

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini dilakukan analisis efek pemberian tiga jenis pasta hasil yang diproduksi oleh BATAN, yaitu pasta *Injectable Bone Xenograft* (IBX) yang menggunakan tulang *bovine*, pasta *Injectable Hydroxyapatite Chitosan* (IHA-C), dan pasta *Injectable Hydroxyapatite* (IHA) terhadap viabilitas osteoblas *cell line* karena analisa sitotoksitas suatu biomaterial merupakan penelitian awal yang penting.²⁵ Penelitian ini menggunakan osteoblas MG 63 yang merupakan *prototype* dari sel osteoblas manusia dan telah banyak digunakan dalam pengujian biomaterial.^{26,27}

Efek toksik pasta *graft* tulang IBX, IHA-C, dan IHA terhadap *osteoblas cell line* ditentukan berdasarkan viabilitas sel yang diukur dengan metode 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) *assay*. MTT *assay* dipilih karena pengukurannya akurat dan sensitif, alat ukur yang digunakan adalah alat spektrofotometer yang dapat mendeteksi perubahan metabolisme sel secara jelas, peralatan yang digunakan biasa tersedia di laboratorium, menghemat waktu, dan tenaga.²⁸ Dalam *assay* ini, jika viabilitas osteoblas *cell line* terjaga maka cairan kuning MTT akan berubah menjadi ungu, hal ini tampak pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pasta-pasta *graft* tulang (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Perubahan Warna Kelompok Kontrol dan Perlakuan Menjadi Ungu Setelah Pemberian MTT Pada. 96-Well Plate. Gambar A: Warna Kelompok Perlakuan dan Kontrol Sebelum Diberi MTT. Gambar B: Warna Kedua Kelompok Setelah Diberi MTT.

Setelah pemberian cairan MTT, lakukan pembacaan dengan *microplate reader* dengan panjang gelombang 490 nm. Kemudian hasil pembacaan *microplate reader* yang berupa nilai absorbansi (OD) dinyatakan dalam persentase terhadap kelompok kontrol sebagai viabilitas osteoblas *cell line* dengan menggunakan rumus dari *In vitro Technologies* sebagai berikut:

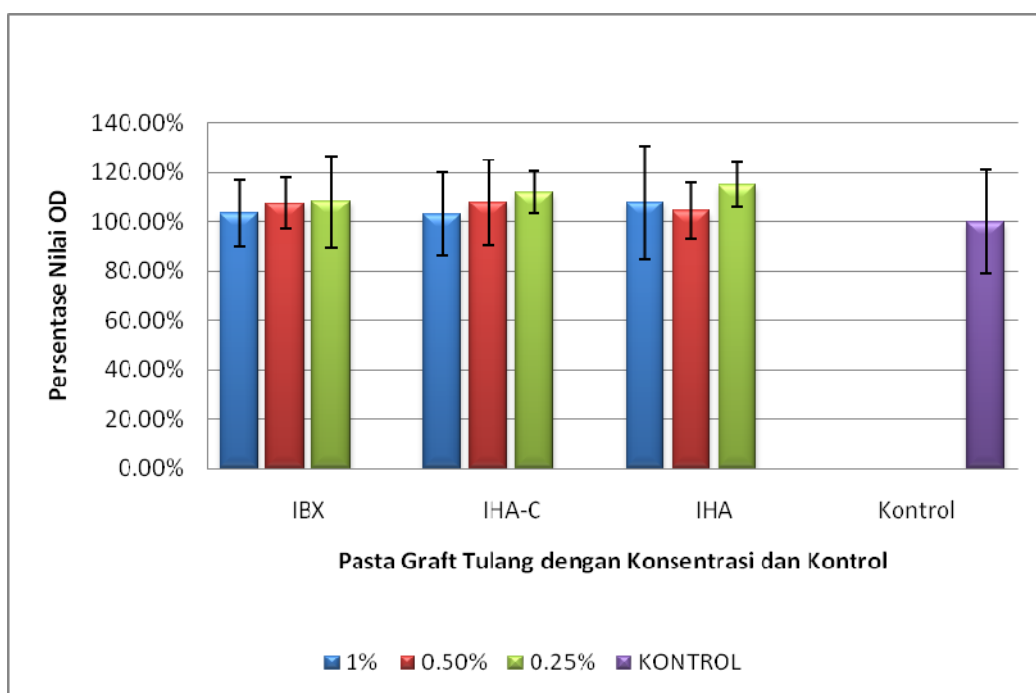
$$\text{Viabilitas Sel (\% dari Kontrol)} = \frac{\text{Nilai absorbansi kelompok Perlakuan}}{\text{Nilai absorbansi kelompok Kontrol}}$$

Jika persentase viabilitas sel lebih kecil dari 100%, maka material yang dipaparkan pada sel tersebut dikatakan bersifat toksik. Hasil pengujian MTT *assay* terhadap viabilitas osteoblas *cell line* tampak pada tabel 5.1 dan gambar 5.2.

Tabel 5.1 Nilai Absorbansi dan Viabilitas Osteoblas *Cell Line* dengan MTT *Assay*

| | n | Rata-rata Absorbansi (OD) \pm SD | Viabilitas Sel Osteoblas \pm SD |
|-------------|----|------------------------------------|-----------------------------------|
| Kontrol | 24 | 2,068 \pm 0,210091 | 100,00% \pm 10,16% |
| IBX 1% | 8 | 2,139625 \pm 0,13478 | 103,46% \pm 6,52% |
| IBX 0.5% | 8 | 2,224 \pm 0,103431 | 107,54% \pm 5,00% |
| IBX 0.25% | 8 | 2,237625 \pm 0,183054 | 108,20% \pm 8,85% |
| IHA-C 1% | 8 | 2,1285 \pm 0,169343 | 102,93% \pm 8,19% |
| IHA-C 0.5% | 8 | 2,233375 \pm 0,171602 | 108,00% \pm 8,30% |
| IHA-C 0.25% | 8 | 2,316375 \pm 0,087541 | 112,01% \pm 4,23% |
| IHA 1% | 8 | 2,2275 \pm 0,231505 | 107,71% \pm 11,95% |
| IHA 0.5% | 8 | 2,162375 \pm 0,114293 | 104,56% \pm 5,53 % |
| IHA 0.25% | 8 | 2,378625 \pm 0,090404 | 115,02% \pm 4.37 % |

Perbedaan persentase nilai OD yang lebih jelas dari ketiga pasta dengan masing-masing konsentrasinya dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Efek Pemaparan Pasta *Graft* Tulang IBX, IHA-C, dan IHA Terhadap Viabilitas Osteoblas *Cell Line*. Sumbu X menunjukkan pasta *graft* tulang dengan konsentrasi dan kontrol, sedangkan sumbu Y menunjukkan nilai OD yang dinyatakan dalam persentase

Dari data pada gambar 5.2 dapat dilihat bahwa ketiga pasta dengan konsentrasi berbeda menunjukkan persentase viabilitas sel diatas seratus persen. Diantara ketiga pasta *graft* tulang tersebut, persentase viabilitas sel pasta IHA pada konsentrasi 0,25% tampak paling tinggi dibandingkan dengan pasta IBX dan IHA-C pada semua konsentrasi. Hal ini telah dibuktikan secara statistik bahwa pasta IHA

dengan konsentrasi 0,25% ($115,02\% \pm 4,37\%$) bermakna terhadap kontrol ($100,00\% \pm 10,16\%$), ($p < 0,05$).

Pada kelompok pasta IBX, persentase viabilitas sel terhadap kontrol yang tertinggi tampak pada konsentrasi pasta sebesar 0,25% ($108,20\% \pm 8,85\%$) dan secara statistik perbedaan tersebut bermakna. Begitu pula pada kelompok IBX dengan konsentrasi 0,5% persentasenya untuk mempertahankan viabilitas sel osteoblas lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol ($107,54\% \pm 5,00\%$) dan secara statistik perbedaan tersebut juga bermakna. Namun, pada kelompok pasta IBX dengan konsentrasi 1% meskipun persentasenya lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol ($103,46\% \pm 6,52\%$), perbedaan tersebut secara statistik tidak bermakna.

Pada kelompok pasta IHA-C, persentase viabilitas sel osteoblas terhadap kontrol yang tertinggi, ditemukan pada konsentrasi pasta sebesar 0,25% ($112,01\% \pm 4,23\%$) dan perbedaan ini bermakna secara statistik. Seperti pada kelompok pasta IBX, perbedaan persentase pasta IHA-C 0,5% ($108,00\% \pm 8,30\%$) terhadap kontrol bermakna secara statistik sedangkan pasta IHA-C 1% ($102,93\% \pm 8,19\%$) perbedaannya terhadap kontrol tidak bermakna.

Pada kelompok pasta IHA, persentase viabilitas sel osteoblas terhadap kontrol tertinggi ditemukan pada kelompok yang dipaparkan dengan pasta *graft* 0,25% ($115,02\% \pm 4,37\%$) dan perbedaan tersebut bermakna secara statistik. Kelompok dengan perlakuan pasta IHA 1% ($107,71\% \pm 11,95\%$) dan perlakuan pasta IHA 0,5% ($104,56\% \pm 5,53\%$) juga ditemukan lebih tinggi dalam menginduksi proliferasi sel osteoblas dibandingkan dengan kontrol. Namun, secara statistik perbedaan bermakna hanya ditemukan pada kelompok yang diberi perlakuan IHA 1%.

Setelah mendapatkan data pasta-pasta yang bermakna terhadap kontrol dari masing-masing kelompok perlakuan, maka pasta-pasta tersebut (IBX 0,5% & 0,25%, IHA-C 0,5% & 0,25%, serta IHA 1% & 0,25%) dibandingkan kembali untuk melihat kemaknaan diantaranya. Ternyata pasta-pasta tersebut secara statistik tidak memiliki perbedaan yang bermakna, sehingga dapat dikatakan bahwa kemampuan pasta-pasta tersebut dalam menjaga viabilitas sel tidak berbeda jauh. Jika dilihat dari data secara keseluruhan, dapat diketahui bahwa pasta IHA 1% dan 0,25% menyebabkan nilai

persentase viabilitas osteoblas yang lebih tinggi dibandingkan pasta IHA-C dan IBX 1% dan 0,25%. Sedangkan pasta IHA-C 0,5 % dan 0,25 % lebih tinggi dibandingkan dengan pasta IBX 0,5% dan 0,25%. Viabilitas kelompok perlakuan yang diberikan pasta dengan bahan hidroksiapatit (IHA dan IHA-C) telah terbukti tidak toksik dan meningkatkan proliferasi sel. Hasil ini sesuai dengan kesimpulan penelitian yang dilaporkan oleh Kasaj, *et al.* (2008) yang juga menemukan bahwa bahan hidroksiapatit meningkatkan proliferasi sel. Namun, dalam penelitian tersebut Kasaj, *et al* menggunakan pasta nano hidroksiapatit pada sel PDL. Selain itu, mereka juga menggunakan pasta nano hidroksiapatit, yang strukturnya lebih menyerupai tulang alami. HA dengan struktur nano lebih dapat meningkatkan proliferasi sel karena struktur nano berdampak pada penambahan luas *scaffold* proses regenerasi tulang.²⁹

Penambahan kitosan dalam hidroksiapatit sebagai biomaterial pengganti tulang diharapkan dapat meningkatkan sifat biokompatibilitas pasta berbahan hidroksiapatit. Pernyataan ini terdapat pada beberapa penelitian, seperti penelitian oleh Risbud, *et al* (2001 dan 2002), Nettles (2001) yang melaporkan bahwa kitosan mendukung pertumbuhan sel dan memberikan hasil yang baik dalam aplikasi pada bidang *tissue engineering*.^{30,31,32}

Dalam penelitian ini tampak bahwa persentase viabilitas sel yang diberikan perlakuan pasta IHA lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan pasta IHA-C. Data ini kemungkinan dapat dihubungkan dengan derajat deasetilasi kitosan yang terkandung dalam pasta IHA-C. Pada umumnya derajat deasetilasi yang terdapat pada kitosan adalah 70 – 90%. Lahiji, *et al* (2001) melaporkan bahwa terjadi peningkatan proliferasi normal sel osteoblas manusia pada saat dipaparkan dengan lapisan kitosan dengan derajat deasetilasi yang lebih besar dari 90%. Demikian pula menurut Muzarelli, *et al* (1994), kitosan dengan derajat deasetilasi yang lebih besar dari 99% dapat menginduksi proses regenerasi tulang melebihi pembentukan normal pada defek femur kambing.^{33,34}

Dalam penelitian, persentase viabilitas sel osteoblas yang diberi paparan pasta IBX yang lebih rendah dibandingkan dengan dua pasta lainnya. Fenomena ini kemungkinan karena kandungan pasta IBX yang terdiri atas *bovine xenograft*.

Xenograft yang diambil dari tulang *bovine* kehilangan sifat osteogenik dan osteoinduktifnya selama dilakukan pembersihan secara kimia untuk menghilangkan sifat antigenik dan mencegah terjadinya infeksi.^{16,35} Selain itu, kemungkinan perbedaan ini juga dipengaruhi oleh ukuran partikel bahan *graft* tulang, dimana ukuran partikel pasta IBX adalah 60 mesh sedangkan ukuran partikel hidroksiapatit yang digunakan dalam pasta IHA dan IHA-C adalah 100 mesh. Berdasarkan laporan Kasaj, *et al* semakin kecil ukuran partikel maka proses osteogenesis akan meningkat.²⁹ Selain itu, Bartee (2005) juga menyatakan bahwa sifat osteokonduksi suatu bahan *graft* tulang berkaitan dengan sifat struktural dan material *graft* (porositas, ukuran pori-pori, bentuk, dan ukuran partikel).³⁶

Pada penelitian yang dilakukan oleh Rininta (*on going references*) dilaporkan pada sel osteoblas yang dipaparkan dengan pasta IBX menunjukkan tingkat fosfatase alkali yang tertinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan pasta IHA-C dan IHA. Pada penelitian ini pasta IBX menunjukkan persentase viabilitas sel yang paling rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan dua pasta lainnya. Hasil ini sesuai dengan laporan penelitian oleh Joss UE, *et al* (2006), yang menyatakan bahwa ekstrak tulang *bovine* yang diberikan pada sel mesenkim tikus dapat menginduksi diferensiasi sel osteoblas dengan meningkatkan aktivitas ALP dan menurunkan proliferasi sel. Dengan demikian, kemungkinan rendahnya angka persentase viabilitas sel kelompok pasta IBX dikarenakan oleh tingginya aktivitas fosfatase alkali.³⁷

Uji viabilitas sel pada penelitian ini menunjukkan bahwa ketiga pasta *graft* tulang yang diproduksi oleh BATAN, yaitu *Injectable Bone Xenograft*, *Injectable Hydroxyapatite-Chitosan* dan *Injectable Hydroxyapatite* tidak memiliki efek toksik, melainkan memiliki efek induksi proliferasi sel-sel osteoblas. Selain itu, terdapat perbedaan presentasi viabilitas sel terhadap kontrol pada masing-masing pasta berdasarkan konsentrasinya.