



**TOKSISITAS HIDROKSIAPATIT HASIL SINTESIS LIMBAH *DENTAL*  
*GYP SUM* TIPE III DENGAN WAKTU PENYIMPANAN YANG  
BERBEDA PADA *MESENCHYMAL STEM*  
*CELLS* (MSCs) TIKUS**

**SKRIPSI**

Oleh

**Lelia Zahra Zakiyah**

**NIM 121610101026**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2016**



**TOKSISITAS HIDROKSIAPATIT HASIL SINTESIS LIMBAH *DENTAL*  
*GYP SUM* TIPE III DENGAN WAKTU PENYIMPANAN YANG  
BERBEDA 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

**Lelia Zahra Zakiyah**

**NIM 121610101026**

**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2016**

## PERSEMBAHAN

Karya tulis ini saya persembahkan untuk:

1. Ibunda Endang Puji Wahyuni dan Ayahanda Tuhu Suryono yang tercinta;
2. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. Dosen pembimbing dan dosen penguji yang selalu menginspirasi;
4. Segenap HA-*Dental Gypsum Team* 2015;
5. Guru-guru pengajar SD, SMP dan SMA serta dosen-dosen di perguruan tinggi.

## MOTTO

“ Dan Allah tidak menjadikan pemberian bala bantuan itu melainkan sebagai kabar gembira bagi kemenanganmu, dan agar tentram hatimu karenanya. Dan kemenanganmu itu hanyalah dari Allah  
(Q.S Al Isra` 36)\*

---

\*)Departemen Agama Republik Indonesia. 1998. *Al-Qur`an dan Terjemahannya*. Semarang: PT Kusmudasmoro Grafiondo

## PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Lelia Zahra Zakiyah

NIM : 121610101026

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Toksistas Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe III dengan Waktu Penyimpanan yang Berbeda 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, Januari 2016

Yang menyatakan,

Lelia Zahra Zakiyah

(121610101026)

**SKRIPSI**

**TOKSISITAS HIDROKSIAPATIT HASIL SINTESIS LIMBAH *DENTAL*  
*GYP SUM* TIPE III DENGAN WAKTU PENYIMPANAN YANG  
BERBEDA PADA *MESENCHYMAL STEM*  
*CELLS* (MSCs) TIKUS**

Oleh

**Lelia Zahra Zakiyah**

**121610101026**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : drg. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc

Dosen Pembimbing Pendamping : drg. Yenny Yustisia, M. Biotech

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Toksistas Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe III dengan Waktu Penyimpanan yang Berbeda pada *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) Tikus” telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Jum`at, 6 Januari 2016

Tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota,

drg. Pudji Astuti., M.Kes  
NIP 196810201996012001

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

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

drg. Hengky Bowo Ardhiyanto., MDSc  
NIP 19790505200501105

drg. Yenny Yustisia., M.Biotech  
NIP 197903252005012000

Mengesahkan  
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember,

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

## RINGKASAN

**Toksisitas Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe III dengan Waktu Penyimpanan yang Berbeda pada *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) Tikus;** Lelia Zahra Zakiyah, 121610101026; 2016: 51 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Dalam bidang kedokteran gigi penggunaan *dental gypsum* terutama tipe III paling sering digunakan, namun hanya digunakan dalam jangka waktu tertentu sehingga berpotensi menjadi limbah. Lama waktu penyimpanan *dental gypsum* menyebabkan pengerutan, hal ini diakibatkan pada saat seluruh hemihidrat telah berubah menjadi dihidrat maka air yang terdapat pada gipsum akan menguap dan jumlah air akan berkurang. Limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan yang berbeda dapat disintesis menjadi hidroksiapatit (HA) menggunakan metode hidrotermal. Sebagai biomaterial yang baru dikembangkan, HA yang disintesis perlu diuji untuk mengetahui biokompatibilitasnya. Salah satu parameter biokompatibilitas adalah toksisitas terhadap sel.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbedaan toksisitas hidroksiapatit hasil sintesis dari limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan yang berbeda pada MSCs tikus.

Dalam penelitian ini menggunakan 4 kelompok sampel yaitu hidroksiapatit komersial (HAP 200) sebagai kontrol, hidroksiapatit hasil sintesis *dental gypsum* tipe III durasi penyimpanan 0 tahun, 1 tahun dan 3 tahun. Prosedur penelitian ini diawali dengan persiapan sampel berupa serbuk hidroksiapatit. Serbuk hidroksiapatit dilakukan sterilisasi *gamma radiation* di BATAN untuk selanjutnya ditimbang dan direndam dalam media perendaman dan diencerkan mencapai konsentrasi 1000 µg/ml. Setelah itu dilakukan pengambilan tulang femur tikus untuk mendapatkan sum-sum tulang. Lalu dilanjutkan dengan isolasi dan kultur MSCs dari sum-sum tulang femur tikus. Setelah itu dilakukan karakterisasi MSCs yang diamati dengan mikroskop fluoresen.



Lalu, dilanjutkan dengan uji toksisitas menggunakan *MTT Assay*. MSCs dikultur pada *96 well plate* selama 24 jam, kemudian setiap sumuran diberi rendaman hidroksiapatit. Setelah diinkubasi selama 24 jam, tiap sumuran diberi 10 µl reagen MTT dan dibiarkan selama 4 jam, setelah itu diberi DMSO. Hasil *MTT assay* dibaca menggunakan *ELISA reader*.

Hasil uji toksisitas menunjukkan jumlah kematian MSCs hidroksiapatit sintesis kurang dari 35%, namun masih lebih tinggi dari hidroksiapatit komersil (HAP 200). Pada kelompok hidroksiapatit sintesis menunjukkan hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan 3 tahun memiliki persentase jumlah kematian sel yang lebih tinggi dibanding dengan waktu penyimpanan 0 tahun dan 1 tahun. Antara hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan 0 tahun dan 1 tahun, juga memiliki perbedaan jumlah kematian sel namun tidak signifikan ( $p>0,005$ ).

Kesimpulan dalam penelitian ini yaitu terdapat perbedaan jumlah kematian sel pada paparan hidroksiapatit hasil sintesis *dental gypsum* tipe III dimana hidroksiapatit hasil sintesis *dental gypsum* tipe III 3 tahun memiliki presentase jumlah kematian sel yang paling tinggi dibandingkan dengan hidroksiapatit hasil sintesis *dental gypsum* tipe III 0 tahun dan hidroksiapatit hasil sintesis *dental gypsum* tipe III 1 tahun.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Toksisitas Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe III dengan Waktu Penyimpanan yang Berbeda 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. Hengky Bowo Ardhiyanto, MDSc., selaku Dosen Pembimbing Utama dan drg. Yenny Yustisia, M. Biotech., selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah ikhlas dan sabar meluangkan waktu, pikiran, tenaga serta perhatiannya hingga terselesaikannya skripsi ini;
3. drg. Pudji Astuti, M.Kes, selaku Dosen Penguji Utama dan Dr. drg. Didin Erma I., M.Kes, selaku Dosen Penguji Anggota yang telah bersedia memberikan masukan dan saran demi terwujudnya skripsi yang lebih baik;
4. Dr. drg. FX Adi Soesetijo., Sp. Pros, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa pendidikan strata satu (S1);
5. Ibunda Endang Puji Wahyuni dan Ayahanda Tuhu Suryono, kedua orang tua hebat yang tidak pernah lelah mendoakan, menemani dan mendukung secara moril dan materiil kepada penulis selama ini;
6. Kedua Adikku tersayang Faris Akbar Maulana dan Agha Naufal Rahmaddhani yang selalu menjadi tim hore penawar kegalauan dalam mengerjakan skripsi;
7. Teman-teman FKG UNEJ Angkatan 2012 yang telah berjuang bersama menyelesaikan pendidikan S1;

8. Saudari-saudariku tersayang Anindya Roshida, Citra Ayu Mawaddah, Ayuk Susilo Wati, Asri Krisnaini dan Shinta Novadela, yang telah mewarnai hari-hari sejak mahasiswa baru yang keunikannya tidak ada duanya;
9. Teman-teman tersayang Amalia Rahmaniari Indrarti, Ahmad Faris Adli Izzuddin, Yusuf Rizkillah Akbar, Yusron Haries, Fadhillah Kurniasari, Nidha Tuhu Respati Karno dan Prima Andri Wicaksono. Yang telah setia membantu dan memberi semangat;
10. 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, Januari 2016

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Hidroksiapatit</b> .....	4
<b>2.2 Proses Sintesa Gypsum Menjadi Hidroksiapatit</b> .....	5
<b>2.3 Karakteristik Gypsum Kedokteran Gigi</b> .....	5
<b>2.4 Gypsum Kedokteran Gigi</b> .....	7
<b>2.5 Penggunaan Gypsum Tipe III dalam Kedokteran Gigi</b> .....	9
<b>2.6 Hidroksiapatit Hasil Sintesis <i>Dental Gypsum</i> Tipe III</b> .....	9
<b>2.7 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Sifat Fisik Gypsum</b> .....	12
<b>2.8 Toksisitas Biomaterial terhadap Sel</b> .....	12

<b>2.9 Mesenchymal Stem Cells (MSCs)</b> .....	15
<b>2.10 Uji Toksisitas</b> .....	17
<b>2.11 Kerangka Konsep</b> .....	18
<b>2.12 Hipotesis</b> .....	18
<b>BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	19
<b>3.1 Jenis Penelitian</b> .....	19
<b>3.2 Rancangan Penelitian</b> .....	19
<b>3.3 Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	19
<b>3.4 Identifikasi Variabel Penelitian</b> .....	19
3.4.1 Variabel Bebas .....	19
3.4.2 Variabel Terikat .....	19
<b>3.5 Definisi Operasional Penelitian</b> .....	19
<b>3.6 Sampel Penelitian</b> .....	20
3.6.1 Pengelompokan Sampel .....	20
<b>3.7 Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	20
3.7.1 Alat Penelitian .....	20
3.7.2 Bahan Penelitian .....	21
<b>3.8 Prosedur Penelitian</b> .....	21
3.8.1 Persiapan Sampel Hidroksiapatit .....	21
3.8.2 Pengambilan Tulang Femur .....	22
3.8.3 Isolasi dan Kultur MSCs Sumsum Tulang .....	22
3.8.4 Karakterisasi MSCs .....	23
3.8.5 Uji Toksisitas .....	24
<b>3.9 Alur Penelitian</b> .....	25
<b>3.10 Analisis Data</b> .....	25
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	27
<b>4.1 Hasil dan Analisis Data</b> .....	27
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	30
<b>BAB 5. KESIMPULAN</b> .....	33

<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>33</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>33</b>

**DAFTAR PUSTAKA**

**LAMPIRAN**

## DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Persentase kematian MSCs tikus yang dipapar hidroksiapatit (%) .....	27
4.2 Hasil <i>Saphiro Wilk Test</i> kematian sel MSCs yang dipapar hidroksiapatit.	28
4.3 Hasil <i>Levene's Test</i> kematian sel MSCs yang dipapar hidroksiapatit.....	29
4.4 Hasil Uji <i>One way ANOVA</i> kematian sel MSCs yang dipapar hidroksiapatit	29
4.5 Hasil uji LSD persentase kematian sel MSCs yang dipapar hidroksiapatit	29

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1. Struktur Hidroksiapatit.....	5
2.2 Grafik hasil karakterisasi FTIR.....	10
2.3 Grafik hasil karakterisasi SEM .....	10
2.4 Hasil karakterisasi XRD.....	11
2.5 Jalur intrinsik dan ekstrinsik apoptosis .....	14
2.6 Jalur kematian sel nekrosis, autofag dan apoptosis .....	15
2.7 MSCs sungsung tulang tikus .....	16
2.8 Proses MTT Assay .....	17
2.9 Kerangka konsep penelitian .....	18
3.1 Alur penelitian .....	25
4.1 Histogram persentase jumlah kematian sel .....	28



## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. <i>Ethical Clearance</i> .....	38
Lampiran B. Hasil Uji MTT Assay (ELISA Reader) .....	39
Lampiran C. Hasil Uji AAS dan Uji Spektroskopi UV-Vis.....	40
Lampiran D. Hasil Uji Toksisitas .....	41
Lampiran E. Hasil Uji Statistik .....	42
Lampiran F. Alat dan Bahan Penelitian .....	44
Lampiran G. Prosedur Penelitian .....	49

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Kasus kerusakan tulang yang menyebabkan defek tulang di rongga mulut masih sering terjadi. Menurut Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) yang dilakukan oleh Departemen Kesehatan (Depkes) tahun 2001 kerusakan tulang tersebut diantaranya adalah akibat kecelakaan (trauma), pasca bedah kista atau tumor, pasca ekstraksi, dan penyakit periodontal seperti periodontitis kronis serta periodontitis agresif. Dalam penanganannya sering diperlukan pencangkokan tulang. Tulang merupakan jaringan kedua terbanyak yang di transplantasikan setelah darah, lebih dari 2,2 juta cangkok tulang setiap tahun dilakukan di seluruh dunia (Greenwald et al., 2002; Joyce et al., 2002; Vaccaro, 2002; Betz, 2002).

Bahan cangkok tulang (*bone graft*) secara signifikan dapat mengurangi defek sekitar 60% - 65%. *Bone graft* yang digunakan pada defek tulang dapat berupa *autograft*, *allograft*, *xenograft*, dan *alloplast* (Riani, 2012). Meningkatnya kebutuhan akan *bone graft*, memicu upaya untuk mengembangkan biomaterial alternatif yang dapat menggantikan struktur tulang yang hilang tanpa menimbulkan efek yang negatif. Salah satunya adalah biokeramik. Kelebihan biokeramik adalah memiliki biokompatibilitas yang baik dengan sel-sel tubuh dibandingkan dengan biomaterial polimer atau logam. Biokeramik yang banyak dikenal adalah hidroksiapatit dengan rumus kimia  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Balgies dkk., 2011).

Hidroksiapatit memiliki komposisi kimia, biologi, dan kristalografi yang mirip dengan tulang dan gigi serta bersifat biokompatibel dan osteokonduktif. Saat ini banyak digunakan hidroksiapatit dalam bentuk bubuk yang disintesis dari berbagai macam mineral, termasuk coral, gipsum, dan kalsit (Pujiyanto dkk., 2006). Beberapa

metode telah dikembangkan dalam sintesis hidroksiapatit, yaitu *wet methods* dan *solid state reaction*. *Wet methods* terdiri dari teknik hidrolisis dan hidrotermal (Siswomihardjo, 2012).

Dalam bidang kedokteran gigi penggunaan gipsum terutama tipe III sangatlah melimpah. Gipsum dalam kedokteran gigi terutama tipe III banyak digunakan sebagai bahan untuk pembuatan model atau replika dari keadaan gigi pasien. Namun model tersebut hanya digunakan untuk waktu tertentu, yang akhirnya bisa menjadi limbah. Lama waktu penyimpanan model menyebabkan pengerutan pada *dental gypsum*, hal ini diakibatkan pada saat seluruh hemihidrat telah berubah menjadi dihidrat maka air yang terdapat pada gipsum akan menguap dan jumlah air akan berkurang (Michalakakis, 2004). Dalam penelitian sebelumnya yang dilakukan Haries (2015), hasil sintesis hidroksiapatit dari limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan yang berbeda telah disintesis menggunakan metode hidrotermal. Metode hidrotermal digunakan karena derajat kristalinitasnya yang tinggi sehingga rasio kalsium-fosfat (Ca-P) mendekati nilai stoikiometrik yang dapat membuktikan telah berhasilnya proses sintesis hidroksiapatit (Siswomihardjo, 2015). Hidroksiapatit yang dihasilkan pada penelitian Haries (2015) memiliki karakteristik yang mirip dengan hidroksiapatit komersil meskipun memiliki morfologi yang berbeda sehingga berpotensi untuk dapat dikembangkan menjadi biomaterial pengganti tulang.

Suatu biomaterial yang baru dikembangkan perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui biokompatibilitasnya (Wahl dan Czernuszka, 2006). Salah satu parameter biokompatibilitas dapat dilihat melalui uji toksisitas biomaterial pada kultur sel. Penelitian ini akan menguji toksisitas dari hidroksiapatit yang disintesis dari limbah gipsum kedokteran gigi tipe III dengan waktu penyimpanan yang berbeda pada kultur *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) dengan menggunakan MTT assay dengan melihat jumlah kematian sel. MSCs digunakan karena sel tersebut merupakan sel yang sangat sensitif terhadap agen toksik.

## 1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana perbedaan toksisitas hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan yang berbeda pada MSCs?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui perbedaan toksisitas hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan yang berbeda pada MSCs.

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi tentang perbedaan toksisitas hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan yang berbeda pada MSCs.
2. Sebagai acuan penelitian selanjutnya.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

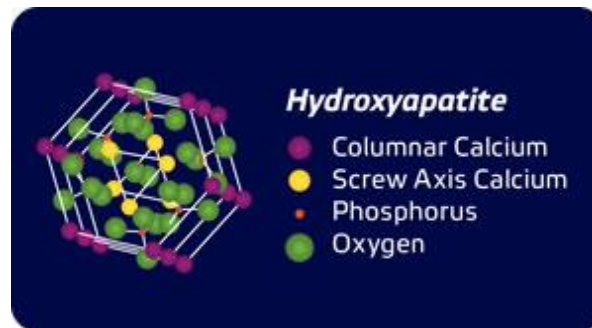
### 2.1 Hidroksiapatit

Hidroksiapatit yaitu senyawa mineral apatit yang mempunyai struktur heksagonal. Hidroksiapatit merupakan fase kristal dari senyawa kalsium fosfat yang paling stabil. Rumus kimia hidroksiapatit adalah  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (Balgies, 2011). Komposisi unsur penyusun hidroksiapatit (% berat ideal) yaitu Ca 39,9%, P 1,5%, H 0,2% O 41,41% dan rasio ideal antara kalsium-fosfat (Ca-P) adalah 1,67 (Kohn, 2014). Kristal hidroksiapatit mempunyai ukuran yang sama dengan Kristal hidroksiapatit tulang, yaitu berkisar 20-50 nm. Hidroksiapatit memiliki struktur Kristal heksagonal dengan dimensi selnya  $a = b = 9,42 \text{ \AA}$  dan  $c = 6,88 \text{ \AA}$  ( $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ ). Secara stokiometri Ca/P hidroksiapatit memiliki ratio 1,67 dan secara kimia sama dengan mineral tulang manusia. Adanya kesamaan struktur kimia dengan mineral jaringan tulang manusia, maka hidroksiapatit sintetik menunjukkan daya afinitasnya dengan baik yaitu dapat berikatan secara kimiawi dengan tulang (Rocha, 2005).

Alasan digunakannya hidroksiapatit sebagai biokeramik dalam bidang medis yaitu kemiripannya dengan fasa mineral pada tulang dan gigi, sehingga memiliki sifat biokompatibilitas *bioactive*, yakni memungkinkan jaringan sekitar untuk tumbuh ke dalam implan serta adanya porositas, sehingga ikatan lebih baik dengan jaringan dapat diperoleh. Selain itu, ada beberapa keuntungan potensi tambahan, antara lain konduktifitas listrik dan termal rendah, sifat elastik mirip dengan tulang, dan dapat berfungsi sebagai lapisan penghambat apabila menggunakan material logam sebagai substrat implan tulang (Sunandar, 2008). Selain itu, penggunaan hidroksiapatit dalam aplikasi medis antara lain untuk reparasi tulang yang mengalami kerusakan, pelapisan logam protesa (implan) untuk meningkatkan sifat biologi dan mekanik dan juga

sebagai media penghantaran obat (*drug delivery*). Secara termodinamik hidroksiapatit sangat stabil pada pH, temperatur dan komposisi fisiologi fluida (Peroos, 2006).

Hidroksiapatit dapat disintesis dengan metode hidrotermal dari gipsum. Dalam metode ini dapat mensintesis hidroksiapatit lebih baik dibandingkan dengan metode konvensional. Selain itu, pada metode hidrotermal dapat menghasilkan ukuran Kristal yang lebih kecil dan area permukaan yang lebih baik (Pujiyanto,2013).

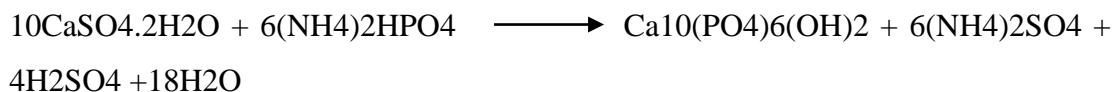


Gambar 2.1 Struktur Hidroksiapatit

(Sumber : <http://www.unitedfisheries.co.nz> )

## 2.2 Proses Sintesa Gipsum Menjadi Hidroksiapatit

Berdasarkan penelitian Sedyono (2008), limbah gipsum dalam bentuk kalsium sulfat dihidrat dapat disintesis menjadi hidroksiapatit melalui proses *hydrothermal* yaitu dengan mereaksikan limbah gipsum yang dihaluskan dengan larutan *diammonium hydrogen phosphat* (DHP) [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>]. Rumus persamaan kimia yang didapat adalah :



Dari reaksi diatas didapatkan hidroksiapatit [Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>], amonium sulfat [6(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>], asam sulfat (4H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) dan air (18H<sub>2</sub>O).

## 2.3 Karakteristik Gipsum Kedokteran Gigi

Karakteristik gipsum kedokteran gigi adalah sebagai berikut :

- a. *Setting Time*

*Setting Time* adalah waktu yang diperlukan gips untuk menjadi keras dan dihitung sejak gips kontak dengan air (Anusavice, 2003). *Setting time* terdapat dua tahap yaitu *Initial setting time* dan *Final setting time* (Hatrack, 2011; Manappallil, 1998). *Initial setting time* yaitu waktu yang dibutuhkan bahan-bahan gipsum untuk mencapai kekerasan tertentu, yaitu dimana air dipermukaan adonan diasorpsi ke dalam adonan hingga menjadi kristal. Proses ini terjadi selama 8-16 menit dihitung dari mulai pencampuran *Final setting time* yaitu waktu yang dibutuhkan untuk reaksi lengkap atau kondisi reaksi kimia sudah lengkap. Waktu untuk mencapai *final setting time* yaitu 20 menit dihitung dari mulai pencampuran ( Craig, 2002 ).

b. *Setting* ekspansi

*Setting* ekspansi terjadi pada semua jenis gips. Plaster memiliki *setting* ekspansi paling besar yaitu 0,30% sedangkan *high-strength stone* memiliki *setting* ekspansi paling rendah yakni 0,10%. *Setting* ekspansi merupakan hasil dari pertumbuhan kristal-kristal gips ketika mereka bergabung. *Setting* ekspansi harus dikontrol agar tetap minimum terutama ketika gips tersebut akan digunakan untuk membuat pola malam sebuah restorasi. Apabila *setting* ekspansi yang terjadi berlebihan maka akan menghasilkan sebuah restorasi yang *oversized*. *Setting* ekspansi hanya terjadi ketika gips dalam proses pengerasan (Hatrack, 2011).

c. Perubahan dimensi

Perubahan dimensi dipengaruhi oleh *setting* ekspansi dari gipsum. *Setting* ekspansi yang terjadi pada proses pengerasan gips disebabkan oleh adanya dorongan ke luar oleh pertumbuhan kristal dihidrat. Semakin tinggi atau besar ekspansi pengerasan maka keakuratan dimensi semakin rendah (Anusavice, 2003).

d. *W/P Ratio*.

Tipe gips yang berbeda akan memiliki rasio air-bubuk yang berbeda juga. Hal ini disebabkan oleh perbedaan bentuk dan ukuran kristal kalsium sulfat hemihidrat (Powers, 2009)

e. Kekuatan Kompresi

Kekuatan kompresi gips merupakan kemampuan bahan untuk menahan fraktur. Kekuatan kompresi gips merupakan faktor penting dalam menentukan kekerasan dan daya tahan abrasi gips (Powers, 2008). Semakin sedikit air yang digunakan maka semakin besar kekuatan kompresi yang dihasilkan (Powers, 2009).

f. *Reproduction of details*

Porositas dapat terbentuk oleh karena berhubungan dengan proses pencampuran, yaitu jumlah gipsium yang tidak tercampur oleh air dengan baik (Craig, 2002).

g. Sifat Gypsum Berkaitan dengan Penyimpanan

Penyimpanan model pada temperatur antara 90°-100° C akan mengakibatkan pengerutan yang disebabkan oleh kristalisasi air yang keluar dan mengubah dihidrat menjadi hemihidrat kembali sehingga kekuatan kompresi gipsium akan bertambah (Anusavice, 2003).

## 2.4 Gypsum Kedokteran Gigi

Menurut spesifikasi gypsum menurut ADA (American Dental Association) nomor 25. Produk gypsum terbagi menjadi 5 tipe yaitu :

1. *Impression Plaster* (Tipe I)

Gips tipe I (*Impression Plaster*) memiliki kalsium sulfat hemihidrat terkalsinasi sebagai bahan utamanya dan ditambahkan kalsium sulfat, borax dan bahan pewarna (Combe, 1986). Selain itu, bentuk bubuk dari gips ini menyerupai spon (porous) yang tidak teratur (Anusavice, 2003). Gips tipe ini jarang digunakan untuk mencetak dalam kedokteran gigi sebab telah digantikan oleh bahan yang tidak terlalu kaku seperti hidrokoloid dan elastomer, sehingga gips tipe I terbatas digunakan untuk cetakan akhir, atau *wash*, untuk rahang edentulus (Hatrack, 2011).

2. *Model Plaster* (tipe II)

Gips tipe II (*Model Plaster*) terdiri dari kalsium sulfat terkalsinasi/  $\beta$ -hemihidrat sebagai bahan utamanya dan zat tambahan untuk mengontrol *setting time* (Combe, 1986).  $\beta$ -hemihidrat terdiri dari partikel kristal ortorombik yang lebih besar dan tidak



beraturan dengan lubang-lubang kapiler sehingga partikel  $\beta$ -hemihidrat menyerap lebih banyak air bila dibandingkan dengan  $\alpha$ -hemihidrat (Anusavice, 2003). Gips tipe II digunakan terutama untuk keperluan laboratorium dan model akhir pencetakan rahang tidak bergigi.

### 3. *Dental Stone* (tipe III)

Gips tipe III (*Dental Stone*) terdiri dari hidrokal/ $\alpha$ -hemihidrat dan zat tambahan untuk mengontrol *setting time* (Combe, 1986).  $\alpha$ -hemihidrat terdiri dari partikel yang lebih kecil dan teratur dalam bentuk batang atau prisma dan bersifat tidak porous sehingga membutuhkan air yang lebih sedikit ketika dicampur bila dibandingkan dengan  $\beta$ -hemihidrat (Anusavice, 2003; Craig, 2000). Gips ini memiliki warna biru, putih atau kuning. Gips tipe III ideal digunakan untuk membuat model kerja yang memerlukan kekuatan dan ketahanan abrasif yang tinggi seperti pada konstruksi protesa dan model ortodonsi. Kekuatan kompresi gips tipe III berkisar antara 20,7 MPa (3000 psi) – 34,5 MPa (5000 psi) (Anusavice, 2003).

### 4. *Dental Stone High Strength* (tipe IV)

Gips tipe IV (*Dental Stone, High Strength*) terdiri dari densit yang memiliki bentuk partikel kuboidal dengan daerah permukaan yang lebih kecil sehingga partikelnya paling padat dan halus bila dibandingkan dengan  $\beta$ -hemihidrat dan hidrokal (Powers, 2009; Anusavice, 2003). Gips tipe IV memiliki kekuatan kompresi 35 MPa (4980 psi) dan kekuatan *tensile* 8MPa (Craig dkk., 1993). Gips tipe IV sering dikenal sebagai *die stone* sebab gips tipe IV ini sangat cocok digunakan untuk membuat pola malam dari suatu restorasi, umumnya digunakan sebagai dai pada inlay, mahkota dan jembatan gigi tiruan di bidang konservasi gigi (Hatrick, 2011; Manappallil, 1998).

### 5. *High Strength High Expansion Dental Stone* (tipe V)

Gypsum tipe V ini memiliki partikel terbesar berbentuk kuboidal, bentuknya teratur serta memiliki kristal paling padat (Anusavice, 2003). Bahan ini umumnya berwarna biru atau hijau dan merupakan produk gipsum yang paling mahal. (Hatrick,

2011). Di bidang kedokteran gigi biasanya digunakan untuk mengkompensasi besar pengerutan logam untuk *dental casting*.

## **2.5 Penggunaan Gypsum Tipe III dalam Kedokteran Gigi**

Gypsum tipe III merupakan jenis gypsum yang paling sering digunakan dalam praktik kedokteran gigi sehari-hari. Gypsum tipe ini digunakan untuk pembuatan model kerja karena memiliki kemampuan yang baik untuk menahan fraktur. Model kerja digunakan dokter gigi atau laboran sebagai media pembuatan gigi tiruan. Untuk mencapai hasil perawatan yang sukses, selain kekuatan model. Keakuratan model kerja perlu diperhatikan. Tetapi karena pemakaiannya hanya dalam batas waktu tertentu model kerja tersebut akan dibuang apabila tidak digunakan lagi sehingga limbah gypsum akan bertambah banyak (Anusavice, 2003). Limbah gypsum merupakan bahan yang sulit terurai. Kalsium sulfat dihidrat yang terkandung di dalam limbah gypsum menyebabkan ancaman polusi yang besar apabila terus-menerus meningkat jumlahnya (Abidoeye, 2010).

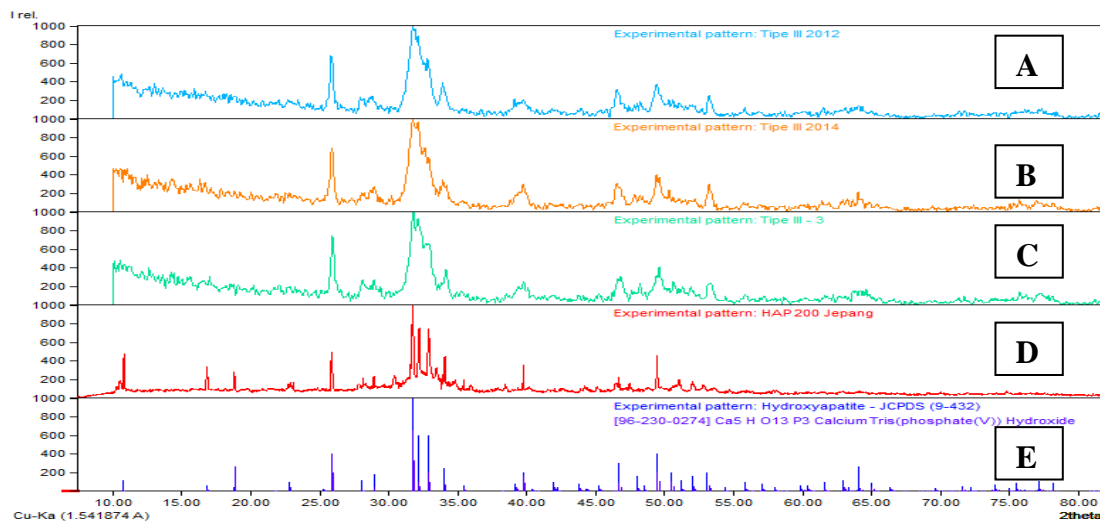
## **2.6 Hidroksiapatit Hasil Sintesis *Dental Gypsum* Tipe III**

Pada uji FTIR yang telah dilakukan Haries (2015) menunjukkan hasil grafik *superimpose* (gambar 2.2). Dari grafik tersebut dapat diketahui unsur yang terkandung antara lain yaitu Ca-O, karbonat, fosfat dan hidroksil. Dari hasil FTIR dapat diketahui bahwa hidroksiapatit-DG III 0 tahun, hidroksiapatit-DGIII 1 tahun, dan hidroksiapatit-DGIII 3 tahun memiliki gugus fungsi dan senyawa yang identik dengan HAP 200.

Hasil analisa SEM (gambar 2.3) didapatkan bentukan yang saling menempel satu sama lain dan berbentuk bulat memanjang. Pada hidroksiapatit sintesis didapatkan perbedaan pada permukaannya jika dibandingkan dengan gypsum yang menandakan bahwa hidroksiapatit telah tersintesis dari limbah gypsum tipe III (Haries, 2015).



Hasil dari analisa grafik uji XRD (gambar 2.4) pada masing-masing kelompok menunjukkan selisih deviasi yang sangat kecil pada bidang kristal (hkl) yang dibandingkan dengan hidroksiapatit stokiometri (JCPDS 9-432). Selain itu adanya hasil tentang struktur kristal yang semuanya berbentuk heksagonal karena parameter kisi yang identik antara kelompok hidroksiapatit-DGIII 0 tahun, hidroksiapatit-DG 1 tahun, dan hidroksiapatit-DGIII 3 tahun dengan parameter kisi HAP 200 dan hidroksiapatit stokiometri.



Gambar 2.4 Grafik hasil XRD Hap 200 dibandingkan dengan hidroksiapatit stokiometri JCPDS 9-432. Hidroksiapatit-DGIII 0 Tahun (A), Hidroksiapatit-DGIII 1 Tahun (B), Hidroksiapatit-DGIII 3 Tahun (C), HAP 200 (D) dan Hidroksiapatit stokiometri JCPDS 9-432 (E)

Menurut Ardhiyanto (2015), kelarutan ion fosfat dan ion kalsium diuji dengan menggunakan *Atomic Absorption Spectroscopy* (AAS) dan uji spektroskopi UV-Vis pada hidroksiapatit hasil sintesis *dental gypsum* tipe III pada MSCs pada tikus. Rasio Ca-P pada HAP 200 yaitu 1,06, hidroksiapatit-DGIII 0 tahun 0,89, hidroksiapatit-DGIII 1 tahun 0,96 dan hidroksiapatit-DGIII 3 tahun 0,85.

## **2.7 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Sifat Fisik Gypsum**

### **2.7.1 Suhu Ruangan dan Suhu Air**

Peningkatan suhu ruangan dan suhu air dapat menyebabkan pergerakan ion kalsium dan ion sulfat meningkat sehingga *setting time* menjadi lebih singkat. Peningkatan suhu ruangan yang berawal 20°C menjadi 37°C dapat meningkatkan kecepatan reaksi pengerasan sehingga *setting time* menjadi lebih singkat dan *setting expansion* menjadi lebih besar, tetapi suhu yang meningkat di atas 37°C dapat menurunkan kecepatan reaksi pengerasan dan *setting time* menjadi lebih lama, serta *setting expansion* menjadi lebih kecil. Peningkatan suhu air (tidak melebihi 37,5°C) yang digunakan sebagai campuran gips dapat mempersingkat *setting time*, tetapi jika suhu air di atas 37,5°C dapat memberikan efek retarder pada pengerasan gips. Tetapi secara umum peningkatan dan penurunan suhu ruangan dan suhu air yang digunakan tidak memberikan pengaruh yang bermakna pada kekuatan gips (Annusavice, 2003).

### **2.7.2 Lama Penyimpanan**

Menurut Michalakis (2004) sangat dipengaruhi oleh waktu dibandingkan dengan suasana lingkungan saat dilakukan pengukuran *setting* ekspansi. Hal ini dikarenakan adanya pertumbuhan kristal yang berlangsung terus menerus selama material gypsum yang telah mengeras dibiarkan di udara. Pertumbuhan kristal ini diakibatkan oleh masuknya uap air ke dalam mikroporus yang mengakibatkan menurunnya tegangan permukaan sehingga kristal dapat tumbuh bebas. Pada saat seluruh hemihidrat telah berubah menjadi dihidrat maka air yang terdapat pada gypsum akan menguap dan jumlah air akan berkurang sehingga akan terjadi pengerutan pada gypsum.

## **2.8 Toksisitas Biomaterial Terhadap Sel**

Salah satu parameter penting yang perlu diperhatikan dalam pemilihan material dibidang medis adalah biokompatibilitas yang didefinisikan sebagai kemampuan suatu bahan untuk memberi respon biologis yang baik atau sesuai jika diaplikasikan pada tubuh. Syarat suatu bahan atau material di bidang medis

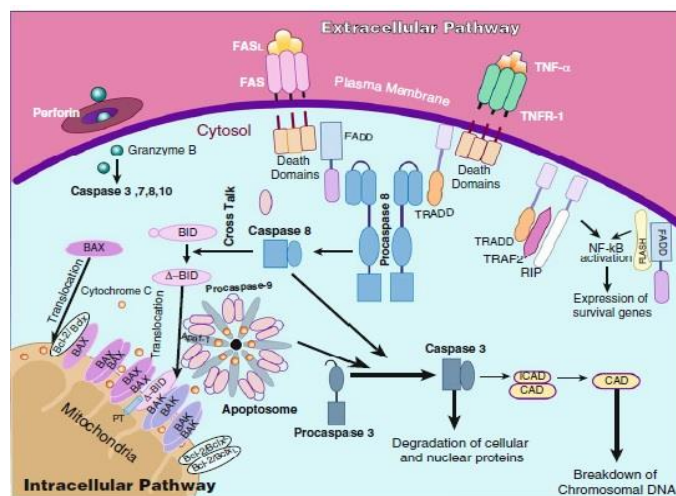
khususnya di bidang kedokteran gigi agar dapat dikatakan biokompatibel adalah tidak boleh mengiritasi jaringan pulpa maupun jaringan lunak, tidak boleh mengandung bahan yang dapat dilepaskan dan diadsorpsi ke dalam sistem sirkulasi sehingga mengakibatkan respon toksik, harus bebas dari bahan yang dapat menyebabkan respon alergi, dan tidak mempunyai potensi kariogenik (Anusavice, 2003).

Uji toksisitas adalah salah satu indikasi keberhasilan suatu biomaterial dilihat dari viabilitas sel. Viabilitas sel adalah kemungkinan sel untuk dapat hidup setelah terpapar suatu bahan. Menurut Dojindo, viabilitas sel dapat dideteksi dari bermacam-macam fungsi sel, seperti aktivitas enzim, permeabilitas sel membran, perlekatan sel, produksi ATP, produksi ko-enzim, dan kecepatan aktivitas nukleotida.

Kematian sel mempengaruhi pengaturan pengembangan organisme, homeostasis jaringan dan respon stress, serta berhubungan dengan kelangsungan hidup sel dan proliferasi. Terjadinya kematian sel memerlukan interaksi yang diatur oleh tiga proses yaitu apoptosis, nekrosis dan autofag (Mayur dkk, 2013). Apoptosis adalah mekanisme kematian sel terprogram yang penting dalam berbagai proses biologi. Ada tiga fase dalam apoptosis. Fase pertama adalah fase inisiasi dimana terjadi induksi heterogen yang bergantung pada stimulus faktor yang menginisiasi kematian dan adanya kenaikan rangsangan reseptor kematian tersebut. Fase kedua adalah fase efektor yang merangkum segala mekanisme reaksi metabolik dengan pola yang lebih teratur. Fase yang terakhir adalah fase eksekusi yang ditandai dengan peningkatan enzim katabolik dan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang secara bersamaan akan menurunkan permeabilitas mitokondria. Akibatnya adalah perubahan morfologi dan biokimia sel dimana DNA dipecah menjadi fragmen yang berbeda-beda dan dimakan oleh sel makrofag tanpa terjadi inflamasi (Boedina, 2011).

Enzim proteolitik kaspase berperan penting sebagai eksekutor dalam apoptosis yang berujung pada kematian sel. Ada dua jalur utama pengaktifan kaspase dalam mekanisme apoptosis yaitu jalur intrinsik atau mitokondrial dan jalur ekstrinsik atau *death receptor*. Kerusakan atau gangguan sinyal pada salah satu atau kedua jalur tersebut akan menyebabkan tidak terjadinya apoptosis (Fulda dan Pervaiz, 2009)

Ketika sel tidak dapat mati melalui jalur apoptosis, maka sel tersebut bisa mengalami kematian sel nekrosis. Sel tersebut bias dikatakan nekrosis dapat dilihat melalui morfologinya, yang dikarakteristikan dengan pembesaran sel, tidak berfungsinya mitokondria, pecahnya membrane sel sehingga menumpahkan isi dari sitoplasmik ke ruang ekstraselular dan lisis. Tidak seperti apoptosis, inti yang nekrotik tidak menunjukkan adanya kondensasi, fragmentasi dan pembelahan internukelosomal DNA, meskipun beberapa degradasi DNA terjadi pada stadium akhir nekrosis. Berkebalikan dengan apoptosis, pada proses nekrosis tidak melibatkan pengaktifan caspase. Reaksi inflamasi sering terjadi sebagai respon dari nekrosis (Mayur,2013).

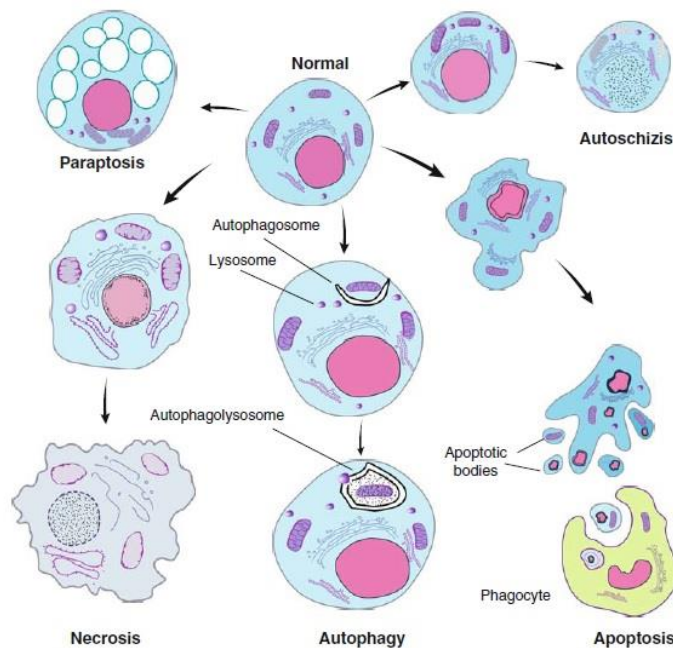


Gambar 2.5 Jalur Intrinsik dan Ekstrinsik Apoptosis

Sumber: *Apoptosis and Cell death journal* (2009)

Bentuk kematian sel lainnya yaitu autofag. Autofag yang biasa disebut makroautofag atau program kematian sel tipe II merupakan jenis kematian sel yang dikarakteristikan dengan pengambilan sitoplasma dan organe-organel sel pada struktur multimembran yang biasa disebut vakuola autafagik, yang diikuti degradasi dari isi vakuola tersebut dengan meleburkan lisosomal sel itu sendiri (Pothana, 2009). Tahap awal dalam autofag merupakan tahap pembentukan *phagophore*. *Phagophore* tersebut mengembang dan membungkus material untuk didegradasi. Metabolit yang dihasilkan pada proses degradasi ini melepaskan dilepaskan ke sitosol untuk

memasuki reaksi metabolisme. Regulasi autofag disertai dengan adanya protein yang mempunyai peran penting dalam sinyal nutrisi yaitu mTOR, PI3K, GTPases, kalsium dan elemen sintesis protein. Faktor regulasi mengontrol aktivitas mTOR yang berdampak pada tingkat aktifitas dari autofag. Mekanisme regulasi penting dari aktivitas mTOR melibatkan regulasi protein GTP/GDP yang banyak ditemukan dalam otak (Mayur, 2013).



Gambar 2.6 Jalur Kematian Sel Nekrosis, Autofag dan Apoptosis

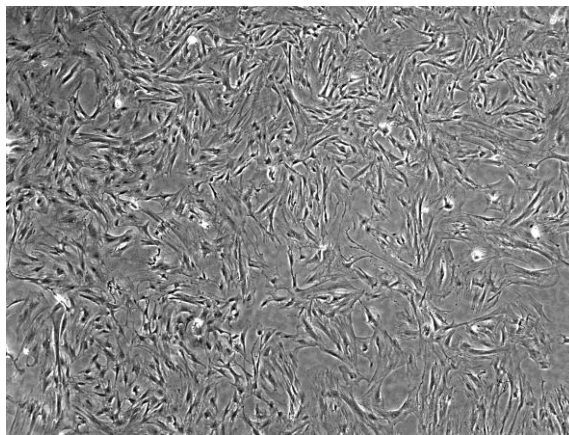
Sumber : *Apoptosis and Cell Death journal 2013*

## 2.9 Mesenchymal Stem Cells (MSCs)

*Stem cell* atau sel punca adalah sel yang belum mempunyai bentuk dan fungsi tertentu namun mempunyai kemampuan memperbarui, 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 atau *mesenchymal stem cells* (MSCs), dan sel punca hematopoietik (Supartono, 2015).



MSCs bersifat multipoten yang artinya sel tersebut mempunyai kemampuan membentuk berbagai jenis sel dewasa dalam lini yang sama seperti sel tulang rawan, tulang, lemak dan jaringan penyangga pembuluh darah ( Han Y dkk, 2009). MSCs memiliki beberapa kriteria yaitu melekat pada lempeng plastik kultur, dapat membentuk sel osteoblas, lemak dan kondroblas secara in vitro (Shenaq DS, 2010). Sifat plastis MSCs membuatnya dapat membentuk sel ginjal, jantung, saraf, hepar, dan sel meniskus (Khan WS, 2009). MSCs dibuat dengan membiakkan sel mononuklear (MNC) hasil isolasi dari cairan atau jaringan tubuh dalam medium dalam waktu tertentu (Shenaq DS, 2010). MSCs dapat diperoleh dari sumsum tulang, baik manusia maupun hewan seperti tikus (Appasani, *et al.*, 2011).



Gambar 2.7 MSCs sumsum tulang tikus

(Sumber : <http://www.primcells.com/Rat-Mesenchymal-Stem-Cells-BM>)

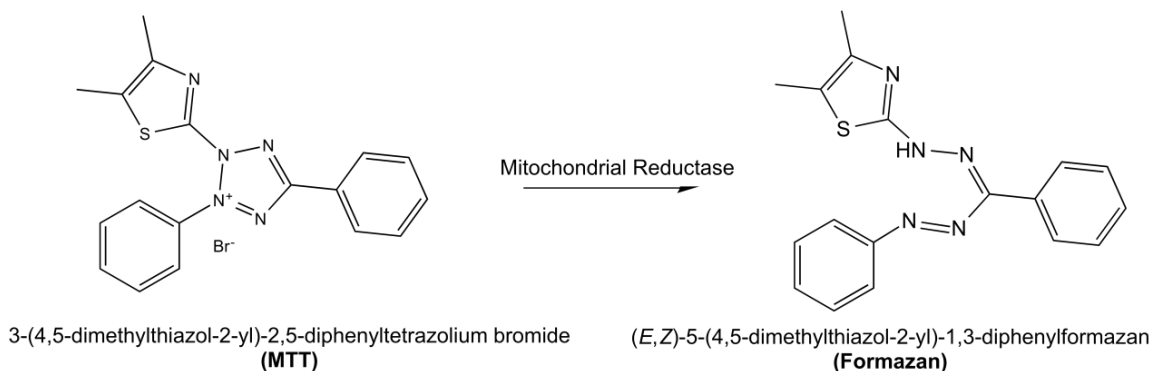
Pemanfaatan MSCs sudah banyak dilakukan. Pertimbangannya karena MSCs mempunyai kemampuan menyatu dengan jaringan yang membutuhkan (*homing*), membentuk jenis sel sesuai kebutuhan (*diferensiasi*), memperbaiki kerusakan jaringan, mencegah peradangan (inflamasi) dan mempertahankan kekebalan tubuh (Wang Shihua dkk, 2012). MSCs terbukti dapat memperbaiki kerusakan jaringan seperti otot, saraf, tulang atau tulang rawan (Haleem Am dkk, 2009).

## 2.10 Uji Toksisitas

Dua metode umum yang digunakan untuk uji toksisitas adalah metode perhitungan (*direct counting*) dengan menggunakan biru tripan (*trypan blue*) dan metode MTT *assay*. Uji MTT *assay* merupakan salah satu metode yang digunakan dalam uji toksisitas (Doyle dan Griffith, 2000)

Uji toksisitas dilakukan menggunakan MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] *assay*. Uji ini mengukur aktifitas metabolik seluler melalui sel NAD(P)H-bebas enzim oksidoreduktase dan dibawah kondisi yang ditentukan mencerminkan jumlah dari sel yang layak (proliferasi sel). Pewarnaan tetrazolium dapat juga digunakan untuk mengukur toksisitas (hilangnya sel yang hidup) atau aktivitas toksisitas (pergantian dari proliferasi sel menjadi istirahat) dari potensial obat dan agen beracun (Fotakis dkk, 2006).

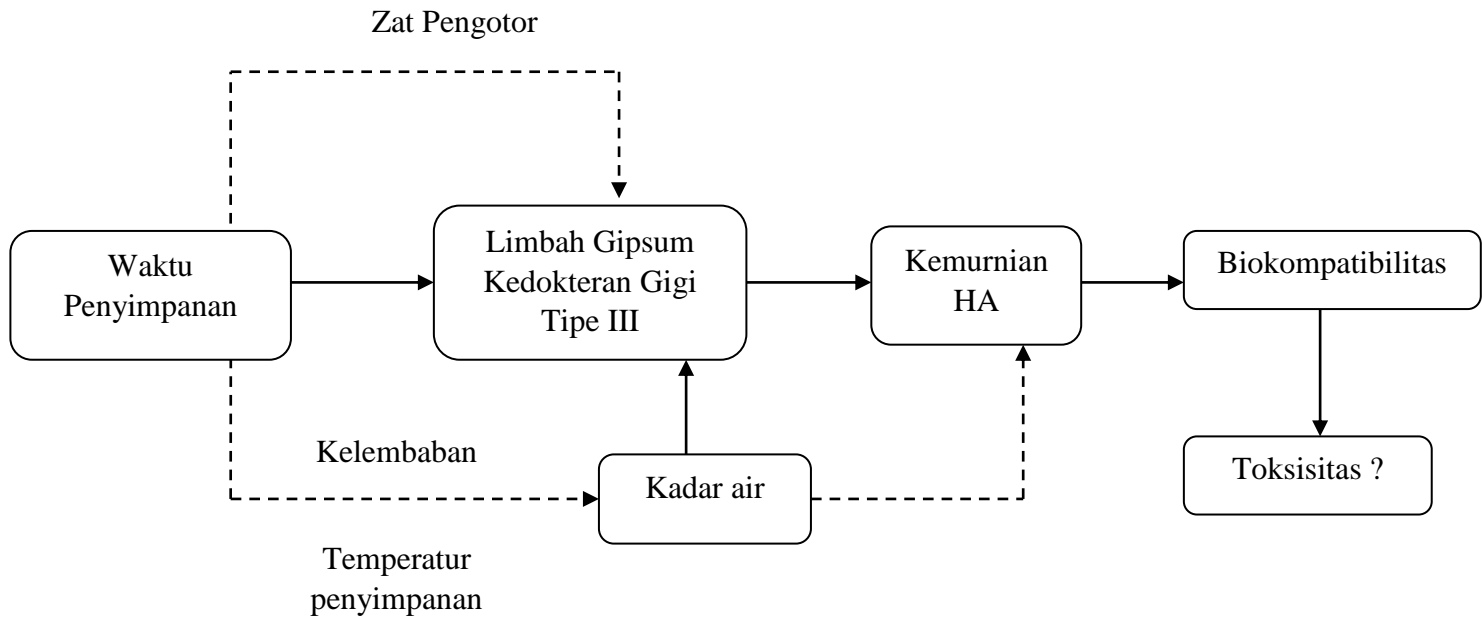
Uji MTT merupakan uji yang sensitif, kuantitatif, dan terpercaya. Metode ini merupakan metode kolorimetrik, dimana pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan oleh system suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA *reader* (Doyle dan Griffith, 2000).



Gambar 2.8 Proses MTT Assay

( Sumber : <http://prevestdirect.com/>)

## 2.11 Kerangka Konsep



Gambar 2.9 Kerangka Konsep Penelitian

## 2.12 Hipotesis

Terdapat perbedaan toksistas hidroksiapatit hasil sintesis limbah *dental gypsum* tipe III dengan waktu penyimpanan yang berbeda pada MSCs.

## **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**

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan September - November 2015 di laboratorium *Institute of Tropical Disease* Universitas Airlangga.

### **3.4 Identifikasi Variabel Penelitian**

#### **3.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah waktu penyimpanan *dental gypsum* 0, 1 dan 3 tahun untuk sintesis hidroksiapatit.

#### **3.4.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah toksisitas hidroksiapatit.

### **3.5 Definisi Operasional Penelitian**

- a. Hidroksiapatit-DGIII adalah serbuk hidroksiapatit yang dihasilkan melalui sintesis limbah *dental gypsum* tipe III dengan menggunakan metode hidrotermal.

- b. Waktu penyimpanan *dental gypsum* tipe III adalah limbah *dental gypsum* yang merupakan model gipsum dengan waktu penyimpanan 0 tahun, 1 tahun dan 3 tahun.
- c. *Dental gypsum* tipe III adalah jenis gipsum yang paling sering digunakan untuk model kerja dalam praktik kedokteran gigi.
- d. Toksisitas adalah jumlah kematian sel yang dipapar menggunakan metode MTT assay. Sel yang digunakan adalah Mesenchymal Stem Cells tikus.

### **3.6 Sampel Penelitian**

#### **3.6.1 Pengelompokan Sampel**

Pada penelitian ini sampel dibagi menjadi 4 kelompok yaitu :

- a. Kelompok 1 merupakan kelompok kontrol yang menggunakan serbuk hidroksiapatit komersial HAP-200.
- b. Kelompok 2 merupakan serbuk hidroksiapatit-DGIII dengan durasi penyimpanan 0 tahun.
- c. Kelompok 3 merupakan serbuk hidroksiapatit-DGIII dengan durasi penyimpanan 1 tahun.
- d. Kelompok 4 merupakan serbuk hidroksiapatit-DGIII dengan durasi penyimpanan 3 tahun.

### **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. *96 microwell plate* (NUNC, Denmark)
- g. *Micropipet* (Eppendorf, Jerman)

- h. *Tips micropipet*
- i. *Sterile syringe filter* (Coming, NY 14831, Jerman)
- j. *Syringe 50 ml* (Terumo, Jepang)
- k. Tabung Centrifuge (Axygen, USA)
- l. *Hemocytometer*
- m. Mikroskop (Nikon Elipse 80<sub>1</sub>)
- n. Inkubator (Memert)
- o. *Microplate reader* (Bio-rad)
- p. *Biohazard cabinet*
- q. *Mikrotube*

3.7.2 Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Hidroksiapatit-DGIII
- b. Tulang Femur Tikus
- c. Aquades Steril
- d. *Normal Saline*
- e. *Mesenchymal Stem Cells (MSCs)*
- f. Media kultur
- g. Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x
- h. MTT 5mg/mL PBS
- i. NHCL dalam isopropanol
- j. Reagen Stopper DMSO
- k. *Ficoll reagen*
- l. *Kloroform*

### **3.8 Prosedur Penelitian**

#### **3.8.1 Persiapan Sampel Hidroksiapatit**

Serbuk hidroksiapatit yang diuji toksisitas ditimbang 100 mg dan dimasukkan dalam mikrotube. Kemudian dilakukan sterilisasi *gamma radiation* di Badan Tenaga Nuklir Indonesia (BATAN). Setelah itu, serbuk hidroksiapatit sintesis direndam

dalam media perendaman selama 7 hari. Media perendaman hidroksiapatit disentrifugasi 2000 rpm selama 3 menit dan diambil supernatannya. Ekstrak hidroksiapatit komersil (HAP 200) digunakan sebagai pembanding. Supernatan diencerkan hingga mencapai konsentrasi 1000 µg/ml.

### 3.8.2 Pengambilan Tulang Femur Tikus

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

1. Dilakukan pembiusan pada tikus dengan kloroform. Dan bagian yang akan dilukai disiram dengan alkohol. Setelah itu dilakukan penyayatan secara melintang dengan tepat memproyeksikan pada tulang femur tikus.
2. Tulang femur yang telah diambil disiram dengan *normal saline*. Dan dilakukan pemisahan tulang femur dengan otot-otot. Setelah bersih, tulang femur kembali disiram dengan *normal saline* hingga bersih. Lalu dimasukkan ke dalam *disposable steril* yang berisi medium transport.
3. Setelah seluruh tulang femur telah diambil dari ketiga tikus dan telah masuk ke dalam medium transport, tulang femur dimasukkan ke dalam larutan *povidone iodine*. Lalu tulang femur kembali dibilas dengan *normal saline* hingga bersih. Setelah itu dimasukkan kembali ke dalam *disposable steril* yang berisi medium transport untuk siap dilakukan isolasi dan kultur *bone marrow* dari femur tikus tersebut.

### 3.8.3 Isolasi dan kultur sel sumsum tulang

Tulang femur tikus diambil sumsum tulangnya dengan menginjektikan syringe ke dalam tulang femur tersebut. Sumsum-sumsum tulang yang diperoleh ditempatkan pada culture dish. Lalu dituang ke dalam tabung disposable 15 ml yang steril dan ditambahkan PBS 10cc, kemudian lakukan resuspensi. Siapkan 5 cc ficol ke dalam tabung disposable 15 ml yang steril, secara perlahan melalui dinding tabung

tuangkan campuran marrow dan PBS. Lakukan sentrifugasi pada temperatur 20°C selama 25 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Dari hasil sentrifugasi akan diperoleh 4 lapisan yaitu sel darah merah, ficol, buffy coat, dan plasma. Dengan menggunakan pipet, buffy coat diambil dan diletakkan pada tabung disposable 15 ml yang steril. Tambahkan PBS 10cc tujuannya adalah untuk mencuci buffy coat yang diperoleh. Kemudian dilakukan sentrifugasi kembali dengan suhu 20°C selama 10 menit dengan kecepatan 1600 rpm. Dari hasil sentrifugasi diperoleh pelet, pelet ini kemudian ditambahkan medium komplit sebanyak 2 ml. Lalu dipindahkan kedalam *culture dish* diameter 10 ml dan ditambahkan 10 cc medium komplit. Inkubasi pada inkubator 37° C dengan kadar CO<sub>2</sub> dan pertumbuhan sel akan diamati setiap harinya.

Pada hari kedua dilakukan pencucian sel, dengan cara medium lama diambil dan dicuci dengan menggunakan PBS, lalu diganti dengan medium baru. Bila pertumbuhan sel telah konfluen 80% dilakukan *splitting*. Medium lama diambil lalu dicuci dengan PBS 5 ml dan ditambahkan tripsin 3 ml kemudian inkubasi 5 menit. Lalu ditambahkan lagi medium komplit 3 ml dan dimasukkan dalam disposable steril. Suspensi sel dipindahkan ke dalam tabung disposable 15 ml yang steril untuk kemudian dilakukan sentrifugasi, lalu supernatant dibuang. Pelet yang diperoleh ditambahkan medium komplit dan dipindahkan ke dalam 2 *culture dish* berdiameter 10 ml, masing-masing ditambahkan 10 cc medium komplit. Inkubasi kembali pada inkubator. Pertumbuhannya diamati setiap hari. Pada penelitian ini menggunakan sel hasil pasase ke-5.

#### 3.8.4 Karakterisasi MSCs

Sel yang telah tumbuh membentuk satu lapisan / monolayer di jadikan single sel dengan proses tripsinasi. Sentrifuge 1600 rpm, selama 5 menit. Pelet sel ditambahkan medium sebanyak 1 ml, resuspensi dan tanam pada obyek glass khusus sebanyak 20 µl. Letakkan obyek glas dalam kotak yang didalamnya sudah terdapat kertas basah, lalu inkubasi di suhu 37°C, selama 1 jam. Fixasi dengan 3% Formaldehide selama 15 menit pada suhu ruang. Cuci dengan PBS sebanyak 4 kali,



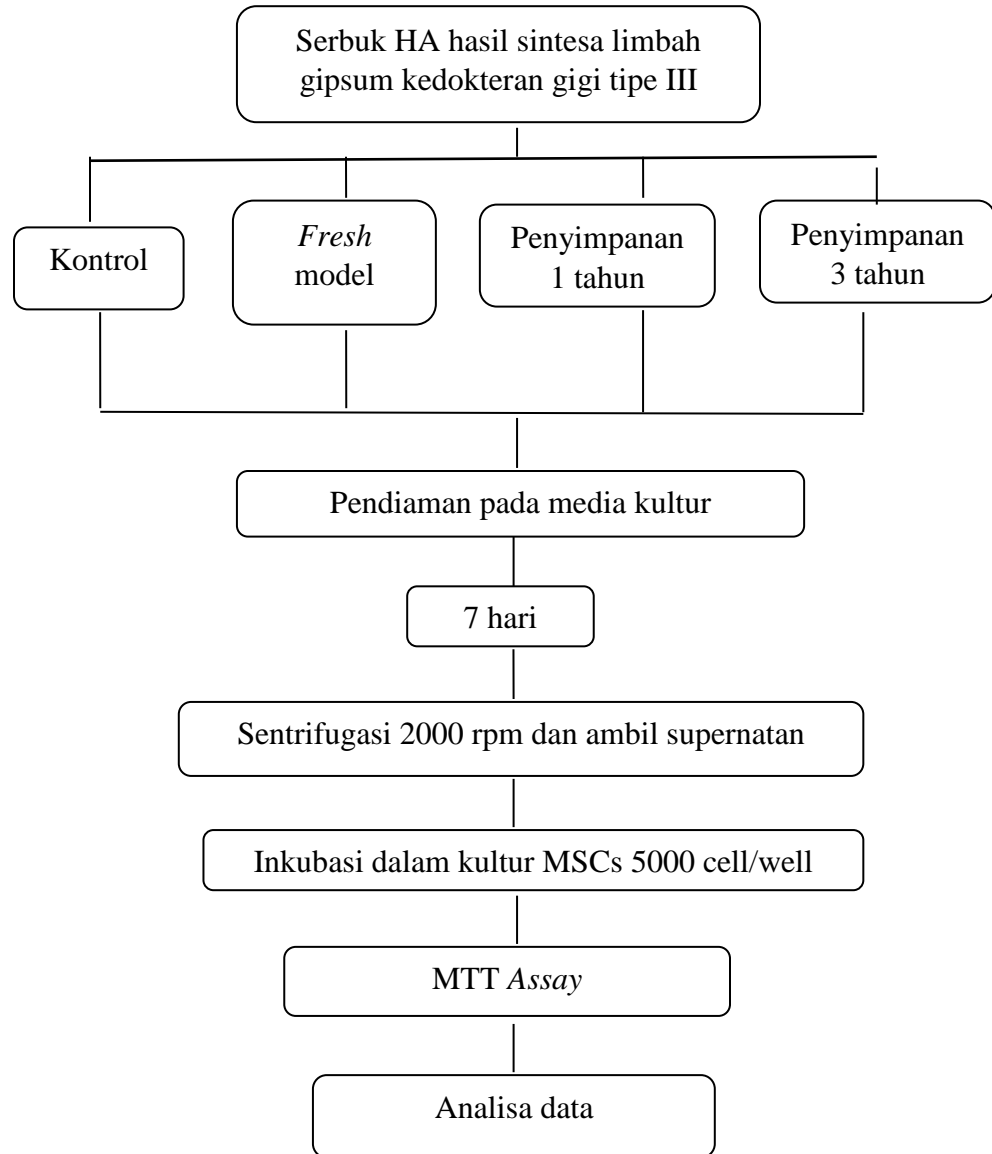
lalu keringkan. Bloking dengan PBS yang mengandung serum 1%, selama 15 menit, pada suhu ruang. Cuci dengan PBS sebanyak 4 kali, lalu keringkan. Tambahkan Ab CD-45/CD-105 yang sudah berlabel FIT-C, inkubasi di suhu 37°C, selama 45 menit. Cuci dengan PBS sebanyak 4 kali, keringkan air disekitar obyek glas dengan kertas tisu. Teteskan 50% glicerol di atas obyek glas, langsung dilihat hasilnya dengan mikroskop fluoresen pada perbesaran 40x. Kalau hasilnya berpendar : positif. Kalau hasilnya tidak berpendar maka : negatif.

### 3.8.5 Uji Toksisitas

Dilakukan tripsinasi untuk melepas lapisan MSCs pada flask kultur, lalu dilakukan resuspensi sel. Setiap sumuran pada 96 sumuran *microtiter tissue plate* diisi suspensi MSCs dengan kepadatan sel  $5 \times 10^3$  sel per *well*, media kultur sel kemudian diinkubasi selama 24 jam. Sumuran untuk kelompok perlakuan diberi rendaman hidroksiapatit, masing-masing dibuat 3 replikasi. Kemudian diinkubasi selama 24 jam, tiap sumuran diberi 10µL MTT, dibiarkan selama 4 jam, lalu diberi 100µL DMSO. Setelah itu nilai OD bisa diperoleh menggunakan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Nilai OD digunakan untuk menghitung presentase kematian sel dengan menggunakan rumus:

$$\frac{(OD \text{ sel kontrol} - OD \text{ medium}) - (OD \text{ sampel} - OD \text{ medium})}{(OD \text{ sel kontrol} - OD \text{ medium})} \times 100$$

### 3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.1 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 *Saphiro Wilk Test* dengan  $p=0,05$ . Uji selanjutnya adalah uji homogenitas data menggunakan *Levene Test* dengan  $p=0,05$ . Selanjutnya data hasil penelitian dilakukan uji parametrik dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui adanya pengaruh waktu penyimpanan terhadap toksisitas limbah kedokteran gigi tipe III. Untuk dapat mengetahui perbedaan antar kelompok digunakan uji LSD.