

PERBANDINGAN METODE KAUTERISASI DAN *PERIOSTEAL STRIPPING* TERHADAP KEJADIAN *NONUNION* PADA PROSES PENYEMBUHAN FRAKTUR

Studi Pada Tikus *Sprague dawley*

(Laporan Penelitian)



Oleh:

Ahmad Fauzi

**FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS LAMPUNG
LAMPUNG
2021**

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
DAFTAR ISI.....	ii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat Hasil Penelitian.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Fraktur.....	3
2.1.1 Definisi	4
2.1.2 Proses Penyembuhan Fraktur	5
2.2 <i>Nonunion</i>	6
2.3 Model Hewan Coba	7
BAB III METODE PENELITIAN	10
3.1 Desain Penelitian.....	10
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	10
3.3 Populasi dan Sampel	10
3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi	10
3.5 Besar Sampel.....	11
3.6 Variabel Penelitian	11
3.7 Alur Penelitian	11
3.8 Etik Penelitian	11
3.9 Analisis dan Penyajian Data	11

DAFTAR PUSTAKA

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Fraktur merupakan suatu kondisi diskontinuitas tulang salah satu masalah dalam bidang kesehatan dengan insidensi yang semakin meningkat dan mempunyai komplikasi sehingga memerlukan perawatan yang lama. Salah satu komplikasi penyembuhan fraktur adalah *nonunion*. *Nonunion* adalah kegagalan fraktur mencapai penyembuhan atau *union* (Salter, 1999; Phieffer dan Goulet, 2006).

Insidensi dan prevalensi *nonunion* yang dilaporkan bervariasi sesuai dengan wilayah, anatomi, dan kriteria yang digunakan untuk mendefinisikan *nonunion*. Di Inggris, pada tahun 2005–2010, ada sekitar 850.000 kasus fraktur baru per tahun yang terjadi pada orang dewasa. Pada tahun yang sama di Amerika Serikat, diperkirakan 100.000 kasus fraktur menjadi *nonunion* setiap tahun. Beberapa penelitian menunjukkan, kasus fraktur sering terjadi pada usia 30–40 tahun dan lebih sering terjadi pada laki-laki. Pada perempuan, tingkat *nonunion* terjadi pada usia dekade kelima dan paling banyak disebabkan oleh kerapuhan tulang (Nandra dkk., 2015). Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Nandra, R. dkk. (2015), risiko *nonunion* meningkat menjadi sekitar 1 per 200 kasus fraktur untuk remaja laki-laki pada rentang usia 15–19 tahun.

Kondisi *nonunion* masih jadi penyebab utama peningkatan masalah sosial dan ekonomi akibat terganggunya produktivitas (Ekegren dkk, 2018; Saleh dan Hak, 2001; Phieffer dan Goulet, 2006; Garcia-Altès dan Pèrez, 2007), sehingga berkembang berbagai penelitian untuk menyelesaikan masalah tersebut. Salah satunya penggunaan tikus laboratorium sebagai salah satu hewan coba. Tikus dapat digunakan sebagai instrumen untuk mengukur suatu besaran kualitas dan kuantitas biologis serta sebagai penghasil produk biologi (Setijono, 1985). Penggunaan tikus sebagai hewan coba disebabkan karena tikus dapat memberikan gambaran secara ilmiah yang mungkin terjadi pada manusia (Sihombing, 2010).

Berbagai metode telah banyak digunakan untuk membuat model *nonunion* pada tikus antara lain *periosteal stripping* dan kauterisasi. Kokubu dkk. (lihat Liu dkk., 2018) melakukan kauterisasi periosteum sebanyak 2 mm masing-masing

fragmen fraktur pada model tikus dan dievaluasi setiap 2 minggu selama 8 minggu. Hilangnya periosteum dan efek termal nekrosis dari kauter menghasilkan suatu model *nonunion* tipe atrofi pada femur tikus. Sedangkan studi yang dilakukan oleh Garcia dkk. (lihat Jilka, 2003) menunjukkan bahwa *stripping* periosteum secara tajam (tidak menggunakan kauter untuk mencegah nekrosis termal), disertai adanya gap pada lokasi fraktur dapat menyebabkan *delayed union*. Namun, hingga saat ini belum ada penelitian yang membandingkan potensi *nonunion* pada proses penyembuhan fraktur yang dapat terjadi setelah kedua metode tersebut dilakukan.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penulis tertarik untuk membandingkan metode *periosteal stripping* dan metode kauterisasi terhadap kejadian *nonunion* dalam proses penyembuhan fraktur pada tikus putih galur *Sprague dawley*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah “Apakah terdapat perbedaan signifikan antara metode *periosteal stripping* dan metode kauterisasi terhadap kejadian *nonunion* dalam proses penyembuhan fraktur pada tikus putih galur *Sprague dawley*?”

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan antara metode *periosteal stripping* dengan metode kauterisasi terhadap potensi kejadian *nonunion* dalam proses penyembuhan fraktur pada tikus galur *Sprague dawley*.

1.4 Manfaat Hasil Penelitian

Bila penelitian ini berhasil, maka penelitian ini dapat memberikan manfaat pada :

1. Ilmu pengetahuan

Dapat menjelaskan metode yang paling berpotensi menyebabkan kejadian *nonunion* dalam proses penyembuhan fraktur.

2. Terapan

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan referensi dalam penelitian mengenai fraktur *nonunion* selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fraktur

2.1.1 Definisi

Fraktur merupakan suatu kondisi dikontinuitas dari tulang, kartilago, dan lempeng epifisis (Winanto dkk., 2013). Fraktur dapat terjadi pada kondisi *stress* berulang, kelemahan abnormal tulang serta trauma akibat gaya mekanik yang diterima oleh tulang melebihi kapasitas tulang untuk menahan gaya mekanik tersebut (Suryani, 2013).

2.1.2 Proses Penyembuhan Fraktur

Pada proses penyembuhan fraktur diperlukan beberapa faktor penting yang tergabung ke dalam *diamond concept* meliputi faktor sel osteogenik, osteokonduktif, stailitas mekanik serta vaskularisasi sebagai syarat utama dalam faktor pertumbuhan (Giannoudis dkk., 2007). Daerah fraktur yang mengalami penurunan vaskularisasi akan menyebabkan tertundanya penyembuhan hingga terjadinya kondisi *nonunion* (Ekegren dkk., 2018). Secara umum, terdapat 5 fase penyembuhan fraktur, antara lain (Harada dan Rodan, 2003; Tanaka dkk., 2005):

a. Fase Hematom

Fase hematom merupakan fase pertama yang terjadi segera setelah fraktur. Hematom pada tulang yang cedera terjadi akibat perdarahan dari tulang yang pecah serta akibat proses pembentukan pembuluh periosteal pada kanal meduler dan di bawah periosteum. Pelepasan mediator vasoaktif pada sistem koagulasi terjadi pada fase hematom ini. Akibat trauma vaskular yang dialami bersamaan dengan fraktur, situs fraktur akan mengalami hipoksian dan osteosit pada ujung situs fraktur akan mengalami kekurangan nutrisi dan secara perlahan akan menjadi jaringan nekrotik (Banhey dkk., 2019). Hipoksia jaringan yang dicetuskan oleh mekanisme patologis tersebut dapat meningkatkan pertumbuhan pembuluh darah baru dengan memediasi jalur proangiogenik (Darwin E dkk., 2017). Trombin diperlukan pada pembentukan hematom. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *low molecular weight*

heparin sebagai komponen yang dapat mempercepat pemecahan trombin memiliki efek negatif pada proses penyembuhan fraktur hewan coba. Trombin telah terbukti bertindak sebagai faktor kemotaktik sel endotel, mampu mengikat fibrinogen, mengkatalisasi pemecahan fibrin dan membentuk bekuan darah secara *in vivo* dan *in vitro*. Hal ini menunjukkan bahwa hematoma berfungsi sebagai penyerap faktor penyembuhan yang diperlukan pada proses revaskularisasi di daerah fraktur (Street dkk., 2000).

b. Fase Inflamasi

Setelah terjadinya fraktur, struktur dan vaskularisasi tulang akan terganggu sehingga menyebabkan hilangnya stabilitas mekanik, penurunan suplai oksigen dan nutrisi jaringan serta pelepasan faktor inflamasi pada lokasi yang mengalami cedera. Faktor inflamasi tersebut berperan penting dalam memfasilitasi penyembuhan fraktur. Sel-sel inflamasi seperti makrofag akan memfagositosis jaringan nekrotik dan memfasilitasi regenerasi faktor pertumbuhan seperti BMP, TGF, PDGF, dan IGF. Faktor pertumbuhan ini sangat berperan penting dalam proses rekrutmen, migrasi, serta proliferasi sel punca dan diferensiasinya terhadap angioblas, kondroblas, osteoblas, dan fibroblas untuk memulai proses pembentukan kalus (Oryan dkk., 2015).

c. Fase Fibrovaskular

Vaskularisasi tulang dapat dibentuk kembali melalui pengembangan jaringan vaskular yang baru. Proses pembentukan jaringan ini terjadi melalui dua proses utama yang berbeda, yaitu angiogenesis dan vaskulogenesis. Angiogenesis merupakan proses pembentukan pembuluh darah baru dari pembuluh darah yang telah ada, sedangkan vaskulogenesis merupakan pembuluh darah dari *endothelial progenitor cell in situ* (EPC) di dalam kalus secara *de novo*. Angiogenesis dipicu oleh kondisi hipoksia yang dapat menghasilkan kapiler melalui pelepasan EGF, aFGF, bFGF, dan angiopoietin (Darwin E dkk., 2017). Sebuah studi mengumpulkan sampel jaringan fraktur *nonunion* dan mencari korelasi respon faktor pertumbuhan lokal dan sistemik terhadap kejadian *nonunion*. Didapatkan hasil bahwa konsentrasi VEGF, Angiopoietin-1,

Angiopoietin-2, dan bFGF pada kondisi *nonunion* lebih rendah dibandingkan dengan *union*. Serta diperlukakan waktu pembentukan hematoma yang lebih lama dibandingkan kelompok kontrol secara histologis. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi VEGF yang rendah pada *nonunion* mungkin disebabkan akibat kondisi hipoksia yang berkepanjangan (Lienau dkk., 2009).

d. Fase Formasi Tulang

Setelah pembentukan jaringan fibrovaskular, sebagian besar sel punca yang membentuk kalus fibrovaskular mengalami diferensiasi menjadi kondrosit atau osteoblas untuk memulai pembentukan tulang. Diferensiasi osteogenik dari periosteal sel punca dapat menyebabkan pertumbuhan intramembran di sepanjang permukaan tulang yang berdekatan dengan situs fraktur. Selain itu, sel punca periosteal dapat bermigrasi ke dalam celah fraktur dan memulai proses kondrogenesis. Kondrogenesis pada celah fraktur dilanjutkan dengan pembentukan tulang kompak. Dalam zona transisi vaskularisasi antara tulang rawan dan tulang kompak, pewarnaan histologis menunjukkan kondrosit hipertrofik terperangkap dalam matriks tulang yang berdekatan dengan pembuluh darah. Sebagian matriks tulang rawan hilang dan matriks tulang kompak dengan morfologi kondrosit hipertrofik berbentuk bulat secara bertahap dikonversi menjadi karakteristik morfologi osteosit dengan ekstensi seluler yang ada di kanalikuli. Pembelahan sel reduktif dari kondrosit hipertrofik mungkin menjadi salah satu mekanisme yang memungkinkan morfogenesis ini. (Banhey dkk., 2019).

e. Fase Remodeling

Fase remodeling merupakan tahap akhir dari perbaikan fraktur. Pada fase ini, terjadi degradasi tulang sementara yang pertama kali diproduksi dan digantikan dengan tulang pipih yang matang. Komponen utama dari remodeling kalus adalah degradasi tulang oleh osteoklas. Osteoklas adalah sel myeloid berinti banyak yang membentuk ikatan erat pada permukaan tulang melalui struktur membran khusus disebut *sealing zone*. Kemudian terjadi pertukaran vesikel protein lisosom yang larut dan terikat membran ke *sealing*

zone dan terjadi fusi transportasi vesikel dengan membran plasma *sealing zone* membentuk area permukaan berlipat sebagai ciri khas resorpsi osteoklas matur. Kadar pH yang tergolong asam dari lakuna *Howship* memfasilitasi pembebasan kristal hidroksiapatit yang terdiri dari komponen mineral tulang, sedangkan enzim protease mencerna matriks kolagen yang mendasarinya. Degradasi tulang yang dimediasi oleh osteoklas akan membebaskan beberapa faktor seperti TGF- β dan faktor yang diproduksi oleh osteoklas itu sendiri. *Transforming growth factor- β* (TGF- β) merupakan salah satu faktor penting yang berperan dalam proses angiogenik pada jaringan hipoksia. Faktor ini mengatur angiogenesis dengan cara menginduksi proliferasi dan maturasi vaskuler, menginduksi faktor angiogenik lain (PDGF, IL-1, bFGF, TNF- α , dan TGF- α), serta merubah fungsi faktor VEGF dari prosurvival menjadi proapoptosis (Darwin E dkk., 2017).

Proses penyembuhan fraktur harus dilakukan dalam kondisi yang stabil dan tanpa mobilisasi. Kondisi imobilisasi dan stabilisasi fragmen fraktur dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu fiksasi internal dan fiksasi eksternal. Jika fiksasi internal yang diberikan stabil dan tidak ada *micromotion*, maka akan terjadi *primary healing*. Hal ini dimediasi langsung oleh osteoklas dan osteoblas, dengan pengaruh dari jaringan sekitarnya. Jika fraktur diimobilisasi dengan fiksasi eksternal, fiksasi intramedula, atau *plate* yang memungkinkan *micromotion* pada fraktur, maka akan menyebabkan penyembuhan sekunder melalui proses osifikasi intramembranosa dan endokondral (Manolagas, 2000; Harada dan Rodan, 2003).

2.2 Nonunion

Bentuk komplikasi yang paling buruk dalam proses penyembuhan fraktur adalah *nonunion*. *Nonunion* merupakan kondisi fraktur yang sudah terjadi dalam jangka waktu 6 hingga 8 bulan dan belum menunjukkan adanya tanda pambuan dalam kurun waktu 3 bulan terakhir. Pada gambaran radiologi, tampak *bridging* minimal pada tulang, ujung fragmen fraktur yang sklerotik dan berbentuk bundar, serta kegagalan dalam pembentukan kalus (Jilka, 2003; Cohen, 2006; Phieffer dan Goulet, 2006). Faktor-faktor yang dapat menyebabkan kondisi ini

bersifat multifaktorial, seperti malnutrisi, infeksi, instabilitas, interposisi jaringan lunak, distraksi pada fragmen fraktur, hilang atau rusaknya vaskularisasi, serta kerusakan jaringan periosteum (Cohen, 2006; Phieffer dan Goulet, 2006). Beberapa kondisi lain yang dapat menyebabkan terjadinya *nonunion* yaitu vaskularisasi tidak adekuat pada daerah fraktur seperti oklusi arteri pada ekstremitas ipsilateral, *intramedullary reaming*, penggunaan OAINS, serta kondisi *stripping* pada periosteum yang juga merupakan sumber penting sel osteoprogenitor (Jilka, 2003; Mundy dkk., 2001; Phieffer dan Goulet, 2006). Studi yang dilakukan oleh Garcia dkk. (lihat Jilka, 2003) menunjukkan bahwa *stripping* periosteum secara tajam (tidak menggunakan kauter untuk mencegah nekrosis termal), disertai adanya gap pada lokasi fraktur dapat menyebabkan *delayed union*. Pada studi yang dilakukan Utvag dkk. (1996) dalam Rucci (2008) juga membuktikan bahwa *stripping* periosteum pada segmen tengah tulang pada fraktur segmental, menyebabkan terjadinya *delayed union* dan menurunkan kapasitas mekanik tulang. Selain itu, kauterisasi periosteum pada studi Kokubu dkk. (lihat Liu dkk., 2018) menunjukkan bahwa hilangnya periosteum dan efek termal nekrosis dari kauter menghasilkan suatu model *nonunion* tipe atrofi pada femur tikus.

2.3 Model Hewan Coba

Penentuan model hewan coba yang sesuai merupakan langkah utama untuk desain penelitian dan mengekstrapolasikan pada keadaan klinis. Beberapa faktor yang dipertimbangkan ketika memilih model hewan coba pada rekayasa jaringan tulang, meliputi: kelayakan model hewan coba, potensi ekstrapolasi yang diharapkan pada kondisi klinis, homogenitas genetik model hewan coba yang spesifik, data mengenai anatomi tulang rangka, fisiologi tulang, dan biomekanik tulang serta penyembuhan frakturnya, biaya yang terjangkau dan ketersediaan model hewan coba, kemampuan model hewan coba beradaptasi terhadap manipulasi penelitian dan lingkungan laboratorium serta pertimbangan ekologi dan implikasi etik dan sosialnya (Aungst, 2013).



Gambar 2.1. Perbandingan Bentuk Femur Kiri Berbagai Hewan Coba. Sumber: Luo dkk., 2016.

Tikus dan kelinci merupakan model hewan coba yang paling sering digunakan pada penelitian mengenai *basic bone microarchitecture and biomechanics* karena mempunyai kelebihan dan keuntungan, antara lain: adanya standarisasi kondisi penelitian, perawatan dan pemeliharaannya relatif murah, jenis *strains* baik spesifik atau mutan secara genetik dapat ditentukan, data mengenai metabolisme tulang dan efek diet pada tulang sudah banyak diketahui, jangka waktu hidupnya relatif singkat dengan laju *bone turnover*-nya cepat, penipisan tulang, *fragility* tulang spongiosum, laju dan lokasi remodeling-nya serupa, serta arsitektur tulang lamelar yang serupa. Manusia dan jenis burung merupakan makhluk yang berdiri tegak di atas dua kaki, sedangkan hewan primata, monyet, dan tikus mempertahankan berdiri tegak ketika makan. Tikus merupakan model hewan coba nonprimata yang lebih sesuai sebagai model untuk penelitian morfologi femur dan tulang belakang dibandingkan spesies hewan yang berdiri di atas empat kaki seperti kelinci dan anjing (Aungst, 2013; Luo dkk., 2016).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian pendahuluan (*pilot study*) berupa studi komparatif untuk menentukan model *nonunion* dengan menggunakan hewan tikus putih, galur *Sprague Dawley*. Dalam penelitian ini menggunakan data berupa pertumbuhan kalus pada kelompok percobaan yang dinilai secara histopatologis.

3.2 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilakukan di Rumah Sakit Hewan Intitut Pertanian Bogor (IPB) dengan waktu penelitian selama 1 bulan.

3.3 Populasi dan sampel

Populasi penelitian adalah tikus galur *Sprague Dawley* yang berasal dari tempat penangkaran di Pusat Penelitian dan Pengembangan Departemen Kesehatan. Sampel penelitian adalah bagian dari populasi.

3.4 Kriteria inklusi dan eksklusi

Kriteria inklusi:

- Umur sekitar 8 minggu
- Berat badan kurang lebih 250–350 gram
- Jenis kelamin jantan

Kriteria eksklusi:

- Cacat pada femur
- Protrusi implan pascapemasangan

3.5 Besar sampel

Estimasi besar sampel ditentukan menurut rumus Federer sebagai berikut:

$$(n-1)(k-1) \geq 15$$

n = sampel tiap kelompok

k = jumlah kelompok penelitian

Estimasi besar sampel adalah:

k = jumlah kelompok penelitian (2)

Didapatkan hasil: $(n-1)(2-1) \geq 15$

$$n-1 \geq 14$$

$$n \geq 15$$

Dengan mempertimbangkan *drop out* pada sampel penelitian sebesar 10%, maka dari hasil perhitungan diperoleh bahwa tiap kelompok memerlukan minimal 17 ekor tikus.

Pada penelitian ini dilakukan pada 2 kelompok sehingga jumlah hewan total yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah 34 ekor, dengan rincian perlakuan pada hewan penelitian untuk studi pendahuluan (*pilot study*) adalah sebagai berikut :

- Kelompok 1: yaitu tikus yang mengalami osteotomi, *stripping*periosteum 8 mm ke arah distal dan 8 mm ke arah proksimal dari garis fraktur dan ORIF dengan *K-wire*.
- Kelompok 2 : yaitu tikus yang mengalami osteotomi, dilakukan kauterisasi pada ujung fragmendan ORIF dengan *K-wire*.

Kedua kelompok dikorbankan pada minggu ke-4 untuk pemeriksaan histologis. Hal ini dilakukan karena pada minggu ke-4, fraktur femur pada tikus sudah menjadi union (Aungst, 2013).

3.6 Variabel Penelitian

Variabel penelitian adalah sebagai berikut:

- Variabel bebas:
 - Metode *periosteal stripping* yang dilakukan 8 mm ke arah distal dan 8 mm ke arah proksimal dari garis fraktur ORIF dengan *K-wire*.
 - Metode kauterisasi pada ujung fragmen fraktur dan ORIF dengan *K-wire*.
- Variabel tergantung: kejadian *nonunion* pada proses penyembuhan fraktur femur tikus putih galur *Sprague Dawley*.

3.7 Alur Penelitian

Alur penelitian pada studi ini adalah sebagai berikut:



Gambar 3.1. Skema alur penelitian *pilot study*

3.8 Etik Penelitian

Penelitian ini mempertimbangkan etika penelitian terhadap hewan coba, yaitu:

1. Jumlah hewan coba yang digunakan membandingkan hasil rumus numerik kategorik tidak berpasangan dengan rumus Federer. Rumus Federer menghasilkan jumlah hewan coba lebih sedikit, sehingga formula ini yang digunakan.

2. Semua hewan coba dijamin kesejahteraannya dengan cara dipelihara di kandang yang terpisah, serta mendapatkan makan dan minum secara *ad libitum*.
3. Prosedur osteotomi, *stripping* periosteum, kauterisasi dan fiksasi interna dilakukan dalam kondisi hewan coba teranestesi, sehingga menjamin hewan coba tidak mengalami nyeri maupun ketakutan.
4. Semua hewan coba mendapatkan antibiotik (Ampisilin 50 mg/kgBB/hari) dan analgetik (parasetamol 50 mg/kgBB/hari) selama 1 minggu, sehingga mencegah timbulnya infeksi dan nyeri pascaintervensi.
5. Pada proses eutanasia, semua hewan coba dilakukan dalam kondisi teranestesi. Hal ini supaya hewan coba tidak mengalami nyeri. Pasca eutanasia, hewan coba dikuburkan secara layak.

3.9 Analisis dan Penyajian Data

Karakteristik subjek penelitian akan ditampilkan dalam bentuk ukuran rerata dan simpang baku secara deskriptif pada tabel. Data yang telah diperoleh dari kedua kelompok sampel diolah dengan menggunakan program computer *SPSS 16.0 for windows*. Uji analisis dilakukan dengan *Independent T-test*. Data penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel, gambar dan grafik (Garcia dkk., 2013).

DAFTAR PUSTAKA

- Aungst J. 2013. Dose response relationships: biological and modeling aspects. US Food and Drugs Administration. Diunduh dari <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/event/documentset/1206141-p05.pdf> tanggal 03 Januari 2021.
- Banhey CS, Zondervan RL, Allison P, Theologis A, Ashley JW, Ahn J, et al. 2019. Cellular biology of fracture healing. *J Orthop Res* : 37(1):35–50.
- Cohen Jr MM. 2006. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *Am J Med Genet A* : 140(23):2646–706.
- Darwin E, Elfi EF, Elvira D. 2017. Endotel: Fungsi dan Disfungsi. Andalas University Press : 76-81.
- Ekegren CL, Edwards WR, de-Steiger R, Gabbe BJ. 2018. Incidence, Costs and Predictors of Non-Union, Delayed Union and Mal-Union Following Long Bone Fracture. *Int J Environ Res Public Health* : 15(12):2845.
- Garcia-Altès G, Pèrez K. 2007. The economic cost of road traffic crashes in urban setting. *Inj Prev* : 13(1):65-8.
- Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, et al. 2013. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater* : 26:1-14.
- Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. 2007. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* : 38 Suppl_4:S3-6.
- Harada S, Rodan GA. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* : 423(6937):349–55.
- Jilka RL. 2003. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediat Oncol* : 41(3):182–5.
- Liu M, Sun Y, Zhang Q. 2018. Emerging role of Extracellular Vesicles in Bone Remodeling. *J Dent Res* : 97(8):859–68.
- Luo G, Sun SJ, Weng TJ, Li XM, Wang ZG, and Zhang B. 2016. Effect of osteoclasts on murine osteoblastic differentiation in early stage of co-culture. *Int J Clin Exp Med*:9(2):1062–72.
- Mundy GR, Chen D, Zhao M, Dallas S, Xu C, Harris S. 2001. Growth regulatory factors and bone. *Rev Endocr Metab Disord* : 2(1):105-15.

- Nandra R, Grover L, Porter K. 2016. Fracture nonunion epidemiology and treatment. *Trauma* : 18(1):3-11.
- Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. 2015. Bone injury and fracture biology. *Biomed Environ Sci* : 28(1): 57-71.
- Phieffer L, Goulet JA. 2006. Delayed unions of the tibia. *J Bone Joint Surg Am* : 88:205-16.
- Rucci N. 2008. Molecular biology of bone remodelling. *Clin Cases Miner Bone Metab* : 5(1):49–56.
- Saleh K, Hak DJ. 2001. Sosioeconomic burden of traumatic tibia fractures: nonunion or delayed union. Diunduh dari https://www.medscape.org/viewarticle/418523_6 tanggal 03 Januari 2021.
- Salter RB. 1999. *Textbook of disorders and injuries of the musculoskeletal system: an introduction to orthopaedics, fractures, and joint injuries, rheumatology, metabolic bone disease, and rehabilitation*. 3rd ed. Lippincott-Williams-Wilkins. Philadelphia : 417-98.
- Setijono, MM. 1985. Mencit (*Mus musculus*) sebagai Hewan Percobaan. *Skripsi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor*.
- Sihombing, M. 2010. Status gixi dan fungsi hati mencit (galur CBS-Swiss) dan tikus putih (galur Wistar). *Laboratorium Hewan Percobaan. Puslitbang Biomedis dan Farmasi, Jakarta. Media Litbang Kesehatan*. 20(1):33-40.
- Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP. 2002. Is human fracture hematoma inherently angiogenic?. *Clin Orthop Relat Res* : 378:224-37.
- Suryani N. 2013. Perbandingan metode pengeringan terhadap resorpsi amnion dalam larutan simulated body fluid (sbf). *Beta Gamma* : 4(2):53–8.
- Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. 2005. Osteoblasts and Osteoklasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* : 4(3):325-8.
- Winanto ID, Kamal AF, Prabowo Y, JusufAA, Prasetyo M. 2013. Role of sterile lyophilized amniotic membrane in treatment of fracture with bone defect: an experimental study on sprague-dawley. *JIndonOrtho and Traumatology* : 41(45):36–41.