

Gambaran Total Leukosit Darah Kelinci Pasca-implantasi Bahan Cangkok Demineralisasi Asal Tulang Sapi Bali

*(PROFILE TOTAL LEUCOCYTE COUNT OF POST-IMPLANTATION BALI CATTLE
DEMINERALIZED BONE GRAFT IN RABBITS)*

**Komang Darma Yudha Putra¹,
Iwan Harjono Utama², I Wayan Wirata³, Luh Made Sudimartini⁴**

¹Mahasiswa Sarjana Pendidikan Dokter Hewan, ²Laboratorium Biokimia Veteriner;
³Laboratorium Bedah Veteriner, ⁴Laboratorium Fisiologi, Farmakologi, dan Farmasi Veteriner,
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana
Jl. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia, 80234,
Telp/Fax: (0361) 223791,
Email: yudhaputraa96@gmail.com

ABSTRAK

Cangkok tulang *xenograft*, salah satunya dengan menggunakan tulang sapi, sering digunakan pada perlakuan ortopedik untuk melakukan implantasi. Implantasi bisa dilakukan dari bahan cangkok demineralisasi asal tulang sapi bali. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh penggunaan bahan cangkok demineralisasi asal korteks tulang femur sapi bali terhadap kondisi fisiologis hewan model dilihat dari aspek jumlah total leukosit. Jumlah leukosit dapat menjadi acuan untuk mengetahui kondisi responsif tubuh terhadap adanya material asing. Sepuluh ekor kelinci digunakan dalam penelitian ini dan dibagi atas dua kelompok. Setiap kelinci pada setiap kelompok dibuat sebuah lubang dengan diameter 5 mm pada diafisis tulang femur kelinci. Pada Kelompok Kontrol lubang tidak diimplantasi bahan cangkok, sedangkan pada Kelompok Perlakuan, lubang diimplantasi bahan cangkok demineralisasi. Dilakukan pemeriksaan hematologi selama enam minggu dengan interval waktu dua minggu, yaitu hari ke-0 (24 jam), minggu ke-2, 4 dan 6 pasca operasi untuk pemeriksaan jumlah total leukosit yang kemudian diuji secara statistik dan disajikan secara deskriptif. Hasil menunjukkan bahwa implantasi bahan cangkok demineralisasi asal tulang sapi bali pada hewan uji selama enam minggu tidak menyebabkan perubahan jumlah total leukosit dari nilai rujukan normal. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahan cangkok demineralisasi asal korteks tulang femur sapi bali tidak mengalami penolakan pada tubuh hewan uji.

Kata-kata kunci: cangkok tulang; cangkok tulang *xenograft*; demineralisasi; fraktur; total leukosit; tulang sapi bali

ABSTRACT

Bone xenografts, such as by obtaining from bovine bone, are frequently used in orthopedic for implantation treatments. A demineralized graft material made from Bali cattle bone can be used for implanting. The purpose of this study was to evaluate the effect of demineralized graft material from cortical femur bone of Bali cattle on the physiological conditions of the animal model in terms of total leukocytes count. The number of leukocytes can be used as a guide to determine how responsive the body is to foreign material. In this study, 10 rabbits were used and divided into two groups. The diaphysis of the rabbit femur in each group was given a hole 5 mm in diameter. In Control Group, the graft material was not implanted in the hole, while it was implanted with demineralized graft material in Treated Group. Week 0 (24 hours), week 2, 4 and 6 post-operative, hematological examinations was performed at 2-week interval to monitor the total leukocyte counts, which was then statistically tested and presented descriptively. The results showed that 6 weeks implantation of demineralized graft material from Bali cattle bone in animal model had no effect on the total leukocytes counts comparing

to the normal reference value. Based on the findings, it can be concluded that the demineralized graft material from cortical femur bone of Bali cattle was not rejected by the bodies of animal model.

Keywords: bali cattle bone; bone graft; bone xenograft; demineralization; fracture; leukocyte count

PENDAHULUAN

Fraktur merupakan salah satu insiden yang banyak ditemukan di tempat praktik Dokter Hewan, Klinik Hewan, maupun Rumah Sakit Hewan namun hanya sedikit yang dilaporkan. Berdasarkan temuan Wirata *et al.* (2018) terhadap hasil survei di Rumah Sakit Hewan Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana (RSHP FKH UNUD), kejadian fraktur di Bali yang ditemukan mencapai 1,8% dari total 1608 total pasien yang masuk pada tahun 2016.

Pencapaian kesembuhan tulang yang optimum pada hewan merupakan masalah klinis yang umum dan rumit dialami para praktisi dalam operasi pembedahan tulang (Ratajska *et al.*, 2008). Jika kerusakan tulang yang dialami cukup besar maka tidak ada kemungkinan untuk tulang sembuh secara alami (Li *et al.*, 2015), sehingga diperlukan pencangkokan tulang. Pencangkokan tulang adalah prosedur operasi untuk menggantikan tulang yang patah ataupun hancur dalam kejadian yang sangat kompleks. Cangkok tulang digunakan untuk menangani berbagai gangguan tulang termasuk fraktur *union* dan *nonunion*, pseudoarthrosis, infeksi dan tumor (Hung, 2012). Dewasa ini cangkok tulang cukup sering dilakukan dalam dunia medis, jenis cangkok tulang *xenograft* banyak digunakan. Biomaterial *xenograft* yang jumlahnya cukup banyak untuk digunakan saat ini adalah tulang sapi.

Tulang sapi sering digunakan sebagai bahan cangkok pada perlakuan ortopedik dalam periodontal, *maxillofacial*, dan bedah neurologi (Heo *et al.*, 2011). Menggunakan total leukosit sebagai parameter terjadinya rejeksi oleh tubuh hewan uji terhadap bahan cangkok yang diimplantasikan karena menurut Balta *et al.* (2016) material cangkok yang digunakan dalam penelitiannya menginduksi respon leukosit menjadi lebih lambat, sehingga mendukung dalam proses awal penyembuhan tulang, dibandingkan dengan biomaterial lainnya, dan dengan demikian menjadikannya salah satu material yang baik untuk teknik cangkok jaringan tulang. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan biomaterial *xenograft* yang berasal dari korteks tulang sapi bali yang didemineralisasi terhadap respon fisiologis selama proses kesembuhan tulang melalui nilai total leukosit yang dapat digunakan untuk menggambarkan penolakan bahan asing di dalam tubuh hewan uji.

METODE PENELITIAN

Persiapan Hewan Model

Dalam penelitian ini digunakan kelinci lokal jantan sebanyak 10 ekor dengan berat $2500\text{g} \pm 500\text{g}$. Penggunaan hewan coba dalam studi ini telah disetujui oleh Komite Etik Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Udayana (No. 413/KE-PH-Lit-1/VII/2018). Adaptasi hewan dilakukan selama satu minggu di RSHP FKH UNUD sebelum perlakuan untuk mengkondisikan semua hewan dalam status sehat secara klinis. Hewan dikandangkan secara individual dan diberi pakan konsentrat komersil dan sayuran, diberikan minum air secara *ad libitum*. Kelinci dikelompokkan dalam dua kelompok, meliputi kelompok Kontrol, yaitu kelinci yang tidak diimplantasikan bahan cangkok demineralisasi asal tulang femur sapi bali dan kelompok Perlakuan, yaitu kelinci yang diimplantasikan bahan cangkok demineralisasi asal tulang femur sapi bali.

Persiapan Bahan Cangkok Demineralisasi

Proses pembuatan bahan cangkok demineralisasi mengacu pada studi Wirata *et al.* (2018) yang memodifikasi prosedur Abbas *et al.* (2001), yang meliputi pembersihan tulang femur sapi bali dari sisa otot dan jaringan lemak menggunakan *scalpel* kemudian tulang dipotong dengan ukuran $0,5 \times 0,5 \text{ cm}$. Selanjutnya, tulang dihancurkan menggunakan lesung kecil terbuat dari besi. Hasil berupa serbuk tulang seukuran pasir pantai berbutir, kemudian dicuci menggunakan *aquades* dan selanjutnya dengan NaCl 0,9%. Serbuk yang sudah dibersihkan kemudian direndam selama 12 jam menggunakan *chloroform-methanol* (rasio 1:1) untuk menghilangkan lemak (*defatting*) dan protein (*deproteinizing*). Setelah itu serbuk tulang direndam dalam HCL 5% dalam *aquades* selama 72 jam pada suhu ruangan dan larutan HCL diganti setiap 12 jam dengan perbandingan berat serbuk dan volume larutan adalah 50gr:500ml.

Demineralisasi yang sempurna ditandai dengan konsistensi serbuk tulang menjadi lunak dan *translucent* (transparan), kemudian serbuk tulang dicuci menggunakan *aquades* sampai bersih dan dilanjutkan pencucian menggunakan alkohol 70%, kemudian dimasukkan dan disimpan dalam tabung yang berisi alkohol 70% sampai dengan diaplikasikan.

Prosedur Operasi dan Pengambilan Sampel

Sebelum dioperasi, hewan diberikan minum secukupnya tanpa dipuasakan. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan fisik hewan. Kemudian dilakukan pengambilan sampel darah pada *vena chepalica* kemudian ditampung pada tabung EDTA, setelah itu dilakukan anestesi dengan kombinasi *xylazine-ketamine* dengan masing-masing dosis 5 mg/kg dan 35

mg/kg secara intramuskular. Anestesi dimonitor setiap setiap 10 menit sekali terhadap membran mukosa (MM), refleks rahang, refleks jari, refleks cahaya (PLR/*Pupillary Light Reflex*), denyut jantung (HR), dan jumlah respirasi (RR).

Setelah teranestesi, rambut pada daerah femur dicukur, kemudian kulit diolesi dengan alcohol 70% dan larutan *povidone iodine*. Kelinci diposisikan rebah lateral pada meja operasi. Frakturasi dilakukan dengan membuat insisi kulit di sepanjang *craniolateral* tulang yang segaris dari *trochanter mayor* ke *patella*. Demikian pula pada bagian subkutaneum. Kulit dan jaringan subkutaneum diretraksi, *fascia lata* diiris sepanjang tepi cranial *M. biceps femuris*. Setelah fascia diiris maka akan tampak septum muskulus. Muskulus *biceps femuris* ditarik ke belakang dan *M. vastus lateralis* ditarik ke depan sehingga tampak bagian permukaan tulang femur. Penarikan dilakukan perlahan-lahan untuk menghindari terjadinya perobekan pada muskulus.

Dengan mesin bor tulang (*boor low speed*), diafisis tulang femur kelinci setiap kelompok dibuat lubang dengan diameter 5 mm. Selama proses operasi, tulang ditetesi dengan larutan fisiologis NaCl untuk mencegah kerusakan akibat panas. Pada kelompok Kontrol, bagian yang dibor tidak diimplantasi bahan cangkok demineralisasi, sedangkan pada kelompok Perlakuan bagian yang dibor diimplantasikan bahan cangkok serbuk demineralisasi asal korteks tulang femur sapi bali. Kemudian muskulus dijahit dengan menggunakan *cat gut chromic* ukuran 3-0 dan kulit menggunakan benang *silk* 3-0. Pengambilan sampel darah kembali pada *vena chepalica* pasca-operasi dilakukan pada hari ke-0 (24 jam), minggu ke-2, 4 dan 6, kemudian sampel darah ditampung pada tabung EDTA.

Perawatan pascaoperasi, kelinci diletakkan pada alas yang nyaman dan diberikan antibiotika berupa *enrofloxacin* dengan dosis 10-30 mg/kg per oral yang menurun selama lima sampai dengan tujuh hari, dan untuk mengatasi rasa sakit, kelinci diberikan *carprofen* dengan dosis 1,5 mg/kg per oral selama 7 hari.

Analisis Data

Data yang diperoleh dikalkulasikan dan dianalisis secara statistik dengan uji Rancangan Acak Lengkap dengan pola *split in time* untuk melihat hubungan rerata total leukosit pada beberapa waktu pengambilan sampel terhadap kelompok eksperimen (kontrol dan perlakuan). Hasil yang signifikan kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan. Penelitian ini menggunakan nilai probabilitas kurang dari 0.05 untuk menyatakan signifikansi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data hasil analisis statistik antara rerata total leukosit selama hari ke-0 (24 jam) sampai dengan minggu ke-6 dan kelompok Kontrol dan Perlakuan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil rerata \pm standar deviasi total leukosit antar kelompok Kontrol dan kelompok Perlakuan.

| Waktu | Kontrol ($10^9/L$) | Perlakuan ($10^9/L$) |
|--------------------|----------------------|------------------------|
| Hari Ke-0 (24 jam) | 6.32 ± 1.42^a | 6.60 ± 1.85^b |
| Minggu Ke-2 | 3.96 ± 0.74^b | 5.80 ± 0.94^b |
| Minggu Ke-4 | 6.60 ± 0.76^a | 6.64 ± 1.99^b |
| Minggu Ke-6 | 6.54 ± 0.88^a | 4.94 ± 2.27^b |
| Rata-rata | $5.86 \pm 1.27^*$ | $6.00 \pm 0.80^*$ |

Keterangan: Superskrip *asterisk* dibaca secara horizontal. Angka yang diikuti asterisk menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$). Superskrip huruf dibaca secara vertikal. Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata ($P>0,05$), sedangkan angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$).

Berdasarkan Tabel 2, pada minggu ke-2 kelompok Kontrol menunjukkan hasil berbeda nyata terhadap hari ke-0 (24 jam), 4, dan 6. Jumlah total leukosit dari masing masing kelompok masih berada dalam rentang nilai yang normal dengan nilai rujukan normal total leukosit pada kelinci *New Zealand White* jantan $5,5-12,5 \times 10^9/L$ (Zimmerman *et al.*, 2010).

Hasil uji analisis rancangan acak lengkap dengan pola *split in time* rata-rata total leukosit terhadap kelompok Kontrol dan kelompok Perlakuan menunjukkan nilai probabilitas sebesar 0,47 ($P>0,05$). Hal ini menunjukkan rerata total leukosit antara kelompok Kontrol terhadap kelompok Perlakuan tidak berbeda nyata. Dengan kata lain implantasi bahan cangkok demineralisasi asal korteks tulang femur sapi bali tidak berpengaruh terhadap jumlah total leukosit. Setelah enam minggu pasca-operasi, hasil mengindikasikan kelinci sudah dalam masa penyembuhan dari model fraktur yang diakibatkan oleh pengeboran diaphisis tulang femur kelinci, baik pada kelompok Kontrol maupun Perlakuan, yang dibuktikan dengan tidak terjadinya perubahan jumlah total leukosit yang signifikan (Tribianto *et al.*, 2014). Hasil studi ini didukung oleh hasil studi tersebut bahwa tidak ditemukan adanya perubahan yang signifikan pada jumlah total leukosit kelinci jenis Lop yang diimplantasi dengan *stainless steel* AISI 316L dan polietilen UHMWPE. Kesembuhan model fraktur juga dibuktikan oleh studi sebelumnya yang dilakukan oleh Wirata *et al.* (2018). Studi tersebut menyebutkan bahwa implantasi bahan cangkok demineralisasi asal korteks femur sapi bali selama enam minggu menunjukkan adanya formasi kalus sebagai salah satu indikasi adanya kesembuhan fraktur.

Menurut Zimmerman *et al.* (2010) nilai rujukan normal eosinofil kelinci *New Zealand White* jantan yang dilampirkan dalam satuan persen berkisar antara 0,5-3,5. Dari hasil uji

hematologi yang telah dilakukan eosinofil mengalami peningkatan signifikan, yaitu 8-13 (data tidak disajikan dalam studi ini). Peningkatan jumlah eosinofil pada setiap individu kelinci yang diimplantasikan bahan cangkok terjadi pada minggu ke-2 hingga minggu ke-4 namun pada minggu ke-6 jumlah eosinofil sudah menunjukkan nilai normal. Menurut Wangko dan Karundeng (2014), eosinofil akan menuju pada daerah peradangan, untuk mengurangi reaksi alergi dan memfagositosis kompleks antigen antibodi. Hal tersebut merujuk pada hasil minggu ke-2 pasca-operasi, dimana eosinofil mulai bereaksi terhadap bahan cangkok yang diimplantasikan, dimana eosinofil akan melakukan fagositosis terhadap kompleks antigen antibodi dari bahan cangkok yang diimplantasikan pada tulang femur kelinci. Jumlah eosinofil mengalami peningkatan yang sangat tinggi jika dibandingkan dengan nilai rujukan normal, namun peningkatan jumlah eosinofil tidak terlalu mempengaruhi dari jumlah total leukosit pada kelompok Perlakuan. Hal ini pula menunjukkan bahwa peningkatan jumlah eosinofil cukup berperan dalam proses kesembuhan, dimana terjadinya proses kesembuhan tulang dan luka serta tidak adanya perubahan yang signifikan pada jumlah total leukosit tersebut mengindikasikan bahwa cedera yang diakibatkan karena perlakuan implantasi bahan cangkok demineralisasi sudah dalam proses penyembuhan. Hasil ini juga mengindikasikan bahwa bahan cangkok demineralisasi yang digunakan tidak mengalami penolakan dalam tubuh hewan uji.

Hasil uji antara waktu pengambilan sampel darah terhadap kelompok Perlakuan diperoleh nilai probabilitas sebesar 0,463 ($P > 0,05$). Hal ini menunjukkan hasil tidak berbeda nyata pada waktu pengambilan sampel darah terhadap jumlah total leukosit kelompok Perlakuan.

Hasil uji antara waktu pengambilan sampel darah terhadap kelompok Kontrol diperoleh nilai probabilitas sebesar 0,000 ($P < 0,05$). Hal ini menunjukkan hasil berbeda nyata pada waktu pengambilan sampel darah terhadap jumlah total leukosit kelompok Kontrol. Hasil kemudian dilanjutkan dengan uji Duncan dan diperoleh hasil jumlah total leukosit kelompok Kontrol pada hari ke-0 (24 jam) tidak berbeda nyata terhadap minggu ke-4 dan 6, sedangkan minggu ke-2 berbeda nyata terhadap hari ke-0 (24 jam), 4, dan 6.

Perbedaan nyata pada minggu ke-2 pada kelompok Kontrol menunjukkan jumlah total leukosit lebih rendah dari nilai rujukan normal. Rendahnya rataan jumlah total leukosit tersebut mengindikasikan terjadinya leukopenia pada seluruh individu kelompok Kontrol pada minggu ke-2. Leukopenia pada kelompok Kontrol ini disebabkan karena jumlah limfosit pada setiap individu kelompok Kontrol (data tidak disajikan dalam studi ini) lebih rendah daripada

nilai rujukan normal limfosit kelinci *New Zealand White* jantan, yang dapat diindikasikan sebagai limfopenia. Menurut Brass *et al.* (2014) limfopenia dapat menggambarkan respon terhadap stress, seperti akibat infeksi akut, atau pembedahan yang belum lama dilakukan, atau skunder *iatrogenic* karena obat-obatan, khususnya obat-obatan immunosupresan seperti steroid. Sehingga dapat diindikasikan leukopenia saat minggu ke-2 pada kelompok Kontrol diakibatkan karena adanya respon stres pada individu kelinci tersebut akibat lingkungan, dimana adanya kelinci-kelinci lain di sekitar kandang dan terjadinya peradangan akut ataupun pembedahan yang belum lama dilakukan.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, implantasi bahan cangkok demineralisasi asal korteks tulang femur sapi bali pada hewan uji selama enam minggu, hasil menunjukkan adanya perubahan jumlah total leukosit pada masing-masing kelompok namun masih dalam batas nilai normal. Perubahan yang signifikan tampak pada kelompok kelinci KI saat memasuki minggu ke-2, perubahan tersebut disebabkan oleh beberapa faktor, yaitu respon stres, terjadinya peradangan akut dan akibat dari pembedahan yang belum lama dilakukan. Pada minggu ke-4 sampai minggu ke-6, nilai total leukosit pada masing-masing kelompok mulai menunjukkan peningkatan yang masih dalam rentang nilai rujukan normal. Hal ini menunjukkan bahwa bahan cangkok demineralisasi asal korteks tulang femur sapi bali tidak mengalami penolakan pada tubuh hewan uji.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk membandingkan bahan cangkok demineralisasi asal korteks tulang femur sapi bali dengan produk yang sudah ada. Penelitian lanjutan disarankan untuk memastikan tidak adanya penolakan terhadap hewan uji dalam jangka waktu yang lebih lama terhadap bahan cangkok pasca-implantasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Universitas Udayana yang telah mendanai penelitian ini melalui PNPB Universitas Udayana (No. 1114/UN14.2.9/LT/2017), serta semua pihak yang turut mendukung hingga terselesaikannya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas B, Anas F, Sajirun S, Zakaria P, Hilmy N. 2001. Efek demineralisasi dan iradiasi gamma terhadap kandungan kalsium dan kekerasan tulang *bovine* liofilisasi. In: Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Aplikasi Isotop dan Radiasi: Industri, Lingkungan, Kesehatan, Pertanian, Peternakan, Jakarta. 6-7 November 2001.
- Balta C, Herman H, Rosu M, Cotoraci C, Ivan A, Folk A, Duka R, Dinescu S, Costache M, Alexandru P, Hermenean A. 2016. Homeostasis of blood parameters and inflammatory markers analysis during bone defect healing after scaffolds implantation in mice calvaria defects. *Romanian Biotechnological Letters* 22: 12018-12025.
- Brass D, Mckay P, Scott F. 2014. Investigating an incidental finding of lymphopenia. *BMJ* 348: g1721.
- Heo SH, Na CS, Kim NS. 2011. Evaluation of equine cortical bone transplantation in a canine fracture model. *Veterinarni Medicina* 56(3): 110-118.
- Hung NN. 2012. Basic Knowledge of Bone Grafting. In: *Bone Grafting*. Zorzi A, de Miranda JB. London. IntechOpen. Hlm. 11-38.
- Li Y, Chen S-K, Li L, Qin L, Wang X-L, Lai Y-X. 2015. Bone Defect Animal Models for Testing Efficacy of Bone Substitute Biomaterials. *Journal of Orthopaedic Translation* 3: 95-104.
- Ratajska M, Haberko K, Ciechańska D, Niekraszewicz A, Kucharska M. 2008. Hydroxyapatite - Chitosan Biocomposites. *Polish Chitin Society Monograph XIII*: 89-94.
- Tribianto V, Praseno K, Kasiyati. 2014. Analisis Eritrosit, Leukosit, dan Hemoglobin Kelinci Pada Uji Materi *Stainless Steel* AISI 316L dan Polietilen UHMWPE. *Jurnal Akademika Biologi* 3(1): 49-54.
- Wirata IW, Purbantoro SD, Sudimartini LM, Gunawan IWNF, Dharmayudha AAO, Pemayun IGAGP. 2018. Evaluasi radiografi femur kelinci yang diimplantasi bahan cangkok tulang sapi bali. *Jurnal Veteriner* 19(3): 439-445.
- Zimmerman KL, Moore DM, Smith SA. 2010. Hematology of Laboratory Rabbits (*Oryctolagus Cuniculus*). In *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th Edition. Section IX: Species Specific Hematology. London. John Wiley and Sons.