

## Perbandingan Tingkat Penyembuhan Defek Kortikal Tibia Kelinci yang Diselubungi Membran Amnion Liofilisasi Dibandingkan Periosteum

Bangkit Primayudha, Nucki Nursjamsi Hidajat, Fachry A. Tandjung, Dicky Mulyadi

Departemen Orthopaedi dan Traumatologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran/  
Rumah Sakit Umum Dr. Hasan Sadikin, Bandung, Indonesia

### Abstrak

Pada kasus defek tulang disertai hilangnya periosteum dapat menggunakan lapisan lain, yaitu membran amnion liofilisasi, yang merupakan *biodegradable tissue engineering* yang mengandung berbagai macam *growth factor* bersifat osteoinduktif dan lapisan membran basal yang berfungsi mencegah lolos berbagai jenis mikroorganisme dan sel nonosteogenik ke dalam defek tulang. Penelitian ini merupakan uji eksperimental hewan yang bertujuan untuk mengetahui peranan membran amnion liofilisasi dibandingkan dengan periosteum pada penyembuhan defek tulang panjang yang diberikan tandur tulang *autograft* secara radiologis dengan skor Lane-Shandu dan histopatologis dengan skor Salked. Kelinci dibagi menjadi dua kelompok yang dilakukan defek sebesar 5 mm pada tulang tibia, stabilisasi dengan mini plate 2.0 mm, diberikan *autogenic bone graft*, pada kelompok I diselubungi dengan membran amnion liofilisasi, kelompok II dijahitkan kembali perisosteumnya. Empat minggu setelah perlakuan, tulang tibia dianalisis secara radiologis dan histopatologis. Hasil statistik dengan menggunakan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui adanya perbedaan di antara dua kelompok, didapatkan nilai  $p=0.634$  pada skor Lane-Shandu dan nilai  $p=0.823$  pada skor Salked, yaitu tidak ada perbedaan yang signifikan diantara kedua kelompok. Kesimpulan penelitian ini bahwa tingkat penyembuhan defek kortikal tulang panjang dengan *autograft* yang diselubungi Membran Amnion Liofilisasi hasilnya sama dengan Periosteum yang dinilai secara radiologis dan histopatologis

**Kata Kunci :** Defek Tulang, Membran Amnion Liofilisasi, Periosteum

## *Comparison Of The Healing Rates In Cortical Tibial Defect Rabbit Covered By Lyophilized Amniotic Membrane Compared To Periosteum*

### Abstract

*The defect in long bone is one of the problems that is still difficult to treat in orthopaedic, it requires an act of reconstruction procedure and bone graft. In the case of bone defect with loss of periosteum, it can use another layer, Lyophilized Amniotic Membrane, which is biodegradable tissue engineering that contains various osteoinductive growth factors and membrane basal layer which function to prevent escaping various types of microorganisms and nonosteogenic cells into bone defects. This study is an experimental animal test which aims to determine the role of Lyophilized Amniotic Membrane compared to periosteum in bone defect healing assessed by radiologically with Lane-Shandu scores and histopathologically with Salked score. Rabbit were divided into two groups with a 5 mm defect in the tibia rabbit, stabilization with a 2.0 mm mini plate, given autogenic bone graft, in group I covered with Lyophilized Amniotic Membrane and group II with periosteum, four weeks after treatment, the tibia bone was analysed radiologically and histopathologically. The statistical results using Mann-Whitney test to determine between two groups, obtained p value 0.634 in Lane-Shandu score and p value 0.823 in Salked score, that there were no significant differences between the two groups. Conclusion of this study, that Healing rates of cortical long bone defect with autograft covered by Lyophilized Amniotic Membrane same with Periosteum which assessed radiologically and histopathologically*

**Keywords :** Bone Defect, Lyophilized Amniotic Membrane, Periosteum

---

### Korespondensi:

**Bangkit Primayudha, dr**

Departemen Orthopaedi dan Traumatologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran/  
Rumah Sakit Umum Dr. Hasan Sadikin, Bandung, Indonesia

Jl. Pasteur No. 38, Kota Bandung, 40161

Mobile : 081226499464

Email : [tts.bangkit@gmail.com](mailto:tts.bangkit@gmail.com)

## Pendahuluan

Defek tulang pada tulang panjang merupakan salah satu masalah yang masih sulit ditangani di bidang orthopaedi, membutuhkan prosedur operasi berkali-kali, penanganan yang berkepanjangan, menyakitkan dan ketidakpastian sehingga dihubungkan dengan morbiditas, berkurangnya kualitas hidup, berpengaruh pada psikologis hingga sosioekonomi pasien. Defek tulang yang terjadi di Rumah Sakit pada tahun 2017 sebanyak 447 kasus. Paling sering terjadi disebabkan karena trauma dengan energi yang tinggi, infeksi tulang, reseksi keganasan tulang termasuk metastasis dan tidak adekuatnya pemasangan fiksasi internal.<sup>1</sup>

Penanganan defek tulang yang relatif kecil berukuran kurang dari 5 cm dengan jaringan lunak yang masih memadai biasanya diisi dengan menggunakan tandur tulang kanselus secara *autologus* atau tandur tulang pengganti secara *heterologous*. Sedangkan bila berukuran lebih dari 5 cm dengan atau tanpa defek pada jaringan lunak, membutuhkan penanganan khusus berupa tandur tulang fibula bervaskularisasi (*vascularized fibular grafting*) dengan osteogenesis distraksi atau menggunakan internal bone transport dengan fiksasi eksternal (teknik Ilizarov).<sup>2</sup>

Pada keadaan defek tulang yang disertai hilangnya periosteum, dibutuhkan lapisan pengganti lain, salah satu yang dapat digunakan berupa *Tissue-engineering* menggunakan material *biodegradable* dapat menjadi alternatif untuk pembentukan konstruksi jaringan, dengan keuntungan lebih mudah terdegradasi dan bersifat nonimmunogenik. Salah satu biomaterial yang digunakan adalah membran amnion liofilisasi.<sup>3,4</sup>

Membran ini memiliki 2 lapisan penting yaitu membran basalis dan lapisan stroma. Pada lapisan stroma mengandung berbagai macam

komponen *growth factor*, sedangkan lapisan membran basalis berfungsi sebagai segel untuk mikroorganisme dan berbagai jenis jaringan dengan regenerasi cepat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan tingkat penyembuhan defek kortikal tulang tibia kelinci Selandia Baru diberikan tandur tulang *autograft* yang diselubungi dengan Membran Amnion Liofilisasi dibandingkan dengan Periosteum dinilai secara radiologis dan histopatologis.<sup>5</sup>

## Metode

Penelitian dilakukan di laboratorium hewan Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran pada bulan Maret 2019 – April 2019 dan telah disetujui oleh komisi etik penelitian Universitas Padjadjaran pada tanggal 6 Februari 2019 (139/UN6.KEP/EC/2019). Penelitian ini bersifat eksperimental dengan metode sampel rancang acak lengkap (*completely randomize design*) dengan menggunakan 34 ekor kelinci Selandia Baru, jumlah sampel ini didapat menggunakan rumus Federer, berusia > 12 bulan, berat badan 3000-3500 gram dan dalam kondisi sehat. Seluruh kelinci dilakukan tindakan frakturisasi segmental sepanjang 5 mm pada tulang tibia kanan, pemasangan fiksasi internal dan pemberian *autograft*. Setelah dibagi menjadi dua kelompok secara acak, yaitu Pada kelompok 1 pada sisi defek diselubungi dengan membran amnion liofilisasi dan pada kelompok 2 dilakukan penjahitan kembali periosteumnya. Pada minggu ke 4 pasca operasi dilakukan terminasi pada kelinci, kemudian dilakukan pemeriksaan radiologis dan histopatologis. Penilaian radiologis menggunakan sistem skor Lane-Sandhu (tabel 1), sedangkan penilaian histopatologis menggunakan sistem skor Salkeld (Tabel 2).

**Tabel 1 Sistem skor Lane-Sandhu untuk menilai penyembuhan tulang secara radiologis<sup>6</sup>**

Kriteria gambaran radiologis	Keterangan	Skor
Derajat dari pembentukan tulang	Tidak ada pembentukan tulang baru	0
	Terbentuk tulang baru 25% dari luas defek	1
	Terbentuk tulang baru 50% dari luas defek	2
	Terbentuk tulang baru 75% dari luas defek	3
	Terbentuk tulang baru 100% dari luas defek	4
Derajat union	Garis patahan masih terlihat penuh	0
	Garis patahan masih terlihat sebagian	2
	Garis patahan sudah menghilang	4
Derajat remodelling dari cavum medulla	Tidak ada tanda remodelling	0
	Rekanalisasi cavum medulla	2
	Terbentuk struktur tulang korteks setelah rekanalisasi	4

**Tabel 2 Sistem skor Salkeld untuk menilai derajat penyembuhan tulang berdasarkan histopatologis<sup>7</sup>**

Kualitas Union	Skor
Tidak ada tanda union fibrosa atau union yang lain	0
Union fibrosa	1
Union kartilago atau fibrokartilago	2
Union kartilago termineralisasi	3
Tulang Matur	4

**Tabel 3 Deskriptif data penelitian**

Kelompok		Skor Lane-Shandu	Skor Salked
Membran Amnion Liofilisasi	Mean	2.12	2.53
	Std. Deviation	1.166	0.624
	Minimum	1	1
	Maximum	4	3
	Median	2.00	3.00
Periosteum	Mean	2.35	2.59
	Std. Deviation	1.320	0.618
	Minimum	1	1
	Maximum	5	3
	Median	2.00	3.00

## Hasil

Semua hasil foto radiologi dibaca serta dianalisis oleh dokter spesialis radiologi dan Pemeriksaan histopatologi dibaca dan dianalisis oleh dokter spesialis patologi anatomi.

Pada tabel 3 deskriptif data penelitian terlihat bahwa data skor Lane-Shandu pada kelompok Membran Amnion Liofilisasi dan kelompok Periosteum masing-masing mempunyai skor minimum 1 dan median 2. Nilai maksimum pada kelompok Lane-Shandu sebesar 4 dan untuk kelompok Periosteum sebesar 5. Adapun data skor Salked pada kelompok Membran Amnion Liofilisasi dan kelompok Periosteum masing-masing mempunyai skor minimum 1, maksimum 3 dan median 3. Dilakukan uji *Mann-Whitney* untuk skor radiologis, dihasilkan nilai mean skor Lane-Shandu kelompok Membran Amnion Liofilisasi sebesar  $2,12 \pm 1,166$  dan nilai mean kelompok Periosteum sebesar  $2,35 \pm 1,320$  dengan nilai  $p=0,634 > 0,05$  yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan nilai mean antara kelompok Membran Amnion Liofilisasi dengan Periosteum pada skor Lane-Shandu.

Pada skor histopatologis juga dilakukan uji *Mann-Whitney*, didapatkan nilai mean skor Salked kelompok Membran Amnion Liofilisasi sebesar  $2,52 \pm 0,624$  dan nilai mean kelompok Periosteum sebesar  $2,59 \pm 0,618$  dengan nilai  $p=0,823 > 0,05$  yang berarti tidak ada perbedaan yang signifikan

nilai mean antara kelompok Membran Amnion Liofilisasi dengan Periosteum pada skor Salked.

## Pembahasan

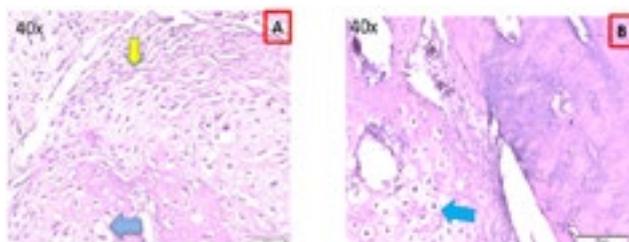
Hasil penelitian menunjukkan bahwa skor Lane-Shandu dan skor Salked pada kelompok Membran Amnion Liofilisasi dengan Periosteum tidak berbeda secara signifikan. Dari analisis data diperoleh nilai  $p=0,634$  pada skor Lane-Shandu dan nilai  $p=0,823$  pada skor Salked, yaitu tidak ada perbedaan yang signifikan diantara kedua kelompok.

Membran amnion manusia merupakan membran tipis dengan ketebalan hanya 10 – 15 mikrometer dan merupakan lapisan semi-transparan paling dalam dari membran janin. Membran ini memiliki 2 komponen penting yaitu membran basalis dan stroma. Samandari M, dkk. dalam penelitiannya menyebutkan bahwa membran amnion memiliki efek positif pada diferensiasi sel, migrasi dan invasi dari beberapa jenis sel. Hal ini memberikan sinyal mesenkim untuk penyembuhan tulang, kartilago, saraf dan tendon.<sup>5</sup>

Pada lapisan stroma membran amnion memiliki *growth factor* yang berbeda, sehingga membantu mempercepat penyembuhan luka dan menstimulasi induksi tulang. Beberapa *growth factor* memiliki peran penting dalam remodeling tulang dan berefek positif pada penyembuhan



**Gambar 1** Gambaran radiologi pada kedua kelompok. Skor 4 pada kelompok Membran Amnion Liofilisasi (gambar A) dan skor 5 pada kelompok Periosteum (gambar B)



**Gambar 2** Gambaran histopatologi pada kedua kelompok. Skor 2 pada kelompok Membran Amnion Liofilisasi (gambar A) dan skor 3 pada kelompok Periosteum (gambar B). Sel kartilago (panah biru) dan sel fibrosa (panah kuning)

patah tulang. FGF (*Fibroblast Growth Factor*) berperan penting pada fase awal proses penyembuhan fraktur karena mempercepat pembentukan pembuluh darah baru, serta mengatur dan meningkatkan ekspresi dari aktifitas osteoblas dan menstimulasikan penyembuhan tulang dengan menstimulasi remodeling pada tulang. Beberapa penelitian membuktikan bahwa FGF dasar meningkatkan volume dan masa kalus pada tulang.<sup>5,8</sup>

TGF (*Transforming Growth Factor*) berperan pada regulasi dan stimulasi prekursor sel mesenkim untuk kondrosit dan osteoklas, serta menstimulasi proliferasi osteoblas pada fase proliferasi sel penyembuhan tulang. Membran amnion liofilisasi menyediakan membran basal yang mendorong migrasi dan diferensiasi sel, mengurangi peradangan pada area di bawah membran dan bertindak sebagai segel yang mencegah lolos berbagai jenis mikroorganisme ke dalam defek tulang, dan berbagai jenis jaringan dengan kapasitas regenerasi cepat (seperti jaringan epitel dan jaringan ikat) masuk ke dalam defek tulang yang dapat menghambat potensi osteogeniknya.<sup>8,9</sup>

Pada kelompok I dan kelompok II berdasarkan pemeriksaan radiologis dengan sistem skoring Lane-Sandhu, pada kedua kelompok didapatkan skor 1, 2 dan 4 dengan distribusi angka yang hampir sama, tetapi pada kelompok II didapatkan satu sampel dengan skor 5, yaitu: terbentuknya tulang baru sebesar 75% dari luas defek dan garis

patahan masih terlihat sebagian. Berdasarkan pemeriksaan histopatologis dengan sistem skoring Salkeld, didapatkan skor 1, 2, 3 dengan distribusi angka yang hampir sama, untuk skor 3 yaitu terdapat tanda union mineralisasi kartilago. Rios, dkk. dalam penelitiannya membandingkan efek membran amnion liofilisasi dengan membran kolagen pada penyembuhan defek tulang femur kelinci, hasilnya pada defek tulang yang diselubungi dengan membran amnion lebih tinggi densitas dan pembentukan tulang barunya dibandingkan dengan membran kolagen. Penelitian yang dilakukan oleh Kumar, dkk. untuk mengevaluasi membran amnion dengan tandur tulang pada penanganan defek interdental, didapatkan bahwa membran amnion meningkatkan jumlah pembentukan tulang pada defek dan menurunkan inflamasi yang dilihat pada menurunnya jumlah interleukin 1 $\beta$  pada cairan celah gusi.<sup>10,11</sup>

Penelitian lain yang dilakukan Go, dkk. dengan memeriksa efek dari setiap ekstraksi membran amnion dan ekstraksi membran korion pada diferensiasi *osteoblast like cells* secara *in vitro*. Mereka menemukan bahwa ekstraksi keduanya dapat meningkatkan diferensiasi osteogenic dari sel secara *in vitro*. Pada ekstraksi membran amnion mengandung *epidermal growth factor* (EGF) yang secara negatif meregulasi diferensiasi osteogenic dari sel secara *in vitro*. *Co-culture* kedua ekstraksi tersebut menyebabkan menurunnya mineralisasi dari matriks ekstraselular dari sel osteogenic secara *in vitro*.<sup>12</sup> Hasil berkebalikan didapatkan

dari penelitian yang dilakukan Khalil, dkk. bahwa membran amnion liofilisasi tidak cocok untuk meningkatkan kualitas penyembuhan tulang ketika digunakan sebagai materi untuk mengisi defek tulang. Hal ini dapat disebabkan beberapa faktor yaitu, bentuk liofilisasi (kering beku) bukan bentuk segar yang mengandung *stem cell* dengan potensi regeneratif. Pada penelitian ini menggunakan membran amnion untuk mengisi defek tulang bukan digunakan sebagai selubung di luar defek tulang.<sup>13</sup>

Keterbatasan penelitian ini, yaitu hanya menilai kualitas penyembuhan tulang pada satu waktu 4 minggu pasca operasi, tidak pada periode waktu yang berbeda. Penelitian ini hanya menggunakan penilaian penyembuhan tulang secara radiologis dan histopatologis saja, sedangkan metode penilaian lain dengan parameter biokimia, test biomekanik dan analisa ekspresi gen tidak dilakukan, padahal metode-metode tersebut dapat meningkatkan hasil yang lebih meyakinkan namun meningkatkan kebutuhan biaya penelitian.

Kesimpulan pada penelitian ini bahwa tingkat penyembuhan defek kortikal tulang tibia kelinci yang diselubungi dengan membran amnion liofilisasi hasilnya sama dengan periosteum pada penyembuhan fraktur defek tulang panjang yang diberikan tandur tulang *autograft* yang dinilai dengan sistem skoring Lane-Shandu secara radiologis dan skoring Salkeld secara histopatologis. Saran penelitian ini, yaitu perlu dilakukan penelitian dengan periode waktu yang lebih bervariasi untuk melihat proses penyembuhan tulang hingga terjadi union. Perlu dilakukan penelitian menggunakan berbagai jenis tandur tulang seperti *autograft*, *allograft* dan *synthetic bone graft* untuk melihat respon Membran Amnion Liofilisasi dengan berbagai jenis tandur tulang tersebut pada proses penyembuhan defek tulang panjang.

## Daftar Pustaka

1. Wiese A, Pape H. Bone defects caused by high-energy injuries, bone loss, infected nonunions, and nonunions. Department of Orthopedic Trauma, Aachen University Medical Center, Pauwelsstr, Aachen, Germany. 2010; 41(1): 1-4.
2. Brydone A, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials and the clinical need for bone engineering. Southern General Hospital, Glasgow, UK. 2010; 224: 1329-43.
3. Mikael S, Schwartz J, Daniel A. Evaluation of Amniotic-Derived Membrane Biomaterial as an Adjunct for Repair of Critical Sized Bone Defects. Department of Orthopaedic Surgery, Manhasset, New York, USA. 2014; 10(1): 15-19.
4. Ramuta T, Kreft M. Human Amniotic Membrane and Amniotic Membrane-Derived Cells: How Far Are We from Their Use in Regenerative and Reconstructive Urology. Faculty of Medicine, Institute of Cell biology, University of Ljubljana, Ljubljana, Slovenia. SAGE journal. 2018; 27(1): 77-92.
5. Samandari M, Adibi S, Khoshzaban A. Human amniotic membrane, best healing accelerator, and the choice of bone induction for vestibuloplasty technique an animal study. Dove Press Journal. 2011; 3: 1-8.
6. Tawonsawatruk T, Hamilton D, Simpson A. Validation of the Use of Radiographic Fracture-Healing Scores in a Small Animal Model. Department of Trauma and Orthopaedics, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom. Journal of Orthopaedic Research. 2014; 32(2): 1117-1119.
7. Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. J Bone Joint Surg Am. 2001; 83-A(6): 803-16.
8. Koizumi N et al. Growth Factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. Curr Eye Res. 2004; 20(3): 173-7.
9. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M. Properties of The Amniotic Membrane For Potential Use In Tissue Engineering. European Cells and Materials Journal. 2011; 15: 88-99.
10. Ríos LK, Espinoza CV, Alarcón M, Huamani JO. Bone density of defects treated with lyophilized amniotic membrane versus collagen membrane: a tomographic and histomorphogenic study in rabbit's femur. Journal Oral Research. 2014; 3(3): 143-9.
11. Kumar A, Chandra RV, Reddy AA, Reddy BH, Reddy C, Naveen A. Evaluation of clinical, antiinflammatory and antiinfective properties of amniotic membrane used for guided tissue regeneration: a randomized controlled trial. Dental Research Journal. 2015; 12(2): 127.
12. Go YY, Kim SE, Cho GJ, Chae S-W, Song J-J. Differential effects of amnion and chorion membrane extracts on osteoblast-like cells due to the different growth faktor composition of the extracts. Public Library of Science One. 2017; 12(8): 51-70.
13. Khalil NM, Melek LN. Histologic and histomorphometric evaluation of lyophilized amniotic membrane in bone healing: An experimental study in rabbit's femur. Future Dental Journal. 2018; 4(2): 205-210.