

## EFEK APLIKASI *HUMAN* LAKTOFERIN TOPIKAL TERHADAP PROSES PENYEMBUHAN DEFEK TULANG (Kajian pada Tikus Wistar dengan Analisis Histomorfometri)

Franciskus W. Praba\*, Bambang Dwirahardjo\*\*, dan Rahardjo\*\*

\*Program Studi Bedah Mulut, Program Pendidikan Dokter Gigi Spesialis, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

\*\*Bagian Bedah Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

### ABSTRAK

**Latar belakang.** Laktoferin, selain memiliki efek antimikrobal, melindungi permukaan jaringan mulut, elemen gigi dan mukosa juga mampu menginduksi aktivitas osteoblastik dan menghambat aktivitas osteoklastik. Namun sampai saat ini belum ada penelitian yang menguji peranan laktoferin dalam meningkatkan aktivitas formasi tulang pada tahap penyembuhan. **Tujuan.** Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk menguji perbedaan aktivitas formasi tulang pada aplikasi laktoferin secara topikal terhadap defek tulang tikus wistar (*Rattus norvegicus*) dan menentukan pada tahap penyembuhan apa, laktoferin tersebut bekerja. **Metode.** *Randomized posttest only control group design* dilakukan pada 18 tikus Wistar jantan usia 12 minggu. Perlakuan dibuat dengan mengebor mandibula dengan kedalaman 2mm kemudian diaplikasikan 1,5µg/mL gel laktoferin. Pengamatan aktivitas formasi tulang dilakukan pada 3 tahap penyembuhan, hari ke-7, 21, dan 42 setelah perlakuan. Pewarnaan HE dilakukan untuk mengamati stereologi tiga dimensi variabel trabekula, sedangkan TRAP dilakukan untuk mengamati osteoklas. Hasil pengamatan kedua pewarnaan digunakan untuk analisis histomorfometri. **Hasil.** ANOVA dua jalur menunjukkan perbedaan yang bermakna pada *Trabecular Volume Percentage* (Tb.BV/TV) ( $p < 0,0001$ ), *Mean Trabecular Plate Density* (MTPD) ( $p < 0,0001$ ), *Mean Trabecular Plate Separation* (MTPS) ( $p < 0,0001$ ), dan *Active Resorption Surface* (ARS) ( $p = 0,0012$ ) antara kelompok perlakuan dan kontrol pada setiap tahap penyembuhan. Sedangkan *Mean Trabecular Plate Thickness* (MTPT) hanya berbeda bermakna antara kelompok perlakuan dan kontrol ( $p < 0,0001$ ), namun tidak berbeda bermakna pada setiap tahap penyembuhan. Nilai variabel Tb.BV/TV, MTPT, dan MTPD pada kelompok perlakuan di setiap tahap penyembuhan lebih kecil daripada kelompok kontrol. Sebaliknya, nilai MTPS dan ARS pada kelompok perlakuan disetiap tahap penyembuhan lebih besar pada kelompok kontrol dan meningkat pada setiap tahapnya. **Kesimpulan.** Aplikasi laktoferin secara topikal dapat meningkatkan aktivitas formasi tulang pada seluruh variabel di setiap tahap penyembuhan terutama pada tahap remodeling.

**Kata kunci :** Laktoferin, aplikasi topikal, histomorfometri, tahap penyembuhan tulang, tahap remodeling

### ABSTRACT

**Background.** Lactoferrin, in addition to having antimicrobial effect and protect the surface tissues of the mouth, teeth and mucous, it was also believed to induce osteoblastic activity and inhibit osteoclastic activity. However, there was no study has tested the role of lactoferrin in increasing bone formation activity in the healing stages. Therefore the **objective** of our study is to observe the differences of bone formation increasing activity in the topical application of lactoferrin on Wistar rats (*Rattus norvegicus*) bone defect in the healing stages. **Method.** *Randomized post test only control group design* performed in 18 male Wistar rats aged 12 weeks. The defect was made with a 2mm depth drilling in mandible and was applied 1,5µg/mL lactoferrin gel. The observation of bone formation activity performed on 3 stages of healing, i.e: day 7, 21, and 42 after drilling. HE staining was conducted to observe the three-dimensional stereologi trabecular variables, whereas TRAP performed to observe osteoclasts variables. The results of both staining observation was used for histomorfometri analysis. **Results.** Multivariate ANOVA showed significant differences in *Trabecular Volume Percentage* (Tb.BV/TV) ( $p < 0.0001$ ), *Mean Trabecular Plate Density* (MTPD) ( $p < 0.0001$ ), *Mean Trabecular Plate Separation* (MTPS) ( $p < 0.0001$ ), and *Active Surface resorption* (ARS) ( $p = 0.0012$ ) between the treatment and control groups at each stage of healing. While *Mean Trabecular Plate Thickness* (MTPT) only significant difference between treatment and control groups ( $p < 0.0001$ ), but not significantly different at each stage of healing. Tb.BV/TV variable values, MTPT, and MTPD in the treatment group at each stage of healing is smaller than the control group. In contrast, the value of MTPS and ARS in the treatment group at each stage of healing was greater in the control group and increased in each of the stages. **Conclusion.** Topical application of lactoferrin enhances bone formation activity in all the variables in each stage of healing, especially at this stage of remodeling.

**Keywords:** Lactoferrin, topical application, histomorfometri, bone healing stages, remodeling phase

### PENDAHULUAN

Di dalam saliva terdapat berbagai komponen yang berperan melindungi permukaan jaringan mulut, baik elemen gigi maupun mukosa. Saliva mengandung komponen spesifik yang

mampu melindungi jaringan mulut dari infeksi bakteri dan virus. Beberapa protein dalam saliva yang diidentifikasi sebagai antibakteria adalah IgAs, sistem laktoferoksidase dan tiosianat. Sistem laktoferoksidase dalam saliva ada 3 macam yang bersifat antibakteria, yaitu: sia-

loperoksidase, lisozim, dan laktoferin; dan yang bersifat antikandida adalah histatin. Laktoferin adalah protein pengikat ion yang menghalangi proliferasi bakteri yang membutuhkan besi untuk metabolismenya [1].

Laktoferin atau laktotransferin dapat ditemukan dalam kolostrum air susu mamalia. Laktoferin diproduksi kelenjar eksokrin pada mukosa bronkus, saliva, sekresi hidung, air mata, empedu hati, pankreas, servikal mukosa dan urin [2]. Susu adalah cairan yang banyak mengandung faktor pertumbuhan dan nutrisi pada saat pertumbuhan tulang yang sangat cepat dan perkembangan pada saat neonatus, oleh karena itu susu dianggap sebagai salah satu faktor yang memberikan efek anabolik pada tulang. Investigasi dari fraksi *protein whey* yang diekstrak dari susu adalah laktoferin sebagai faktor tulang-aktif. Laktoferin adalah glikoprotein pengikat besi yang ada di dalam susu dan dalam sekresi epitel lainnya. Laktoferin juga memiliki beberapa peran dalam regulasi besi di situs lokal peradangan dan infeksi [3] dan penyerapan zat besi adalah bagian penting dari perannya baik sebagai antioksidan dan agen antimikrobia [4].

Laktoferin merupakan faktor pleiotropik yang memiliki banyak aktivitas biologi, yaitu: aktivitas mikrobial dan fungsinya sebagai regulator dari respon imun. Aktivitas mikrobial laktoferin dibagi menjadi dua mekanisme. Pertama, laktoferin mengikat besi pada daerah infeksi, yang merupakan ion penting untuk pertumbuhan bakteri, sehingga menimbulkan efek bakteristatik. Kedua, laktoferin berinteraksi langsung pada beberapa bakteri, virus, fungi, dan permukaan parasit yang akan menyebabkan sel lisis atau efek bakteriosid [5].

Beberapa peneliti memperkirakan bahwa laktoferin ini bekerja dengan cara bersaing dengan mikroorganisme dalam hal mengikat zat besi dari lingkungannya. Zat besi ini merupakan faktor pembatas (*limiting factor*) bagi perkembangan mikroorganisme. Setiap molekul laktoferin dapat mengikat dua ikatan Fe, Zn, Cu, dan logam lain [2]. Laktoferin merupakan faktor pleiotropik dengan aktivitas antimikrobia dan imunomodulator kuat, dan menunjukkan efek anabolik dalam tulang pada konsentrasi fisiologis [6].

Pada perkembangan tulang dan perbaikan fraktur tulang mandibula meliputi koordinasi beberapa tahap seperti migrasi, diferensiasi, dan aktivasi beberapa jenis sel dan jaringan [7].

Perkembangan mikrovaskularisasi dan mikrosirkulasi sangat penting untuk homeostasis dan regenerasi hidup tulang, tanpa itu, jaringan hanya akan berdegenerasi dan mati [8].

Laktoferin menginduksi proses proliferasi dari osteoblas primer dan jalur sel osteoblastik serta meningkatkan diferensiasi osteoblas pada konsentrasi fisiologis. Dalam kultur selama tiga minggu osteoblas primer janin tikus, laktoferin dosis tunggal meningkatkan diferensiasi osteoblas dengan meningkatkan deposisi matriks tulang [9]. Pada tahap awal diferensiasi osteogenik sel mesenkim pluripoten, laktoferin berperan dalam menghambat diferensiasi adipogenik [10]. Laktoferin juga menurunkan apoptosis dengan menginduksi penarikan serum kembali pada osteoblas primer pada tikus (Grey dkk, 2006). Pada osteoklas, laktoferin menghambat pengembangan osteoklas matur dengan mekanisme bebas dari sistem aktivator reseptor NF- $\kappa$ B (RANK)/RANK-ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) [11].

Efek laktoferin pada sel prekursor osteogenik tulang adalah: (1) Menginduksi proliferasi osteoblas primer dan *osteoblastic-cell lines*; (2) Merangsang diferensiasi osteoblas *in vitro*; (3) Melindungi osteoblas dari apoptosis dengan penarikan serum *low density lipoprotein receptor related protein 1* (LRP-1); (4) Menghambat resorpsi tulang dengan menghambat perkembangan dan aktivitas osteoklas; (5) Meningkatkan formasi tulang dan rasio aposisi mineral pada penelitian dengan injeksi lokal.

Penyembuhan tulang mandibula karena fraktur atau defek merupakan mekanisme kompleks yang saling berkesinambungan dan melibatkan aktivitas osteoblastik dan osteoklastik. Aktivitas osteoblastik adalah proses formasi tulang yang terdiri dari proliferasi, pematangan matriks, dan mineralisasi matriks, sedangkan aktivitas osteoklastik adalah proses resorpsi tulang [12].

Pengamatan aktivitas osteoblastik dan osteoklastik ini menggunakan variabel histomorfometri berasal dari pengukuran primer yang dibuat di mikroskop, seperti: area dan perimeter tulang kortikal dan trabekula. Nomenklatur, derivasi matematika dan unit telah distandarkan oleh *American Society of Bone and Mineral Research* [13]. Parameter histomorfometrik umumnya dibagi menjadi dua kategori: struktural dan remodeling, dengan yang terakhir dibagi

menjadi parameter statis dan dinamis. Keunggulan penggunaan histomorfometri tiga dimensi dalam metode pemeriksaan tulang di tingkat seluler yang menganalisis secara kuantitatif perubahan mikrostruktur tulang berdasarkan variabel-variabel pada indeks statis dan dinamis tulang [14].

Dalam analisis histomorfometri Kimmel dkk (1990) menyatakan proses formasi tulang ditunjukkan dengan adanya peningkatan *Trabecular Bone volume* (BV/TV), *Mean Trabecular Plate Density* (MTPD), *Mean Trabecular Plate Thickness* (MTPT), *Volume Osteoid* (ROV dan ROS). Proses resorpsi ditandai dengan peningkatan *Mean Trabecular Plate Separation* (MTPS) dan jumlah osteoklas pada permukaan trabekula atau *Active Resorption Surface* (ARS) [15].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan informasi perbedaan proses penyembuhan dengan melihat peningkatan aktivitas formasi tulang pada pemberian laktoferin secara topikal terhadap defek tulang tikus wistar (*Rattus norvegicus*). Untuk menentukan tahap penyembuhan defek tulang mandibula tikus wistar (*Rattus norvegicus*) setelah pengaplikasian laktoferin secara topikal.

## METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni (*true experimental study*) pada tikus wistar dengan desain "*Randomized Post test only control group design*" yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian. Penelitian hewan coba dalam penelitian ini mengikuti *animal ethics*. Proposal telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada dan RSUP Dr. Sardjito (Protokol 2014/KE/FK/739/EC).

Delapan belas tikus dibagi menjadi 2 grup, yaitu : kelompok kontrol, kelompok perlakuan laktoferin. Grup tersebut dibagi menjadi 3 kelompok hari pengamatan, sesuai tahapan penyembuhan yakni hari ke 7 (fase inflamasi), 21 (fase proliferasi) dan 42 (fase remodelig). Masing-masing kelompok adalah 3 tikus

Defek dibuat dengan cara mengeburi tulang pada daerah diastema mandibula kiri tikus wistar dengan bur tulang diameter dan kedalaman 2 mm sampai tulang trabekula. Volume de-

fek dihitung dengan rumus  $\frac{1}{2} \times \frac{4}{3} \pi r^3$  sehingga didapatkan angka 2,08  $\mu\text{L}$ . *Human* laktoferin yang didapatkan dari Sigma Aldrich, Jerman yang dikomposisikan dalam gel karboksimetil selulosa dengan konsentrasi 1,5  $\mu\text{g/mL}$ . Laktoferin 0,15mg ditambah dengan 2 gram karboksimetil selulosa dicampurkan dalam 100 mL aquadest untuk mendapatkan gel laktoferin 1,5  $\mu\text{g/mL}$  konsentrasi polimer 2% (w/w). Aplikasi gel topikal pada defek tulang 4 $\mu\text{L}$  dengan menggunakan mikropipet, kemudian lesi dijahit dengan benang nilon 5/0. Pemberian analgesik parasetamol oral dengan dosis 45 mg/kgBB dibagi dalam dua dosis pemberian selama 3 hari.

Tiga tikus dari tiap-tiap grup didekapitasi dengan inhalasi eter sesuai hari pengamatan. Setelah difiksasi dengan Paraformaldehid 4% dengan pH 7,4 selama 24 jam, kemudian didekalsifikasi dengan EDTA selama lima belas hari dalam inkubator dengan suhu 37°C Pembedahan koronal dengan ketebalan seksi yang dipotong dengan interval 5 $\mu\text{m}$  dengan mikrotom putar sebanyak 10 potongan terutama pada daerah perbatasan korteks dan trabekula tulang. Pewarnaan hematoksilin eosin stereologi tiga dimensi pada 6 potongan lapang pandang tiap object glass, kemudian diaplikasikan untuk perhitungan terkoreksi indeks statis dengan analisis histomorfometri. Empat potongan berikutnya diletakkan di object glass polysine untuk pewarnaan enzim TRAP, kemudian dilakukan penghitungan terkoreksi indeks semidinamis.

Pengamatan menggunakan mikroskop yang dilengkapi kamera optilab dengan panjang kerja 10 mm dan magnifikasi 100x sehingga didapatkan 1,562 piksel/ $\mu\text{m}$ . Pengambilan gambar ditentukan dari analisis semidinamis pewarnaan TRAP untuk pemetaan histomorfometri stereologi tiga dimensi. Analisis histomorfometri meliputi nilai dasar dan nilai bentukan.

Perbedaan B.Ar, Tb.Ar, Tb.Pm, Oc.Pm, BV/TV, MTPT, MTPD, MTPS dan ARS antar kelompok diuji menggunakan uji ANOVA *post hoc test* Bonferroni dan uji korelasi Pearsons. Batas derajat kemaknaan adalah apabila variabel yang dianalisis mempunyai nilai  $p \leq 0,05$  dengan 95% interval kepercayaan. Seluruh analisis data dilakukan dengan program komputer *statistical analysis system* (SAS) Ver. 9.1.

## ANALISIS HISTOMORFOMETRI

### Nilai dasar

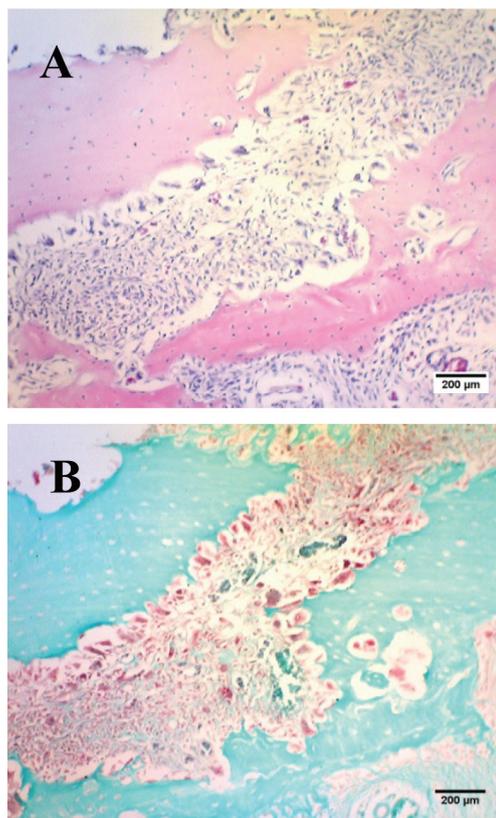
Target pengukuran meliputi trabekula sebagai objek pengukuran aktivitas osteoblas dalam proses formasi tulang, sedangkan jumlah permukaan osteoklas sebagai objek pengukuran osteoklas dalam proses resorpsi tulang. Variabel nilai dasar: B.Ar (Luas tulang rahang), Tb.Ar (Luas tulang trabekula), Tb.Pm (Luas tulang trabekula), Oc.Pm (Keliling tulang trabekula),

### Nilai bentukan

Nilai yang didapat dari kalkulasi nilai dasar yang berpengaruh lebih berarti secara biologi. Nilai bentukan terdiri dari dua parameter, yaitu: **Parameter Struktural** memberikan informasi tentang massa tulang dan struktur. Parameter-parameter ini berkaitan dengan geometri tiga dimensi dari tulang dan dihitung dari pengukuran daerah tulang total dan perimeter tulang total. Penilaian struktur tulang penting, karena menilai hubungan dengan kekuatan tulang (Dempster dkk, 1993). **Parameter Remodeling** merupakan parameter semidinamis dan memberikan informasi tentang jumlah tulang unmineralized (osteoid) dan tingkat rongga resorpsi (*Howships' lacunae*). Variabel nilai bentukan: Tb.BV/TV (Volume trabekula), MTPT (*Mean Trabecular Plate Thickness*) =  $2 / (BS/BV)$ ; MTPD (*Mean Trabecular Plate Density*) =  $(BV/TV) / Tb.Th$ ; MTPS (*Mean Trabecular Plate Separation*) =  $(1/Tb.N) - Tb.Th$ ; dan ARS (*Active Resorption Surface*).

## HASIL PENELITIAN

Nilai dasar dan nilai bentukan variabel-variabel indeks statis dan semidinamis histomorfometri tulang diperoleh dari pengukuran mikrostruktur tulang hasil dua pewarnaan yaitu Hematoksilin Eosin dan enzim TRAP (Gambar 1). Pewarnaan Hematoksilin Eosin dapat membedakan antara matriks tulang yang belum dan telah termineralisasi. Histomorfometri mengukur matriks tulang trabekula (Tb), yang merupakan indeks statis hasil aktivitas osteoblas, sedangkan indeks semidinamis untuk aktivitas osteoklas diperoleh dengan metode histokimia pewarnaan enzim TRAP untuk mendeteksi osteoklas dalam proses resorpsi tulang [12].



**Gambar 1.** A. Mikrostruktur tulang dengan pewarnaan dengan HE. 12B. Pewarnaan dengan histokimia TRAP, warna merah merupakan penanda positif osteoklas

### 1. Trabekula

Keutuhan mikrostruktur tulang sangat ditentukan oleh keseimbangan proses remodeling tulang yang mencakup proses formasi dan resorpsi tulang. Kedua proses ini dipengaruhi oleh keseimbangan metabolisme osteoblas dan osteoklas. Laktoferin berperan dalam keseimbangan metabolisme tulang. Tabel rerata dan kesalahan baku nilai dasar indeks statis trabekula disajikan di bawah dalam Tabel 1,2, dan 3.

Penghitungan ANOVA pada tabel deskriptif nilai dasar indeks statis trabekula variabel B.Ar (Tabel 1) tidak ditemukan perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan maupun tahap-tahap penyembuhan. Hal ini dapat disimpulkan bahwa laktoferin tidak mempengaruhi nilai dasar variabel B.Ar.

Tabel deskriptif penghitungan ANOVA nilai dasar indeks statis trabekula variabel Tb.Ar (Tabel 2) menunjukkan bahwa tidak ada perbe-

daan efek pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ( $p=0,0002$ ) namun terdapat perbedaan bermakna pada tahap penyembuhan saja dan tidak ada hubungan interaksi antar grup.

Tabel deskriptif penghitungan ANOVA nilai dasar indeks statis trabekula variabel Tb.Pm (Tabel 3) menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ( $P=0,7961$ ) namun memberikan efek pada tahap penyembuhan ( $P<0,0001$ ) dan tidak ada hubungan interaksi antar grup.

Uji lanjut Bonferonni pada variabel Tb.Ar dan Tb.Pm menunjukkan bahwa laktiferin mulai memberikan efek yang berbeda pada tahap proliferasi. Variabel Tb.Ar memiliki hubungan korelasi dengan variabel Tb.Pm yang sangat kuat ( $p<0,01$ ) pada uji korelasi Pearson pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan kecil pada variabel Tb.Ar akan mempengaruhi variabel Tb.Pm.

Nilai dasar indeks statis ini kemudian dikonversikan dengan formula matematika yang telah ditetapkan oleh *American Society of Bone and Mineral Research* untuk mendapatkan nilai bentukan Tb. BV/TV, MTPT, MTPD, MTPS. Nilai bentukan tersebut disajikan dalam Tabel 6, 7, 8, dan 9 dibawah ini.

Tabel deskriptif rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks statis trabekula variabel Tb.BV/TV (Tabel 4) menunjukkan bahwa penghitungan ANOVA memberikan perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan ( $P<0,0001$ ) maupun tahap-tahap penyembuhan ( $P<0,0001$ ). Hubungan interaksi antar grup variabel Tb.BV/TV positif, berbeda bermakna pada tiap-tiap grup menjadi empat kelompok penghitungan (a,b,c,d).

Tabel deskriptif rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks statis trabekula variabel MTPT (Tabel 5) menunjukkan bahwa penghitungan ANOVA memberikan perbedaan

**Tabel 1.** Rerata dan kesalahan baku nilai dasar indeks statis trabekula variabel B.Ar

G	H1 inflamasi	H2 roliferasi	H3remodeling	$\bar{x}_1$	
K	0,622±0,335	0,485±0,034	0,542±0,076	0,5495 <sup>a</sup>	P=0,0715
P	0,812±0,200	0,623±0,146	0,705±0,067	0,7132 <sup>a</sup>	
$\bar{x}_2$	0,7171 <sup>a</sup>	0,5539 <sup>a</sup>	0,6232 <sup>a</sup>	Interaksi antar grup (-)	
P=0,3072					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

**Tabel 2.** Rerata dan kesalahan baku nilai dasar indeks statis trabekula variabel Tb.Ar

G	H1 inflamasi	H2proliferasi	H3remodeling	$\bar{x}_1$	
K	0,123±0,061	0,061±0,013	0,020±0,004	0,06767 <sup>a</sup>	P=0,2221
P	0,104±0,028	0,037±0,012	0,010±0,001	0,05046 <sup>a</sup>	
$\bar{x}_2$	0,11343 <sup>a</sup>	0,04902 <sup>b</sup>	0,01473 <sup>b</sup>	Interaksi antar grup (-)	
P=0,0002					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

**Tabel 3.** Rerata dan kesalahan baku nilai dasar indeks statis trabekula variabel Tb.Pm

G	H1 inflamasi	H2proliferasi	H3remodeling	$\bar{x}_1$	
K	65,133±31,941	33,941±5,630	10,390±1,803	36,488 <sup>a</sup>	P=0,7961
P	71,479±18,250	25,005±7,652	7,175±1,023	34,553 <sup>a</sup>	
$\bar{x}_2$	68,306 <sup>a</sup>	29,473 <sup>b</sup>	8,783 <sup>b</sup>	Interaksi antar grup (-)	
P<0,0001					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

**Tabel 4.** Rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks statis trabekula variabel Tb.BV/TV

G	H1 inflamasi	H2proliferasi	H3remodeling	$\bar{x}_1$	
K	0,201 ±0,019 <sup>a</sup>	0,125±0,019 <sup>b</sup>	0,036±0,002 <sup>cd</sup>	0,1206 <sup>a</sup>	P<0,0001
P	0,128±0,005 <sup>b</sup>	0,059±0,006 <sup>c</sup>	0,014±0,002 <sup>d</sup>	0,0671 <sup>b</sup>	
$\bar{x}_2$	0,1644 <sup>a</sup>	0,0919 <sup>b</sup>	0,0251 <sup>c</sup>	Interaksi antar grup (+)	
P<0,0001					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

**Tabel 5.** Rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks statis trabekula variabel MTPT

G	H1 inflamasi	H2proliferasi	H3remodeling	$\bar{x}_1$	
K	3,766±0,030	3,595±0,181	3,759±0,101	3,7065 <sup>a</sup>	P<0,0001
P	2,936±0,133	2,976±0,076	2,902±0,049	2,9380 <sup>b</sup>	
$\bar{x}_2$	3,3507 <sup>a</sup>	3,2854 <sup>a</sup>	3,3307 <sup>a</sup>	Interaksi antar grup (-)	
P=0,5744					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

**Tabel 6.** Rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks statis trabekula variabel MTPD

G	H1 inflamasi	H2proliferasi	H3remodeling	$\bar{x}_1$	
K	0,054±0,006 <sup>a</sup>	0,035±0,004 <sup>b</sup>	0,010±0,000 <sup>d</sup>	0,0327 <sup>a</sup>	P<0,0001
P	0,044±0,000 <sup>b</sup>	0,020±0,001 <sup>c</sup>	0,004±0,001 <sup>d</sup>	0,2266 <sup>b</sup>	
$\bar{x}_2$	0,0486 <sup>a</sup>	0,0275 <sup>b</sup>	0,0070 <sup>c</sup>	Interaksi antar grup (+)	
P<0,0001					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

**Tabel 7.** Rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks statis trabekula variabel MTPS

G	H1 inflamasi	H2proliferasi	H3remodeling	$\bar{x}_1$	
K	15,099±1,837 <sup>a</sup>	25,664±3,522 <sup>a</sup>	104,527±5,264 <sup>b</sup>	48,430 <sup>a</sup>	P<0,0001
P	20,360±0,493 <sup>a</sup>	47,795±3,680 <sup>a</sup>	243,972±43,57 <sup>c</sup>	101,043 <sup>b</sup>	
$\bar{x}_2$	17,73 <sup>a</sup>	36,73 <sup>a</sup>	169,75 <sup>b</sup>	Interaksi antar grup (+)	
P<0,0001					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

**Tabel 8.** Rerata dan kesalahan baku nilai dasar osteoklas variabel Oc.Pm

G	H1	H2	H3	$\bar{x}_1$	
K	20,964±8,619	10,090±3,579	15,288±1,754	15,447 <sup>a</sup>	P<0,0001
P	4,366±1,260	2,803±0,633	3,244±0,757	3,471 <sup>b</sup>	
$\bar{x}_2$	12,665 <sup>a</sup>	6,447 <sup>a</sup>	9,266 <sup>a</sup>	Interaksi antar grup (-)	
P=0,0538					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

**Tabel 9.** Rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks semidinamis osteoklas ARS

G	H1	H2	H3	$\bar{x}_1$	
K	0,195±0,015 <sup>a</sup>	0,126±0,007 <sup>a</sup>	0,299±0,005 <sup>b</sup>	0,2069	P=0,0012
P	0,155±0,004 <sup>a</sup>	0,093±0,010 <sup>a</sup>	0,214±0,002 <sup>c</sup>	0,1406	
$\bar{x}_2$	0,1547 <sup>a</sup>	0,1097 <sup>a</sup>	0,2569 <sup>b</sup>	Interaksi antar grup (+)	
P<0,0001					

Rerata dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda bermakna

yang bermakna pada antar kelompok perlakuan (P<0,0001) saja.

Tabel deskriptif rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks statis trabekula variabel MTPD (Tabel 6) menunjukkan bahwa penghitungan ANOVA memberikan perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan (P<0,0001) maupun tahap-tahap penyembuhan

(P<0,0001). Hubungan interaksi antar grup variabel MTPD positif, berbeda bermakna pada tiap-tiap grup menjadi empat kelompok penghitungan (a,b,c,d).

Tabel deskriptif rerata dan kesalahan baku nilai bentukan indeks statis trabekula variabel MTPS (Tabel 7) menunjukkan bahwa penghitungan ANOVA memberikan perbedaan yang

bermakna antar kelompok perlakuan ( $P < 0,0001$ ) maupun tahap-tahap penyembuhan ( $P < 0,0001$ ). Hubungan interaksi antar grup variabel Tb.BV/TV positif, berbeda bermakna pada tiap-tiap grup menjadi tiga kelompok penghitungan (a,b,c).

Variabel Nilai bentuk Tb.BV/TV, MTPPT, dan MTPD pada kelompok perlakuan di setiap tahap lebih kecil daripada kelompok kontrol dan nilai tahap remodeling (hari ke 42) paling kecil jika dibandingkan dengan tahap-tahap lainnya. Sebaliknya nilai variabel MTPS pada kelompok perlakuan disetiap tahap lebih besar pada kelompok kontrol dan meningkat pada setiap tahapnya. Variabel nilai bentuk Tb.BV/TV, MTPD, dan MTPS indeks statis trabekula juga menunjukkan perbedaan bermakna ( $p < 0,0001$ ) diantara kedua kelompok, tahap perlakuan, dan diantara masing-masing grup. Namun variabel MTPPT menunjukkan perbedaan bermakna hanya diantara kedua kelompok saja.

Uji lanjut Bonferroni pada variabel Tb.BV/TV, MTPD dan MTPS menunjukkan bahwa laktiferin memberikan efek yang berbeda pada kedua kelompok (kontrol dan perlakuan), pada tiap-tiap tahap penyembuhan (inflamasi, proliferasi dan remodeling), dan pada hubungan interaksi antar grup. Uji korelasi antar variabel Tb.BV/TV, MTPD, MTPS pada kelompok kontrol dan perlakuan pada nilai bentuk memiliki hubungan yang bermakna ( $p < 0,05$ ). Variabel MTPPT tidak memiliki hubungan yang bermakna dengan variabel nilai bentuk indeks statis trabekula yang lain.

#### 1. Osteoklas

Analisis secara tingkat seluler menyatakan bahwa jumlah Oc.Pm dan persentase ARS positif bewarna merah pada trabekula menurun pada tahap proliferasi dan meningkat kembali pada tahap remodeling. Tabel rerata dan kesalahan baku nilai dasar dan bentuk indeks semidinamis dengan penanda TRAP disajikan dalam Tabel 8 dan 9.

Nilai variabel Oc.Pm pada Tabel 8 kelompok kontrol dan perlakuan menggambarkan penurunan nilai pada tahap proliferasi dan meningkat kembali pada tahap remodeling. Namun kalkulasi statistik ANOVA variabel Oc.Pm memberikan hasil yang berbeda bermakna ( $p < 0,0001$ ) hanya pada di antara kelompok kontrol dan perlakuan, bukan pada tiap tahap penyembuhan.

Tabel deskriptif rerata dan kesalahan baku nilai bentuk indeks semidinamis osteoklas ARS (Tabel 9) menunjukkan bahwa penghitungan ANOVA memberikan perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan ( $P = 0,0012$ ) maupun tahap-tahap penyembuhan ( $P < 0,0001$ ). Uji lanjut Bonferroni menunjukkan bahwa variabel ARS menunjukkan perbedaan yang bermakna pada tahap remodeling. Hubungan interaksi antar grup variabel Tb.BV/TV positif, berbeda bermakna pada tiap-tiap grup menjadi tiga kelompok penghitungan (a,b,c).

Variabel Oc.Pm tidak memiliki hubungan yang bermakna dengan nilai dasar lainnya pada kelompok kontrol dan perlakuan dalam uji korelasi Pearson. Sedangkan pada variabel ARS, uji korelasi Pearson menunjukkan bahwa ARS memiliki hubungan yang kuat ( $p < 0,05$ ) dengan MTPS pada kelompok kontrol dan hubungan yang sangat kuat ( $p < 0,01$ ) dengan MTPS pada kelompok perlakuan.

## PEMBAHASAN

Bahan dekalsifikasi yang digunakan pada penelitian ini adalah bahan kelasi *ethylenediaminetetracetic acid* (EDTA). EDTA bekerja dengan menangkap ion kalsium dari permukaan kristal apatit dan perlahan-lahan mengurangi ukurannya. Karena proses ini sangat lambat tapi sangat, reagen ini sangat tepat untuk aplikasi penelitian di mana kualitas yang sangat tinggi morfologi diperlukan atau elemen molekul tertentu harus diawetkan untuk teknik seperti imunohistokimia [16]. EDTA lebih cepat bekerja di pH10 tetapi beberapa elemen jaringan dapat rusak pada pH basa, sehingga umumnya digunakan pada pH7.0 [17]. Suhu penyimpanan 37°C dapat mempercepat proses dekalsifikasi tanpa merusak jaringan daripada penyimpanan pada suhu 4°C [18].

Pemilihan waktu pengamatan hari ke 7 (inflamasi), 21 (proliferasi), dan 42 (remodeling) penelitian ini berdasarkan penelitian terdahulu [19]. Brandão dkk (2002) menganalisis histomorfometri pada penyembuhan alveolar tikus setelah pencabutan gigi dengan hidroksiapatit dan BMP. Analisis histomorfometri dilakukan dengan mengamati langsung tulang trabekula, jaringan ikat dan proporsi dari material hidroksiapatit. Hasil penelitiannya menyatakan bahwa hidroksiapatit memberikan perbedaan yang

bermakna pada tahap proliferasi. Hal ini sejalan dengan penelitian penulis, dimana pada nilai dasar variabel Tb.Ar dan Tb.Pm menunjukkan perbedaan bermakna pada tahap proliferasi. Namun setelah nilai dasar ini diolah menjadi nilai bentukan [14], variabel Tb.BV/TV dan MTPD memberikan perbedaan bermakna pada tiap tahapnya; variabel MTPS dan ARS berbeda bermakna pada tahap remodeling.

Nilai dasar indeks histomorfometri atau *primary histomorphometric indices* diperoleh secara langsung dari pengukuran tulang pada sediaan histomorfometri. Informasi dasar ini akan lebih berarti secara biologi setelah dikalkulasi menjadi nilai bentukan histomorfometri atau dikenal sebagai *secondary derived histomorphometric indices* [14]. Variabel indeks statis Tb. BV/TV mempresentasikan volume trabekula, sedangkan MTPT, MTPD, dan MTPS mempresentasikan arsitektur trabekula [13].

Laktoferin tidak memberikan pengaruh pada kelompok kontrol dan perlakuan variabel nilai dasar indeks statis trabekula Tb.Ar dan Tb.Pm, tetapi memberikan pengaruh pada tahap penyembuhan pada kedua kelompok. Penjelasan terhadap hasil penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan formasi tulang pada tahap-tahap penyembuhan dengan penurunan nilai dasar variabel Tb.Ar dan Tb.Pm bermakna pada tahap proliferasi. Laktoferin juga memberikan efek yang berbeda bermakna pada kelompok perlakuan pada variabel nilai dasar indeks semidinamis osteoklas.

Nilai dasar ini kemudian dikalkulasi dengan formula dan derivasi matematika histomorfometri menjadi nilai bentukan. Hasil penghitungan statistik menunjukkan bahwa seluruh variabel indeks statis trabekula dan indeks semidinamis osteoklas berbeda bermakna pada kedua kelompok, dan tahap-tahap penyembuhan, kecuali variabel MTPT. Variabel MTPT hanya mempengaruhi kelompok perlakuan laktoferin. Pada hasil ini dapat kita lihat peningkatan formasi tulang terjadi dengan penurunan nilai pada tahap penyembuhan dari nilai bentukan dari variabel Tb. BV/TV dan MTPD terjadi pada tiap tahap serta peningkatan nilai dari variabel MTPS dan ARS terjadi pada tahap remodeling.

Hasil analisis histomorfometri penelitian ini tidak sesuai dengan penelitian terdahulu [12] dalam penelitian hipoestrogenis tulang ilium *Macaca fascicularis* yang terpapar sinar lampu

ultraviolet beta dengan analisis histomorfometri indeks statis dan dinamis. Sulistiawati (2004) menyatakan bahwa peningkatan nilai bentukan hasil aktivitas osteoblas BV/TV, MTPD, MTPT, dan penurunan MTPS dan ARS sebagai hasil aktivitas osteoklas, dengan pengamatan magnifikasi 40x [12]. Penyebab perbedaan dengan penelitian terdahulu adalah pewarnaan histokimia enzim TRAP pada penelitian ini digunakan sebagai pemetaan pemilihan penghitungan area, dimana pewarnaan positif merah TRAP dengan densitas tertinggi (*hotspot*) menjadi acuan daerah penghitungan histomorfometri. *Hotspot* ini berpindah pada tiap tahapnya menuju ke arah luar permukaan kortikal dan pengamatan dengan magnifikasi 100x untuk pemeriksaan tulang mandibula.

Hal ini dapat diasumsikan bahwa trabekula yang kaya akan fibroblas mengisi ruang kosong akibat perlukaan tulang kemudian berdiferensiasi menjadi preosteoblas osteoblas, kemudian osteoid, sehingga daerah yang menunjukkan pewarnaan positif aktivitas osteoklas semakin menyempit, diikuti luas dan permukaan trabekula yang semakin menyempit juga. Hasil dari penyempitan tersebut adalah persentase dari variabel ARS akan meningkat, diikuti dengan peningkatan MTPS kemudian Tb. BV/TV dan MTPD menurun digantikan oleh tulang kompakta atau kortikal.

Sejalan dengan peningkatan usia akan terjadi penurunan volume tulang trabekula (Tb. BV/TV) akibat dari penurunan *Mean Trabecular Plate Density* (MTPD) tetapi tanpa penurunan *Mean Trabecular Plate Thickness* (MTPT). Tb. BV/TV menurun jauh pada individu dengan fraktur tulang belakang akibat penurunan MTPD yang berlanjut, namun perubahan nilai MTPT tidak bermakna. Hal tersebut sejalan dengan penelitian ini dimana MTPT hanya menunjukkan perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan laktoferin, namun tidak pada tahap-tahap penyembuhannya. Penurunan MTPT disebabkan oleh karena proses penuaan dan osteoporosis [20], namun tidak memiliki hubungan dengan perubahan Tb. BV/TV dan MTPD [21].

Indeks statis trabekula MTPS memiliki hubungan yang bermakna dengan indeks semidinamis osteoklas ARS pada penelitian ini. Penjelasan terhadap hasil penelitian ini menyatakan bahwa perubahan kecil nilai variabel ARS akan berakibat perubahan pada variabel MTPS.

Parfitt (1983) menyatakan jika hilangnya lempengan trabekula terjadi bukan karena kelainan fungsi osteoblas dan reduksi rerata ketebalan dinding (W.Th), maka kelainan fungsi osteoklas menyebabkan peningkatan kedalaman rongga resorpsi. Kemudian siklus ini berturut-turut terjadi sehingga menyebabkan perforasi lempengan trabekula [21].

## KESIMPULAN

Aplikasi laktoferin topikal pada kelompok perlakuan memberikan nilai aktivitas formasi tulang yang lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol dalam seluruh variabel nilai bentukan. Laktoferin mempengaruhi aktivitas formasi tulang yang lebih tinggi dalam tiap tahap penyembuhan (inflamasi, proliferasi, dan remodeling) pada variabel Tb.BV/TV, MTPD dan dalam tahap remodeling saja pada variabel MTPS.

- a. Penurunan rerata nilai bentukan variabel indeks statis Tb.BV/TV dan MTPD serta peningkatan variabel MTPS menunjukkan peningkatan aktivitas osteoblas oleh laktoferin pada tiap tahap remodeling.
- b. Peningkatan rerata nilai bentukan indeks semidinamis ARS menunjukkan penekanan aktivitas osteoklas pada tahap remodeling kelompok kontrol dan perlakuan.
- c. Peningkatan rerata nilai bentukan indeks semidinamis ARS mempengaruhi secara langsung peningkatan rerata nilai bentukan indeks statis MTPS.

## SARAN

1. Metode dekalsifikasi jaringan tulang rahang dengan menggunakan EDTA 4% 1M dengan pemanasan 37°C selama 15 hari dapat mempercepat proses pemeriksaan tulang tanpa mempengaruhi variabel indeks semidinamis penelitian, sehingga dapat digunakan untuk membantu menegakkan diagnosis dan riset yang lain.
2. Pemakaian analisis histomorfometri stereologi tiga dimensi trabekula magnifikasi 100x dapat dilakukan pada penelitian penyembuhan mandibula. Mandibula memiliki elemen struktural trabekula mirip dengan tulang ilium dan spinal. Tulang ilium dan spinal dianalisis dengan magnifikasi 40x.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut berkaitan dengan indeks semidinamis aktivitas

osteoblas dengan menilai preosteoblas atau osteoid secara langsung sehingga dapat menjawab mekanisme perubahan mikroarsitektur formasi tulang.

4. Perlu dilakukan penelitian gabungan penyembuhan tulang tentang efektivitas laktoferin dengan pemberian sistemik maupun topikal dan penelitian yang berkaitan penyakit metabolisme tulang secara sistemik seperti osteoporosis.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Amerongen A V N. 1992. *Ludah dan kelenjar ludah. Arti Bagi Kesehatan Gigi*. Penerjemah: Abyono R. Ed ke-2. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hlm 43 - 44; 49 - 53.
2. Chierici R. 2001. Antimicrobial actions of lactoferrin. *Advances in Nutritional Research*, 10, 247-269.
3. Naot *et. al.* 2011. Molecular mechanisms involved in the mitogenic effect of lactoferrin in Osteoblasts. *Bone* 49: 217-224.
4. Janssen, H., and Hancock, R.E. 2009. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* 91(1): 19-29.
5. Wakabayashi, H., Yamauchi, K., and Takase, M. 2006. Lactoferrin research, technology and applications. *International Dairy Journal* 16: 1241-51
6. Ward, P.P., Paz, E., Conneely, O.M. 2005. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci* 62:2540-8.
7. Colnot C, Romero DM, Huang S, Helms JA. 2005. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. *Clin Orthop Relat Res* 435: 69-78.
8. Schmid J, Walkkamm B, Hammerle CH, Gogolewski S, Lang NP. 1997. The significance of angiogenesis in guided bone regeneration. A case report of a rabbit experiment. *Clin Oral Implants Res* 8: 244-248.
9. Cornish J, Callon K E, Naot D, Palmano KP, Banovic T, Bava U, *et. al.* 2004. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology* 145: 4366-74.
10. Ying X, Cheng S, Wang W, Lin Z, Chen Q, Zhang W, Kou D, Shen Y, Cheng X, Peng L, Zi Xu H, and Zhu Lu C. 2011. Effect of lactoferrin on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *Int Orthop*.
11. Grey A, Qing Z, Watson M, Callon K, and Cornish J. 2006. Lactoferrin potently inhibits osteoblast apoptosis via an LRP1-independent pathway. *Molecular and Cellular Endocrinology* 251: 96-102.
12. Sulistiawati, E. 2004. *Analisis Histomorfometri dengan sediaan plastik dan parafin pada trabekula*

- tulang ilium Macaca fascicularis hipoestrogenis yang terpapar sinar lampu ultraviolet beta*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Disertasi.
13. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. 1987. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res* 2(6): 595- 610.
  14. Eriksen E F, Axelrod D W, Melsen F. 1994. Bone Histomorphometry. New York: Raven press. Hlm 1-54.
  15. Kimmel, D.B., Recker, R.R., Gallagher J.C., Vaswaameni, A.S., Aloia, J.F. 1990. A Comparison of Iliac bone histomorphometric data in post-menopausal osteoporotic and normal subject. *Bone Miner* 11: 217-235.
  16. Reineke T, Jenni B, Abdou MT *et al*. Ultrasonic Decalcification Offers New Perspectives for Rapid FISH, DNA, and RT\_PCR Analysis in Bone Marrow Trephines *Am J Surgical Pathology* 2006;**30**.
  17. Rolls G. 2012 An Introduction to Decalcification on <http://www.leicabio systems.com>
  18. Brandão A C *et. al*. 2002. Histomorphometric Analysis of Rat Alveolar Wound Healing with Hydroxyapatite Alone or Associated to BMPs. *Braz Dent J* 13(3): 147-154.
  19. Callis G, Sterchi D. Decalcification of Bone: Literature Review and Practical Study of Various Decalcifying Agents, Methods, and Their Effects on Bone Histology. *The Journal of Histotechnology* 1998;**21**:49-58.
  20. Hodgson, S F, Clake B L, Wermers R, Hefferan T, Yaszemski M. 2007. Bone Histology and Histopathology for Clinicians- A Primer. Mayo Foundation. Cited on 14 April 2013.
  21. Parfitt AM. 1983. Stereologic basis of bone histomorphometry; theory of quantitative microscopy and reconstruction of the third dimension. In: Recker RR (ed.). *Bone histomorphometry: techniques and interpretation*. Boca Raton, FL: CRC Press, USA; p. 53-85.