

Karakterisasi *Hydroxyapatite* Alami yang Dibuat dari Tulang Sapi dan Cangkang Telur sebagai Bahan untuk Donor Tulang (*Bone Graft*)

Ahmad Taufik, Arif Zuhan, Sigit Kusdaryono, Rohadi

Abstrak

Latar Belakang: Penanganan terhadap komplikasi trauma tulang seperti *delayed union*, *nonunion*, *malunion* dan keadaan hilangnya sebagian dari tulang (defek) masih menjadi masalah. Diperlukan donor tulang (*bone graft*) untuk mengisi defek atau kekosongan pada tulang yang hilang agar terjadi penyambungan.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakterisasi *hydroxyapatite* yang dibuat dari sumber alami yaitu dari tulang sapi dan cangkang telur sebagai bahan untuk cangkok tulang (*bone graft*) dalam tindakan kedokteran.

Metode: Tulang panjang sapi Bali dan sapi Brahman dipotong 5x5x5 mm untuk selanjutnya dikalsinasi pada suhu 800°C dan 1000°C. *Hydroxyapatite* yang dihasilkan diukur kadar kalsium dan fosfornya dengan metode spektrofotometer, kemudian dibandingkan dengan kadar kalsium dan fosfor pada tulang manusia.

Hasil Penelitian: *Hydroxyapatite* dihasilkan baik dari tulang sapi Bali atau sapi Brahman memiliki kadar kalsium rata-rata 28 – 35%, kadar fosfor rata-rata 12- 15%. Kadar kalsium dan fosfor lebih tinggi pada tulang kortikal dibandingkan trabekular. Dibandingkan dengan kadar kalsium dan fosfor pada tulang manusia tidak berbeda bermakna ($p < 0,005$). Kadar kalsium paling tinggi didapatkan pada cangkang telur (64%).

Pembahasan: Kadar kalsium dan fosfor baik pada tulang sapi Bali atau sapi Brahman mempunyai kadar yang hampir sama dengan manusia. Ini karena setiap tulang mamalia mempunyai komposisi mineral dan air yang sama.

Kesimpulan: *Hydroxyapatite* (HA) dari tulang sapi Bali, sapi Brahman dan cangkang telur mempunyai karakteristik yang hampir sama dengan tulang manusia dan bisa digunakan sebagai bahan untuk donor tulang.

Katakunci

hydroxyapatite, kadar kalsium, kadar fosfor

Fakultas Kedokteran Universitas Mataram

*e-mail: taufik.unram@gmail.com

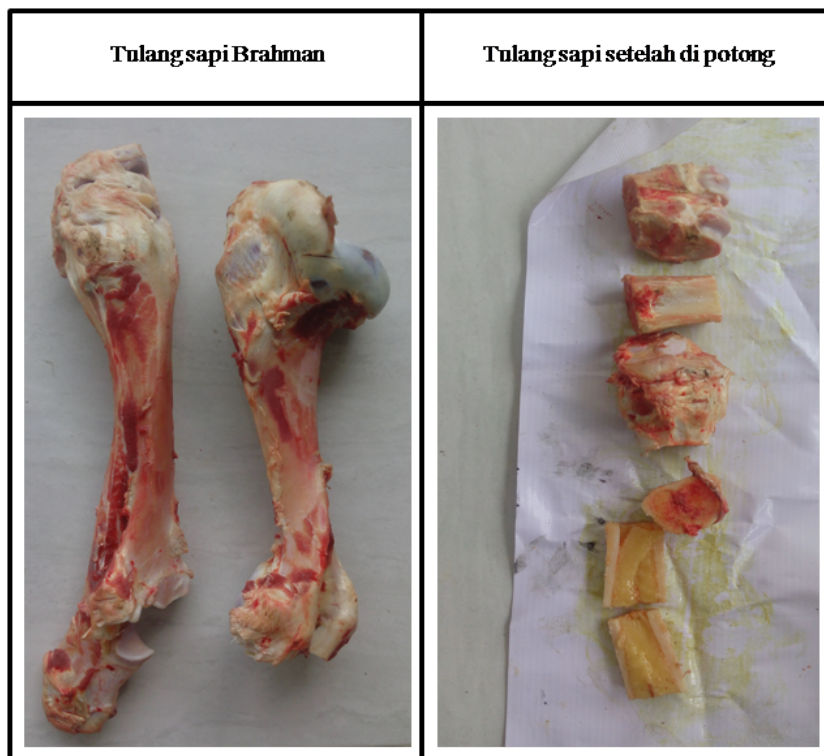
1. Pendahuluan

Penanganan terhadap kondisi tulang tertentu setelah trauma seperti *delayed union*, *nonunion*, *malunion* dan keadaan lain yang berkaitan dengan hilangnya sebagian dari tulang (defek) masih menimbulkan tantangan tersendiri. Pada umumnya penderita trauma adalah orang muda sehingga beban biaya yang dikeluarkan untuk kesehatan dan dampak sosial ekonominya menjadi tinggi. Walaupun mayoritas patah tulang dapat sembuh normal tetapi 5%-10% menyisakan masalah pada proses penyembuhannya. Kunci kesuksesan penyembuhan tulang adalah stabilitas biomekanik dan fungsi biologis dari tulang. Banyak kondisi yang dapat mengganggu proses penyembuhan seperti kondisi vaskularisasi yang kurang baik, infeksi, ketidakstabilan mekanik dan penyakit-penyakit sistemik.¹

Untuk mendapatkan stabilitas mekanik, pada seba-

gian besar kasus cukup dengan mengembalikan panjang tulang (*alignment*) dan fiksasi stabil pada tulang namun pada sebagian yang lain diperlukan donor tulang (*bone graft*) atau bahan pengganti donor tulang (*bone-graft substitutes*) untuk mengisi defek atau kekosongan pada tulang yang hilang.^{2,3} Pilihan lain dapat menggunakan teknik *bone callus distraction* atau yang lebih populer dengan istilah teknik Ilizarov.⁴

Permintaan donor tulang tampaknya akan semakin meningkat seiring dengan semakin luasnya indikasi penggunaannya. Donor tulang dapat mengurangi angka morbiditas pada pasien akibat *nonunion* dan *delayed union* dan menjadi salah satu alternatif pemecahan masalah yang berkaitan dengan defek tulang akibat trauma atau setelah reseksi tumor. Selain itu donor tulang dapat juga berperan dalam *arthrodesis* persendian sehingga pada keadaan hilangnya sebagian tulang tetapi jaringan ekstremitas dinilai masih hidup (*viabel*), tindakan amputasi dapat dihindari.⁵ Dengan demikian dapat me-



Gambar 1. Tulang sapi Bali dan sapi Brahman

nurunkan angka kecacatan yang akan berdampak pada nilai produktivitas ekonomi. Peningkatan permintaan terhadap donor tulang dapat dilihat di USA, tahun 1994 lebih dari 5.000 kemudian pada tahun 2001 prosedur ini meningkat sampai kira-kira 22.000. Perkiraan biaya yang dikeluarkan untuk prosedur ini sampai tahun 2002 diperkirakan telah mencapai lebih dari 600 juta dolar⁶ (AAOS, 2003). Di RSUD dr. Soetomo sendiri tercatat perkembangan produksi *allograft* tulang beku kering (*freeze dried*) menunjukkan peningkatan dari tahun ke tahun. Pada tahun 2001 telah diproduksi sebanyak 148 sediaan dari beberapa jenis jaringan dan pada tahun 2006 mencapai jumlah 199 sediaan.⁷

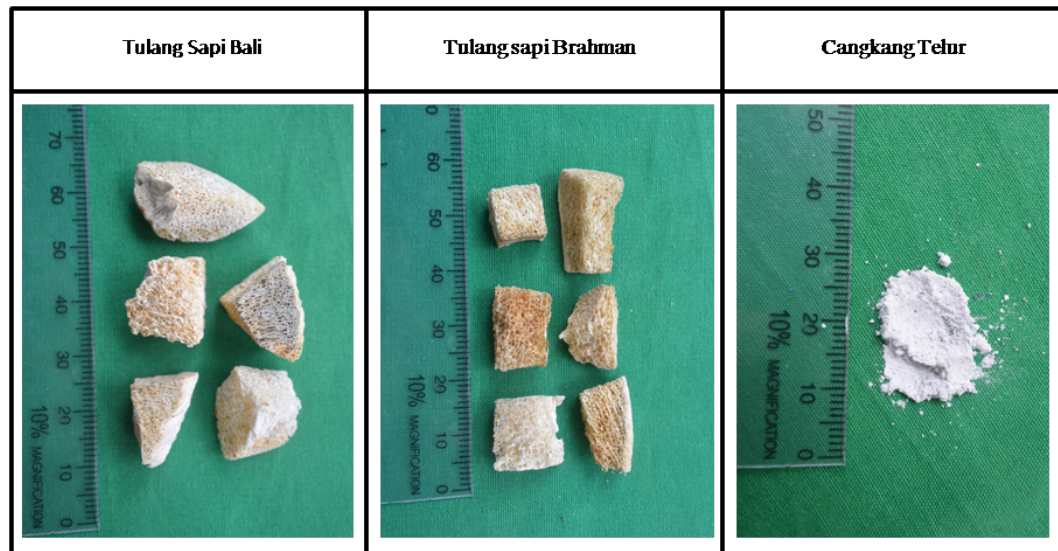
Ada banyak pilihan donor tulang yang dapat digunakan antara lain autograft trabekular atau kortikal dan allograft beku kering (*freeze-dried*) dari tulang kadever. *Autograft* trabekular memenuhi semua persyaratan donor tulang yaitu osteokonduktif, osteoinduktif dan osteogenesis namun mengingat keterbatasan kekuatan struktural dan kemampuan untuk mempertahankan fiksasinya. *Autograft* kortikal sebaliknya dapat memberikan integritas struktural tetapi kemampuan penyatuan (*incorporation*) lebih lambat dibandingkan dengan tulang trabekular. *Allograft* beku kering (*freeze dried*) memberikan kemudahan penggunaannya, mudah didapat dan memberikan jumlah yang lebih besar tetapi masih mempunyai risiko terjadinya transmisi penyakit dan reaksi hipersensitivitas. Oleh karena itu penggunaan autograft kortikotrabeular dari tulang krista iliaka masih merupakan standar emas. Namun demikian sebuah penelitian meta-analisis menemukan 40% pasien setelah operasi masih mengeluh nyeri sampai 5 tahun sesudahnya. Un-

tuk alasan inilah muncul pengganti donor tulang (*bone graft substitutes*) untuk menambah maupun meningkatkan prosedur donor tulang.⁸ Donor tulang pengganti yang ideal diharapkan mempunyai kemampuan osteoinduksi dan osteokonduksi untuk regenerasi tulang tetapi tidak menimbulkan efek samping.⁹

Bahan pengganti donor tulang yang sudah dikenal dapat digolongkan menjadi tiga kelompok utama, yaitu *demineralized bone matrix (DBM)*, keramik dan material komposit.¹⁰ Salah satu alternatif donor tulang pengganti adalah menggunakan *allograft demineralized bone matrix (DBM)*. Teknik ini berdasarkan pada penemuan awal bahwa matrik organik tulang masih mengandung sejumlah protein yang mampu merangsang osteogenesis heterotopik dengan mekanisme osifikasi endokondral. Protein matrik ini disebut *Bone Morphogenetic Protein (BMPs)*. DBM juga dikatakan mempunyai risiko kecil untuk transmisi penyakit oleh karena mengalami pemrosesan lebih lanjut dari *allograft* beku kering.¹¹

Di masa mendatang tampaknya penggunaan donor tulang *demineralized bone matrix (DBM)* akan semakin populer dan terus berkembang. Hal ini karena kemampuannya membentuk tulang baru melalui dua mekanisme yaitu osteokonduksi dan osteoinduksi.³ Penggunaan bahan ini sebenarnya telah lama populer terutama di bidang maxillo-fasial. Namun demikian penggunaan di bidang ortopedi masih terbatas karena kemungkinan hasil yang diharapkan terlalu tinggi dan adanya metode alternatif yang lebih dulu populer seperti autograft dan perangsangan pertumbuhan tulang melalui teknik Ilizarov.¹²

Meskipun DBM telah secara luas diterima sebagai



Gambar 2. Tulang sapi setelah dilakukan proses kalsinasi

salah satu donor tulang pengganti di klinik, tetapi kemampuan induksinya masih dipertanyakan. Pada beberapa penelitian secara histologi menampakkan pembentukan tulang baru lebih disebabkan oleh proses osteokonduksi daripada osteinduksi. Regenerasi tulang terjadi oleh pertumbuhan sel-sel tulang dari inang dan DBM bertindak sebagai *scaffolding* daripada secara *de novo* merangsang diferensiasi sel-sel mesenkimal.¹³

Hydroxyapatite akan digunakan sebagai bahan untuk cangkok tulang (*Bone graft*) dalam tindakan kedokteran. Berdasarkan pada keadaan di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakterisasi *hydroxyapatite* yang dibuat dari sumber alami yaitu dari tulang sapi dan cangkang telur dibandingkan dengan *hydroxyapatite* dari tulang manusia (*human bone*) sebagai bahan untuk cangkok tulang (*Bone Graft*).

2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium karena semua kelompok mendapatkan perlakuan, dengan menggunakan rancangan penelitian cross-sectional. Penelitian ini menggunakan bahan tulang panjang sapi Bali, tulang Brahman dan cangkang telur. Tulang sapi dipotong dengan ukuran 5 x 5 x 5 mm selanjutnya dibuang semua protein yang menempel secara mekanik dan kimia dengan HCL dan NaOH. Potongan tulang tersebut selanjutnya dilakukan kalsinasi pada suhu 800 dan 1000°C. Hasil yang didapatkan berupa *Hydroxyapatite* dengan bentuk kubus dan warna putih. Pada penelitian ini diukur kadar kalsium (Ca) dan fosfor (P) yang terdapat pada *hydroxyapatite*. Kadar kalsium diukur dengan metode Spektrofotometri Serapan atom (SSA). Kalsium dan magnesium diukur dengan metode absorpsi. Kadar fosfat ditentukan dengan menggunakan pengekstrak HCl 25%. Pengekstrak ini akan melarutkan senyawa fosfat dan kalium mendekati kadar total ion P dan K. Ion fosfat dalam ekstrak akan bereaksi

menghasilkan larutan berwarna biru. Intensitas warna biru larutan dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 889 nm. Data penelitian ini akan ditampilkan dalam bentuk tabel dan grafik mengenai data karakteristik *hydroxyapatite* berupa rata-rata kadar kalsium dan fosfor dari tulang sapi dan cangkang telur.

3. Hasil

Pada penelitian ini bahan untuk pembuatan *hydroxyapatite* diambil dari tulang panjang (tulang paha) sapi Bali, sapi Brahman dan cangkang telur. Tulang sapi tersebut dibersihkan dari otot dan ligamen yang menempel secara mekanik dan secara kimia. Pembuangan protein yang tersisa yang menempel pada tulang menggunakan HCl 1 (N) (35%) selama 24 jam pada suhu 25°C. Tulang panjang selanjutnya dipotong-potong menjadi ukuran 1x1x1 cm, dicuci kembali dan dikeringkan pada suhu 50 - 60°C. Bahan yang diproses selanjutnya hanya bagian kortikotrabeular (campuran tulang trabekular dan tulang kortikal) yang terletak di dekat persendian.

Tulang panjang yang telah dipotong-potong dan kering selanjutnya dikalsinasi pada suhu 800°C dan 1000°C selama 3 jam dan dinginkan secara perlahan. Hasil terakhir didapatkan tulang berubah dari kecoklatan menjadi putih dan menjadi lebih ringan. Kandungan air pada tulang dihilangkan dengan proses kalsinasi ini. Tulang juga menjadi lebih rapuh dan mudah untuk dihancurkan. Untuk cangkang telur langsung diproses kalsinasi setelah dibersihkan dan dipecah-pecah ke ukuran 1x1 cm.

Karakterisasi *hydroxyapatite* bertujuan untuk mengetahui komposisi dan kadar yang terkandung pada tulang kortikotrabeular tersebut. Standar yang digunakan adalah komposisi dan kadar tulang manusia karena *hydroxyapatite* tersebut selanjutnya akan diaplikasikan pada tulang manusia. Terlihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 adalah kadar kalsium dan fosfor yang terdapat pada

Tabel 1. Kadar Kalsium dan Fosfor *Hydroxyapatite* Rata-rata pada Berbagai Sediaan pada Suhu 800°C

No	Jenis	Kadar kalsium (%)		Kadar fosfor (%)	
		Trabekular	Kortikal	Trabekular	Kortikal
1	Sapi Bali	28,72	31,32	12,35	14,10
2	Sapi Brahman	32,52	34,78	14,01	15,13
3	Cangkang telur	64,28	-	10,13	-

Tabel 2. Kadar Kalsium dan Fosfor *Hydroxyapatite* Rata-rata pada Berbagai Sediaan pada Suhu 1000°C

No	Jenis	Kadar kalsium (%)		Kadar fosfor (%)	
		Trabekular	Kortikal	Trabekular	Kortikal
1	Sapi Bali	32,52	36,33	14,75	15,32
2	Sapi Brahman	31,90	36,53	14,52	15,13

hydroxyapatite dari tulang sapi dan cangkang telur. Kadar kalsium paling tinggi didapatkan pada cangkang telur, sedangkan kadar fosfornya lebih rendah dibandingkan pada HA tulang sapi Bali dan sapi Brahman.

Pada tabel-tabel tersebut terlihat kadar kalsium dan fosfor pada tulang trabekular dan tulang kortikal tidak jauh berbeda, baik pada pemanasan 800°C atau 1000°C.

4. Pembahasan

Untuk cangkok tulang (*bone graft*) lebih dipilih *hydroxyapatite* yang dibuat dari kortikotrabeular karena beberapa kelebihan. Pertama, graft ini lebih mudah diaplikasikan karena strukturnya yang lebih lunak sehingga mudah dipotong dan diaplikasikan sesuai ukuran defek yang ada. Kedua, lebih mudah terjadi osteointegrasi dengan tulang tubuh dan lebih mudah bagi sitokin seperti BMP dan Interleukin untuk masuk ke dalam graft tersebut. Kelebihan ini tidak didapatkan pada tulang kortikal yang cenderung padat dan sulit untuk diaplikasikan sesuai ukuran defek. Tulang terdiri dari elemen organik dan inorganik, dimana 20% beratnya adalah air dan sisanya merupakan inorganik kalsium fosfat (65-70%) dan matrik organik protein dan kolagen (30-35%). Kandungan inorganik tulang utama adalah kalsium fosfat diikuti fosfat kalsium karbonat serta sedikit magnesium, fluorida, fosfor dan natrium. Tulang merupakan kerangka kolagen dimana mineral kalsium utamanya berupa *hydroxyapatite*.

Donor tulang beku kering yang tidak mengalami demineralisasi akan membentuk tulang baru secara osteokonduksi seperti pada donor tulang beku segar (*fresh frozen bone*). Secara teoritis seharusnya donor tulang demikian juga memiliki potensi osteoinduksi, oleh karena BMPs secara fisiologis akan dibuka oleh osteoklast. Tetapi hanya sedikit bukti histologis yang menunjukkan demikian. Penelitian lain menunjukkan bahwa donor tulang yang tidak mengalami demineralisasi hanya berfungsi sebagai *scaffolding* untuk membentuk tulang baru dengan cara osteokonduksi. Penelitian lainnya mengungkapkan bahwa mineralisasi mungkin dapat menghambat pembentukan tulang dengan cara mengganggu pelepasan BMPs.

Berdasarkan bentuk dan ukuran bahan donor dapat berupa serbuk tulang (*bone powder*) dengan ukuran

partikel 45-2500 μm ataupun balok kecil tulang (*bone chips*) dengan ukuran panjang 0,3-3 cm, tulang secara utuh maupun dekalsifikasi permukaan tulang saja. Tidak ada penelitian yang menunjukkan hasil yang sama antara ukuran partikel donor tulang dan potensi osteoinduksi dari DBM. Suatu penelitian menemukan semakin kecil ukuran partikel semakin berkurang kemampuan osteoinduksinya karena rentan terjadi fagositosis, sedangkan peneliti yang lain menemukan ukuran partikel tidak mempengaruhi kemampuan osteoinduksinya.^{14,15}

Potensi osteoinduksi dari berbagai macam jaringan tubuh yang didekalsifikasi ternyata berbeda. Bagian diafisis tulang (humerus, femur, tibia dan fibula), dentin dan plasenta menunjukkan kemampuan osteoinduksi yang tinggi sedangkan tulang dari kalvarium, skapula, pelvis dan kartilago menunjukkan osteoinduksi yang kurang bagus.¹⁶ Proses penyatuan donor tulang dengan resipiennya adalah serupa dengan proses penyembuhan tulang akibat fraktur pada tulang panjang. Penyembuhan fraktur mengembalikan jaringan seperti sifat-sifat fisik dan mekanik sebelumnya dimana faktor-faktor biokimia, mekanik, dan biofisikal terlihat dalam proses ini.

Penyatuan donor tulang dengan tulang sekitarnya juga melalui proses dimana tulang yang nekrosis perlahan diserap kemudian secara simultan diganti oleh tulang baru. Proses penyatuan ini disebut *creeping substitution*. Sel mesenkim primitif berdiferensiasi menjadi osteoblast yang memproduksi osteoid di tengah area nekrosis.

5. Kesimpulan

Hydroxyapatite (HA) dari tulang sapi Bali, sapi Brahman dan cangkang telur mempunyai karakteristik yang hampir sama dengan tulang manusia dari segi kadar kalsium dan fosfor dan bisa diaplikasikan pada defek tulang secara tepat. *Hydroxyapatite* dengan bahan dari tulang sapi dan cangkang telur bisa digunakan sebagai alternatif bahan untuk donor tulang yang lebih murah dan kemampuan yang sama.

Daftar Pustaka

1. Termaat M, Den Boer F, Bakker F, Patka P, Haarmann HTM. Bone morphogenetic proteins. J Bone

- Joint Surg Am. 2005;87(6):1367–1378.
2. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint surg am.* 2002;84(3):454–464.
 3. Altundal H, Sayrak H, Delilbaşı Ç. Effect of demineralized bone matrix on resorption of autogenous cortical bone graft in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences.* 2005;35(4):209–216.
 4. DeCoster TA, Gehlert RJ, Mikola EA, Pirela-Cruz MA. Management of posttraumatic segmental bone defects. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons.* 2004;12(1):28–38.
 5. Brown KL, Cruess RL. Bone and cartilage transplantation in orthopaedic surgery. A review. *JBJS.* 1982;64(2):270–279.
 6. American Academy of Orthopaedic S, et al. Bone graft substitutes: facts, fictions & applications. In: *American Academy of Orthopedic Surgeons 70th Annual Meeting*; 2003. p. 5–9.
 7. Laporan tahunan bank jaringan Rumah Sakit Dr Soetomo. Rumah Sakit Dr Soetomo Surabaya Jawa Timur Indonesia. 2006;.
 8. Malay D. Closer look at bone graft substitutes. *Podiatry Today (18).* 2005;18(1):28 – 34.
 9. Kay JF, Vaughan LM. Proportional Osteoinduction of Demineralized Bone Matrix Donor tulang Materials. *spartanmedspine.* 2007; Available from: <http://www.spartanmedspine.com/files/osteoinduction-100percent-human.pdf>.
 10. Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ, Menke DM, DeOrio JK. Imaging Characteristics of Bone Graft Materials 1. *Radiographics.* 2006;26(2):373–388.
 11. Society NAS. The Brochure for general information and understanding. North American spine society Public education series. 2006; Available from: www.spine.org.
 12. Delloye C. The use of freeze-dried mineralised and demineralised bone. In: *Advances in Tissue Banking.* World Scientific; 1999. p. 45–65.
 13. Groeneveld E, Burger E. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *European journal of endocrinology.* 2000;142(1):9–21.
 14. Syftestad GT, Urist MR. Degradation of bone matrix morphogenetic activity by pulverization. *Clin Orthop.* 1979;141:281–6.
 15. Kearney JN, Lomas RJ. Principles of freeze drying. World scientific publishing. 1997;3:243–60.
 16. Yim CJ. Biology of The Demineralised Bone and Its Clinical Use: Chapter 2 Bone Allografts. In: Phillips GO, Strong DM, von Versen R, Nather A, editors. *Advances in Tissue Banking.* Singapore: World Scientific; 1999. p. 87–111.