

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tulang adalah organ struktural statis yang menunjang pergerakan tubuh, melindungi organ dalam, dan sebagai tempat reservoir mineral. Tulang merupakan organ penting sebagai penopang tubuh dan tempat melekatnya otot dan tendon, serta pergerakan tubuh. Tulang melindungi organ rongga tengkorak dan dada dari cedera, dan menampung serta melindungi sumsum tulang di dalam rongganya. Selain itu, Tulang memiliki peran penting sebagai reservoir mineral seperti kalsium dan fosfat, yang dapat dilepaskan ketika kebutuhan tubuh meningkat (Su *et al.*, 2019). Tulang dapat menyebabkan fraktur yang sering terjadi karena adanya tekanan berlebihan atau trauma langsung pada tulang dan faktor patologis (dapat disebabkan dari penyakit degeneratif dan kanker tulang) (Alhawas dan Alghamdi, 2023).

Fraktur adalah kondisi dimana tulang mengalami keretakan, patah sebagian atau seluruhnya akibat trauma atau tekanan berlebih. fraktur sering terjadi dan seringkali mengakibatkan gangguan yang signifikan, keterbatasan fungsional dan kecacatan, terutama jika melibatkan bagian kaki. Ketika fraktur terjadi, terjadi gangguan pada organisasi jaringan kerangka dan hilangnya fungsi mekanis. Tujuan penyembuhan patah tulang adalah untuk meregenerasi jaringan termineralisasi di area patah tulang dan mengembalikan kekuatan mekanik tulang (Mahajan *et al.*, 2015). Penanganan fraktur pada intrumenyang tidak terselesaikan dengan baik menghasilkan celah antar tulang yang tidak menyatu atau rapat sehingga membutuhkan kesembuhan yang lebih lama, untuk mencegah itu maka dibutuhkan implant bonegraft untuk mengisi celah antar tulang agar dapat memproses penyembuhan luka (Khoiriyah dan Cahyaningrum, 2018).

Bonegraft merupakan bahan yang digunakan untuk menggantikan tulang setelah melewati proses tertentu. Bonegraft berfungsi sebagai penyambung untuk mengatasi pergeseran tulang dan berfungsi memperbaiki tulang yang fraktur. Bonegraft adalah material dengan sifat-sifat seperti bioaktif(memfasilitasi pembentukan ikatan kimia langsung dengan tulang), osteointegratif (mendukung ikatan yang kuat antara tulang dan implant), osteoinduktif (memungkinkan pertumbuhan tulang baru), biokompatibel (sesuai dengan jaringan tulang), bioresorbable (permukaannya dapat ditumbuhi jaringan). Salah satu material yang memenuhi standar untuk bonegraft adalah hidroksiapatit, senyawa anorganik yang merupakan komponen utama tulang dan gigi (Suryadi, 2011). Bonegraft terdiri dari beberapa jenis seperti bahan material yang diambil pada suatu daerah tubuh dan dipindahkan ke area lain dalam tubuh itu sendiri dinamakan autograft, bonegraft yang berasal dari donor lain akan tetapi masih satu spesies disebut allograft, jenis graft tulang yang berasal dari hewan seperti sapi dan babi dinamakan xenograft, dan bonegraft sintetik adalah bahan kimia yang kandungannya mirip dengan tulang alami (Baldwin, 2019). Salah satu sumber daya alami yang mengandung hidroksiapatit dan memiliki potensi ekonomi yang besar namun belum dimanfaatkan secara optimal adalah kerang darah (Anadara granosa) (al., 2016).

*Anadara granosa* merupakan sekelompok famili Arcidae, kelas *Bivalvia*, filum yang sudah dikenal cukup lama. *Anadara granosa* telah dilaporkan memiliki



aktivitas biologis karena mereka mengandung berbagai senyawa bioaktif, seperti kelompok gastropoda pada vegetasi mangrove, ekosistem terumbu karang dan *Bivalvia* laut (Rozirwan *et al.*, 2023). Cangkang kerang darah dapat dimanfaatkan sebagai bahan biomaterial karena mempunyai kandungan kalsium yang cukup tinggi, yang berguna untuk memperkuat gigi dan tulang. Kandungan cangkang kerang darah terdiri dari 66,70% Kalsium Oksida (CaO), 7,88% Silika (SiO<sub>2</sub>), 1,25% Aluminium Oksida (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), 0,03% Ferri Oksida (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), dan 22,28% Magnesium Oksida (MgO). Se jauh ini, cangkang kerang darah hanya dimanfaatkan sebagai kerajinan seperti hiasan dinding ataupun sebagai campuran pakan ternak. Akan tetapi, sebenarnya cangkang kerang darah mengandung kalsium karbonat (CaCO<sub>3</sub>) yang merupakan bahan alami (Sukirawaty dan Resky, 2024). Menurut data terakhir dari statistik PPID Sulawesi Selatan, jumlah produksi kerang darah di daerah Makassar tahun 2022 sebanyak 13,5 ton, penyebab terjadinya penumpukan limbah ini diakibatkan karena sebagian besar masyarakat hanya mengkonsumsi dagingnya tanpa mengolah atau memanfaatkan limbah cangkangnya lebih lanjut, sehingga dapat menyebabkan masalah pada lingkungan.

Dalam penelitian sintesis hidroksiapatit, terdapat dua metode yang umum digunakan, yaitu metode kering dan basah (Sulistioso *et al.*, 2012). Contoh metode basah meliputi sol-gel dan pengendapan basah, sedangkan metode kering seperti kalsinasi. Metode sol-gel diyakini mampu meningkatkan kristalinitas hidroksiapatit, serta menghasilkan lapisan yang homogen, efektif dan murni (Sidiqa *et al.*, 2012). Dalam penelitian ini dilakukan kombinasi metode basah dan metode kering, keunggulan dari metode basah selain biayanya yang relative murah dalam tahap proses pembuatan hidroksiapatit didapatkan tingkat kemurnian yang cukup tinggi. Pada metode metode kering sintesis hidroksiapatit memiliki keunggulan dari hasil rendeman hidroksiapatit tertinggi sehingga sangat disarankan untuk digunakan saat proses pembuatan bahan implant (Yuliana *et al.*, 2017).

Oleh karena itu, penelitian ini memanfaatkan limbah *anadara granosa* sebagai alternatif bone graft pada kondisi fraktur, sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada respon penolakan sel-sel osteogenesis dalam kesembuhan tulang pasca implantasi dan bagaimana efektivitas implantasi bonegraft sebagai alternatif xenograft untuk mempercepat kesembuhan tulang yang diamati dari aspek histopatologi.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dapat diambil rumusan masalah sebagai berikut.

- a. Bagaimana efektivitas bonegraft dari limbah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) sebagai alternatif xenograft untuk penanganan fraktur pada tikus putih yang diamati dari aspek histopatologi?
- b. Apakah terdapat respon penolakan sel osteogenesis pada tulang pasca implantasi xenograft dari limbah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*)?



### 1.3 Tujuan dan Manfaat

#### 1.3.1 Tujuan Penelitian

- Mengetahui efektivitas implantasi bonegraft dari limbah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) sebagai alternatif xenografit untuk mempercepat kesembuhan tulang yang diamati dari aspek histopatologi
- Mengetahui apakah terdapat penolakan sel osteogenesis dalam kesembuhan tulang pasca implantasi xenografit dari limbah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*)

#### 1.3.2 Manfaat Klinis

Penelitian ini diharapkan bermanfaat dalam proses kesembuhan tulang menggunakan cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) sebagai alternatif xenografit yang dilihat dari aspek histopatologi, seperti melihat gambaran histopatologi serta aktivitas sel-sel osteogenesis kesembuhan tulang pasca implantasi xenografit dari limbah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*).

#### 1.3.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini memiliki potensi sebagai acuan penelitian lebih lanjut dalam implantasi hidroksiapatit untuk mempercepat kesembuhan pada kondisi fraktur yang diamati dari aktivitas sel-sel osteogenesis.

### 1.4 Hipotesis

Berdasarkan uraian diatas, dapat diambil hipotesis penelitian bahwa dengan menggunakan hidroksiapatit *anadara granosa* sebagai bahan implan pada kondisi fraktur terjadi perubahan aktivitas sel osteogenesis yang diamati dari Gambaran histopatologi.

### 1.5 Keaslian Penelitian

Tabel 1. Keaslian Penelitian

Penulis	Judul
Khoirudin dkk. 2015	Sintesis dan Karakterisasi Hidroksiapatit (HAp) dari Kulit Kerang Darah ( <i>Anadara granosa</i> ) dengan Proses Hidrotermal
Rosyada, A.Z.M. 2020	Histopatologikfraktur Diafisis Fraktur Yang Diberi Pasta Cangkang Kerang Darah ( <i>Anadara Granosa</i> ) Pada Tikus Jantan
Hikmah dkk. 2023	Potential of nano hydroxyapatite synthesized from blood clam shells as a remineralizing agent after in office bleaching

### 1.6 Kajian Pustaka

#### 1.6.1 Tulang

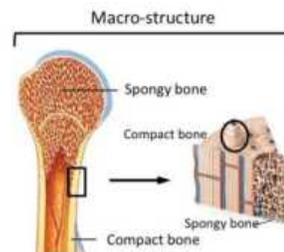
##### 1.6.1.1 Struktur Tulang

Tulang adalah organ struktural statis yang menunjang pergerakan tubuh, i organ dalam, dan sebagai reservoir mineral. Tulang merupakan organ sebagai penopang tubuh dan tempat melekatnya otot dan tendon, serta n tubuh. Tulang melindungi organ rongga tengkorak dan dada dari cedera, dan ng serta melindungi sumsum tulang di dalam rongganya (Su et al., 2019).



Tulang adalah jaringan ikat termineralisasi yang memperlihatkan beberapa jenis sel yaitu sel osteoblas, osteosit, dan osteoklas. Tulang merupakan organ yang sangat dinamis yang terus-menerus diserap oleh osteoklas dan dibentuk kembali oleh osteoblas. Fungsi sel-sel ini merupakan peranan penting yang berperan dalam menggabungkan resorpsi tulang dengan pembentukan tulang. Remodeling tulang adalah proses yang sangat kompleks dimana tulang yang lama digantikan oleh tulang baru, dalam suatu siklus yang terdiri dari tiga fase: (1) inisiasi resorpsi tulang oleh osteoklas, (2) transisi (atau periode pembalikan) dari resorpsi ke resorpsi baru pembentukan tulang, dan (3) pembentukan tulang oleh osteoblas. Proses ini terjadi karena tindakan yang terkoordinasi osteoklas, osteoblas, osteosit, dan sel pelapis tulang yang Bersama-sama membentuk struktur anatomi. Remodeling tulang yang normal diperlukan untuk penyembuhan patah tulang dan adaptasi kerangka terhadap penggunaan mekanis, serta untuk homeostatis kalsium (Silva et al., 2015).

**a. Struktur Makroskopis**

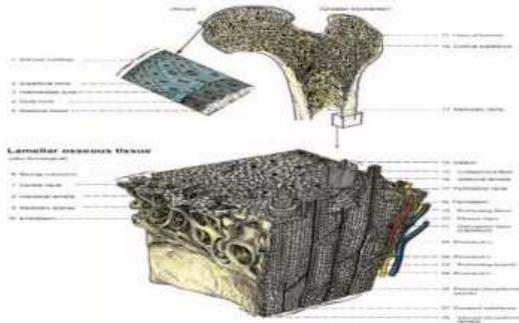


**Gambar 1.** Struktur Makroskopis Tulang (Hussein *et al.*, 2023).

Tulang memiliki dua bentuk utama, yaitu tulang kompak (substansi kompakta) dan tulang spons (substansi spongiosa). Tulang kompak terlihat sebagai massa padat dengan ruang-ruang kecil yang hanya terlihat dengan mikroskop. Pada tulang panjang seperti femur atau humerus, bagian batangnya (diafisis) terdiri dari silinder tulang kompak dengan dinding tebal dan rongga sumsum di dalamnya. Ujung tulang panjang (epifisis) terutama terdiri dari tulang spons yang ditutupi oleh lapisan tipis tulang kompak. Zona pertumbuhan tulang terletak di antara tulang rawan epifisis dan tulang spons metafisis selama proses pertumbuhan. Tulang dibungkus oleh periosteum, lapisan jaringan ikat yang memiliki kemampuan untuk membentuk tulang. Rongga sumsum dan rongga dalam tulang spons dilapisi oleh endosteum, yang juga memiliki sifat pembentukan tulang. Pada tulang pipih tengkorak, substansi kompak terbentuk di permukaan luar dan dalamnya, yang sering disebut sebagai tabel luar dan dalam (Fawcett, 2010).



## b. Struktur Mikroskopis



**Gambar 2.** Struktur Mikroskopis Tulang (Budras *et al.*, 2023).

Menurut Silva *et al.* (2015) tulang memiliki empat jenis sel yang berbeda diantaranya sebagai berikut:

- 1) Osteoblas adalah sel berbentuk kubus yang terletak di sepanjang permukaan tulang, yang terdiri dari 4-6% dari sel tulang residen total dan sebagian besar dikenal karena fungsi pembentukan tulang. Sel ini memiliki karakteristik morfologi sel pembentuk protein, seperti retikulum endoplasma yang melimpah dan aparatus Golgi yang menonjol, serta berbagai vesikula sekretori. Osteoblas mengeluarkan osteoid ke matriks tulang sebagai sel yang terpolarisasi. Sel punca mesenkim (MSC) adalah sumber osteoblast. Pengendapan matriks organik dan mineralisasi berikutnya adalah dua tahap utama sintesis matriks tulang oleh osteoblas. Osteoblas mensekresikan protein kolagen (terutama kolagen tipe I) dan protein non-kolagen (seperti OCN, osteonektin, BSP II, dan osteopontin), serta proteoglikan yang membentuk matriks organik, termasuk dekorin dan biglikan. Setelah itu, mineralisasi matriks tulang terjadi dalam dua fase: fase vesikular dan fase fibrilar. Fase vesikular terjadi ketika bagian dengan diameter antara 30 dan 200 nanometer, yang disebut vesikula matriks, dilepaskan dari membran apikal utama osteoblas ke dalam matriks tulang yang baru terbentuk, di mana mereka berikatan dengan proteoglikan dan bahan organik lainnya. Proteoglikan tersulfasi melumpuhkan ion kalsium yang tersimpan di dalam vesikula matriks karena muatan negatifnya. Ketika osteoblas mengeluarkan enzim yang menghancurkan proteoglikan, ion kalsium dilepaskan dari proteoglikan dan melintasi saluran kalsium di membran vesikel matriks. Annexin adalah protein yang membentuk saluran ini. Osteosit adalah osteoblas matang yang tertanam dalam matriks tulang dan berfungsi dalam produksi tulang. Mereka juga dikenal untuk merespons stimulasi mekanis, merasakan regangan, dan memulai respons pemodelan dan renovasi melalui glukosa 6 fosfat dehidrogenase, oksida nitrat (NO), dan IGF. Meskipun osteosit hampir tidak bergerak, mereka berkonsentrasi pada aktivitas metabolisme sel yang sangat penting untuk kelangsungan hidup mereka dan untuk mempertahankan meostasis, yang berarti mempertahankan kondisi internal tubuh yang konstan. Osteogenik berasal dari jaringan ikat mesenkim, yang masih bersifat embrional. Mereka adalah sel punca pluripoten yang belum berdiferensiasi dan



memiliki kemampuan untuk mitosis, yang memungkinkan mereka untuk menghasilkan osteoblas dan osteoklas baru. Sel-sel ini biasanya ditemukan pada permukaan tulang, di endosteum, di lapisan dalam periosteum, dan di saluran pembuluh darah pada tulang kompak. Dua jenis sel osteoprogenitor berbeda: preosteoblas menghasilkan osteoblas dengan sedikit retikulum endoplasma; dan preosteoklas menghasilkan osteoklas dengan lebih banyak mitokondria bebas dan ribosom.

- 3) Sel Osteoklas, sel besar berinti banyak ini ditemukan di permukaan tulang di mana proses resorpsi, renovasi, dan perbaikan tulang terjadi. Osteoklas ini sering ditemukan dalam lacunae Howship, alur dangkal pada tulang yang diserap atau terkikis secara enzimatik. Osteoklas awalnya berasal dari prekursor seperti monosit dan berfungsi untuk mengeluarkan kolagenase dan enzim proteolitik lainnya, yang memungkinkan matriks tulang melepaskan sebagian dari zat tanah yang terkalsifikasi. Osteoklas mungkin berubah menjadi sel aslinya atau berdegenerasi setelah proses resorpsi selesai.

### 1.6.1.3 Komposisi Tulang

Tulang terdiri dari dua komponen utama yaitu matriks organik (30%) dan garam anorganik (60%), dengan sisa 10% adalah air. Sel-sel penyusun tulang meliputi osteoprogenitor (sel induk), osteoblas (yang menghasilkan matriks tulang), osteosit (yang memelihara matriks tulang), dan osteoklas (yang bertanggung jawab atas resorpsi tulang). Osteoprogenitor terletak di dalam periosteum, berperan dalam proliferasi dan diferensiasi selama remodeling tulang. Osteoblas bertanggung jawab atas pembentukan dan mineralisasi matriks tulang, sementara osteosit menjaga keberlangsungan tulang. Osteoklas, berasal dari prekursor monosit, berfungsi dalam proses resorpsi tulang (Gartner dan Hiatt, 2014).

Tulang adalah jaringan yang mengalami kalsifikasi dan terdiri dari 5%–10% air, 50%–70% hidroksiapatit, dan 20%–40% komponen organik, termasuk kolagen tipe I dan 10% protein non-kolagen yang terlibat dalam mineralisasi tulang (Osterhoff *et al.*, 2016). Berdasarkan porositas dan unit mikrostruktur, tulang diklasifikasikan menjadi dua jenis. Tulang kompak (juga disebut tulang kortikal atau tulang padat) adalah jaringan tulang padat yang mengelilingi rongga meduler atau sumsum tulang. Tulang kanselus (juga disebut tulang trabekular atau tulang spons) adalah struktur yang tersebar di sumsum tulang. Kerangka manusia dewasa terdiri dari 80% tulang kompak dan 20% tulang kanselus, dan seluruh strukturnya sangat vaskularisasi (Ciosek *et al.*, 2021).

### 1.6.2 Fraktur

Fraktur bisa terjadi karena adanya tekanan berlebihan atau trauma langsung pada tulang, faktor patologis dapat disebabkan dari penyakit degeneratif dan kanker tulang (Alhawas dan Alghamdi, 2023).

Menurut Mahajan *et al.* (2015), berikut adalah penyebab-penyebab fraktur pada



Penyebab Ekstrinsik

• **Trauma Langsung:** Trauma adalah penyebab paling umum dari fraktur tulang pada hewan kecil, yang biasanya disebabkan oleh kecelakaan seperti tabrakan mobil atau jatuh dari ketinggian.

- 2) Tekanan Torsi: Torsi fraktur terjadi ketika gaya putaran diterapkan sepanjang sumbu panjang tulang. Umumnya, hal ini terjadi ketika satu ujung tulang tetap dalam posisi sementara ujung lainnya dipaksa berputar. Fraktur yang terjadi biasanya berbentuk spiral panjang dengan ujung yang tajam yang dapat membahayakan jaringan lunak atau menyebabkan fraktur terbuka.
- b. Penyebab Intrinsik

Fraktur patologis terjadi karena adanya penyakit tulang atau kondisi sistemik yang membuat tulang pada hewan menjadi tidak normal dan lebih rentan terhadap fraktur. Fraktur ini dapat terjadi karena berbagai jenis trauma: gaya lentur, gaya torsi, gaya tekan, atau gaya geser. Seringkali, satu-satunya yang menyebabkan fraktur adalah berat badan hewan, sehingga fraktur spontan terjadi tanpa trauma yang jelas. Fraktur patologis dapat disebabkan oleh berbagai jenis patologi tulang seperti neoplasia, kista tulang, osteoporosis karena penyakit noninflamasi kronis, hiperparatiroidisme nutrisi, infeksi tulang lokal (osteomielitis), atau osteoporosis karena tidak digunakannya fiksasi eksternal dalam waktu lama atau pengangkatan perangkat internal yang kaku.

#### 1.6.2.1 Jenis-jenis Fraktur

- a. Fraktur humerus adalah putusnya kesinambungan pada tulang humerus, yang merupakan tulang lengan atas yang membentang dari bahu hingga siku. Fraktur ini bisa terjadi di bagian mana pun dari tulang humerus, termasuk di caput humerus (dekat bahu), diafisis humerus (bagian tengah tulang), atau distal humerus (dekat siku). Fraktur humerus biasanya disebabkan oleh trauma langsung atau tidak langsung (Sabharwal *et al.*, 2016).
- b. Fraktur femoralis terjadi ketika tulang paha mengalami retak atau patah akibat trauma langsung seperti tabrakan kendaraan atau jatuh dari ketinggian. Dampak yang mungkin muncul meliputi pendarahan, cedera pada organ dalam dan masalah pernapasan. Tulang femur merupakan tulang terpanjang, terkuat dan paling berat yang berperan sebagai penyangga utama tubuh. Sehingga cedera pada femur dapat berakibat fatal (Denisiuk dan Afsari 2023).
- c. Fraktur mandibula adalah kondisi dimana tulang mandibula mengalami retak atau patah akibat trauma pada wajah atau karena keadaan patologis. Bagian yang paling tipis dari mandibula meliputi angulus (sudut) dan subkondilus, menjadikannya daerah rentan terhadap fraktur. Titik lemah lainnya termasuk foramen mentale, angulus tempat gigi molar III, dan kolum kondilus mandibula, terutama saat trauma langsung mengenai dagu dan meneruskan retakan ke arah belakang. Fraktur mandibula dapat diklasifikasikan berdasarkan lokasi anatomi, seperti Angulus, Dento-alveolar, Korpus, Kondilus, Koronoid, Ramus, Simfisis, dan parasimfisis (Dewi *et al.*, 2022).
- d. Fraktur tibia fibula adalah terputusnya jaringan antar tulang yang disebabkan oleh trauma atau tekanan berlebihan pada tulang tibia fibula (Setyoko dan Tata, 2022).



#### Patofisiologi Fraktur

Menurut Joyce & Hawks (2014), patofisiologi fraktur umumnya disebabkan oleh trauma langsung seperti tabrakan mobil ataupun jatuh. Keparahan fraktur tergantung

pada intensitas trauma yang diterima. Jika keparahan trauma melewati batas tertentu, tulang bisa mengalami retak atau bahkan patah. Selain itu, fraktur juga dapat disebabkan oleh stres akibat kondisi patologis. Perubahan pada fragmen tulang dapat merusak jaringan dan pembuluh darah, yang sering kali menyebabkan pendarahan di sekitar area fraktur dan ke dalam jaringan lunak sekitarnya. Hal ini dapat mengakibatkan penurunan volume darah, yang jika tidak terkompensasi dapat mengubah perfusi jaringan karena penurunan Cardiac Output (COP). Edema di sekitar area patahan juga dapat menyebabkan tekanan pada pembuluh darah di sekitarnya, yang pada akhirnya mempengaruhi perfusi jaringan di perifer

Patofisiologi Fraktur terjadi akibat ketidakmampuan proses remodeling tulang untuk menahan tekanan fisiologis yang diterapkan melalui beban mekanis yang berulang. Ketika tulang mengalami tekanan berulang yang berlebihan tanpa cukup waktu untuk penyembuhan, micro-damage (kerusakan mikro) dapat berkembang menjadi fraktur stres. Fraktur sering terjadi pada anggota tubuh bagian bawah karena aktivitas berulang dengan dampak tinggi yang meningkatkan gaya reaksi tanah (ground reaction forces) yang diterima oleh tulang. Proses Biologis respon remodeling tulang saat tulang mengalami beban berulang, terjadi peningkatan aktivitas osteoklastik (resorpsi tulang) diikuti dengan vaskularisasi dan pembentukan osteoid baru oleh osteoblas (Sharma dan Heaferty, 2017).

### 1.6.2.3 Mekanisme Kesembuhan Fraktur Tanpa Bonegraft

Menurut Oryan *et al* (2015), proses kesembuhan fraktur normal melibatkan beberapa tahap yang secara bertahap mengembalikan kekuatan dan integritas tulang, sebagai berikut:

- a. Tahap Inflamasi: Tulang memiliki dua bentuk utama, yaitu tulang kompak (substansi kompakta) dan tulang spons (substansi spongiosa). Tulang kompak terlihat sebagai massa padat dengan ruang-ruang kecil yang hanya terlihat dengan mikroskop. Pada tulang panjang seperti femur atau humerus, bagian batangnya (diaphisis) terdiri dari silinder tulang kompak dengan dinding tebal dan rongga sumsum di dalamnya. Ujung tulang panjang (epifisis) terutama terdiri dari tulang spons yang ditutupi oleh lapisan tipis tulang kompak. Zona pertumbuhan tulang terletak di antara tulang rawan epifisis dan tulang spons metafisis selama proses pertumbuhan. Tulang dibungkus oleh periosteum, lapisan jaringan ikat yang memiliki kemampuan untuk membentuk tulang. Rongga sumsum dan rongga dalam tulang spons dilapisi oleh endosteum, yang juga memiliki sifat pembentukan tulang. Pada tulang pipih tengkorak, substansi kompak terbentuk di permukaan luar dan dalamnya, yang sering disebut sebagai tabel luar dan dalam (Fawcett, 2010).
- b. Tahap Proliferasi/Fibroplasia: Fase reparatif dimulai dalam beberapa hari pertama setelah fase inflamasi dimulai dan berlanjut selama beberapa minggu. Pada fase ini, jaringan kalus reparatif mulai terbentuk baik di dalam maupun di sekitar area patah tulang, yang kemudian akan digantikan oleh tulang baru. Jaringan kalus ini adalah untuk meningkatkan stabilitas mekanis dengan memberikan dukungan dari luar. Osteosit yang berada di dekat ujung patah tulang mengalami gangguan nutrisi dan mati, yang ditandai dengan



terbentuknya lakuna kosong pada jarak tertentu dari ujung patah tulang. Kerusakan pada periosteum, sumsum tulang, dan jaringan lunak di sekitarnya menyebabkan terjadinya nekrosis jaringan di area patah tulang. Selama proses resorpsi jaringan nekrosis, sel punca mesenkim pluripoten mulai mengalami diferensiasi menjadi fibroblas, kondroblas, dan osteoblas. Sel-sel ini dapat berasal dari area trauma atau bermigrasi dari tempat lain ke area patah tulang bersama-sama dengan pembuluh darah. Pada fase ini, kalus terdiri dari jaringan ikat fibrosa, pembuluh darah, kartilago, tulang jaringan baru (woven bone), dan osteoid. Selama proses penyembuhan, pH secara perlahan berubah menjadi netral atau sedikit basa, yang merupakan kondisi optimal untuk aktivitas alkali fosfatase dan perannya dalam mineralisasi kalus (Mahyudin, 2018).

#### 1.6.2.4 Mekanisme Kesembuhan Fraktur Dengan Bonegraft

Bone grafting dijelaskan sebagai metode penting dalam ortopedi modern, terutama untuk kasus-kasus yang parah seperti fraktur peri-prostetik, non-union, dan tulang akut. Bone grafting adalah prosedur bedah di mana jaringan tulang dipindahkan dari satu area ke area lain untuk memperbaiki atau mengganti tulang yang tidak lagi berfungsi atau untuk memperkuat respons penyembuhan alami tubuh. Bone grafting sering digunakan dalam trauma untuk berbagai indikasi, mulai dari penggunaan akut untuk defek tulang traumatis hingga augmentasi stabilitas dan penyembuhan pada fraktur berisiko tinggi seperti fraktur femoral peri-prostetik. Penyembuhan yang sukses dengan bone grafts dapat dipahami melalui konsep "diamond" yang mencakup sel-sel osteogenik, mediator osteoinduktif, matriks osteokonduktif, stabilitas mekanik, dan vaskularitas yang memadai. Bone grafting bukan hanya tentang menyediakan jaringan tulang, tetapi juga memastikan bahwa lingkungan yang tepat ada untuk mendukung proses penyembuhan tulang yang kompleks (Rodham *et al.*, 2023).

#### 1.6.3 Bonegraft

Bonegraft merupakan bahan yang digunakan untuk menggantikan tulang setelah melewati proses tertentu. Bonegraft berfungsi sebagai penyambung untuk mengatasi pergeseran tulang dan berfungsi memperbaiki tulang yang fraktur. Bonegraft adalah biomaterial dengan sifat-sifat seperti bioaktif (memfasilitasi pembentukan ikatan kimia langsung dengan tulang), osteointegratif (mendukung ikatan yang kuat antara tulang dan implant), osteoinduktif (memungkinkan pertumbuhan tulang baru), biokompatibel (sesuai dengan jaringan tulang), bioresorbable (permukaannya dapat ditumbuhi jaringan). Salah satu material yang memenuhi standar untuk bonegraft adalah hidroksiapatit, senyawa anorganik yang merupakan komponen utama tulang dan gigi (Suryadi, 2011). Bonegraft digunakan sebagai pengganti sintesis atau alami dan jaringan tulang dapat beregenerasi sepenuhnya jika diberikan ruang untuk tumbuh. Seiring dengan pertumbuhan tulang alami, umumnya bahan implan tersebut sepenuhnya menggantikan bahan bonegraft, sehingga menghasilkan tulang baru yang terintegrasi dengan tulang yang ada. Bonegraft yang berasal dari spesies lain selain manusia seperti, sapi dan babi, sebagai matriks klasifikasi disebut xenograft (Kumar *et al.*, 2013). Bonegraft digunakan sebagai pengobatan pada berbagai kelainan, diantaranya penyatuan dan perbaikan tulang patah tulang yang terhambat, pseudoarthrosis bawaan, dan kerusakan tulang akibat trauma, infeksi, dan tumor. Tulang umumnya memiliki kemampuan untuk



beregenerasi secara sempurna, tetapi membutuhkan ruang fraktur yang sangat kecil atau semacam perancah untuk melakukannya (Hung, 2012).

### 1.6.3.1 Jenis-jenis Bonegraft

Menurut Baldwin *et al* (2019), jenis-jenis bonegraft sebagai berikut:

- a. Autografit adalah jenis bone graft yang dipindahkan langsung dari satu area tulang individu ke area lain dalam tubuhnya sendiri. Sering juga disebut sebagai autogenous atau autologous bone graft. Autografit dianggap sebagai “*Gold standart*” dalam regenerasi tulang karena memiliki sifat *osteoconduction*, *osteinduction*, *osteogenicity*, dan *osseointegration*. Pembentukan tulang dalam autografit terjadi dalam dua fase. Selama fase pertama, yang berlangsung hingga 4 minggu, kontribusi utama dalam pembentukan tulang berasal dari sel-sel graft. Selama fase kedua, sel-sel dari host mulai terlibat dalam proses pembentukan tulang. Sel lapisan endosteal dan stroma sumsum tulang menghasilkan sekitar setengah dari tulang baru, sementara osteosit hanya sedikit terlibat. Namun, kelemahan dari prosedur graft ini adalah perlunya operasi tambahan untuk mengambil graft tulang dari donor, yang dapat meningkatkan risiko morbiditas, memperpanjang waktu operasi, serta menghadapi keterbatasan dalam kuantitas dan bentuk graft tulang yang tersedia, juga biaya yang lebih tinggi.
- b. Bone graft yang berasal dari donor lain yang masih satu spesies disebut allografit. Graft ini dapat berupa mineralized freeze-dried (FDBA) atau decalcified freeze-dried (DFBA). Tulang dari donor dibersihkan dan disinfeksi untuk mengurangi risiko transmisi penyakit dari donor ke penerima. Allografit sering dipilih oleh pasien karena mengurangi komplikasi terkait dengan pengambilan graft dari donor site pada autografit. Fresh allografit jarang digunakan karena memerlukan pemeriksaan penyakit dan meningkatkan risiko transmisi penyakit. Frozen allografit disimpan pada suhu di bawah 10°C untuk mengurangi aktivitas enzim pengurai dan resiko reaksi imun, namun memiliki kelemahan yaitu kemampuan osteoinduktif yang berkurang. Keuntungan allografit meliputi pengurangan area operasi donor, nyeri post-operatif yang berkurang, dan biaya operasi tambahan yang berkurang. Namun, kerugiannya adalah risiko transmisi penyakit atau infeksi serta efektivitas yang berkurang karena kehilangan sel pertumbuhan tulang dan protein selama proses pembersihan dan disinfeksi.
- c. Xenografit adalah jenis graft tulang yang diambil dari satu spesies dan ditanamkan ke spesies lain. Salah satu jenis xenografit yang paling umum digunakan adalah anorganic bovine bone (ABB). Graft ini memiliki kelebihan karena memiliki komposisi ultrastruktural yang mirip dengan tulang manusia, terutama terdiri dari hydroxyapatite, dan telah melalui proses kimia untuk menghilangkan komponen organiknya, sehingga dapat digunakan tanpa menimbulkan respons imun dari host. Xenografit umumnya diambil dari hewan seperti sapi atau babi dan digunakan pada manusia setelah proses penghilangan bahan organiknya. Graft hydroxyapatite yang berasal dari sapi dapat diproses melalui pemanasan tinggi (osteografit) untuk menghilangkan bahan organik, sehingga menghasilkan hydroxyapatite yang mirip dengan tulang manusia.



- d. Bonegraft Sintetik, dalam kategori biomaterial sintetik, terdapat berbagai jenis material pengganti bone graft yang bervariasi dalam materi, sumber, dan asal-usulnya (natural dan sintetik). Material sintetik yang baik adalah yang memiliki struktur dan komposisi yang mirip dengan tulang alami, seperti komposit kolagen hydroxyapatite. Komposit ini telah terbukti biokompatibel baik pada manusia maupun hewan, menunjukkan sifat osteokonduktif yang lebih baik dibandingkan dengan hydroxyapatite monolitik, dan mampu menghasilkan matriks tulang yang mirip dengan tulang asli. Material sintetik seperti calcium phosphate dan bioglass adalah contoh lain yang digunakan untuk regenerasi jaringan tulang, dengan masing-masing memiliki kelebihan dalam sifat biokompatibilitas, osteointegrasi, dan osteoconductivity.

### 1.6.3.2 Metode Pembuatan Bonegraft HA

Dalam penelitian sintesis hidroksiapatit, terdapat dua metode yang umum digunakan, yaitu metode kering dan basah (Sulistioso *et al.*, 2012). Contoh metode basah meliputi sol-gel dan pengendapan basah, sedangkan metode kering seperti kalsinasi. Metode sol-gel diyakini mampu meningkatkan kristalinitas hidroksiapatit, serta menghasilkan lapisan yang homogen, efektif dan murni (Sidiqa *et al.*, 2012).

Sintering adalah proses di mana material serbuk dipadatkan menjadi benda padat melalui pemanasan tanpa mencapai titik leleh material tersebut. Keunggulan sintering termasuk pengurangan porositas, peningkatan kekuatan mekanik, dan pengaturan sifat mikrostruktur material. Sintering merupakan proses yang digunakan untuk membuat implan tulang dengan memanaskan bahan pada suhu yang berbeda (Xu *et al.*, 2019).

Menurut Babalola *et al* (2023), Ada beberapa metode sintering yang umum digunakan:

- a. Sintering Konvensional:  
Metode ini dilakukan dengan memanaskan material dalam *furnace* pada suhu di bawah titik lelehnya, Biasanya berlangsung dalam suhu yang terkontrol untuk mencegah oksidasi atau kontaminasi.
- b. Sintering dengan Tekanan (Hot Pressing):  
Menggabungkan pemanasan dengan tekanan mekanis, Biasanya digunakan untuk mendapatkan densitas tinggi dan mengurangi porositas, Cocok untuk bahan-bahan yang sulit disinter dengan metode konvensional.
- c. Sintering Plasma (Spark Plasma Sintering/SPS):  
Menggunakan arus listrik dan tekanan untuk mencapai pepadatan cepat, Proses ini berlangsung lebih cepat dibandingkan dengan sintering konvensional, Cocok untuk material dengan titik leleh tinggi dan sifat mekanik khusus.  
Hydroxyapatite sintetis (HAp) dapat disintesis menggunakan berbagai teknik yang diklasifikasikan menjadi metode kering, basah, dan suhu tinggi. Setiap metode ini menghasilkan ukuran, morfologi, dan fase kristal yang berbeda dari kalsium fosfat, selain HAp kristal murni. Oleh karena itu, karakteristik HAp secara signifikan mempengaruhi bioaktivitas, sifat mekanik, dan biologisnya. Menurut *et al.*, karakteristik ini menentukan aplikasi biomedis dari HAp, sehingga menarik untuk mengembangkan metode sintesis yang dapat mengontrol morfologi, kristalinitas, ukuran, dan komposisi kimia HAp. Dengan demikian, studi tentang masing-masing metode sintesis ditinjau untuk menyimpulkan perbedaan dan



kompleksitas setiap metode dalam sintesis HAp sintetis (pu'ad et al., 2020). Proses dalam metode basah dapat dilakukan melalui berbagai rute teknis, seperti metode hidrolisis, sol-gel, hidrotermal, dan emulsi. Metode kimia basah memiliki keunggulan dalam mengontrol morfologi dan ukuran partikel secara lebih presisi. Berdasarkan analisis statistik, metode ini paling menjanjikan untuk menghasilkan HA dalam bentuk partikel nano. Namun, metode basah menghadapi tantangan dalam mengatur kristalinitas dan kemurnian fase nanopartikel HA, serta melibatkan prosedur yang rumit dan memakan waktu, yang membuatnya kurang cocok untuk scaling up produksi serbuk HA dalam jumlah besar (Wahyudi et al., 2019).

Metode kering untuk mensintesis HAp dapat diklasifikasikan menjadi dua metode berbeda, yaitu metode padat (solid-state) dan metode mekanokimia (mechanochemical). Dalam metode kering, bahan kimia prekursor (kalsium dan fosfat), yang berbentuk kering, dicampur untuk mensintesis HAp. Menurut Sadat-Shojai et al., sebagian besar metode kering tidak memerlukan kondisi yang tepat dan terkontrol. Hal ini membuat metode kering cocok untuk produksi massal bubuk Hap (pu'ad et al., 2020).

Metode basah untuk mensintesis HAp mengacu pada penggunaan larutan air selama proses sintesis. Beberapa metode basah yang biasanya digunakan untuk ekstraksi HAp meliputi presipitasi kimia, hidrolisis, dan metode hidrotermal. Metode basah dapat mengontrol morfologi dan ukuran rata-rata partikel bubuk. Selain memiliki keunggulan ini, metode basah juga memiliki kelemahan, salah satunya adalah HAp yang dihasilkan menunjukkan kristalinitas rendah karena suhu pemrosesan yang rendah (pu'ad et al., 2020). Metode kering berbeda dengan metode basah karena tidak melibatkan penggunaan pelarut, dan dapat dilakukan dalam dua cara sintesis: state-solid dan proses mechanochemical. Metode kering memiliki keunggulan dalam produksi serbuk HA karena biayanya relatif rendah, tetapi cenderung menghasilkan partikel serbuk yang besar. Dalam beberapa tahun terakhir, terdapat kemajuan dalam persiapan HA menggunakan metode kering, terutama metode solid-state yang memakan waktu lama dan menghasilkan serbuk dengan ukuran yang cukup besar serta bentuk yang kurang homogen (Chetty et al., 2012).

#### 1.6.4 Kerang Darah (*Anadara Granosa*)



Gambar 3. Morfologi dari *Anadara granosa*, A: Kerang bagian atas; B: Kerang bagian depan; C: Daging dalam kerang (Rozirwan et al., 2020).

Menurut Linnaeus (1758). Kerang darah (*Anadara granosa*) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : *Animalia*  
 : *Mollusca*  
 : *Bivalve*  
 : *Autobranchia*  
 : *Arcoida*



Famili : *Arcide*  
Genus : *Anadara*  
Species : *Anadara granosa*

Morfologi dari *Anadara granosa* yaitu cangkang berukuran sedang hingga besar, cangkang tebal dan berat (lebih tebal di bagian perut), kulit luar berwarna putih, bagian dalam berwarna krim atau berwarna putih, cangkang tidak berbulu, bentuk lonjong menggembung dan tidak seimbang, ditutupi dengan periostracum berwarna coklat kekuningan sampai coklat kehitaman, hidup terendam lumpur atau lumpur berpasir di dalamnya wilayah pesisir, nama lokal: cangkang darah (Desrita dan Susetya, 2020).

*Anadara granosa* adalah sekelompok keluarga *Arcidae*, kelas *bivalvia*, filum moluska yang dikenal dalam waktu yang lama. Moluska laut telah dilaporkan memiliki aktivitas biologis karena mereka mengandung berbagai senyawa bioaktif, seperti kelompok gastropoda pada vegetasi mangrove, ekosistem terumbu karang, dan bivalvia laut. Senyawa bioaktif menghasilkan senyawa esensial aktivitas biologis dalam bentuk antioksidan. Antioksidan bertujuan untuk menangkap radikal bebas yang masuk (Rozirwan *et al.*, 2023).

#### 1.6.4.1 Komposisi Kerang Darah

Salah satu jenis limbah cangkang kerang yang sering ditemui adalah cangkang kerang darah (*Anadara granosa*). Cangkang ini terdiri dari mineral alami seperti kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), magnesium (Mg), sodium (Na), fosfor (P), dan elemen lainnya dengan komposisi kalsium yang tinggi. Cangkang ini dapat digunakan sebagai bahan komposit pengganti tulang (Hazmi *et al.*, 2007). Cangkang kerang darah dapat dimanfaatkan sebagai bahan biomaterial karena mempunyai kandungan kalsium yang cukup tinggi, yang berguna untuk memperkuat tulang. Kandungan cangkang kerang darah terdiri dari 66,70% Kalsium Oksida ( $\text{CaO}$ ), 7,88% Silika ( $\text{SiO}_2$ ), 1,25% Aluminium Oksida ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), 0,03% Ferri Oksida ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), dan 22,28% Magnesium Oksida ( $\text{MgO}$ ) (Sukirawati dan Resky, 2024).

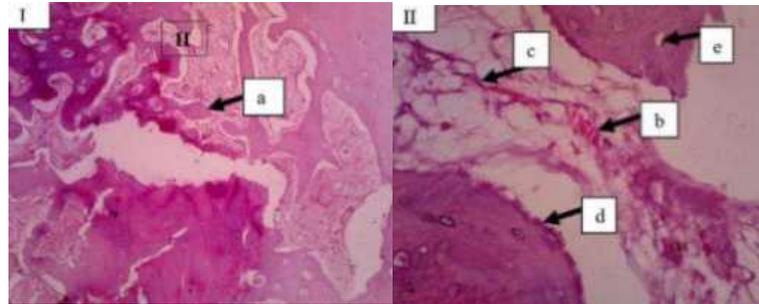
#### 1.6.4.2 Potensi Sebagai Bahan Implan

Cangkang kerang (*Anadara granosa*) yang termasuk dalam famili *Arcidae* merupakan limbah dari filum *Mollusca* yang merupakan salah satu limbah cangkang laut yang banyak ditemukan di sepanjang tepi lautan dan beberapa industri makanan di lautan. Selain itu, potensinya dalam mensintesis HAp untuk tujuan biomedis telah dilaporkan oleh berbagai peneliti. Hal ini disebabkan kekayaan kalsium karbonat yang dapat digunakan sebagai prekursor kalsium untuk sintesis Hap (Mtavangu *et al.*, 2022). Pada penelitian yang ada hasil limbah cangkang kerang darah dimanfaatkan dengan membuat reminerale untuk veneer gigi (Hikmah *et al.*, 2023).



### 1.6.5 Histopatologi

#### 1.6.5.1 Histopatologi Kesembuhan Tulang



Gambar 4. Histopatologi Proses Penyembuhan Tulang (Asih *et al.*, 2019).

Pada gambar tersebut terlihat peningkatan aktivitas osteoblas (d) dan osteosit (e) setelah tulang menerima implantasi bonegraft, yang mengindikasikan pertumbuhan tulang baru yang lebih intensif. Dalam penyembuhan tulang, Faktor Pertumbuhan Endotel Pembuluh Darah (VEGF) sangat penting untuk membentuk pembuluh mikro yang mempercepat fagositosis oleh osteoklas. Ini diikuti dengan peningkatan aktivitas osteoblas yang mempercepat pembentukan tulang fibrosa (woven bone) dan degradasi jaringan fibrosa. Sebelum proses penyembuhan tulang dimulai, terjadi peningkatan osteoblas, osteoklas, dan pembentukan tulang fibrosa (woven bone). Namun, tulang fibrosa (woven bone) akan menurun pada minggu berikutnya karena proses kalsifikasi. Proses pembentukan kalus dimulai pada minggu kedua dan mencapai puncaknya pada minggu keenam bersamaan dengan kalsifikasi hingga penyembuhan tulang terjadi (Asih *et al.*, 2019).

Histopatologi penyembuhan tulang terdiri dari empat fase yang saling berhubungan, dimulai dengan respons inflamasi, pembentukan kalus lunak yang terdiri dari jaringan fibrosa dan kartilago, pembentukan kalus keras (tulang spon), dan remodeling. Penyembuhan tulang di area diaphysis terjadi melalui osifikasi endokondral dan osifikasi intramembranosa. Osifikasi endokondral adalah proses pembentukan tulang selama fase kartilago, yang ditandai oleh hipertrifikasi, kalsifikasi kondrosit dalam matriks kartilago diikuti oleh angiogenesis. Selanjutnya, osteoblas akan mensintesis tulang spon (tulang tidak matang) dalam jaringan kolagen yang diproduksi oleh kondrosit. Evaluasi komposisi kartilago dari kalus dapat menjadi indikator sensitif kemajuan penyembuhan tulang (Umiatin *et al.*, 2021).

- a. Fase Inflamasi, Tulang memiliki dua bentuk utama, yaitu tulang kompak (substansi kompakta) dan tulang spons (substansi spongiosa). Tulang kompak terlihat sebagai massa padat dengan ruang-ruang kecil yang hanya terlihat dengan mikroskop. Pada tulang panjang seperti femur atau humerus, bagian batangnya (diaphysis) terdiri dari silinder tulang kompak dengan dinding tebal dan rongga sumsum di dalamnya. Tulang panjang (epifisis) terutama terdiri dari tulang spons yang ditutupi oleh lapisan tipis tulang kompak. Zona pertumbuhan tulang terletak di antara tulang kompak epifisis dan tulang spons metafisis selama proses pertumbuhan. Tulang kompak dilindungi oleh periosteum, lapisan jaringan ikat yang memiliki kemampuan untuk membentuk tulang. Rongga sumsum dan rongga dalam tulang spons dilapisi oleh



endosteum, yang juga memiliki sifat pembentukan tulang. Pada tulang pipih tengkorak, substansi kompak terbentuk di permukaan luar dan dalamnya, yang sering disebut sebagai tabel luar dan dalam (Fawcett, 2010).

- b. Fase Reparasi, Cedera pada tulang yang menghasilkan patah tidak hanya merusak sel-sel, pembuluh darah, dan matriks tulang, tetapi juga dapat melibatkan jaringan lunak di sekitarnya seperti otot dan pembuluh darah. Setelah cedera, respons inflamasi terjadi segera dengan puncaknya dalam satu hari pertama dan berangsur-angsur mereda setelah satu minggu dari patah tulang. Reaksi inflamasi ini berperan dalam mengimobilisasi patah tulang dengan dua mekanisme: rasa sakit yang menghalangi gerakan untuk melindungi area yang cedera dan pembengkakan yang secara hidrostatik membatasi gerakan di sekitar lokasi patah tulang. Pada tempat patah tulang, kerusakan pada pembuluh darah kecil akan mengaktifkan serangkaian reaksi biokimia termasuk pembekuan darah dan pelepasan mediator kimia yang merangsang proses penyembuhan. Area awal patah tulang, yang cenderung hipoksik dan asam, mendukung aktivitas sel-sel seperti PMN (polimorfonuklear), limfosit, monosit, dan makrofag yang berperan dalam menghasilkan sitokin untuk merangsang pembentukan pembuluh darah baru. Darah yang bocor dari pembuluh darah yang rusak membentuk hematoma, yang bertindak sebagai penghalang untuk mengontrol perdarahan dan sebagai medium untuk migrasi seluler yang diperlukan untuk proses penyembuhan tulang. Hematoma juga berfungsi sebagai sumber molekul sinyal yang penting untuk menginisiasi proses penyembuhan. Keseluruhan proses ini menyebabkan pembentukan kalus reparatif yang dikenal sebagai kalus eksternal (Mahyudin, 2018).
- c. Fase Remodeling, Fase remodelling merupakan fase terakhir penyembuhan fraktur dan diawali dengan penggantian tulang woven dengan tulang lamellar dan resorpsi kalus yang berlebihan. Walaupun fase ini menggambarkan aktivitas normal remodelling tulang, fase ini dapat berlangsung selama beberapa tahun pada tempat fraktur. Remodelling penyembuhan fraktur setelah semua tulang woven diganti terdiri dari resorpsi osteoklastik pada trabekula yang tidak beraturan dan pembentukan tulang baru searah gaya beban. Hasil dari fase remodelling adalah modifikasi bertahap daerah fraktur di bawah pengaruh beban mekanis sampai stabilitas optimal tercapai, akhirnya korteks tulang akan memiliki arsitektur yang sama dengan sebelum terjadinya fraktur (Mahyudin, 2018).

#### 1.6.5.2 Histopatologi Kesembuhan Tulang Dengan Bahan Implan



5. Histopatologi kesembuhan tulang pasca implantasi bonegraft (Demircan dan Isler, 2021).

ambar diatas merupakan gambaran histopatologi tulang pasca implantasi pada tikus putih dengan menggunakan bahan bifosfonat lokal dan sistemik,



pada penelitian ini digunakan sebanyak 32 tikus putih yang dibagi atas 4 kelompok percobaan, kelompok pertama hanya diberi perlakuan patah tulang tanpa pengaplikasian bahan lain. Kelompok kedua diberikan perlakuan patah tulang dan pengaplikasian allograft. Kelompok ketiga larutan alendronate ditambahkan secara lokal ke bahan cangkok sebelum diaplikasikan pada lokasi kerusakan tulang. Pada kelompok keempat, alendronate diberikan secara sistemik setelah lokasi kerusakan tulang dicangkokkan dan ditutup terlebih dahulu. Setelah 6 minggu, seluruh tikus dibunuh dan sampel yang diperoleh diperiksa secara histopatologi. Hasil dari pengamatan menunjukkan skor peradangan menunjukkan signifikansi statistik. Kelompok kontrol 1 menunjukkan peningkatan tingkat peradangan, dan ini signifikan secara statistik dibandingkan dengan kelompok SA ( $p = 0,029$ ) dan kelompok Kontrol 2 ( $p = 0,009$ ). Baik pengaplikasian alendronate lokal maupun sistemik tidak menyebabkan peningkatan peradangan. Demikian pula, skor nekrosis untuk kelompok Kontrol 1 lebih signifikan secara statistik dibandingkan kelompok lain. Tidak ada peningkatan nekrosis dengan sampel yang diberikan alendronate. Peningkatan fibrosis yang signifikan secara statistik diamati pada kelompok Kontrol 1, dan tidak ada perbedaan yang signifikan secara statistik antara kelompok lain.

Pembentukan tulang baru pada LA dan SA lebih signifikan secara statistik dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok LA, tulang yang baru terbentuk terlihat lebih matang dan berkembang dengan baik (Gambar 3). Penyambungan tulang antara dinding cangkok dan dinding yang rusak dapat dengan mudah dilihat pada kelompok LA dan SA (Demircan dan Isler, 2021).

Pemeriksaan histopatologi spesimen tulang ditambah dengan kultur tulang dianggap sebagai gold standart diagnosis osteomyelitis (OM), Fraktur ditandai dengan kontak antara fragmen utama setelah reduksi yang biasanya mengembalikan panjang normal tulang (Kellam *et al.*, 2018).

#### 1.6.6 Aktivitas Seluler Terhadap Penolakan Benda Asing

Reaksi benda asing (FBR) adalah proses yang tidak dapat dihindari yang terjadi setiap kali material tertanam di dalam tubuh. Proses penanaman ini melukai jaringan di sekitar benda asing, yang memicu proses peradangan. Selama beberapa minggu hingga bulan, proses peradangan ini berkembang menjadi respons fibrotik, yang meliputi dan mengisolasi material yang tertanam. Ketika material asing tertanam dengan tujuan memberikan terapi, baik tahap akut (yang dominan peradangan) maupun kronis (fibrotik) dari FBR menimbulkan tantangan signifikan terhadap integritas dan fungsi terapeutiknya (Carnicer-Lombarte *et al.*, 2021).

Fase akut dari Reaksi Benda Asing (FBR) dimulai segera setelah penanaman. Kerusakan jaringan dan ekstrasvasi darah yang tak terhindarkan selama proses penanaman memicu aliran sel-sel mediator peradangan ke area tersebut. Dalam hitungan detik setelah penanaman, protein banyak di antaranya berasal dari darah yang ekstrasvasasi, seperti albumin dan fibrinogen menempel secara non-spesifik pada implan. Lapisan protein ini menjadi matriks sementara, melalui mana sel-selumpul di area tersebut dapat mengidentifikasi dan berinteraksi dengan benda asing. Berjalannya waktu, protein-protein dalam matriks sementara ini mengalami amis adsorpsi-desorpsi, di mana protein-protein kecil yang awalnya ditemukan



di sekitar permukaan implan (seperti albumin) secara bertahap digantikan oleh yang lebih besar. Proses ini dikenal sebagai efek Vroman dapat bervariasi dalam komposisi protein dan waktu untuk berbagai material yang ditanamkan, menyebabkan perbedaan dalam FBR di berbagai material bahkan pada tahap awal ini. Proses penanaman menandai awal dari serangkaian peristiwa seluler yang membentuk FBR. Dalam beberapa menit setelah penanaman, neutrofil responder awal dalam jenis cedera jaringan apa pun bermigrasi ke area tersebut. Neutrofil menempel pada lapisan protein di sekitar implan dan mulai melepaskan faktor-faktor yang mempromosikan kemajuan peradangan. Bersama dengan sinyal kimia serupa yang dihasilkan dari pembekuan darah dan aktivasi sel mast, faktor-faktor ini meningkatkan permeabilitas vaskular dan menarik monosit ke situs penanaman. Setelah tiba, monosit mulai diferensiasi menjadi makrofag, yang selanjutnya berkembang biak dan menghuni lesi. Dalam dua hari setelah penanaman, gelombang awal neutrofil telah sepenuhnya menghilang untuk memberi jalan pada populasi makrofag yang memelihara diri sendiri dengan terus-menerus berkembang biak dan melepaskan kemoatraktan yang merekrut lebih banyak makrofag. Makrofag ini juga memediasi inti dari respons peradangan, melepaskan faktor pro-inflamasi seperti TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), dan interleukin IL-1b, IL-6, dan IL-8. Hingga tahap ini, respons peradangan terhadap penanaman perangkat sangat mirip dengan yang terjadi dalam setiap cedera neutrofil bergegas ke area dan merekrut makrofag, yang pertama-tama menghilangkan ancaman yang menyerang dan kemudian memediasi perbaikan jaringan. Namun, saat makrofag menghuni situs penanaman, respons peradangan akut awal ini berkembang menjadi FBR. Saat makrofag menghuni situs lesi, mereka mulai menempel dan menutupi permukaan implan yang terbuka. Proses penempelan ini dianggap sebagai komponen kritis dari inisiasi FBR, dan terjadi melalui integrin kelas luas protein transmembran yang mengikat protein-protein lingkungan jaringan yang secara khusus mengikat protein-protein yang menempel pada permukaan implan. Secara khusus, integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 dianggap penting untuk tahap penempelan awal ini karena secara spesifik mengikat protein-protein serum pada permukaan implan seperti fibronectin dan fibrinogen. Setelah tahap penempelan awal ini, makrofag mengalami remodeling sitoskeleton. Makrofag yang terikat meratakan diri di atas permukaan implan dalam upaya untuk menelan dan fagositosis, dan memperpanjang podosom struktur yang khusus dalam proteolisis dan remodeling matriks ekstraseluler. Makrofag yang terikat dan diaktifkan juga mengeluarkan faktor kemoatraktif yang terus-menerus merekrut makrofag bahkan setelah cedera penanaman awal telah teratasi. Lapisan makrofag yang terbentuk di sekitar implan menciptakan ruang yang terdefinisi dan terisolasi. Tidak dapat menelan seluruh implan karena ukurannya yang besar, makrofag sebagai gantinya mengeluarkan faktor-faktor ke dalam ruang ini dalam upaya untuk menguraikan benda asing dan sebaliknya fagositosis fragmen-fragmen yang dihasilkan. Jika makrofag berhasil menguraikan dan fagositosis implan selama fase akut FBR ini, reaksi tersebut berakhir, dan jaringan secara perlahan kembali normal. Beberapa perangkat implantasi dirancang untuk memanfaatkan proses inflamasi ini untuk menguraikan setelah mereka iikan peran terapeutik mereka (Carnicer-Lombarte *et al.*, 2021).



## BAB II METODOLOGI PENELITIAN

### 2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 – selesai di Laboratorium Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Teknologi proses Mineral Politeknik ATI Makassar. Penelitian ini menggunakan sampel cangkang kerang darah (*Anadara granosa*). Sintering hidroksiapatit (HAp) dari cangkang kerang darah, yang akan dilakukan di Laboratorium Teknologi proses Mineral Politeknik ATI Makassar, sementara proses uji coba bahan implan kepada hewan coba dan koleksi spesimen dilakukan di laboratorium Terpadu Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin dan Lab Bedah Rumah Sakit Hewan Universitas Hasanuddin.

### 2.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental yang akan dibahas secara deskriptif dengan melihat gambaran struktur dan mikroskopis jaringan sel-sel osteogenesis kesembuhan tulang pasca implantasi *graft* dari bahan baku cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) untuk penanganan fraktur. Dimana penelitian ini melakukan dua kegiatan utama yaitu pembuatan *bone graft* dan uji coba pada hewan coba.

### 2.3 Materi Penelitian

#### 2.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu botol vial, lumpang alu, blender, cawan porselin, kertas saring, gelas ukur, gelas beaker, mesin *furnace* (@Controlab), *automatic stirrer*, *magnetic stirrer*, *PH digital*, tabung reaksi, timbangan digital (@Mettler toledo).

#### 2.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu fosfor, *amonium hidroksida* ( $H_2O_2$ ), *diammonium hydrogen phosphat*  $((NH_4)_2HPO_4)$ , cangkang kerang darah, tikus Wistar jantan (12 ekor), *ketamine*, *xylazine*, *atropine sulfate*, *epinephrine*, tampon, catgut chromic 3/0 (®Gea), silk 3/0 (®OneMed), povidone iodine, Alkohol 70%, NaCl Steril.

### 2.4 Prosedur Penelitian

#### 2.4.1 Pembuatan Bone Graft Cangkang Kerang Darah (*Anadara granosa*)

##### a. Persiapan Material Sebelum Disintesis

Sampel cangkang kerang darah yang digunakan diperoleh dari pasar lokal kota Makassar. Cangkang kerang darah pertama-tama dibersihkan menggunakan air bersih untuk menghilangkan kotoran dan sisa-sisa jaringan, kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari selama sehari. Setelah itu, cangkang kerang dipecah menjadi beberapa keping dan selanjutnya direndam dalam larutan  $H_2O_2$  secara bertahap selama 2-4 hari, Tujuan perendaman ini adalah mengubah warna dari asli putih kekuningan menjadi putih. Jika perendaman berlangsung lebih dari 24 jam, bahan akan menjadi sangat putih tetapi samping berupa menjadi rapuh seperti butiran pasir (Adrianto et al., 2019).  $H_2O_2$  berperan sebagai oksidator untuk mengoksidasi dan membunuh bakteri sampel (Hutajulu, 2017).



## 2.4.2 Sintesis Hidroksiapatit Cangkang Kerang Darah

### a. Sintering Tahap I

Pembuatan serbuk cangkang kerang darah (*Anadara granosa*) dilakukan dengan menggunakan metode kombinasi pemanasan basah dan kering. Sintering dilakukan dengan menggunakan mesin *furnace* dengan suhu berbeda, yaitu 800°C dan 1000°C selama 2 jam dengan kenaikan suhu 10°C/menit sehingga diperoleh serbuk kalsit. Pelaksanaan proses sintering dilakukan pada temperatur yang bervariasi yakni pada 1000°C dengan laju kenaikan temperatur 2 °C/min, waktu penahanan (*soaking time*) selama 1 jam, dan laju penurunan temperatur 10 °C/min (Masrukan dan Mujinem, 2016).

### b. Sintesis Hidroksiapatit

Serbuk kalsit yang telah diperoleh akan disintesis dengan menggunakan metode pemanasan basah yaitu dengan metode presipitasi. Suspensi kalsit sebanyak 25 mg dibuat dengan mencampurkannya dalam 250 ml aquabidest. Pada suhu 70°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer*, lalu menambahkan fosfor dengan suspensi 100 ml aquabidest dengan konsentrasi 0,68 molar secara bertahap kedalamnya sambil terus diaduk selama 1 jam. Kondisi suhu dan pH dijaga agar tetap pada Ph 8-9 dengan pemberian amonia secara bertahap. Selanjutnya, larutan didiamkan selama 1 jam sehingga terbentuk endapan kalsit. Endapan kalsit kemudian disaring dan dikeringkan sehingga terbentuk serbuk hidroksiapatit dan dilanjutkan dengan pengukuran rendemen.

### c. Sintering Tahap II

Sintering tahap ke-2 dilakukan dengan cara yang sama pada sintering tahap pertama, sehingga didapatkan *bone graft* yang belum steril. Tahapan selanjutnya yaitu perhitungan perbandingan antara kalsium dan fosfor (Ca/P) dengan menggunakan alat spektrofotometri. Tahap terakhir dilakukan dengan melakukan pencetakan terhadap *bone graft* yang telah disintesis dalam bentuk komersil.

Setelah dilakukan sintering tahap dua, maka telah diperoleh bahan implan dari cangkang kerang darah yang diberi nama Granulosa Hidroksiapatit (GHA). Bahan implan GHA kemudian dimasukkan kedalam botol sampel yang kemudian disimpan.

## 2.4.3 Uji Coba Pada Hewan Percobaan

### a. Persiapan Hewan

Sebanyak 12 ekor tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) digunakan sebagai model hewan percobaan fraktur dalam penelitian ini. Tikus yang digunakan berjenis kelamin jantan dengan berat badan 200-300 g dengan usia 2-3 bulan. Hewan coba pada penelitian ini telah memiliki izin sebagai hewan coba fraktur dari Komite Etik Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Hasanuddin. Sebelum perlakuan, tikus diaklimatisasi selama 10 hari untuk penyesuaian fisiologisnya. Dimana Tikus diberikan pakan dan minum standar. Setelah itu, secara acak tikus putih dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu Kelompok I (KI) sebanyak 4 ekor sebagai kelompok kontrol negatif, Kelompok II (KII) sebanyak 4 ekor sebagai kelompok kontrol positif yang disubstitusi *bone graft* komersil (GamaCha) dan Kelompok III (KIII) sebanyak 4 ekor sebagai kelompok kontrol positif yang disubstitusi *bone graft* GHA. Syarat untuk dilakukan uji

ANOVA adalah ada pengulangan pada setiap perlakuan. Kemerahan, ka, dan tepi luka menyatu dianalisis dengan uji *Two Way ANOVA* (Djauhari, 2009). Jumlah sampel dalam penelitian ini minimum yang harus ada adalah 4 sampel untuk masing-masing kelompok (Daniel, 2005).



Sesuai dengan penelitian ini menggunakan 4 sampel hewan coba untuk masing-masing kelompok perlakuan.

#### b. Operasi Implantasi

Sebelum operasi, area kaki belakang tikus dicukur. Tikus dianestesi secara intraperitoneal menggunakan ketamin 10% dengan dosis 50 mg/kg berat badan dan xylazin 2% dengan dosis 5 mg/kg berat badan. Prosedur bedah dilakukan secara aseptik dan steril. Kulit area femur disayat hingga terlihat m. vastus lateralis, yang kemudian dipreparasi dan dikuakkan menggunakan retractor hingga tulang femur terlihat. Tulang femur bagian diafisis dilubangi menggunakan mata bor berdiameter 0,2 mm, dan bone graft dimasukkan ke dalam lubang tersebut sesuai dengan masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok I adalah kelompok kontrol (tanpa implan), sedangkan Kelompok II (KII) dan Kelompok III (KIII) adalah kelompok perlakuan. Otot dan fascia dijahit menggunakan benang polyglactin acid 4.0 USP dengan pola jahitan lock-stitch, sedangkan kulit dijahit menggunakan benang silk 4.0 USP dengan pola jahitan simple interrupted. Luka area bedah dibersihkan dengan NaCl 0,9% dan ditutup menggunakan plester leukoplast (Hypafix®).

#### c. Koleksi Sampel

Pada minggu ke-2 pasca operasi, 2 ekor tikus pada kelompok I, II dan III. Pada minggu ke-4 pasca operasi, hal yang sama juga dilakukan pada empat ekor tikus lain kelompok I II dan III. Kemudian kelinci di *euthanasia* lalu dipotong tulang femurnya pada daerah pemberian implan *bonegraft* untuk di ambil sampel tulangnya sebagai sampel preparat guna mengamati gambaran perubahan sel tulang setelah pemberian *bonegraft* melalui aspek histopatologi.

### 2.5 Pembuatan Preparat Histopatologi Dengan Pewarnaan HE

Jaringan tulang direndam formalin selama dua hari lalu didekalsifikasi dengan menggunakan larutan *Rhyco Plank* (aluminium klorida 14 gram, HCl 37% sebanyak 17 ml, asam formiat pekat sejumlah 10 ml, dan akuades steril yang digunakan untuk pengenceran hingga volume mencapai 200 ml) selama 3 hari. Hal bertujuan untuk menghilangkan sisa kalsium sehingga jaringan menjadi lebih lunak. Jaringan selanjutnya didehidrasi untuk menghilangkan sisa air yang terkandung dalam jaringan dengan cara direndam pada alkohol bertingkat (70%, 80%, 95% dan 100%) untuk alkohol 70%, 80%, 90% direndam masing-masing selama 24 jam untuk alkohol 95% direndam selama 12 jam dan alkohol 100% direndam dengan 3 kali rendaman masing-masing selama 1 jam, dilanjutkan dengan penjernihan (clearing) dengan cara direndam dalam larutan xylol I, II, dan III selama 1 jam, pada tahanan III xylol dibagi atas 2 suhu yaitu 30 menit suhu lab dan 30 menit suhu inkubator untuk membuang alkohol yang terkandung di dalam jaringan. Penanaman (embedding) jaringan dilakukan dengan cara infiltrasi jaringan pada paraffin cair bersuhu 57- 59°C selama 1 jam. Proses ini dimaksudkan agar rongga yang terdapat dalam jaringan dapat terisi oleh parafin sehingga diperoleh jaringan yang keras dan mudah dipotong.

Proses penanaman dilanjutkan dengan tahap embedding, jaringan 12 mm ke dalam blok cetakan berisi parafin cair selama 30 menit sampai parafin kemudian dilepas dari cetakan dan diberi label. Pemotongan jaringan secara mekanis dengan menggunakan mikrotom untuk mendapatkan irisan 5 µm. Irisan yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam waterbath dengan



suhu 50°C kemudian diambil menggunakan kaca objek dan diberi label. Tahapan selanjutnya yaitu pewarnaan preparat dengan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Pewarnaan pada preparat jaringan diawali dengan deparafinasi menggunakan xylol selama 10 menit. Tahap ini dilakukan untuk menghilangkan parafin dalam sediaan supaya tidak menghalangi proses pewarnaan. Sediaan kemudian direhidrasi menggunakan alkohol dengan konsentrasi menurun (100%, 95%, 80%, 70%) masing-masing selama 1 menit, kemudian dicuci dengan menggunakan aquades selama 5 menit. Rehidrasi bertujuan untuk menghilangkan xylol sehingga lingkungan sediaan sama dengan zat warna. Pewarnaan inti sel dilakukan dengan cara merendam sediaan pada larutan Hematoksin selama 2 menit, kemudian dicuci dengan aquades sehingga inti sel akan nampak berwarna biru keunguan. Pewarnaan dilanjutkan dengan menggunakan larutan eosin selama 30 detik kemudian dicuci dengan menggunakan aquades untuk memberikan warna merah pada sitoplasma. Preparat yang telah terwarnai selanjutnya didehidrasi dengan cara mencelupkan sediaan ke dalam alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, 95% dan 100% masing-masing sebanyak 3 celupan, dikeringkan kemudian dilakukan clearing menggunakan larutan xylol selama 6 menit untuk menghilangkan alkohol. Tahap selanjutnya adalah mounting dengan cara ditetaskan balsam Canada agar preparat menjadi awet dan jernih, kemudian preparat ditutup menggunakan deck glass.

## **2.6 Pengamatan Preparat Histopatologi**

### **2.6.1 Pengamatan Secara Deskriptif**

Pengamatan dilakukan terhadap masing-masing preparat pada seluruh kelompok perlakuan dengan menggunakan *blind method*. Hal tersebut dilakukan untuk meningkatkan validitas dan objektivitas hasil pengamatan. Penghitungan jumlah osteoblas dan osteoklas dilakukan dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400X. Setiap sediaan diamati pada 5 lapang pandang yang berbeda. Sel osteoblas akan nampak berbentuk kuboid atau kolumnar pada tepi matriks tulang dan sel osteoklas sekilas mirip osteoblas namun lebih besar. Hasil penghitungan dari 5 lapang pandang pada tiap preparat dijumlahkan dan dirata-rata. Selanjutnya hasil dari semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan menggunakan analisis statistik. Evaluasi keberhasilan penggunaan *bone xenograft* dari cangkang kerang darah dapat diketahui melalui pemeriksaan gambaran sampel histopatologi pada minggu ke-2 dan ke-4 untuk mengamati struktur sel serta jaringan tulang dan tingkat densitas tulang tikus.

### **2.6.2 Parameter Evaluasi**

Evaluasi keberhasilan penggunaan cangkang kerang darah dapat diketahui melalui pemeriksaan gambaran sampel histopatologi pada minggu ke-2 dan ke-4 untuk mengamati struktur sel serta jaringan tulang dan jumlah sel osteogenesis pada tulang.

## **2.7 Analisis Data**

Pengamatan hasil gambar sampel histopatologi dianalisis secara deskriptif. Pemeriksaan struktur jaringan tulang yang dianalisis secara statistik. Analisis data dengan deskripsi histopatologi, two-way ANOVA dan Uji Duncan.



## 2.8 Alur Penelitian

