

Ekspresi *Bone Morphogenetic Protein-2* untuk Mengukur Efektivitas Biomaterial *Freeze Dried Bovine Bone Xenograft (FDBBX)* sebagai Bahan Penyambung Tulang

Expression of Bone Morphogenetic Protein-2 for Measuring Effectiveness of Freeze Dried Bovine Bone Xenografts (FDBBX) Biomaterials as Bone Connector Material

Agus Purnomo¹ dan Dhirgo Adji²

¹ Dinas Pertanian, Daerah Istimewa Yogyakarta

² Bagian Bedah & Radiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Jl. Fauna No.2, Karangmalang 55281. Telephone 0274 560862. Fax 0274 560861. Email : dhirgo_adji@yahoo.com.

Abstract

Osteogenic activity in normal fracture healing will start early at around 1 week after the repair, but not necessarily occur in fracture healing with the aid of grafts. Demineralized freeze dried bovine bone xenograft (DFDBBX) is a bone graft material made from cows that are widely produced recently to assist the process of bone grafting in humans, but has not been used on animals. It does not know how it works in helping to repair the bone. Twenty male SD rats weighing 150 g, were divided into 2 groups of 10 rats each. Group I was the control group, the rats were fractured and reconnected immediately using intramedullar pin fixation, Group II was a group of rats that were fractured and reconnected immediately using pin fixation intramedullar plus graft material of freeze dried bovine bone xenograft. Fracture of the left femur was made in diaphysis part of bone. Evaluation of joints performed regularly at 1 week, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks and 8 weeks post surgery respectively by selecting at random, each group of 2 rats. Rats at each observation were collected two head / group, rats were then killed, the bone parts to be joined was taken and stored in 10% of formalin for histopathologic examination. Some pieces of the bones were used for the analysis of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) by immunohistochemical method. The results were then analyzed descriptively to see the changes directly on the X-rays and tissue. Overall results of this study showed that the graft material of DFDBBX were osteoconductive rather than osteoinductive properties. Nevertheless, the biomaterial is useful for orthopedic purposes primarily of handling cases with partial fracture of bone tissue which is lost. Due to the nature osteoconductive of DFDBBX will make cells to grow and to unify the separate bone fragments.

Keywords: fracture, osteogenic activity, demineralized freeze dried bovine bone xenograft, *bone morphogenetic protein-2*, immunohistochemical analysis

Abstrak

Aktivitas osteogenik pada kesembuhan fraktur normal akan dimulai sejak awal yaitu sekitar 1 minggu pasca reparasi, namun belum tentu terjadi pada kesembuhan fraktur dengan bantuan bahan cangkok. *Demineralized freeze dried bovine bone xenograft* (DFDBBX) adalah bahan cangkok terbuat dari tulang sapi yang saat ini banyak diproduksi untuk membantu proses penyambungan tulang pada manusia, namun belum pernah dipakai pada hewan dan tidak diketahui cara kerjanya dalam membantu reparasi tulang. Dua puluh ekor tikus SD jantan dengan berat 150 gram, dibagi menjadi 2 kelompok masing masing 10 ekor tikus. Kelompok I adalah kelompok kontrol, yaitu tikus yang dibuat fraktur dan tulang disambung kembali dengan menggunakan fiksasi pin intrameduller, Kelompok II adalah kelompok tikus yang dibuat fraktur dan disambung kembali menggunakan fiksasi pin intrameduler ditambah bahan cangkok *freeze dried bovine bone xenograft*. Fraktur dibuat dibagian femur sebelah kiri dibagian diafisis tulang. Evaluasi terhadap sambungan tulang dilakukan secara berkala pada 1 minggu pasca operasi, 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu dan 8 minggu pasca operasi dengan memilih secara acak, masing masing kelompok 1 ekor tikus. Tikus pada setiap pengamatan di ambil 2 ekor/ kelompoknya, dirontgen kaki bagian yang dioperasi, selanjutnya tikus dimatikan, tulang bagian yang disambung diambil dan disimpan dalam formalin 10% untuk pemeriksaan Histopatologi, dan sebagian potongan dipergunakan untuk analisis *Bone Morphogenetic Protein 2* (BMP-2) dengan metoda imunohistokimia. Hasil penelitian selanjutnya dianalisis secara deskriptif dengan melihat perubahan secara langsung pada hasil rontgen dan jaringan. Hasil secara keseluruhan dari penelitian ini menunjukkan bahwa bahan cangkok DFDBBX lebih bersifat osteokondusif dibanding sifat osteoinduktif. Meskipun demikian, biomaterial tersebut bermanfaat untuk penanganan kasus ortopedi terutama pada fraktur dengan sebagian jaringan tulang hilang. Karena sifat osteokondusif akan mempermudah sel tumbuh dan menyatukan fragmen tulang yang terpisah.

Kata kunci: fraktur, Aktivitas Osteogenik, *Demineralized Freeze Dried Bovine Bone Xenograft*, *Bone Morphogenetic Protein-2*,

Pendahuluan

| minggu | Pin intrameduller | | | | Pin +DFDBBX | | | |
|--------|-------------------|-----|---------|-----|-------------|-----|---------|-----|
| | Tikus 1 | | Tikus 2 | | Tikus 3 | | Tikus 4 | |
| | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC | HE | IHC |
| 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | - | + | - | + | - | + | - | + |
| 4 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 6 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8 | + | + | + | + | + | + | + | + |

Keterangan : HE : Pengecatan Hematoksilin Eosin
 IHC : Pengecatan Immunohistokimia

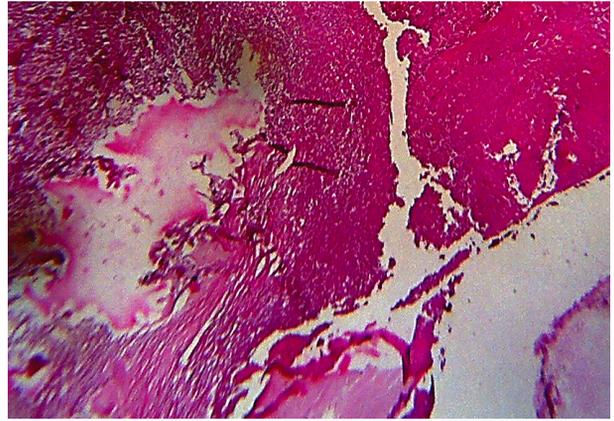
Hasil yang tertera pada Tabel 1 menunjukkan bahwa penggunaan DFDBBX tidak memiliki perbedaan yang mencolok pada ekspresi BMP-2, yang dimulai dari minggu ke 2 hingga minggu ke 8. Pengamatan secara histopatologis baik tikus pada Kelompok tanpa bahan cangkok dan tikus pada kelompok DFDBBX menunjukkan kemiripan perkembangan kesembuhannya (Gambar 1 dan 2). Jumlah sel osteoblas tidak dimanfaatkan untuk diamati pada penelitian ini. Hasil pengamatan immunohistokimia menunjukkan aktivitas osteogenik masing-masing jaringan tulang baik pada kelompok tikus tanpa bahan cangkok maupun DFDBBX muncul mulai minggu 2 sampai minggu 8. Hasil tersebut menunjukkan bahwa aktifitas osteogenik dimulai sejak minggu 2 hingga batas akhir kesembuhan (Gambar 3 dan 4). Berdasar perkembangan kesembuhan fraktur, baik Kelompok I (penyambungan dengan pin) maupun Kelompok II (penyambungan dengan pin dan graft) menunjukkan prospektif kesembuhan yang baik. Kondisi ini menunjukkan bahwa pelaksanaan operasi telah dilaksanakan dengan standar operasi yang baik dan benar, serta tidak terdapat adanya tanda

penyimpangan kesembuhan seperti adanya infeksi atau kerusakan jaringan. Hasil evaluasi histopatologis tidak terlihat adanya perkembangan penempelan fragmen yang cukup baik pada minggu 1 dan 2 baik, namun selanjutnya terdapat banyak perkembangan yang signifikan pada perkembangan jaringan pada minggu 4,6 dan 8. Penilaian kesembuhan secara histopatologis tidak dapat dinilai dengan penempelan sempurna dari fragmen patahan karena penilaian kesembuhan didasarkan pada perkembangan sel. Evaluasi histopatologis menggunakan teknologi immunohistokimia membuktikan bahwa proses perbaikan dalam kaitannya dengan proliferasi sel dan jaringan terbaca dimulai dari minggu 2 dengan ditemukannya antigen *Bone Morphogenetic Protein-2* (BMP-2). Berturut-turut BMP-2 ditemukan baik pada Kelompok Tikus tanpa Bahan cangkok (Kelompok I) maupun Kelompok Tikus yang diberi Bahan Cangkok (Kelompok II) dimulai minggu 2, 4, 6 dan 8. Kondisi tersebut menggambarkan bahwa BMP -2 terekspresi pada akhir fase radang dan terus bekerja sampai semua jaringan tulang sudah tersambung dengan baik.

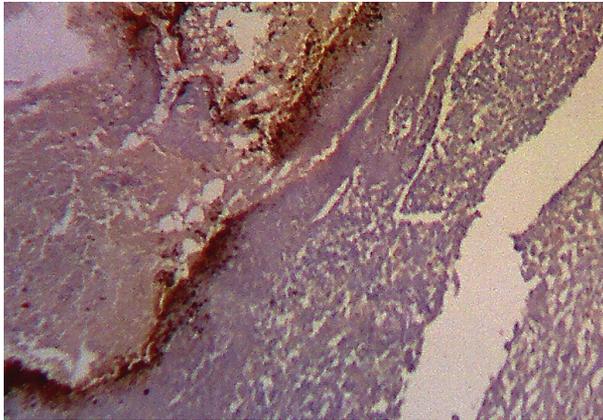
Secara lengkap hasil temuan dalam penelitian ini adalah seperti tergambar pada Tabel I.



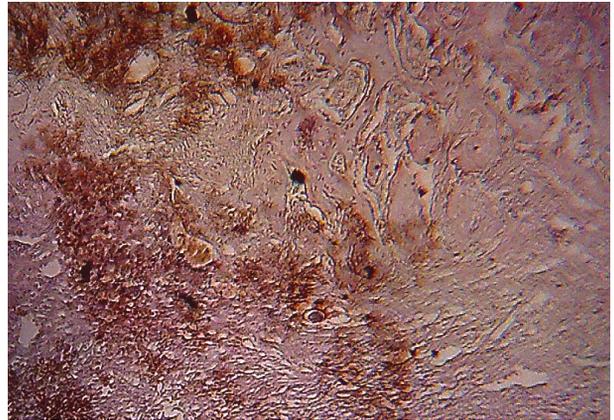
Gb.1. Histopatologis tulang fraktur setelah direparasi dengan pin intrameduler. A. Tulang B. Sumsum tulang (HE, 40x)



Gb.2. Histopatologis tulang fraktur setelah disambung dengan bahan cangkok. A. Sumsum tulang B. DFDBBX C. Tulang (HE, 40x)



Gb.3. Gambar IHC, positif BMP-2 (A) dari Kelompok tikus dengan pin intrameduler (Streptavidin biotin, 40x)



Gb.4. Gambar IHC, positif BMP-2 (A) dari Kelompok dengan DFDBBX (Streptavidin biotin, 40x)

Bone morphogenetic Proteins merupakan protein anggota keluarga *transforming growth factor beta* yang berperan penting dalam peristiwa osteogenesis. Ekspresi BMP-2 dan BMP-4 meningkat pada awal fase laten, kemungkinan untuk membantu proses differensiasi sel prekursor menjadi sel kondrogenik atau osteogenik (Al-Aql *et al.*, 2008). Nakashima and Reddi (2003), mengatakan bahwa Morfogen merupakan sinyal ekstraseluler yang mengatur proses morfogenesis selama interaksi epithelial-mesenkimal. Morfogen

dijelaskan lebih lanjut terdiri dari 4 keluarga protein yaitu : *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), *Fibroblast Growth factors* (FGF), *Hedgehog Proteins* (Hhs) dan *Wingless-and Int-related Proteins* (Wnts). Protein protein tersebut berperan penting sebagai inisiator, pembentuk model, morfogenesis dan differensiasi sel. Menurut Wozney (2002), berbagai bahan cangkok tulang digunakan untuk tujuan meningkatkan kemampuan tulang dan penyembuhan tulang. Keberhasilannya sangat relatif tergantung oleh banyak faktor termasuk

teknik aplikasi bedah dan sifat bahan itu sendiri. Selain sifat fisik bahan, cangkok dapat bersifat osteokonduktif atau osteoinduktif. Kemampuan material untuk mempromosikan pertumbuhan tulang dengan memungkinkan pembentukan tulang pada permukaannya, mungkin cukup bilamana jumlah yang dibutuhkan cukup memadai dan tersedia margin tulang. Dalam banyak kasus, osteoinduksi, didefinisikan sebagai pembentukan tulang *de novo* di situs jaringan lunak atau keras. Bahan cangkok Alloplastik sekarang ini merupakan agen osteokonduktif terbaik, dan dapat dilihat dalam banyak kasus hanya sebagai bahan pengisi kekosongan bioinert. Allograft dengan atau tanpa mineral memiliki sifat osteokonduktif dan secara luas diyakini mengandung beberapa kapasitas osteoinduktif. Namun, kapasitas osteoinduktif tersebut sangat bervariasi tergantung pada metode pengolahan dan sumber.

Tidak dapat dijelaskan kapan BMP-2 dihasilkan, namun berdasarkan hasil penelitian ini, produksi besar besaran BMP-2 akan dimulai pada akhir dari fase inflamasi, menuju fase inisiasi yaitu setelah minggu 2. Akhir produksi BMP-2 belum diketahui, namun berdasarkan hasil penelitian ini kemungkinan produksi BMP-2 akan terus berlanjut hingga selesainya fase maturasi jaringan tulang yang baru.

Ucapan Terima Kasih

Trimakasih kepada Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, atas bantuan dana yang diberikan untuk membantu terlaksananya penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Al-Aql, Z.S., Alagi, A.S., Graves, A.T., Gerstenfeld, L.C., and Einhorn, T.A. (2008). Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *J. Dent. Res*, Feb ; 87(2): 107-118.
- Brinker, WO., Piermattei, DL, and Flo, GL. (1983). *Small Animal Orthopedics and Fracture Treatment*. W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Mexico city, Rio De Janeiro, Sydney, Tokyo.
- Nakashima, M and Reddi, A.H. (2003). The Application of Bone Morphogenetic Proteins to Dental Tissue Engineering. *Nature Biotech.* Vol 21. No. 9. Sept 2003. 1025-1032.
- Olmstead, ML. (1995). *Small Animal Orthopedics*. Mosby. St. Louis. Missouri.
- Piermattei, D.L., Gretchen, L.F., De Camp, C.E. (2006). *Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair*. 4 ed. Saunders. Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Slatter, D. (2002). *Textbook of Small Animal Surgery*. 1st ed. Saunders, USA.
- Werber, KD., Raeder, E., Brauer, RB and Weiss, S. (2003). External Fixation of Distal radial fractures : Four Compared With Five Pins. *J. Bone and Joint Surg*. Volume 85A. No 4: 660-666.
- Wozney, J.M. (2002). *Overview of Bone Morphogenetic Proteins*. *Spine*, Vol. 27, No 16S, pp. 52-58. Lippincott Williams & Wilkins, Inc.