



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PERBANDINGAN DOSIS AKHIR STERILISASI  
15 kGy DAN 25 kGy BAHAN ALLOBATAN (DFDB)  
PADA PROSES REGENERASI TULANG**

**TESIS**

**LINDA ERMIZA**

**NPM: 4205010027**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
PROGRAM SPESIALIS ILMU BEDAH MULUT  
JAKARTA  
2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PERBANDINGAN DOSIS AKHIR STERILISASI  
15 kGy DAN 25 kGy BAHAN ALLOBATAN (DFDB)  
PADA PROSES REGENERASI TULANG**

**TESIS**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar/sebutan profesi  
Spesialis dalam Ilmu Bedah Mulut dan Maksilofasial

**LINDA ERMIZA  
NPM: 4205010027**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
PROGRAM SPESIALIS ILMU BEDAH MULUT  
JAKARTA  
2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar**

**Nama : Linda Ermiza**

**NPM : 4205010027**

**Tanda Tangan : - **

**Tanggal : 13 Januari 2012**

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Linda Ermiza  
NPM : 4205010027  
Program Studi : Ilmu Bedah Mulut  
Judul Tesis : Perbandingan dosis akhir sterilisasi 15 kGy dan 25 kGy bahan Allobatan (DFDB) pada proses regenerasi tulang

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Spesialis pada Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Bedah Mulut dan Maksilofasial, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Ketua : drg. Abdul Latif, Sp.BM (K)

Pembimbing : DR.drg. Corputty Johan E.M, Sp.BM

Pembimbing : drg. Endang Winiati Bachtiar, M Biomed, Ph.D

Penguji : dr. Eka Yudhanto, Msi.Med, Sp.B, Sp.B.(K)Onk

Penguji : drg. Chusnul Chotimah, Sp.BM (K)

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 13 Januari 2012

## KATA PENGANTAR

Assalamualaikum wr.wb, alhamdulillah puji syukur saya panjatkan ke hadhirat Allah Subhanahuwata'ala atas segala rahmat, hidayah dan karunia-Nya saya dapat menyelesaikan penelitian ini yang merupakan salah satu syarat akademik dalam menyelesaikan Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis Bedah Mulut dan Maksilofasial, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia. Saya menyadari, bahwa dalam penelitian ini saya dibantu, dibimbing dan didukung oleh berbagai pihak sehingga penelitian ini dapat saya selesaikan. Untuk itu saya sampaikan penghargaan dan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

- 1) DR. drg. Corputty Johan E.M, Sp.BM selaku pembimbing utama dari Departemen Bedah Mulut dan Maksilofasial yang dengan penuh kesabaran, memberikan semangat-semangat kepada saya dalam memberikan penyelesaian penelitian ini dan selama pendidikan.
- 2) drg. Endang W. Bachtiar, M.Biomed, Ph.D selaku pembimbing II yang telah meluangkan waktu dan membimbing selama penelitian ini.
- 3) drg. Abdul Latif, Sp.BM(K) selaku Ketua Departemen Bedah Mulut dan Maksilofasial FKGUI yang telah banyak memberikan saran dan dukungan kepada saya selama pendidikan dan dalam menyelesaikan penelitian ini.
- 4) Prof. DR. drg. Benny S. Latief, Sp.BM(K) yang selalu mendukung, mendengarkan keluh kesah saya dengan sabar serta memberikan nasehat-nasehat selama saya menempuh pendidikan maupun dalam menyelesaikan penelitian ini.
- 5) Prof. drg Iwan Tofani, Ph.D atas semua dukungan dan bimbingan yang beliau berikan selama pendidikan dan menyelesaikan penelitian ini.
- 6) Seluruh konsulen dan staf pengajar Departemen Bedah Mulut dan Maksilofasial FKGUI, yang telah memberikan dukungan, bimbingan dan ilmu pengetahuan selama menempuh pendidikan dan penyelesaian penelitian ini.
- 7) Prof. drg. Boy M. Bachtiar, MS, Ph.D yang banyak mendukung dan membimbing selama penelitian di Laboratorium *Oral Biology* FKGUI.

- 8) Ir. Basri Abbas, BATAN-Jakarta, yang banyak membantu dan memberi sumbangsih ide-ide dan bimbingan dalam penelitian.
- 9) Sahabat saya, mba Maisaroh dan mba Dessy yang bersedia menemani dan membantu saya dalam mengerjakan penelitian di Laboratorium *Oral Biology* FKG UI.
- 10) Teman-teman residen Bedah Mulut dan Maksilofasial FKGUI , terimakasih atas kerjasama dan dukungan selama saya menyelesaikan tugas akhir ini.
- 11) Seluruh staf poli Bedah Mulut RSCM yang telah banyak membantu selama menjalani pendidikan.
- 12) Seluruh staf Perpustakaan FKG UI, Pak Asep, Pak Yanto, Pak Nuh yang dengan sabar membantu dan menemani saya belajar.
- 13) Seluruh staf Bedah Mulut FKG UI, Mba Supri, Pak Sanir, Mba Rani, Mba Yuni yang telah memberikan dukungan.

Kepada kedua orang tua saya tercinta, Papa Ali Amran (Alm) dan Mama Asnizar, berkat jerih payah papa dan mama ananda dapat melanjutkan sekolah seperti ini, yang tidak dapat ananda ganti dengan kata atau perbuatan, hanya doa yang ananda panjatkan kepada Allah SWT untuk papa dan mama.

Untuk suamiku, dr. Abdul Haris Malik Msi.Med, SpB terimakasih atas kasih sayang, dukungan dan bimbingan Mas, maafkan saya kalau sering meninggalkan Mas sendirian. Inshaallah selesai pendidikan ini kita selalu berkumpul, dan untuk anak-anakku, terimakasih atas dukungan serta pengorbanan kalian, rajin belajar semoga tercapai cita-citanya.

Akhir kata saya ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, semoga Allah Subhanahuwata'ala melimpahkan karunia dan rahmatNya kepada kita semua.

Saya berharap semoga sumbangsih penelitian ini dapat berguna untuk kemajuan ilmu pengetahuan di bidang Bedah Mulut dn Maksilofasial.

Jakarta , Januari 2012

penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIK**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang beretanda tangan di bawah ini :

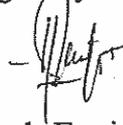
Nama : Linda Ermiza  
NPM : 4205010027  
Program Studi : Spesialis  
Departemen : Bedah Mulut  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Jenis Karya Ilmiah : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Non-eksklusif (*Non-exclusif Royalti-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**PERBANDINGAN DOSIS AKHIR STERILISASI 15 kGy DAN 25 kGy  
BAHAN ALLOBATAN (DFDB) PADA PROSES REGENERASI TULANG**  
Beserta perangkat yang ada (bila diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Non eksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat , dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta  
Pada tanggal 10 Januari 2012  
Yang menyatakan



(Linda Ermiza)

## ABSTRAK

Nama : Linda Ermiza  
Program Studi : Spesialis Bedah Mulut dan Maksilofasial  
Judul : Perbandingan dosis akhir sterilisasi 15 kGy dan 25 kGy  
bahan Allobatan (DFDB) pada proses regenerasi tulang

**Latar belakang :** Osteoblas merupakan sel tulang yang berperan dalam formasi tulang, yang mempunyai kemampuan dalam sintesa dan mengatur deposisi dan mineralisasi dari matrik selular tulang. Kerusakan tulang diatasi dengan penempatan material pengganti yang merangsang pembentukan tulang baru dimana osteoblas berperan dalam pembentukan formasi tulang. Transplantasi jaringan telah dikembangkan untuk merekonstruksi kerusakan tulang dengan penempatan bahan tandur tulang. Dosis akhir sterilisasi 25 kGy biasa dipakai untuk bahan tandur tulang tergantung dari bank jaringan. Dosis radiasi tergantung pada tingkat bioburden jumlah organisme yang tertinggal. Laporan terdahulu mengemukakan bahwa dosis radiasi 15 kGy efektif dalam mensterilkan bahan tandur tulang.

**Tujuan :** Mengevaluasi perilaku osteoblas manusia galur MG63 dalam proses regenerasi tulang setelah ditransplantasi dengan Demineralized freeze-dried bone, DFDB (Batan, Jakarta, Indonesia) dengan dosis sterilisasi 15 kGy dibandingkan dengan DFDB yang disterilisasi dengan dosis 25 kGy.

**Metoda :** Sel osteoblas manusia dibiakkan dan dibagi dalam 3 kelompok, pertama ditransplantasi dengan DFDB yang disterilisasi dengan dosis 15 kGy, kedua ditransplantasi dengan DFDB dosis sterilisasi 25 kGy, dan grup ketiga tanpa transplantasi sebagai kontrol. Proliferasi of osteoblas dianalisa 24 jam setelah transplantasi dengan test MTT assay. Ekspresi fosfatase alkali dan deposisi ion  $Ca^{++}$  dianalisis setelah 7, 14 dan 21 hari setelah transplantasi.

**Hasil :** Proliferasi sel osteoblas manusia setelah ditransplantasi dengan DFDB yang disterilisasi 15 kGy tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan yang ditransplantasi dengan DFDB dosis sterilisasi 25 kGy setelah 24 jam transplantasi. Dan proses remineralisasi antara kedua kelompok relatif sama antara kelompok DFDB 15 kGy dan dengan kelompok DFDB 25 kGy.

## ABSTRACT

**Background :** Osteoblasts are the skeletal cells responsible for bone formation, meaning that they synthesize and regulate the deposition and mineralization of the extracellular matrix of bone. Bone defect treated with placement a preparation material to promote new bone formation and osteoblasts play a major role in bone formation. Tissue transplantation were developed to reconstruct bone defect with the placement of bone graft material. A 25 kGy dose is the most commonly used radiation dose for sterilization of bone graft material, but tissue bankers can decide the dosage used to sterilized their tissues. The dose can be selected depending on the bioburden or microbial count on the tissue prior to sterilization and had been reported a low dose radiation 15 kGy is effective to sterilization a bone graft materials.

**Objective :** The objective of this study was to evaluate behavior of human osteoblast cell line (MG63) in bone regeneration process, after transplantation of Demineralized freeze-dried bone, DFDB (Batan, Jakarta, Indonesia) with radiation dose sterilization 15 kGy compare with DFDB with radiation sterilization 25 kGy.

**Method :** Human osteoblast cell line culture was divided into 3 groups, first group transplanted with dose radiation DFDB 15 kGy, second group transplanted with dose radiation 25 kGy DFDB and and the third group without bone graft as control. After 24 hours, proliferation of osteoblast cell area are analysed with MTT assay test. Expression of alkali phosphatase and deposition of  $\text{Ca}^{++}$  are analysed after 7, 14 and 21 days after transplantation.

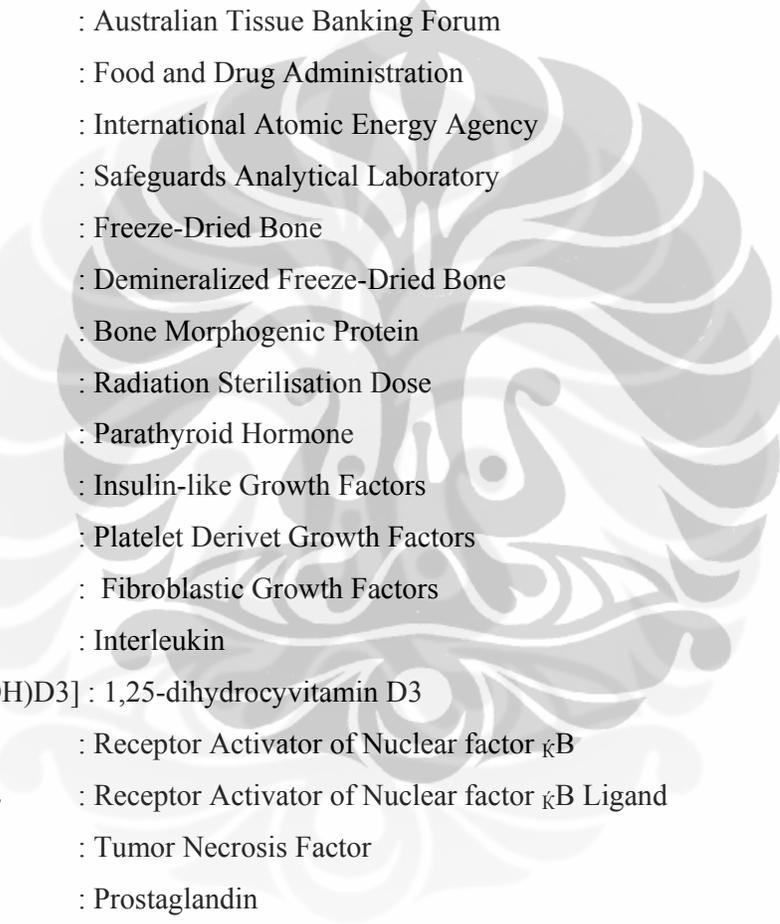
**Results :** Proliferation of osteoblast cell in DFDB 15 kGy showed not significantly difference with DFDB 25 kGy after 24 hours and remineralization process between DFDB 15 kGy group transplantation equal with DFDB 25 kGy group.

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI	vi
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR GRAFIK	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.2.1 Rumusan Masalah Primer	4
1.2.2 Rumusan Masalah Sekunder	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.2.1 Tujuan Umum	4
1.2.1 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Bahan Tandur Tulang	6
2.1.1 Pengertian Bahan Tandur Tulang	7
2.1.2 Sejarah Diperlukan Bahan Tandur Tulang	7
2.1.3 Macam-macam Bahan Tandur Tulang	8
2.1.4 Sifat Bahan Tandur Tulang	9
2.2 Allograft	11
2.2.1 Sejarah Pemakaian Bahan Tandur Tulang Allograft	11
2.2.2 Sifat Allograft	13
2.2.3 Proses Pembuatan Bahan Tandur Tulang Produksi Batan, Jakarta	14
2.2.4 Sterilisasi Akhir Dengan Sinar Gamma	15
2.3 Struktur Tulang Dan Fungsinya	16
2.3.1 Proses Penyembuhan Tulang	19
2.3.2 Proses Remodelling Tulang	20
2.3.3 Biomarker Pada Formasi Tulang	23
2.4 Kerangka Teori	25
BAB 3 KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS DAN DEFINISI OPERASIONAL	26
3.1 Kerangka Konsep	26

3.2 Hipotesis	26
3.3 Definisi Operasional	27
<b>BAB 4. METODOLOGI PENELITIAN</b>	<b>29</b>
4.1 Jenis Penelitian	29
4.2 Subyek Penelitian	29
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian	29
4.4 Sampel Penelitian	29
4.5 Variabel Penelitian	29
4.5.1 Variabel Bebas	29
4.5.2 Variabel Terikat	29
4.6 Alur Penelitian	30
4.7 Alat dan Bahan	31
4.7.1 Alat	31
4.7.2 Bahan Biakan Sel	31
4.7.3 Bahan Pemeriksaan Indeks Proliferasi Osteoblas	32
4.7.4 Bahan Pengujian ekspresi Fosfatase Alkali	32
4.7.5 Bahan Pemeriksaan Deposisi Ion Kalsium	32
4.8 Cara Kerja	32
4.8.1 Pembuatan Medium Biakan	32
4.8.2 Pembuatan DFDB Allograft	33
4.8.3 Pembuatan Kultur Osteoblas	33
4.8.4 Pemaparan Kultur Osteoblas dengan DFDB Allograft	33
4.8.5 Pengukuran Indeks Proliferasi Osteoblas	33
4.8.6 Pengukuran Fosfatase Alkali	34
4.8.7 Pengukuran Kadar Ion Kalsium	34
4.9 Manajemen dan Analisis Data	35
4.10 Kaji Etik	35
<b>BAB 5 HASIL</b>	<b>36</b>
5.1 Pengukuran Proliferasi Osteoblas	36
5.2 Pengukuran Ekspresi Fosfatase Alkali	37
5.3 Pengukuran Deposisi Ion Kalsium	38
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b>	<b>40</b>
6.1 Proliferasi Osteoblas	40
6.2 Ekspresi Fosfatase Alkali	41
6.3 Deposisi Ion Kalsium	42
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN</b>	<b>44</b>
7.1 Kesimpulan	44
7.2 Saran	44
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	<b>45</b>

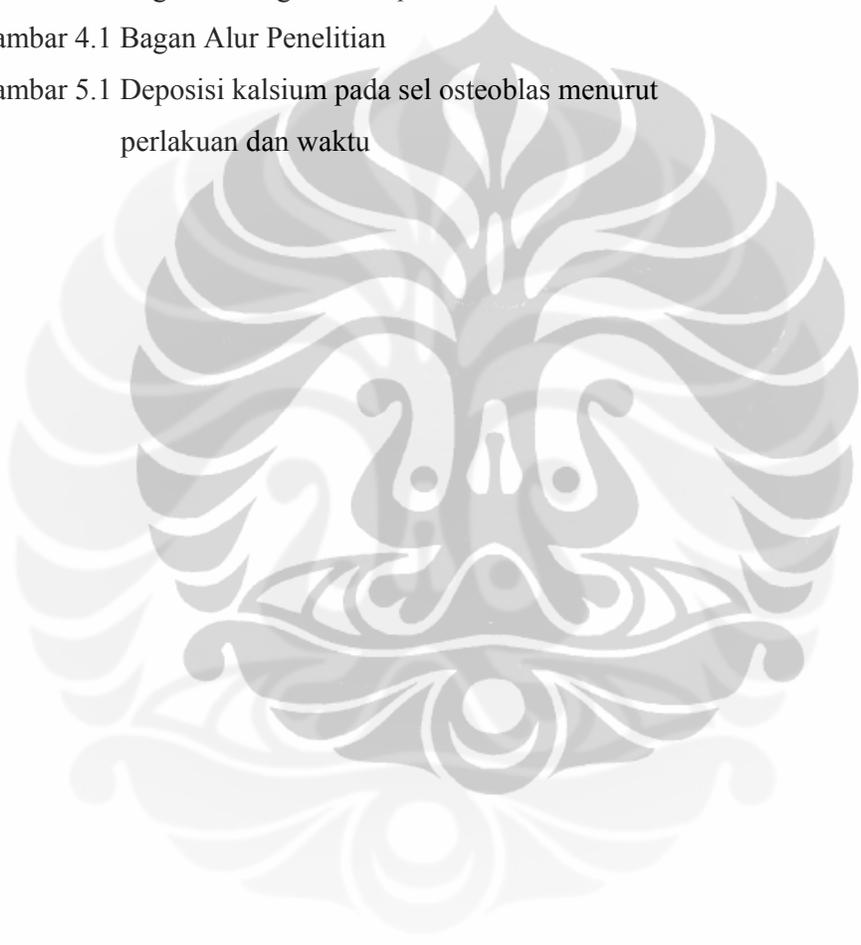
## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN



AATB	: American Association Tissue Bank
EATB	: European Association Tissue Bank
APASTB	: Asia Pacific Association of Surgical Tissue Banks
BATAN	: Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN, Jakarta)
ATBF	: Australian Tissue Banking Forum
FDA	: Food and Drug Administration
IAEA	: International Atomic Energy Agency
SAL	: Safeguards Analytical Laboratory
FDB	: Freeze-Dried Bone
DFDB	: Demineralized Freeze-Dried Bone
BMP	: Bone Morphogenic Protein
RSD	: Radiation Sterilisation Dose
PTH	: Parathyroid Hormone
IGF	: Insulin-like Growth Factors
PDGF	: Platelet Derivet Growth Factors
FGF	: Fibroblastic Growth Factors
IL	: Interleukin
[1,25-(OH)D3]	: 1,25-dihydrocyvitamin D3
RANK	: Receptor Activator of Nuclear factor $\kappa$ B
RANKL	: Receptor Activator of Nuclear factor $\kappa$ B Ligand
TNF	: Tumor Necrosis Factor
PG	: Prostaglandin
ALP	: Alkali Phosphatase
kGy	: Kilo Gray
OD	: Optical Density

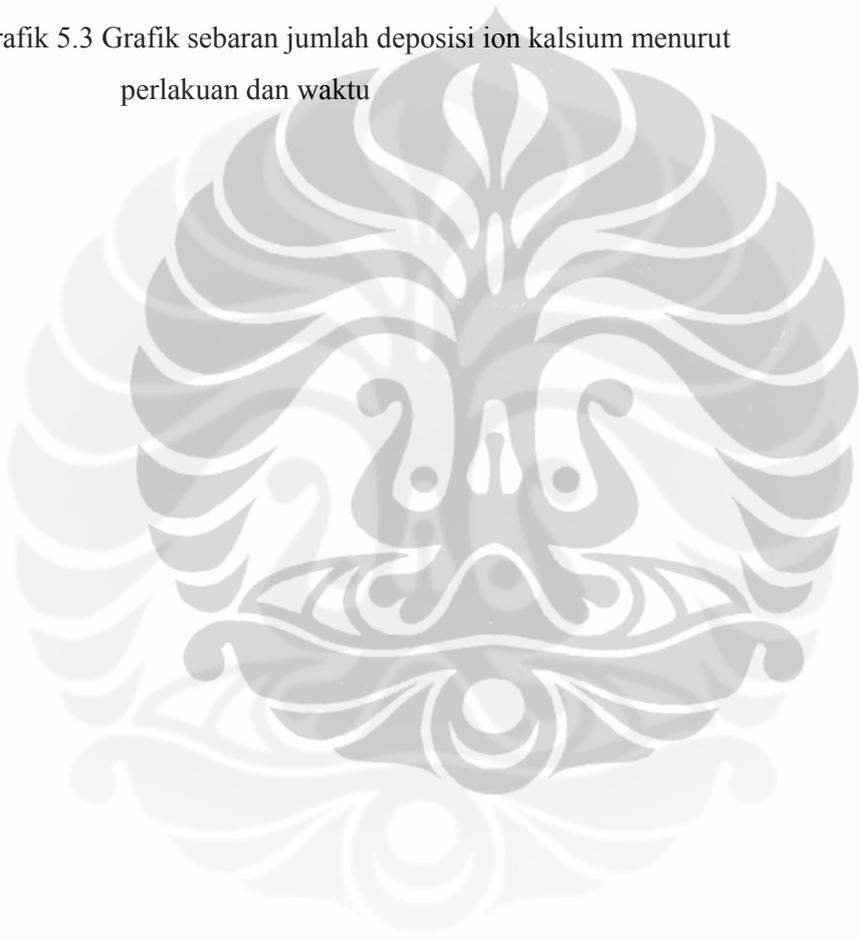
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Siklus proses remodelling tulang.	22
Gambar 3.1 Bagan Kerangka Teori	25
Gambar 3.2 Bagan Kerangka konsep	26
Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian	30
Gambar 5.1 Deposisi kalsium pada sel osteoblas menurut perlakuan dan waktu	39



## DAFTAR GRAFIK

Grafik 5.1 Persentase viabilitas osteoblas	36
Grafik 5.2 Aktifitas volume fosfatase alkali menurut perlakuan dan waktu	37
Grafik 5.3 Grafik sebaran jumlah deposisi ion kalsium menurut perlakuan dan waktu	38



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 :	Surat Keterangan Lolos Etik	49
Lampiran 2 :	Tabel sebaran indeks proliferasi sel osteoblas menurut jenis perlakuan 24jam setelah transplantasi DFDB 15 kGy dan DFDB 25 kGy	50
Lampiran 3 :	Uji statistik Deskriptif Viabilitas Osteoblas 24 jam setelah transplantasi DFDB 15 kGy dan DFDB 25 kGy	51
Lampiran 4 :	Tabel test statistik viabilitas osteoblas antara kelompok DFDB 15 kGy dan kelompok DFDB 25 kGy	52
Lampiran 5 :	Boxplot viabilitas sel osteoblas manusia 24 jam setelah transplantasi DFDB 15 kGy dan DFDB 25 kGy	53
Lampiran 6 :	Tabel aktifitas fosfatase alkali menurut perlakuan dan waktu	54
Lampiran 7 :	Uji statistik deskriptif fosfatase alkali antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 7 hari	55
Lampiran 8 :	Uji statistik deskriptif fosfatase alkali antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 14 hari	56
Lampiran 9 :	Uji statistik deskriptif fosfatase alkali antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 21 hari	57
Lampiran 10:	Tabel test statistik fosfatase alkali antara kelompok DFDB 15 kGy dan kelompok 25 kGy	58
Lampiran 11:	Boxplot fosfatase alkali menurut perlakuan dan waktu	59
Lampiran 12:	Tabel deposisi ion kalsium menurut perlakuan dan waktu	60
Lampiran 13:	Uji statistik deskriptif deposisi ion kalsium antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 7 hari	61
Lampiran 14:	Uji statistik deskriptif deposisi ion kalsium antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 14 hari	62

Lampiran 15:	Uji statistik deskriptif deposisi ion kalsium antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 21 hari	63
Lampiran 16:	Tabel test statistik deposisi ion kalsium antara kelompok DFDB 15 kGy dan kelompok DFDB 25 kGy	64
Lampiran 17:	Boxplot analisis kalsium menurut perlakuan dan waktu	65
Lampiran 18:	Gambar bahan-bahan pembuatan medium biakan	66
Lampiran 19:	Gambar pembuatan kultur osteoblas	67
Lampiran 20:	Gambar transplantasi biakan osteoblas dengan allograft	68
Lampiran 21:	Gambar disain pemeriksaan MTT, Pemberian larutan MTT dan Pembacaan MTT dengan <i>microplate reader</i>	69

# Bab 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sejalan dengan pesatnya perkembangan ilmu pengetahuan, penggunaan tandur tulang dalam penanganan kasus-kasus kerusakan tulang juga semakin meningkat. Di bidang Kedokteran Gigi, sejak tahun 1901 Von Eiselsberg telah menggunakan tulang vomer dan mukoperiosteumnya untuk mengisi defek celah alveolar unilateral dan celah palatum. Tahun 1908, Erich Lexer pertama kali melaporkan penggunaan allograft untuk mengganti sendi rahang yang mengalami osteomyelitis dan merekonstruksi defek tulang setelah reseksi tumor.<sup>1</sup>

Meningkatnya pemakaian tandur tulang dalam bedah rekonstruksi menuntut tersedianya bahan tandur tulang yang siap pakai. Untuk memenuhi kebutuhan tersebut, di Amerika Serikat pada tahun 1949 berdiri bank jaringan pertama (US navy Tissue Bank), diikuti dengan terbentuknya kelompok-kelompok bank jaringan regional seperti American Association Tissue Bank (AATB) tahun 1990, the European Association Tissue Bank (EATB) tahun 1992. Perkembangan bank jaringan di regional Asia Pasifik telah dimulai sejak awal tahun 1980 an di beberapa negara dikawasan ini dan pada tahun 1988 dibentuk Asia Pacific Association of Surgical Tissue Banks (APASTB). Di Indonesia Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN, Jakarta) sejak tahun 1986 mulai menjajaki untuk membentuk bank jaringan dengan melakukan penelitian terhadap pengawetan amnion segar dan sejak tahun 1992 telah melakukan penelitian terhadap tandur tulang.<sup>1</sup> BATAN sebagai badan riset nasional telah memproduksi bahan tandur tulang sebagai pilihan, dengan harga yang bisa dipertimbangkan dan sesuai dengan ekonomi masyarakat Indonesia.<sup>2</sup>

Menurut sumbernya dikenal dua jenis bahan tandur tulang yaitu bahan yang berasal dari tulang (natural) dan bahan yang tidak berasal dari tulang (sintetik).<sup>2</sup> Bahan yang berasal dari tulang digolongkan menjadi : *Autograft* yaitu : jaringan tulang berasal dari individu yang bersangkutan, *Allograft* , yaitu jaringan tulang diambil dari individu yang berbeda namun dari spesies yang sama, dan *Xenograft*, adalah tulang yang telah mengalami deproteinisasi dari spesies primata

berbeda.<sup>3</sup> Bahan yang tidak berasal dari tulang (sintetik) seperti garam kalsium fosfat, kalsium karbonat dan keramik kaca bioaktif. Dalam penelitiannya Julia V, tahun 2007 mengemukakan bahan alami koral sebagai salah satu bahan alloplast.<sup>4</sup>

Bahan tandur tulang autograft memiliki kualitas terbaik pada perbaikan tulang karena menjamin terjadinya osteogenesis, osteoinduksi, dan osteokonduksi secara optimal. Tetapi untuk memperoleh bahan tandur tulang autograf, diperlukan operasi di daerah lain donor sehingga waktu dan prosedur pembedahan menjadi lebih panjang, penambahan morbiditi pada pasien serta terbatasnya jumlah bahan tandur tulang yang bisa diambil. Oleh karena itu para ahli mencari alternatif bahan tandur yang lain sehingga menyebabkan pemakaian allograft semakin meningkat.<sup>3,5</sup>

Karena berasal dari individu yang berbeda, bahan tandur tulang allograft mempunyai beberapa kekurangan, salah satunya adalah kemampuan transmisi infeksi biologis dari donor kepada resipien, seperti Human Immunodeficiency Virus (HIV), virus Hepatitis C (HCV), hepatitis B, syphilis dan bakteri patogen lain seperti *clostridium sondellii* dan *Streptococcus pyogenes*. Untuk mengurangi resiko tersebut, dilakukan skrining test ketat pada bahan allograft sebelum pembuatan dan sterilisasi akhir dengan sinar gamma.<sup>1,6</sup>

Dosis radiasi untuk sterilisasi bahwa bahan tandur tulang allograft harus memenuhi akreditasi AATB, EATB, APASTB, Australian Tissue Banking Forum (ATBF) dan Food and Drug Administration (FDA). Di Asia Pasifik, standar umum APASTB sesuai dengan standar Kurikulum International Atomic Energy Agency (IAEA) mengenai perlindungan khusus analisis laboratorium, *safeguards analytical laboratory (SAL)*. Dosis sterilisasi yang dipilih tergantung pada masing-masing bank jaringan, berdasarkan jumlah kontaminasi mikroorganisma pada suatu bahan sebelum menjalani prosedur sterilisasi.<sup>7</sup> Dosis radiasi untuk allograft berkisar dari 15 to 35 kGy. Di BATAN, dosis radiasi yang dipakai untuk sterilisasi allograft saat ini adalah 25 kGy, sesuai standar ISO 11137, 1995 dan ISO 11737, 1995.<sup>2,4</sup>

Besarnya dosis radiasi yang diberikan dipengaruhi oleh jarak antara sumber radiasi dengan sasaran dan waktu penyinaran. Makin jauh jarak antara sumber radiasi dengan sasaran dan makin lama waktu penyinaran dosis akan

makin besar. Sebaliknya bila makin dekat jarak antara sumber radiasi dengan sasaran dan makin sedikit waktu penyinaran maka dosis akan makin kecil. Besarnya dosis radiasi berbanding lurus dengan biaya produksi pembuatan bahan tandur tulang. Usaha untuk menekan biaya produksi pembuatan bahan tandur tulang terus dilakukan. Balsly CR dan kawan kawan juga melaporkan bahwa dosis radiasi rendah (18.3–21.8 kGy) dan sedang (24.0–28.5 kGy) tidak berpengaruh terhadap kekuatan dan modulus elastisitas allograf.<sup>3</sup> Nguyen dan kawan-kawan (2008) melakukan penelitian pada dosis lebih rendah dan memperoleh hasil bahwa dosis 15 kGy diterima sebagai standar dosis rasional (RSD) dan sudah dapat mensterilkan allograft tulang.<sup>1</sup> Laporan ini memberi manfaat untuk bank jaringan dan pasien, karena dosis radiasi rendah menjaga kualitas allograf tulang lebih baik.

Perbedaan besarnya dosis radiasi menimbulkan kerusakan kimia dan biologis yang berbeda pada suatu protein sel.<sup>2,3</sup> Efek radiasi pada suatu tandur tulang dapat ditinjau dengan melihat aktivitas sel-sel, antara lain sel osteoblas yang berperan dalam pembentukan tulang. Osteoblas memproduksi komponen matriks ekstraselular tulang seperti kolagen, protein non-kolagen dan proteoglikans serta berperan dalam proses sekresi beberapa enzim, sitokin, maupun faktor-faktor pertumbuhan yang berperan merangsang pertumbuhan tulang baru. Fase awal diferensiasi osteogenik dapat dilihat dengan adanya peningkatan aktifitas osteoblast dari marker fosfatase alkali, dan osteokalsin<sup>4,5</sup> dan deposisi kalsium sebagai hasil mineralisasi yang merupakan fase akhir dari proses maturasi.<sup>6,8</sup>

Pada penelitian terdahulu terhadap bahan allograft produksi BATAN, Corputty (2009) melaporkan bahwa pemakaian DFDB produksi BATAN meningkatkan proliferasi sel osteoblas dalam 24 jam setelah transplantasi serta meningkatkan diferensiasi sel osteoblas, yang ditunjukkan dengan meningkatnya ekspresi fosfatase alkali dan osteokalsin.<sup>4</sup> Penelitian yang telah dilaporkan diatas menggunakan DFDB dengan dosis radiasi 25 kGy. Sedangkan penelitian tentang pengaruh penggunaan DFDB dengan dosis radiasi 15 kGy pada proliferasi osteoblas belum pernah dilaporkan.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah dosis radiasi 15 kGy dapat dipakai sebagai sterilisasi akhir dari bahan allograft. Hal ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk bank jaringan dan pasien, karena selain biaya produksi lebih rendah, dosis radiasi rendah juga menjaga kualitas allograft tulang lebih baik.<sup>1</sup>

## **1.2 Rumusan Masalah**

Dengan latar belakang masalah di atas, rumusan masalah yang dapat diambil pada penelitian ini yaitu :

### **1.2.1 Rumusan Masalah Primer**

Apakah DFDB yang disterilisasi dengan dosis radiasi 15 kGy efektif meningkatkan proliferasi dan differensiasi sel osteoblas.

### **1.2.2 Rumusan Masalah Sekunder**

- Apakah transplantasi DFDB yang disterilisasi dengan dosis radiasi 15 kGy berpengaruh terhadap proliferasi sel osteoblas dibandingkan dengan transplantasi dengan DFDB yang disterilisasi dengan dosis 25 kGy?
- Apakah terdapat perbedaan ekspresi fosfatase alkali sel osteoblast yang ditransplantasi dengan DFDB dengan dosis radiasi 15 kGy dibandingkan transplantasi DFDB dengan dosis sterilisasi 25 kGy?
- Apakah terdapat perbedaan deposisi ion kalsium sel osteoblast yang ditransplantasi dengan DFDB dengan dosis radiasi 15 kGy dibandingkan transplantasi DFDB yang disterilisasi dengan dosis 25 kGy?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Membuktikan efektifitas DFDB yang disterilisasi dengan dosis radiasi 15 kGy terhadap peningkatan proliferasi dan differensiasi sel osteoblas.

### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Membuktikan efektifitas DFDB yang disterilisasi dengan dosis radiasi 15 kGy terhadap proliferasi sel osteoblas dibandingkan dengan transplantasi DFDB yang disterilisasi dengan dosis 25 kGy setelah 24 jam.
2. Membuktikan perbedaan ekspresi fosfatase alkali sel osteoblast yang ditransplantasi DFDB dengan dosis radiasi 15 kGy dibandingkan dengan

transplantasi DFDB yang disterilisasi dengan dosis 25 kGy pada hari ke 7, ke 14 dan ke 21.

3. Membuktikan perbedaan deposisi ion kalsium sel osteoblast yang ditransplantasi DFDB dengan dosis radiasi 15 kGy dibandingkan dengan transplantasi DFDB yang disterilisasi dengan dosis 25 kGy pada hari ke 7, ke 14 dan ke 21.

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

- a. Penelitian ini diharapkan dapat menambah khasanah ilmu pada bidang kedokteran gigi khususnya mengenai allograf serta pengembangan biomaterial produksi dalam negeri.
- b. Bila diketahui dengan dosis radiasi 15 kGy dapat dipakai untuk sterilisasi bahan tandur tulang, maka akan diperoleh bahan tandur dengan biaya produksi yang lebih rendah sehingga harganya menjadi lebih murah, terjangkau oleh daya beli masyarakat Indonesia.
- c. Penelitian ini diharapkan juga dapat dijadikan landasan penelitian selanjutnya dalam mengembangkan produksi bahan tandur tulang.

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

Sistem muskuloskeletal meliputi jaringan otot, tulang, sendi, tendon, dan ligamen merupakan bagian vital tubuh sehingga tubuh kita mampu untuk melakukan tugas-tugas kehidupan sehari-hari. Apabila terjadi gangguan pada sistem ini, secara signifikan akan berpengaruh terhadap kualitas hidup. Metode medis, fisik, dan bedah dilakukan untuk mengembalikan fungsi yang hilang sebagai akibat dari cedera atau penyakit. Salah satunya dengan transplantasi jaringan.<sup>9</sup>

Transplantasi bertujuan untuk melakukan rekonstruksi bagian tubuh yang mengalami kecacatan karena penyakit atau trauma. Dalam melakukan rekonstruksi dibutuhkan jaringan pengganti (*graft*), yang bisa berasal dari diri sendiri, spesies yang sama, spesies berbeda serta bahan sintesis.<sup>10</sup>

Pemakaian bahan pengganti tulang meningkat karena banyaknya kasus kerusakan tulang yang disebabkan oleh fraktur atau penyakit, meningkatnya pemasangan implan gigi serta resorpsi tulang rahang yang membutuhkan penambahan kuantitas tulang.

#### **2.1 Bahan Tander Tulang**

Perawatan kerusakan jaringan tulang dapat dilakukan dengan prosedur pencangkokan tulang, yaitu prosedur rekonstruksi atau menggantikan tulang yang rusak dengan bahan pengganti tulang atau bahan tandur tulang. Bahan tersebut dimaksudkan untuk dapat merangsang pembentukan tulang baru, karena jaringan tulang memiliki kemampuan untuk meregenerasi kerusakan sepenuhnya jika disediakan ruang di mana tulang itu dapat tumbuh. Tulang baru yang terbentuk sebagaimana tulang yang asli tumbuh, umumnya akan mengganti bahan tandur tulang sepenuhnya, sehingga di daerah tersebut akan terintegrasi tulang baru.<sup>10,11</sup>

Beberapa bagian tubuh seperti pinggul, rahang, lutut dan tulang belakang dapat diganti atau diperbaiki dengan menggunakan prosedur pencangkokan tulang. Hal ini juga dilakukan dalam menyembuhkan patah tulang dan kerusakan tulang dengan defek yang besar karena jenis tertentu kanker tulang.<sup>12</sup>

### **2.1.1 Pengertian Bahan Tander Tulang**

*Bone graft* atau bahan tandur tulang adalah bahan pengganti tulang yang dilakukan melalui prosedur pembedahan untuk menggantikan tulang yang hilang dengan bahan dari tubuh pasien sendiri, seseorang, bahan pengganti alami dari spesies berbeda dan bahan sintetik. Penggunaan bahan tandur tulang dimaksudkan agar terbentuk tulang baru.<sup>13</sup>

Pada kerusakan tulang dengan defek yang cukup besar, proses regenerasi tulang memerlukan tambahan matriks di dalam defek, karena jarak yang besar tidak memungkinkan sel-sel tulang untuk menyeberang dari satu sisi ke sisi lain tulang yang rusak. Bahan tandur tulang berfungsi sebagai matriks untuk dapat membantu pertumbuhan tulang.<sup>14</sup>

Bahan tandur tulang yang tersedia saat ini dapat ditemui dalam berbagai bentuk, ukuran, dan jenis. Misalnya berbentuk serbuk, batangan padat, dan batangan berpori. Bentuk serbuk biasanya digunakan untuk menambal rahang tulang gigi yang rusak. Sedangkan bentuk blok biasa digunakan untuk menambal defek tulang yang lebih besar. Terakhir BATAN sudah mengembangkan bahan tandur tulang berbentuk pasta, yang penggunaannya dapat diinjeksikan ke dalam kavitas.

### **2.1.2 Sejarah Diperlukan Bahan Tander Tulang**

Peristiwa menyebabkan suatu penemuan, dan kebutuhan adalah ibu penemuan. Perang Dunia II, misalnya, mengakibatkan banyak jumlah korban. Kerugian tulang, patah tulang atau luka bakar memaksa dokter bedah Perang menemukan metode reparasi untuk memperbaiki cacat tersebut (penyembuhan tulang-penyambungan dan tulang-transplantasi; Lancet, 1918).<sup>9</sup> Sejarah bahan tandur tulang (dan kulit) awalnya penuh dengan kontroversi karena sifat radikal dari prosedur pada jaman dulu. Maklum, tindakan tandur tulang atau kulit dari satu orang ke orang lain mengundang banyak kontroversi pada masyarakat, etika, agama dan alasan sosial.<sup>9,15</sup> Dengan tidak mengurangi penghargaan terhadap lingkungan dan opini pada masyarakat saat itu, para pelopor melakukan penelitian dalam memperjelas teknik graft dan aplikasi klinisnya. Saat ini walaupun pemakaian bahan tandur terutama bahan tandur tulang marak dilakukan,

penelitian-penelitian masih terus dilakukan untuk memperoleh hasil yang lebih baik.

### 2.1.3 Macam-macam Bahan Tandur Tulang

Berdasarkan asal donor terdapat berbagai jenis bahan tandur tulang yaitu :

#### - **Bahan tandur tulang *Autogenous***

Bahan tandur tulang autogenous juga dikenal sebagai *autograft* atau *self-graft* , merupakan bahan yang diperoleh dan dipakai pada satu individu, bisa berasal dari intraoral maupun ekstraoral.<sup>4,16,17</sup> Tulang dapat diambil dari tulang non-esensial, seperti dari krista iliaka dan fibula. Pada bedah mulut dan rahang atas, dari simfisis mandibula, ramus mandibular anterior (dalam proses koronoideus), tuberositas mandibula dan tulang zygoma. Hal ini terutama dilakukan untuk cangkok tulang berupa blok, di mana sebuah blok kecil tulang ditempatkan di seluruh daerah yang sedang dicangkokkan. Bahan tandur tulang autograft lebih disukai karena nonimmunogenik.<sup>4,11,16</sup> Resiko penolakan dari tubuh pasien kecil karena dan protein berasal dari tubuh pasien sendiri serta tidak ada kemungkinan transmisi penyakit dari donor. Tulang autograft menyediakan kerangka kerja yang kuat untuk tulang yang baru tumbuh, karena bersifat osteogenesis, osteoinduksi dan osteokonduksi. Sebaliknya aspek negatif pengambilan autograft memerlukan situs bedah tambahan, seperti penambahan waktu dan tempat operasi di bagian lain tubuh, mempunyai resiko potensial untuk nyeri dan ketidaknyamanan serta komplikasi lainnya pasca-operasi.<sup>18</sup>

#### - **Bahan tandur tulang *Allogenic***

Bahan tandur tulang allogenic disebut juga *allografts* atau *homografts* , yaitu jaringan tulang diambil dari individu berbeda namun mempunyai spesies yang sama.<sup>4,12,19</sup> Atau dengan kata lain merupakan graft tulang yang didapat dari seseorang untuk ditransplantasikan ke orang lain. Tulang allograft biasanya diperoleh dari bank tulang yang mengolah dari kadaver atau orang hidup lain. Tulang dibersihkan dan didesinfeksi untuk mengurangi kemungkinan terjadinya transmisi penyakit dari donor kepada resipien. Pemakaian allograft tidak menimbulkan daerah donor pada pasien, mengurangi waktu pembedahan dan komplikasi pasca operasi. Allograft, seperti autograft, menyediakan kerangka

kerja untuk tulang yang baru untuk tumbuh, tetapi membutuhkan waktu lebih lama karena tidak bersifat osteogenik. Juga tidak seperti autograft, tulang allograft tidak selalu memiliki sifat kekuatan yang sama karena sel-sel dan protein mengalami perubahan pada proses pembuatannya. Selain itu bahan ini dapat memberikan respon imunologis yang merugikan pada resipien.<sup>20</sup>

- **Bahan tandur tulang Xenogenik**

Dikenal dengan sebutan xenografts atau heterografts, merupakan bahan tandur tulang yang berasal dari spesies yang berbeda. Jenis spesies yang umum digunakan adalah sapi (bovine). Tulang sapi yang digunakan tentunya harus berasal dari sapi sehat dan mendapatkan sertifikasi kesehatan dari dokter dan dideproteinisasi untuk mencegah resiko transmisi penyakit. Hewan herbivora itu juga harus terbebas dari virus penyebab penyakit menular, misalnya virus antraks. Oleh sebab ini, tulang sapi yang akan digunakan sebagai bahan xenograft dipersiapkan khusus, bukan tulang sapi dari tempat pemotongan hewan. Berdasarkan hasil penelitian, diketahui bahwa bahan tandur tulang dari jaringan tulang sapi dapat merangsang pertumbuhan tulang baru dari defek tulang resipien. Keuntungan xenograft dan kerugian xenograft hampir sama dengan allograft.<sup>4</sup>

- **Bahan tandur tulang Alloplast**

Merupakan bahan pengganti tulang sintetik yang terbuat dari kalsium fosfat sintetik (HA dan TCP), kalsium karbonat, polimer *hard tissue replacement* (HTR), keramik kaca bioaktif dan faktor pertumbuhan, sitokin dan BMPs.<sup>12,21</sup> Kalsium karbonat mulai menurun dalam penggunaan karena resorbable dalam waktu singkat yang membuat tulang mudah pecah lagi. Akhirnya yang digunakan adalah fosfat trikalsium yang sekarang digunakan dalam kombinasi dengan hydroxylapatite sehingga memberikan osteokonduksi yang baik. Bahan ini memberi efek osteokonduksi dan keuntungan bahan ini dapat diperoleh dalam jumlah banyak serta tidak menimbulkan transmisi penyakit.

#### 2.1.4 Sifat Bahan Tandur Tulang

Bahan tandur tulang berfungsi sebagai *scaffold*, yaitu sebagai tempat perkembangan sel dan analog dengan matriks ekstraselluler. Untuk beregenerasi dan kemudian akan terdegradasi setelah jaringan yang diharapkan terbentuk.<sup>10</sup>

Selain itu *scaffold* juga berperan dalam penghantaran nutrisi, oksigen dan zat-zat sisa metabolisme serta memperantarai pelepasan *growth factors*<sup>13</sup> Bahan tandur tulang menyediakan lingkungan mikro yang bersifat fisikokimia dan biologis untuk mendukung pertumbuhan dan diferensiasi sel, serta meningkatkan perlekatan dan migrasi sel. Bahan tandur tulang memberikan rangsangan karena bersifat osteogenesis, osteokonduksi, dan osteoinduksi.

**Osteogenesis**, yaitu kemampuan merangsang pembentukan dan perkembangan menghasilkan sel-sel osteogenik dan matriks.<sup>9</sup> Tandur tulang bersifat osteogenesis bila dapat merangsang formasi tulang dalam jaringan lunak atau mengaktifasi pertumbuhan tulang secara cepat pada daerah tulang.<sup>22</sup> Contoh tandur tulang dari sum-sum tulang, BMP.<sup>9,16</sup>

- **Osteoinduksi**, yaitu kemampuan tandur tulang untuk merangsang pertumbuhan tulang baru atau proses stimulasi osteogenesis. Bahan tandur menginduksi sel osteoprogenitor untuk berdiferensiasi menjadi sel osteoblas yang kemudian mulai pembedakan tulang baru.<sup>6</sup> Mediator sel induksi adalah protein morfogenetik tulang (BMP). Osteoinduksi terjadi saat BMP diaktivasi. Bagian aktif BMP didapatkan dari matriks tulang yang didekalsifikasi.<sup>8,22</sup>
- **Osteokonduksi**, yaitu kemampuan bahan sebagai perancah dimana sel-sel tulang dapat bermigrasi sehingga dapat tumbuh dan membelah. Dalam hal ini bone graft berfungsi sebagai tempat tumbuhnya tulang baru (*scaffolding*).<sup>13</sup> Untuk merangsang suatu graft osteokonduktif membutuhkan kehadiran tulang yang ada atau sel mesenkim yang mengalami diferensiasi.<sup>9,16</sup>

Bahan tandur tulang juga harus biokompatibel, yaitu bahan yang tidak ditolak oleh *host*. Bahan tandur tulang harus memenuhi uji biokompatibilitas. Biokompatibilitas didefinisikan sebagai kehidupan yang harmonis dan tidak mempunyai pengaruh toksik atau jejas terhadap fungsi biologi.<sup>9,16</sup> Pengujian ini dimaksudkan agar tidak merusak *host*. Bahan-bahan tersebut harus tidak mengandung substansi yang dapat menyebabkan respon sistemik bila berdifusi dalam sistem sirkulasi, bebas dari bahan sensitasi yang dapat menyebabkan respon alergi dan tidak berpotensi karsinogenik.<sup>14</sup>

## 2.2 Allograft

Allograft merupakan jaringan tulang individu lain yang diproses untuk mengisi defek tulang resipien. Sumber untuk allografts bervariasi, dari kadaver atau donor hidup yang biasanya dikumpulkan dan disimpan oleh bank jaringan, perusahaan medis yang mengkhususkan diri dalam mengambil, penyaringan, dan mengelola bahan-bahan biologi yang digunakan dalam transplantasi dan prosedur okulasi.<sup>9,16</sup>

Bahan baku tulang allografts yang berasal dari donor hidup harus terbebas dari HIV/AIDS, hepatitis B/C, dan penyakit-penyakit menular lainnya. Untuk itu, sebelum mendonor-kan tulangnya, darah pendonor harus diperiksa terlebih dahulu dengan mesin Polymerase Chain Reaction (PCR). Hal itu dimaksudkan untuk memastikan pendonor bebas dari berbagai penyakit menular. Melalui mesin PCR, data-data DNA virus dari sampel darah pendonor bisa terlihat.<sup>21,23</sup>

Dalam proses pembuatannya, mula-mula proses pengisian jaringan tulang allograft diawali dengan menghilangkan bagian-bagian dalam tulang yang dapat menyebabkan tulang menolak "benda" baru yang masuk. Beberapa bagian itu antara lain protein, lemak, dan sebagian besar antigen yang dapat memicu reaksi pada pasien.<sup>23,24</sup>

Untuk menghilangkan protein biasanya digunakan hidrogen per-oksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Sedangkan lemak dihilangkan dengan memakai kloro-form dan metanol. Kadar kalsium dalam tulang yang digunakan sebagai bone graft juga harus dikurangi terlebih dahulu. Pengurangan kalsium (demineralisasi) itu untuk mendapatkan bone morphogenic protein (BMP) yang lebih banyak. Protein itu dapat merangsang sel-sel hidup dalam tulang yang mengalami celah agar cepat pulih kembali seperti sediakala.<sup>9,23</sup>

### 2.2.1 Sejarah Pemakaian Bahan Tandur Tulang Allograft

Demonstrasi penggunaan allograft tulang pertama kali oleh ahli bedah dan anatomi Skotlandia, John Hunter 1770 yang mentransplantasikan taji ayam. Pada tahun 1771 Hunter menggambarkan dalam bukunya *Treatise on the Natural History of the Human Teeth*, keberhasilan reimplantasi premolar yang hilang karena trauma. Seterusnya Hunter melanjutkan penelitiannya pada transplantasi gigi manusia kepada taji ayam. Sayang sekali penelitiannya kekurangan donor dan

terhambat karena infeksi, dan penelitiannya kemudian terhenti sampai pertengahan abad ke delapan belas. (Tilney,2000)<sup>9</sup>

Pada abad kesembilan belas pemakaian allograft dan perannya dalam pembentukan tulang menjadi perhatian ahli bedah ortopedi. Kontroversi antara pengetahuan osteogenesis -pembentukan tulang-antara Duhamel dan von Haller. Duhamel (1743) mengatakan bahwa periosteum berperan dalam pembentukan tulang baru, sebaliknya Haller (1763) mengatakan bahwa periosteum bukanlah osteogenik, tapi didukung oleh pembuluh darah dan eksudat dari pembuluh darah yang bersifat sebagai osteogenik. Tahun 1842 Flourens dalam penelitiannya menemukan bahwa periosteum bersifat osteogenik dan sebagai faktor utama dalam penyembuhan defek tulang. Tahun 1858 Ollier memecahkan masalah osteogenesis dengan melakukan studi komprehensif terhadap periosteum. Ia menyimpulkan bahwa transplantasi periosteum dan tulang sangat mengejutkan dan menjadi osteogenik dibawah lingkungan yang mendukung. Ia juga menyimpulkan bahwa kanal Haversian dan endosteum juga osteogenik. Tahun 1893, Barth mengemukakan dalam penelitiannya bahwa tulang dan periosteum yang ditransplantasikan kadang-kadang mati dan digantikan oleh jaringan sekelilingnya. Tandur tulang berperan sebagai scaffolding pasif. Axhausen (1909) dalam penelitian-penelitian yang dilakukannya mengatakan periosteum yang menakjubkan dan bersifat osteogenik dengan variasi dari bermacam-macam autograft dan juga allograft seperti juga laporan Gallie.<sup>15</sup>

Penggunaan bahan tandur tulang pertama kali tahun 1879 oleh William Macewen yang mentransplantasikan tibia seorang anak yang menderita rakhitis sebagai allograft ke humeri seorang anak muda yang berporus karena osteomielitis. Allograft ini berhasil karena Macewen sudah bekerja dalam kondisi antiseptik seperti anjuran Lister.<sup>1</sup>

Tahun 1908 Erich Lexer menggunakan allograft besar pertama untuk restorasi sendi yang mengalami defek besar karena osteomielitis. Tahun 1915 Trout melaporkan keberhasilan transplantasi bahan tandur tulang segar dari seorang ayah kepada anaknya. Penggunaan bahan tandur tulang segar berlanjut sampai tahun 1930-1940. Tahun 1948 Alldredge melaporkan kasus nonunion pada penggunaan bahan tandur tulang segar. Bonfiglio 1955 dan De Boer 1988

melaporkan adanya reaksi imunologi yang kuat pada penggunaan bahan tandur tulang segar. Perkembangan bahan tandur tulang segar terhenti sejalan dengan berkembangnya pengertian tentang imunogenisitas.<sup>9</sup>

Tahun 1910 Bauer melaporkan keberhasilan penggunaan bahan tandur tulang yang disimpan dalam refrigerator selama tiga minggu. Albee, seorang ahli bedah ortopedi amerika menganjurkan penyimpanan bahan tandur termasuk tandur tulang pada suhu 4-5<sup>0</sup> C. Bush dan Wilson menyimpan tandur tulang pada suhu -20<sup>0</sup>C. (Bush,1947; Wilson, 1947;Donati 2007) <sup>9</sup>

Tahun 1949 George Hyatt mendirikan US Navy Tissue Bank di Bethesda, Maryland dengan menyimpan tulang dari kadaver dalam pembekuan kering, yang membantu availabilitas tulang allogenik. Selanjutnya bank-bank jaringan didirikan di beberapa tempat seluruh dunia.<sup>9</sup>

Penggunaan allograft tulang selanjutnya berkembang pesat, juga dalam bidang bedah tumor , sejalan dengan berkembangnya bidang kemoterapi, merupakan alternatif pilihan selain amputasi.

### **2.2.2 Sifat allograft**

Biasanya digunakan dua bentuk allograft, yaitu freeze-dried bone allograft (FDB) and demineralized freeze-dried bone allograft (DFDB).<sup>14,16</sup>

Kedua tipe bahan tandur tulang tersebut bersifat osteokonduktif dan bekerja dalam mekanisme yang berbeda. FDB bersifat osteokonduksi dan memfasilitasi terjadinya resorpsi bila ditanamkan pada jaringan mesenkim.<sup>11</sup> Hosney dan Sharaway (1985) mengatakan bahwa FDB akan menghambat pembentukan tulang, DFDB selain mempunyai sifat osteokonduksi juga bersifat osteoinduksi, yang akan merangsang pembentukan tulang baru.<sup>8</sup>

Pilihan bahan tandur yang dipakai berdasarkan kondisi klinis daerah yang akan digraft. Karena masih termineralisasi, FDB masih mempunyai karakter fisik yang lebih baik. Tetapi FDB tidak bersifat osteoinduktif. Meskipun tidak terdapat perbedaan secara klinis antara FDB and DFDB, bila regenerasi menjadi masalah utama, pilihan jatuh pada DFDB. Penelitian pada hewan coba mengemukakan bahwa DFDB merangsang pembentukan tulang baru.<sup>8,11</sup>

Dalam pembuatannya, DFDB didekalsifikasi dalam asam hidroklorid kemudian dikeringkan secara beku kering. Dekalsifikasi diperlukan untuk membuka daerah morfogenetik tulang di dalam matriks organik tulang.<sup>1</sup>

DFDB pertamakali dikemukakan pada tahun 1965.<sup>1</sup> dan sudah digunakan dalam terapi periodontal sejak 2 dekade (Libin dkk, 1975) dengan kesuksesan rekonstruksi defek intraosseous periodontal. (Melloniog dkk,1982) Sekarang ini DFDB digunakan luas karena selain sifat osteokonduksinya juga berdasarkan kemampuan osteoinduksinya.<sup>1, 11</sup>

### **2.2.3 Proses Pembuatan Bahan Tander Tulang Produksi Batan, Jakarta**

Semua tulang yang diambil dari donor harus diproses dengan metoda yang sudah divalidasi untuk memperoleh kualitas, keamanan, efikasi jaringan. Skrening donor dan pengolahan bahan tandur setiap bank jaringan harus sesuai dengan Prosedur Baku Operasional pengawetan bahan tandur yang diakreditasi oleh assosiasi bank jaringan.<sup>1</sup>

Tes laboratorium pertama kali dilakukan sebelum proses pembuatan bahan tandur tulang dan tulang harus memenuhi verifikasi negatif terhadap tes laboratorium meliputi Anti-HIV1 dan anti HIV2, HbsAG, Anti-HCV, RPR (jika positif TPHA) dan Kultur dan sensitifitas untuk organisme aerob dan anaerob.<sup>1, 22,25</sup>

Bahan tandur tulang diproses sebagai berikut :<sup>1</sup>

Tulang-tulang yang telah dipotong tipis-tipis di suatu wadah, satu per satu diperiksa dengan seksama sebelum diproses dengan menggunakan berbagai macam bahan kimia. Pencucian dilakukan dibawah air bertekanan tinggi untuk menghilangkan darah dan sisa debris.

#### **Proses kimia**

Tulang ditempatkan pada botol bersih mengandung 70% etanol, lebih kurang empat jam. Atau pada bank jaringan lain pada larutan sodium hipoklorit 0,5 % tiga jam. Keduanya efektif untuk menonaktifkan HIV. Zat kimia dibersihkan dengan pencucian air dengan normal salin dan disimpan dalam botol berlabel pada temperatur dingin (-80<sup>0</sup>C) sampai tahap berikut dilakukan.

### **Mengeliminasi bakteri**

Proses selanjutnya bahan tandur tulang dipanaskan dalam air bertemperatur 58 sampai 60 derajat celsius selama sekitar tiga jam. Proses pemanasan itu disebut dengan pasteurisasi. Proses pasteurisasi bertujuan untuk mengeliminasi bakteri.

Tahapan berikutnya, tulang diproses dalam berbagai bentuk, ukuran, dan jenis, yaitu bentuk serbuk, batangan padat, dan batangan berpori.

Bone graft kemudian dikeringkan dengan cara sublimasi (liofilisasi), yaitu dibekukan dan dikeringkan tanpa melalui fase cair agar tidak mengalami perubahan secara kimia.

Bone graft yang telah diproses dengan cara liofilisasi hingga kadar air mencapai 5 sampai 7 persen dapat dikemas dalam kantong plastik polietilen. Proses selanjutnya adalah proses sterilisasi dengan menggunakan sinar gamma.

#### **2.2.4 Sterilisasi Akhir Dengan Sinar Gamma**

Untuk mendapatkan material yang bebas bakteri maupun virus. Teknologi radiasi memegang peran vital dalam industri bahan kesehatan. Sterilisasi radiasi sangat cocok untuk jaringan biologi termasuk bahan tandur tulang karena prosesnya dingin sehingga tidak mengubah struktur jaringan dan tidak meninggalkan residu beracun.<sup>17</sup> Selain itu, sterilisasi radiasi sangat ampuh membunuh mikroorganisme merugikan, termasuk virus sampai batas tertentu sehingga aman digunakan untuk implantasi pada manusia.<sup>1,2,7</sup>

Teknik sterilisasi allograft di promosikan oleh Internasional Atomic Energy Agency (IAEA) melalui program regional dan interregional mulai dari tahun 1990 sampai awal tahun 2000. Sterilisasi akhir bahan allograft menggunakan iradiasi sinar Gamma dari sumber Cobalt 60. Saat ini radiasi sinar gamma telah digunakan luas lebih dari 45% dari semua produk dan alat kesehatan dan dalam proses allograft oleh semua bank jaringan.<sup>1,21,23</sup>

ISO 11137-2: 2006 (ISO 11137-2a 2006) merekomendasikan beberapa metoda dalam menetapkan suatu dosis sterilisasi radiasi atau *radiation sterilisation dose* (RSD).<sup>21</sup> Untuk produk-produk kesehatan berdasarkan *bioburden information* atau resistensi radiasi dari organisma. Tingkat *bioburden* menggambarkan level kontaminasi mikrobiologis suatu produk. Kontaminasi

dapat berasal dari lingkungan, proses pembuatan, personil dalam pembuatan, mesin dan alat alat selama proses pembuatan.<sup>25</sup>

Ada dua pilihan dosis radiasi untuk allograft tulang, yaitu 25 kGy atau 15 kGy (VDmax 25 dan VDmax 15). (Hilmy dkk. 2000, 2003; Baker dkk. 2005; Djefal dkk. 2007)<sup>6</sup>, sesuai dengan akreditasi EATB, 1995; AATB, 2002; IAEA Int. Standards, 2002 and Australia TGA, 2000).<sup>1,3,21</sup>

Radiasi dengan sinar Gamma memberikan efek terhadap kekuatan mekanis dan biologis allograft tulang dengan pemecahan kolagen pada matriks tulang. Sinar gamma mengubah atau membelah rantai polipeptida tulang.<sup>3</sup>

Dari perkembangan penelitian radiasi dilaporkan efek radiasi sinar gamma pada berbagai dosis radiasi terhadap kekuatan mekanis bahan tandur. Nguyen dan kawan-kawan melaporkan penelitian untuk dosis sinar gamma melebihi 25 kGy, menyebabkan penurunan kekuatan mekanis dan kehilangan integritas biomekanis bahan tandur, sedangkan pada dosis kurang dari 25 kGy (antara 0 and 25 kGy) melalui tes *compressive and tensile strength* yang dilakukan pada dosis absorpsi rendah (18.3–21.8 kGy) dan dosis sedang (24.0–28.5 kGy), secara statistik tidak memberikan perbedaan untuk kekuatan mekanis atau modulus elastisitas bahan tandur, dibandingkan dengan grup kontrol pada dosis standar. Penelitian ini mensupport penggunaan dosis radiasi sinar gamma rendah dan sedang untuk graft tulang.<sup>3</sup>

Penelitian yang dilakukan menurut New ISO 11137-2006 dengan VDmax 15 metoda dengan dosis 15 kGy pada suatu sampel sudah dapat diterima oleh bank jaringan dan sudah cukup steril untuk bahan tandur tulang.<sup>21</sup>

Bone graft yang telah diiradiasi itu disimpan pada temperatur 4 sampai 10 derajat celcius dan diusahakan terhindar dari paparan sinar matahari langsung. Cara penyimpanan itu direkomendasikan hanya untuk kurun waktu 2 hingga 5 tahun, namun hal itu bergantung dari jenis jaringannya. Untuk menjaga kualitas dan sterilitas jaringan, kemasan yang rusak atau terbuka akibat pemakaian, tidak boleh digunakan lagi.

### **2.3 Struktur Tulang Dan Fungsinya**

Tulang memberikan fungsi protektif, dukungan mekanis dan proses metabolis tubuh. Tulang merupakan suatu jaringan yang kompleks, yang terdiri

dari matriks protein, sel-sel dan mineral yang berkombinasi membentuk suatu struktur dinamis yang berperan sebagai struktur penahan tubuh.<sup>10</sup>

Komposisi tulang terdiri dari 65% komponen anorganik dan 25% komponen organik dan 10% air.<sup>15,24</sup> Komponen anorganik diantaranya mineral hidroksi apatit, kalsium fosfat, kalsium karbonat, magnesium, natrium. Komponen organik diantaranya diantaranya 90% merupakan kolagen (tipe I)<sup>3,4,26</sup> yang merupakan bagian terbesar, bone morphogenetic protein (BMP), dan osteogenin.<sup>4</sup>

Secara morfologis terdapat dua bentuk tulang, kortikal (compact) dan kanselus (spongy). Tulang kortikal tersusun dari serat-serat kolagen membentuk lamellae konsentrik dan serat-serat tersebut tersusun secara perpendicular menurut lamellae. Sedangkan tulang kanselus merupakan suatu matriks yang porus tanpa organisasi. Perbedaan antara tulang kortikal dan kanselus dalam struktur dan fungsinya dimana susunan struktur berhubungan dengan fungsi utamanya, yaitu tulang kortikal memberikan fungsi mekanis dan perlindungan dan tulang kanselus memberikan fungsi metabolik.<sup>4</sup>

Tiga tipe sel yang berbeda ditemukan pada tulang yaitu osteoblast, yang berperan dalam pembentukan matriks tulang, osteoklas yang berperan dalam proses resorpsi, dan osteosit dengan jumlah mencapai 90% pada tulang yang matang.<sup>19,26</sup>

**Osteoblast.** Dalam pembentukan tulang, osteoblast berasal dari stem sel mesenkimal yang pluripoten, yang berdiferensiasi menjadi sel pembentuk tulang preosteoblast. Osteoblast merupakan sel mononuklear datar, berbentuk kuboid, yang belum terdiferensiasi sempurna. Sel ini terletak pada permukaan tulang bersama dengan precursornya membentuk suatu lapisan tipis.

Osteoblast mensekresikan sejumlah besar kolagen tipe I, tipe V (kebanyakan tipe I), sejumlah kecil proteoglikan serta protein matrik organik tulang yang lain dan pengaturan mineralisasinya. Protein nonkolagen produksi osteoblast meliputi osteokalsin (komponen nonkolagen tulang terbesar), 20% dari total massa tulang; osteonektin; protein sialyted dan phosphorylated; Peranan protein nonkolagen tersebut tidak diketahui tapi sintesisnya diatur oleh hormon paratiroid (PTH) dan 1,25 dihidroksivitamin D. Osteoblast menghasilkan berbagai

macam sitokin yang membantu meregulasi metabolisme sel. Osteoblas juga menghasilkan sejumlah *bone morphogenetic protein* (BMP) superfamily, yaitu BMP-2, BMP-7, dan perubahan pertumbuhan faktor  $\beta$ , dengan tambahan *insulin-like growth factors* (IGF-I dan IGF-II), *platelet derived growth factors* (PDGF) dan *fibroblastic growth factors* (FGF).<sup>19,26</sup>

Dalam fungsinya sel ini tidak terlepas dari kontak dengan sel-sel lain melalui bermacam protein transmembran (integrins, connexins, cadherin) dan reseptor spesifik (sitokin, hormon, growth factors).<sup>1,27</sup> Faktor kunci pada kecepatan pertumbuhan sel tulang adalah perluasan jumlah faktor pertumbuhan dari osteoblas, prekursor, atau keduanya.

Pada membran luar osteoblas terdapat kandungan fosfatase alkali, dimana enzim ini dapat memecah ikatan fosfat secara organik. Lalu fosfat yang dibebaskan ini akan berkontribusi terhadap tahap inisiasi dan pertumbuhan progresif dari kristal mineral tulang.

Vitamin D [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] merupakan regulator transkripsi gen yang poten yang berperan meningkatkan atau menurunkan ekspresi berbagai gen fenotip osteoblas, misalnya meningkatkan sintesis osteokalsin.

Pada proses pembentukan matrik tulang organik, osteoblas terperangkap diantara formasi jaringan baru, kehilangan kemampuan sintesis dan menjadi osteosit.<sup>3,4, 28,29</sup>

**Osteosit.** Osteosit merupakan sel osteoblast yang sudah berdiferensiasi sempurna, yaitu sel bundar yang dikelilingi oleh matriks tulang dan berada pada kripa-kripa yang disebut lakuna tulang. Ukurannya lebih kecil dari osteoblast, mengandung sedikit organella seperti ribosoma dan retikulum endoplasma retikula, dengan inti sel yang besar. Sel osteosit menerima oksigen dan nutrisi dari pembuluh darah pada kanali Havers. Osteosit relatif sebagai sel yang tidak aktif.<sup>3,4, 28,29</sup>

**Osteoklast.** Sel Osteoklast mempunyai banyak inti, rata-rata 10-12, berukuran besar hingga 100  $\mu\text{m}$  dengan diameter sel bervariasi dari 10-100  $\mu\text{m}$ . Osteosit diperkirakan merupakan derivat dari monosit. Kebalikan dari osteoblast, sel ini berperan dalam resorpsi tulang dan mobilisasi kalsium, fosfat, dan mineral-mineral melalui stimulasi hormon paratiroid yang berperan dalam aspek

serum kalsium level.<sup>4</sup> Sel ini mengandung lisosom dan metalloproteinase yang dapat menghancurkan serat kolagen dari tulang. Perkembangan dan fungsi mereka dimodulasi oleh sitokin seperti interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) dan interleukin-11 (IL-11).<sup>3,4, 28,29</sup>

### 2.3.1 Proses Penyembuhan Tulang

Penyembuhan tulang merupakan suatu proses biologis yang menakjubkan. Terdapat dua mekanisme penyembuhan tulang, yaitu penyembuhan tulang primer dan sekunder. Pada penyembuhan primer, dimana kedua segmen tulang berkontak langsung, tidak terdapat gap di antara kedua fragmen tulang. Pada kondisi ini osteoblas dapat menyeberang garis fraktur secara langsung. Pada penyembuhan sekunder dimana terdapat gap antara kedua fragmen fraktur, penyembuhan melalui terbentuknya intermediate callus.<sup>13,14</sup>

**Tahap Inflamasi** . Merupakan tahap awal proses penyembuhan yang terjadi beberapa hari setelah terjadi kerusakan. Pada permulaan akan terjadi perdarahan di sekitar patahan tulang, yang disebabkan karena terputusnya pembuluh darah pada tulang dan periosteum. Fase ini disebut **fase hematoma**. Pada hematoma yang besar menyebabkan periosteum terdorong dan dapat mengalami robekan akibat tekanan sehingga dapat terjadi ekstrasvasasi darah ke dalam jaringan lunak. Terjadi pelepasan sel-sel darah merah, neutrofil, makrofag dan mediator inflamasi serta terbentuknya fibrin di daerah kerusakan. Hematom ini kemudian akan berubah menjadi pertumbuhan jaringan fibrosis dan terbentuk pembuluh darah baru. Fase ini disebut **fase jaringan fibrosis**. Jaringan ini menyebabkan fragmen tulang saling menempel sebagai soft callus atau sering juga disebut kallus fibrosa.<sup>3,28</sup>

**Tahap reparatif** . Proses repair mulai saat hematoma berubah menjadi callus. Transformasi menjadi soft callus membutuhkan kedua komponen internal dan eksternal. Aspek internal callus yaitu sel-sel dan jaringan endosteum, dan aspek eksternal yaitu pembentukan dari periosteum, yang berfungsi osteogenik. Endosteum dan periosteum menghasilkan osteoid sepanjang aspek internal dan perifer fraktur. Aktivitas seluler meningkatkan terbentuknya pembuluh darah baru, sel mesenkim berubah menjadi kondroblast dan terbentuk kondroid yang

merupakan bahan dasar kartilago. Soft callus mengalami kalsifikasi, dan pada tahap akhir penyembuhan, kalus fibrosa berubah menjadi kalus tulang atau *immature woven bone*. Kalsifikasi terjadi mulai minggu ke 3 dan ke 4 setelah jejas. Proses ini dilanjutkan dalam beberapa minggu sampai terjadi tulang yang stabil. Pada foto Rontgen, proses ini terlihat sebagai bayangan radio-opak, tetapi bayangan garis patah tulang masih terlihat, disebut **fase penyatuan klinis**. Selanjutnya, terjadi penggantian sel tulang secara berangsur-angsur oleh sel tulang yang mengatur diri sesuai dengan garis tekanan dan tarikan yang bekerja pada tulang. Akhirnya, sel tulang ini mengatur diri secara lamelar seperti sel tulang normal. Kekuatan kalus ini sama dengan kekuatan tulang biasa dan fase ini disebut **fase konsolidasi**.<sup>3,25,29</sup>

### 2.3.2 Proses Remodelling Tulang

**Remodeling tulang atau metabolisme tulang** merupakan suatu proses yang berlangsung sepanjang hidup. Proses remodeling tulang merupakan proses yang kompleks dan terkoordinasi yang terdiri dari proses resorpsi dan proses ossifikasi atau formasi tulang baru yang menghasilkan pertumbuhan dan pergantian tulang. Jika massa tulang tetap pada dewasa, menunjukkan terjadinya keseimbangan antara formasi dan resorpsi tulang. Keseimbangan ini dilaksanakan oleh osteoblas dan osteoklas pada unit remodeling tulang. Remodeling dibutuhkan untuk menjaga kekuatan tulang.<sup>3,7,26</sup>

Konsep terbaru dari remodeling tulang adalah berdasarkan hipotesis dimana prekursor osteoklas menjadi teraktivasi dan berdiferensiasi menjadi osteoklas dan memulai proses resorpsi tulang. Resorpsi tulang melalui beberapa tahap mengarah pada pembuangan mineral dan konstituen organik matriks tulang oleh osteoklast, dibantu osteoblas. Osteoklas dan osteoblas dikontrol oleh hormon sistemik dan sitokin seperti faktor lokal lain (*growth factor* (TGF- $\beta$ , IGF-I dan II, *platelet derived growth factors* (PDGF) dan *fibroblastic growth factors* (FGF)., prostaglandin E<sub>1</sub> (PGE<sub>1</sub>) dan PGE<sub>2</sub>, leukotrien, PTH, kalsitonin, estrogen dan 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [1,25-(OH)D<sub>3</sub>], insulin, glukokortikoid, dan hormon tiroid).<sup>26,30</sup>

Tahap pertama adalah pengerahan dan penyebaran sel osteoprogenitor osteoklas ke tulang melalui aliran darah. Kemudian sel-sel prekursor osteoklas

tersebut akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi osteoklas. Selama resorpsi, osteoklas melepaskan faktor lokal dari tulang, dimana faktor lokal tersebut memiliki dua efek, yaitu inhibisi fungsi osteoklas dan stimulasi aktifitas osteoblas.

Aktivasi resorpsi tulang oleh osteoklas terjadi karena produksi ion hidrogen dan enzim proteolitik dalam lingkungan yang terlokalisasi di bawah tepi sel sitokin yang berkerut, mendorong aktivitas osteoklas berperan dalam meningkatkan jangka waktu hidup osteoklas dan faktor yang menghambat aktivitas osteoklas, muncul sebagai pemicu apoptosis osteoklas dan memblokir pembentukan osteoklas dan resorpsi tulang. Akhirnya saat osteoklas menyelesaikan siklus resorptif, mereka akan mensekresikan protein yang nantinya akan menjadi substrat untuk perlekatan osteoblas.<sup>31</sup>

Setelah resorpsi selesai, dilanjutkan dengan pembentukan tulang. Diawali dengan penarikan kemotaktik prekursor osteoblas ke daerah defek resorpsi, yang dimediasi oleh faktor lokal yang diproduksi selama proses resorpsi. Kemudian terjadi proses proliferasi prekursor osteoblas menjadi osteoblas. Menurut Matsuo dan Irie<sup>21</sup> ditemukan suatu ligan *osteoklastogenic (receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand/RANKL)* yang berperan pada interaksi antar sel dalam remodelling tulang. Reseptor RANKL adalah suatu glikoprotein transmembran, berasal dari superfamili *tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$*  dan diekspresikan pada sel osteoblas.<sup>26</sup> Kemunculannya diatur oleh beberapa hormon dan faktor osteotropik seperti vitamin D3, hormon paratiriod, prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) dan interleukin-11 (IL-11).<sup>5</sup> RANKL akan berinteraksi dengan reseptor RANK pada prekursor sel osteoklas, sehingga terjadi aktivasi, diferensiasi serta fusi galur sel osteoklas dari sel-sel hematopoietik, menandakan dimulainya proses resorpsi tulang. Interaksi ini terjadi dalam bentuk siklus yang memperlihatkan resorpsi maupun pembentukan tulang terjadi secara bersamaan (*coupling*).<sup>2,7,24</sup>

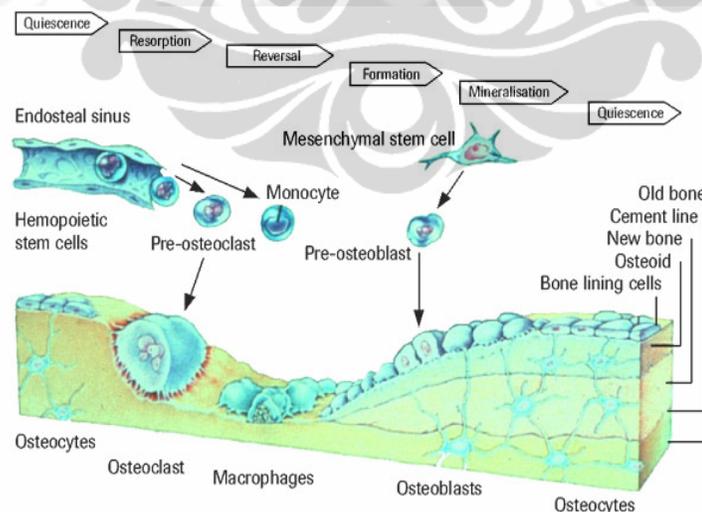
Peristiwa selanjutnya adalah diferensiasi osteoblas menjadi sel dewasa. Beberapa faktor pertumbuhan yang berasal dari tulang akan membentuk tanda yang menunjukkan bahwa osteoblas telah terdiferensiasi, hal ini termasuk ekspresi aktifitas fosfatase alkali, kolagen tipe I dan osteokalsin. Osteoblas yang matang akan berkumpul pada dasar kavitas resorpsi dan membentuk osteoid dan

terjadi mineralisasi. Terjadinya mineralisasi dapat dilihat dengan terbentuknya deposit ion kalsium pada matriks ekstraseluler. Osteoblas akan terus membentuk dan melakukan mineralisasi osteoid hingga kavitas terisi. Shen, dkk membuktikan adanya deposit ion kalsium pada matriks ekstraseluler yang dihasilkan biakan sel osteoblas pada hari ke-14 dan 21.<sup>32</sup>

Compston (2001) menggambarkan tahapan siklus remodeling tulang sebagai berikut :<sup>33</sup>

1. *Quiescence*, yaitu fase tenang, permukaan tulang sebelum terjadi resorpsi.
2. *Aktivation*, dimulai saat osteoklas teraktivasi dan taksis (pergerakan dan arah perpindahan dipengaruhi oleh arah datangnya rangsangan) ke permukaan tulang.
3. *Resorption*, dimana osteoklas berada pada permukaan tulang. Osteoklas akan mengikis permukaan tulang, melarutkan mineral, matriks tulang, membuat lubang (*resorption pit*) dan selanjutnya tertarik dalam *resorption pit*.
4. *Bone formation*, dimana osteoblas akan membentuk tulang baru dengan memproduksi matriks tulang osteoid.
5. *Mineralization*, dimana permukaan tulang telah ditutupi dengan sel-sel pelapis oleh proses modeling dan remodeling.

Siklus proses remodelling tulang dapat terlihat pada gambar berikut :



Gambar 2.1. Siklus proses remodelling tulang.

### 2.3.3 Biomarker Pada Formasi Tulang

Biomarker pada tulang dapat diklasifikasikan menurut prosesnya, yaitu marker dalam pembentukan tulang berupa produk yang dihasilkan dari aktivitas osteoblast, dan marker pada resorpsi tulang berupa produk yang dihasilkan oleh osteoklas.<sup>34,35</sup> Aktifitas osteoblas mulai dari pembentukan sel osteoblas terjadi dalam 3 tahap yaitu proliferasi, pembentukan dan maturasi matriks ekstraselular serta mineralisasi. Biomarker pada pembentukan tulang adalah produk-produk yang dihasilkan oleh aktifitas osteoblas yaitu fosfatase alkali (ALP) dan osteokalsin (OC), Procollagene I-C dan N-terminal propeptida. Biomarker yang dapat dilihat pada proses maturasi matriks tulang adalah terbentuknya ion kalsium sebagai salah satu mineral inorganik pada tulang.<sup>5,36,37</sup>

**Fosfatase alkali** (alkaline phosphatase,ALP) adalah suatu grup enzim yang dapat ditemukan dalam konsentrasi tinggi pada sejumlah jaringan tubuh. Jaringan yang mengandung kadar ALP tinggi adalah hati (isoenzim ALP-1), tulang (isoenzim ALP-3), plasenta, tubulus proksimal ginjal, dan usus halus (isoenzim ALP-3). Pada orang dewasa, ALP pada tulang dan hati ditemukan dalam konsentrasi yang sama, pada anak-anak ALP tulang biasanya lebih banyak dalam sirkulasi. Tingginya kadar ALP pada suatu jaringan dapat dipakai sebagai informasi diagnostik suatu penyakit. Pada kelainan tulang, kadar ALP meningkat karena peningkatan aktifitas osteoblastik (pembentukan sel tulang) yang abnormal, misalnya pada penyakit Paget. Jika ditemukan kadar ALP yang tinggi pada anak, baik sebelum maupun sesudah pubertas, hal ini adalah normal karena pertumbuhan tulang (fisiologis).<sup>38,39</sup>

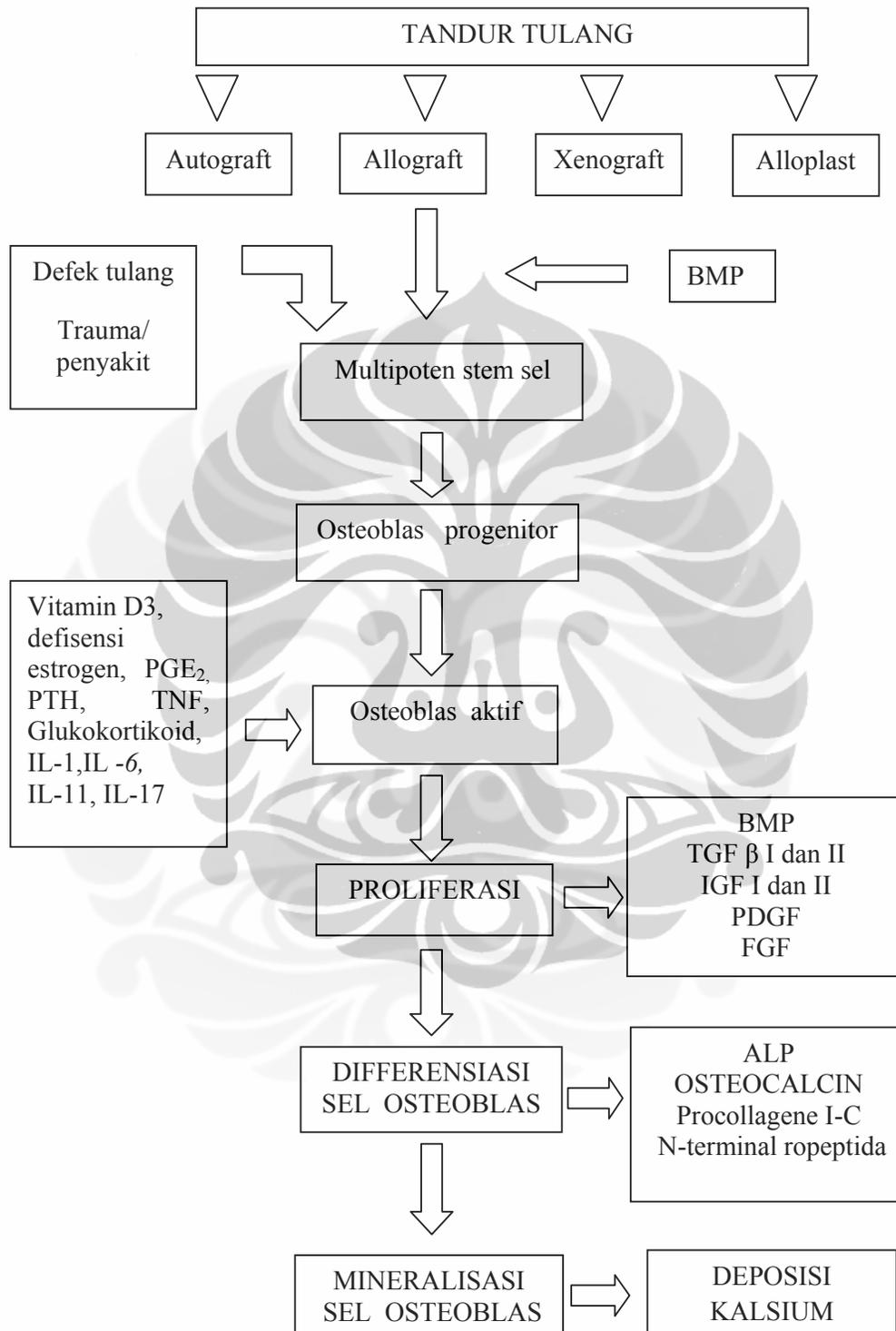
ALP tulang merupakan ektoenzim osteoblast yang ditemukan pada permukaan luar membran plasma osteoblas, merupakan enzim hidrolase yang bekerja sebagai katalisator hidrolisa ester fosfat pada membran osteoblast. Enzim ini bekerja dengan memecah ikatan fosfat secara organik sehingga berperan dalam penyediaan konsentrasi tinggi fosfat pada proses mineralisasi tulang. Oleh sebab itu aktifitas serum ALP meningkat selama periode aktif pembentukan dan pertumbuhan tulang, seperti pada bayi dan kehamilan. Ekspresi ALP yang merupakan penanda tingkat diferensiasi osteogenik.<sup>35</sup>

Meningkatnya aktifitas fosfatase alkali merupakan salah satu cara untuk mengetahui adanya peningkatan osteoblas.<sup>40</sup>

Uji kadar ALP secara kuantitatif dilakukan dengan banyak teknik, baik dengan pewarnaan maupun teknik assay. Metode pengukuran kadar ALP umumnya adalah kolorimetri dengan menggunakan alat (misalnya fotometer/spektrofotometer) manual atau dengan analizer kimia otomatis.

**Ion kalsium**, merupakan biomarker pada proses maturasi tulang sebagai hasil dari mineralisasi tulang. Ion kalsium merupakan salah satu mineral inorganic yang banyak terdapat dalam tulang dalam bentuk kristal hidroksi apatit.<sup>20</sup> Deposisi ion kalsium dilihat dengan pewarnaan von Kossa oleh Carnes dkk mulai ditemukan pada hari ke-12,<sup>8</sup> sedangkan Shen, dkk<sup>32</sup> membuktikan adanya deposit ion kalsium pada matriks ekstraseluler yang dihasilkan biakan sel osteoblas pada hari ke-14 dan 21. Corputty dalam penelitiannya mengemukakan bahwa deposisi ion kalsium terbentuk sesuai dengan kedua peneliti di atas.<sup>2</sup>

## 2.4 Kerangka Teori

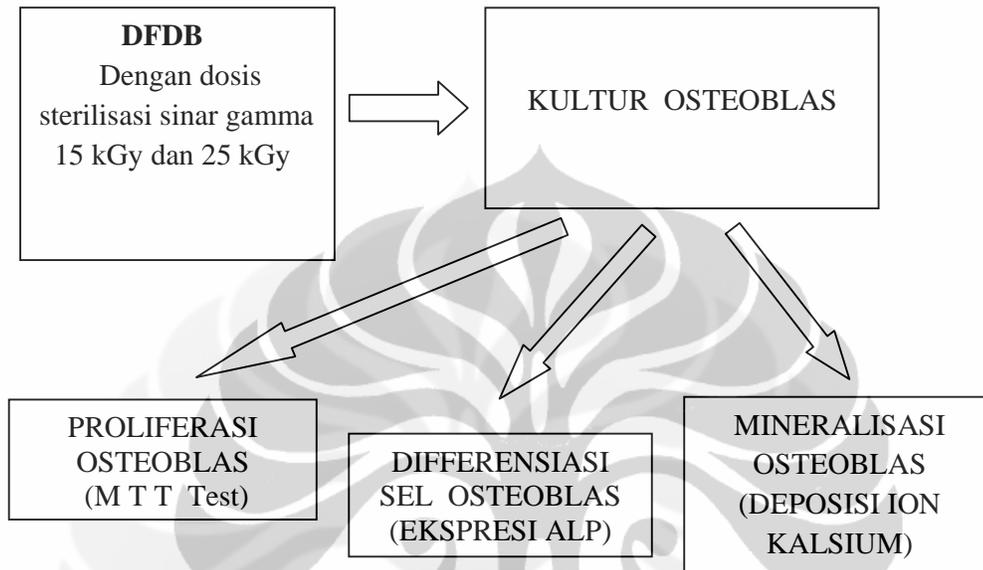


Gambar 2.2 Bagan Kerangka Teori

## BAB 3

### KERANGKA KONSEP, HIPOTESIS DAN DEFINISI OPERASIONAL

#### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.2 Bagan Kerangka konsep

Keterangan :

Konsep pada penelitian ini adalah bahan tandur allograft DFDB yang disterilisasi dengan dosis radiasi sinar gamma 15 kGy dan 25 kGy dipaparkan pada sel osteoblast MG 63, selanjutnya diuji efeknya terhadap proliferasi sel berupa produksi fosfatase alkali dan deposisi ion kalsium sebagai hasil mineralisasi.

#### 3.2 Hipotesis Penelitian

1. Perbedaan dosis radiasi sinar gamma pada bahan tandur tulang allograft DFDB mempengaruhi proliferasi sel osteoblast.
2. Perbedaan dosis radiasi sinar gamma pada bahan tandur tulang allograft DFDB mempengaruhi kadar fosfatase alkali osteoblas.
3. Perbedaan dosis radiasi sinar gamma pada bahan tandur tulang allograft DFDB mempengaruhi deposisi ion kalsium osteoblas.

### 3.3 Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Bahan & Cara/alat ukur	Hasil ukur
Osteoblas	biakan dari cell line human osteoblast MG 63 yang dikultur pada medium D-MEM		
DFDB	bahan tandur tulang allograft produksi BATAN, Jakarta, berbentuk granular ukuran 60-20 Mesh	Granular	60-20 mesh
Dosis radiasi	dosis sterilisasi akhir pada bahan allograf	sinar gamma dari sumber Cobalt 60	15 kGy dan 25 kGy
Waktu	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 24 jam setelah dipajan dengan DFDB untuk menghitung indeks proliferasi osteoblas</li> <li>- 7, 14 dan 21 hari untuk penghitungan fosfatase alkali dan deposisi ion kalsium.</li> </ul>		24 jam  7, 14, 21 hari
Indeks Proliferasi Osteoblas	angka <i>Optical Density</i> (OD) yang melewati kultur sel osteoblas pada <i>microplate reader</i>	MTT Cytotoxic Assay	
Ekspresi fosfatase alkali	kadar enzim fosfatase alkali pada supernatan biakan sel osteoblas manusia setelah dipajan dengan DFDB	Colorimetri	nMol

	(sterilisasi 15 dan 25 kGy) pembacaan <i>Optical Density</i> pada <i>microplate reader</i>		
Deposisi ion kalsium	jumlah nodul yang menandakan deposit ion kalsium pada biakan sel osteoblas setelah dipajan DFDB (sterilisasi 15 dan 25 kGy), dilihat dengan	Pewarnaan von Kossa dilihat dengan mikroskop cahaya pembesaran 10 kali	

## **BAB 4**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **4.1 Jenis Penelitian**

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratorik.

Penelitian dilakukan terhadap kultur sel osteoblas yang diberi tandur tulang DFDB allograft yang disterilisasi dengan dosis radiasi 15 kGy dan 25 kGy, kemudian di lihat aktivitas osteoblas dengan mengukur indeks proliferasinya dan beberapa biomarker regenerasi tulang, fosfatase alkali dan deposisi kalsium.

#### **4.2 Subyek Penelitian**

Subyek yang digunakan dalam penelitian ini adalah galur sel osteoblas manusia (MG 63) yang dikultur, diperoleh dari Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

#### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Pembuatan bahan tandur DFDB Allograft dan sterilisasi sinar gamma dilakukan di Bank Jaringan BATAN Jakarta, sedangkan penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.

Penelitian dilakukan pada tanggal 10 Oktober sampai 6 Desember 2011.

#### **4.4. Sampel Penelitian**

Besar sampel menurut WHO tiap kelompok minimal 5 untuk setiap perlakuan. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan tiap kelompok adalah 5 *well* untuk setiap perlakuan

#### **4.5.Variabel Penelitian**

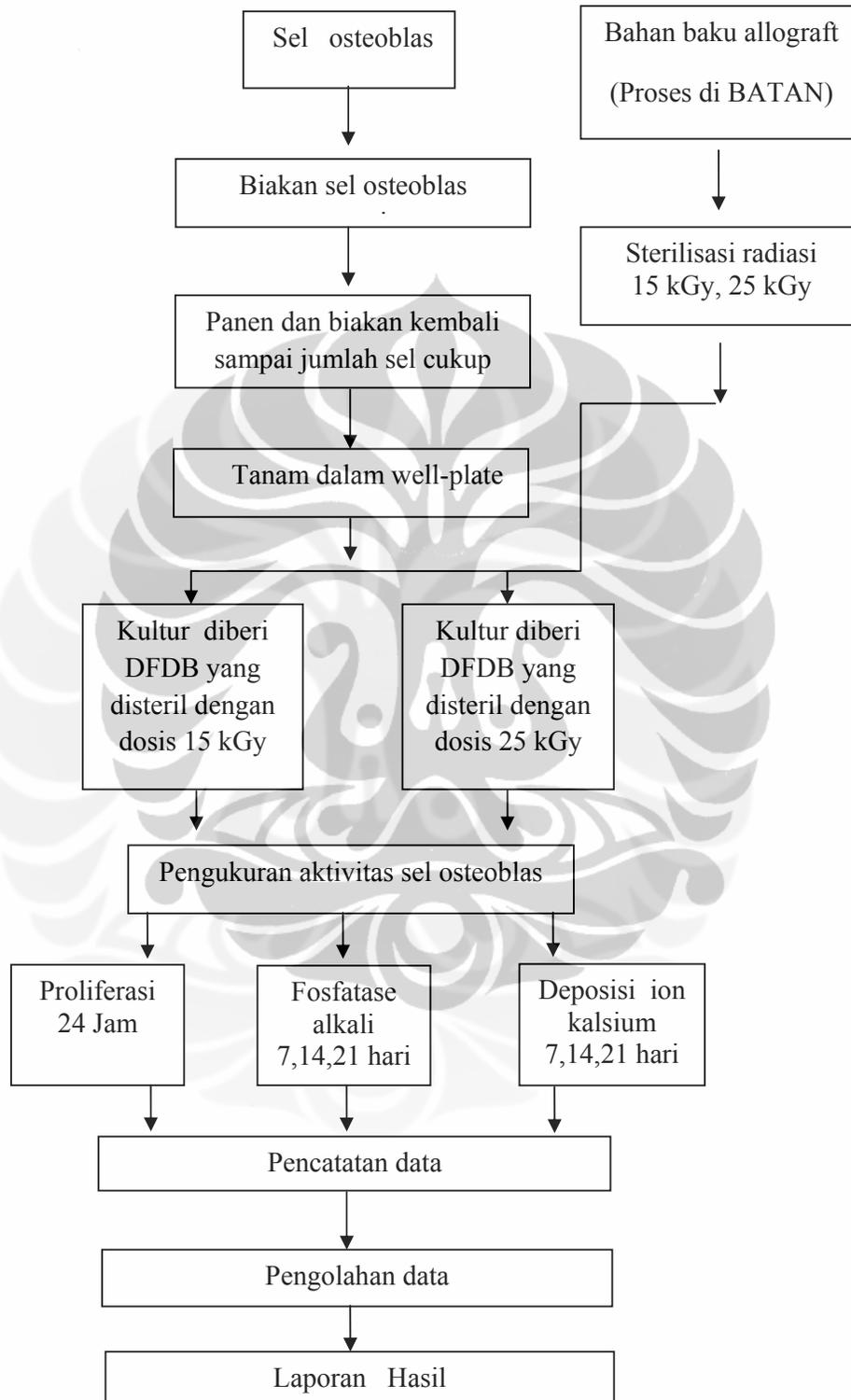
##### **4.5.1.Variabel bebas**

Sebagai variabel bebas adalah : Pemberian bahan tandur tulang, Dosis sterilisasi radiasi bahan allograft dan Waktu.

##### **4.5.2 Variabel terikat**

Sebagai variabel terikat adalah : Indeks proliferasi sel osteoblas, Ekspresi enzim alkali fosfatase dan Jumlah deposisi ion kalsium

#### 4.6 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

## 4.7 Alat dan bahan

### 4.7.1 Alat

1. Botol Schott (Schott, Germany)
2. Tabung 15 ml (Falcon, Biologix)
3. Tabung 50 ml (Falcon, USA)
4. *Centrifuge* (SORVALL)
5. Cawan petri (NUNC, Denmark)
6. *24 well plate* (NUNC, Denmark)
7. *96 well plate* (NUNC, Denmark)
8. Pipet mikro (Eppendorf, Jerman)
9. Semprit 50 mL (Terumo, Jepang)
10. Tabung Eppendorf (Axygen, USA)
11. *Criofile* (NUNC, Denmark)
12. Hemositometer (Neubauer, Germany)
13. Mikroskop (Nikon Elipse 80i)
14. Inkubator (Memert)
15. *Microplate reader* (Bio-Rad)
16. *Biohazard cabinet* (Esco, Singapore)
17. *Water bath* (CERTOMAT, Biotech)
18. Nitrogen cair
19. *Sterile syringe filter* (Corning, NY 14831, Jerman)
20. *Eppis tube* 1,5 mL (Falcon Biologix)

### 4.7.2 Bahan Biakan Sel

1. Medium biakan: Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, USA)
2. Mili Q water
3. Penisillin Streptomisin (Gibco, New Zealand)
4. Sodium bikarbonat (Sigma, USA)
5. Fungizone (Gibco, New Zealand)
6. *Fetal Bovine Serum* (FBS) (BioWest, South America)
7. L-Glutamine (Gibco, New Zealand)
8. *Herpes Buffer Solution* (Sigma, USA)

9. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Sigma, USA)
10. *Trypan Blue* (Sigma, USA)

#### 4.7.3 Bahan Pemeriksaan Indeks Proliferasi Sel Osteoblas

1. Larutan MTT 150  $\mu$ L. (Sigma, USA)
2. Cairan Isopropanol 1500  $\mu$ L (Sigma, USA)

#### 4.7.4 Bahan Pengujian Ekspresi Fosfatase Alkali

1. Larutan  $MgCl_2$  1 M (Sigma, USA)  $\rightarrow$  2,03 gr  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  tiap 10mL  $H_2O$ .
2. *Buffer* Dietanolamin 1M; pH 9,8 (Sigma, USA)  
52,9 gr Dietanolamin/400 mL + 0,2 mL larutan  $MgCl_2$  (reagen 1)  
Kemudian larutan *buffer* dipanaskan pada suhu 37° C, lalu diatur pada pH 9,8 menggunakan larutan HCl 2N. Setelah itu, ditambahkan air hingga mencapai 500 mL dan disimpan dalam botol gelap.
3. Larutan *p-nitrophenyl phosphate* 0.65 M (247mg/1 mL  $H_2O$ ) (Sigma, USA)

#### 4.7.5 Bahan Pemeriksaan Deposisi Ion Kalsium

1. Larutan Ag Nitrat 1% (Sigma, USA)  $\rightarrow$  Ag Nitrat 0,1 mg dalam 10 mL  $H_2O$
2. Larutan Na Tiosulfat 5% (Sigma, USA)  $\rightarrow$  Na Tiosulfat 5 mg dalam 10 mL  $H_2O$
3. Larutan pewarna terdiri atas:  
Aluminum sulfat 5% + *nuclei fast red* 0,1% (Sigma, USA)  $\rightarrow$  Aluminum Sulfat 5 mg dan *nuclei fast red* 0,1 mg dalam 10 mL  $H_2O$ .

### 4.8 Cara Kerja

#### 4.8.1 Pembuatan Medium Biakan

Pada penelitian ini akan digunakan biakan Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), ditambahkan fenol red sebanyak 100 mL ditambahkan dengan sodium bikarbonat 6.75 mL, L Glutamine 4.5 mL dan Herpes Buffer 2 mL kemudian dilarutkan dalam Mili Q water sebanyak 886,75 mL menjadi 1 liter medium DMEM. Setelah itu 45 mL medium biakan dimasukkan dalam tabung 50 mL, kemudian tambahkan 5 mL *fetal bovine serum* (FBS) penisilin streptomisin 10  $\mu$ L dan *fungizone* 10  $\mu$ L lalu homogenkan dan disaring menggunakan *sterille syringe filter* ke dalam botol kosong lalu disimpan dalam lemari pendingin.

#### 4.8.2 Pembuatan DFDB Allograft

Pembuatan dan pemrosesan bahan tandur tulang dilakukan di BATAN, Jakarta, dengan proses demineralisasi freeze drying (DFDB), kemudian disterilisasi akhir dengan iradiasi sinar gamma dengan dosis 15 kGy dan 25 kGy.

#### 4.8.3 Pembuatan Kultur Osteoblas

Sel osteoblas diambil sebanyak 100  $\mu\text{L}$  menggunakan pipet mikro, lalu dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan tambahkan Phosphate Buffer Saline (PBS) sampai 10 mL kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2000 RPM/g, pada suhu 24°C selama 10 menit. Hasil sentrifugasi akan diperoleh 2 bagian cairan masing-masing supernatan dan pelet. Pelet kemudian dilarutkan kembali dalam medium biakan dan dibuat homogen. Selanjutnya larutan tadi dipindahkan ke dalam cawan petri dan tambahkan medium biakan hingga volume cawan mencapai 7 mL. Setelah itu cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO<sub>2</sub> selama 48 jam. Setelah sel bertambah banyak mencapai keadaan *confluen* maka sel osteoblas siap untuk dipanen.

#### 4.8.4 Pemaparan Kultur Osteoblas Dengan DFDB Allograft

Sel osteoblas dihitung dalam hemositometer kemudian dimasukkan ke dalam 5 *well* biakan jaringan dengan kepadatan sel 10<sup>4</sup> sel/mL masing-masing *well*. Kemudian masing-masing *well* diberi perlakuan dengan allograft yang disterilisasi dengan dosis 15 kGy, masing-masing sebanyak 2 mg dan kontrol (ditransplantasi dengan bahan *tandur* tulang yang disteril pada dosis 25 kGy), lalu diinkubasi selama 7, 14 dan 21 hari.

#### 4.8.5 Pengukuran Indeks Proliferasi Osteoblas

Sel osteoblas disebar kedalam *well* ukuran 24 *well* dengan kepadatan 10<sup>4</sup> kemudian sel osteoblas ditransplantasi dengan allograft yang disterilisasi dengan dosis 15 kGy sedangkan kelompok kontrol adalah sel osteoblas yang disterilisasi dengan allograft dengan sterilisasi 25 kGy. 24 jam setelah diinkubasi pada suhu 37°C, CO<sub>2</sub> 5%, tiap *well plate* ditambahkan dengan larutan MTT 150  $\mu\text{L}$ , lalu diinkubasi lagi selama 3 jam. Kemudian ditambahkan cairan isopropanol 1500  $\mu\text{L}$  setiap *well* dan *well-plate* digetarkan selama 1 jam dengan kecepatan 50 RPM di atas meja getar (*shaking table*). Setelah itu sampel dibagikan ke dalam 96-*well*

*plate* sesuai dengan daftar sampel yang telah dibuat. Masing-masing perlakuan dibuat 5 *well* dalam dua seri perlakuan. yang kemudian dilakukan pengukuran densitas optikal pada 490 nm menggunakan *microplate reader*. Kemudian dihitung persentase viabilitas sel dari angka mean OD tiap perlakuan yang merupakan angka yang menunjukkan integritas membran sel atau aktifitas metabolik sel yang memungkinkan sel untuk dapat hidup.

#### **4.8.6 Pengukuran Fosfatase Alkali**

Kadar fosfatase alkali diukur menggunakan teknik kolorimetri. Reagen *Buffer* Dietanolamin 1M; pH 9,8 sebanyak 290  $\mu$ L diambil menggunakan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam *well plate* ukuran 300  $\mu$ L, lalu ditambahkan larutan p-Nitrophenyl phosphate 0.65 M (247mg/1 mL H<sub>2</sub>O) sebanyak 5  $\mu$ L dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian masing-masing *well* ditambahkan supernatan sampel sebanyak 5  $\mu$ L, dan dicampurkan. Uji ALP berdasarkan perubahan warna *Para-Nitrophenol phosphate* (p-NP) yang diurai oleh ALP sehingga menghasilkan *P-Nitrophenol* (p-NP) dan *phosphate*. Kadar ALP dihitung menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm dengan suhu 37°C.

#### **4.8.7 Pengukuran Kadar Ion Kalsium**

Setelah pembiakan sel osteoblas dalam *well plate* mencapai keadaan *confluent*, kemudian ditransplantasi dengan DFDB dengan sterilisasi 15 kGy dan 25 kGy. Untuk setiap perlakuan, sel osteoblas dibiakkan dalam 3 seri, karena pengukuran akan dilakukan pada hari ke-7, ke-14 dan ke-21.

#### **Pewarnaan Von Kossa pada Hari ke 7, 14, 21**

Setelah sel osteoblas diinkubasi selama 7, 14, 21 hari, dilakukan pewarnaan Von Kossa.

Pada setiap hari pengukuran, *well* diambil sesuai dengan waktu pengukuran, lalu medium dibuang dari dalam *well-plate* dan cuci dengan PBS, kemudian dalam setiap *well* ditambahkan larutan AgNitrat masing-masing 200  $\mu$ L larutan 1 % silver nitrat ke dalam tiap-tiap *well*. Lalu biarkan dibawah UV selama 20 menit. *Well* kemudian dicuci dengan aquadest, dan angkat sisa-sisa Ag-Nitrat yang tertinggal dipermukaan dalam *well* dengan menambahkan larutan 5 %

sodium thiosulfat masing-masing *well* 200  $\mu$ L, biarkan selama 5 menit. Cuci lagi dengan aquadest sampai bersih dan warnai dengan larutan pewarna nuclear fast red dan diamkan selama 5 menit, cuci dengan mili Q sampai bersih dan dikeringkan.

### **Perhitungan Jumlah Deposisi Kalsium**

Kultur sel yang telah diwarnai dengan teknik Von Kossa dihitung jumlah nodul pada setiap sel yang merupakan larutan pewarna yang diserap oleh kalsium yang telah diberi transplantasi DFDB dengan dosis radiasi 15 kGy dan 25 kGy dan dihitung secara manual.

dengan pembesaran 10 x. Pilih satu lapang pandang yang sangat mewakili jumlah deposisi ion kalsium, lalu dihitung secara manual.

Warna coklat/hitam → ion kalsium

Warna merah → inti sel

Warna merah jambu → sitoplasma.

Penghitungan dilakukan oleh 3 orang yang sebelumnya dilakukan kalibrasi terlebih dulu.

### **4.9 Managemen Dan Analisis Data**

Tiap perlakuan dibuatkan replikasi biologis sebanyak 3 kali. Semua data akan dilaporkan sebagai rerata  $\pm$  simpang baku. Dalam bentuk tabel dan grafik dan analisa secara statistik dengan uji Mann Whitney-U dan Wilcoxon W.

### **4.10 Kaji etik**

Rancangan penelitian dengan judul “ Efektifitas bahan allobatan dengan sterilisasi 15 kGy terhadap proses regenerasi tulang” diajukan pada Komite Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dan mendapatkan surat lolos etik dengan surat keterangan Nomor: 35/Ethical Clearence// FKGUI/VII/2011, tanggal 11 November 2011

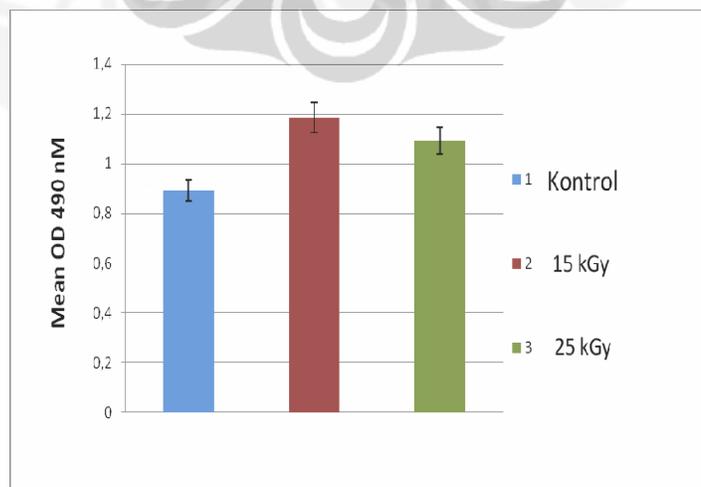
## BAB 5

### HASIL

Pada penelitian ini dilakukan analisis pengaruh transplantasi DFDB produksi Batan, Jakarta, dengan dosis sterilisasi akhir 15 kGy (DFDB 15 kGy) terhadap perilaku sel osteoblas manusia dibandingkan dengan transplantasi DFDB dengan dosis sterilisasi akhir 25 kGy (DFDB 25 kGy). Biakan sel osteoblas manusia dibagi menjadi 3 kelompok, masing-masing kelompok A ditransplantasi dengan DFDB 15 kGy produksi Batan, Jakarta, Indonesia) dan kelompok B ditransplantasi dengan DFDB 25 kGy dan kelompok K tanpa perlakuan. Kelompok Proliferasi sel osteoblas diukur 24 jam setelah perlakuan, ekspresi enzim fosfatase alkali, dan deposit ion kalsium, yang diukur pada hari ke 7, 14 dan 21 setelah perlakuan.

#### 5.1 Pengukuran Proliferasi Sel Osteoblas.

Sebaran indeks proliferasi sel osteoblas 24 jam setelah transplantasi DFDB 15 kGy dan 25 kGy ketiga kelompok perlakuan dengan nilai rerata DFDB 15 kGy  $1,18 \pm 0,17$ ; DFDB 25 kGy  $1,09 \pm 0,18$  dan kontrol  $0,89 \pm 0,17$  seperti terlihat pada lampiran 2. Sebaran indeks proliferasi sel osteoblas menurut jenis perlakuan seperti terlihat pada dan Grafik 5.1.

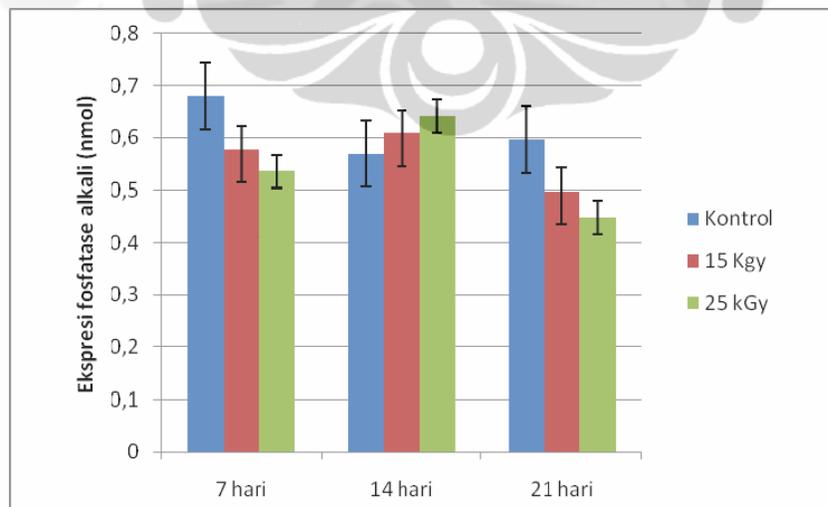


Grafik 5.1 Indeks proliferasi osteoblas menurut perlakuan setelah 24 jam

Secara statistik proliferasi osteoblast pada boxplot yang terlihat pada lampiran 2 terlihat rerata viabilitas pada kedua kelompok tidak menunjukkan perbedaan bermakna. Analisa statistik dengan uji Mann Whitney-U dan Wilcoxon W antara kelompok perlakuan 15 kGy dibandingkan dengan 25 kGy juga tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna.

## 5.2 Pengukuran Ekspresi Fosfatase Alkali

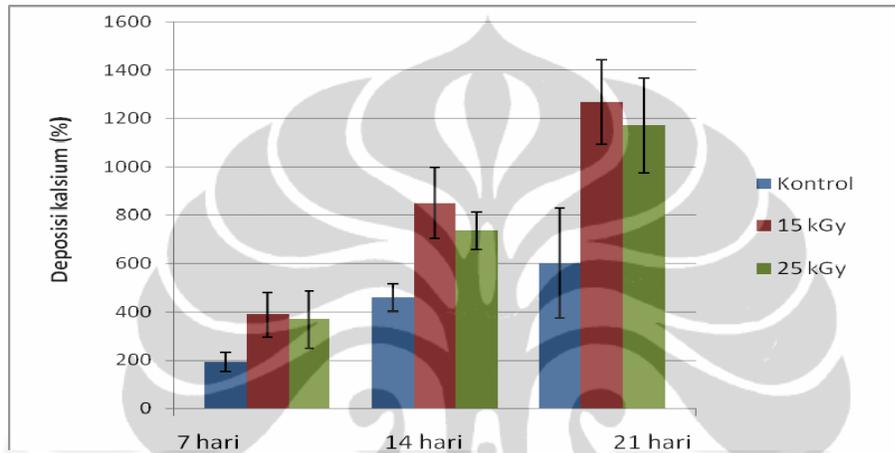
Ekspresi fosfatase alkali dilakukan pada biakan osteoblas manusia setelah ditransplantasi dengan DFDB 15 kGy dan DFDB 25 kGy pada hari ke-7 dengan rerata kelompok DFDB 15 kGy adalah  $0,58 \pm 0,03$  dan kelompok DFDB 25 kGy adalah  $0,54 \pm 0,03$ . Pada hari ke-14 kelompok DFDB 15 kGy  $0,61 \pm 0,01$  dan kelompok 25 kGy adalah  $0,64 \pm 0,02$ . Hari ke-21 kelompok DFDB 15 kGy adalah  $0,50 \pm 0,04$  dan kelompok 25 kGy  $0,45 \pm 0,03$ . Sedangkan aktifitas volume fosfatase alkali tergambar pada grafik 5.2. Secara statistik ekspresi fosfatase alkali dengan uji Mann Whitney-U dan Wilcoxon W antara kelompok perlakuan 15 kGy pada hari ke-7 tidak terdapat perbedaan bermakna dibandingkan dengan DFDB 25 kGy. Tetapi pada hari ke-14 terlihat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan 15 kGy dibandingkan dengan 25 kGy. Sedangkan pada hari ke-21 tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan 15 kGy dibandingkan dengan 25 kGy .



Grafik 5.2 Aktifitas volume fosfatase alkali menurut perlakuan dan waktu

### 5.3 Pengukuran Deposisi Ion Kalsium.

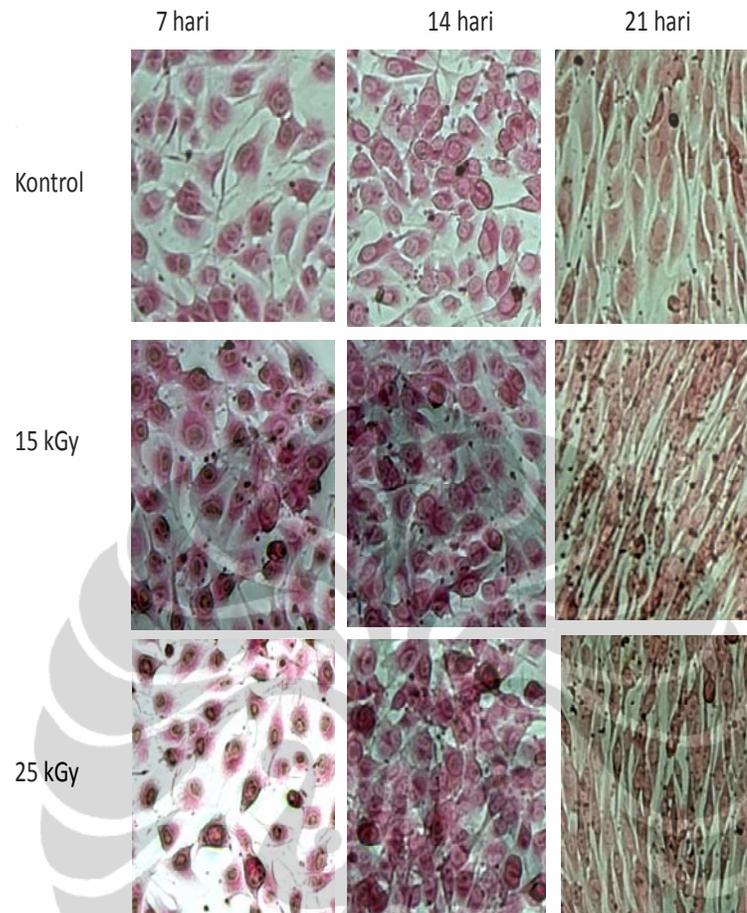
Rerata hasil penghitungan deposisi kalsium pada hari ke-7 pada kelompok DFDB 15 kGy adalah  $388,6 \pm 92,87$  dan pada kelompok DFDB 25 kGy adalah  $348,6 \pm 136,92$ . Pada hari ke-14 kelompok 15 kGy  $849,2 \pm 78,35$  dan kelompok 25 kGy  $735 \pm 78,35$ . Pada hari ke-21 kelompok 15 kGy  $1267,4 \pm 174,87$  dan kelompok 25 kGy  $1169,4 \pm 196,3$  terlihat pada grafik 5.3.



Grafik 5.3 Grafik sebaran jumlah deposisi ion kalsium menurut jenis perlakuan dan waktu

Secara statistik hasil penghitungan deposisi ion kalsium pada biakan sel osteoblas manusia dengan uji Mann Whitney-U dan Wilcoxon W antara kelompok perlakuan 15 kGy pada hari ke-7 tidak terdapat perbedaan bermakna dibandingkan dengan DFDB 25 kGy. Pada hari ke -14 juga terlihat tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan 15 kGy dibandingkan dengan 25 kGy. Begitu juga pada hari ke-21 tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok perlakuan 15 kGy dibandingkan dengan 25 kGy.

Deposisi ion kalsium pada sel osteoblas manusia setelah dilakukan transplantasi dengan DFDB 15 kGy dan 25 kGy dapat dibandingkan menurut waktu sebagaimana terlihat pada gambar 5.1 berikut:



Gambar 5.1 Deposisi kalsium pada sel osteoblas menurut perlakuan dan waktu

Perbandingan deposisi kalsium pada masing-masing perlakuan, kelompok 15 kGy dan 25 kGy dan kelompok kontrol pada hari ke-7, 14, dan 21 memperlihatkan bahwa kedua kelompok perlakuan menunjukkan jumlah nodul yang lebih banyak daripada kelompok kontrol.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Osteoblas mempunyai peran yang sangat penting dalam proses regenerasi tulang sebagai sel spesifik sebagai pembentuk tulang. Osteoblas berperan besar dalam proses *remodelling* tulang, dengan cara memproduksi komponen matriks ekstraselular tulang seperti kolagen, protein non-kolagen dan proteoglikans.<sup>1-3,24,41</sup>

Penelitian ini menganalisis proses regenerasi tulang melalui penghitungan indeks proliferasi osteoblas, ekspresi enzim fosfatase alkali sebagai dan deposisi ion kalsium sebagai hasil dari mineralisasi osteoblas.<sup>6,41</sup>

#### 6.1 Proliferasi Sel Osteoblas

Proliferasi sel osteoblas dihitung menggunakan test MTT assay 24 jam setelah transplantasi dengan allograft produksi Batan. Proliferasi osteoblas dianalisa dari angka mean Optical Density(OD) yang ditunjukkan oleh *microplate reader*. Optical Density merupakan kemampuan cahaya untuk melewati kultur osteoblas. Besarnya angka OD berarti banyaknya jumlah sel yang dilewati oleh cahaya.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa indeks proliferasi sel osteoblas sudah dapat dihitung 24 jam setelah transplantasi dengan DFDB, sesuai dengan hasil penelitian terdahulu oleh Corputty (2009) dan selaras dengan laporan studi Li dkk (2008).<sup>42</sup> Dalam penelitiannya, Corputty (2009) melaporkan bahwa pemakaian DFDB produksi BATAN meningkatkan proliferasi sel osteoblas dalam 24 jam setelah transplantasi serta meningkatkan diferensiasi sel osteoblas.<sup>2</sup>

Proliferasi sel osteoblas ketiga kelompok perlakuan dengan nilai rerata DFDB 15 kGy  $1,18 \pm 0,17$ ; DFDB 25 kGy  $2,2 \pm 0,28$  dan kontrol  $0,89 \pm 0,17$ . Menunjukkan bahwa transplantasi dengan DFDB meningkatkan proliferasi osteoblas 24 jam setelah perlakuan, baik transplantasi DFDB yang disterilisasi dengan dosis akhir 15 kGy maupun 25 kGy karena kedua kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang lebih besar dari kelompok kontrol.

Makin tinggi angka OD yang dikeluarkan pada microplate reader, berarti makin banyak jumlah sel yang terdapat dalam kultur dan besar angka mean OD berkaitan dengan viabilitas osteoblas, yakni makin tinggi angka mean OD makin besar viabilitas osteoblas.

Viabilitas osteoblas merupakan kemampuan sel osteoblas untuk dapat hidup. Prosentase viabilitas osteoblas kelompok perlakuan diperoleh dengan membandingkan angka mean OD masing-masing kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Viabilitas kelompok osteoblas dengan DFDB 15 kGy adalah 132.7 % dan kelompok osteoblas dengan DFDB 25 kGy adalah 122.5 %. Angka ini menunjukkan viabilitas osteoblas kelompok DFDB 15 kGy mempunyai angka yang lebih tinggi dari kelompok osteoblas dengan DFDB 25 kGy.

Dibandingkan antara kedua kelompok perlakuan, memperlihatkan kelompok 15 kGy memberikan hasil lebih tinggi daripada kelompok 25 kGy. Hal ini memenuhi asumsi bahwa dosis radiasi yang lebih rendah memberikan hasil proliferasi osteoblas yang lebih baik, karena kerusakan fisik bahan allograf yang terjadi lebih kecil dari pada allograf dengan dosis radiasi yang lebih tinggi.

Corputty (2009) melaporkan bahwa DFDB yang mendapatkan dosis akhir sterilisasi 25 kGy meningkatkan proliferasi sel osteoblas 24 jam setelah transplantasi, hasil penelitian ini membuktikan bahwa DFDB yang mendapatkan dosis akhir penyinaran 15 kGy juga mampu meningkatkan indeks proliferasi osteoblas. Hal ini juga sesuai dengan laporan Leung dkk yang memperlihatkan proliferasi osteoblas sudah terjadi satu hari setelah perlakuan.<sup>40</sup> Dengan demikian maka hipotesis pertama penelitian ini sudah terbukti.

## **6.2 Ekspresi Fosfatase Alkali**

Ekspresi enzim fosfatase alkali telah dilaporkan sebagai penanda awal terjadinya proses diferensiasi osteoblas dalam proses penyembuhan tulang. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada hari ke-7 ekspresi fosfatase alkali kelompok osteoblas dengan transplantasi DFDB 15 kGy lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok transplantasi DFDB 25 kGy. Pada hari ke-14 ekspresi fosfatase alkali meningkat dengan kelompok DFDB 25 kGy lebih tinggi dari kelompok 15 kGy. Hari ke-21 terjadi penurunan ekspresi fosfatase alkali pada

kedua kelompok dimana kelompok DFDB 15 kGy lebih tinggi dari kelompok DFDB 25 kGy.

Hal ini sesuai dengan ekspresi fosfatase alkali pada penelitian terdahulu oleh Corputty (2009) dimana ekspresi fosfatase alkali meningkat pada hari ke 14 kemudian menurun pada hari ke 21.<sup>2</sup> Hasil penemuan ini juga sesuai dengan penelitian Li dkk.<sup>42</sup> yang memperlihatkan bahwa ekspresi fosfatase alkali sebagai penanda awal proses regenerasi tulang secara in-vitro puncaknya terjadi pada hari ke 14. Zhang dkk,<sup>43</sup> dan Han dkk<sup>44</sup> menggunakan ekspresi fosfatase alkali sebagai suatu cara melakukan penghitungan kuantitatif untuk menentukan potensi osteoinduksi dari DFDB.

Hasil penelitian ini juga sesuai laporan Shen dkk.<sup>32</sup> yang menginduksikan BMP-7 untuk mengevaluasi diferensiasi sel osteoblas dengan melihat ekspresi fosfatase alkali pada hari 14 dan ke-21, hasilnya menunjukkan ekspresi fosfatase alkali terlihat meningkat hari ke-14 kemudian menurun pada hari ke 21.<sup>2,32</sup> Hasil penelitian ini juga membuktikan aplikasi DFDB dengan dosis akhir sterilisasi 15 kGy juga mampu meningkatkan diferensiasi sel osteoblas, yang dapat ditunjukkan dengan meningkatnya ekspresi fosfatase alkali, sesuai dengan penelitian Leung dkk,<sup>40</sup> Zhang dkk.,<sup>43</sup> Hasil ini membuktikan bahwa hipotesis kedua telah terbukti.

### **6.3 Deposisi Ion Kalsium**

Deposisi ion kalsium dihitung dari jumlah nodul pada tiap sel dari satu lapangan pandang yang mewakili dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 10 kali. Nodul memperlihatkan zat warna yang diserap oleh ion kalsium. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa deposisi ion kalsium pada biakan osteoblas yang ditransplantasi DFDB yang mendapat dosis akhir sterilisasi 15 kGy sudah ditemukan pada hari ke-7, dan meningkat terus sampai hari ke-21. Hal yang sama juga pada biakan osteoblas yang ditransplantasi DFDB yang mendapat dosis akhir sterilisasi 25 kGy. Deposisi kalsium merupakan hasil mineralisasi dari sel tulang. Penemuan ini juga sesuai dengan hasil penelitian Corputty, Carnes dkk<sup>14</sup> dan Shen dkk,<sup>32</sup> yang memperlihatkan bahwa deposit ion kalsium pada kultur sel osteoblas mencapai puncaknya pada hari ke-21.

Secara deskriptif pada boxplot statistik (lampiran 16), hasil perhitungan deposit ion kalsium pada kedua kelompok pada hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-

21 biakan sel osteoblas yang ditransplantasi dengan DFDB 15 kGy dan DFDB 25 kGy tidak memperlihatkan perbedaan bermakna dan tampak produksi kalsium pada kelompok dengan transplantasi 15 kGy lebih tinggi dari kelompok allograft 25 kGy. Hal ini membuktikan bahwa dosis radiasi yang lebih rendah akan memberikan mutu bahan allograft yang lebih baik karena lebih meningkatkan proses mineralisasi sel osteoblas.

Begitu juga dengan analisa statistik deposisi ion kalsium kedua kelompok perlakuan pada hari ke-7, ke-14 dan ke-21 dengan hasil tidak terdapat perbedaan bermakna antara kedua kelompok dengan  $p > 0,05$ . Dengan demikian penelitian ini membuktikan bahwa allograft 15 kGy mempunyai kemampuan dalam meningkatkan proses mineralisasi sel osteoblas dan membuktikan bahwa sterilisasi akhir 15 kGy dapat diterima sebagai dosis sterilisasi akhir untuk bahan allograft Batan. Dengan demikian hipotesis ketiga pada penelitian ini sudah terbukti.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Bahan tandur tulang dengan dosis sterilisasi akhir 15 kGy mampu meningkatkan proliferasi osteoblas 24 jam setelah transplantasi.
2. Bahan tandur tulang dengan dosis sterilisasi akhir 15 kGy mempunyai kemampuan meningkatkan deferensiasi dan mineralisasi sel osteoblas.
3. Dosis 15 kGy dapat diterima sebagai dosis akhir sterilisasi bahan tandur tulang dilihat dari segi kemampuan biologis dalam proses regenerasi tulang.

#### 7.2 Saran

1. Untuk membuktikan keamanan dosis akhir sterilisasi 15 kGy untuk bahan tandur tulang (Batan, Jakarta, Indonesia) perlu dilakukan uji sterilitas agar dapat ditentukan keamanan bahan.
2. Perlu dilakukan uji *in vivo* agar dapat dilihat efektifitas bahan tandur tulang dengan dosis akhir sterilisasi 15 kGy (Batan, Jakarta, Indonesia) untuk melihat efek histologi dan penghitungan histomorfometri.

## Daftar Pustaka

1. Nather A NY, N Hilmy. Allograft procurement, processing and transplantation, a comprehensive guide for tissue banks. New Jersey: World Scientific; 2010.
2. Corputty JEM. Perilaku sel osteoblas manusia (in-vitro) dalam proses regenerasi tulang terhadap transplantasi Demineralized Freese-dried Bone (DFDB) untuk preservasi tulang alveolar (upaya untuk meningkatkan kualitas maupun kuantitas tulang alveolar dalam pencabutan gigi). Jakarta: Universitas Indonesia; 2009.
3. Nather A. Bone grafts and bone substitutes, basic science and clinical applications. New Jersey: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.; 2005.
4. Lynch SE GR, Marx RE. Tissue engineering, application in maxillofacial surgery and periodontics. Illinois: Quintessence Publishing Co.Inc; 1999.
5. Julia V. Pengaruh pemberian coral goniopora Sp terhadap aktivitas sel osteoblas (cell line human osteoblast MG 63) dalam medium L-mem) penelitian laboratorium invitro. Jakarta: Universitas Indonesia; 2007.
6. IAEA. Radiation biology: a handbook for teachers and students. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2010.
7. International Standars I-. Sterilization of medical devices – microbiological methods – part 1 : estimation of population of microorganisms on products. 1995;12-4.
8. Balsly CR CA, Williams LA, Gaskins BD, Moore MA, Wolfenbarger L Jr. Effect of low dose and moderate dose gamma irradiation on the mechanical properties of bone and soft tissue allografts. Cell Tissue Banking. 2008;9:289-98.
9. Nguyen H MD, Sly LI, Benkovich M, Cull S, Forwood MR. Validation of 15 kGy as a radiation sterilisation dose for bone allografts manufactured at the Queensland Bone Bank: application of the VDmax 15 method. Cell Tissue Banking. 2008;9:139-47.

10. Nguyen H MD, Forwood MR. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell tissue bank*. 2007;8(2):93-105.
11. Christenson R. Biochemical markers of bone metabolism: an overview USA. *Clinical Biochemistry* 1997;30:573-93.
12. Lopez J, Canhao H, Fonseca J. Osteoblasts and bone formation. *Orgao Oficial da Sociedade Portuguesa de Reumatologia- Act Reum Port*. 2007;32:103-10.
13. Hadjidakis D, Andraulakis I. Bone Remodelling. *New York Academy of Sciences*. 2006;1092:385-96.
14. Carnes DL J, Fontaine JDL, Cochran D, Mellonig J, Keogh B, Harris S. Evaluation of 2 novel approaches for assessing the ability of Demineralized Freeze-dried Bone allotandur to induce new bone formation. *J Periodontol*. 1999;70:353-63.
15. Karp J, Dalton P, Schoichet M. Scaffold for tissue engineering. *MRS Bulletin*; 2003.
16. Committee on Research. Science and Therapy of the American Academy of Periodontology. Tissue Banking of Bone Allografts Used in Periodontal Regeneration. *JPeriodontal*. 2001;72:834-8.
17. Fonseca R. Oral and maxillofacial surgery. Philadelphia: Saunders Co.; 2000.
18. Eduardo A. Review of scaffolding in tissue engineerin, by Peter X. Ma abd Jennifer Elisseeff pubmed 2006;5:52.
19. Buser D, Dahlin C, Schenk R. Guided bone regeneration in implant dentistry. Chicago: Quintessence Publishing Co; 1994.
20. Gallie W. The history of a bone graft. *J Bone Joint Surg Am*. 2010;12:201-12.
21. Yonchek J, J dKirk J. Effect of terminal gamma sterilization on osteoinductivity. Alachua: RTI Biologics. Inc; 2008.
22. Lee Y. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphatae sponges. *J Periodontal*. 2000 March;71(3):410-7.

23. EN ISO -. Sterilization of health care products – radiation – part 2 : establishing the sterilization dose (ISO 11137-2:2006). Brussel: CEN; 2006.
24. Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblast and bone formation. *ACTA REUM PORT* 2007;32:103-10.
25. Nather A, Yusof N, Hilmy N. Radiation in tissue banking, basic science and clinical applications of irradiated tissue allografts. New Jersey: World Scientific; 2007.
26. Bilezikian J, Raisz, LG, Rodan GA. Principles of bone biology. San Diego: Academic Press; 1996.
27. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 473. Elsevier Inc. 2008:201-9.
28. Sommerfeldt D, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 2001;10:S86-S95.
29. Macdonal B, Gowen M. The cell biology of bone. *Bailliere Clinical Rheumatology.* 1993;7(3):421-43.
30. Sims N, Gooi J. Bone remodelling: amultiple cellular interactions required for coupling of bone formataion and resorption. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2008;19(5):444-51.
31. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455-98.
32. Shen B, Bhargav D, Wei A, Williams L, Tao H, Ma D, et al. BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation *Int J Biol Sci.* 2009;5(2):192-200.
33. The bone remodelling cycle,  
[www.roche.com/pages/facets/11/os...defe.htm](http://www.roche.com/pages/facets/11/os...defe.htm). [cited]; Available from.
34. Pagani F, Francucci C, Moro L. Markers of bone turnover : biochemical and clinical perspectives. *J Endocrinology Invest* 28 Suppl To. 2005;10:8-13.
35. Sara F, Saygılı F. Causes of high bone alkaline phosphatase *BIOTECHNOL & BIOTECHNOL EQ* 2007;21(2):197-.

36. Miao D, Scutt A. Histochemical localization of alkaline phosphatase activity in decalcified bone and cartilage. 2002;Vol 50:333-340. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2002;50:333-40.
37. Cang X, Hou Z, Yasuaki S, Tomoo T, Akira Y. Quantitative study of alkaline phosphatase and osteocalcin in the process of new bone *Pub Med*. 2005 Oktober;23(5):424-6.
38. Fishman W. Alkaline phosphatase isoenzymes: recent progress. *Clinical Canada: Biochemistry*. 1990 April;23:99-104.
39. Corathers S. Focus on Diagnosis : the alkaline phosphatase level: nuances of a familiar test. *Pediatrics in Review*. 2006;27:382-4.
40. Leung KS, Fung KP, Sher AHL, Li CK, Lee KM. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 1993 Maret;75:B2.
41. Zarb G. *Osseointegration, On contonuing synergies in surgery, prosthodontics, biomaterials*. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc; 2008.
42. Li H, Zhai W, Chang J. In vitro biocompatibility assessment of PHBV/Wollastonite composites. *J Mater Sci: Mater Med*. 2008;19:67-73.
43. Zhang M, RM Powers J, L Wolfinbarger J. A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bone matrix. *J Periodontol*. 1997;68:1076-84.
44. Han B, Tang B, Nimni M. Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. *J Orthopaedic Research*. 2003;21:648-54.

## Lampiran 1 : Surat Keterangan Lolos Etik



### UNIVERSITAS INDONESIA FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

JLN. SALEMBA RAYA NO. 4 JAKARTA PUSAT 10430  
TELP. (62-21) 31930270, 3151035  
FAX. (62-21) 31931412

#### SURAT KETERANGAN LOLOS ETIK

Nomor: 35/Ethical Clearance/FKGUI/VII/2011

Setelah membaca dan mempelajari/mengkaji usulan penelitian yang tersebut di bawah ini:

Judul : "Efektifitas Bahan Allograft dengan Sterilisasi 15 kGy terhadap Proses Regenerasi Tulang"

Nama Peneliti : Linda Ermiza 140303608

Sesuai dengan keputusan Anggota Komisi Etik, maka dengan ini Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia menerangkan bahwa penelitian tersebut dinyatakan lolos etik.

Mengetahui:  
Dekan FKGUI,

  
Prof. drg. Bambang Irawan, PhD.  
NIP. 195306151980031005

Jakarta, 11 November 2011  
Ketua Komisi Etik Penelitian FKGUI,

  
drg. Anton Rahardjo, MKM, PhD  
NIP. 195406021983031002

**Lampiran 2.**

**Tabel sebaran indeks proliferasi sel osteoblas menurut jenis perlakuan 24jam setelah transplantasi DFDB 15 kGy dan DFDB 25 kGy**

Kelompok	1	2	3	4	5	Mean	SD
Kontrol	0.859	0.843	0.675	0.856	0.804	0.8921	0,171492
	0.639	1.134	1.105	1.082	0.924		
15 kGy	1.287	1.251	1.299	1.309	0.878	1.1835	0,168325
	0.888	1.288	1.226	1.295	0.114		
25 kGy	1.088	0.833	1.282	1.154	0.82	1.092	0,182937
	0.937	1.328	1.043	1.174	1.269		



### Lampiran 3

#### Uji statistik Deskriptif Viabilitas Osteoblas 24 jam setelah transplantasi DFDB 15 kGy dan DFDB 25 kGy

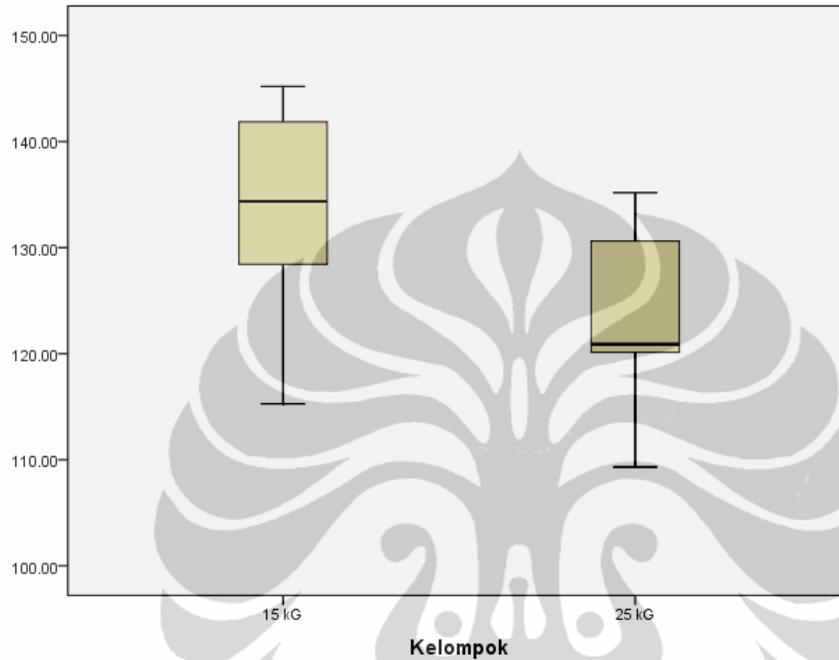
Descriptives			Statistic	Std. Error	
Kelompok					
Viabilitas	15 kG	Mean	133.0235	5.31002	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	118.2805	
			Upper Bound	147.7665	
		5% Trimmed Mean	133.3333		
		Median	134.3653		
		Variance	140.982		
		Std. Deviation	11.87357		
		Minimum	115.28		
		Maximum	145.19		
		Range	29.92		
		Interquartile Range	21.67		
		Skewness	-.795	.913	
		Kurtosis	.027	2.000	
		25 kG	25 kG	Mean	123.2240
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			110.7091	
	Upper Bound			135.7389	
5% Trimmed Mean	123.3329				
Median	120.8912				
Variance	101.588				
Std. Deviation	10.07910				
Minimum	109.31				
Maximum	135.18				
Range	25.87				
Interquartile Range	18.18				
Skewness	-.254			.913	
Kurtosis	-.605			2.000	

**Lampiran 4****Tabel test statistik viabilitas osteoblas antara kelompok DFDB 15 kGy dan kelompok DFDB 25 kGy**

	Viabilitas
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	22.000
Z	-1.149
Asymp. Sig. (2-tailed)	.251
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 <sup>a</sup>

**Lampiran 5**

**Boxplot viabilitas osteoblas manusia 24 jam setelah transplantasi antara DFDB 15 kGy dibandingkan dengan kelompok DFDB 25 kGy**



### Lampiran 6

Tabel ekspresi fosfatase alkali menurut perlakuan dan waktu

Perlakuan	1	2	3	4	5	Mean OD	SD
Kontrol 7 hari	0,637	0,616	0,616	0,775	0,758	0,6804	0,079292
15 kGy 7 hari	0,608	0,608	0,597	0,542	0,534	0,5778	0,036718
25 kGy 7 hari	0,57	0,555	0,548	0,503	0,503	0,5358	0,030979
Kontrol 14 hari	0,586	0,578	0,573	0,545	0,565	0,5694	0,01563
15 kGy 14 hari	0,623	0,612	0,592	0,615	0,604	0,6092	0,011777
25 kGy 14 hari	0,665	0,652	0,629	0,641	0,618	0,641	0,018507
Kontrol 21 hari	0,558	0,548	0,544	0,676	0,655	0,5962	0,0639
15 kGy 21 hari	0,54	0,522	0,525	0,467	0,438	0,4984	0,043673
25 kGy 21 hari	0,487	0,454	0,458	0,441	0,401	0,4482	0,031284

### Lampiran 7

#### Uji statistik deskriptif fosfatase alkali antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 7 hari

Kelompok			Statistic	Std. Error
Fosfatase alkali 7 hari	15 kG	Mean	.577800	.0164207
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	.532209	
		Upper Bound	.623391	
		5% Trimmed Mean	.578556	
		Median	.597000	
		Variance	.001	
		Std. Deviation	.0367178	
		Minimum	.5340	
		Maximum	.6080	
		Range	.0740	
		Interquartile Range	.0700	
		Skewness	-.570	.913
		Kurtosis	-3.102	2.000
25 kG		Mean	.535800	.0138542
		95% Confidence Interval for Mean		
		Lower Bound	.497334	
		Upper Bound	.574266	
		5% Trimmed Mean	.535722	
		Median	.548000	
		Variance	.001	
		Std. Deviation	.0309790	
		Minimum	.5030	
		Maximum	.5700	
		Range	.0670	
		Interquartile Range	.0595	
		Skewness	-.304	.913
		Kurtosis	-2.787	2.000

## Lampiran 8

### Uji statistik deskriptif fosfatase alkali antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 14 hari

Fosfatase alkali 14 hari	15 kG	Mean		.609200	.0052669		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.594577			
			Upper Bound	.623823			
		5% Trimmed Mean		.609389			
		Median		.612000			
		Variance		.000			
		Std. Deviation		.0117771			
		Minimum		.5920			
		Maximum		.6230			
		Range		.0310			
		Interquartile Range		.0210			
		Skewness		-.608	.913		
		Kurtosis		.168	2.000		
		25 kG	25 kG	Mean		.641000	.0082765
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.618021	
Upper Bound	.663979						
5% Trimmed Mean				.640944			
Median				.641000			
Variance				.000			
Std. Deviation				.0185068			
Minimum				.6180			
Maximum				.6650			
Range				.0470			
Interquartile Range				.0350			
Skewness				.083	.913		
Kurtosis				-1.106	2.000		

### Lampiran 9

#### Uji statistik deskriptif fosfatase alkali antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 21 hari

Fosfatase Alkali 21 hari	15 kG	Mean	.498400	.0195310			
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.444173			
			Upper Bound	.552627			
		5% Trimmed Mean	.499444				
		Median	.522000				
		Variance	.002				
		Std. Deviation	.0436726				
		Minimum	.4380				
		Maximum	.5400				
		Range	.1020				
		Interquartile Range	.0800				
		Skewness	-.737	.913			
		Kurtosis	-1.785	2.000			
		25 kG	25 kG	Mean	.448200	.0139907	
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	.409356	
					Upper Bound	.487044	
5% Trimmed Mean	.448667						
Median	.454000						
Variance	.001						
Std. Deviation	.0312842						
Minimum	.4010						
Maximum	.4870						
Range	.0860						
Interquartile Range	.0515						
Skewness	-.626			.913			
Kurtosis	1.452			2.000			

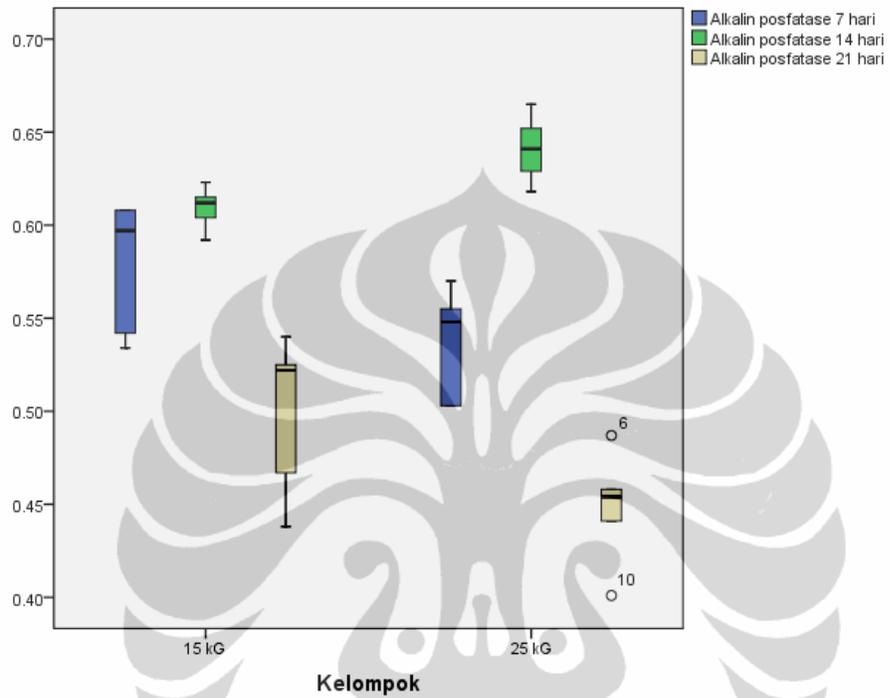
### Lampiran 10

**Tabel test statistik fosfatase alkali antara kelompok DFDB 15 kGy dan kelompok 25 kGy**

	Fosfatase alkali 7 hari	Fosfatase alkali 14 hari	Fosfatase alkali 21 hari
Mann-Whitney U	6.000	1.000	5.000
Wilcoxon W	21.000	16.000	20.000
Z	-1.366	-2.402	-1.567
Asymp. Sig. (2-tailed)	.172	.016	.117
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.222 <sup>a</sup>	.016 <sup>a</sup>	.151 <sup>a</sup>

## Lampiran 11

### Boxplot fosfatase alkali menurut perlakuan dan waktu



## Lampiran 12

**Tabel deposisi ion kalsium menurut perlakuan dan waktu**

<b>Kelompok</b>	<b>7 hari</b>	<b>14 hari</b>	<b>21 hari</b>
<b>15 kGy</b>	291.0	1033.0	1295.0
	427.0	707.0	1015.0
	328.0	698.0	1495.0
	369.0	860.0	1321.0
	528.0	948.0	1211.0
<b>25 kGy</b>	213.0	813.0	1136.0
	232.0	777.0	1022.0
	334.0	663.0	977.0
	542.0	639.0	1245.0
	422.0	783.0	1467.0

### Lampiran 13

#### Uji statistik deskriptif deposisi ion kalsium antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 7 hari

Kelompok			Statistic	Std. Error
Kalsium 7 hari	15 kG	Mean	388.6000	41.52662
		95% Confidence Interval for Lower Bound	273.3036	
		Mean		
		Upper Bound	503.8964	
		5% Trimmed Mean	386.2778	
		Median	369.0000	
		Variance	8622.300	
		Std. Deviation	92.85634	
		Minimum	291.00	
		Maximum	528.00	
		Range	237.00	
		Interquartile Range	168.00	
		Skewness	.836	.913
		Kurtosis	.141	2.000
			25 kG	Mean
95% Confidence Interval for Lower Bound	178.5927			
Mean				
Upper Bound	518.6073			
5% Trimmed Mean	345.3889			
Median	334.0000			
Variance	18746.800			
Std. Deviation	136.91895			
Minimum	213.00			
Maximum	542.00			
Range	329.00			
Interquartile Range	259.50			
Skewness	.576			.913
Kurtosis	-1.061			2.000

### Lampiran 14

#### Uji statistik deskriptif deposisi ion kalsium antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 14 hari

Kalsium 14 hari	15 kG	Mean	849.2000	65.85697		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	666.3517		
			Upper Bound	1032.0483		
		5% Trimmed Mean	847.3889			
		Median	860.0000			
		Variance	21685.700			
		Std. Deviation	147.26065			
		Minimum	698.00			
		Maximum	1033.00			
		Range	335.00			
		Interquartile Range	288.00			
		Skewness	.110	.913		
		Kurtosis	-2.237	2.000		
		25 kG	25 kG	Mean	735.0000	35.03712
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	637.7214
Upper Bound	832.2786					
5% Trimmed Mean	736.0000					
Median	777.0000					
Variance	6138.000					
Std. Deviation	78.34539					
Minimum	639.00					
Maximum	813.00					
Range	174.00					
Interquartile Range	147.00					
Skewness	-.519			.913		
Kurtosis	-2.783			2.000		

### Lampiran 15

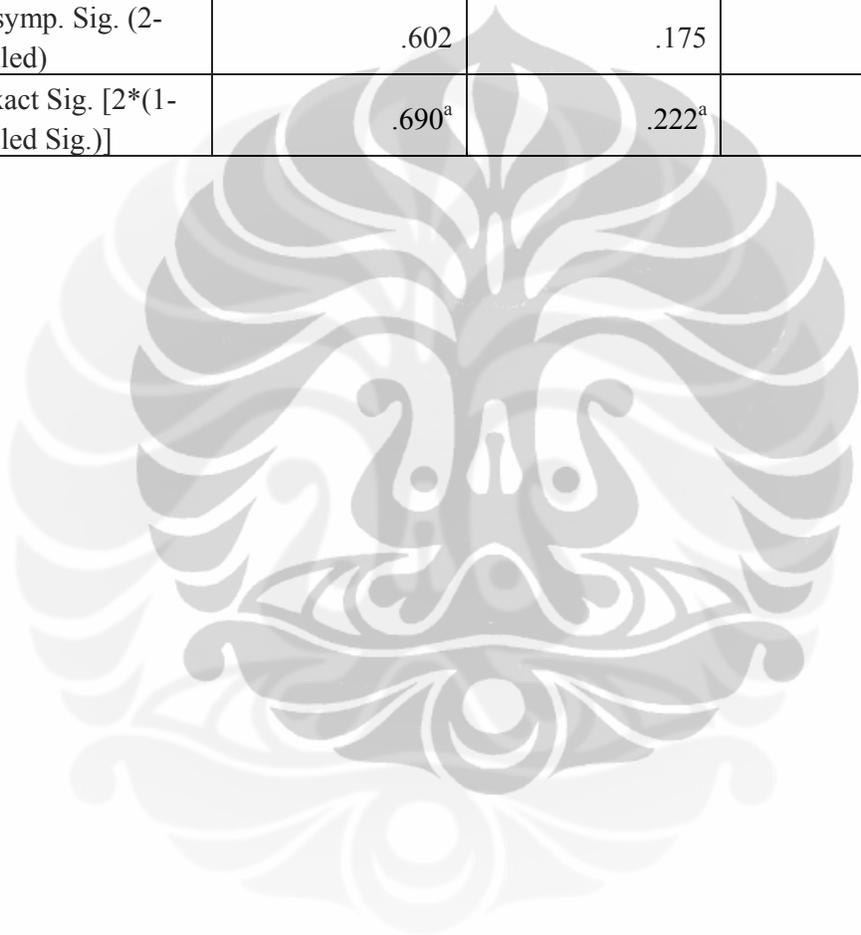
#### Uji statistik deskriptif deposisi ion kalsium antara kelompok DFDB 15 kGy dan 25 kGy setelah 21 hari

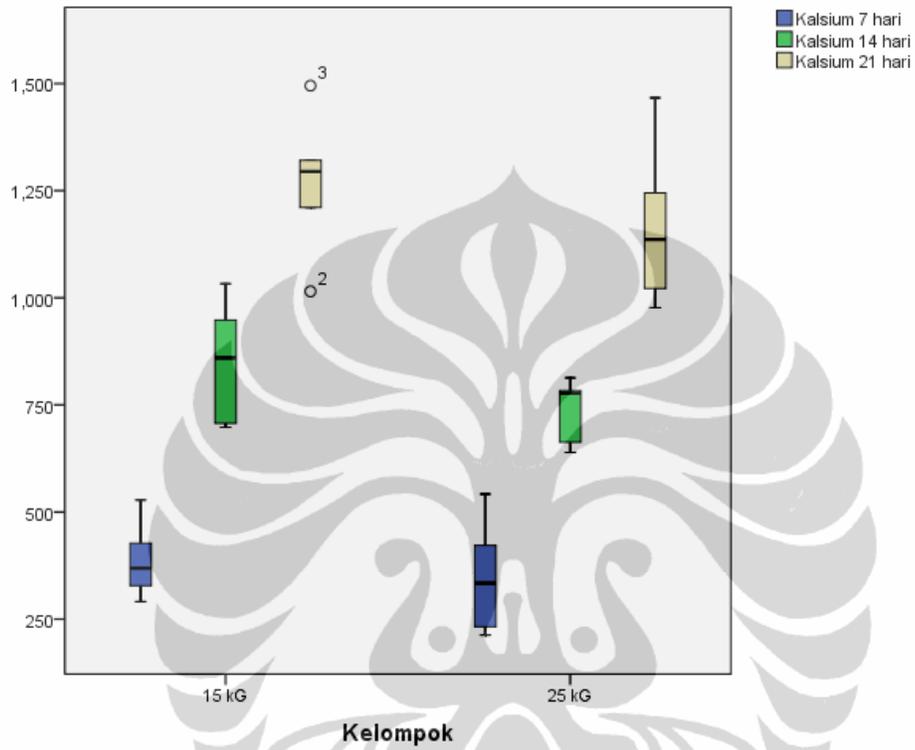
Kalsium 21 hari	15 kG	Mean	1267.4000	78.20588	
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	1050.2657	
			Upper Bound	1484.5343	
		5% Trimmed Mean	1268.7778		
		Median	1295.0000		
		Variance	30580.800		
		Std. Deviation	174.87367		
		Minimum	1015.00		
		Maximum	1495.00		
		Range	480.00		
		Interquartile Range	295.00		
		Skewness	-.335	.913	
		Kurtosis	1.037	2.000	
		25 kG	25 kG	Mean	1169.4000
95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound			925.6563	
	Upper Bound			1413.1437	
5% Trimmed Mean	1163.5556				
Median	1136.0000				
Variance	38535.300				
Std. Deviation	196.30410				
Minimum	977.00				
Maximum	1467.00				
Range	490.00				
Interquartile Range	356.50				
Skewness	.905			.913	
Kurtosis	.182			2.000	

### Lampiran 16

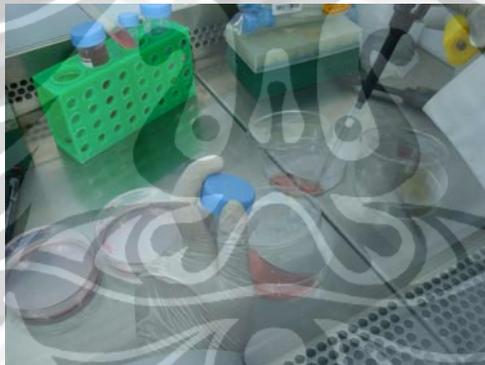
**Tabel test statistik deposisi ion kalsium antara kelompok DFDB 15 kGy dan kelompok DFDB 25 kGy**

	Kalsium 7 hari	Kalsium 14 hari	Kalsium 21 hari
Mann-Whitney U	10.000	6.000	8.000
Wilcoxon W	25.000	21.000	23.000
Z	-.522	-1.358	-.940
Asymp. Sig. (2-tailed)	.602	.175	.347
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 <sup>a</sup>	.222 <sup>a</sup>	.421 <sup>a</sup>



**Lampiran 17****Boxplot analisis kalsium menurut perlakuan dan waktu**

**Lampiran 18****Gambar bahan-bahan pembuatan medium biakan**

**Lampiran 19****Gambar pembuatan kultur osteoblas**

**Lampiran 20****Gambar transplantasi biakan osteoblas dengan allograft**

## Lampiran 21

Gambar disain pemeriksaan MTT, Pemberian larutan MTT dan Pembacaan MTT dengan *microplate reader*

