

JUMLAH OSTEOLAS PADA PROSES PENYEMBUHAN TULANG PASCA IMPLANTASI HIDROKSIAPATIT SINTESIS DARI KALSIT

(NUMBER OF OSTEOLAST IN BONE HEALING PROCESS AFTER IMPLANTATION
OF SYNTHETIC HYDROXYAPATITE FROM CALCITE)

Hengky Bowo Ardhiyanto*, Widowati Siswomihardjo**, Tetiana Haniastuti***

*Bagian Bedah Mulut
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37 Jember

** Bagian Biomaterial
*** Bagian Biologi Oral
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada
Jl. Denta Sekip Utara, Yogyakarta 55281
E-mail: hengky_ardhiyanto@yahoo.com

Abstract

Bone has natural repair mechanism, but there are some critical sized defects which will not allow the tissues to regenerate themselves. Hydroxyapatite (HA), a popular bone substitute material, can be synthesized from many sources including rocks, namely calcite. The purpose of the present study is to investigate the number of osteoblast on bone healing process after implantation of synthesized HA from calcite as bone graft. Fifty-eight Sprague Dawley rats were divided into 3 groups. The first group was the group which the rats were implanted with synthesized HA from calcite; the second group was the group which the rats were implanted with 200 HA; while the third group as control group. The defects (size 3 mm in diameter, depth 3mm) were created on the condyle of femur. Six rats of each group were sacrificed after the 14th, 28th, and 56th days after the implantation. Specimens were then processed histologically and stained with haematoxylin-eosin. The results showed that the number of osteoblast in rats implanted with 200 HA were greater compared to the rats implanted with synthesized HA from calcite; however, the number of osteoblast in rats implanted with synthesized HA from calcite were greater compared to control group. Statistically there was no significant differences of the number of osteoblasts among groups ($p > 0.05$). In conclusion, synthesized HA from calcite may increase the number of osteoblast in bone healing process although the increasing number was not significant.

Key words: hydroxyapatite, bone healing, osteoblast

Abstrak

Tulang memiliki respons penyembuhan secara alami, namun defek yang besar seringkali menyebabkan tulang tidak dapat beregenerasi dengan baik. Hidroksiapatit (HA) adalah material pengganti tulang yang sudah sering digunakan sebagai *bone graft*. Material ini dapat disintesis dari berbagai sumber, antara lain dari batuan kalsit. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui jumlah sel osteoblas pada proses penyembuhan tulang setelah diimplantasi dengan hidroksiapatit sintesis dari kalsit sebagai material *bone graft*. Lima puluh delapan ekor tikus *Sprague dawley* dibagi menjadi 3 kelompok. Kelompok pertama adalah tikus yang diimplantasi dengan HA kalsit, kelompok kedua adalah tikus yang diimplantasi dengan HA 200, dan kelompok ketiga tidak mendapat perlakuan (kontrol). Defek dibuat pada kondilus tulang femur dengan ukuran yang sama (diameter 3mm dan kedalaman 3mm). Enam ekor tikus pada masing-masing kelompok dikorbankan pada hari ke-14, 28 dan 56. Spesimen kemudian diproses secara histologis dan diwarnai dengan hematoksilin-eosin. Hasil penelitian menunjukkan jumlah sel osteoblas pada tikus yang diimplantasi dengan HA 200 lebih tinggi jika dibandingkan dengan HA sintesis kalsit. Jumlah sel osteoblas pada tikus yang diimplantasi dengan HA sintesis kalsit lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, secara statistik tidak terdapat perbedaan yang bermakna jumlah osteoblas antar kelompok ($p > 0,05$). Sebagai kesimpulan, implantasi HA sintesis dari kalsit sebagai *bone graft* dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas pada proses penyembuhan tulang, namun peningkatannya tidak bermakna.

Kata kunci: hidroksiapatit, penyembuhan tulang, osteoblas

PENDAHULUAN

Dalam praktek bedah mulut, kerusakan tulang pada daerah maksilofasial biasanya disebabkan oleh trauma, neoplasma, infeksi maupun kelainan kongenital.¹ Kasus-kasus tersebut seringkali menimbulkan defek pada tulang. Sampai saat ini rekonstruksi defek pada tulang masih menjadi tantangan bagi para ahli bedah mulut, karena proses penyembuhannya seringkali mengalami gangguan atau bahkan kegagalan.^{2,3}

Untuk membantu proses penyembuhan pada defek tulang yang besar, perlu dilakukan terapi dengan menggunakan suatu material pengganti yaitu *bone graft*. Selain harus bersifat biokompatibel, *bone graft* harus memiliki 3 fungsi dasar yaitu osteogenesis, osteoinduksi, dan osteokonduksi.⁴

Tingginya tingkat kebutuhan *bone graft* menyebabkan para peneliti dan ahli bedah terus mengembangkan material sintetis *alloplast* atau *alloimplant* sebagai alternatif *bone graft*. Material tersebut berasal dari bahan sintetis non-logam yang diperoleh dari bahan keramik (kalium fosfat), komposit dan polimer.³

Komponen utama pembentuk tulang dan enamel gigi pada manusia adalah hidroksiapatit (HA).⁴ HA ternyata dapat disintesis dari bahan alam, salah satunya adalah dari batuan kalsit.⁵ Dalam geologi, kalsit kaya akan fosfor, banyak terdapat pada bekuan material vulkanik gunung berapi, batuan metamorfik, dan sedimen contohnya batu gamping. Kalsit merupakan mineral utama pembentuk batu gamping, dengan unsur kimia pembentuknya yaitu kalsium (Ca^{2+}) dan karbonat (CO_3). Karena sifat kimiawinya tersebut, maka kalsit berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan baku pembuatan HA.⁵

Tingkat keberhasilan suatu *bone graft* ditandai dengan distimulasinya osteoblas ataupun pre osteoblas. *Bone graft* diharapkan mampu menjadi media yang cocok bagi pre osteoblas untuk menempel dan berdiferensiasi menjadi osteoblas. Osteoblas kemudian akan mensekresi matriks tulang baru yang nantinya akan terkalsifikasi.⁶ Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh HA sintesis dari kalsit terhadap jumlah sel osteoblas sebagai parameter pada proses penyembuhan pada defek tulang tikus *Sprague dawley*.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris, yang dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Seluruh prosedur penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Hidroksiapatit sintesis kalsit (PT. Omya, Surabaya, Jawa Timur) dibuat melalui proses *hydrothermal*.

Kalsit dikalsinasi melalui proses reaksi endotermik dan dekomposisi pada karbonat atau hidroksida, sehingga akan membentuk oksida padat dengan tujuan untuk mengurai CaCO_3 menjadi CaO . Proses ini dilakukan dengan cara memanaskan kalsit dalam oven dengan kenaikan temperatur bertahap 3°C per menit hingga mencapai suhu 900°C dan dipertahankan selama 2 jam. Larutan *Diamonium Hydrogen Phosphat* (DHP) 0,5 M dibuat dengan melarutkan serbuk DHP 132 M sebanyak 66 gr dalam akuades sebanyak 1 l. Serbuk kalsit sebanyak 0,5 gram dicampur dengan larutan DHP 0,5 M sebanyak 40 ml. Hasil campuran tersebut kemudian dipanaskan dengan *microwave* pada daya 400 watt selama 20 menit. Larutan yang didapat disaring dengan kertas saring, dibilas dengan akuades, kemudian dikeringkan dalam inkubator selama 5 jam pada suhu 50°C .⁵

Pembuatan *bone graft* dilakukan dengan memasukkan serbuk HA sebanyak 35 mg kedalam cetakan yang terbuat dari bahan *stainless steel* ukuran diameter 3 mm dan ketebalan 3 mm. Setelah dimasukkan dalam cetakan, serbuk ditekan dengan menggunakan mesin hidrolis manual bertekanan 120 Mpa hingga padat. Bahan kemudian dikemas menggunakan aluminium foil dan disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 30 menit.⁵

Limapuluh delapan ekor tikus *Sprague dawley* jantan dan sehat dibagi menjadi 3 kelompok yaitu kelompok tikus yang diimplantasi *bone graft* HA sintesis dari kalsit, kelompok tikus yang diimplantasi *bone graft* HA 200 (Tai Hei, Tokyo, Japan), dan kelompok kontrol. Sebelum dilakukan perlakuan, tikus dianestesi secara *intra muscular* dengan menggunakan Ketamin hidroklorida (dosis 8 mg/100 gram berat badan). Defek dibuat pada kondilus tulang femur berukuran diameter 3 mm dengan kedalaman 3 mm dengan menggunakan bur tulang. Setelah itu dilakukan implantasi material *bone graft* dan luka ditutup dengan menjahit *flap*.

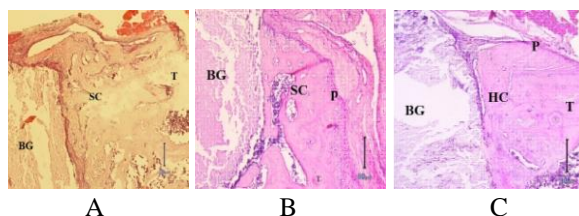
Enam ekor tikus dari tiap-tiap kelompok dikorbankan pada hari ke-14, 28, dan 56 pasca implantasi dengan cara dekapitasi. Kondilus tulang femur diambil dan difiksasi dalam larutan *buffered formalin* 10% dengan pH 7,4 selama 24 jam. Spesimen kemudian ditanam dalam blok parafin, dipotong secara serial, dan diwarnai dengan Hematoksin-Eosin (HE).

Sel osteoblas diamati dengan menggunakan mikroskop pembesaran 400 kali. Jumlah osteoblas dihitung pada 6 lapang pandang yang berbeda. Data yang diperoleh merupakan rerata jumlah osteoblas

dari 6 lapang pandang. Data selanjutnya dianalisis dengan menggunakan uji *one-way* ANOVA dan LSD.

HASIL

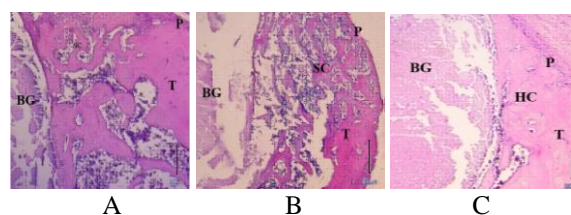
Hasil pengamatan mikroskopis pada hari ke-14 pada semua kelompok terlihat sel-sel osteoblas pada daerah di bawah lapisan periosteum dan endosteum, serta daerah tepian *soft callus* yang terbentuk pada defek tulang. Pada kelompok implantasi dengan menggunakan HA sintesis kalsit (Gambar 1A) dan HA 200 (Gambar 2A) gambaran *soft callus* terlihat meluas mengitari tepian material implan sedangkan pada kelompok kontrol negatif gambaran *soft callus* mulai mengisi defek tulang yang kosong (Gambar 3A).



Gambar 1. Gambaran histologis osteoblas pada proses pembentukan tulang pada kelompok tikus yang diimplantasi dengan HA sintesis dari kalsit (Pembesaran 100x). (A) hari ke-14, (B) hari ke-28, (C) hari ke-56. Bentuk tulang baru mengitari tepian material *bone graft* (BG), dan sel osteoblas berada di tepian *soft callus*. Pada hari ke-56 osteoblas pada *soft callus* mulai berubah menjadi osteosit dan nampak gambaran *hard callus*. SC= *soft callus*, HC= *hard callus*, BG= *bone graft*, P= periosteum, T= tulang

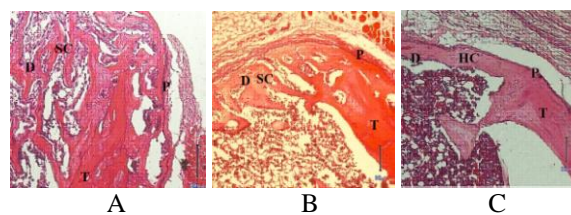
Jumlah osteoblas pada hari ke-28 semakin meningkat pada semua kelompok dibandingkan dengan hari ke-14. *Soft callus* mulai meluas ke arah tepi bagian dalam material implan ke arah sumsum tulang pada kelompok implantasi dengan menggunakan HA sintesis dari kalsit (Gambar 1B) dan HA 200 (Gambar 2B). Pada kelompok kontrol, gambaran *soft callus* tampak mengisi defek tulang yang kosong (Gambar 3B).

Pada hari ke-56, pada semua kelompok jumlah osteoblas mengalami penurunan dibandingkan dengan hari ke-28. Pada kelompok implantasi dengan menggunakan HA sintesis kalsit (Gambar 1C) dan HA 200 (Gambar 2C) dan, osteoblas pada *soft callus* mengalami perubahan menjadi osteosit karena mengalami kalsifikasi, sedangkan beberapa sel osteoblast yang lainnya berada pada bagian periosteum.



Gambar 2. Gambaran histologis osteoblas pada proses pembentukan tulang pada kelompok tikus yang diimplantasi dengan menggunakan HA 200 (Pembesaran 100x). (A) hari ke-14, (B) hari ke-28, (C) hari ke-56. Bentuk tulang baru mengitari tepian material *bone graft* (BG), dan sel osteoblas berada di tepian *soft callus*. Pada hari ke-56 osteoblas pada *soft callus* mulai berubah menjadi osteosit dan nampak gambaran *hard callus*. SC= *soft callus*, HC= *hard callus*, BG= *bone graft*, P= periosteum, T= tulang

Pada beberapa daerah, *soft callus* mulai mengalami perubahan menjadi bentuk yang lebih padat yaitu *hard callus* yang membentuk tulang muda atau *woven bone* di sekitar tepi dalam material implan. Pada kelompok kontrol, gambaran *soft callus* mengisi defek tulang yang kosong (Gambar 3C).



Gambar 3. Gambaran histologis osteoblas pada proses pembentukan tulang pada kelompok kontrol negatif (Pembesaran 100x). (A) hari ke-14 terlihat osteoblas di tepian *soft callus*, (B) pada hari ke-28 bentuk tulang baru mengisi daerah defek tulang, (C) pada hari ke-56 osteoblas pada *soft callus* mulai berubah menjadi osteosit dan nampak gambaran *hard callus*. SC= *soft callus*, HC= *hard callus*, BG= *bone graft*, P= periosteum, T= tulang

Rerata jumlah sel osteoblas pada kelompok implantasi HA 200 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok HA sintesis kalsit (Tabel 1). Kedua kelompok implantasi tersebut memiliki jumlah osteoblas yang lebih tinggi dibanding kelompok kontrol negatif. Namun, secara statistik tidak terdapat perbedaan jumlah osteoblast yang bermakna antar kelompok ($p > 0,05$). Hal ini berarti bahwa pemberian *bone graft* implantasi HA pada kedua kelompok perlakuan tersebut menyebabkan peningkatan jumlah osteoblas, walaupun tidak bermakna. (Tabel 1).

Tabel 1. Rerata jumlah osteoblas pada tiap periode hari perlakuan

Kelompok perlakuan	Hari ke-14	Hari ke-28	Hari ke-56
	Rerata ± SD	Rerata ±SD	Rerata ± SD
HA 200	73,37 ± 5,37	95,20 ± 8,62	41,84 ± 5,59
HA sintesis kalsit	73,24 ± 4,20	95,12 ± 8,37	41,74 ± 4,99
Kontrol Negatif	68,65 ± 2,99	89,59 ± 8,22	37,68 ± 10,43

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah osteoblas pasca implantasi HA, walaupun peningkatannya tidak bermakna. Hal tersebut kemungkinan disebabkan manipulasi material HA yang kurang tepat sehingga menyebabkan material ini menjadi tidak dapat berfungsi dengan maksimal dalam menstimulasi sel osteoprogenitor pada proses osteogenesis. Material HA yang dipakai dalam penelitian ini kemungkinan terlalu kompak dan kurang porus. Porosititas pada *bone graft* sangat berpengaruh, karena luas permukaan *bone graft* akan semakin tinggi sehingga akan meningkatkan sifat osteokonduktivitas.⁷ Kolonisasi sel osteoblas menjadi lebih cepat, dan materialnya lebih mudah untuk direabsorpsi. HA dengan pori yang *interconnected* akan mempercepat proses vaskularisasi sehingga akan membentuk ikatan antar tulang yang sangat kuat. HA berpori sangat penting dalam menghubungkan ikatan antara material dengan tulang. Dimensi dan bentuk pori merupakan faktor penting terjadinya proses osteointegrasi. HA *interconnected* antar pori dengan permukaan kasar akan memudahkan penetrasi sel osteoblast dan menjadi media yang baik bagi sel osteoblas untuk menempel.⁸ Proses penempelan sel osteoblas ke permukaan matriks *bone graft* berlangsung secara perlahan-lahan (biasanya dalam hitungan jam) kemudian sel akan menyebar ke permukaan matriks *bone graft*. Proses penempelan sel osteoblas ke seluruh permukaan material *bone graft* biasanya berlangsung lama (dalam hitungan jam), tergantung pada kompatibilitas permukaan material *bone graft*, dan ekspresi dari komponen biologis adhesif, yang meliputi sekresi ECM (*extra cellular matrix*) serta hasil penempelan sel dengan permukaan material. Proses ini, dimediasi oleh formasi fokus adhesi dan pembentukan plak yang tersusun dari integrin transmembran yang menghubungkan antara sitoskeleton dengan ECM hasil sekresi antara material dengan sel.⁹

Meskipun tidak bermakna, rerata jumlah osteo-

blas pada HA 200 sedikit lebih tinggi dibandingkan dengan HA sintesis kalsit. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan struktur HA. Pemeriksaan dengan *scanning electron microscopy* menunjukkan bahwa bentuk partikel HA kalsit tidak beraturan dengan ukuran tidak homogen. Partikel HA 200 cukup padat dan teraglomerasi serta mempunyai ukuran partikel yang lebih homogen. Penyebaran partikel kedua material HA ini cukup merata dengan bentuk permukaan kasar. Ukuran kristal HA sintesis kalsit lebih besar dibandingkan dengan HA 200. Hal tersebut kemungkinan menyebabkan HA sintesis kalsit kurang stabil dibandingkan dengan HA 200.⁵ Tingkat homogenitas ukuran partikel material juga menentukan respon adaptasi sel dengan material untuk bisa hidup. Semakin sesuai ukurannya dengan kondisi tulang maka material tersebut semakin efektif.⁷ Hasil kajian *impurity* material HA dengan uji karakterisasi *atomic absorption spectroscopy*, diketahui bahwa terdapat perbedaan rasio Ca/P antara HA 200 dengan HA sintesis Kalsit. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kandungan asam fosfor dan kurang sempurnanya ikatan molekul Ca²⁺ pada sisi kristal apatit, tetapi kemurnian HA sintesis kalsit yaitu 1,6886 sudah mendekati standart kemurnian HA stokiometri (JCPDS 09-432) sebesar 1,6667.⁵ Kandungan ion Ca²⁺ dan P ini berfungsi untuk menentukan percepatan derajat mineralisasi *callus* dan kebutuhan energi sel pada proses osteogenesis. Adanya perbedaan-perbedaan inilah yang menyebabkan perbedaan respon sel-sel osteoprogenitor antara HA sintesis kalsit dengan HA 200. Sel-sel osteoprogenitor dengan mudah akan menempati media yang cocok dan analog dengan kondisi tulang yang sebenarnya untuk bisa berproliferasi dan berdiferensiasi untuk menstimulasi proses osteogenesis.⁸

Pada hari ke-14 osteoblas sudah dapat terlihat, walaupun jumlahnya tidak sebanyak pada hari ke 28. Pada hari ke-14 merupakan akhir dari fase inflamasi dan awal fase reparatif. Pada fase ini interaksi antar sel akan menstimulasi *growth factor*, sitokin dan reseptor yang menyebabkan sel-sel mesenchymal pluripoten yang berasal dari periosteum maupun dari sumsum tulang berdiferensiasi menjadi sel-sel fibroblas, kondroblas, dan osteoblas.¹⁰ Osteoinduktif faktor (*Growth factor*) seperti *bone morphogenetic protein* (BMP) dan *transforming growth factor-β* (TGF-β) pada HA sebagai material *graft* juga membantu menstimulasi formasi pembentukan tulang baru sehingga tampak peningkatan jumlah sel osteoblas pada hari ke-28.¹⁰

Komposisi perbaikan jaringan akan berbeda pada setiap harinya karena pada tulang akan memperbaiki stabilitas secara mekanik menjadi lebih rigid dan

stabil. Terlihat pada hari ke-56 jumlah sel osteoblas menurun. Hal ini disebabkan karena terjadi proses mineralisasi tulang. Proses mineralisasi tulang disebabkan oleh osteoblas yang mensekresi matriks ekstraseluler (ECM) yang terjadi pada fase reparatif antara minggu ke-2 hingga hitungan tahun. Osteoblas berkumpul pada dasar kavitas resopsi dan membentuk osteoid yang mulai untuk mineralisasi dengan rasio $\sim 1\mu\text{m}/\text{hari}$. Osteoblas akan mendeposisi tulang yang baru serta pembuluh darah akan menyertai osteoblast tersebut. Matriks tulang yang baru terbentuk tersebut menyelimuti osteosit dan pembuluh darah membentuk sistem haversi. Osteoblas akan terus membentuk dan melakukan mineralisasi osteoid hingga kavitas terisi.^{6,10}

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa implantasi HA sintesis dari kalsit sebagai *bone graft* dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas pada proses penyembuhan tulang walaupun peningkatannya tidak bermakna. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk menyempurnakan preparasi material HA sintesis dari kalsit sehingga dapat dijadikan alternatif material *bone graft* pada defek tulang.

Daftar Pustaka

- Greenberg AM, Prein J. Craniomaxillofacial reconstructive and corrective bone surgery. Principles of Internal Fixation Using the AO/ASIF Technique. New York: Springer-Verlag, 2002: 5.
- Zhao J, Zhiyuan Z, Shaoyi W, Xiaojuan S, Xiuli Z, Chen J, et al. Apatite-coated silk fibroin scaffolds to healing mandibular border defects in canines. *J Bone* 2009; 45: 517-27.
- Rimondini L, Nicolò NA, Milena F, Gaetano G, Matilde T, Giardino R. In vivo experimental study on bone regeneration in critical bone defects using an injectable biodegradable PLA/PGA copolymer. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Bologna: Instituti Ortopedico Giardino* 2004: 1-9.
- Ohtsuki M. Bone-grafting materials their uses advantages and disadvantages. *JADA* 2002; 133: 1125-6.
- Syamsuddin. Analisis uji tekan dan porositas material kompaksi sinter Ha/ZnO sebagai material substitusi tulang. Tesis, Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada, 2010: 28-45.
- Lieberman JR, Friedlaender GE. Bone regeneration and repair: Biology and clinical applications, 1st ed, New Jersey: Humana Press, 2005: 45-3, 241-61.
- Peon E, Fuentes G, Delgado JA, Morejon L, Almirall A, García R. Preparation and characterization of porous blocks of synthetic hydroxyapatite. *Latin American Applied Research* 2004: 34, 225-28.
- Abdurrahim T, Sopyan I. Recent progress on the development of porous bioactive calcium phosphate for biomedical applications. *Recent Patents on Biomedical Engineering* 2008, 1, 213-29.
- Liu X, Lim JY, Donahue HJ, Dhurjati R, Mastro AM, Vogler EA. Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hFOB 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro: *J Biomaterials* 2007, 28(31): 4535-50.
- Miller MD, Hart JA, Thompson R. Review of orthopaedics. 6th ed. Virginia: Saunders, 2012: 11-5.