17. Hadi, S. A.. Fracture Healing, dalam Kumpulan Makalah Prof. dr. H. Soelarto Reksoprodjo, Sp. B., Sp. BO. Jakarta : Divisi Orthopaedi dan Traumatologi FKUI/ RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo, 2002:127-130.
 18. Salata, L. Z., Craig, G. T., Brook, I. M. Bone Healing Following the Use of Hydroxyapatite or Ionomeric Bone Substitutes Alone or Combined With a Guided Bone Regeneration Technique: an Animal Study. The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 1998;13 (1):44-9.
 19. Trisi, P., Keith, D. J., Rocco, S. Human Histologic and Histomorphometric Analyses of Hydroxyapatite-Coated Implants After 10 Years of Function: A Case Report. The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants 2005;20 (1):124-29.

