



**TOKSISITAS SERBUK HIDROKSIAPATIT HASIL SINTESIS LIMBAH
DENTAL GYPSUM TIPE II DENGAN *SINTERING* PADA
MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) TIKUS**

SKRIPSI

Oleh

**Fadhillah Kurniasari
NIM 121610101041**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**TOKSISITAS SERBUK HIDROXIAPATIT HASIL SINTESIS LIMBAH
DENTAL GYPSUM TIPE II DENGAN *SINTERING* PADA
MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) TIKUS**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh

Fadhillah Kurniasari

NIM 121610101041

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS JEMBER

2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT;
2. Nabi Muhammad SAW;
3. Ibunda Wa Ode Sabaria dan Ayahanda Amal Fatchullah yang tercinta;
4. Keluarga Besarku yang terkasih;
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

MOTTO

Sabar dan rela adalah pangkal ketaatan kepada Allah. Barang siapa bersabar dan rela menerima takdir Allah, baik takdir itu menyenangkan atau tidak, Allah akan menetapkan takdir yang lebih baik baginya, lepas dari persoalan apakah orang itu menginginkan atau tidak.*)

* Alhuasaini, Alhamid. 2012. Riwayat Hidup Fatimah Az-Zahra. Jakarta: Bacalah.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Fadhillah Kurniasari

NIM : 121610101041

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Toksitas Serbuk Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe II dengan *Sintering* pada *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) Tikus” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun dan bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 23 Desember 2015

Yang menyatakan,

Fadhillah Kurniasari

(121610101041)

SKRIPSI

**TOKSISITAS SERBUK HIDROKSIAPATIT HASIL SINTESIS LIMBAH
DENTAL GYPSUM TIPE II DENGAN *SINTERING* PADA
MESENCHYMAL STEM CELLS (MSCs) TIKUS**

Oleh

Fadhillah Kurniasari
121610101041

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Yenny Yustisia, M. Biotech
Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Toksistas Serbuk Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe II dengan *Sintering* pada *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) Tikus” telah diuji dan disahkan pada:

Hari, tanggal : 23 Desember 2015

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Ketua,

Dosen Penguji Anggota,

Dr. drg. Didin Erma I., M.Kes
NIP 196903031997022001

drg. Pudji Astuti, M.Kes
NIP 196810201996012001

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Pendamping,

drg. Yenny Yustisia, M.Biotech
NIP 197903252005012000

drg. Hengky Bowo Ardhianto, MDSc
NIP 197905052005011005

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prost
NIP 196901121996011001

RINGKASAN

Toksisitas Serbuk Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe II dengan Sintering pada *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) Tikus; Fadhillah Kurniasari, 121610101041; 2015: 32 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Hidroksiapatit (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) merupakan kalsium apatit biokeramik yang serupa dengan struktur tulang manusia, bersifat osteokonduktif dan memiliki biokompatibilitas yang tinggi. HA dapat disintesis dari berbagai macam sumber, salah satunya adalah limbah *dental gypsum* tipe II. Metode sintesis dapat dilakukan dengan menggunakan metode hidrotermal dilanjutkan dengan proses *sintering*. Hasil sintesis menunjukkan bahwa sifat HA memiliki karakteristik yang identik dengan HA komersial (HAP 200). Salah satu fungsi HA adalah sebagai material pengganti tulang. Syarat yang harus dipenuhi oleh material pengganti tulang sintetis adalah dapat diterima oleh tubuh atau biokompatibel. Oleh karena itu perlu dilakukan uji toksisitas pada material pengganti tulang yang baru. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui toksisitas hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II dengan sintering terhadap MSCs serta mengetahui toksisitas hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II dengan suhu sintering yang berbeda.

Penelitian ini diawali dengan melakukan isolasi dan kultur MSCs tikus dan dilanjutkan uji sitotoksitas menggunakan MTT *assay*. Setiap kelompok hidroksiapatit, yaitu HA komersial (HAP 200, Taihei Japan), HA non sintering, HA sintering 600° C, dan HA sintering 900° C direndam dalam media perendaman selama 7 hari dengan konsentrasi 1000 µg/ml. MSCs yang telah dikultur pada 96-*well plate* selanjutnya dipapar dengan media perendaman hidroksiapatit dan diinkubasi selama 24 jam. Kemudian, dilakukan pengujian toksisitas dengan MTT reagen dan dilihat absorbansinya menggunakan mesin ELISA *reader*.

Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa persentase kematian MSCs tikus yang dipapar pada media dengan rendaman HA sintesis secara bermakna ($p < 0.05$) lebih besar dibandingkan hidroksiapatit komersial (HAP 200). Suhu *sintering* yang lebih tinggi secara bermakna lebih besar ($p < 0.05$) dibandingkan suhu yang lebih rendah sehingga dapat mempengaruhi toksisitasnya terhadap sel. Hal ini dapat ditunjukkan dengan persentase kematian selnya lebih kecil bila dibandingkan dengan suhu yang lebih rendah.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, dapat diperoleh bahwa hidroksiapatit dengan *sintering* lebih toksik dibandingkan dengan hidroksiapatit non *sintering*. Hal ini dapat disebabkan oleh karena masih adanya gugus hidroksil dalam hidroksiapatit dengan *sintering*. Selain itu, berdasarkan hasil uji pendahuluan menunjukkan kadar ion kalsium dan ion fosfat dalam media perendaman hidroksiapatit *sintering* lebih tinggi dari pada hidroksiapatit non *sintering*. Suhu *sintering* yang lebih tinggi menyebabkan toksisitas yang lebih rendah. Hal ini disebabkan oleh karena semakin tinggi suhu *sintering* maka dapat meningkatkan derajat kristalinitasnya sehingga degradasi material semakin rendah. Oleh karena itu, perlu dilakukan suhu *sintering* yang bervariasi untuk mengetahui suhu optimal sehingga kematian sel lebih rendah.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Toksistas Serbuk Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe II dengan *Sintering* pada *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) Tikus”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. drg. Rahardyan Parnaadji, M.Kes, Sp.Prost., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
2. drg. Yenny Yustisia, M. Biotech., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga, dan perhatian dalam penulisan skripsi ini sehingga dapat terselesaikan;
3. Dr. drg. Didin Erma I., M.Kes, selaku Dosen Penguji Utama dan drg. Pudji Astuti, M.Kes, selaku Dosen Penguji Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam mengevaluasi skripsi ini;
4. drg. Raditya Nugroho, Sp.KG., selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa pendidikan strata satu (S1);
5. Ibunda Wa Ode Sabaria dan Ayahanda Amal Fatchullah, orang tua yang tak pernah lelah mendoakan dan mendukung, serta memotivasi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini;
6. Ibunda Endang Astutik, dan Ayahanda Aji Subarno, orang tua calon imamku yang juga selalu mendoakan dan mendukung penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;

7. drg. Zefri Eka Setiaji, calon imamku yang telah memberikan dorongan dan doa, serta mendengar keluh kesahku dalam menyelesaikan skripsi ini;
8. Teman-teman FKG UNEJ Angkatan 2012 yang telah berjuang bersama menyelesaikan pendidikan S1 ini;
9. Mantan penghuni D-10, Annaasa Nur Hidayah, Dewi Anggraini, Nazala Zetta Zettira, Laura Willy Widiyani, yang telah berjuang bersama, teman seangkatan yang kenal pertama, teman kos pertama, perjuangan yang tak terlupakan;
10. Teman-teman kos Danau Toba 37A, Nasa dan Ghiza Jibrila K.B., yang telah mendukung dan mendorong penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
11. Rekan-rekan HA Geng, Lelia Zahra Zakiyah, Ahmad Faris A.I., Nidha Tuhu R.K., Yusron Haries, Prima Andri W., yang telah membantu dan memberi semangat;
12. Semua pihak yang terlibat baik langsung maupun tidak langsung yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Material Pengganti Tulang	5
2.2 Hidroksiapatit	5
2.2.1 Struktur Hidroksiapatit	6
2.2.2 Sifat Hidroksiapatit	6
2.2.3 Sumber Hidroksiapatit	7
2.3 Gypsum Kedokteran Gigi	7
2.3.1 Kalsifikasi <i>Dental Gypsum</i>	8

2.3.2	Prosedur Sintesa Hidroksiapatit	8
2.4	Sintering	9
2.5	Karakteristik Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah <i>Dental</i>	
Gypsum Tipe II	10
2.6	<i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs)	14
2.7	Toksisitas Biomaterial	15
2.8	Uji Toksisitas Biomaterial	16
2.9	Kerangka Konsep	18
2.10	Hipotesis	18
BAB 3.	METODOLOGI PENELITIAN	19
3.1	Jenis Penelitian	19
3.2	Rancangan Penelitian	19
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.4	Identifikasi Variabel Penelitian	19
3.4.1	Variabel Bebas	19
3.4.2	Variabel Terikat	20
3.5	Definisi Operasional Penelitian	20
3.6	Sampel Penelitian	20
3.6.1	Pengelompokkan Sampel	20
3.7	Alat dan Bahan Penelitian	21
3.7.1	Alat Penelitian	21
3.7.2	Bahan Penelitian	22
3.8	Prosedur Penelitian	22
3.8.1	Persiapan Sampel Hidroksiapatit	22
3.8.2	Kultur MSCs	23
3.8.3	Uji Toksisitas	25
3.9	Alur Penelitian	26
3.10	Analisis Data	26
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	28

4.1 Hasil dan Analisis Data	28
4.2 Pembahasan	31
BAB 5. KESIMPULAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Persentase kematian MSCs tikus yang dipapar hidroksiapatit (%)	28
4.2 Hasil <i>Saphiro Wilk Test</i> dari persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit	29
4.3 Hasil <i>Levene's Test</i> dari persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit	29
4.4 Hasil Uji <i>Oneway ANOVA</i> persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit	30
4.5 Hasil uji <i>LSD</i> persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit yang berbeda	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Proses pemampatan pada <i>sintering</i>	9
2.2 Grafik hasil karakterisasi FTIR	11
2.3 Grafik hasil karakterisasi XRD	12
2.4 Hasil karakterisasi SEM	13
2.5 <i>Mesenchymal Stem Cells</i> (MSCs) manusia (A) dan tikus (B)	15
2.6 Kerangka Konsep Penelitian	18
3.1 Diagram Alur Penelitian	26
4.1 Rerata prosentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit	28

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. <i>Ethical Clearance</i>	39
Lampiran B. Hasil Uji Sitotoksitas	40
Lampiran C. Hasil Analisis SPSS	40
Lampiran D. Alat dan Bahan Penelitian	43
Lampiran E. Pelaksanaan Penelitian	45

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebutuhan material pengganti tulang setiap tahun terus bertambah. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya jumlah kasus kehilangan tulang, seperti tumor, kelainan konginetal, ataupun kecelakaan yang mengakibatkan patah tulang. Berdasarkan data di Asia, Indonesia adalah negara dengan jumlah penderita patah tulang tertinggi. Diantaranya, ada sebanyak 300-400 kasus operasi bedah tulang per bulan di RS. Dr. Soetomo Surabaya (Gunawarman, dkk. dalam Fitriawan, dkk., 2014). Selain itu, kasus trauma tulang maksilofasial masih sering terjadi. Data penderita yang dirawat di Staf Medis Fungsional (SMF) Ilmu Bedah Rumah Sakit Umum DR. Soetomo Surabaya tahun 2001-2005 menunjukkan bahwa penderita fraktur maksilofasial akibat kecelakaan lalu lintas sekitar 64,38% dimana fraktur mandibula dan maksila menempati urutan terbanyak yaitu sebesar 29,85%, fraktur zigoma 27,64% dan fraktur nasal 12,66% (Reksoprawiro, dalam Ardhiyanto, 2013).

Material pengganti tulang yang sudah umum seperti *autografts*, *allografts* dan *xenografts* memiliki beberapa kekurangan dalam penggunaannya. *Autografts* dapat menyebabkan rasa nyeri dan morbiditas area donor, infeksi, kehilangan darah akibat waktu operasi yang lebih lama serta keterbatasan jumlah dan sediaan. Pada material *allografts*, kurang memiliki potensi osteogenik dan biaya yang harus dikeluarkan tinggi. Material *xenografts* juga dapat terjadi resiko imunogenisitas (Fitriawan, dkk., 2014; Oryan, dkk., 2014). Oleh karena itu, banyak dikembangkan material pengganti tulang lainnya. Salah satunya dapat dihasilkan dari biomaterial

berbahan kalsium fosfat *based ceramics* seperti hidroksiapatit (HA) (Nandi, dkk., 2010).

Hidroksiapatit (HA) dengan rumus molekul $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ merupakan kalsium apatit biokeramik yang serupa dengan struktur tulang manusia. Dalam dunia kedokteran modern telah banyak digunakan material hidroksiapatit sebagai pengganti tulang manusia yang hilang (Fitriawan, dkk., 2014). Selain itu, kelebihan hidroksiapatit lainnya adalah bersifat osteokonduktif dan memiliki biokompatibilitas yang tinggi (Mao dan V, 2014). Hidroksiapatit dapat disintesa dari berbagai macam sumber seperti tulang, cangkang kerang, maupun gipsum (Sedyono dan Tontowy, 2008; Balgies, dkk., 2011; Fitriawan dkk., 2014).

Gipsum adalah mineral tambang yang terdiri dari berbagai macam kristal dengan rumus kimia $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ atau kalsium sulfat dihidrat. Produk gipsum banyak digunakan dalam bidang kedokteran dalam bentuk bubuk hemihidrat (Anusavice dkk., 2012). Bubuk hemihidrat dalam kedokteran gigi sangat banyak digunakan untuk menghasilkan model studi maupun model kerja sehingga sering disebut sebagai *dental gypsum*. Setelah pemakaian model *gypsum* selesai, model sering kali dibuang sehingga dapat menjadi limbah. Oleh karena itu, dilakukan pemanfaatan limbah *dental gypsum* untuk disintesis menjadi hidroksiapatit.

Sintesis hidroksiapatit dari limbah *dental gypsum* dapat dilakukan melalui proses hidrotermal menggunakan larutan *Diammonium Hydrogen Phosphate* (DHP) dan dilanjutkan dengan proses *sintering* (Sedyono dan Tantowi, 2008). Efek *sintering* dapat meningkatkan kemurnian dan sifat permukaan sehingga membuat material biosintesis lebih kompatibel untuk *bioactive coating* (Gopi dkk. dalam Pudjiastuti, 2012). Dalam penelitian yang dilakukan Wicaksono dkk. (2015) limbah *dental gypsum* tipe II disintesis menjadi hidroksiapatit melalui metode hidrotermal dilanjutkan dengan *sintering* pada suhu 600°C dan 900°C . Hidroksiapatit yang dihasilkan identik

dengan hidroksiapatit komersial, dimana grafik FTIR dan XRD memiliki karakteristik yang serupa dengan HAP 200 Japan yang merupakan produk hidroksiapatit yang telah dipasarkan.

Syarat yang harus dipenuhi oleh material pengganti tulang sintetis adalah dapat diterima oleh tubuh atau biokompatibel sehingga perlu dilakukan uji biokompatibilitas pada material pengganti tulang yang baru (Miranda dkk., Tanpa Tahun). Salah satu uji biokompatibilitas adalah uji toksisitas terhadap sel. Oleh karena itu, penulis melakukan penelitian untuk mengetahui toksisitas hidroksiapatit yang disintesis oleh Wicaksono dkk dari limbah *dental gypsum* pada *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) tikus. MSCs digunakan karena sel ini sangat sensitif terhadap agen toksik (Hendrawan, 2013).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka dirumuskan permasalahan sebagaimana berikut:

1. Bagaimana toksisitas hidroksiapatit sintesis limbah *dental gypsum* tipe II yang disinter pada MSCs tikus?
2. Bagaimana perbedaan toksisitas hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II dengan suhu *sintering* yang berbeda pada MSCs?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui toksisitas hidroksiapatit sintesis limbah *dental gypsum* tipe II yang disinter pada MSCs tikus.
2. Mengetahui perbedaan toksisitas hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II dengan suhu *sintering* yang berbeda pada MSCs.

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang sifat toksik hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II melalui proses hidrotermal yang dilanjutkan dengan proses *sintering*.
2. Memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh suhu *sintering* terhadap hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II.
3. Digunakan sebagai acuan penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Material Pengganti Tulang

Pencangkokan tulang adalah prosedur pembedahan yang memerlukan material pengganti tulang yang hilang dimana dapat berasal dari sebuah pengganti buatan atau alami. Material pengganti tulang didefinisikan sebagai bahan cangkok yang membantu penyembuhan tulang tunggal atau dalam kombinasi dengan bahan lain, melalui osteogenesis, osteoinduksi, dan osteokonduksi, dalam kombinasi atau tunggal. Material tersebut digunakan sebagai perancah untuk memungkinkan pembentukan tulang dan mempromosikan penyembuhan luka dan bertindak sebagai reservoir mineral yang membantu dalam pembentukan tulang baru (Mao dkk., 2013; Oryan dkk., 2014).

Pemilihan suatu material pengganti tulang yang ideal bergantung pada beberapa faktor seperti kelayakan jaringan, ukuran cacat, ukuran material pengganti, bentuk dan volume, karakteristik biomekanik, penanganan material pengganti, biaya, masalah etika, karakteristik biologi, dan komplikasi yang terkait (Oryan dkk., 2014).

2.2 Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA) adalah material keramik yang bersifat biokompatibel dan terdiri dari kristal kalsium fosfat $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dengan rasio kalsium pada fosfat adalah 1,67 dapat ditemukan dalam tulang dan gigi manusia. Dalam dunia kedokteran modern telah banyak digunakan material hidroksiapatit sintetik sebagai pengganti tulang manusia yang rusak karena kemiripan dan kesesuaian strukturnya dengan tulang manusia (Nandi dkk., 2010; Mao dkk. 2013; Fitriawan dkk., 2014).

2.2.1 Struktur Hidroksiapatit

Struktur kristal pada HA dapat dibedakan menjadi 2 struktur, yaitu monoklinik dan heksagonal. Pada umumnya, HA yang biosintesis memiliki struktur heksagonal. Struktur tersebut terdiri dari susunan PO_4 tetrahedral yang diikat oleh ion-ion Ca. Struktur monoklinik dapat dijumpai apabila HA yang terbentuk benar-benar stoikiometri. Rasio C/P dari HA adalah 1,67 dan densitasnya 3,19 g/ml (Ferraz dkk., 2004).

2.2.2 Sifat Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA) memiliki banyak sifat, diantaranya sifat paling unik dari material ini adalah kesamaan kimia dari fase mineral dengan tulang. Hal tersebut menghasilkan potensi osteokonduktif, dan biokompatibilitas yang sangat baik. HA sangat baik untuk faktor pertumbuhan populasi sel adalah yang memiliki sifat osteoinduktif dan osteogenik. HA sebagai material sintetik biasanya digunakan untuk implan ortopedi dan implan gigi karena memiliki sifat sitokompatibel, bioaktif dan biodegradabilitas yang baik, tetapi penggunaannya terbatas karena kelarutan rendah dalam tubuh dan sifat mekanik yang berbeda dengan tulang dan jaringan sekitarnya (Darwis dan Warastuti, 2008; Nandi dkk., 2010).

Sifat kimia yang penting dari HA adalah biokompatibel, bioaktif, dan *bioresorbable*. Biokompatibel adalah sifat dimana material tersebut tidak menyebabkan reaksi penolakan dari sistem kekebalan tubuh manusia karena dianggap sebagai benda asing. Material bioaktif akan sedikit terlarut tetapi membantu pembentukan sebuah lapisan permukaan apatit biologis sebelum langsung saling bertemu antar permukaan dengan jaringan dalam skala atomik yang mengakibatkan pembentukan sebuah ikatan kimia langsung ke tulang. Material *bioresorbable* berperan dalam proses dinamis pembentukan dan rearsorpsi yang terjadi dalam jaringan tulang sehingga material ini dapat digunakan sebagai *scaffolds* atau pengisi

(*filler*) yang dapat berinfiltrasi dan bersubstitusi ke dalam jaringan (Pudjiastuti, 2012).

2.2.3 Sumber Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HA) dapat disintesa dari berbagai macam sumber seperti tulang, cangkang kerang, alga laut (*Marine algae*), maupun gipsum (Sedyono dan Tontowy, 2008; Balgies dkk., 2011; Felicio-Fernandez dkk. dalam Suryadi, 2011; Fitriawan dkk., 2014). Pada penelitian sebelumnya, Wicaksono (2015) telah melakukan sintesis HA menggunakan bahan dari limbah *dental gypsum* tipe II dengan proses hidrotermal dan dilanjutkan proses *sintering*.

2.3 Gipsum Kedokteran Gigi

Gipsum adalah mineral yang ditambang dari berbagai belahan dunia. Gipsum juga merupakan produk samping dari beberapa proses kimia. Secara kimia, gipsum yang dihasilkan untuk tujuan kedokteran gigi adalah kalsium sulfat dihidrat ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) murni (Anusavice, 2012). Sama halnya Dorland (2011), gipsum merupakan kalsium fosfat dihidrat alami yang bila dipanaskan menjadi *plaster of paris*.

Produk yang dibuat dari gipsum secara luas digunakan dalam industri dan hampir semua rumah serta bangunan memiliki dinding yang terbuat dari plaster. Produk gipsum juga digunakan dalam kedokteran gigi untuk membuat model studi dari rongga mulut serta struktur maksilofasial dan sebagai peranti penting untuk pekerjaan laboratorium kedokteran gigi yang melibatkan pembuatan protesa gigi. Berbagai jenis plaster digunakan untuk membuat cetakan dan model dimana protesa dan restorasi kedokteran gigi dibuat. Produk gipsum komersial yang tersedia dipasaran terdiri dari 1 bentuk hemihidrat. Bahan tersebut merupakan hasil pengapuran sulfat dihidrat atau gipsum (Anusavice, 2012).

2.3.1 Klasifikasi *Dental Gypsum*

Berbagai jenis produk gipsum dibuat untuk penggunaan kedokteran gigi. Menurut Spesifikasi *American Dental Association* (ADA) No.25 produk gipsum terdiri dari 5 jenis, yaitu plaster cetak (Tipe I), plaster model (Tipe II), *stone* gigi (Tipe III), *stone* gigi kekuatan tinggi (Tipe IV), dan *stone* gigi, kekuatan tinggi, ekspansi tinggi (Tipe V) (Anusavice, 2012).

Plaster model (Tipe II) terdiri dari kalsium sulfat terkalsinansi (β -hemihidrat) sebagai bahan utamanya dan zat tambahan untuk mengontrol *setting* time (Combe, 1986). *Dental gypsum* tipe ini sekarang digunakan untuk mengisi kuvet dalam pembuatan protesa apabila ekspansi pengerasan tidaklah penting dan kekuatan cukup. Biasanya dipasarkan dalam warna putih alami sehingga terlihat kontras dengan tipe III dan IV yang umumnya berwarna (Anusavice, 2012).

2.3.2 Sintesis Hidroksiapatit dengan Metode Hidrotermal

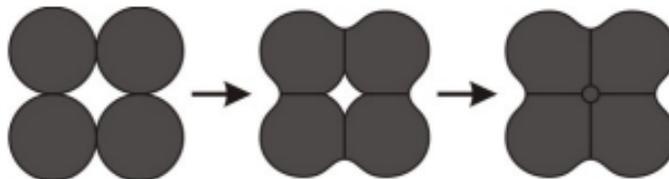
Beberapa metode telah dilakukan dalam sintesa hidroksiapatit (HA) antara lain metode pengendapan kimia basah, pendekatan sol-gel, dan hidrotermal. Metode hidrotermal memanfaatkan tekanan uap air dan tekanan dalam sintesis suatu material keramik. Di abad ke-20, metode untuk sintesis material merupakan teknologi yang penting karena dapat dihasilkan berbagai macam material keramik seperti hidroksiapatit. Metode hidrotermal adalah suatu proses yang menggunakan reaksi-reaksi fasa tunggal atau heterogen di dalam larutan air pada temperatur tinggi ($T > 25^{\circ}\text{C}$) dan tekanan ($P > 100\text{ kPa}$) untuk mengkristalisasi material keramik langsung dari larutan. Bagaimanapun, dengan metode ini rasio kalsium maupun fosfat dari endapan dapat meningkat seiring dengan peningkatan tekanan atau temperatur hidrotermal (Suryadi, 2011).

Felicio-Fernandez dkk. dalam Suryadi (2011) telah melakukan sintesa HA dengan memanfaatkan sumber alam berupa alga laut (*Marine algae*) dari pantai Brazil memakai proses hidrotermal. Pada penelitiannya, struktur berpori dari

phycogenic CaCO₃ tidak mengalami perubahan dan HA yang dihasilkan tidak stokiometrik dan mengandung karbonat. Hasil ini sangat mirip dengan struktur tulang manusia karena HA yang menyusunnya tidak stokiometrik dan mengandung karbonat tipe AB. Metode hidrotermal dapat menghasilkan partikel dengan kristalinitas yang baik dan tidak mengalami aglomerasi, ukuran, bentuk, dan komposisi homogen pada temperatur rendah. Pada gipsium dapat dilakukan pembuatan serbuk terlebih dahulu untuk proses sintesis menjadi HA (Sedyono dan Tontowy, 2008). Setelah proses sintesis HA dengan metode hidrotermal dilanjutkan proses *sintering*.

2.4 Sintering

Pemanasan sampai temperatur tinggi disebut sinter. Pada proses sinter terjadi proses penggabungan partikel-partikel serbuk melalui peristiwa difusi saat suhu meningkat. Penggabungan partikel terjadi melalui peristiwa penghilangan pori-pori antara partikel bahan dimana pada saat yang sama terjadi penyusutan komponen dan diikuti oleh pertumbuhan butir serta pengikatan antara partikel yang berdekatan sehingga menghasilkan bahan yang lebih mampat. Selama proses ini terbentuklah batas-batas butir yang merupakan tahap rekristalisasi (Ramlan dan Bama, 2011; Listiawati dkk., Tanpa Tahun). Efek *sintering* dapat meningkatkan kemurnian dan sifat permukaan sehingga membuat material yang biosintesis lebih kompatibel untuk *bioactive coating* (Gopi dkk., dalam Pudjiastuti, 2012).



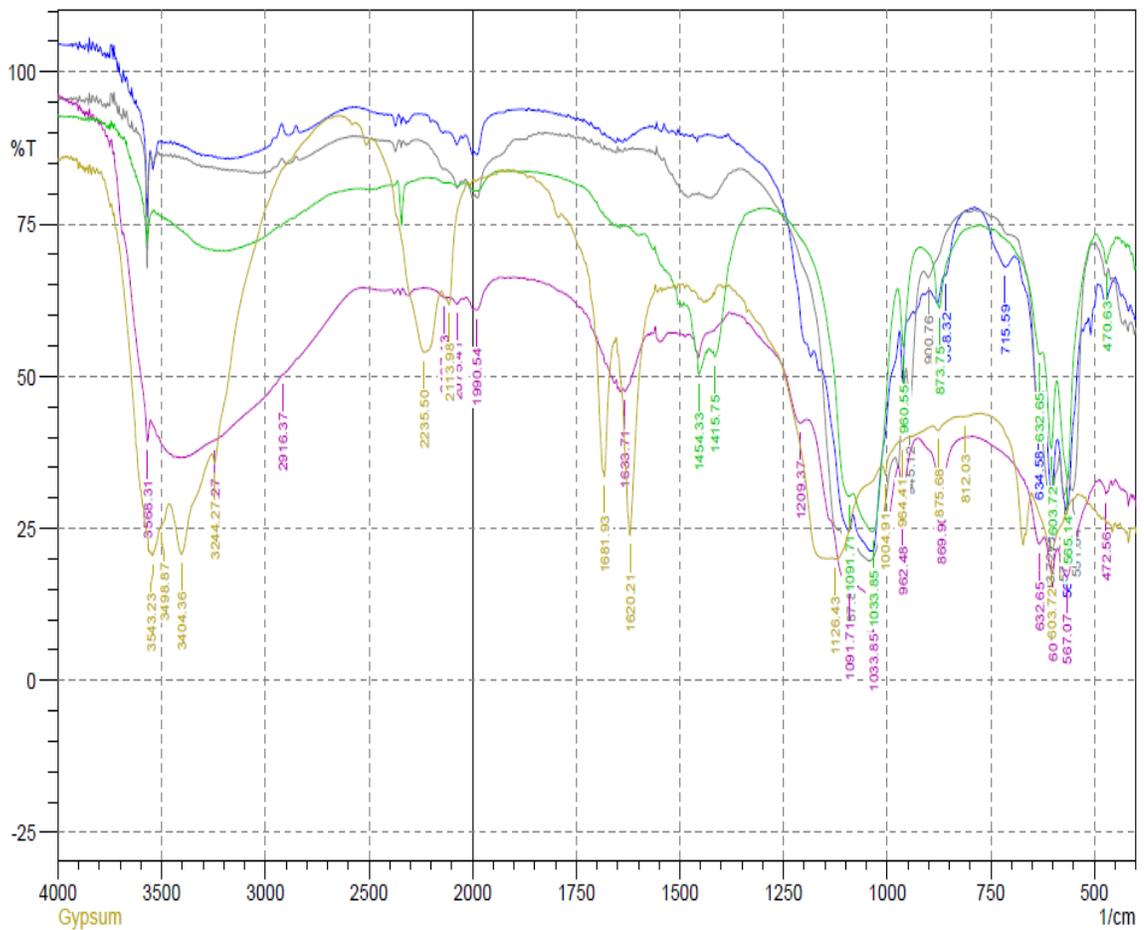
Gambar 2.1. Proses pemampatan pada *sintering* (Ramlan dan Bama, 2011).

Penelitian yang dilakukan oleh Penga (2013) pada tulang sotong (*Sepia sp.*) yang disintesis menjadi hidroksiapatit melalui proses hidrotermal dan dilanjutkan dengan proses *sintering* memberikan efek peningkatan kristalinisasi, ukuran kristal, morfologi, dan *compressive strength*. Hal tersebut terjadi seiring dengan peningkatan suhu *sintering*. Selain itu, peningkatan suhu tidak menimbulkan efek toksik pada hidroksiapatit yang ditunjukkan dengan nilai viabilitas sel lebih dari 60% pada metode *Microculture Tetrazolium Test* (MTT).

Pada penelitian Nurmanta dkk. (2014) yang melakukan *sintering* hidroksiapatit dengan suhu 1200°C selama 1 jam, 2 jam, 3 jam, dan 4 jam menyatakan bahwa keempat sampel hidroksiapatit berpori tersebut tidak bersifat toksik pada sel. Pada pengujian metode MTT menunjukkan bahwa sampel tersebut tidak memberikan efek toksik karena persentase sel hidup yang diperoleh dari pengujian sampel tersebut adalah sebesar 70,889 %.

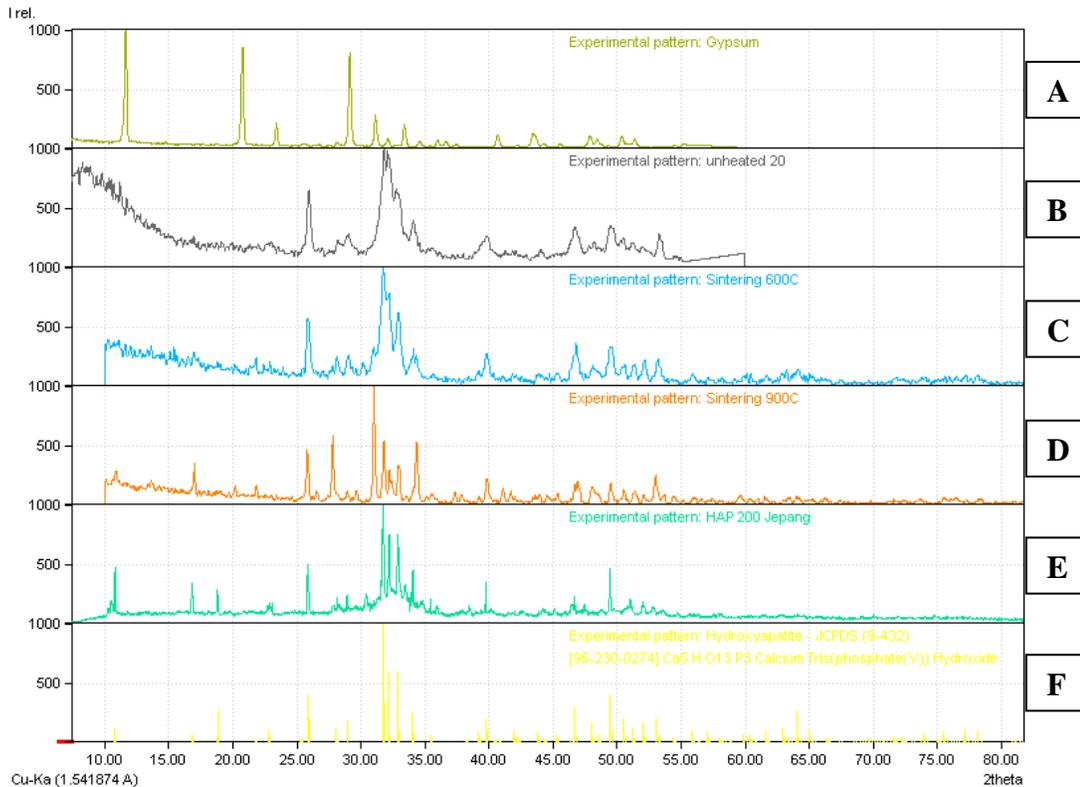
2.5 Karakteristik Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe II

Karakterisasi dengan menggunakan *Fourier Transform InfraRed spectroscopy* (FTIR) dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung di dalam sampel (Indrani, 2012). Berdasarkan penelitian Wicaksono dkk. (2015) dapat diambil kesimpulan bahwa hidroksiapatit hasil sintesa *dental gypsum* tipe II dengan *sintering* suhu 600° C dan 900° C dapat dikatakan sebagai hidroksiapatit yang murni. Hal ini didasarkan pada hasil karakterisasi menggunakan FTIR didapatkan hidroksiapatit *sintering* 600° C dan 900° C yang murni dan identik dengan hidroksiapatit tanpa *sintering*, hidroksiapatit komersial (HAP 200), dan hidroksiapatit stokiometri (HA JCPDS 9-432).



Gambar 2.2 Grafik hasil karakterisasi FTIR hidroksiapatit *sintering* 600° C (biru), hidroksiapatit *sintering* 900° C (abu-abu), hidroksiapatit non *sintering* (ungu), HAP 200 (hijau), gipsum (kuning) (Wicaksono, dkk., 2015)

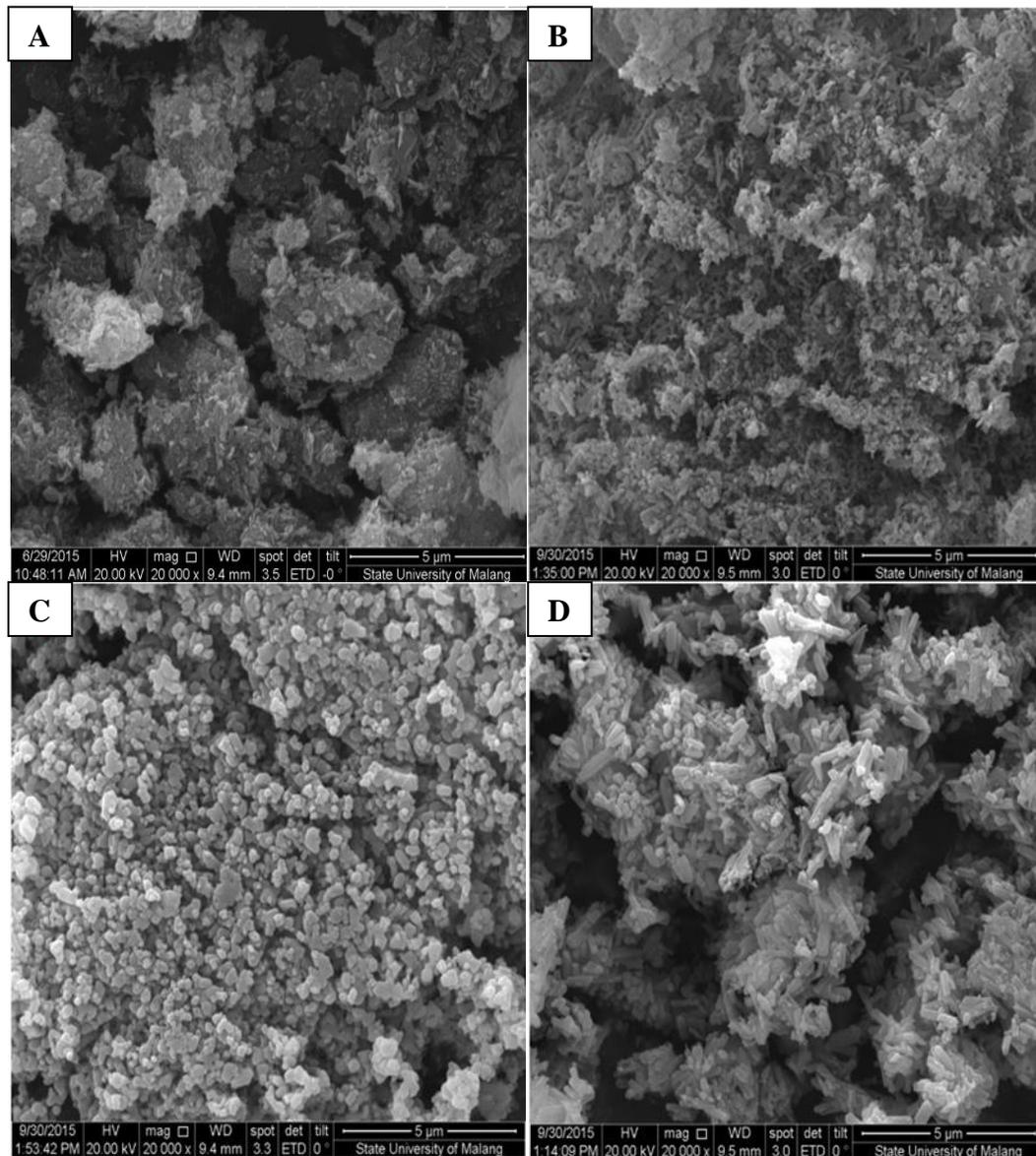
Karakterisasi dengan menggunakan *X-Ray Diffraction* (XRD) dilakukan untuk identifikasi fasa, struktur kristal, derajat kristalinitas, dan ukuran kristalit dari sampel (Indrani, 2012). Hasil karakterisasi menggunakan XRD didapatkan sifat yang identik antara hidroksiapatit tanpa *sintering*, hidroksiapatit *sintering* 600° C, hidroksiapatit *sintering* 900° C, HAP 200, dan HA JCPDS 9–432 (Wicaksono, dkk., 2015).



Gambar 2.3 Grafik hasil karakterisasi XRD hidroksiapatit gipsium (A), hidroksiapatit non sintering (B), sintering 600° C (C), hidroksiapatit sintering 900° C (D), HAP 200 (E), dan HA JCPDS 9-432 (F) (Wicaksono, dkk., 2015)

Karakterisasi dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) untuk mengetahui morfologi sampel (Kosasih dan Zainuri, 2012). Pada penelitian Yang sama, Wicaksono dkk. (2015), hasil karakterisasi menggunakan SEM didapatkan bahwa partikel penyusun serbuk hidroksiapatit sintering 600° C, hidroksiapatit sintering 900° C, dan hidroksiapatit non sintering adalah serbuk bulat memanjang yang berbeda dari HAP 200 yang berbentuk kristal memanjang. Ukuran partikel hasil sintesis juga lebih kecil dari pada HAP 200 dikarenakan kristalinisasi hidroksiapatit yang tinggi. Susunan dan jarak partikel penyusun serbuk hidroksiapatit non sintering, hidroksiapatit sintering 600° C, dan hidroksiapatit sintering 900° C

tersebut tidak teratur dan nampak bahwa partikel-partikel didalamnya melekat antara satu partikel dengan yang lainnya. Hal ini sama dengan SEM dari HAP 200.



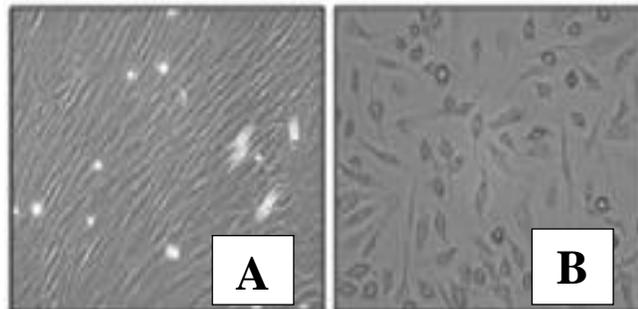
Gambar 2.4 Hasil karakterisasi SEM Hidroksiapatit DG-II non *sintering* (A), Hidroksiapatit DG-II *sintering* 600° C (B), Hidroksiapatit DG-II *sintering* 900° C (C), dan HAP 200 (D) dengan perbesaran perbesaran 20.000x (Wicaksono, dkk., 2015).

Menurut Ardhiyanto, dkk. (2015), kelarutan kalsium dan fosfat yang diukur menggunakan *Atomic Absorbtion Spectrophotometry* dan Spektrofotometri *UV-Visible*. Rasio Ca/P pada hidroksiapatit non *sintering* adalah 0,89 serta *sintering* 600° C dan 900° C adalah 1,16 dan 4,72, sedangkan pada hidroksiapatit komersial (HAP 200) memiliki rasio Ca/P sebesar 1,06.

2.6 Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

Sel punca atau *stem cell* adalah sel yang belum mempunyai bentuk dan fungsi tertentu namun mempunyai kemampuan memperbaiki, memperbanyak diri, dan membentuk sel atau jaringan tubuh. Sel punca yang ditemukan di sel embrio, disebut sebagai sel punca embrional, sedangkan yang berada di jaringan tubuh disebut sebagai sel punca jaringan. Ditinjau dari karakternya, sel punca jaringan dibedakan menjadi dua jenis yaitu sel punca mesenkim (MSCs), dan sel punca hematopoietik (Supartono, 2015).

MSCs merupakan wakil dari jenis sel punca yang memberikan variasi sel termasuk osteosit, kondrosit, adiposit dan bentuk lain dari sel jaringan ikat lain seperti dalam tendon. MSCs bersifat multipoten dimana sel tersebut mempunyai kemampuan untuk membentuk berbagai jenis sel dewasa seperti sel tulang rawan, tulang, lemak dan jaringan penyangga pembuluh darah. MSCs memiliki bentuk seperti sel fibroblas dan melekat pada lempeng plastik (Beyer dan Meireles *dalam* Fibrianto, dkk., 2009; Supartono, 2015) . MSCs dapat diperoleh dari sumsum tulang, baik manusia maupun hewan seperti tikus (Appasani dan Appasani, 2011).



Gambar 2.5 *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) manusia (A) dan tikus (B) (Appasani, dkk., 2011)

Pemanfaatan MSCs telah banyak dilakukan. Pertimbangannya karena MSCs mempunyai kemampuan menyatu dengan jaringan yang membutuhkan (*homing*), membentuk jenis sel sesuai kebutuhan (diferensiasi), memperbaiki kerusakan jaringan, mencegah peradangan (inflamasi) dan mempertahankan kekebalan tubuh (Supartono, 2015). Selain itu, MSCs juga memiliki tingkat sensitifitas yang tinggi terhadap agen toksik sehingga sering digunakan dalam uji toksisitas (Hendrawan, 2013).

2.7 Toksisitas Biomaterial

Salah satu parameter penting yang perlu diperhatikan dalam pemilihan material dibidang medis adalah biokompatibilitas. Biokompatibilitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu bahan untuk memberi respons biologis yang baik jika diaplikasikan ke tubuh. Syarat suatu material dibidang medis, khususnya dibidang kedokteran gigi dapat dikatakan biokompatibel adalah tidak boleh mengiritasi jaringan pulpa maupun jaringan lunak, tidak boleh mengandung bahan yang dapat dilepaskan dan diadsorpsi ke dalam sistem sirkulasi sehingga mengakibatkan respons toksik, harus bebas dari bahan yang dapat menyebabkan respons alergi dan tidak mempunyai potensi kariogenik (Anusavice, 2003).

Parameter uji toksisitas terhadap sel adalah viabilitas sel. Viabilitas sel dapat ditinjau berdasarkan beberapa fungsi sel seperti aktivitas enzim, permeabilitas sel membran, perlekatan sel, produksi ATP, produksi koenzim, aktivitas penyerapan nukleotida (Anonim, 2015).

Terdapat beberapa ion yang terdegradasi dari material hidroksiapatit DG-II, yaitu ion kalsium (Ca^{2+}), ion fosfat (PO_4^{3-}), ion hidroksil (OH^-), maupun ion karbonat (CO_3^{2-}). Diketahui bahwa Ca^{2+} dan ion PO_4^{3-} yang berlebihan dapat menyebabkan apoptosis pada sel (Bashamboo, 2012; Mansfield dkk., 2001).

Kelebihan Ca^{2+} merupakan jalur umum kematian sel karena dapat menyebabkan runtuhnya membran plasma (Yu, dkk., 2001). Ion kalsium yang berlebihan dapat mengakibatkan keadaan sitotoksik sehingga mampu merusak proses signaling sel dan fungsi mitokondria yang dipengaruhi oleh ion kalsium teraktivasi oleh enzim katabolik dan radikal bebas (Yu, dkk., 2001). Selain itu, Ca^{2+} mampu mempengaruhi PO_4^{3-} untuk menginduksi apoptosis (Adams, dkk., 2001). Ion hidroksil merupakan salah satu *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang berasal dari kerusakan oksidatif (Li, dkk., 2015).

2.8 Uji Toksisitas Biomaterial

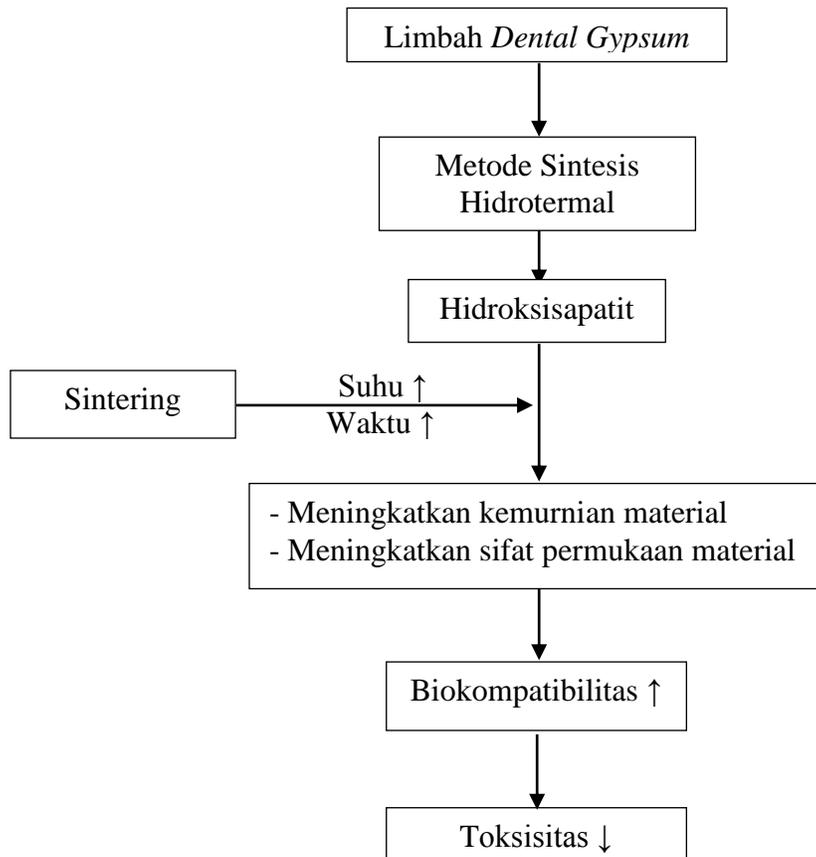
Menurut *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi UGM, uji toksisitas adalah evaluasi yang telah terstandarisasi untuk menentukan apakah suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) secara biologis. Selain itu, menurut Haryoto dkk. (2013), uji toksisitas merupakan uji toksisitas secara *in vitro* menggunakan kultur sel yang digunakan untuk mendeteksi adanya aktivitas antineoplastik dari suatu senyawa. Syarat yang harus dipenuhi untuk sistem uji toksisitas diantaranya adalah sistem pengujian harus dapat menghasilkan kurva dosis-respon yang reproduibel dengan variabilitas yang rendah, kriteria respon harus menunjukkan hubungan linier dengan jumlah sel serta informasi yang didapat dari

kurva dosis-respon harus sejalan dengan efek yang muncul pada *in vivo*. Pada sistem ini menggunakan uji kuantitatif dengan cara menetapkan kematian sel.

Parameter yang digunakan untuk uji toksisitas adalah nilai IC_{50} . Nilai tersebut menunjukkan nilai konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel sebesar 50% dan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel (Cho dkk., 1998). Semakin besar nilai IC_{50} maka semakin tidak toksik senyawa tersebut (Haryoto dkk., 2013).

Pada uji toksisitas dengan menggunakan metode *Microculture Tetrazolium Test* (MTT), menurut Cancer Chemoprevention Research Center Fakultas Farmasi UGM dan Kamal dkk. (2013) memiliki prinsip dimana terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu dan tidak larut air. Penambahan reagen *stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Sehingga jika intensitas warna ungu semakin besar, maka berarti jumlah sel hidup semakin banyak.

2.9 Kerangka Konsep



Gambar 2.6 Kerangka Konsep Penelitian

2.10 Hipotesis

1. Hidroksisapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II melalui proses hidrotermal dilanjutkan dengan *sintering* tidak bersifat toksik terhadap sel.
2. Peningkatan suhu *sintering* menurunkan toksisitas dari hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II melalui proses hidrotermal dilanjutkan dengan *sintering*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris (Notoadmojo, 2005:59).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan pada penelitian ini menggunakan *The Post Test Only Control Group Design* (Notoadmojo, 2005:59).

3.3 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September - Oktober 2015 di beberapa laboratorium sebagai berikut.

- a. Laboratorium *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga.
- b. Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Indonesia, Kecamatan Jenggawah, Kabupaten Jember.

3.4 Identifikasi Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah suhu *sintering* sintesis hidroksiapatit limbah *dental gypsum* tipe II.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah toksisitas hidroksiapatit limbah *dental gypsum* tipe II dengan metode hidrotermal dan *sintering*.

3.5 Definisi Operasional Penelitian

- a. Hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II adalah serbuk hidroksiapatit yang dihasilkan melalui sintesis limbah *dental gypsum* tipe II dengan menggunakan metode hidrotermal dan dilanjutkan dengan *sintering*.
- b. *Sintering* adalah pemanasan sampai temperatur tinggi menggunakan *furnace*. *Sintering* yang dilakukan hingga mencapai suhu 600° C dan 900° C dan dibiarkan pada suhu tersebut selama 1 jam.
- c. Toksisitas adalah jumlah kematian sel yang dipapar serbuk hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II menggunakan metode hidrotermal dilanjutkan dengan *sintering* dengan melihat viabilitas sel menggunakan MTT *assay*. Sel yang digunakan adalah *Mesenchymal Stem Cells* tikus.
- d. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) adalah sel punca yang bersifat multipoten dengan bentuk seperti sel fibroblas. MSCs memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi terhadap agen toksik.

3.6 Sampel Penelitian

Sampel penelitian ini adalah serbuk hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II.

3.6.1 Pengelompokkan Sampel

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 3 kelompok yaitu :

- a. Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol merupakan serbuk hidroksiapatit komersil HAP-200 (Taihei, Jepang).

- b. Kelompok 2 merupakan serbuk hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II (Hidroksiapatit-DG-II) menggunakan metode hidrotermal tanpa *sintering*.
- c. Kelompok 3 merupakan serbuk hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II (Hidroksiapatit-DG-II) menggunakan metode hidrotermal dilanjutkan dengan *sintering* pada suhu 600° C.
- d. Kelompok 4 merupakan serbuk hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe II (Hidroksiapatit-DG-II) menggunakan metode hidrotermal dilanjutkan dengan *sintering* pada suhu 900° C.

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Botol *Schott*
- b. *Tube* 15 ml (Falcon, Biologix)
- c. *Tube* 50 ml (Falcon, USA)
- d. *Centrifuge* (SORVALI)
- e. Cawan petri (NUNC, Denmark)
- f. Mikrotube
- g. *Vortex mixer* (Advantec, Jepang)
- h. *96 microwell plate* (NUNC, Denmark)
- i. *Micropipet* (Eppendorf, Jerman)
- j. *Tips micropipet*
- k. *Sterile syringe filter* (Coming, NY 14831, Jerman)
- l. *Syringe* 12 ml (One Med)
- m. Ependorf *tube* (Axygen, USA)
- n. *Criofile* (NUNC, Denmark)
- o. *Hemocytometer*
- p. Mikroskop (Nikon Elipse 80₁)
- q. Inkubator (ESCO, Jepang)

- r. *Microplate reader* (ImmunoMini NJ-2300, Jepang)
- s. *Biohazard cabinet*
- t. Mikroskop flouresen (Olympus FSX100, Jepang)

3.7.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Hidroksiapatit-DG-II tanpa *sintering*, *sintering* 600⁰C, dan *sintering* 900⁰C (Wicaksono, dkk., 2015)
- b. Tulang femur tikus
- c. Aquades
- d. Klorofom
- e. *Normal Saline* (NaCl)
- f. Larutan povidon iodin
- g. *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs)
- h. Media kultur α MEM
- i. Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x
- j. Larutan *Ficoll*
- k. MTT 5mg/mL PBS
- l. *Dimethyl sulphoxide* (DMSO) *stopper reagen*
- m. NHCl dalam isopropanol

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan sampel hidroksiapatit

a. Uji Toksisitas

Serbuk hidroksiapatit yang diuji toksisitas ditimbang 100 mg dan dimasukkan dalam mikrotube. Kemudian, dilakukan sterilisasi *Gamma radiation* di BATAN. Setelah itu, serbuk hidroksiapatit sintesis dengan konsentrasi 100 mg/mL direndam dalam media perendaman selama 7 hari. Media perendaman hidroksiapatit disentrifugasi 2000 rpm selama 3 menit dan diambil supernatannya. Supernatan

diencerkan hingga mencapai konsentrasi 1000 µg/ml. Hidroksiapatit komersial (HAP 200) digunakan sebagai pembanding.

3.8.2 Kultur MSCs

3.8.2.1 Pengambilan tulang femur

Sebelum dilakukan penelitian, hewan coba dan prosedur penelitian akan dilakukan pengurusan *ethical clearance* di komisi *ethical clearance* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

1. Tiga tikus yang akan diambil tulang femurnya dianastesi terlebih dahulu menggunakan klorofom. Bagian yang akan dilukai disiram dengan alkohol dan melakukan penyayatan secara melintang tepat diproyeksikan pada tulang femur tikus tersebut.
2. Tulang yang telah diambil, disiram dengan NaCl dan bersihkan otot yang masih menempel, siram kembali dengan NaCl. Kemudian tulang femur yang telah bersih dimasukkan ke dalam tabung disposibel steril yang telah berisi NaCl. Setelah semua tulang femur diambil dari ketiga tikus tersebut, kemudian dimasukkan ke dalam larutan povidon iodin. Tulang dibilas kembali dengan NaCl hingga bersih.
3. Tulang yang telah bersih dimasukkan ke dalam tabung disposibel steril yang berisi medium transport untuk siap dilakukan isolasi dan kultur MSCs dari sumsum tulang femur tikus tersebut.

3.8.2.2 Isolasi, kultur, dan ekspansi MSCs sumsum tulang

- 1 Mempersiapkan bahan yang akan digunakan. Sumsum tulang yang diperoleh dituang ke dalam tabung disposibel steril 15 ml dan ditambahkan PBS sebanyak 10 ml kemudian resuspensi. Siapkan 5 ml Ficol dan tambahkan ke dalam tabung disposibel 15 ml. Secara perlahan melalui dinding tabung, tuangkan campuran sumsum tulang dan PBS. Lakukan setrifugasi pada temperatur 20°C selama 25 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Dari sentrifugasi akan diperoleh 4 lapisan, yaitu sel darah merah, Ficol, *buffy coat*, dan plasma. Dengan menggunakan pipet,

buffy coat diambil dan diletakkan pada tabung disposibel 15 ml yang steril dan ditambahkan PBS 10 ml. Sentrifugasi kembali pada temperatur 20°C selama 10 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Dari sentrifugasi akan diperoleh pelet dan kemudian ditambahkan medium penumbuh α MEM sebanyak 2 ml dan diresuspensi.

- 2 Hasil resuspensi dipindahkan ke *petridish* diameter 10 cc dan ditambahkan 10 ml medium penumbuh α MEM. Inkubasi pada inkubator 37° C dengan kadar CO₂ dan pertumbuhan sel akan diamati setiap harinya. Pada hari kedua dilakukan pencucian sel dengan mengambil medium lama dan dicuci dengan PBS, lalu diganti dengan medium baru. Apabila pertumbuhan sel telah konfluen 80% dilakukan *splitting*. Medium lama diambil dan ditambahkan tripsin 3 ml, kemudian inkubasi selama 5 menit pada inkubator. Setelah 5 menit ditambahkan medium komplet, disentrifugasi dalam tabung disposibel steril dan dibuang supernatannya. Kemudian dipindahkan ke dalam 2 *petridish* berdiameter 10 cc, masing-masing ditambahkan 10 ml medium komplet. Inkubasi kembali dalam inkubator. Pertumbuhannya diamati setiap hari hingga jumlah yang diinginkan telah tercapai. Pada penelitian ini menggunakan hasil *passage* ke-5.

3.8.2.3 Karakterisasi MSCs

- 1 Sel yang telah monolayer di jadikan *single* sel dengan proses tripsinasi. Kemudian sentrifugasi 1600 rpm, selama 5 menit. Pelet sel yang diperoleh ditambahkan medium sebanyak 1 ml, resuspensi dan ditanam pada obyek glass khusus sebanyak 20 μ l. Letakkan obyek glass dalam kotak yang didalamnya sudah terdapat kertas basah dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian melakukan fixasi dengan 3% formaldehid selama 15 menit pada suhu ruang dan cuci dengan PBS sebanyak 4 kali, lalu dikeringkan. *Blocking* dengan PBS yang mengandung serum 1%, selama 15 menit pada suhu ruang. Cuci dengan PBS sebanyak 4 kali dan keringkan.

2. Tambahkan Ab CD-45/CD-105 yang sudah berlabel FIT-C, inkubasi di suhu 37°C selama 45 menit. Cuci dengan PBS sebanyak 4 kali dan mengeringkan air di sekitar obyek glass dengan kertas tisu. Teteskan 50% gliserin di atas obyek glass dan lihat hasilnya dengan mikroskop fluoresen pada perbesaran 40x. Apabila hasilnya berpendar maka positif tetapi apabila hasilnya tidak berpendar maka negatif.

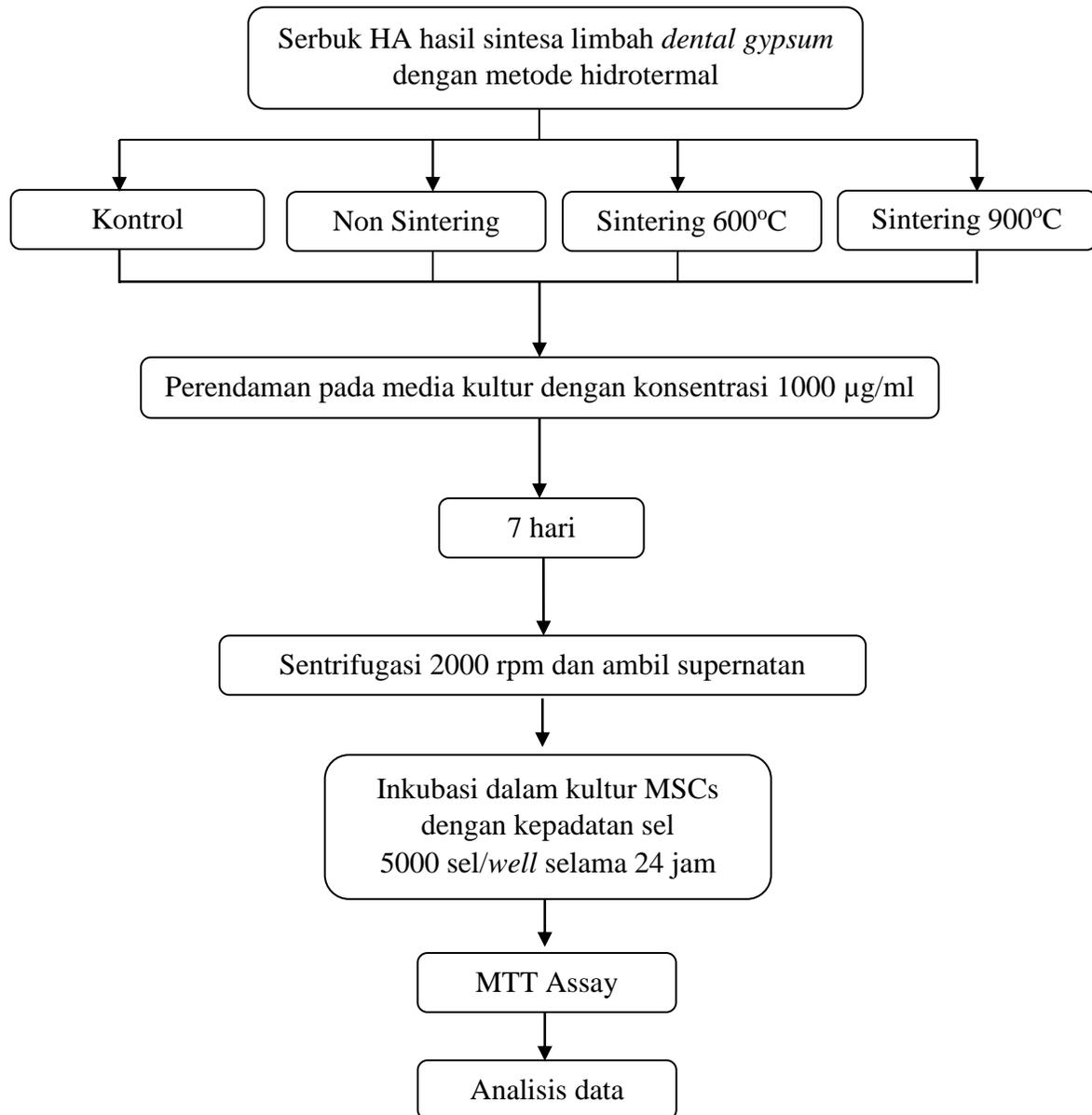
3.8.3 Uji Toksisitas

Pada uji toksisitas menggunakan metode MTT dilakukan dengan cara sebagai berikut.

1. Dilakukan tripsinasi untuk melepas lapisan MSCs pada *flask* kultur. Setiap sumuran pada 96 sumuran *microtiter tissue plate* diisi suspensi MSCs dengan kepadatan sel 5×10^3 sel per *well*, media kultur sel kemudian diinkubasi selama 24 jam. Sumuran untuk kelompok perlakuan diberi ekstrak hidroksiapatit, masing-masing dibuat 3 replikasi. Setelah inkubasi selama 24 jam, tiap sumuran diberi 10 μ L MTT, dibiarkan selama 4 jam, lalu diberi DMSO 200 μ l per *well*. Setelah itu nilai OD diperoleh dengan menggunakan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Nilai OD digunakan untuk menghitung presentase kematian sel dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ kematian} = \frac{\text{OD sel kontrol} - \text{OD sampel}}{\text{OD sel kontrol} - \text{OD medium}} \times 100\%$$

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian

3.10 Analisis Data

Analisis data didahului dengan uji normalitas dan homogenitas untuk mengetahui bahwa data terdistribusi normal dan homogenitas sebagai prasyarat

dalam pengujian statistik parametrik. Uji normalitas dilakukan dengan mengetahui apakah distribusi data yang ada pada masing-masing variabel mengikuti kurva distribusi normal atau tidak. Uji normalitas dilakukan dengan uji *Saphiro Wilk* dengan $p = 0,05$. Uji selanjutnya adalah uji homogenitas untuk mengetahui apakah kesimpulan yang diambil dapat menggambarkan populasi yang ada. Uji homogenitas data menggunakan uji *Levene* dengan $p = 0,05$. Selanjutnya apabila data berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik dengan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya pengaruh suhu *sintering* terhadap efek toksik hidroksiapatit DG-II. Untuk dapat mengetahui perbedaan antar kelompok maka dapat dilakukan uji *Least Significant Difference* (LSD). Namun, apabila data tidak berdistribusi normal maka dilakukan uji non parametrik dengan uji *Kruskal Wallis*, kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui besarnya perbedaan antar masing-masing kelompok.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

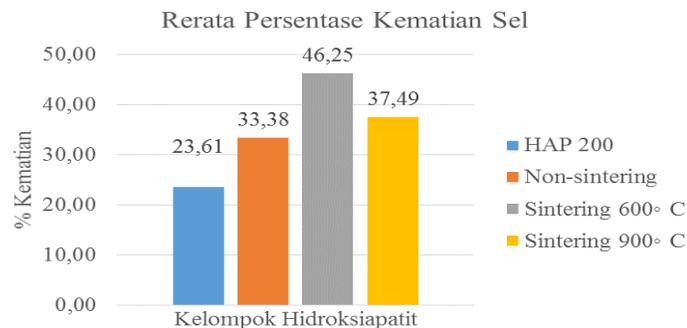
4.1 Hasil dan Analisa Data

Hasil penelitian untuk melihat toksisitas serbuk hidroksiapatit DG-II terhadap jumlah kematian MSCs tikus dapat dilihat pada tabel 4.2.

Tabel 4.1 Persentase kematian MSCs tikus yang dipapar hidroksiapatit (%)

Kelompok	I (%)	II (%)	III (%)	Rerata \pm standar deviasi (%)
HAP 200	26.27	27.57	25.10	26.31 \pm 1.24
Non-sintering	34.72	31.60	33.81	33.38 \pm 1.60
Sintering 600°C	42.65	49.80	46.29	46.25 \pm 3.58
Sintering 900°C	36.02	38,88	37.58	37.49 \pm 1.43

Secara umum, kelompok hidroksiapatit sintesis menunjukkan persentase kematian sel lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol (HAP 200). Pada kelompok hidroksiapatit sintesis, persentase kematian sel paling tinggi dari adalah pada *sintering* 600°C dan paling rendah adalah non *sintering*. Gambaran perbandingan kematian sel dapat dilihat dalam histogram pada gambar 4.2.



Gambar 4.1 Histogram rerata persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit

Data hasil penelitian yang diperoleh, selanjutnya diuji normalitas dan uji homogenitas terlebih dahulu untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal dan homogen. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan *Saphiro Wilk Test* (Tabel 4.2). Uji homogenitas dilakukan dengan menggunakan *Levene's Test* (Tabel 4.3).

Tabel 4.2 Hasil *Saphiro Wilk Test* dari persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Kelompok	Saphiro-Wilk
		Sig.
1000	HAP 200	.942
	Hidroksiapatit DG-II Non <i>Sintering</i>	.549
	Hidroksiapatit DG-II <i>Sintering</i> 600	.980
	Hidroksiapatit DG-II <i>Sintering</i> 900	.900

Tabel 4.3 Hasil *Levene's Test* dari persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Levene Statistic	Sig.
1000	1.068	.415

Hasil *Saphiro Wilk Test* menunjukkan bahwa signifikansi > 0.05 yang berarti bahwa semua data diatas berdistribusi normal. Hasil *Levene's Test* juga menunjukkan bahwa signifikansi > 0.05 yang berarti bahwa semua data di atas homogen.

Untuk melihat apakah terdapat perbedaan antara kelompok hidroksiapatit dilakukan uji parametrik *Oneway ANOVA*.

Tabel 4.4 Hasil Uji *Oneway* ANOVA persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)		Dr	Mean Square	Sig.
1000	<i>Between Groups</i>	3	207.856	.000
	<i>Within Groups</i>	8	4.733	
	<i>Total</i>	11		

Berdasarkan tabel 4.4, nilai signifikasinya 0.000 ($p < 0.05$) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antar kelompok hidroksiapatit. Oleh karena itu, data tersebut dapat diuji beda lanjut dengan menggunakan uji *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan lebih lanjut antar dua kelompok hidroksiapatit.

Tabel 4.5 Hasil uji LSD persentase kematian MSCs tikus yang telah dipapar hidroksiapatit yang berbeda

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Kelompok	HAP 200	HA DG-II Non sintering	HA DG-II Sintering 600° C	HA DG-II Sintering 900° C
1000	HAP 200		0.004	0.000	0.000
	HA DG-II Non sintering	0.004		0.000	0.049
	HA DG-II Sintering 600° C	0.000	0.000		0.001
	HA DG-II Sintering 900° C	0.000	0.049	0.001	

Berdasarkan tabel 4.5 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p < 0.05$) pada semua perbandingan persentase kematian sel dari kelompok hidroksiapatit yang berbeda.

4.2 Pembahasan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh hasil bahwa persentase kematian MSCs tikus yang dipapar hidroksiapatit sintesis lebih tinggi dibandingkan dengan yang dipapar hidroksiapatit komersial (HAP 200). Apabila ditinjau dari hasil FTIR (Wicaksono, dkk., 2015), hidroksiapatit sintesis memiliki gugus hidroksil. Gugus tersebut dapat terdegradasi dalam media perendaman sehingga akan melepaskan ion hidroksil (OH^-). Ion hidroksil tersebut dapat merusak DNA sel dengan mengakibatkan berbagai macam lesi oksidatif. Lesi oksidatif ini akan mengakibatkan kerusakan genomik hingga kematian sel (Li, dkk., 2015).

Proses awal apoptosis yang diinduksi oleh lesi oksidatif, tidak secara langsung merusak dengan membunuh sel, melainkan memicu program sinyal apoptosis yang menyebabkan kematian sel. Selain itu, lesi oksidatif yang terjadi terus menerus dapat mengakibatkan kerusakan biomolekul oksidatif sehingga menimbulkan efek biologikal pada perubahan transduksi sinyal dan ekspresi gen untuk transformasi hingga kematian sel (Mates dan Sanchez-Jimenez, 1999).

Selain ion hidroksil, hidroksiapatit juga dapat melepaskan ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion fosfat (PO_4^{3-}) yang merupakan struktur penyusunnya. Berdasarkan hasil uji pendahuluan (tabel 4.1) menunjukkan bahwa kadar Ca^{2+} dan PO_4^{3-} dalam media perendaman hidroksiapatit sintesis lebih tinggi dibandingkan HAP 200. Kadar Ca^{2+} yang berlebihan dapat menyebabkan membran plasma sel menjadi ruptur. Ion kalsium dalam mitokondria dapat merangsang matriks dehidrogenase yang sensitif terhadap Ca^{2+} untuk memproduksi ATP. Namun, tingginya Ca^{2+} tersebut dapat mengaktifkan pembukaan pori permeabilitas transisi yang tersusun dari protein sehingga air maupun zat terlarut dalam sitosol akan masuk dan mengakibatkan pembengkakan mitokondria hingga terjadinya ruptur membran (Zhivotovsky dan Orrenius, 2011).

Ion kalsium berlebihan yang teraktivasi oleh enzim katabolik dan radikal bebas dapat mengakibatkan toksisitas pada sel dengan merusak proses signaling sel dan fungsi mitokondria (Yu, dkk., 2001). Selain itu, Ca^{2+} mampu mempengaruhi

PO_4^{3-} untuk menginduksi apoptosis (Adams, dkk., 2001). Pada dasarnya, ion fosfat sangat diperlukan untuk nutrisi pembentukan asam nukleat dan membran sel. Keseimbangan PO_4^{3-} sangat dibutuhkan untuk menghasilkan energi dalam metabolisme sel. Akan tetapi, apabila PO_4^{3-} tidak berada dalam keseimbangan maka dapat terjadi gangguan proses *signaling* pada sel dan berakhir pada kematian sel (Osuka dan Razzaque, 2012). Berdasarkan hasil uji pendahuluan, hidroksiapatit DG-II *sintering* 600° C memiliki kadar PO_4^{3-} lebih tinggi dibandingkan hidroksiapatit DG-II *sintering* 900° C dan hidroksiapatit DG-II non *sintering* sehingga keadaan tersebut dapat mengganggu keseimbangan kadar PO_4^{3-} dalam sel. Akibatnya, persentase kematian sel masih lebih tinggi dibandingkan hidroksiapatit sintesis lainnya.

Secara teori, proses *sintering* dapat meningkatkan derajat kristalinitas suatu material. Derajat kristalinitas yang tinggi dapat menurunkan degradasi material seperti yang dipaparkan oleh Indrina (2012). Apabila degradasi material rendah, maka ion yang terlepas dalam media perendaman juga sedikit. Pada studi yang dilakukan oleh Nazarpak, dkk., dalam Indrina (2012) menunjukkan bahwa suhu kalsinasi di atas 1000° C dapat meningkatkan derajat kristalinitas material secara signifikan. Hal tersebut dibuktikan dalam hasil uji pendahuluan (tabel 2.1) menunjukkan bahwa kadar Ca^{2+} dalam media perendaman pada hidroksiapatit DG-II *sintering* lebih tinggi dibandingkan hidroksiapatit DG-II non *sintering* sehingga persentase kematian MSCs tikus yang dipapar hidroksiapatit DG-II non *sintering* lebih rendah dari yang dipapar hidroksiapatit DG-II *sintering*. Hal ini menunjukkan bahwa suhu *sintering* yang dilakukan belum meningkatkan derajat kristalinitas secara signifikan sehingga menyebabkan degradasi material masih tinggi. Akibatnya, konsentrasi ion dalam media perendaman hidroksiapatit DG-II *sintering* memiliki kadar yang tinggi, seperti yang ditunjukkan pada hasil uji pendahuluan sehingga tidak dapat ditoleransi oleh sel dan dapat menyebabkan kematian MSCs tikus.

Pada penelitian ini, hingga konsentrasi 1000 µg/ml, hidroksiapatit DG-II non *sintering* memiliki persentase kematian sel tidak lebih dari 34%, sedangkan hidroksiapatit DG-II *sintering* 600° C dan 900° C memiliki persentase kematian sel

tidak lebih dari 47% dan 38%. Meskipun demikian, perlu dikembangkan metode sintesis hidroksiapatit dengan *sintering* pada suhu dan waktu yang bervariasi untuk mendapatkan material yang memiliki resiko kematian sel yang lebih rendah.

BAB 5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian dalam skripsi ini, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut.

1. Hidroksiapatit dengan *sintering* 600° C dan 900° C memiliki toksisitas hingga 46% dan 38%. Akan tetapi, masih lebih toksik dibandingkan dengan hidroksiapatit non *sintering* yang memiliki toksisitas 34%. Hal ini dapat disebabkan oleh karena masih adanya gugus hidroksil dalam hidroksiapatit dengan *sintering*. Selain itu, berdasarkan hasil uji pendahuluan menunjukkan kadar ion kalsium dan ion fosfat dalam media perendaman hidroksiapatit *sintering* lebih tinggi dari pada hidroksiapatit non *sintering*.
2. Suhu *sintering* yang lebih tinggi dapat menurunkan toksisitas hidroksiapatit. Hal ini disebabkan oleh karena semakin tinggi suhu *sintering* maka dapat meningkatkan derajat kristalinitasnya sehingga degradasi material semakin rendah.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian disarankan menggunakan proses sintesis hidroksiapatit dengan suhu *sintering* dan waktu yang bervariasi untuk mengetahui suhu yang lebih optimal sehingga kematian sel lebih rendah. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang degradasi material serta mekanisme penyebab kematian sel.