

Gambaran Histopatologi Kesembuhan Patah Tulang Femur dengan Terapi Kalsium Karbonat Dosis Tinggi pada Tikus Jantan

(DESCRIPTION OF HISTOPATOLOGICAL FEMORAL FRACTURES HEALING WITH EXCESSIVE OF CALCIUM-CARBONATE TREATMENT IN MALE RAT)

Ira Sari Yudaniayanti¹, Hartiningsih², Agus Budi Santoso²

¹Laboratorium Ilmu Bedah Veteriner, Rumah Sakit Hewan Pendidikan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo Kampus C Unair, Surabaya 60115, Telepon 031-5927832, Email : ira_sari@unair.ac.id

²Laboratorium Ilmu Bedah dan Radiologi, FKH Universitas Gadjah Mada, Kampus UGM, Jln Olahraga, Yogyakarta

ABSTRACT

Fracture healing is a complex process that requires the ordered synthesis of matrix proteins and deposition of mineral. Complications such as delayed union or non-union may arise from excessive flexibility bone because low mineral content of bone or apposition of both fracture fragments is not complete yet. The aim of this study is to determine the effect of excessive calcium carbonate (CaCO₃) on the healing femoral fracture in rat by examining histopathological change of femoral fracture. Twelve male *Sprague Dawley* rats, 12 weeks old were subjected to this investigation. The entire rats model at 13 weeks old were treated reposition of femoral dexter fractures with intramedullary pin fixation. The rats model were evenly randomly divided into three groups of four at 15 weeks old ; group I treated with normal diet, group II with normal diet + CaCO₃ supplement 75 mg/day, group III with normal diet + CaCO₃ supplement 225 mg/day per oral. At the end of the experiment (19 weeks old), the rats were killed, subsequently dexter femur were taken out for determining the histopathological examination. The results showed that excessive supplementation CaCO₃ to description of histopathological fracture healing on group III had even better, callus was able to bridge the fracture fragment with completely. The proportion woven bone and trabeculae were higher, while group II were cartilage dominate in callus, and group I were higher fibrous tissue. From the results can be concluded that given CaCO₃ 225 mg/ day accelerate the healing process of femoral fractures.

Keywords : CaCO₃, histopathology, woven bone, bone trabeculae, bone fibrous tissue

PENDAHULUAN

Kesembuhan patah tulang merupakan suatu proses kompleks, yang membutuhkan matriks protein dan deposit mineral. Komplikasi seperti *delayed union* atau *non union* bisa terjadi akibat kurangnya deposit mineral, atau aposisi dari kedua fragmen tulang yang tidak sempurna (Millet *et al.*, 2001).

Nutrisi merupakan salah satu faktor yang berpengaruh dalam proses kesembuhan tulang dan salah satunya adalah asupan kalsium yang cukup (Yahiro, 2001). Kalsium dibutuhkan untuk proses kalsifikasi kalus, seperti diketahui pembentukan kalus pada kejadian patah tulang sangat penting untuk menjembatani fragmen-fragmen tulang yang patah dan mempertahankan stabilitas temporer atau kestabilan sementara (Olmstead, 1995). Brinker (1984)

menyatakan bahwa kendala yang sangat tidak diharapkan pada patah tulang adalah tidak adanya jembatan kalus kesembuhan antara kedua fragmen atau tidak adanya kalsifikasi pada kalus yang terbentuk. Pada proses kesembuhan tersebut yang terlihat hanya jaringan fibrosa, sehingga pada kejadian tersebut mungkin terjadi *delayed union* atau bahkan *non union*. Jika timbul komplikasi seperti tersebut, tidak hanya akan menyebabkan problem kosmetik dan mempengaruhi lokomosi atau gerakan otot, syaraf mau pun tulang, tetapi juga menimbulkan kerugian secara ekonomi karena memperlama proses kesembuhan sehingga membutuhkan perawatan yang intensif, bahkan tindakan operasi ulang, untuk itu perlu tambahan biaya yang tidak sedikit.

Dalam praktek, banyak dokter hewan (praktisi) yang memberikan suplemen kalsium pada pasien pascaoperasi reposisi patah tulang dengan tujuan membantu proses kalsifikasi kalus, sehingga diharapkan dapat mempercepat kesembuhan tulang. Yahiro (2001) menyatakan bahwa pada proses kesembuhan tulang, kalsium yang dibutuhkan oleh tubuh akan mengalami peningkatan, karena selain digunakan untuk mempertahankan kadar kalsium darah agar normal juga dibutuhkan untuk proses kalsifikasi kalus. Asupan kalsium dalam tubuh harus cukup, sebab jika kurang, deposisi kalsium pada tulang juga berkurang, sehingga proses kalsifikasi kalus tidak terjadi yang akhirnya akan mempengaruhi proses kesembuhan patah tulang.

Berbeda dengan pendapat tersebut di atas, Lewis *et al.*, (1990) menyatakan bahwa pemberian suplemen kalsium pada kasus patah tulang tidak memberikan manfaat untuk proses kesembuhannya. Boyd (1955) juga berpendapat bahwa rendahnya kadar kalsium dalam darah karena defisiensi kalsium dalam pakan tidak akan mengganggu kecepatan kesembuhan patah tulang atau menyebabkan terjadinya *non union*. Rasio kalsium yang lebih tinggi dari fosfor akibat pemberian kalsium yang berlebihan dalam pakan akan menyebabkan difusi pasif fosfor menurun. Hal tersebut dapat terjadi karena tingginya kadar kalsium dalam cairan usus maka akan terbentuk ikatan kalsium-fosfor dalam lumen usus yang selanjutnya dikeluarkan lewat feses (Schoenmakers *et al.*, 2000). Hipofosfatemia akan menyebabkan terganggunya deposisi kalsium ke dalam tulang, agar kalsium dapat terdeposit membutuhkan rasio yang seimbang antara kalsium dengan fosfor (Carter, 1992).

CaCO₃ merupakan jenis kalsium yang sering digunakan karena selain mudah didapat dan harganya murah, juga mengandung elemen kalsium lebih tinggi daripada jenis kalsium yang lain, sehingga dalam penggunaannya hanya membutuhkan dosis yang kecil dan lebih ekonomis (Monroe, 1994). Selain itu berdasarkan laporan Garcia-Lopez dan Miller (1991), bahwa bioavailabilitas kalsium karbonat, kalsium sitrat, dan trikalsium fosfat tidak menunjukkan perbedaan yang berarti.

Sebagai hewan coba digunakan tikus, karena selain mudah dalam perawatan dan penanganannya, juga cukup menguntungkan dari segi biaya, sebelum diterapkan pada hewan coba yang lain ataupun manusia. Selain itu

berdasarkan pernyataan Urist dan Johnson yang disitasi oleh Boyd (1955) bahwa proses kesembuhan tulang pada tikus mempunyai pola yang sama dengan yang terjadi pada manusia, sehingga akan cukup bermanfaat bila nantinya penelitian ini diterapkan pada manusia.

Berdasarkan pernyataan tersebut maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui seberapa jauh pengaruh suplemen CaCO₃ dosis tinggi terhadap proses kesembuhan patah tulang.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai sumber informasi, serta dapat digunakan dalam praktek kedokteran hewan dan dapat dikembangkan penerapannya pada kedokteran manusia, guna mendapatkan suatu prosedur yang dapat mempercepat kesembuhan tulang dan mencegah atau mengurangi terjadinya kasus *delayed union* atau *non union*.

METODE PENELITIAN

Tikus percobaan ditempatkan dalam kandang individu, diadaptasikan terhadap pakan dan lingkungan selama satu minggu. Pada umur 13 minggu semua tikus dilakukan operasi reposisi patah tulang femur dekstra dengan fiksasi pin intramedular (Millet *et al.*, 2001). Anestetikum yang digunakan adalah kombinasi antara ketamin (25 mg/kg bb) dengan xylazine (8 mg/kg bb) (Flecknell, 1987).

Untuk perawatan pascabedah semua tikus diinjeksi ampisilin selama lima hari berturut-turut dan luka operasi pada kulit setiap hari diolesi salep bioplacenton sampai luka operasi mengering.

Selama masa adaptasi, penyembuhan, dan perlakuan, tikus diberi pakan standar yang disusun menurut Hartiningsih (1996), sebanyak $\pm 10\%$ dari berat badan, dan air minum aquabides secara *ad libitum*.

Pada umur 15 minggu tikus percobaan dibagi secara acak dalam 3 kelompok (kelompok I, II, dan III), masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus dan ditempatkan dalam kandang individu. Tikus kelompok I (kontrol) diberi pakan standar (normal), tikus kelompok II diberi pakan standar+suplemen CaCO₃ 75 mg/hari per oral, tikus kelompok III diberi pakan standar + suplemen CaCO₃ 225 mg/hari per oral. Dosis pemberian kalsium berdasarkan Talbott *et al.*, (1998).

Pada akhir penelitian (tikus umur 19 minggu), semua tikus dieutanasi dengan cara

dislokasi tulang leher. Tulang femur kanan diambil dan difiksasi dalam larutan formalin 10% disiapkan guna proses dekalsifikasi untuk pembuatan preparat histopatologi dengan pengecatan hemaktosilin dan eosin (HE), seperti yang rutin dilakukan di laboratorium BBVet wilayah IV Wates, Yogyakarta.

Analisis Data

Pemeriksaan histopatologi dilakukan dengan metode *scoring* berdasarkan proporsi dari jaringan ikat, tulang rawan hialin, tulang muda (*woven bone*), dan tulang trabekula yang mengisi kalus (Tabel 1) (Olmstead, 1995). Selanjutnya dianalisis secara statistik dengan *Kruskal-Wallis One Way Analysis* (Siegel dan Castellan, 1988).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil skoring dari pengamatan preparat histopatologi pada masing-masing kelompok perlakuan berdasarkan kriteria skoring yang tertera pada Tabel 1. Pada tikus kelompok I lebih didominasi nilai 1, sedang untuk tikus kelompok II lebih beragam nilai skoringnya dari 1 sampai 3, dan pada tikus kelompok III skoringnya lebih didominasi nilai 4 (Tabel 2). Berdasarkan uji *kruskal Wallis* didapatkan rata-rata ranking berturut-turut pada perlakuan I = 3,25, perlakuan II = 5,75 dan perlakuan III = 10,5, dan terdapat perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$) antar perlakuan, dengan nilai tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan III yang berbeda nyata dengan kelompok perlakuan II dan I, selanjutnya kelompok perlakuan II juga berbeda nyata dengan kelompok perlakuan III dan I, demikian juga kelompok perlakuan I yang mempunyai nilai terkecil juga berbeda nyata dengan kelompok perlakuan II dan III. Hal tersebut menunjukkan bahwa gambaran

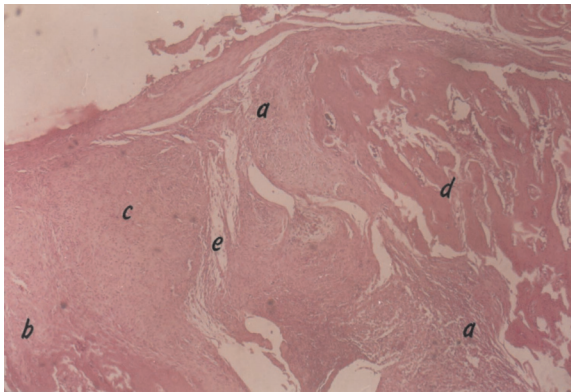
histopatologi kesembuhan patah tulang pada masing-masing kelompok perlakuan berbeda, dan gambaran kesembuhan tulang yang mendekati dengan kriteria kesembuhan tulang yang sempurna berdasarkan komposisi tulang muda dan trabekula yang terbanyak didapatkan pada kelompok perlakuan III (suplemen $CaCO_3 = 225$ mg/hari).

Gambaran histopatologi pada kelompok perlakuan I, lebih didominasi nilai 1, gambaran kalusnya lebih didominasi oleh jaringan ikat, meskipun tulang rawan hialin sudah terbentuk dan sudah ada sedikit tulang muda dan tulang trabekula (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa pada tikus kelompok I asupan kalsium yang masuk dalam tubuh tidak cukup untuk proses mineralisasi kalus, akibatnya kalus yang terbentuk kurang kaku (*rigid*) dan mudah mengalami tensi (tarikan), sehingga mendorong sel-sel mesenkim berdeferensiasi menjadi fibroblas. Jaringan ikat yang berlebihan ini menyebabkan kalus menjadi lunak seperti karet dan mengurangi kekakuan tulang (Olmstead, 1995).

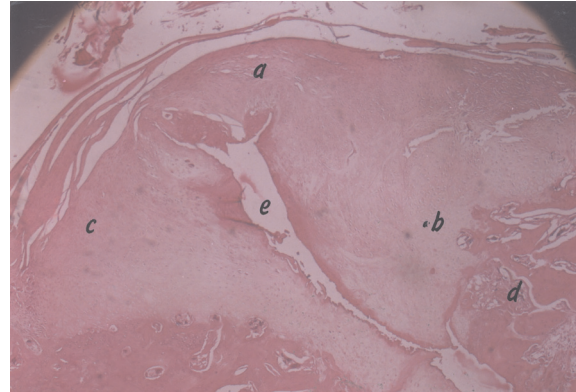
Pada tikus kelompok II, dengan nilai skoring lebih beragam dari 1 sampai 3, gambaran histopatologi terlihat lebih beragam. Komposisi jaringan tulang rawan hialin lebih dominan, namun komposisi tulang muda serta tulang trabekula sudah semakin banyak terbentuk namun jaringan ikatnya hanya sedikit membentuk kalus (Gambar 2 dan 3). Hal tersebut kemungkinan disebabkan karena asupan kalsium yang diberikan pada tikus kelompok II tidak cukup untuk proses mineralisasi kalus, sehingga kalus yang terbentuk tidak cukup stabil, suplai darah yang membawa oksigen ke daerah tersebut tidak lancar, akibatnya banyak terbentuk tulang rawan hialin. Olmstead (1995) menyatakan bahwa jika suplai oksigen pada kalus tersebut

Tabel 1. Kriteria skoring proses kesembuhan tulang

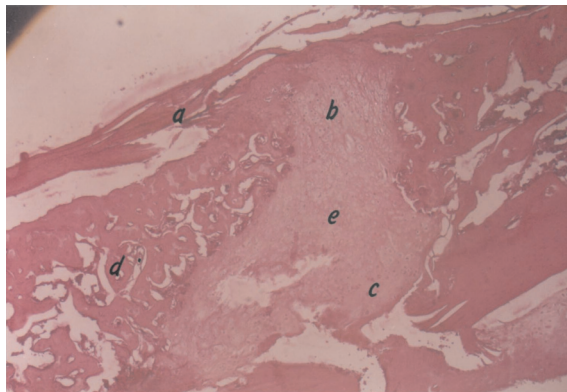
Skor	Proporsi Kalus			
	Jaringan ikat	Tulang rawan Hialin	Tulang muda (<i>woven bone</i>)	Tulang Trabekula
1 (diwakili Gambar 1)	++++	++	+	+
2 (diwakili Gambar 2)	++	+++	++	++
3 (diwakili Gambar 3)	+	++	+++	+++
4 (diwakili Gambar 4)	+	+	++++	++++



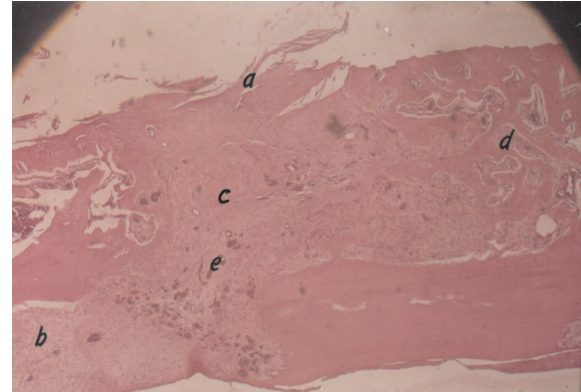
Gambar 1. Gambar *score/nilai* 1, gambar kesembuhan tulang yang terjadi pada sebagian besar kelompok I. Kedua fragmen tulang belum tersambung sempurna (e), proporsi jaringan ikat dalam kalus lebih banyak (a) dari tulang rawan hialin (b), tulang muda (*woven bone*) (c) dan tulang trabekula (d) (HE, 400X)



Gambar 2. Gambar *score/nilai* 2, gambar kesembuhan tulang yang terjadi pada kelompok I dan sebagian kelompok II. Kedua fragmen tulang belum tersambung sempurna (e) dan kalus yang terbentuk lebih banyak mengandung tulang rawan hialin (b), dengan sedikit jaringan ikat (a) dan sudah mulai terbentuk tulang muda (*woven bone*) (c) serta tulang trabekula (d) (HE, 400X)



Gambar 3. Gambar *score/nilai* 3, gambar kesembuhan tulang yang terjadi pada kelompok II dan sebagian kelompok III. Kedua fragmen tulang sudah tersambung sempurna (e), dengan proporsi tulang rawan hialin cukup banyak di daerah penyambungan (b), sedikit jaringan ikat (a), tulang muda (*woven bone*) (c) sudah mulai terbentuk, demikian juga tulang trabekula (d) (HE, 400X)



Gambar 4. Gambar *score/nilai* 4, gambar kesembuhan tulang yang terjadi pada sebagian besar kelompok III. Kedua fragmen tulang sudah tersambung sempurna (e), proporsi tulang muda (*woven bone*) (c) dan tulang trabekula (d) lebih banyak, sedikit tulang rawan hialin (b) serta jaringan ikat yang mulai menghilang (a) (HE, 400X)

rendah, maka kartilago cenderung lebih banyak dibentuk dalam kalus. Kondisi seperti ini sebenarnya normal, tulang rawan hialin pada sebuah kalus kadang-kadang dapat mengalami mineralisasi dan ossifikasi endokondral. Kerugian dari terlalu banyaknya tulang rawan hialin pada kalus adalah berkurangnya kekakuan dan stabilitas pada tempat patah tulang sampai osifikasi tulang rawan endokondral dalam kalus selesai dengan sempurna.

Hasil pemeriksaan histopatologi tulang femur tikus kelompok III menunjukkan

Tabel 2. Data semikuantitatif gambaran kalus berdasarkan pemeriksaan histopatologi

Kelompok Perlakuan pemberian CaCO ₃ (mg/hari)	Skor pada Ulangan				Rataan Ranking
	1	2	3	4	
0	1	1	1	2	3,25 ^a
75	1	2	3	3	5,75 ^b
225	3	4	4	4	10,50 ^c

a,b, superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (p<0,05).

gambaran histopatologi yang paling baik untuk kesembuhan tulang dibandingkan dengan kelompok I dan II, karena lebih didominasi nilai 4 dengan rata-rang berdasarkan uji Kruskal Wallis sebesar 10,5. Hal tersebut ditunjukkan oleh adanya kalus yang sudah menjembatani kedua fragmen tulang secara sempurna dengan proporsi pembentukan tulang muda dan tulang trabekula yang lebih banyak, serta sedikit tulang rawan hialin dan jaringan ikat (Gambar 4).

Penambahan suplemen kalsium karbonat pada tikus kelompok III cukup untuk proses mineralisasi kalus, sehingga kalus yang terbentuk lebih kokoh dan stabil. Menurut Newton dan Nunamaker (1985) kalus yang sudah termineralisasi dengan cepat akan diresorpsi dan diganti dengan tulang lamelar, sehingga fungsi ekstremitas dapat lebih cepat digunakan. Hal tersebut akan menyebabkan pita kalus dapat lebih cepat menyebrangi garis patahan. Frost (1989) melaporkan bahwa pada patah tulang yang stabil dengan suplai darah yang bagus, akan terjadi kalus tulang yang sempurna dalam waktu empat minggu. Kalus yang terbentuk mengalami maturasi lebih lanjut oleh aktifitas osteoblas, kalus menjadi tulang dewasa (*mature*) dengan pembentukan lamela-lamela. Pendapat yang sama dinyatakan oleh Olmstead (1995), bahwa kalus yang stabil dan kaku, membuat suplai darah di daerah tersebut bagus sehingga tekanan oksigen cukup menyebabkan sel-sel mesenkim berdeferensiasi menjadi osteoblas yang aktif menghasilkan tulang-tulang muda. Pada proses remodeling, osteoblas akan mengisi ruang-ruang di antara tulang muda dengan tulang trabekula, juga ruang-ruang di antara trabekula, selanjutnya osteoblas tersebut akan mengganti tulang trabekula menjadi tulang kompak.

SIMPULAN

Pemberian suplemen kalsium karbonat dosis tinggi empat kali dari normal (225 mg/hr) selama 4 minggu, setelah operasi reposisi patah tulang femur dekstra pada tikus mempunyai efek positif pada proses kesembuhan patah tulang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini dengan penuh rasa hormat, penulis menghaturkan terima kasih

kepada Rektor, Dekan, Direktur Program Pascasarjana, Kepala Lab Patologi FKH UGM, Kepala Bagian Patologi BBVet Wilayah IV Wates, dan semua pihak yang membantu penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Boyd W. 1955. *The Bones in Phatology for The Surgeon*. 7th.Ed. Philadelphia: WB Saunders Company. Pp. 520-529.
- Brinker WA, John RB, Prieur WD. 1984. *Delayed Union and Non Union*. In *Manual of Internal Fixation in Small Animals*. New York: Springer Verlag.
- Carter, M.A. 1992. *Fraktur dan Dislokasi*. Dalam *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. S.A. Price dan L.M. Wilson. EGC. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. Pp. 1175-1188.
- Flecknell, PA. 1987. *Laboratory Animal Anaesthesia*. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich. Publishers. Pp: 90-91
- Frost, HM. 1989. The Biology of Fracture Healing : An Overview for Clinicians. Part I. *Clin Orthop* 248 : 283 -293.
- Garcia-Lopez, S. Miller GD. 1991. Bioavailability of Calcium from Four Sources. *Nutr Res* 10: 1187-1196
- Hartiningih. 1996. Nilai Diagnostik Kalsium dan Fosfat Dalam Darah Terhadap Perubahan Awal Osteoporosis Pada Tikus Putih (*Ratus norvegicus albinus*) yang Dipanhisterektomi. *Lap. Penelitian*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Gadjah Mada.
- Lewis LD, Morris M, Hand MS. 1990. *Small Animal Clinical Nutrition III*. Kansas: Mark Morris Associates. Pp.12-3 - 12-11.
- Millet PJ, Cohen B, Allen MJ, Rushton N. 2001. Bone Mineral Density Changes During Fracture Healing : A Densitometric Study in Rats. The Hospital for Special Surgery. New York. <http://www.uniduesseldorf.de/www/MedFak/Orthopaedie/jo>.
- Monroe WE. 1994. *Diseases of the Parathyroid Glands*. Dalam *Practical Small Animal Internal Medicine*. Leib MS, Monroe WE (Ed). Tokyo: WB Saunders Company. Pp. 1071-1082.
- Newton CD, Nunamaker DM. 1985. *Text Book of Small Animal Orthopaedics*. Philadelphia: JB Lippincott Company. Pp. 35-61.

- Olmstead ML. 1995. *Fractures of Bones of the Hind Limb*. In Olmstead ML, Paros FJ (Ed.) *Small Animal Orthopedics*. St.Louis: Mosby-Year Book Inc. Pp 219-243.
- Schoenmakers I, Hazewinkel HAW, Voorhout G, Carlson CS, Richardson D. 2000. Effect of Diet with Different Calcium and Phosphorus Contents on the Skletal Develepment and Blood Chemistry of Growing Great Danes. *Vet Record* 2 : 652-660.
- Siegel S, Castellan NJ. 1988. *Non Parametric Statistics for The Behavioral Sciences*. Second Edition. Mc. Graw-Hill Book Company. Pp. 206-215.
- Talbott SM, Rothkopf MM, Shapses SA. 1998. Dietary Restriction of Energy and Calcium Alters Bone Turnover and Density in Younger and Older Female Rats, *J Nutr* 128: 640 - 645
- Yahiro M. 2001. Nutriions Role in Increasing The Speed of Bone Healing. Consultant to FDA. [http:// Lesann tripod.com/healing %20 fracture.htm](http://Lesann.tripod.com/healing%20fracture.htm)