

# ***The Effect of Eggshell Nanocalcium for Bone Tissues Histological Image in Bone Fracture Healing***

Tegar Jati Kusuma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Medical student of Muhammadiyah University of Yogyakarta*

## **ABSTRACT**

*In bone healing process, calcium that needed by body will increase. One of calcium resource that hasn't used is eggshell. By using nanocalcium, calcium absorption is better. The purpose of this research is to know influential of eggshell nanocalcium giving as a supplement therapy in fracture healing process seen by histological 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 Sparague 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 then euthanasia was done to all rats and histological preparat of the fracture was made with HE colorization and then histological scoring was done. Histological scoring data of fracture healing was analyzed by using Oneway Annova test.*

*The result of this research showed that using eggshell nanocalcium didn't influence in fracture healing quality seen by histological overview that showed by  $p=0,889$  ( $p>0,05$ ).*

*Keywords: chicken egg shells, nanocalcium, fractures, an histological overview*

# Pengaruh Terapi Nanokalsium Cangkang Telur Terhadap Gambaran Histologi Jaringan Tulang Pada Penyembuhan Patah Tulang

Tegar Jati Kusuma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

## INTISARI

Pada proses kesembuhan tulang, kebutuhan kalsium tubuh meningkat. Salah satu sumber kalsium yang belum digunakan adalah cangkang telur. Dengan nanokalsium, penyerapan kalsium akan menjadi lebih baik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian nanokalsium cangkang telur sebagai suplemen terapi terhadap proses penyembuhan patah tulang pada gambaran histologi.

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 *Sparague Dawley*, jantan, berumur 12 minggu, dan BB 200-250 gram. Pada umur 13 minggu semua tikus dilakukan operasi reposisi fraktur femur dextra 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, selanjutnya semua tikus di-*euthanasia* dan pada bagian patahan dibuat preparat histologi dengan pewarnaan HE kemudian dilakukan skoring. Data skoring histologi penyembuhan fraktur dianalisa menggunakan uji *Oneway Anova*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak berpengaruh terhadap kualitas kalus pada kesembuhan patah tulang ditinjau dari gambaran histologi yang ditunjukkan dengan nilai  $p=0,889$  ( $p>0,05$ ).

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

## **Pendahuluan**

Patah tulang dapat terjadi akibat adanya tekanan yang melebihi kemampuan tulang dalam menahan tekanan. Tekanan pada tulang dapat berupa tekanan berputar, tekanan membengkok, tekanan sepanjang aksis, dan kompresi vertikal.<sup>1</sup>

Kesembuhan patah tulang merupakan suatu proses yang kompleks dan membutuhkan adanya matriks protein dan deposit mineral.<sup>2</sup>

Pada proses kesembuhan tulang, kalsium yang dibutuhkan oleh tubuh akan mengalami peningkatan, karena selain digunakan untuk mempertahankan kadar kalsium darah agar normal, juga dibutuhkan untuk proses kalsifikasi kalus. Asupan kalsium dalam tubuh harus cukup, jika kekurangan akan menyebabkan deposisi kalsium pada tulang berkurang, sehingga proses kalsifikasi kalus tidak terjadi, dan mempengaruhi proses kesembuhan.<sup>3</sup>

Kalsium yang umum dikonsumsi terdapat dalam bentuk mikrokalsium. Ukuran partikel kalsium ini terkait dengan besarnya penyerapan kalsium oleh tubuh. Ukuran mikro dapat terabsorpsi hanya 50%, sehingga sering menyebabkan defisiensi kalsium. Teknologi pembentukan ukuran kalsium yang lebih kecil perlu dikembangkan untuk

memperbesar penyerapan kalsium oleh tubuh. Teknologi pembentukan ukuran kalsium yang perlu dikembangkan adalah teknologi nano. 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%. Jika, penyerapan kalsium oleh tubuh dapat mencapai 100%, maka dapat membantu mempercepat proses kalsifikasi kalus dalam proses penyembuhan patah tulang.<sup>4</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian nanokalsium cangkang telur sebagai suplemen terapi terhadap proses penyembuhan patah tulang.

## **Pelaksanaan Penelitian**

Pada pembuatan serbuk nanokalsium cangkang telur diawali dengan tahap preparasi cangkang telur. Preparasi cangkang telur dilakukan dengan pencucian cangkang. Cangkang kemudian dikeringkan dengan pengovenan selama 6 jam pada suhu  $50^{\circ}$  C. 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. Setelah melalui proses *milling* dengan menggunakan HEM, tepung cangkang dikarakterisasi. Karakterisasi dilakukan dengan menggunakan *Particle Size Analysis (PSA)*.

Subyek pada penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Sparague Dawley* umur 12 minggu dengan BB 200-250gr sebanyak 24 ekor.

Dilakukan operasi reposisi patah tulang femur dextra dengan menggunakan anestesi ketamin (25 mg/kg bb) dan xylazin (8 mg/kg BB), lalu dipasang pin intramedular untuk memfiksasi tulangnya.

Untuk perawatan paska operasi semua tikus diberi suntikan ampisilin intramuskuler selama lima hari secara berturut-turut, lalu untuk perawatan luka bekas operasi diolesi betadine sampai luka mengering. Setiap harinya semua tikus diberikan pakan standar.

Tiga minggu setelah operasi diberikan suplemen untuk penyembuhan tulang selama 4 minggu. Kelompok I Sebagai kontrol negatif sehingga tidak

diberikan perlakuan apapun, kelompok II diberikan tablet kalk 75 mg/ hari per oral sebagai kontrol positif, kelompok III diberikan nanokalsium 37,5 mg/hari peroral, dan kelompok IV diberikan nanokalsium 75 mg/hari.

Pada akhir penelitian (tikus umur 19 minggu), semua tikus di-*eutanasia* dengan cara dislokasi tulang leher. Tulang femur kanan diambil dan difiksasi dalam larutan formalin 10%, disiapkan untuk proses dekalsifikasi untuk pembuatan preparat histopatologi dengan metode blok paraffin dengan teknik pengecatan hemaktosilin dan eosin (HE).

Penilaian skor preparat histologi dilakukan berdasarkan pada penelitian Xiaolin Li *et al* (2003).<sup>5</sup> Skor 1 menunjukkan jaringan ikat fibrosa, skor 2 menunjukkan proporsi jaringan ikat yang dominan dengan beberapa kartilago, skor 3 menunjukkan proporsi jaringan ikat dan kartilago sama banyak, skor 4 menunjukkan proporsi kartilago yang dominan, skor 5 menunjukkan proporsi kartilago dengan beberapa *woven bone*, skor 6 menunjukkan proporsi kartilago dan *woven bone* dalam jumlah yang sama, skor 7 menunjukkan proporsi *woven bone* yang dominan dengan beberapa kartilago, skor 8 menunjukkan keseluruhan merupakan *woven bone*, skor 8 menunjukkan *wovwn bone* dan tulang matur, dan skor 10 menunjukkan tulang matur.

## Hasil

Pengujian pengaruh nanokalsium pada patah tulang dilakukan pada tikus yang telah dilakukan frakturisasi. Pemberian suplemen dilakukan selama 28 hari, kemudian tikus di-*euthanasia* dan dibuat preparat histologi.

Pembacaan dan penilaian preparat histologi dengan menggunakan mikroskop dilakukan berdasarkan skoring kesembuhan patah tulang oleh Xiaolin Li *et al* (2003).<sup>5</sup> Pembacaan ini dilakukan secara *blind* (tanda kelompok ditutup dengan menggunakan kertas) yang dimaksudkan untuk menghindari subyektifitas saat dilakukan penilaian agar tidak terjadi bias.

No.	Kelompok	Rata-rata ± SD
1.	Tanpa perlakuan	3,4±0,68
2.	Kalk dosis 75 mg/hari	2,8±0,73
3.	Nanokalsium 37,5 mg/hari	2,6±0,68
4.	Nanokalsium 75 mg/hari	2,8±0,92

Dari tabel di atas didapatkan hasil rerata pada kelompok tanpa perlakuan sebesar 3,4±0,68; pada kelompok kalk 75 mg/hari sebesar 2,8±0,73; pada kelompok nanokalsium 37,5 mg/hari sebesar 2,6±0,68; dan pada kelompok nanokalsium

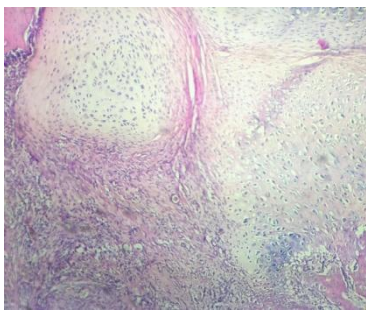
75 mg/hari sebesar 2,8±0,92. Dari hasil tersebut terlihat bahwa kelompok tanpa perlakuan menunjukkan hasil yang lebih baik daripada kelompok yang lainnya, meskipun tidak terlalu besar perbedaannya.

Pengujian data hasil penelitian dilakukan dengan menggunakan seperangkat program komputer. Pada penelitian ini jumlah sampel yang digunakan adalah 20 sampel (sampel  $\leq 50$ ), maka uji normalitas yang digunakan adalah Shapiro-Wilk (SW). Pada pengujian didapatkan nilai  $p > 0,05$  pada setiap kelompok, hal tersebut menandakan bahwa distribusi data normal. Setiap kelompok sampel menunjukkan distribusi data yang normal maka uji beda yang digunakan adalah One Way Anova sehingga didapatkan nilai  $p = 0,889$  ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pada penelitian ini tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok yang diberi suplemen nanokalsium dan yang tidak diberi suplemen nanokalsium.

## Pembahasan

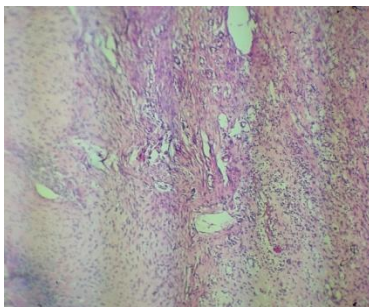
Pada kelompok kontrol negatif memiliki hasil yang lebih baik daripada kelompok perlakuan. Hal ini mungkin dikarenakan saat pemberian perlakuan yang dilakukan setiap hari menyebabkan

tikus melakukan gerakan aktif dan gerakan aktif ini dapat menghambat proses kesembuhan tulang. Gerakan bebas di tempat patahan tulang dapat menghalangi proses pembentukan. Prinsip pada penatalaksanaan patah tulang sendiri adalah mengembalikan posisi patahan tulang ke posisi semula (reposisi) dan mempertahankan posisi itu selama masa penyembuhan patah tulang (imobilisasi).<sup>6</sup>



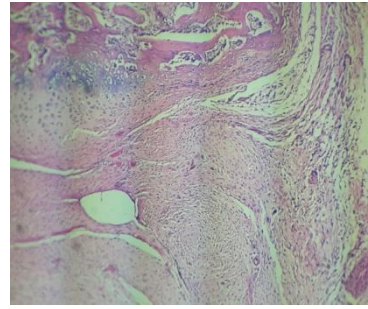
**Gambar 1.** Kelompok tanpa perlakuan

Pada kelompok tanpa perlakuan tampak jaringan ikat dan kartilago memiliki proporsi yang sama.



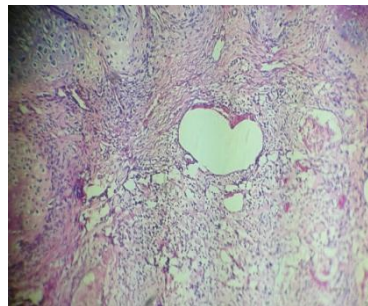
**Gambar 2.** Kelompok kalk 75 mg/hari

Pada kelompok yang diberik kalk 75 mg/hari tampak jaringan ikat memiliki proporsi yang sangat banyak dengan proporsi kartilago yang sedikit.



**Gambar 3.** Kelompok nanokalsium 37,5 mg/hari

Pada Kelompok yang diberi nanokalsium 37,5 mg/hari tampak jaringan ikat memiliki proporsi yang sangat banyak dengan proporsi kartilago yang sedikit.



**Gambar 4.** Kelompok nanokalsium 75 mg/hari

Pada kelompok yang diberi nanokalsium 75 mg/hari tampak jaringan ikat memiliki proporsi yang sangat banyak dengan proporsi kartilago yang sedikit.

Pada penelitian sebelumnya dikatakan bahwa pemberian suplemen kalsium memiliki efek positif pada kesembuhan patah tulang dan dengan teknologi nano, kalsium dapat diserap lebih baik oleh tubuh.<sup>4,7</sup> Pernyataan ini tidak sesuai dengan hasil yang didapatkan

pada penelitian ini yang menunjukkan bahwa secara statistik pemberian nanokalsium tidak memiliki pengaruh yang signifikan pada proses penyembuhan patah tulang. Hal ini dikarenakan ada beberapa faktor nutrisi lain yang mempengaruhi kesembuhan patah tulang yang pada penelitian ini tidak dikendalikan.

Pada cangkang telur ayam, terdapat pula kandungan serat yang cukup tinggi. Konsumsi serat dapat mempengaruhi absorpsi kalsium di usus. Hal ini disebabkan karena serat dapat mengurangi waktu transit pada usus halus. Waktu transit yang sebentar ini menyebabkan penyerapan yang terjadi di usus menjadi tidak optimal sehingga penyerapan kalsium pada usus kurang efisien.<sup>10</sup>

Pada komposisi gizi pakan AD2 yang diberikan pada hewan uji, terdapat kandungan serat kasar sebesar 6%, yang menambah konsumsi serat pada hewan uji. Hal ini mungkin juga dapat mengganggu absorpsi dari kalsium.

Nutrisi merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi kesembuhan patah tulang. Salah satunya di sini adalah vitamin D. Vitamin D dengan metabolitnya D3 mampu merangsang pembentukan sebuah protein pengikat-kalsium dalam brush-border yang terlihat dalam transpor kalsium melintasi epitel. Protein ini esensial bagi pemasukan

kalsium yang mencukupi ke dalam tulang. Vitamin D merupakan regulator primer dari penyerapan kalsium, tanpa vitamin D yang adekuat menyebabkan kadar kalsium darah menurun dan menyebabkan kalsium kurang cukup untuk proses kesembuhan tulang.<sup>8</sup>

Vitamin D3 meningkatkan absorpsi dari usus halus selama kalsifikasi dan pembentukan kalus. Penggunaan yang meningkat dari metabolit aktif vitamin D3 di mukosa usus dan jaringan tulang dan atau menstimulasi sintesis pada jaringan tersebut mungkin bertanggung jawab pada metabolisme kalsium dan remodeling fraktur. Vitamin D ini memiliki efek yang positif seperti sirkulasi darah yang adekuat, sintesis dan penyusunan serabut kolagen, proliferasi dan diferensiasi dari sel osteoprogenitor.<sup>9</sup>

Meskipun pemasukan mineral mencukupi, kekurangan vitamin D dapat menyebabkan proses penulangan terganggu. Dalam hal ini, penulangan tulang rawan epifiser akan terganggu, susunan berkolom teratur dari sel-sel tulang rawan pada lempeng epifiser menghilang, dan metafisis menjadi campuran tak teratur dari tulang rawan tak mengapur dan matriks tulang kurang mengapur.<sup>8</sup>

Dari pembahasan di atas dapat diketahui bahwa kalsium saja tidak cukup untuk membantu proses kesembuhan

tulang. Perlu adanya nutrisi lain untuk mengoptimalkan penggunaan kalsium, nutrisi lain tersebut adalah vitamin D3.

### **Kesimpulan**

Pemberian nanokalsium cangkang telur pada kedua dosis (37,5 mg/hari dan 75mg/hari) tidak berpengaruh pada kualitas kesembuhan patah tulang ditinjau dari gambaran histologi.

### **Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut penggunaan nanokalsium cangkang telur dengan variasi dosis lain.
2. Dilakukan pemeriksaan kimia darah untuk mengetahui kadar alkaline fosfatase sebagai parameter lain kesembuhan patah tulang.
3. Pada penelitian selanjutnya perlu adanya pengawasan untuk mengurangi faktor pengganggu seperti gerakan berlebihan pada hewan uji dan nutrisi lain yang dapat mempengaruhi penyerapan kalsium.

### **Daftar Pustaka**

1. Muttaqin A. 2008. Buku Ajar Asuhan Keperawatan Klien Gangguan Sistem Muskuloskeletal. Jakarta: EGC.
2. Millet PJ, Cohen B, Allen M.J, Rushton N. 2001. Bone Mineral Density Changes During Fracture Healing : A Densitometric Study in Rats. The Hospital for Special Surgery. New York. <http://www.uni.Duesseldorf.De/www/Med Fak/Orthopaedie/jo>.
3. Yahiro M., 2001. *Nutrition's Role in Increasing The Speed of Bone Healing*. Consultant to FDA. [http://Lesann\\_tripod.com/healing\\_%20fracture.htm](http://Lesann_tripod.com/healing_%20fracture.htm).
4. Suptijah P. 2009. *Sumber Nano Kalsium Hewan Perairan*. Di dalam: 101 Inovasi Indonesia. Jakarta: Kementrian Negara, Riset dan Teknologi.
5. Li, Xiaolin, Xinle Luo, Nansheng Yu, Bingfang Zeng. 2007. *Effects of Salmon Calcitonin on Fracture Healing in Ovariectomized Rats*. Saudi Med J 2007; Vol. 28(1): 60-64.
6. Sjamsuhidajat, Wim DJ. 2005. Buku Ajar Ilmu Bedah Edisi 2. Jakarta: EGC.
7. Yudaniyanti IS. 2003. *Pengaruh kalsium Karbonat Dosis Tinggi Terhadap Kesembuhan Pasca Reposisi Patah Tulang Femur Pada Tikus (Sprague Dawley)*. Tesis Sain Veteriner. Program Pasca Sarjana. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
8. Fawcett, Don W. 2002. Buku Ajar Histologi Edisi 12. Jakarta: EGC.
9. Aslan, MD Bahadır, MD Aydiner 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.
10. Wolf RL, Cauley JA, Baker CE, et al. *Factors Associated with Calcium Absorption Efficiency in Pre- and Perimenopausal women*. Am J Clin Nutr 2000;72:466-71.