jurnal material kedokteran gigi

ISSN 2302-5271

Studi pendahuluan silika amorf sekam padi sebagai scaffold sintetis *bone graft*: efeknya terhadap aktivitas sel osteoblas (*In-vitro*)

Didin Erma Indahyani
Bagian Biologi Mulut Fakultas Kdokteran Gigi Universitas Jember

Zahreni Hamzah
Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Pujiana Endah Lestari
Bagian Oral Medicine Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Abstrak

Bahan sintetik *bone graft* dikembangkan sebagai *scaffold* yang berfungsi untuk template pembentukan tulang. *Scaffold* yang ideal adalah harus biodegradable, osteokonduktif dan osteoinduktif. Silica terbukti mendukung dan mempromosikan pertumbuhan tulang. Sekam padi mengandung silika cukup tinggi. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis silika amorf dari limbah sekam padi sebagai bahan sintetis *bone graft (scaffold)*, khususnya terhadap aktifitas osteoblast secara *in-vitro.* Penelitian ini dilakukan dengan mengisolasi silika dari sekam padi. Hasil isolasi akan dikondisikan pada media kultur osteoblas primer. Kultur osteoblas primer berasal dari calvaria tikus wistar umur 2 hari, di tumbuhkan dalam *Alpha-Modified Eagle Medium* (α-MEM) (sebagai kontrol negatif), α-MEM yang di kondisikan dengan silika 58S (sebagai kontrol positif) dan α-MEM yang dikondisikan dengan silika dari sekam padi (sebagai kelompok perlakuan). Aktifitas osteoblas diamati dengan menganalisis ekspresi *alkaline phosphatase* (ALP), menggunakan *Alkalin phosphatase* Kits pada hari ke 7 dan 14. Hasil yang diperoleh bahwa silika sekam padi secara bermakna ($p<0,05$) mempunyai ekspresi *alkaline phosphatase* yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol potitif dan negatif. Hal ini dapat diartkan bahwa silika amorf sekam padi mempengaruhi peningkatan aktifitas osteoblas secara in-vitro. Disimpulkan bahwa silika sekam padi meningkatkan aktifitas

Korespondensi:

Didin Erma Indahyani
Bagian Biologi Mulut Fakultas Kdokteran Gigi Universitas Jember
email: didinermae@yahoo.com

sel osteoblas sehingga bersifat osteoinduktif yang berpotensi sebagai *scaffold* untuk bahan sintetis *bone graft*.

Kata Kunci: *bone graft,* scaffold, silika, *alkaline phosphatase*, osteoblas

Preliminary study of amorphous silica husk rice as synthetic bone graft material: the effect on osteoblasts activities (In-vitro)

Abstract

Synthetic bone graft material was developed as a scaffold that serves to template the formation of bone. The ideal scaffold should be biodegradable, osteoindukctive, and osteoconductive. Silica proven to support and promote bone growth. Rice husk contains silica is quite high. The purpose of this study is to analyze the amorphous silica from rice husk as synthetic bone graft material (scaffold), particularly on osteoblast activity in vitro. The research was conducted by isolating silica from rice husk.The results of isolation would be conditioned on the culture medium of primary osteoblasts. Primary osteoblast cultures derived from rat calvaria wistar age of 2 days, growing in Alpha-Modified Eagle Medium (α-MEM) (as a negative control), α-MEM in conditioning with silica 58s (as a positive control) and α-MEM that conditioned with silica from rice husk (as treatment group). Osteoblast activity was observed by analyzing the expression of alkaline phosphatase, using Alkaline phosphatase Kits at days 7 and 14. The results obtained that the rice husk silica were significantly ($p < 0.05$) has the expression of alkaline phosphatase higher than the control group and potitif group. This may imply that the amorphous silica of rice husk affects the increase in osteoblast activity in vitro. It was concluded that rice husk silica increases osteoblast cell activity that is potentially as scaffold for bone graft synthetic material.

Key words: *bone graft, scaffold, silica, alkaline phosphatase, osteoblasts*

Pendahuluan

Bone graft sering digunakan untuk memberikan support, mengisi celah kosong antara tulang dan implant, juga dapat mempercepat penyembuhan pada kelainan skeletal.[1] Selama ini *bone graft* dikatakan sebagai *gold standart* terapi tulang, akan

tetapi secara signifikan *bone graft* tersebut mempunyai keterbatasan misalnya pada *autograft* dapat mengakibatkan kematian di daerah donor, jumlahnya yang sedikit sebagai sumber donor dan rasa sakit yang lama serta *cosmetic deformity*.[1] Selain itu, 10-15% penderita *post operative* mengeluh karena rasa sakit berkepanjangan sedang yang mengalami trauma neural di sekitar daerah donor adalah 10%[2], dan juga pembentukan tulang baru pada *autograft*, sangat tergantung pada usia, dan kesehatan pasien.[3,4] Pada allograft berpotensi untuk terjadinya resiko transmisi penyakit dan reaksi imun/jaringan.[5]

Prinsip dasar *bone tissue engineering*, mendasari perkembangan bahan sintetik *bone graft*, bertujuan untuk menghindarkan keterbatasan perawatan konvensional pada transplantasi dan biomaterial implan dan berpotensi untuk mensuplai toleransi artifisial organ secara imunologis dan dapat menumbuhkan jaringan pengganti pada penderita.[6] Secara khusus bahan *graft* ditujukan untuk memberikan *scaffold* yang porus yang berfungsi untuk *template* regenerasi tulang dan pembentukan tulang baru.[4,7] Biomaterial *scaffold* mengganti fungsi biologis dan mekanis dari matriks ekstraseluler jaringan di dalam tubuh dengan bertindak sebagai matriks ekstra seluler artifisial.[8]

Datta dkk[9] menyatakan bahwa secara *in vivo*, matriks ekstraseluler mempunyai peranan penting dalam mempertahankan dan memediai fungsi tulang, karena mengandung beberapa faktor osteoinduktif dan osteokonduktif. Oleh karena itu *scaffold* sintetis harus mempunyai sifat osteoinduktif, osteokonduktif, integritas mekanisnya tinggi, biodegradabilitas, biokompatibilitas (mudah diterima secara imun) dan porositas yang akan menyebabkan pertumbuhan jaringan dalam tulang. Selain itu, *scaffold* harus didegradasi ketika jaringan yang rusak telah diregenerasi.[10]

Peristiwa seluler yang terjadi pada pembentukan tulang merupakan peristiwa pergerakan prekursor osteoblas ke daerah resorpsi dengan proses kemotaksis, dan juga adanya proliferasi prekursor osteoblas yang diikuti oleh diferensiasi untuk menjadi sel yang matur. Osteoblas matur mampu mensintesis protein tulang yaitu kolagen type I, *osteokalsin, osteopontin*, *alkalin fosfatase*, proteoglikan dan komponen komponen faktor regulasi pertumbuhan yang disimpan dalam matriks tulang termasuk bone sialoprotein juga osteonektin. Komponen-komponen tersebut menyebabkan penumpukan mineralisasi pada matriks tulang.[11] Pre osteoblas yang berproliferasi dan *osteoblas* yang matur akan mengekspresikan *alkaline phosphatase* (ALP), sehingga dikatakan sebagai enzim marker *osteoblas* yang aktif.[12]

Silika merupakan bahan semi konduktor terbukti mempengaruhi pembentukan tulang. Defisiensi silika menunjukkan penurunan deposisi matriks ekstraseluler (kolagen) dan mineral tulang (hidroksiapatit).[13] Makanan yang mengandung silikon dapat menstimulasi sel *osteoblas* dan osteoblas-like untuk mensekresi kolagen tipe I dan marker biokimia lain pada maturasi sel tulang dan pembentukan tulang.[14]

Silika banyak ditemukan dengan konsentrasi yang sangat tinggi pada tulang yang immature. Pada tahap mineralisasi konsentrasi silica menurun, sementara kalsium meningkat pada hidroksiapatit tulang. Hal ini menunjukan bahwa silika terlibat dalam inisiasi kalsifikasi dengan mempengaruhi matriks preoseous.[13] *Bioactive glass* berbasis silika yang digunakan sebagai coating implant menunjukan percepatan pembentukan tulang baru dengan adanya ekspresi BMP-2 dan komponen-komponen matriks tulang (kolagen tipe I, II dan III, osteokalsin, serta marker-marker resorpsi tulang yaitu katepsin K dan MMP-9).[15] Silikon mudah dilakukan resorpsi setelah pembentukan tulang, sehingga *scaffold*

silika akan diganti dengan tulang.[10] Menurut Koh dan Atala[8] bahwa biomaterial yang ideal harus kompatibel yaitu biodegradable bioresorbable untuk mendukung penggantian jaringan normal tanpa inflamasi. Bahan yang tidak kompatible lemah pada inflamatori atau respon benda asing tubuh yang akhirnya berperan pada penolakan atau nekrosis. Selain itu hasil degradasi, jika dihasilkan harus dihilangkan dari tubuh melalui jalur metabolisme.

Sekam padi adalah bagian terluar dari butir padi, yang merupakan hasil sampingan saat proses penggilingan padi dilakukan. Kandungan silika dari abu sekam adalah 94-96% dan atau mendekati di bawah 90%. Silika yang terdapat dalam sekam dalam bentuk amorf terhidrat. Tapi jika pembakaran dilakukan secara terus menerus pada suhu di atas 650^{o}C akan menaikkan kristalinitasnya dan akhirnya akan terbentuk fasa kristobalit dan tridimit dari silika sekam.[16] Tujuan dari penelitian ini adalah menganalisis silika amorf dari limbah sekam padi sebagai bahan sintetis *bone graft (scaffold)*, khususnya terhadap aktifitas osteoblast secara *in-vitro.*

Metode penelitian

Alat dan bahan penelitian ini adalah silika sekam padi, *Alkaline Phosphatase Assay Kit (Catalog #K412-500 (Biovision),* FBS, penisilin-streptomisin (100 U/mL), 2mM $_{L}$-glutamin, askorbat -2 fosfat (50 µg/mL) dan 10mM *β-glycerophosphate*. *phosphate buffer saline* (PBS), kolagenase, *Fetal bovine serum* (FBS), sentrifuse, *basic medium culture* (*α-modified Eagle's medium* (α-MEM), penisilin G (50U/mL), streptomisin (50µg/mL), cultur dish, *plate 96 well,* mitomycin C (100 µg/mL), *human recombinant basic fibroblast growth factosr* (bFGF, 10ng/mL), Elisa Reader.

Pertama kali dilakukan ekstraksi silika, yang diperoleh dengan melakukan proses pengabuan. Abu sekam padi dimurnikan dengan cara pengasaman, kemudian diuapkan dan diberi akuades dan HCL untuk dipanaskan kembali. Hasilnya disaring dan dicuci 4 sampai 5 kali dengan akuades panas. Hasil penyaringan berupa residu padat beserta kertas saringnya dipanaskan hingga kertas saring menjadi arang. Kemudian dilanjutkan dengan memanaskan pada suhu 600^{o}C hingga yang tersisa hanya endapan silika (SiO_2) berwarna putih.[16] Identifikasi dilakukan dengan menggunakan Gravimetri.

Persiapan pengkondisian medium kultur dilakukan dengan cara silika amorf sekam padi (60%) ditambahkan CaO (36%) dan P_2O (54%), sedangkan 58S *bioactive glass* (60% SiO_2, CaO (36%) dan P_2O (54%), dalam mol persen) disiapkan sebagai kontrol. Bahan tersebut masing-masing digiling (dihaluskan) dalam wadah dan diayak untuk mendapatkan ukuran partikel antara 90-710µm. Medium yang belum disuplemen akan dikondisikan dalam silika amorf dari sekam padi dan *58S bioactive glass*, disiapkan dengan perendaman partikel silika amorf dan juga 58S *bioactive glass* (antara 0,1 dan 0,5 g/100mL) selama 24 jam pada suhu 37^{0}C. Ekstraks tersebut kemudian disterilisasi dengan v*acum filtration* menggunakan membran nilon dengan ukuran pori-pori 0,2-µm. Medium yang telah dikondisikan tersebut, kemudian disuplemen dengan 10-15% FBS, penisilin-streptomisin (100 U/mL), 2mM $_{L}$-glutamin, askorbat -2 fosfat (50 µg/mL) dan 10mM *β-glycerophosphate*.[17]

Pembuatan kultur primer osteoblas dari kalvaria tikus umur 2 hari, diambil dan dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dan dipotong-potong kecil dengan gunting, kemudian dihancurkan 5 kali dengan kolagenase selama 10 menit pada suhu 37^{0}C. Masing-masing hasil pemotongan diambil supernatannya dan dipindahkan dalam *Fetal bovine serum* (FBS). Kumpulan dari ke 3,4 dan 5 supernatan tersebut, dikumpulkan dan disentrifuse pada 1500 rpm selama 5 menit, kemudian diresuspensi dalam *basic medium culture* (*α-modified Eagle's medium* (α-MEM)

dengan 15% FBS, penisilin G (50U/mL) dan streptomisin (50µg/mL). Sel dipertahankan dalam *basic medium* dan *passaged* 3 kali sebelum digunakan untuk eksperimen dalam medium yang diberi suplemen.

Sel-sel ditumbuhkan dalam *plate 96 well* selama 7 dan 14 hari, dalam medium yang dikondisikan dengan silika, glas dan pada medium yang tidak dikondisikan. Sel-sel disuplai dengan mitomycin C (100 µg/mL) atau *human recombinant basic fibroblast growth factosr* (bFGF, 10ng/mL). Sel primer osteoblas yang diperoleh melalui kultur sel, di*treatment* dengan mengkondisikan medium kultur dengan bahan silika dan juga silika yang berasal dari sekam padi. Sebagai kontrol digunakan α-MEM sebagai mediumnya.[17] Aktifitas osteoblas diamati menggunaka ALP Kit. Hasil yang diperoleh berdasarkan nilai absorbansi yang dilakukan dengan pengukuran 405 nm. Nilai absorbansi diinterpolasikan dengan kurva standar. Data dianalisis statistik dengan uji Anova satu satu arah.

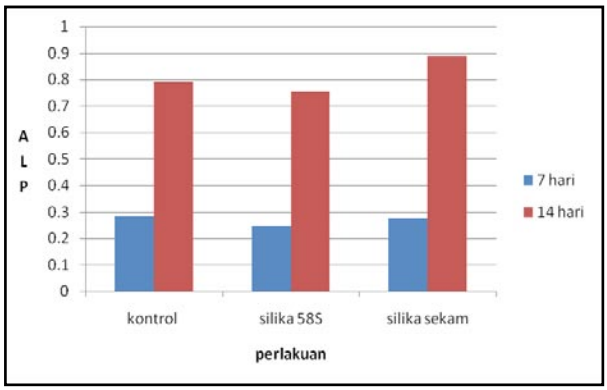
Hasil penelitian

Pada penelitian ini, medium kultur di kondisikan dengan silika amorf dari sekam dan silika 58S serta medium yang tidak dikondisikan sebagai kontrol. Medium yang dikondisikan mengandung 1 gram/100 ml dari masing-masing silika yang diameternya <200µl. Pertumbuhan osteoblas yang baik, akan di tandai dengan adanya diferensiasi, proliferasi dan maturasi. Pertumbuhan osteoblas selalu disertai dengan adanya aktivitas sel itu sendiri. Untuk melakukan aktivitasnya, osteoblas mensekresi alkalin fosfatase dengan nilai yang cukup tinggi, sehingga ekspresi alkalin phosphatase digunakan sebagai penanda terjadinya aktivitas osteoblas. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata nilai *Alkalin Phosphatase* (ALP)

	Kelompok perlakuan	Rerata ALP hari 7 (µmol)		Rerata ALP hari 14 (µmol)	
		Jumlah	Rerata	Jumlah	Rerata
1.	Kontrol	3.557	0,284	9,891	0,791
2	Silika	3,088	0,247	9,453	0,756
3	Silika sekam	3,369	0,0276	11,124	0,889

Secara histogram dapat di lihat sebagai berikut.



Gambar 1. Derajat Ekspresi ALP pada Kultur Osteoblas.

Bedasarkan data yang telah dianalisis menggunakan Anova satu arah, diketahui bahwa terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,005$), antar seluruh kelompok. Data ini kemudian dilakukan uji menggunakan LSD untuk mengetahui perbedaan antar kelompok penelitian dan hasilnya secara bermakna dari ketiga kelompok menunjukkan berbedaan yang berbeda secara bermakna ($p<0,05$) yaitu rerata dari masing-masing kelompok baik yang 7 hari maupun yang 14 hari terdapat perbedaan yang bemakna ($p<0,05$). Ini berarti bahwa rerata jumlah *alkaline phosphatase* pada kelompok sekam

secara bermakna (p<0,05) mempunyai nilai paling tinggi dari kelompok yang lain, sedangkan kelompok silica 58S secara bermakna (p<0,05) mempunyai jumlah yang paling rendah.

Pembahasan

Osteogenesis adalah proses yang kompleks yang melibatkan diferensiasi sel mesensimal di dalam pre osteoblas maupun osteoblas yang berperan penting pada sintesis dan deposisi protein matriks tulang.[18] Osteoblas secara spesifik mensekresi dan memineralisasi matriks tulang. Matriks ekstra seluler terutama terdiri dari kolagen tipe I tetapi ada sejumlah kecil *osteocalcin* (OC), *matrix gla protein, osteopontin* (OPN), *bone sialoprotein* (BSP), BMPs, TGF-β, dan inorganic mineral hydroxylapatite. Osteoblas berdiferensiasi secara *in vivo* dan *in vitro* yang dapat di kharakteristikkan dengan 3 tahap yaitu proliferasi sel, maturasi matriks dan mineralisasi matriks.[19] Maturasi matriks dan mineralisasi biasanya di pertinggi dengan pertumbuhan sel menjadi sempurna dan dengan adanya beberapa penambahan faktor-faktor osteogenik yang spesifik. Selama proliferasi beberapa protein matriks ekstra seluler terdeteksi dan juga ditandai dengan adanya ekspresi alkaline phosphatase, pada saat mulai mineralisasi gen-gen protein non kolagen termasuk OC, BSP, and OPN di ekspresikan dan mineralisasi akan menjadi sempurna.[20,21] Menurut Dana, dkk[12], menyatakan bahwa aktivitas alkaline phosphatase merupakan marker efektif pada tahap proliferasi dan juga maturasi pada kultur primer osteoblas tikus.

Penelitian ini menunjukan bahwa kultur primer osteoblast yang dikondisikan dalam medium *bioactive glass* (58S) dan silica yang berasal dari sekam padi terdeteksi ekspresi ALP lebih tinggi. Hal ini diakibatkan karena sel sedang mengalami proliferasi. Dasar mekanisme terjadinya proliferasi osteoblas tersebut adalah adanya reaksi permukaan yang melepaskan spesies ionic yang terlarut dengan cepat dari glass dalam larutan interfasial (medium). Silica terhidrat yang tinggi di daerah permukaan, dan *polycrystalline hydroxyl carbonate apatit* (HCA) *bilayer* terbentuk beberapa jam. Lapisan-sapiasn tersebut mempertinggi adsorpsi dan desorpsi faktor pertumbuhan. Perlekatan sel, prolifesari dan diferensiasi secara cepat terjadi pada permukaan bahan bioaktif. Pada saat itu juga di mulai memproduksi factor-faktor pertumbuhan yang menstimulasi divisi sel, mitosis dan produksi protein matriks ekstra selular.[22] Peranan aktif dari ion-ion yang terlepas pada sel osteoblas adalah mengaktifkan gen-gen yang berhubungan dengan perlekatan, proliferasi dll.[22] Gen-gen tersebut mengontrol siklus sel osteoblas, mitosis dan diferensiasi yang menyebabkan peningkatan regenerasi tulang dengan cepat. Selain itu diperlukan untuk sel progenitor mengalami mitosis dan menerima stimuli kimia yang benar dari lingkungan lokalnya yang menginstruksikannya untuk memasuki segmen aktif pada siklus sel, yang berperan untuk mitosis sel.[23] Oleh karena itu pada penelitian ini ekspresi ALP menandai terjadinya proliferasi kultur osteoblas pada medium silica. Medium silica yang berasal dari sekam padi mempunyai jumlah ALP yang lebih tinggi. Hal ini dikarenakan bahwa sekam padi berasal dari bahan alami yang lebih sesuai dengan kultur sel osteoblas.

Selain itu, diduga bahwa peristiwa siklus sel yang baru dimulai setelah sel selesai mitosis sempurna juga bisa menyebabkan ekspresi ALP meningkat. Beberapa penelitian menunjukan bahwa kontrol siklus sel osteoblas dicapai dengan mengontrol pelepasan produk ionic yang terlarut dari bahan bioaktif. Sel-sel tersebut berkoloni di permukaan *bioactive glass*. Konsentrasi Si yang terlarut dan ion Ca pada interface larutan sel penting untuk mengontrol siklus sel. Pada tahap pertama

siklus sel (G1), sel tumbuh dan melakukan metabolism normalnya. Selama fase G1 osteoblas mensintesis produk selular yang spesifik termasuk *alkaline phosphatase* (ALP), yaitu sebuah enzim yang dapat digunakan sebagaimarker diferensiasi osteoblas.[22] Pada penelitian ini diketahui bahwa kultur yang di kondisikan dalam medium silica baik yang berasal dari sekam padi maupun 58s, mempunyai level ALP yang tinggi. Dalam medium silika yang berasal dari sekam padi, level ALP Nampak lebih tinggi dari yang lain. Hal ini juga sesuai dengan penelitian Riley dll[24] yang menyatakan bahwa *bioactive glass* menstimulasi produksi ALP oleh osteoblas dalam kultur yang dikondisikan dengan *bioactive glass*. Selain itu selama fase G1 tersebut osteoblas juga memproduksi *osteokalsin*, *trophocollagen macromolecule* yang menyususun dirinya sendiri menjadi kolagen tipe I. Kolagen tipe I merupakan molekul kolagen yang paling banyak dalam matriks tulang.

Simpulan

Simpulan penelitian ini adalah silika mentimulasi terjadinya maturasi dan aktivitas sel osteoblas primer, dengan ditandai peningkatan ekspresi ALP pada medium kultur yang dikondisikan dengan silika. Akan tetapi silika amorf sekam padi, menunjukkan ekspresi ALP yang lebih tinggi. Proses pembuatan silika yang menggunakan pemanasan sederhana mencegah terjadinya kristalisasi silika yang bisa terjadi pada produk silika dari bebatuan yang diproduksi pabrik.

Ucapan Terima Kasih

Disampaikan banyak terima kasih kepada Kementerian Risert dan teknologi yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah penelitian dasar ristek tahun 2010.

Daftar pustaka

1. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *JPGM 2002;48(2)*:142-8. [Diakses 2010 Des 5]. Tersedia pada: *www.jpgmonline.com.*
2. Chou D, Storm PB, Campbell JN. Vulnerability of the subcostal nerve to injury during bone graft harvesting from the iliac crest. *J Neurosurg (Spine 1)* 2004;1:87–9.
3. Saki M, Narbat MK. Samadi K, Saraei A, Ghafouri HB, Gorjipour F. Biocompatibility study of a hydroxyapatite-alumina, and silicon carbide composite scaffold for bone tissue engineering. *Yakhteh Medical J* 2009;11:55-60.
4. Meijer GJ, De Bruijn JD, Koole R, Van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering, plos medicine. 2007. [Diakses 2010 Des 5]. Tersedia pada: http://*www.plosmedicine.org.*
5. Laurencin CT, Khan Y. Bone graft substitute materials. 2006. [Diakses 2011 Mar 3]. Tersedia pada: http://www.emedicine.medscape.com/public/about.
6. Patrick CW, Mikos AG, Mc Intire LV. *Prospects of tissue engineering. In: Frontiers in Tissue Engineering* eds Elsevier. Oxford: Science Ltd; 1998. h. 3-11.
7. Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds, *EE.u Sroapchealons Caenldls J a.Tn.d C Mzeartneruisazlksa* 2003;5:29–40.
8. Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol 2004;15*:1113–25.
9. Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. In vitro generated extracellular matrix and fluid

shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *PNAS* 2005;21(103):82488–93. [Diakses 2010 Mar 3]. Tersedia pada: www.pnas.org_cgi_doi_10.1073_pnas.0505661103.
10. Sun W. Porous Silicon Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering, *Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy.* Department of Biomedical Engineering The College School of Engineering and Applied Science. New York: University of Rochester Rochester. 2007. h. 2-25.
11. Mundy R. Inflammatory mediator and the destruction of bone. *J Periodont Res 1991;*26:213-7.
12. Dana M, Daniel G, Georgete S, Suzana V, Carmina B, Roxana C et al. Alkaline phosphatase-biochemical and histochemical marker for primary osteoblast in proliferative phase. Romania J Endocrin *2004;42*(1-4):29-36.
13. Waked W, Grauer J. Silicates and Bone Fusion, *Orthopedics,* 2008;31:591. [Diakses 2010 Des 5]. Tersedia pada: http:www.orthosupersite.com.
14. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone.* 2003;32(2):127-35.
15. Valimaki, Ville-Valtteri BM, Yrjans JJ, Vuorio EI, Aro HT. Molecular Biological evaluation of bioactive glass microspheres and adjunct bone morphogenetic protein 2 gene transfer in the enhancement of new bone formation 2005;11(3/4):1
16. Harsono H. Pembuatan silika amorf dari limbah sekam padi*. J Ilmu Dasar 2002;3(2):*98-103.
17. Bielby RC, Christodoulo IS, Pryce RS, Radford WJP, Hench LL, Polak JM. Time-and concentration-dependent effects of dissolution products of 58S Sol-Gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue Engineering 2004;10(7/8*):200.
18. Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, Kitaguchi H, Bunyaratavej N. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci 2007;*53(1):25-35.
19. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. In: Noda M, editor. *Cellular and molecular biology of bone. Tokyo: Academic Press*. 1993. h. 47–95.
20. Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin J Clin Endocrinol Metab 1995 Aug;80(8):2511-7.
21. Kostenuik PJ, Bernard P, Halloran, Emily R, Holton M, Daniel DB. Skeletal unloading inhibits the in vitro proliferation and Differentiation of rat osteoprogenitor cells. Am J Physiol 1997;E1133:273.
22. Hench LL, Polak JM. A genetic basis for design of biomaterials for in situtissue regeneration. *Key Enginer Mater* 2008;377:151-66.
23. Lutz-Christian G, Boccaccini AD. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 2010;3:3867-910.
24. Riley GC, Radin S, Chen AT, Ducheyne P. Differential alkaline Phosphatase responses of rat and human bone marrow derived mesenchymal stem cells to 45S5 bioactive glass, doi: 10.1016? J *Biomaterials* 2007;05(038):4091-7. Tersedia pada:www.elsevier.com/locate/biomaterials.