

# Pengaruh Autoclave terhadap Properti Fisik dan Histopatologi Tulang: Sebuah Penelitian Dasar Rekonstruksi

I GEDE EKA WIRATNAYA<sup>1</sup>, ACHMAD FAUZI KAMAL<sup>1</sup>, RINO PATTIATA<sup>2</sup>, EVELINA KODRAT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopaedic and Traumatology, Cipto Mangunkusumo Hospital Faculty of Medicine Universitas Indonesia

<sup>2</sup>Department of Patology Anatomy Cipto Mangunkusumo Hospital Faculty of Medicine Universitas Indonesia

Diterima 19 Februari 2014; Direview 18 Maret 2014; Disetujui 27 Maret 2014

## ABSTRACT

*Background:* Autoclave autograft is a promising alternative procedure in surgical treatment of bone tumors. A minimum effective autoclaving time of 15 minutes at 134°C to devitalize tumour cells. This study aims to know the effect of autoclave to physical properties and histopathology of bone.

*Methods:* We performed experimental study in 28 femoral bone of goat (*Capra Aergagus circus*) at age 1–2 year old. We divide into two groups with simple random sampling to be 14 autoclave and 14 control group. Autoclaving was performed to the bone at 134°C for 15 minute. We examined physical properties each 7 autoclave group to axial and bending force compared with physical properties of the control group. We also examined histopatology of the bone both groups. Independent t-test statistical analysis to evaluate the difference of axial and bending force between autoclave and control group.

*Results:* There were significant difference between autoclave and control group in axial force ( $p = 0.000$ ) and bending force ( $p = 0.03$ ). Physical properties of autoclave bone decreased 58.58 % in axial force and 20.33% bending force to control group. Histopathology examination revealed that all osteocytes were death in autoclave group but without matrix changes.

*Conclusion:* Autoclave at 134°C for 15 minute caused physical properties of bone decrease and statistically significant difference. It also made all osteocytes died but without matrix disturbance.

**Keyword:** Autoclave bone, Physical properties of bone.

## ABSTRAK

Autograft yang mendapat pajanan *autoclave* merupakan salah satu prosedur alternatif dalam penatalaksanaan bedah tumor tulang. Pemanasan *autoclave* efektif untuk devitalisasi sel tumor pada suhu 134°C dalam waktu minimal 15 menit. Studi ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *autoclave* terhadap properti fisik dan histopatologi tulang.

Penelitian ini merupakan studi eksperimental terhadap 28 tulang kambing (*Capra Aergagus circus*) usia 1–2 tahun. Kami membagi menjadi dua kelompok dengan *simple random sampling* menjadi 14 kelompok *autoclave* dan 14 kelompok kontrol. *Autoclave* dilakukan untuk tulang pada suhu 134°C selama 15 menit. Evaluasi properti fisik dilakukan terhadap masing-masing kelompok 7 sampel tulang untuk gaya *axial* dan gaya *bending*. Kami juga memeriksa histopatologi tulang kedua kelompok. Analisis *t-test independent* statistik untuk mengevaluasi perbedaan *axial* dan gaya *bending* antara *autoclave* dan kelompok kontrol.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok *autoclave* dengan kelompok kontrol pada uji gaya axial ( $p = 0,000$ ) dan gaya bending ( $p = 0,03$ ). Properti fisik tulang diautoclave menurun 58,58% pada gaya *axial* dan 20,33% pada gaya *bending*. Pemeriksaan histopatologi menunjukkan kematian osteosit pada kelompok *autoclave*.

Penelitian ini menyimpulkan bahwa *autoclave* mengurangi kekuatan mekanik tulang, baik terhadap gaya axial maupun gaya bending dan bermakna secara statistik, serta menyebabkan kematian seluruh osteosit.

**Kata Kunci:** tulang autoclave, properti fisik tulang.

## KORESPONDENSI:

Dr. dr. Achmad Fauzi  
Kamal, Sp.OT (K)  
Departemen Orthopaedi  
& Traumatologi FKUI/  
RSCM. Jl. Diponegoro No.  
71 Jakarta Pusat. Email:  
fauzikamal@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Pilihan rekonstruksi *limb salvage surgery* (LSS) dapat berupa endoprostesis, *biological reconstruction* (*massive allograft, autograft, bone transfer, bone transport*), atau kombinasi endoprostesis dengan metode *biological reconstruction*. Penggunaan prostesis pada pasien berusia muda (dengan indikasi LSS) mempunyai luaran jangka panjang yang kurang baik. Hal tersebut merupakan salah satu pertimbangan untuk kembali menggunakan *biological reconstruction* dengan autograft.<sup>1,2</sup>

Tindakan rekonstruksi dengan *recycling* autograft dengan *autoclave* merupakan reimplantasi tulang autograft yang terkena tumor setelah dilakukan devitalisasi tumor dengan cara pemanasan *autoclave* pada suhu tertentu. Dibandingkan dengan tulang *massive allograft, recycling* tulang autograft memiliki kelebihan karena tidak terjadi reaksi penolakan, dapat terhindar dari transmisi penyakit, dan lebih mudah direimplantasikan ke dalam defek tulang yang ada.<sup>3-5</sup>

Selain itu, metode *autoclave* untuk *recycling* autograft merupakan prosedur yang murah dan efisien, dan masih sering dilakukan di negara yang sedang berkembang. Hal itu dikarenakan kurang terjangkaunya harga prosthesis, tidak tersedianya fasilitas radiasi dan sulitnya mencari *allograft*, serta masih dapat mempertahankan *bone stock*.<sup>6-9</sup>

Fruh dkk., (1990) pada penelitiannya menyimpulkan proses pemanasan tulang dengan *autoclave* mampu membunuh semua sel tumor, walaupun pemanasan yang lama akan melemahkan kekuatan mekanik tulang.<sup>10</sup> Di samping itu, peningkatan suhu dan penambahan waktu pajanan *autoclave* akan menyebabkan berkurangnya potensi osteoinduktif tulang.<sup>10</sup>

Penggunaan metode *recycling* autograft dengan *autoclave* telah banyak diteliti. Di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo (RSCM), metode ini juga telah dilakukan pada beberapa kasus osteosarkoma dengan indikasi LSS, tetapi data tentang kekuatan mekanik dan gambaran histologis tulang yang mendapat pajanan *autoclave* belum di evaluasi secara lengkap. Atas dasar latar belakang tersebut, penelitian tentang pengaruh *autoclave* terhadap kekuatan mekanik dan histopatologi pada tulang perlu dilakukan. Penelitian ini dapat menjadi dasar pengetahuan biomekanik tulang penggunaan *recycling* autograft dengan *autoclave* pada rekonstruksi LSS.

## MATERI DAN METODE

Penelitian ini merupakan studi eksperimental dengan desain *post control group* menggunakan

model tulang femur kambing (*Capra Aegagrus hircus*), berjenis kelamin jantan dengan rerata umur 1–2 tahun. Besar sampel pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan rumus Federer:  $(n-1) (t-1) > 15$ . Dengan n sebagai jumlah sampel untuk setiap perlakuan, t adalah jumlah kelompok sebanyak 2, yaitu kelompok yang mendapat perlakuan *autoclave* dan kelompok control. Jumlah sampel yang diperlukan 14 untuk setiap kelompok sehingga total sampel yang diperlukan 28.

Tulang femur diambil segera setelah kambing disembelih sehingga didapatkan tulang dalam keadaan segar. Dilakukan pengukuran diameter diafisis dan metafisis tulang femur kambing. Tulang tersebut dimasukkan ke dalam alat transpor berisi pendingin. Pada kelompok perlakuan tulang diberi pemanasan dengan *autoclave* pada suhu 134°C selama 15 menit sesuai rekomendasi Paul Bohm dkk., dengan alat *autoclave Mocom Type Prima* (U) (Italia) tahun 2000 berdaya 1700 watt (Gambar 1A).<sup>10</sup> Selanjutnya dilakukan pengambilan sampel jaringan tulang dari kelompok perlakuan dan kelompok kontrol (tanpa pemanasan) untuk pemeriksaan histopatologi di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Tulang yang telah mengalami *autoclave* dimasukkan kembali ke dalam alat transport untuk persiapan uji kekuatan mekanik. Uji kekuatan mekanik dilakukan pada tulang kelompok *autoclave* dan kontrol dengan memberikan gaya kompresi/*axial* dan *bending* menggunakan alat merek Schenk-Trebe tipe RME 100 buatan Jerman dengan pencatat Yokogawa X-Y recorder tipe 3023 melalui *amplifier* KWS tipe 3073 buatan Jepang. Gaya *axial* dan *bending* diberikan pada tulang kelompok *autoclave* dan kontrol secara kontinu sehingga terjadi fraktur (*break event point*). (Gambar 1.B-C)

Analisis data dilakukan dengan program komputer SPSS versi 16.0 dengan uji *independent t-test* dan dianggap bermakna bila nilai  $p < 0,005$ .

## HASIL

### Kekuatan Mekanik terhadap Gaya Axial

Semua sampel tulang pada kelompok *autoclave* dan kontrol yang diberikan gaya *axial* mengalami fraktur di daerah metafisis. Rerata besarnya gaya *axial* yang menyebabkan fraktur (*break point*) pada kelompok *autoclave* adalah 3035,7 Newton, sedangkan pada kelompok kontrol rerata *break point* sebesar 7328,6 Newton. Tulang pada kelompok perlakuan

*autoclave* mengalami penurunan kekuatan mekanik rata-rata sebesar 58,58% dibandingkan kelompok kontrol. Pada uji statistik dengan menggunakan uji *independentt-test* didapatkan perbedaan bermakna kekuatan mekanik tulang terhadap gaya *axial* antara tulang yang di-*autoclave* dengan kontrol ( $p = 0,000$ ).

### Kekuatan Mekanik terhadap Gaya Bending

Rerata besarnya gaya *bending* yang menyebabkan fraktur (*break point*) pada kelompok *autoclave* adalah  $2421,43 \pm 677,53$  Newton, sedangkan pada kelompok kontrol rerata *break point* sebesar  $3057,14 \pm 156,60$  Newton. Tulang pada kelompok perlakuan *autoclave* mengalami penurunan kekuatan mekanik rata-rata sebesar 20,33% dibandingkan kelompok kontrol. Pada uji statistik menggunakan uji *independent-test* didapatkan perbedaan bermakna kekuatan mekanik tulang terhadap gaya *bending* antara tulang yang di-*autoclave* dengan kontrol ( $p = 0,032$ ). Karakteristik tulang dan data penelitian kekuatan mekanik terhadap gaya *axial* dan *bending* dirangkum pada tabel 1.

### Gambaran Histopatologi

Penilaian histopatologi dengan melihat gambaran matriks dan morfologi sel tulang. Pada kelompok tulang yang mengalami pemanasan dengan *autoclave* didapatkan kematian seluruh osteosit yang terdapat pada metafisis dan diafisis. Gambaran tersebut ditandai dengan lakuna yang kosong (gambar 3). Sebaliknya, pada kelompok kontrol didapatkan osteosit yang *viable*. Pada kedua kelompok tidak terjadi perubahan matriks tulang.

### PEMBAHASAN

Pemanasan dengan *autoclave* pada penelitian ini menggunakan suhu  $134^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit, sesuai yang direkomendasikan dari penelitian Paul Bohm dkk., dari *University Hospital*, Tilbingen, Jerman, 1994.<sup>10</sup> Dengan cara tersebut diharapkan dapat membunuh semua sel tumor, tetapi mendapatkan *scaffold* tulang autograft yang cukup kuat terhadap pembebanan gaya *axial* dan *bending*.

Menurut beberapa studi, komplikasi yang sering terjadi pada penggunaan *recycling* autograft yang dilakukan *autoclave* pada operasi rekontruksi tumor tulang ganas adalah rekuren lokal, fraktur graft, infeksi, dan *non union*. Pada penelitian Jamil dkk., (2006) terhadap 19 pasien tumor ganas primer tulang

yang dilakukan LSS dan rekonstruksi dengan *recycling* autograft dengan *autoclave* pada suhu  $120^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit, kejadian angka lokal rekuren dan infeksi paling banyak (10,5 %), komplikasi *non union* dan *implant failure* lebih kecil.<sup>11</sup> Temuan tersebut berbeda dengan penelitian Asada dkk., (1997) setelah dilakukan *follow up* 1–8 tahun dari 23 pasien tumor yang dilakukan rekonstruksi dengan autograft yang di-*autoclave* dan *allograft* pada suhu  $135^{\circ}\text{C}$  selama 10 menit, tidak ditemukan lokal rekuren, tetapi 10 orang (43,4%) mengalami infeksi, resorpsi graft, fraktur dan *loosening implant*.<sup>12</sup>

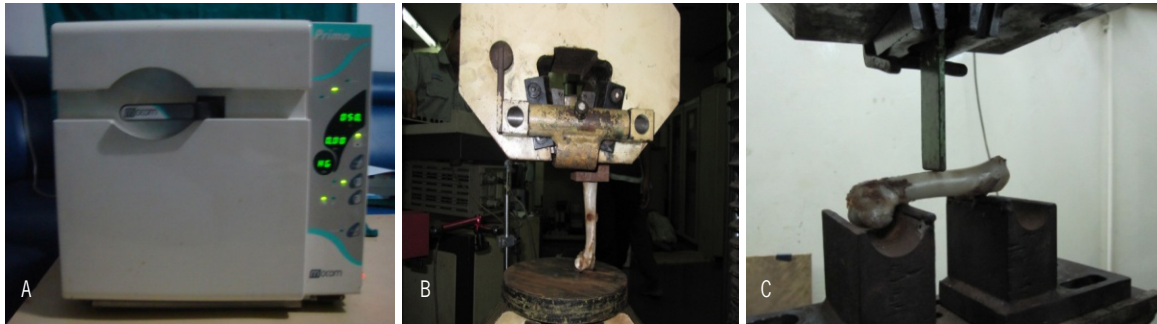
Hal itu menunjukkan pemanasan dengan *autoclave* di bawah suhu  $134^{\circ}\text{C}$  dan kurang dari 15 menit akan berisiko terjadinya lokal rekuren lebih tinggi, tetapi menurunkan kejadian *non union* dan *implant failure*.

Pada penelitian ini digunakan femur tulang kambing dengan harapan dapat menggambarkan kekuatan tulang femur seorang remaja. Untuk menghilangkan pengaruh faktor perancu dilakukan upaya penyeragaman faktor-faktor yang mungkin memengaruhi kekuatan mekanik tulang seperti diameter metafisis dan diafisis tulang, jenis kelamin, dan usia kambing.

Hasil penelitian ini menunjukkan perlakuan *autoclave* telah menurunkan kekuatan mekanik tulang pada uji pembebanan gaya *axial* maupun *bending*. Penurunan kekuatan mekanik lebih besar terjadi pada gaya *axial* dibandingkan gaya *bending*. Hasil penelitian ini serupa dengan yang dilaporkan oleh Kohler dkk., (1986), yang menunjukkan tulang yang dilakukan *autoclave* mengalami penurunan kekuatan mekanik sebesar 23% terhadap gaya *torsi*.<sup>13</sup> Sedangkan penelitian Currey dkk., menunjukkan bahwa tulang yang mengalami *autoclave* menunjukkan penurunan kekuatan mekanik terhadap gaya *bending* secara signifikan.<sup>10</sup>

Terjadinya penurunan kekuatan mekanik tulang disebabkan oleh hilangnya komponen air pada tulang dan kerusakan matriks organik tulang (denaturasi protein). Hal tersebut dilaporkan oleh Gocclawska yang menyatakan bahwa kadar air akan memengaruhi kekuatan mekanik tulang. Semakin banyak air hilang pada proses devitalisasi, semakin besar penurunan kekuatan mekanik tulang.<sup>14</sup>

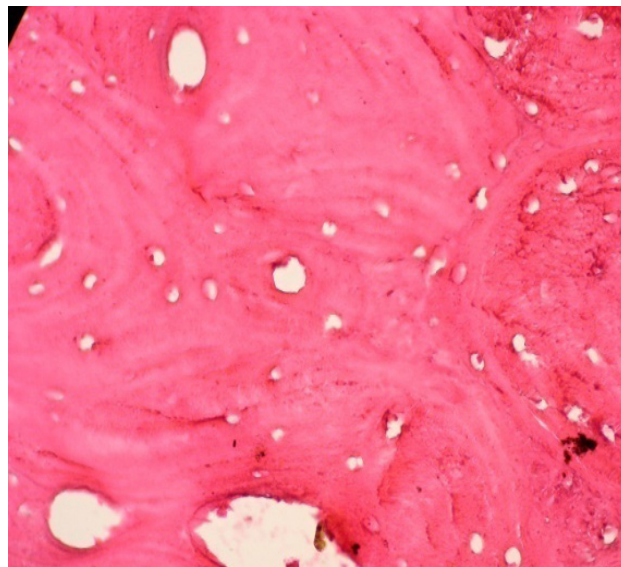
Komponen utama matriks organik adalah kolagen tipe I yang menyusun 90% berat kering matriks tulang. Di samping itu, matriks organik juga mengandung proteoglikan, glikoprotein, dan protein non-kolagen, dan *growth factor*.<sup>14-17</sup> Kolagen bertanggung jawab terhadap gaya tarik pada tulang (*tensile strength*), sedangkan proteoglikan berperan pada kekuatan



Gambar 1: (A) alat autoclave Mocom *TypePrima* (U) (Italia) tahun 2000 berdaya 1700 watt; (B) Tulang yang diberikan gaya axial ; (C) Tulang yang diberikan gaya bending

Tabel 1: Karakteristik tulang dan kekuatan mekanik terhadap gaya axial

	Panjang (mm)	Diameter (mm)				Break Point (N)	
		Gaya axial		Gaya bending		Gaya axial	Gaya bending
		Metafisis	Diafisis	Metafisis	Diafisis		
Autoclave Mean	100	22,8± 1,34	20,3± 1,12	21,8± 1,01	19,6 ± 0,48	3035,71	2421,43
Kontrol Mean	100	22,1± 1,09	19,7± 0,38	22,7± 1,86	19,6 ± 0,48	7328,57	3057,14



Gambar 3: Gambaran histopatologi dari sediaan kelompok *autoclave* menunjukkan lakuna kosong, tidak tampak osteosit (panah putih). Pewarnaan HE, pembesaran obj. 40 x.

kompresi tulang. Dengan demikian, dapat diduga bahwa di samping hilangnya komponen air, denaturasi protein (kerusakan matriks organik) juga memengaruhi penurunan kekuatan mekanik tulang.

Pada proses liofilisasi dan pajanan radiasi 25 kGy, kekuatan mekanik tulang turun sebesar 40%,

sementara tulang segar yang mendapat pajanan radiasi 50 kGy mengalami penurunan kekuatan mekanik sebesar 30%.<sup>18</sup>

Uji kekuatan mekanik dilakukan untuk menilai properti biomekanik tulang yang mencerminkan peran struktur tulang.<sup>18</sup> Properti ekstrinsik tulang

dinilai dari *maximum flexure force* atau *ultimate force*, yaitu gaya bending maksimal hingga terjadinya fraktur.<sup>19</sup>

Penurunan kekuatan tulang secara signifikan sangat jelas terjadi, terutama setelah diberi gaya *axial*. Sedangkan secara histopatologi tidak ditemukan perubahan pada matriks tulang dengan menggunakan mikroskop cahaya. Hasil penelitian tersebut hampir sama dengan penelitian Kohler dkk., (1986), yang menyatakan bahwa pemanasan dengan *autoclave* menyebabkan penurunan kekuatan, kekakuan, dan berat tulang. Walaupun demikian, tulang yang mendapat perlakuan *autoclave* cukup adekuat secara mekanik digunakan sebagai substitusi tulang.<sup>20</sup>

Hal ini menunjukkan tidak ada hubungan antara kekuatan mekanik dan gambaran histopatologi pada tulang yang mengalami pemanasan dengan *autoclave* karena kekuatan mekanik tulang ditentukan oleh komposisi jaringan kolagen dan kalsium hidroksiapatit pada matriks, bukan oleh kematian seluruh sel osteosit. Pada tulang normal, jaringan kolagen akan meningkatkan *tensile strength* dan menurunkan *compressive strength* tulang, sedangkan kalsium hidroksiapatit mempunyai sifat *stiff* pada tulang sehingga meningkatkan *compressive strength* tulang.<sup>13,21</sup>

Pemanasan tulang dengan *autoclave* pada suhu di atas 60°C akan menyebabkan denaturasi dan degradasi jaringan kolagen pada matriks tulang sehingga menurunkan kekuatan mekanik tulang.<sup>13</sup> Pada penelitian ini, tidak ditemukan perubahan matriks tulang secara histopatologi menggunakan mikroskop cahaya sehingga diperlukan metode lain untuk menilai secara kuantitatif dan kualitatif jaringan kolagen serta kalsium hidroksiapatit pada matriks tulang.

Hal yang berlawanan ditemukan pada penelitian Jose Moreno dan Francisco Forriol (2001) yang mendapatkan bahwa tulang yang dipanaskan dengan *autoclave* pada suhu 134°C selama 8 menit, kekuatan mekaniknya tidak menurun secara signifikan. Penelitian ini menyarankan agar dilakukan penelitian mengenai perubahan jaringan kolagen, kandungan mineral (Calcium, Magnesium, Phosphorus), dan *hidroxyproline* pada tulang yang dipanaskan dengan *autoclave*.<sup>22</sup>

## KESIMPULAN

Devitalisasi dengan *autoclave* mengurangi kekuatan mekanik tulang, baik terhadap gaya axial maupun gaya bending, dan bermakna secara statistik serta menyebabkan kematian seluruh osteosit.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Bohm P, Fritz J, Thiede S, Budach W. Reimplantation of Extracorporeal Irradiated Bone Segments in Musculoskeletal Tumors. *Langenbeck Arch Surg*. 2002;387(9-10): 355-65.
2. Hong A, Stevens G, Stalley P, Pendlebury S, Ahem V, Ralston A, Estoesta E, et al. Extracorporeal Irradiation for Malignant Bone Tumors. *Int J Radiation Onco Biology and Physics*. 2001; 50(2): 441-7.
3. June M, Refaat A, Kawagoshi N, Matosumoto S, Kuroda H. Pasteurized Autologous Bone Graft in Surgery for Bone and Soft Tissue Sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;419:258-66.
4. Araki N, Myoui A, Kuratsu S, Hashimoto N, Inoue T, Kudawara I, et al. Intra Operative Extracorporeal Autogenous Irradiated Bone Graft in Tumor Surgery. *Clin Orthop Relat Res*. 2002; 368:196-206.
5. Tsuchiya H, Yamamoto H, Nishida N, Tomita K, Wan S, Sakayama K. Reconstruction Using an Autograft Containing Tumour Treated by Liquid Nitrogen. *J Bone Joint Surg Br*. 2005; 87-B(2):218-25.
6. El-Wahidi GF, Eldesoky I, Kotb S, Awad I, Thabet M, Thaleh Y. Neoadjuvant Chemotherapy & Low Dose Extracorporeal Irradiation for Treatment of Osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 2005;23: 9074.
7. Davies NM, Stalley PD. Extracorporeal Irradiation and Its Role in the Treatment of Primary Pelvic Bone Tumours. *J Bone Joint Surg*. 2003; 85B: 174.
8. Sanjay BKS. Limb Salvage Surgery in Bone Tumor. *J Bone Joint Surg*. 2002;84B:213.
9. Muscolo DL, Ayerza MA, Aponte-Tinao L, Ranalletta M, Abalo E. Intercalary Femur and Tibia Segmental Allografts Provide an Acceptable Alternative in Reconstructing Tumor Resections. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;426:97-102.
10. Bohm P, Stihler Jorge. Intraosseous Temperature during Autoclaving. *J Bone Joint Surg*. 1995; 77B:174.
11. Khattak MJ, Umer M, Haroon-ur-Rasheed, Umar M. Autoclaved tumor bone for reconstruction: an alternative in developing countries. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;447:138-44.
12. Asada N, Tsuchiya H, Kitaoka K, Mori Y, Tomita K. Massive Autoclaved Allografts and Autografts for Limb Salvage Surgery. *Acta Orthop*. 1997; 68: 392-5.

13. Kohler P, Krecberg A, Stromberg L. Physical Properties of Autoclaved Bone. *Acta Orthop*. 1986;57(2):141-5.
14. Dziedzic-Goclawska A. The Application of ionising radiation to sterilise connective tissue allografts. In: Phillips GO, editor. Radiation and tissue banking. 1<sup>st</sup>ed. Singapore: World Scientific; 2000, pp.57-99.
15. Salter RB. Normal Structure and Function of Musculoskeletal Tissues. In: Diagnosis of disorders and injuries of musculoskeletal system. 3<sup>rd</sup> edition. Philadelphia: Lippincott-Williams-Wilkins; 1999, pp.7-28.
16. Isma SPP, Kamal AF, Gumay S. Efek iradiasi 50, 150, dan 300 gray terhadap gambaran histopatologi, kekuatan mekanik terhadap gaya axial dan bending, serta *vickers microhardness*, sebuah uji eksperimental pada femur kambing (*Capra Aegagrus Hircus*). *Maj Orthop Indones*. 2011;39(1):87-91.
17. Rosier RN, O'Keefe RJ, Hicks DG. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;355:294-300.
18. Reddy GK, Stehno-Bittel L, Hamade S, Enwemeka CS. The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2001;54:1-8.
19. Estai MA, Suhaimi F, Shuid AN, Das S, Abdullah S, Soelaiman. Biomechanical evaluation of fracture healing following administration of piper sarmentosum in ovariectomised rats. *Af J Phar Pharmacol*. 2012;63:148-56.
20. Young TQ, Matsuda M, Takekawa M, Ohtsubo S, Tsuyama K, Kita S. Morphological changes of autoclaved autogenic bone implantation and autoclaved autogenic bone supplemented with allogenic demineralized bone matrix in rat parietal bone. *Histol Histopathol*. 1996;11-361-9.
21. Brinker R, O'Connor P. Basic Science. In: Review Of Orthopaedic. 5<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008:1-9.
22. Eurotherm-lifesciences. Autoclave sterilization. Available at : <http://www.eurotherm-lifesciences.com/applications/sterilization/>. Oct.2007.