

The Effect of Egg Shell Nanocalcium in White Rats Fracture Healing Based on an Radiological Overview

Pengaruh Penggunaan Nanokalsium Cangkang Telur pada Penyembuhan Fraktur Tikus Putih Ditinjau dari Gambaran Radiologi

Ayu Kusumawati¹, Yuningtyaswari²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, ²Bagian Histologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

Abstract

Fracture healing is influenced by several factors. One of them is good nutrition. One of the nutrients is calcium which is useful for bone calcification process. Chicken egg shell is a source of high calcium (CaCO₃). To increase the absorption, the egg shell is formed in preparation nanoCa. The aim of this study is to determine the effect of nanocalcium made from basic materials of egg shell on fracture healing based on an radiological overview.

*The experiment used a true experiment design using research methods post test only control group design. The study subjects were 24 white rats (*Rattus norvegicus*) of Sprague - Dawley strain, male, 12 weeks-old, and weight 200-250 grams. At the age of 13 weeks all mice had repositioning surgery of femur fracture with fixation pins dexter intramedular. At 15 weeks the mice were divided into 4 groups (n = 6), i.e: group I (negative control) were not given additional supplements, group II (positive control) were supplemented with calc 75 mg/day orally, group III (treatment I) were supplemented nanoCa 37.5 mg/day orally and IV groups (treatment II) were supplemented nanoCa 75 mg/day orally. Treatment was given for 28 days. At the end of the study, taking picture of rat bone radiology and scoring radiological fracture healing were done. Furthermore, euthanasia was done to all of rats. Data scoring radiological fracture healing was analyzed with the Shapiro-Wilk test and the Kruskal-Wallis test.*

The results of this study prove that there is no significant differences between groups which are given nanocalcium therapy and the groups which are not given nanocalcium therapy post-fracture indicated by Sig $p = 0,944$ ($p > 0,05$). It can be concluded that the use of eggshell nanocalcium has no effect on rats fracture healing based on radiological picture.

Keywords: chicken egg shells, nanocalcium, fractures, an radiology overview

Abstrak

Kesembuhan fraktur dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya adalah asupan nutrisi yang baik. Salah satu nutrisi yang dimaksud adalah kalsium yang berguna untuk proses kalsifikasi tulang. Cangkang telur ayam merupakan sumber kalsium (CaCO_3) yang tinggi. Untuk meningkatkan penyerapan maka cangkang telur ini dibentuk dalam sediaan nanoCa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh nanokalsium yang dibuat dari bahan dasar cangkang telur pada penyembuhan fraktur dilihat dari gambaran radiologi.

Jenis penelitian ini adalah *true experiment design* dengan menggunakan metode penelitian *post test only control group design*. Subyek penelitian ini adalah 24 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur *Sprague dawley*, jantan, berumur 12 minggu, dan BB 200-250 gram. Pada umur 13 minggu semua tikus dilakukan operasi reposisi fraktur femur dexter dengan fiksasi pin intramedular. Pada umur 15 minggu tikus-tikus ini dibagi menjadi 4 kelompok (n=6) yaitu kelompok I (kontrol negatif) tidak diberikan suplemen tambahan, kelompok II (kontrol positif) diberikan suplemen kalk 75 mg/hari per oral, kelompok III (perlakuan I) diberikan suplemen nanoCa 37,5 mg/hari per oral dan kelompok IV (perlakuan II) diberikan suplemen nanoCa 75 mg/hari per oral. Perlakuan diberikan selama 28 hari. Pada akhir penelitian dilakukan pengambilan gambaran radiologi tulang tikus dan dilakukan *scoring* radiologi penyembuhan fraktur. Selanjutnya semua tikus dieutanasi. Data *scoring* radiologi penyembuhan fraktur dianalisa dengan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Kruskal-Wallis*.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok yang diberikan terapi nanokalsium dengan kelompok yang tidak diberikan terapi nanokalsium pasca fraktur yang ditunjukkan dengan Sig $p = 0,944$ ($p > 0,05$). Dapat disimpulkan bahwa Penggunaan nanokalsium cangkang telur tidak berpengaruh pada penyembuhan fraktur tikus putih ditinjau dari gambaran radiologi.

Kata Kunci : cangkang telur ayam, nanokalsium, fraktur, gambaran radiologi

Pendahuluan

Fraktur atau patah tulang adalah salah satu kasus yang banyak terjadi di masyarakat dan ditangani di klinik. Saat ini, penyakit muskuloskeletal telah menjadi penyebab tingginya angka morbiditas dan mortalitas baik di negara maju maupun negara berkembang (Roshanet al., 2008) .

Pada sebuah tulang patah, matriks tulang rusak dan sel-sel tulang yang berdekatan dengan daerah patahan tulang akan mati, selanjutnya tulang yang mengalami kerusakan akan kehilangan kontinuitas atau kesinambungannya (Junqueira et al., 2005) .

Kalsium dibutuhkan untuk proses kalsifikasi kalus, seperti diketahui pembentukan kalus pada kejadian patah tulang sangat penting untuk menjembatani fragmen-fragmen tulang yang patah dan mempertahankan stabilitas temporer atau sementara (Olmstead, 1995) . Dari hasil penelitian Yudaniyanti (2003), menunjukkan bahwa pemberian suplemen kalsium karbonat dosis tinggi dapat mempercepat proses kesembuhan tulang, di mana berdasarkan gambaran histopatologik kalus yang terbentuk didominasi oleh tulang muda (*woven bone*) dan tulang trabekula. Selanjutnya dari gambaran radiografi tulang juga terlihat lebih *radiopaque* (warna putih yang

merupakan warna asli tulang pada gambaran radiologi) dan sudah tidak tampak lagi garis patahan tulang dan kalus sudah menjembatani kedua fragmen tulang.

Salah satu limbah rumah tangga yang banyak ditemukan dan mengandung tinggi kalsium adalah cangkang telur ayam.

Dari hasil penelitian Riyani, *et al.*, (2005), cangkang telur ayam yang telah dibuat serbuk mengandung kalsium sebesar $401 \pm 7,2$ mg/g atau sekitar 39% kalsium, dalam bentuk kalsium karbonat.

Teknologi pembentukan ukuran kalsium yang lebih kecil perlu dikembangkan untuk memperbesar penyerapan kalsium oleh tubuh. Nanokalsium mempunyai ukuran yang sangat kecil, yaitu 10^{-9} m yang menyebabkan reseptor cepat masuk ke dalam tubuh dengan sempurna, oleh karena itu nanokalsium dapat terabsorpsi oleh tubuh hampir 100% (Suptijah, 2009) .

Bahan dan Cara Kerja

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *True Experiment Design* atau eksperimen sungguhan dengan *Post Test Only Control Group*.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY,

dengan waktu penelitian selama 4 - 8 minggu (dimulai sejak perlakuan hingga pengamatan preparat).

Penelitian ini diawali dengan pembuatan nanokalsium cangkang telur di LIPI Serpong. Limbah cangkang telur yang telah dikumpulkan kemudian dipreparasi dengan cara dilakukan pencucian. Cangkang kemudian dikeringkan dengan panas matahari. Cangkang yang telah kering selanjutnya dilakukan penghancuran dengan alat *hammer mill* ukuran 60 mesh sehingga menjadi tepung cangkang. Tepung cangkang selanjutnya di-*treatment* dengan menggunakan alat yang bernama *High Energy Milling (HEM) 3D*. HEM ini digunakan untuk memperkecil ukuran dari partikel – partikel tepung cangkang hingga ke ukuran nanometer. *Milling* dengan menggunakan HEM dilakukan dengan tiga variasi waktu, yaitu 3 jam, 6 jam, dan 9 jam. Serbuk yang berukuran nanometer tersebut selanjutnya akan dilakukan analisis mikroskopis berupa pengukuran partikel dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy (SEM)*. Serbuk nanokalsium yang digunakan pada penelitian ini berukuran 1-100 nanometer.

Subjek penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus Norvegicus*) galur *Sprague dawley* sebanyak 24 ekor, jantan, berumur 12 minggu dengan berat rata-rata 200-250 gram. Aklimatisasi hewan uji

dilakukan selama seminggu. Pada umur 13 minggu semua hewan uji (tikus putih) dilakukan operasi reposisi fraktur femur dextra, kemudian difiksasi dengan pin intramedular. Untuk perawatan pascabedah, semua tikus diinjeksi ampicilin selama 5 hari berturut-turut dan diolesi salep bioplacenton sampai luka operasi mengering. Pada umur 15 minggu, tikus dibagi secara acak dalam 4 kelompok (kelompok I, II, III dan IV) masing-masing terdiri dari 6 ekor tikus dan ditempatkan dalam kandang individu (2 ekor tikus per kandang). Kelompok I sebagai control negatif yang tidak diberikan suplemen tambahan, kelompok II sebagai control positif diberikan suplemen kalk 75 mg/hari, kelompok III diberikan suplemen nanokalsium 37,5 mg/ hari per oral, dan kelompok IV diberikan suplemen nanokalsium 75 mg/hari per oral. Perlakuan ini diberikan selama 28 hari, selanjutnya pada akhir penelitian (tikus umur 19 minggu), dilakukan pengambilan gambar radiologi femur tikus untuk semua kelompok di RSH UGM Yogyakarta. Setelah itu dilakukan eutanasia dengan cara dislokasi tulang leher.

Selanjutnya dilakukan penilaian gambaran radiologi pada masing-masing kelompok dengan sistem *scoring* radiografi untuk penyembuhan fraktur berdasarkan formasi kalus, penyambungan tulang dan remodeling korteks.

Tabel 1. Sistem skoring radiografi untuk penyembuhan fraktur

Kategori	Skor			
	3	2	1	0
Formasi Kalus	Kalus disekitar fraktur penuh	Sedang (>50%)	Ringan (<50%)	Tidak ada
Penyambungan Tulang	Jembatan antar tulang penuh	Sedang (>50%)	Ringan (<50%)	Tidak ada
Remodeling Korteks	-	Penuh	Ringan (<50%)	Tidak ada

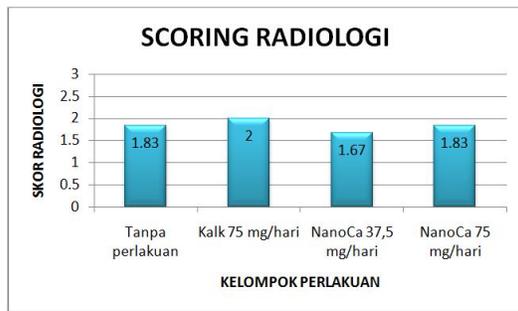
Hasil *scoring* selanjutnya diuji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* dan dianalisis dengan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan setiap kelompok.

Hasil Penelitian

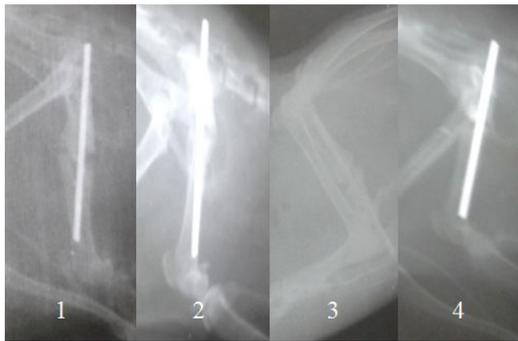
Pada penelitian ini didapatkan hasil skoring dari pengamatan gambaran radiologi pada masing-masing kelompok berdasarkan kriteria skoring. Penghitungan skoring penyembuhan fraktur dilakukan setelah minggu keempat pemberian terapi suplemen yaitu pada saat fase pembentukan kalus (kalus lunak). Didapatkan bahwa keempat kelompok tikus yang diberikan terapi yang berbeda tidak menunjukkan perbedaan rata-rata hasil penyembuhan fraktur yang signifikan. Untuk kelompok 1 yang menjadi kontrol negatif memiliki rata-rata nilai 1,83 yang rata-rata gambaran radiologi tikus hanya terlihat formasi kalus yang tipis saja dan kelompok 2 yang menjadi kontrol positif memiliki rata-rata nilai 2 juga

menunjukkan rata-rata gambaran radiologi tikus sudah terlihat formasi kalus yang tipis dan sedikit penyambungan tulang namun belum ditemukan remodeling pada daerah kortek. Pada tikus kelompok 3 yang diberikan terapi nanokalsium 37,5 mg/hari mempunyai rata-rata nilai 2, pada rata-rata gambaran radiologi tikus sudah terlihat formasi kalus yang tipis dan sedikit penyambungan tulang namun belum ditemukan remodeling pada daerah kortek. Kelompok 4 yang diberikan terapi nanokalsium 75 mg/hari mempunyai rata-rata nilai 1,83, pada rata-rata gambaran radiologi tikus hanya terlihat formasi kalus yang tipis saja, sedangkan belum terlihat penyambungan tulang dan remodeling kortek.

Kedua kelompok perlakuan tersebut memiliki hasil yang sama seperti kelompok kontrol positif dan kontrol negatif. Jika dilihat dari hasil penilaian, terlihat perbedaan yang terjadi antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol, namun perbedaan itu tidak terlalu signifikan. Hal ini juga didukung dengan penilaian SPSS yang menunjukkan nilai signifikansi $p = 0,944$. Nilai signifikansi $p > 0,05$ ini dapat dikatakan bahwa tidak ada pengaruh penyembuhan fraktur antara sampel yang diberikan terapi nanokalsium dengan yang tidak diberikan terapi nanokalsium.



Gambar 1. Rata-rata *scoring* kesembuhan fraktur



Gambar 2. Gambaran Radiologi (1) Tanpa Perlakuan (2) Kalk 75 mg/hari (3) NanoCa 37,5 mg/hari (4) NanoCa 75 mg/hari

Diskusi

Hasil penelitian yang tidak bermakna atau tidak signifikan tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yang juga berpengaruh pada penyembuhan fraktur. Menurut Yudaniayanti (2003), penambahan suplemen kalsium karbonat pada fraktur dapat membantu dalam proses mineralisasi kalus, sehingga kalus yang terbentuk lebih kokoh dan stabil. Kalus yang sudah termineralisasi dengan cepat akan diresorpsi dan diganti dengan tulang lamelar, sehingga akan menyebabkan pita kalus dapat lebih cepat menyebrangi garis. Mekanisme lainnya yang terjadi adalah

pada patah tulang yang stabil dengan suplai darah yang bagus akan terjadi kalus tulang yang sempurna dalam waktu empat minggu. Selanjutnya aktifitas osteoblas akan dimulai untuk membentuk maturasi pada tulang, sehingga kalus menjadi tulang dewasa dengan pembentukan lamela-lamela.

Kalus yang stabil dan kaku juga akan membuat suplai darah di daerah tersebut bagus sehingga tekanan oksigen cukup menyebabkan sel-sel mesenkim berdeferensiasi menjadi osteoblas yang aktif menghasilkan tulang-tulang muda. Pada proses remodeling, osteoblas akan mengisi ruang-ruang trabekula, juga ruang-ruang di antara trabekula, selanjutnya osteoblas tersebut akan mengganti tulang trabekulia menjadi tulang kompak. (Olmstead, 1995)

Namun mekanisme kalsium dalam membantu penyembuhan fraktur tidak bisa hanya berdiri sendiri, dibutuhkan nutrisi lain untuk bisa mengoptimalkan kerja dan hasil kalsium tersebut pada tulang. Aslan et al (2006) menyimpulkan dalam penelitiannya bahwa kombinasi kalsium dan vitamin D yang diberikan pada tahap awal fraktur penyembuhan dapat memberi kesempatan untuk awal bantalan berat. Hasil penelitian ini dilihat dari penilaian mekanis yang dilakukan, walaupun pada hasil radiologinya tidak menunjukkan perbaikan yang signifikan. Vitamin D3 ini

nanti akan meningkatkan penyerapan kalsium dari usus selama proses kalsifikasi dan pembentukan kalus. Peningkatan penggunaan metabolit aktif vitamin D3 di mukosa usus dan jaringan tulang dan / atau stimulasi sintesis dalam jaringan ini mungkin bertanggung jawab untuk metabolisme kalsium dan fraktur *remodelling*.

Ömeroglu et al (1997) juga menyimpulkan bahwa satu dosis tinggi vitamin D3 diberikan intramuskuler akan mempercepat penyembuhan fraktur dalam hewan uji yang sehat melalui empat mekanisme, yaitu memajukan pasokan darah pada daerah fraktur, mempercepat proliferasi dan diferensiasi sel osteoprogenitor dalam kalus, meningkatkan jumlah kolagen dalam kalus dan merangsang penyusunan serat kolagen, dan mengaktifkan mineralisasi dari matriks.

Selain faktor nutrisi tambahan di atas, terdapat juga beberapa faktor yang bisa menghambat penyembuhan fraktur yaitu trauma lokal ekstensif, kehilangan tulang, imobilisasi tak memadai, rongga atau jaringan di antara fragmen tulang, dan infeksi (Smeltzer et al., 2001) . Faktor stress dan gerakan tikus yang terlalu hiperaktif juga merupakan salah satu faktor utama yang menghambat penyembuhan fraktur pada penelitian ini.

Walaupun sudah dilakukan pemasangan pen intramedular pada tulang yang dilakukan frakturisasi yang berguna untuk imobilisasi, tikus tetap pada naluri alamiahnya yang selalu hiperaktif sehingga penyembuhan patah tulang sedikit terganggu. Pemisahan dua ekor tikus perkandang juga ternyata tidak bisa mengurangi pengaruh faktor ini.

Kesimpulan

Pemberian nanokalsium cangkang telur pada kedua dosis (37,5 mg/hari dan 75 mg/hari) tidak berpengaruh pada penyembuhan fraktur tikus putih ditinjau dari gambaran radiologi.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan bahan sediaan lain (cangkang telur bebek) yang memiliki variasi kandungan kalsium
2. Untuk menghasilkan efektifitas terapi terbaik, perlu dilakukan penelitian baru menggunakan dosis yang lebih bervariasi dan dikombinasi dengan nutrisi lain misalnya vitamin D3.
3. Pada penelitian selanjutnya perlu pengendalian yang lebih ketat terhadap faktor-faktor pengganggu, seperti evaluasi gerakan pada tikus

Daftar Pustaka

1. ASLAN, MD Bahadır, MD Aydıner KALACI, MD Murat BOZLAR, MD

- Esin ATIK, MD Ahmet Nedim YANAT, dan MD Arzu TASÇI. "Effects of Vitamin D3 and Calcium on Fracture Healing in Rats." *Türkiye Klinikleri*, 2006: 507.
2. Bukka, McKee, dan karpalis. "Molecular Regulation of Osteoblast Differentiation." Dalam *Topics in Bone Biology: Bone Formation*, oleh F Bronner dan MC Farach-Carson. London: Springer Verlag London, 2004.
 3. Fontaine, C Marie-Laure, S Christele, D Thierry, R Gerard, dan Christian. "New Calcium Carbonate-based cements for bone reconstruction."
 4. Gibson, CJ. "Maintained by the Department of Pathology." <http://www.uwo.ca/pathol/cases/Skeletal/fracture.html>. 2004. (diakses April 20, 2013).
 5. Greiner, R. "Current and Project of Nanotechnology in the food sector." *Journal of Brazilian Society of Food and Nutrition* 1 (2009): 243-260
 6. Junqueira, LC, dan J Carneiro. *Histologi Dasar*. Dialihbahasakan oleh Adji Dharma. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2005.
 7. Millet, PJ, B Cohen, MJ Allen, dan N Rusthon. *Bone Mineral Density Changes During Fracture Healing : A Densitometric Study in Rats*. New York: The Hospital for Special Surgery, 2001.
 8. Muttaqin, A. *Buku Ajar Asuhan Keperawatan Klien Gangguan Sistem Muskuloskeletal*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2008.
 9. Olmstead, ML. "Fractures of Bones of the Hind Limb." Dalam *Small Animal Orthopedics*, oleh ML Olmstead dan FJ Paros. St. Louis: Mosby-Year Book Inc., 1995.
 10. Park, HS, BJ Jeon, J Ahn, dan HS Kwak. "Effects of nanocalcium supplemented milk on bone calcium metabolism in ovariectomized rats." *Journal Animal Science* 8 (2007).
 11. Price, SA, dan LM Wilson. *Patofisiologi : Konsep Klinis Proses-proses Penyakit*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2006.
 12. Reksoprodjo, S. *Kumpulan Kuliah Ilmu Bedah*. Jakarta: Binarupa Aksara, 2000.
 13. Riyani, E, A Maddu, dan DS Soejoko. "Karakteristik Senyawa Kalsium Fosfat Karbonat Hasil Pengaruh Penambahan Ion F⁻ dan Mg²⁺." *Jurnal Biofisika* 1 (2005): 82-89.
 14. S Omeroglu, D Erdogan, H Omeroglu. "Effects of single high-dose vitamin D3 on fracture healing." *Arch Orthop Trauma*, 1997.
 15. Sarban, Sezgin, Alparslan Senkoylu MD, U. Erdem Isikan MD, PhD Petek Korkusuz MD, dan Feza Korkusuz MD. "Can rhBMP-2 Containing Collagen Sponges Enhance Bone Repair in Ovariectomized Rats?" *The Association of Bone and Joint Surgeons*, 2009.
 16. Smeltzer, SC, dan BG Bare. *Buku Ajar Keperawatan Medical bedah*. 8. Jakarta: penerbit Buku kedokteran EGC, 2001.
 17. Sun, L, LC Chow, dan SA Frukhtbeyn. "Preparation and Properties of nanoparticles of calcium phosphates with Ca/P ratios." *Journal of Research of the National Institute of Standard and Technology* 4 (2010).
 18. Suptijah, P. "Sumber Nano Kalsium hewan Perairan." Dalam *101 Inovasi Indonesia*. Jakarta: Kementrian Negara, Riset dan Teknologi, 2009.
 19. Yahiro. "Nutrients Role in Increasing The Speed of Bone Healing." *Consultant to FDA*. 2001. <http://Lesantripod.com/healing%20fracture.html>.
 20. Yudaniyanti, Ira Sari, Hartiningsih, dan Agus Budi Santoso. "Gambaran Histopatologi Kesembuhan Patah Tulang Femur dengan Terapi Kalsium Karbonat Dosis Tinggi pada Tikus Jantan." *Jurnal Veteriner* 9 (2008): 182-187.