UJI TOKSISITAS MEMBRAN KOMPOSIT *NANO HYDROXYAPATITE/MAGNESIUM OXIDE* (nHA/MgO) DENGAN *HYDROXYAPATITE/MAGNESIUM OXIDE* (HA/MgO) PADA *HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST* (HGF) MELALUI METODE *MICROCULTURE TETRAZOLIUM TEST ASSAY* (MTT *ASSAY*)

SKRIPSI

UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN

MEMPEROLEH GELAR SARJANA

Oleh:

SEFFRINA PUTRI ARYANTI

NIM :155070400111013

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

repository.ub.ac.id

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

HALAMAN PENGESAHAN

SKRIPSI

UJI TOKSISITAS MEMBRAN KOMPOSIT *NANO HYDROXYAPATITE/MAGNESIUM OXIDE* (nHa/MgO) dengan *HYDROXYAPATITE/MAGNESIUM OXIDE* (Ha/MgO) pada *HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST* (HGF) melalui METODE *MICROCULTURE TETRAZOLIUM TEST ASSAY* (MTT *ASSAY*)

Oleh:
Seffrina Putri Aryanti
NIM :155070400111013

Telah Diujikan di Depan Majelis Penguji pada Tanggal 27 Desember 2019 dan Dinyatakan Memenuhi Syarat Memperoleh Gelar Sarjana dalam Bidang Kedokteran Gigi

Menyetujui,
Pembimbing

Dr.drg.Nur Permatasari, MS
NIP. 196010051991032001

Malang, 27 Desember 2019

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp. KG
NIP. 19800409200812204

HALAMAN PERSETUJUAN

SKRIPSI

UJI TOKSISITAS MEMBRAN KOMPOSIT *NANO HYDROXYAPATITE/MAGNESIUM OXIDE* (nHa/MgO) dengan *HYDROXYAPATITE/MAGNESIUM OXIDE* (Ha/MgO) pada *HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST* (HGF) melalui METODE *MICROCULTURE TETRAZOLIUM TEST ASSAY* (MTT *ASSAY*)

Oleh:

Seffrina Putri Aryanti

155070400111013

Menyetujui untuk diuji:

Pembimbing

Dr.drg.Nur Permatasari, MS

NIP. 196010051991032001

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam skripsi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila didalam naskah ini disertasi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia skripsi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh SARJANA dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU NO.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Malang, 18 Desember 2019
Yang menyatakan,

Seffrina Putri Aryanti
155070400111013

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "Uji Toksisitas Membran Komposit *Nano Hydroxyapatite-Magnesium Oxide* (nHA/MgO) dengan *Hydroxyapatite-Magnesium Oxide* (HA/MgO) pada *Human Gingival Fibroblast* (HGF) melalui Metode *Microculture Tetrazolium Test Assay* (MTT *Assay*)". Dalam penulisan skripsi ini, penulis banyak mendapatkan bimbingan, bantuan, dan dukungan dari berbagai pihak. Dengan selesainya skripsi ini, penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. drg. R. Setyohadi, MS selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
2. Dr. drg. Nur Permatasari, MS selaku Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya, sekaligus sebagai pembimbing penulis yang dengan sabar membimbing penulis dan memberi semangat kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal tugas akhir ini.
3. drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp.KG selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya.
4. Dr. drg. M. Chair Effendi, SU, Sp.KGA dan drg. Ariyati Retno Pratiwi, M.Kes selaku penguji dari ujian proposal ini.
5. Yang tercinta orangtua penulis Bapak Khoirul Anwar dan Ibu Rezekiyanti dan adik penulis yaitu Hafizh yang selalu

memberikan doa yang tak henti-henti, semangat dan dukungannya

6. Teman-teman bimbingan departemen nanomedicine : Fanny, Meyta, Vira dan teman-teman penulis Desy, Ayu, Chintya, Agil, Bima, Astri, Dinda yang selalu ada dan selalu menghibur penulis, memberi dukungan dan membantu dalam pembuatan proposal tugas akhir ini
7. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu
8. Semua teman-teman seperjuangan FKG UB angkatan 2015

Penulis menyadari bahwa proposal tugas akhir ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhirnya, semoga proposal tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 18 Desember 2019

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman Judul i
Halaman Pengesahan ii
Lembar Persetujuan iii
Pernyataan Orisinalitas Skripsi iv
Kata Pengantar v
Abstrak vii
Abstract viii
Daftar Isi ix
Daftar Gambar xiii
Daftar Lambang dan Singkatan xiv
BAB 1 PENDAHULUAN
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 4
1.3.1 Tujuan Umum 4
1.3.2 Tujuan Khusus 4
1.4 Manfaat Penelitian 4
1.4.1 Manfaat Akademik 4
1.4.2 Manfaat Praktis 4
1.4.3 Manfaat Bagi Peneliti 5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA
2.1 Biomaterial 7
2.2 *Hydroxyapatite* 8
2.3 Nanomaterial 11

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2.4 *Magnesium Oxide* 13
2.5 Uji Toksisitas 14
2.6 Fibroblas 15
2.7 MTT *Assay* 16
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN
3.1 Kerangka Konsep 19
3.2 Hipotesis Penelitian 21
BAB 4 METODE PENELITIAN
4.1 Rancangan Penelitian 23
4.2 Sampel Penelitian 23
4.2.1 Sampel 23
4.2.2 Besar Sampel 23
4.3 Variabel Penelitian 24
4.3.1 Variabel Terikat 24
4.3.2 Variabel Bebas 24
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian 24
4.5 Alat dan Bahan 25
4.5.1 Pembuatan Membran Komposit HA-MgO 25
4.5.2 Pembuatan Membran Komposit nHA-MgO 26
4.5.3 Kultur Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF) 26
4.5.4 Panen Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF) 27
4.5.5 Uji Toksisitas 27
4.6 Definisi Operasional 28
4.6.1 *Nano Hydroxyapatite* (nHA) 28
4.6.2 Membran Komposit nHA-MgO 28
4.6.3 Membran Komposit HA-MgO 29

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

4.6.4 Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF) 29
4.6.5 Uji Toksisitas..... 29
4.7 Prosedur Penelitian 30
4.7.1 Pembuatan Membran Komposit HA-MgO 30
4.7.2 Pembuatan Membran Komposit nHA-MgO 31
4.7.3 Kultur Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF) .. 32
4.7.4 Panen Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF)..... 32
4.7.5 Uji Toksisitas 34
4.7.5.1 Menghitung Sel HGF untuk Uji MTT Assay ... 34
4.7.5.2 Uji MTT Assay..... 35
4.8 Alur Penelitian..... 37
4.9 Analisis Data 38
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN
5.1 Hasil Penelitian 39
5.2 Analisis Data..... 41
5.2.1 Uji Normalitas 41
5.2.2 Uji Homogenitas 41
5.2.3 Uji *Independent T-Test*..... 41
5.2.4 Uji Korelasi *Pearson*..... 42
5.3 Pembahasan 44
BAB 6 HASIL DAN PEMBAHASAN
6.1 Kesimpulan 47
6.2 Saran..... 47
DAFTAR PUSTAKA 49

LAMPIRAN

1. Keterangan Kelayakan Etik 55
2. Dokumentasi Penelitian..... 56
3. Hasil Pembacaan Alat Elisa Reader dan Hasil Uji Analisis Data..... 60

DAFTAR GAMBAR

1 Struktur Heksagonal HA 11
2 Struktur Monoklinik HA 11
2 Viabilitas Sel Hidup Membran Komposit HA/MgO dan nHA/MgO 40
4 Perbandingan viabilitas Membran Komposit HA/MgO dan nHA/MgO 42

DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

Ca	= Kalsium
CO_2	= Karbon dioksida
DMEM	= *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	= *Dimethyl sulfoxide*
ELISA	= *Enzym-linked Immunosorbent assay*
HA	= *Hydroxyapatite*
Mg	= *Magnesium*
MgO	= *Magnesium oxide*
MTT *Assay*	= *Microculture Tetrazolium Test Assay*
nHA	= *NanoHydroxyapatite*
nHA/MgO	= *NanoHydroxyapatite/Magnesium oxide*
O_2	= Oksigen
OD	= Nilai absorbansi
P	= Fosfat
PBS	= *Phosphate Buffered Saline*
PVA	= *Poly Vinyl Alcohol*
Å	= Ångström
γ	= Gamma

repository.ub.ac.id

ABSTRAK

Aryanti, Seffrina Putri, 155070400111013, Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang, 16 Januari 2019, "Uji Toksisitas Membran Komposit *Nano Hydroxyapatite-Magnesium Oxide* (nHA/MgO) dengan *Hydroxyapatite-Magnesium Oxide* (HA/MgO) pada *Human Gingival Fibroblast* (HGF) melalui Metode *Microculture Tetrazolium Test Assay* (MTT *Assay*)". Pembimbing: Dr.drg. Nur Permatasari, M.S

Hydroxyapatite (HA) memiliki sifat biokompatibilitas yang baik dan kemampuan untuk berikatan secara kimia dengan jaringan tulang, osteokonduksi. Nano*hydroxyapatite* (nHA) memiliki karakteristik yang menyerupai sifat fisik, kimia, mekanik dan sifat biologis dari tulang manusia, kontak yang terjadi dengan jaringan sekitarnya lebih rapat, dan ukuran partikel yang lebih kecil dan luas permukaan yang besar, sehingga dapat mempengaruhi adhesi dan proliferasi. *Magnesium Oxide* (MgO) merupakan salah satu komponen yang terdapat di dalam tulang sekitar 1% dan bersifat biokompatibilitas, mampu meningkatkan perlekatan, serta proliferasi fibroblas. Tujuan penelitian ini yaitu untuk menentukan toksisitas membran komposit nHA/MgO dan HA/MgO terhadap kultur sel *Human Gingival Fibroblast*. Konsentrasi pada membran yang digunakan yaitu 0.5%, 2%, 4% sebagai perlakuan, *complete medium* + sel HGF sebagai kontrol positif, dan media DMEM F12 sebagai kontrol negatif. Hasil analisis data menggunakan *Independent T-Test* dengan signifikansi 0.896 (membran nHA/MgO dan HA/MgO 0.5%), 0.070 (membran nHA/MgO dan HA/MgO 2%), 0.080 (membran nHA/MgO dan HA/MgO 4%) menunjukkan tidak terdapat perbedan signifikan. Uji Korelasi *Pearson* penambahan MgO pada membran HA menunjukkan nilai koefisien korelasi sebesar -0.473 yang berarti cukup kuat, sedangkan penambahan MgO pada membran nHA menunjukkan menunjukkan nilai koefisien korelasi sebesar -0.648 yang berarti kuat.

Kata kunci: *Hydroxyapatite*, Nano*Hydroxyapatite*, *Magnesium Oxide*, Kultur Sel HGF

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

ABSTRACT

Aryanti, Seffrina Putri, 155070400111013, Bachelor of Dentistry Study Program, Faculty of Dentistry, Brawijaya University Malang, January 16, 2019, "Toxicity Test of *Nano Hydroxyapatite-Magnesium Oxide* (nHA / MgO) Composite with *Hydroxyapatite-Magnesium Oxide* (HA / MgO) on *Human Gingival Fibroblasts* (HGF) through the *Microculture Tetrazolium Test Assay* (MTT *Assay*) Method. Supervisor: Dr. drg. Nur Permatasari, MS

Hydroxyapatite (HA) has good biocompatibility properties and the ability to bond chemically with bone tissue, osteoconduction. Nano *hydroxyapatite* (nHA) has characteristics that resemble the physical, chemical, mechanical and biological properties of human bones, contact that occurs with the surrounding tissue is denser, and smaller particle size and large surface area, so that it can affect adhesion and proliferation. *Magnesium Oxide* (MgO) is one component that is found in the bones of about 1% and is biocompatible, capable of increasing attachment, and proliferation of fibroblasts. The purpose of this study was to determine the toxicity of nHA / MgO and HA / MgO composite membranes against *Human Gingival Fibroblast* cell cultures. The concentration on the membrane used is 0.5%, 2%, 4% as a treatment, *complete medium* + HGF cells as a positive control, and DMEM F12 as a negative control. The results of data analysis using *Independent T-Test t* with a significance of 0.896 (nHA / MgO membrane and HA / MgO 0.5%), 0.070 (nHA / MgO and HA / MgO 2% membrane), 0.080 (nHA / MgO membrane and HA / MgO 4%) showed no significant difference. The *Pearson* Correlation Test for the addition of MgO to the HA membrane showed a coefficient correlation -0.473, which means strong enough, while the addition of MgO to the nHA membrane showed a coefficient correlation -0.648, which means strong.

Keywords: *Hydroxyapatite,* Nano *Hydroxyapatite, Magnesium Oxide*, HGF Cell Culture

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 1
PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Prevalensi penduduk Indonesia yang memiliki masalah pada gigi dan mulut adalah 23,4% dan terdapat 1,6% penduduk yang kehilangan seluruh gigi asli. Namun hanya 29,6% yang menerima perawatan atau pengobatan dari tenaga kesehatan di bidang kedokteran gigi. Jenis perawatan yang paling banyak diterima penduduk Indonesia yaitu penambalan atau pencabutan atau bedah gigi sebesar 38,5% (Riskesdas, 2008). Dalam kasus pencabutan gigi, terdapat komplikasi yang dapat terjadi pasca tindakan pencabutan gigi yaitu resorbsi tulang yang menyebabkan ketinggian penurunan ketinggian dan ketebalan tulang alveolar (Maryani., dkk 2018). Untuk itu perlu diupayakan adanya bahan yang dapat memperbaiki atau mempercepat proses perbaikan tulang yang rusak seperti biomaterial pengganti tulang salah satunya yaitu *Hydroxyapatite* (HA) agar prognosis dari perawatan dan kondisi gigi selanjutnya lebih baik (Selvia dkk, 2012).

Hydroxyapatite (HA) merupakan bahan yang sering digunakan untuk menggantikan mineral jaringan tulang karena memiliki komposisi dan kristalin yang serupa dengan jaringan tulang manusia yaitu terdiri dari mineral kalsium (Ca) dan fosfat (P) (Erizal dkk.,2013). *Hydroxyapatite* (HA) memiliki sifat biokompatibilitas

yang baik dan kemampuan untuk berikatan secara kimia dengan jaringan tulang (Pascawinata dkk., 2013). *Hydroxyapatite* (HA) memiliki sifat osteokonduksi yang berfungsi menjadi tempat untuk pertumbuhan sel tulang baru dan bersifat osteoinduksi yang akan menstimulasi proses osteogenesis (Suryadi., 2011).

Seiring berkembangnya teknologi, beberapa penelitian telah mengembangkan berbagai bentuk dari *hydroxyapatite*, salah satunya dalam bentuk nano. Nano*hydroxyapatite* (nHA) memiliki karakteristik yang menyerupai sifat fisik, kimia, mekanik dan sifat biologis dari tulang manusia. Menurut Kasaj dkk (2008) dalam Pascawinata dkk (2013) kelebihan nano*hydroxyapatite* adalah kontak yang terjadi dengan jaringan sekitarnya lebih rapat. Menurut Pepla dkk (2014) Nano*Hydroxyapatite* (nHA) memiliki mikrostruktur tiga dimensi untuk mempercepat pertumbuhan jaringan tulang, kolonisasi fibrovaskular, dan saraf. Menurut Kattimani dkk (2016), HA mengandung ion kalsium dan fosfat yang tidak memiliki efek toksisitas lokal maupun sistemik. Bahan HA yang berstruktur nano memiliki ukuran partikel yang lebih kecil dan luas permukaan yang besar, sehingga dapat mempengaruhi adhesi dan proliferasi. Namun nano*Hydroxyapatite* dapat bersifat toksik bila dibandingkan dengan *hydroxyapatite* konvensional pada ukuran nanopartikel yang lebih kecil seperti ukuran kurang dari 50 nm dan pemberian dosis tertentu (Ajdary,2018).

Disamping dibutuhkan bahan material pengganti tulang dalam proses regenerasi tulang khususnya setelah pencabutan gigi, dibutuhkan juga bahan yang memiliki efek antimikrobial untuk mencegah daerah bekas pencabutan gigi tidak terkena infeksi yang

lebih parah dan mampu meningkatkan proses osteogenesis untuk proses regenerasi tulang. Menurut Sharma dkk (2017) *Magnesium Oxide* (MgO) merupakan bahan material yang memiliki aktivitas antimikrobial terhadap bakteri gram positif maupun gram negatif. MgO merupakan salah satu komponen yang terdapat di dalam tulang sekitar 1% dan bahan material MgO bersifat biokompatibilitas, mampu meningkatkan perlekatan, dan proliferasi fibroblas (Hickey dkk, 2014).

Pada penelitian ini akan dilakukan sintesis dari *nano Hydroxyapatite* (nHA) dan *Hydroxyapatite* (HA) yang dikombinasikan menggunakan *Magnesium Oxide* (MgO), selanjutnya dihasilkan membran komposit *nano Hydroxyapatite/Magnesium Oxide* (nHA/MgO) dan membran komposit *Hydroxyapatite/Magnesium Oxide* (HA/MgO) yang akan dilakukan uji toksisitas menggunakan MTT *assay* pada kultur sel *human gingival fibroblast* (hgf) untuk dapat memenuhi sebagai kandidat bahan nanomaterial baru dalam terapi bidang kedokteran gigi.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat perbedaan toksisitas membran komposit nHA/MgO dengan membran komposit HA/MgO?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Menentukan toksisitas membran komposit nHA/MgO dengan membran komposit HA/MgO menggunakan uji MTT *assay*.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Mengetahui perbedaan toksisitas antara membran komposit nHA/MgO dan HA/MgO secara *in vitro* pada kultur sel *human gingival fibroblast* (hgf).
2. Mengetahui hubungan penambahan konsentrasi MgO terhadap toksisitas membran nHA/MgO dan HA/MgO.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan dan pengetahuan mengenai komposit *nano Hydroxyapatite/Magnesium Oxyde* (nHA/MgO) yang berpotensi sebagai kandidat nanomaterial baru dalam mendukung rekayasa jaringan sebagai terapi bidang kedokteran gigi.

1.4.2. Manfaat Praktis

Pemanfaatan komposit nano *Hydroxyapatite/Magnesium Oxyde* (nHA/MgO) sebagai nanomaterial baru yang berperan sebagai dasar terapi bidang kedokteran gigi.

1.4.3. Manfaat Bagi Peneliti

1. Sebagai wadah untuk mengaplikasikan ilmu serta melatih untuk berfikir kritis.
2. Menghitung perbedaan toksisitas membran komposit nHA/MgO dan membran komposit HA/MgO melalui uji MTT *assay*.

BAB 2
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Biomaterial

Menurut American National Institute of Health dalam Warastuti dkk (2015) biomaterial merupakan zat atau kombinasi zat baik yang berasal dari sumber sintetik atau alami yang dapat digunakan untuk menambah atau menggantikan sebagian atau seluruh jaringan, organ atau fungsi tubuh, yang bertujuan untuk meningkatkan kualitas hidup seseorang. Biomaterial memiliki kemampuan untuk bertahan di lingkungan biologis tanpa merusaknya. Terdapat empat kategori utama biomaterial yaitu :

1) *Toxic material*

Biomaterial yang akan ditolak jaringan tubuh saat dipasangkan di dalam jaringan dan memiliki efek kurang baik terhadap jaringan sekitarnya.

2) *Bioinert material*

Biomaterial yang sifatnya tidak beracun dan tidak aktif secara biologis, dapat menyebabkan sedikit atau tidak ada respon dari jaringan tubuh.

3) *Bioresorbable material*

Biomaterial yang sifatnya tidak beracun dan tidak menyatu dengan jaringan sekitarnya dan tidak larut seluruhnya setelah periode waktu tertentu.

4) *Bioactive material*

Biomaterial yang sifatnya aktif secara biologis. Bahan material ini akan mendukung ikatan implan dengan jaringan tubuh di sekitarnya.

2.2. *Hydroxyapatite* (HA)

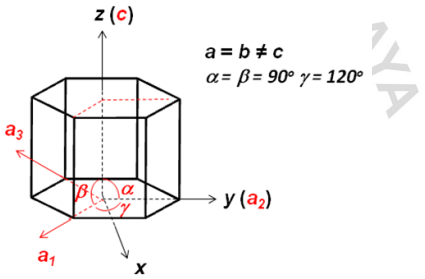
Menurut Kurniasari (2015) *Hydroxyapatite* (HA) dengan rumus kimia $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ merupakan material keramik dan senyawa anorganik penyusun jaringan keras (*hard tissue*) tubuh manusia yang bersifat biokompatibel. Selain itu, HA bersifat bioaktif dan osteokonduktif yang dapat merangsang sel tulang di daerah sekitar material implan agar dapat berinfiltrasi sehingga proses mineralisasi tulang baru dapat lebih cepat terbentuk. Menurut Istifarah (2012) HA mampu melakukan ikatan osteogenesis, menjalin ikatan langsung dengan tulang *host*, tidak menunjukkan respon peradangan, toksisitas, dan respon pirogenetik. Secara termodinamik, temperatur, pH, dan komposisi fisiologi fluida pada hidroksiapatit sangat stabil (Ardhiyanto, 2011).

Mekanisme dari HA dalam mempercepat penyembuhan tulang yaitu pada saat diimplantasikan ke defek tulang maka HA akan mensekresikan kalsium fosfat yang berguna meningkatkan saturasi cairan tubuh dan mempresipitasi apatit biologis dari jaringan sekitarnya. Apatit biologis yang didalamnya terkandung protein endogenous dan dapat berfungsi sebagai matrix untuk menjadi perlekatan dan pertumbuhan sel osteogenik (Pascawinata dkk, 2013). Namun, *hydroxyapatite* memiliki kelemahan diantaranya memiliki sifat mekanik rendah sehingga bersifat rapuh dan ketidakstabilan

struktur pada saat bercampur dengan cairan tubuh (Darwis dan Yessy, 2008). Untuk memperbaiki kelemahan yang ada pada HA dapat dilakukan dengan melapisi menggunaka logam, komposit dengan polimer, dan komposit dengan keramik (Swain dan Herliansyah, 2009 dalam Ardhiyanto, 2011).

Hydroxyapatite memiliki dua struktur kristal yang berbeda, yaitu heksagonal dan monoklinik. HA memiliki struktur kristal heksagonal dengan *space group symmetry* $P6_3/m$ dengan parameter kisi a = b = 9,42 Å, c = 6,881 Å, dan γ = 120° (Gambar 1).

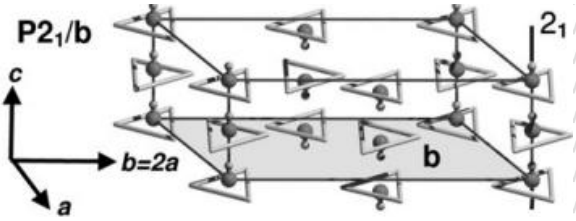
Gambar 1. Struk Magnesium Oxide (*Nano Hydroxyapatite*



Sumber : Prabaningtyas, 2015

Menurut Ferraz, dkk (2004) dalam Kurniasari (2015) *Hydroxyapatite* dengan struktur monoklinik didapatkan jika kondisi stoikiometrik dengan rasio Ca/P 1.67 dan densitas 3.19 g/ml. Struktur monoklinik memiliki stabilitas suhu yang baik dan memiliki struktur yang teratur. *Hydroxyapatite* dengan struktur kristal monoklinik ini memiliki *space group symmetry* $P2_1/b$ dengan parameter kisi a = 9,421 Å, b = 2a, c = 6,881 Å, dan γ = 120°. (Gambar 2).

Gambar 2. Struktur Monoklinik HA



Sumber : Suryadi, 2011

Menurut Kasaj dkk (2008) dalam Pascawinata (2013) *Hydroxyapatite* dengan partikel nano sangat bermanfaat sebagai substitusi tulang karena tersusun atas komponen inorganik dengan struktur nano yang memiliki kerapatan kontak yang lebih baik dengan jaringan sekitarnya, kekuatan dan sifat bioaktif lebih baik, serta akan lebih mudah diserap tubuh karena mempunyai luas permukaan yang besar. Fase nano dari HA memiliki ukuran yang menyerupai dengan jaringan tulang normal sehingga akan menyebabkan aktivitas *fibroblast* (yang akan menstimulasi menjadi osteoblas) menjadi lebih baik dan dapat memperbaiki fungsi sel endotelial yang bekerja pada proses angiogenesis, serta dapat digunakan sebagai bahan proangiogenik (Pezzatini dkk, 2007 dalam Pascawinata dkk, 2013).

Penggunaan partikel nano *hydroxyapatite* dapat meningkatkan karakteristik mekanik, area kontak lebih besar, dan kelarutan lebih tinggi, sehingga nano *hydroxyapatite* dapat digunakan untuk meningkatkan osseointegrasi, dan peningkatan regenerasi tulang. Namun ukuran partikel nano yang kecil dapat menimbulkan gangguan seperti masuknya ke dalam jaringan manusia yang dapat mempengaruhi lingkungan biokimia alami sel,

reaksi peradangan dan kematian sel, serta menimbulkan interaksi dengan permukaan membran sel semakin tinggi dan efek toksisitasnya akan meningkat Nano *hydroxyapatite* juga dapat menimbulkan efek toksik dalam beberapa konsentrasi yaitu 2 dan 5 mg/ml pada sel fibroblas gingiva manusia (Ajdary, 2018).

2.3. Nano Material

Menurut Widyawati dan Didin (2016) nanomaterial merupakan teknik memanipulasi bahan yang menggunakan skala kurang dari 100 nm yang berfungsi untuk memperbaiki bentuk dan fungsi, serta diharapkan dapat mempengaruhi karakteristik dari suatu bahan. Bahan nano material memiliki ukuran partikel yang kecil, luas permukaan yang lebih besar, oleh karena itu, bahan yang berukuran nano memiliki beberapa sifat yang berbeda seperti efek ukuran kecil, efek ukuran kuantum, efek tunneling kuantum, dan efek permukaan (Aueran dkk, 2015).

Terdapat beberapa cara untuk dapat memanipulasi suatu bahan menjadi ukuran nano seperti cara *top-down* (fisika) dan *bottom-up* (kimia). Metode *bottom-up* (kimia) didasarkan pada sintesis kimia dan pertumbuhan bahan yang sangat teratur, serta metode *bottom-up* (kimia) banyak digunakan pada pembuatan bahan nanokomposit, *nano-solution*, serta bahan untuk memperbaiki defek tulang (Harahap dan Sastrodihardjo, 2014). Kelebihan dari metode *bottom-up* (kimia) yaitu metode ini lebih murah dibandingkan dengan metode *top-down* (fisika).

Penggunaan nanomaterial dalam memperbaiki defek tulang memiliki tujuan agar tercapainya osseointegrasi. Hal ini dapat

dipengaruhi oleh komposisi kimia dan topografi permukaan yang dihasilkan, serta degradasi dari lapisan permukaan untuk memperbaiki defek tulang dapat menstimulasi pembentukan tulang baru karena peningkatan osteokonduktivitas yang diakibatkan perubahan topografi permukaan maupun peningkatan osteogenesis. Selain itu, modifikasi dari permukaan menjadi ukuran nano dapat meningkatkan migrasi sel-sel mesenkim, meningkatkan perlekatan dan proliferasi sel, dan menstimulasi diferensiasi osteoblas (Harahap dan Sastrodihardjo, 2014).

Nanomaterial memiliki sifat permukaan yaitu hidrofobisitas dan hidrofilisitas yang mempengaruhi respon lingkungan biologis seperti interaksi dengan protein plasma, fagositosis, dan stimulasi sistem kekebalan tubuh, serta dapat mempengaruhi adhesi, pertumbuhan dan diferensiasi. Ukuran dari nano material akan mempengaruhi laju pelepasan ion, jika semakin kecil ukuran partikel nano maka interaksi dengan permukaan membran sel semakin tinggi dan efek toksisitasnya akan meningkat (Ajdary, 2018).

2.4. *Magnesium Oxide*

Magnesium oxide (MgO) merupakan bahan keramik yang potensial karena memiliki titik lebur yang tinggi, sehingga MgO bersifat tahan air, tahan api, dan memiliki permukaan yang kuat. MgO juga menjadi salah satu elemen yang berkaitan dengan apatit biologis dan sebagai pengganti kationik untuk kalsium (Ca) dalam struktur kisi HA (Farzadi dkk, 2014). MgO memiliki karakteristik biokompatibel, murah, *biodegradable*, ramah lingkungan dan bahan yang secara alami ada di tubuh manusia karena pada tulang bahan

MgO memiliki konsentrasi yang cukup tinggi (kurang lebih sampai 1% dari komposisi tulang). Selain itu, MgO berperan untuk memediasi fungsi sel yang ada di dalam tubuh melalui aktivasi integrin sehingga akan fungsi sel seperti proliferasi, perlekatan dan migrasi dapat tercapai, serta secara tidak langsung dapat mempengaruhi metabolisme mineral melalui aktivasi alkali fosfatase (Hickey dkk, 2014).

Menurut Farzadi dkk (2014) MgO yang digabungkan dengan HA akan berperan seperti faktor pertumbuhan tulang pada tahap awal osteogenesis dan akan menstimulasi adanya proliferasi osteoblas. Nanopartikel *Magnesium Oxide* (MgO) juga bersifat anti mikrobial dan memiliki prinsip anti mikrobial yaitu dapat dengan mudah masuk ke dalam inti bakteri dan dapat menghambat bakteri yang besar terhadap bakteri gram negatif dan gram positif (Sharma dkk, 2017).

2.5. Uji Toksisitas

Menurut *Cancer Chemoprevention Research Center* Fakultas Farmasi UGM, uji toksisitas merupakan evaluasi yang digunakan untuk menentukan suatu material mengandung bahan yang berbahaya (toksik) atau tidak secara biologis terhadap kultur sel dan menjadi salah satu persyaratan yang harus dipenuhi suatu bahan sebagai biomaterial. Pengujian ini merupakan bagian dari uji biokompatibilitas yang akan melihat kesesuain bahan terhadap jaringan tubuh. Uji biokompatibilitas dapat menggunakan metode *in vitro* dengan kultur sel.

Kelebihan menggunakan metode *in vitro* adalah :

1) Sampel lebih homogen.
2) Dapat diukur secara kuantitatif.
3) Lingkungan yang ada di sekitar kultur lebih terkontrol seperti CO_2, O_2, suhu dan tekanan osmotik.
4) Kultur sel akan terpapar langsung oleh bahan uji dan kultur sel sensitif terhadap bahan yang bersifat toksik.
5) Respon terhadap sel hidup dapat langsung diamati. (Marthanti, 2007)

Syarat yang dibutuhkan untuk dilakukan sistem uji toksisitas yaitu :

1) Sistem pengujian harus menghasilkan kurva dosis-respon yang reprodusibel dengan variabilitas rendah.
2) Kriteria respon harus menunjukan hubungan linier dengan jumlah sel . (Kurniasari, 2015)

Parameter dari uji toksisitas terhadap sel adalah viabilitas sel. Viabilitas adalah kemampuan untuk hidup setelah lahir dan dapat dilakukan pengamatan dari beberapa fungsi sel seperti aktivitas enzim, permeabilitas sel membran, perlekatan sel, aktivitas penyerapan nukleutida, dan produksi ATP (Kurniasari, 2015). Terdapat beberapa cara untuk mempelajari viabilitas dan proliferasi dalam populasi sel seperti *assay* dengan format *microplate (96-well plate)* yang akan mempelajari aktivitas metabolik dengan menggunakan substrat *colorimetric* MTT (Istifarah, 2012).

2.6. Fibroblas

Sel fibroblas ditemukan di sepanjang serat kolagen dengan ujung meruncing dan terlihat dalam sediaan sebagai sel fusiform.

Namun dapat ditemukan dalam bentuk gepeng dengan cabang yang ramping, dan inti panjang terlihat jelas diliputi membran inti yang halus dengan satu atau dua anak inti jelas, serta sedikit granula kromatin halus. Pada sediaan histologi, batas sel tidak nyata (Junqueira, 2007).

Fibroblas merupakan sel induk yang berperan membentuk serat dalam matriks, terutama serat kolagen. Kolagen akan memberikan integritas dan kekuatan pada luka. Sel fibroblas berfungsi untuk mensitesis elastin, glikosaminoglikan, proteoglikan dan glikoprotein multi-adhesif (Junquiera, 2007). Sel ini digunakan untuk uji toksisitas karena memiliki fungsi untuk mensintesis komponen jaringan pengikat seperti kolagen dan mukopolisakarida. Selain itu, fibroblas mudah untuk dilakukan kultur karena memiliki kemampuan regenerasi dan pertumbuhan yang cepat. Fibroblas yang berada pada gingiva manusia paling banyak ditemukan pada jaringan periodontal (Septania, 2018). Sitoplasma fibroblas mengandung banyak mitokondria, badan golgi, dan retikulum endoplasmik yang kasar (Fawcett, 2002 dalam Cahyani, 2017).

Sel fibroblas berperan dalam proses penyembuhan luka yang terdiri dari fase inflamasi, proliferasi, dan maturasi (*remodelling*). Pada fase proliferasi, sel fibroblas akan mengalami proliferasi yang akan berperan penting dalam hasil akhir penyembuhan luka. Fibroblas akan mempengaruhi proses reepitalisasi dan akan menghasilkan kolagen untuk menyatukan luka (Sumbayak, 2016). Pada fase remodelling, fibroblas berperan dalam perbaikan jaringan ikat melalui degradasi kolagen dan matriks ECM, dimana fibroblas akan melepaskan enim proteolitik seperti MMP (*metaproteinase*

matriks). MMP akan disekresikan sebagai prekursor tidak aktif dan akan membelah agar menjadi aktif. Degradasi ekstraseluler sering terjadi pada lesi inflamasi, inhibitor MMP akan disekresikan oleh fibroblas untuk berperan dalam degradasi ekstraseluler (Torabinejad, 2008 dalam Cahyani, 2017).

2.7. MTT *Assay*

Uji toksisitas dengan uji enzimatik menggunakan pereaksi (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide (MTT)) adalah pengukuran daya sel hidup berdasarkan aktivitas mitokondria dari kultur sel (Hartono, 2014). Metode MTT *Assay* memiliki prinsip dimana enzim *succinate dehydrogenase* pada mitokondria sel akan mengubah garam tetrazolium MTT berwarna kuning dengan membelah cincin tetrazolium dan akan membentuk *insoluble* kristal tetrazolium (formazan) berwarna keunguan. Jika enzim *succinate dehydrogenase* tidak aktif karena efek toksik dari suatu bahan, maka kristal tetrazolium (formazan) tidak akan terbentuk.

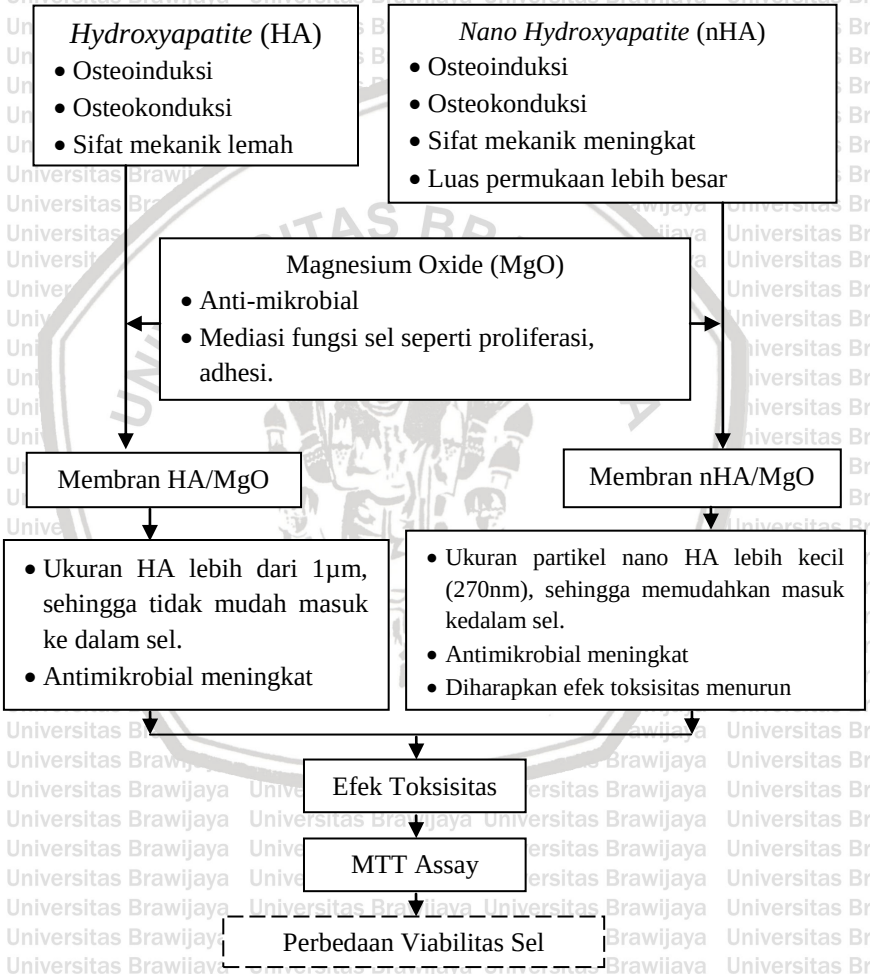
Perubahan warna yang terjadi menunjukkan adanya proliferasi sel pada mitokondria yang menyerap MTT dan terbentuk adanya kristal tetrazolium (formazan) berawarna keunguan yang tidak dapat menembus membran sel, sehingga akan berada di dalam sel yang masih hidup. Jumlah sel yang hidup akan seimbang dengan jumlah pembentukan kristal tetrazolium (formazan) dan dapat dihitung dengan menggunakan *assay colorimetric*, serta dibaca dengan *microplate reader* (Istifarah, 2012).

Hasil bacaan ini berupa nilai absorbansi (OD) yang menandakan presentasi jumlah sel hidup dan dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut (Hartono, 2014) :

$$\%\ \text{sel hidup} = \frac{\text{OD kelompok perlakuan} - \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol sel} - \text{OD kontrol media}} \times 100\%$$

BAB 3
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Hydroxyapatite (HA) merupakan senyawa anorganik penyusun jaringan keras tubuh manusia yang memiliki rumus kimia $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. *Hydroxyapatite* menjadi salah satu bahan keramik bioaktif yang berpotensi untuk dijadikan biomaterial dalam proses regeneratif tulang. Kelebihan *hydroxyapatite* yaitu memiliki karakteristik osteoinduksi dan osteokonduktivitas yang baik karena struktur kimia yang sama dengan mineral pada tulang asli. Namun, kelemahan HA yaitu sifat mekanik yang lemah sehingga bersifat rapuh dan struktur menjadi tidak stabil saat bercampur dengan cairan tubuh atau darah pasien.

Kelemahan *hydroxyapatite* dapat diperbaiki dengan cara mengubah ukuran partikel menjadi ukuran nano partikel, sehingga dapat meningkatkan sifat mekanis, kimia, serta biologis dari *hydroxyapatite*, kemudian *hydroxyapatite* dapat lebih mudah diserap oleh tubuh. Selain itu dilakukan penambahan MgO untuk dikombinasikan menjadi membran komposit. MgO memiliki karakteristik biokompatibel, *biodegradable*, antimikrobial dan mampu meningkatkan proliferasi fibroblas.

Dalam penelitian ini akan di uji toksisitas dari kedua membran komposit menggunakan *MTT assay*. Hasil yang diharapkan dari penelitian ini yaitu membran komposit nHA/MgO memiliki viabilitas sel lebih tinggi, perlekatan fibroblas yang lebih tinggi dan lebih mudah di resorpsi oleh tubuh dibandingkan membran komposit HA/MgO sehingga menurunkan toksisitas dari membran komposit nHA/MgO.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah didapatkan perbedaan toksisitas membran komposit nHA/MgO dengan membran komposit HA/MgO.

BAB 4
METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan metode penelitian *true-experimental laboratory design* (penelitian eksperimental murni) dengan pendekatan *post test with control group*. Pada penelitian ini dilakukan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan toksisitas membran komposit HA/MgO dan membran komposit nHA/MgO.

4.2. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu membran komposit nHA/MgO dan membran komposit HA/MgO.

4.2.1 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu membran komposit nHA/MgO dan membran komposit HA/MgO.

4.2.2 Besar Sampel

Dalam penelitian ini terdapat 8 kelompok perlakuan. Untuk mengetahui jumlah minimal yang dibutuhkan setiap kelompoknya akan dihitung dengan menggunakan rumus yaitu:

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

Keterangan :

n : jumlah sampel per kelompok perlakuan

P : jumlah kelompok perlakuan

Sehingga perhitungannya menjadi:

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

$(8-1)(n-1) \geq 15$

$7n-7 \geq 15$

$7n \geq 15 + 7$

$7n \geq 22$

$n \geq 3.14$ atau dibulatkan menjadi 4

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut, maka jumlah sampel yang diperlukan per kelompok perlakuan minimal 4 buah sampel, sehingga total sampel yang digunakan adalah 32 buah sampel.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Variabel Terikat

Jumlah sel fibroblas dari membran komposit nHA/MgO dan membran komposit HA/MgO.

4.3.2. Variabel Bebas

Nano Hydroxyapatite/Magnesium Oxide (nHA/MgO) dan *Hydroxyapatite/Magnesium Oxide* (HA/MgO).

4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Untuk proses sintesis nHA dan pembuatan membran komposit dilakukan di Laboratorium Kimia dan Biofisika Universitas Brawijaya Malang. Kemudian untuk uji toksisitas menggunakan metode MTT *Assay* dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini berlangsung selama kurang lebih 2 bulan.

4.5. Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1. Pembuatan Membran Komposit HA/MgO

Alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan membran komposit dengan teknik *freeze-drying* yaitu (Warastuti *et al*., 2015) :

a. 0.75 gr serbuk HA (Fluidinova SA)
b. Serbuk MgO 0.5% (0.125 gr dalam aquadest 25 ml) dari Merck KGaA
c. Serbuk MgO 2% (0.5 gr dalam aquadest 25 ml) dari Merck KGaA
d. Serbuk MgO 4% (1 gr dalam aquadest 25 ml) dari Merck KGaA
e. 0.75 gr serbuk PVA (Merck KGaA)
f. 100 ml aquades
g. Gelas kimia
h. Petridisk ukuran d= 6 cm
i. Alumunium foil
j. Spatula
k. Termometer air raksa
l. Neraca digital
m. *Freezer*
n. *Lyophilizer*
o. *Magnetic Stirrer*
p. Statip

4.5.2. Pembuatan Membran Komposit nHA/MgO

Alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan membran komposit dengan teknik *freeze-drying* yaitu (Warastuti *et al*., 2015) :

a. 0.75 gr serbuk nHA sintetik yang telah dibuat dari HA konvensional (Fluidinova SA) dengan modifikasi metode elektrokimia (Nur dkk, 2012)

q. Serbuk MgO 0.5 % (0.125 gr dalam aquadest 25 ml) dari Merck KGaA

r. Serbuk MgO 2 % (0.5 gr dalam aquadest 25 ml) dari Merck KGaA

b. Serbuk MgO 4 % (1 gr dalam aquadest 25 ml) dari Merck KGaA

c. 0.75 gr serbuk PVA (Merck KGaA)

d. 100 ml aquades

e. Gelas kimia

f. Petridisk ukuran d= 6 cm

g. Alumunium foil

h. Spatula

i. Termometer air raksa

j. Neraca digital

k. Freezer

l. Lyophilizer

m. Magnetic Stirrer

n. Statip

4.5.3. Kultur Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF)

a. Media DMEM-F12 yang ditambahkan 10% *fetal bovine serum* (FBS), dan antibiotik 1,25% (penisilin 100 IU / ml, streptomisin 100 µg / ml, dan amphotericin B 100 µg / ml).

b. *96-microwell plate*

c. Flask kultur

d. *Micropipet*

e. *Pipet* elektrik
f. CO_2 inkubator
g. *Falcon* ml
h. *Centrifuge*

4.5.4. Panen Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF)

a. *Conical tube*
b. *96-microwell plate*
c. Pipet
d. SFM (*Serum Free Medium*)
e. Media kultur lengkap (*complete medium*)
f. PBS-A
g. *Trypsine-versene* (Tripsin-EDTA)
h. *Centrifuge*

4.5.5. Uji Toksisitas

Alat dan bahan yang digunakan dalam uji toksisitas dengan MTT Assay :

a. Inkubator standar
b. Inkubator dengan CO_2
c. *96-microwell plate*
d. Botol roux
e. Cawan petri
f. Mikroplate
g. *Elisa reader*
h. Multi pippet
i. Membran komposit HA/MgO dan membran komposit nHA/MgO
j. Kultur sel *fibroblast*

k. Media *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*-F12 (DMEM-F12)

l. *Phosphate Buffered Saline*-A (PBS-A)

m. *Trypsine-versene* (Tripsin-EDTA)

n. MTT [3-(4,5-*dimethylthiazol*-2-*il*)-2,5-*diphenyltetrazolium bromide*]

o. DMSO (*Dimethyl sulfoxide*)

4.6. Definisi Operasional

4.6.1. *Nano Hydroxyapatite* (nHA)

Nano *Hydroxyapatite* (nHA) dibuat dari serbuk *hydroxyapatite* (HA) konvensional bermerk Fluidinova SA dengan cara modifikasi metode elektrokimia (Nur dkk, 2012). Didapatkan serbuk nano *hydroxyapatite* dengan skala nano sebesar 270nm.

4.6.2. Membran Komposit nHA/MgO

Membran komposit nHA/MgO dibuat dengan cara mencampurkan kedua bahan ke dalam PVA yang telah dilarutkan dengan aquadest dan menggunakan *stirrer* agar larutan tidak mengendap setelah dicampurkan. Penggunaan *stirrer* dilakukan selama 1 jam 25 menit pada suhu 40^{o}C. Setelah itu larutan ditunggu hingga suhu ruang dan dimasukkan dalam petridisk, selanjutnya dilakukan proses freeze drying selama 24 jam. Didapatkan membran nHA/MgO dan dilakukan pemotongan dengan ukuran membran 5 mm x 5 mm x 1 mm.

4.6.3. Membran Komposit HA/MgO

Membran komposit HA/MgO dibuat dengan cara mencampurkan kedua bahan ke dalam PVA yang telah dilarutkan dengan aquadest dan menggunakan *stirrer* agar larutan tidak

mengendap setelah dicampurkan. Penggunaan *stirrer* dilakukan selama 1 jam 25 menit pada suhu 40^{o}C. Setelah itu larutan ditunggu hingga suhu ruang dan dimasukkan dalam petridisk, selanjutnya dilakukan proses freeze drying selama 24 jam. Didapatkan membran HA/MgO dan dilakukan pemotongan dengan ukuran membran 5 mm x 5 mm x 1 mm.

4.6.4. Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF)

Sel fibroblas yang digunakan berasal dari gingiva manusia pasca dilakukan prosedur odontektomi dan dilakukan kultur sel HGF dengan kepadatan 2.10^{-5} sel/ml.

4.6.5. Uji Toksisitas

Uji yang digunakan untuk mengukur suatu material bersifat toksik atau tidak toksik terhadap jaringan yang menggunakan metode *Microculture Tetrazolium Test Assay* (MTT *Assay*) setelah diberi perlakuan. Suatu bahan bersifat toksik jika sel yang mati lebih dari 50% yang akan ditunjukkan dengan nilai absorbansi dari viabilitas sel dan pembacaan dilakukan dengan menggunakan alat *Elisa reader*. Perhitungan viabilitas sel hidup didapatkan dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Viabilitas sel Hidup} = \frac{\text{OD perlakuan} - \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol sel} - \text{OD kontrol media}} \times 100\%$$

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Pembuatan Membran Komposit HA/MgO

Pada penelitian pembuatan membran komposit menggunakan teknik *freeze drying* yaitu :

a. Melarutkan 0.75 gr PVA dalam 25 ml aquades menggunakan *magnetic stirrer* dengan suhu 80^0 C hingga larut dan homogen.
b. Larutan akan didiamkan hingga sesuai suhu ruang dan *magnetic stirrer* tetap berputar.
c. Setelah sesuai dengan suhu ruang, mencampurkan sedikit demi sedikit 0.75 gr serbuk HA kedalam larutan PVA hingga larutan homogen.
d. Selanjutnya, mencampurkan sedikit demi sedikit serbuk MgO kedalam larutan PVA+HA hingga larutan homogen.
e. Pembuatan konsentrasi 2 % MgO membutuhkan serbuk 0.5gr MgO dalam 25 ml aquadest, konsentrasi 4 % MgO membutuhkan serbuk 1gr MgO dalam 25 ml aquadest, dan konsentrasi 0.5 % MgO membutuhkan serbuk 0.125 gr MgO dalam 25 ml aquadest.
f. Mengaduk larutan dengan *magnetic stirrer* selama 1.25 jam pada suhu 40^0C.
g. Setelah itu larutan ditunggu hingga dingin (sesuai suhu ruang).
h. Menuangkan larutan ke cetakan petridisk dengan ketinggian larutan mencapai 0.1 cm.
i. Membekukan cetakan pada *freezer* dengan suhu -40^0C.
j. Setelah membeku, memasukkan cetakan ke dalam alat *freeze drying* selama semalaman.
k. Kemudian membran yang sudah jadi dipotong dengan ukuran 5 mm x 5 mm

4.7.2. Pembuatan Membran Komposit nHA/MgO

Pada penelitian pembuatan membran komposit menggunakan teknik *freeze drying* yaitu :

a. Melarutkan 0.75 gr PVA dalam 25 ml aquades menggunakan *magnetic stirrer* dengan suhu 80^0 C hingga larut dan homogen.
b. Larutan akan didiamkan hingga sesuai suhu ruang dan *magnetic stirrer* tetap berputar.
c. Setelah sesuai suhu ruang, mencampurkan sedikit demi sedikit 0.75 gr serbuk nHA kedalam larutan PVA hingga larutan homogen.
d. Selanjutnya, mencampurkan sedikit demi sedikit serbuk MgO kedalam larutan PVA+nHA hingga larutan homogen.
e. Pembuatan konsentrasi 2 % MgO membutuhkan serbuk 0.5gr MgO, konsentrasi 4 % MgO membutuhkan serbuk 1gr MgO, dan konsentrasi 0.5 % MgO membutuhkan serbuk 0.125 gr MgO.
f. Mengaduk larutan dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1.25 jam pada suhu 40^0C.
g. Setelah itu menunggu larutan hingga dingin (sesuai suhu ruang).
h. Menuangkan larutan ke cetakan petridisk dengan ketinggian larutan mencapai 0.1 cm.
i. Membekukan cetakan pada *freezer* dengan suhu -40^0C.
j. Setelah membeku, memasukkan cetakan ke dalam alat *freeze drying* selama semalaman.
k. Kemudian membran yang sudah jadi dipotong dengan ukuran 5 mm x 5 mm

4.7.3 Kultur Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF)

Pada penelitian toksisitas diperlukan kultur sel *human gingival fibroblast* (hgf) dengan cara yaitu :

a. Mencuci jaringan dengan menggunakan transfer medium yang terdiri dari HBSS, antibiotic 1,25% dan DI water.
b. Meletakkan gingiva pada cawan petri yang telah diisi dengan *complete medium* kemudian dicincang secara mekanis menggunakan gunting dan pisau bedah.
c. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit pada larutan yang mengandung jaringan gingiva dan fibroblas.
d. Membuang supernatan, meresuspensi dan pellet ditempatkan pada *flask* yang berisi media kultur lengkap (*complete medium*) yang terdiri dari DMEM-F12 yang ditambahkan 10% *fetal bovine serum* (FBS), dan antibiotik 1,25% (penisilin 100 IU / ml, streptomisin 100 µg / ml, dan amphotericin B 100 µg / ml).
e. Menginkubasi sel pada inkubator dengan suhu 37^0C dan kadar CO_2 5%.
f. Mengganti medium kultur 2 hari sekali hingga sel *human gingival fibroblast* (hgf) telah attached dan 80% konfluen.

4.7.4 Panen Sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF) dan Subkultur

a. Mengambil sel dari inkubator CO_2 dan mengamati kondisi sel.
b. Memanen sel setelah sel 80% konfluen.
c. Membuang *complete medium* dengan syringe.
d. Membilas dengan SFM (*Serum Free Medium*) sebanyak dua kali.
e. Mencuci sel dengan PBS-A lalu membuangnya.
f. Menambahkan tripsin-EDTA (tripsin 0.25%) sebanyak 3cc secara merata agar sel dapat terlepas dari flask.
g. Menginkubasi dalam inkubator CO_2 5 % pada suhu 37^0C selama 3 menit dan diketuk secara perlahan.

h. Melakukan pengamatan dengan mikroskop untuk melihat sel *human gingival fibroblast* (hgf) sudah terlepas atau belum.
i. Memasukkan media kultur lengkap (*complete medium*) ke dalam *conical tube* sebanyak 6cc.
j. Memindahkan sel HGF yang sebelumnya dilakukan *pippeting* hingga sel terlepas ke dalam *conical tube* yang berisi *complete medium.*
k. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit.
l. Membuang media kultur lengkap dan menambahkan SFM (*serum free medium*) sebanyak 3cc.
m. Melakukan *tapping* agar sel HGF tidak mengendap.
n. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit.
o. Membuang SFM dan menambahkan *complete medium* sebanyak 3 cc pada *conical tube*. Melakukan *tapping.*
p. Memasukkan *complete medium* sebanyak 10 cc ke dalam setiap flask baru dan memberi tanda pada tiap flask baru P5.1 P5.2, P5.3
q. Menambahkan sel HGF dari *conical tube* ke setiap flask baru sebanyak 1 cc untuk dilakukan subkultur.
r. Menginkubasi dalam inkubator CO_2 5 % pada suhu 37^0C.

4.7.5 Uji Toksisitas

4.7.5.1 Menghitung Sel HGF untuk Uji MTT *Assay*

a. Mengambil satu flask yang berisikan sel dari dalam inkubator dan melakukan pengamatan dibawah mikroskop.
b. Membilas dengan SFM (*Serum Free Medium*) sebanyak dua kali.

c. Mencuci sel dengan PBS-A lalu membuangnya.

d. Menambahkan tripsin-EDTA (tripsin 0.25%) sebanyak 3cc secara merata agar sel dapat terlepas dari flask.

e. Menginkubasi dalam inkubator CO_2 5 % pada suhu 37^0C selama 3 menit dan diketuk secara perlahan.

f. Melakukan pengamatan dengan mikroskop untuk melihat sel *human gingival fibroblast* (hgf) sudah terlepas atau belum.

s. Memasukkan media kultur lengkap (*complete medium*) ke dalam *conical tube* sebanyak 3cc.

t. Memindahkan sel HGF yang sebelumnya dilakukan *pippeting* hingga sel terlepas ke dalam *conical tube* yang berisi *complete medium.*

u. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit.

v. Membuang media kultur lengkap dan menambahkan SFM (*serum free medium*) sebanyak 3cc.

w. Melakukan *tapping* agar sel HGF tidak mengendap.

x. Melakukan sentrifugasi dengan kecepatan 800 rpm selama 8 menit.

y. Menghitung jumlah sel HGF yang dibutuhkan, lalu mengambil sebanyak 80 µL sel HGF dari *conical tube* dan 3320 µL *complete medium.* Memasukkan kedalam conical tube baru untuk digunakan uji MTT *Assay.*

4.7.5.2 Uji MTT *Assay*

a. Memasukkan membran komposit nHA/MgO dan HA/MgO sesuai jumlah sampel penelitian dan kontrol ke dalam *96-microwell plate.*

b. Memasukkan 100 µL DMEM-F12 ke *96-microwell plate* untuk kelompok kontrol negatif.
c. Memasukkan 100 µL sel HGF ke *96-microwell plate* untuk kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan.
d. Melakukan inkubasi dalam inkubator CO_2 5% selama 24 jam pada suhu 37^{O} C.
e. Mengeluarkan dari inkubator.
f. Melakukan pengamatan pada mikroskop untuk melihat sel HGF telah konfluen atau belum. Jika belum konfluen, melakukan inkubasi 24 jam kembali hingga konfluen. Jika telah konfluen, dilanjutkan untuk uji MTT *Assay*.
g. Membuang media sel (*complete medium*) dengan menggunakan syringe.
h. Menambahkan SFM sebanyak 3 tetes kedalam setiap sumuran lalu menggoyangkan secara perlahan.
i. Membuang SFM dengan menggunakan syringe. (melakukan *washing* sebanyak satu kali lagi)
j. Menambahkan reagen MTT yang telah dilarutkan dengan SFM sebanyak 100 µL ke dalam setiap sumuran *96-microwell plate*.
k. Menutupi *96-microwell plate* dengan menggunakan alumunium foil.
l. Memasukkan ke dalam inkubator CO_2 dan diinkubasi selama 4 jam pada suhu 37^{O} C.
m. Melakukan pengamatan untuk melihat terbentuknya kristal formazan.

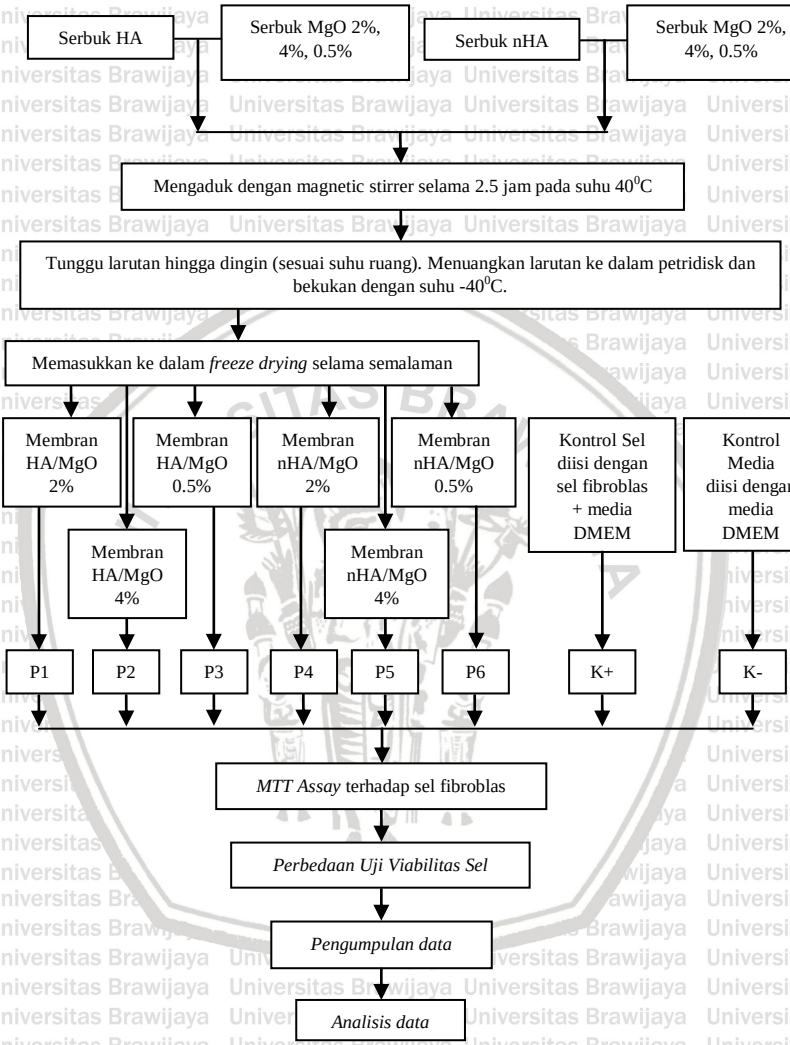
n. Jika telah terbentuk kristal formazan, menambahkan DMSO sebanyak 100 µL.

o. Memasukkan ke dalam inkubator CO_2 dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37^{O} C.

p. Memindahkan kelompok sampel penelitian dan kelompok kontrol ke dalam*96-microwell plate* baru.

q. Menghitung nilai absorbansi (OD) formazan dengan menggunakan alat *ELISA reader* pada panjang gelombang 570 nm.

4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Hasil uji toksisitas menggunakan alat MTT *Assay* pada sampel membran komposit nHA/MgO dan sampel membran komposit HA/MgO dilakukan uji normalitas untuk mengetahui data yang didapat berdistribusi normal atau tidak dengan uji *Saphiro Wilk*. Setelah itu dilakukan uji homogenitas dengan uji *Levene's Test* untuk mengetahui data yang didapat homogen atau tidak. Selanjutnya dilakukan uji *Independent T-test* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Kemudian, dilakukan uji Korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antar variabel dan melihat kuat atau lemahnya hubungan antar perlakuan tersebut.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 5
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Penelitian

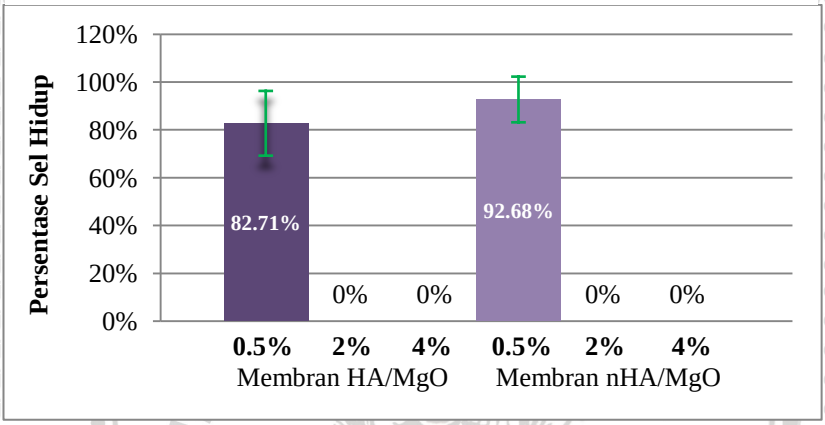
Penelitian uji toksisitas membran komposit HA/MgO dan membran komposit nHA/MgO menggunakan MTT *Assay*. Hasil pengujian dengan MTT *Assay* dilakukan menggunakan Elisa *reader* dan didapatkan berupa *optical density* yang menunjukan tingkat absorbansi melalui perubahan warna yang dihasilkan oleh aktivitas mitokondria sel hidup dan akan membentuk kristal formazan berwarna ungu. Perubahan warna yang semakin pekat akan menunjukkan nilai absorbansi tinggi dan menggambarkan jumlah sel HGF yang hidup semakin tinggi. Perhitungan jumlah sel HGF yang hidup dapat menggunakan rumus presentase sel hidup.

Sampel penelitian ini dibagi menjadi delapan kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif (K-) pemberian media DMEM F-12, kontrol positif (K+) pemberian sel HGF, perlakuan 1 (membran HA/MgO 0.5% dengan pemberian sel HGF), perlakuan 2 (membran HA/MgO 2% dengan pemberian sel HGF), perlakuan 3 (membran HA/MgO 4% dengan pemberian sel HGF), perlakuan 4 (membran nHA/MgO 0.5% dengan pemberian sel HGF), perlakuan 5 (membran nHA/MgO 2% dengan pemberian sel HGF), dan perlakuan 6 (membran nHA/MgO 4% dengan pemberian sel HGF). Hasil viabilitas sel hidup yang didapatkan berdasarkan pengamatan dan pembacaan nilai absorbansi uji toksisitas membran komposit HA/MgO dan membran komposit nHA/MgO terhadap kultur sel HGF (*Human Gingival Fibroblast*) menggunakan rumus :

Viabilitas sel Hidup = $\frac{\text{OD perlakuan} - \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol sel} - \text{OD kontrol media}} \times 100\%$

Didapatkan viabilitas sel hidup sebagai berikut :

Gambar 3. Viabilitas Sel Hidup Membran Komposit HA/MgO dan nHA/MgO



Berdasarkan gambar 3 menunjukkan persentase viabilitas sel hidup HGF setelah diberikan perlakuan membran HA/MgO diperoleh hasil pada kelompok HA/MgO 0.5% sebesar 82.71%, kelompok HA/MgO 2% sebesar 0%, dan kelompok HA/MgO 4% sebesar 0%. Sedangkan untuk perlakuan membran nHA/MgO diperoleh hasil pada kelompok nHA/MgO 0.5% sebesar 92.68%, kelompok nHA/MgO 2% sebesar 0%, dan kelompok nHA/MgO 4% sebesar 0%. Kelompok dengan persentase viabilitas tertinggi didapatkan pada kelompok nHA/MgO 0.5% dan dilanjutkan kelompok membran HA/MgO 0.5%. Sedangkan kelompok dengan persentase viabilitas terendah didapatkan pada kelompok HA/MgO 2%, kelompok HA/MgO 4%, kelompok nHA/MgO 2%, dan kelompok nHA/MgO 4%.

5.2 Analisis Data

Untuk mengetahui perbedaan toksisitas membran komposit HA/MgO dan nHA/MgO maka akan dianalisis dengan uji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu.

5.2.1 Uji Normalitas

Uji normalitas menggunakan uji *Shapiro Wilk* (n<50) dengan ketentuan data dikatakan normal apabila signifikansi >0.05. Didapatkan hasil uji normalitas *Shapiro Wilk* diperoleh nilai signifikansi pada membran HA/MgO 0.5% sebesar 0.410, HA/MgO 2% sebesar 0.111, HA/MgO 4% sebesar 0.955, nHA/MgO 0.5% sebesar 0.601, nHA/MgO 2% sebesar 0.092, nHA/MgO 4% sebesar 0.699. Dapat disimpulkan bahwa data penelitian berdistribusi normal, sehingga dilanjutkan dengan uji homogenitas.

5.2.2 Uji Homogenitas

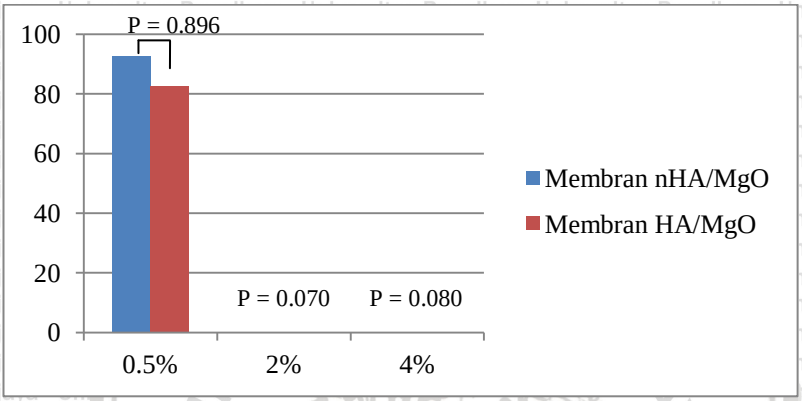
Untuk mengetahui data penelitian yang diperoleh homogen atau tidak maka digunakan uji *Levene's test* dengan ketentuan homogen apabila nilai signifikansi > 0.05. Didapatkan dari hasil uji homogenitas diperoleh nilai signifikansi sebesar 0.028 (< 0.05), dapat disimpulkan data penelitian memiliki ragam tidak homogen.

5.2.3 Uji *Independent T-test*

Uji T digunakan untuk mengetahui perbedaan dua kelompok data yang tidak berpasangan dengan syarat bermakna apabila nilai signifikansi p<0.05 dan data dalam penelitian bersifat normal. Pada penelitian ini, bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat

perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *Independent T-test* sebagai berikut :

Gambar 4. Perbandingan viabilitas Membran Komposit HA/MgO dan nHA/MgO



Berdasarkan hasil uji *Independent T-test* menunjukkan nilai signifikansi (2-*tailed*) pada masing-masing kelompok membran HA/MgO dan nHA/MgO 0.5% sebesar 0.896, membran HA/MgO dan nHA/MgO 2% sebesar 0.070, HA/MgO dan nHA/MgO 4% sebesar 0.080, sehingga dapat diartikan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.

5.2.4 Uji Korelasi *Pearson*

Uji korelasi *Pearson* bertujuan untuk mengetahui hubungan penambahan konsentrasi MgO dan toksisitas membran HA/MgO dan nHA/MgO. Dasar pengambilan keputusan untuk mengetahui hubungan bersifat kuat atau tidak dapat dilihat dari nilai koefisien korelasi dengan syarat nilai koefisien 0-0.2 (sangat lemah), 0.21-0.4

(lemah), 0.41-0.6 (cukup kuat), 0.61-0.8 (kuat), dan 0.81-1 (sangat kuat).

Hasil uji korelasi *Pearson* antara penambahan konsentrasi MgO terhadap membran HA menunjukkan nilai koefisien korelasi sebesar -0.473 yang berarti cukup kuat. Sedangkan hasil uji korelasi *Pearson* antara penambahan konsentrasi MgO terhadap membran nHA menunjukkan nilai koefisien korelasi sebesar -0.648 yang berarti kuat.

Hasil kedua uji memberikan sifat korelasi negatif yang menyatakan bahwa semakin tinggi penambahan konsentrasi MgO maka viabilitas sel hidup akan menurun.

5.3 Pembahasan

Perbedaan viabilitas sel hidup pada membran nHA/MgO dibandingkan dengan membran HA/MgO berdasarkan uji Independent T-Test didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua membran. Hasil ini dapat disebabkan oleh dosis dan ukuran partikel nano*hydroxyapatite* yang digunakan, dimana dalam penelitian ini menggunakan nano*hydroxyapatite* dengan ukuran 270 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian Ajdary (2018), yang mengatakan bahwa nano*hydroxyapatite* dapat memiliki efek toksik pada sel fibroblas gingiva manusia dalam beberapa konsentrasi yaitu 2 dan 5 mg/ml. Adapun ukuran partikel nano, seperti yang dikatakan Na Li dkk. (2019) nano*hydroxyapatite* memiliki luas permukaan yang lebih tinggi dan ukuran partikel yang lebih kecil dibandingkan dengan *hydroxyapatite* konvensional, sehingga memudahkan masuk ke dalam sel dan dapat meningkatkan proliferasi sel. Penelitian yang dilakukan Martins (2011) didapatkan pada periode waktu 2 minggu ditemukan partikel nHA dan dikelilingi beberapa sel seperti osteoklas pada defek. Oleh karena itu, dapat diartikan bahwa partikel nano dapat meningkatkan viabilitas sel hidup lebih baik dibandingkan dengan *hydroxyapatite* konvensional, karena nano*hydroxyapatite* dapat meningkatkan proliferasi sel.

Namun ukuran partikel nano yang kecil juga dapat memiliki efek toksisitas, seperti yang dikatakan oleh Ajdary (2018) bahwa

ukuran nano partikel akan mempengaruhi laju pelepasan ion ke dalam sel, dimana semakin kecil ukuran partikel nano maka semakin cepat laju pelepasan ion dan meningkatkan interaksi dengan permukaan membran sel, sehingga efek toksisitas akan meningkat. Ukuran nano partikel kurang dari 1 mm (1000 nm) dapat memasuki sel dan berinteaksi dengan sel, tetapi efek toksisitasnya belum diketahui. Pada ukuran nano partikel kurang dari 50 nm akan lebih cepat masuk ke dalam sel dan memberikan efek toksik yang lebih kuat dibandingkan dengan ukuran nano partikel 100-200 nm. Jika ukuran nano partikel dikurangi, maka permukaan kontak dengan sel akan meningkat, tingkat oksidasi, dan kerusakan DNA juga akan meningkat (Chithrani dan Chan, 2007).

Pengaruh ukuran nano partikel terhadap efek toksisitas tidak hanya berlaku pada nano*hydroxyapatite*, hal ini sesuai dengan Hussain dkk (2005) dalam Liu dkk (2010), menyatakan bahwa nanologam seperti Fe_3O_4, Al, MnO_2, MoO_3 dan W, SNPs (silver nanoparticles) yang memiliki ukuran nanopartikel sebesar 15 nm dan 100 nm dapat memberikan efek toksik yang lebih signifikan terhadap sel hati tikus BRL 3A. Hasil nanopartikel seperti TiO2 dan nanopartikel emas yang memiliki ukuran nanopartikel yang lebih kecil, dapat mempengaruhi aktivitas biologis yang tinggi sehingga menyebabkan meningkatnya efek toksisitas (Chithrani dan Chan 2007, Pan et al. 2007, Wang et al. 2007, Nan et al. 2008 dalam Liu dkk, 2010).

Berdasarkan hasil uji korelasi *Pearson* pada penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara

penambahan konsentrasi MgO dan viabilitas sel hidup (toksisitas membran) pada membran nHA/MgO, dimana semakin tinggi konsentrasi MgO maka toksisitas membran akan meningkat atau viabilitas sel hidup menurun. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Hickey (2015) bahwa penambahan MgO dalam konsentrasi tinggi akan memengaruhi kepadatan sel fibroblas, karena akan menimbulkan kenaikan pH yang signifikan dan akan melepaskan ion hidroksida pada lingkungan cair, sehingga kepadatan sel fibroblas akan menurun. Namun, setelah hari ketiga dan kelima kepadatan sel fibroblas akan kembali normal setelah terjadi penurunan pada saat awal pemberian MgO yang berkonsentrasi tinggi. Bernard, (2005) menunjukkan bahwa jumlah MgO yang dapat ditambahkan yaitu sebesar 1%, karena pada konsentrasi ini telah menunjukkan biokompatibilitas yang baik tanpa menimbulkan efek toksisitas. Menurut Swain, (2016) penambahan magnesium oxide dalam HA dengan konsentrasi rendah sebesar 0.5% sampai 1.5%, dapat berperan dalam metabolisme tulang selama tahap penyembuhan tulang dan penambahan MgO dapat memengaruhi sifat mekanik saat ditambahkan pada membran *hydroxyapatite* maupun nano*hydroxyapatite*.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa tidak terdapat perbedaan toksisitas antara membran komposit HA/MgO dan membran komposit nHA/MgO, sehingga hipotesis dalam penelitian ini ditolak.

BAB 6
PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, analisa data, dan pembahasan mengenai perbedaan toksisitas antara membran komposit nHA/MgO dengan membran komposit HA/MgO pada kultur sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF), maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Tidak terdapat perbedaan toksisitas antara membran nHA/MgO dan HA/MgO.
2. Membran nHA/MgO 0.5% menunjukkan viabilitas sel hidup paling tinggi sebesar 92.68% dan membran HA/MgO 0.5% menunjukkan viabilitas sel hidup sebesar 82.71%, hasil tersebut menunjukan bahwa kedua membran pada konsentrasi 0.5% memiliki sifat toksisitas yang rendah.
3. Hubungan penambahan konsentrasi MgO terhadap toksisitas membran nHA/MgO dan HA/MgO adalah negatif, yaitu terjadi peningkatan toksisitas membran (viabilitas sel hidup menurun) seiring dengan penambahan konsentrasi MgO.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas membran nHA/MgO dan HA/MgO dengan menambahkan MgO pada konsentrasi >0.5 % dan <1.5% sebagai kandidat biomaterial pengganti tulang.

2. Perlu dilakukan pengamatan pada uji MTT *Assay* setelah hari ke tiga dan ke lima untuk melihat kepadatan sel *Human Gingival Fibroblast* (HGF) setelah diberikan MgO berkonsentrasi tinggi.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk uji toksisitas membran dengan ukuran partikel nano*hydroxyapatite* diantara 15 – 270 nm yang akan berguna untuk melihat keamanan dalam aplikasi terhadap bahan biomaterial pengganti tulang.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme penyebab kematian sel pada MgO dengan pemberian konsentrasi tinggi.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR PUSTAKA

Adam, Mardiana A., Asti Meizarini. 2010. Sitotoksisitas Pemutih Gigi Berdasarkan Konsentrasi Bahan. *Dentofasial*, 9(2): 116-122.

Ajdary, Marziyeh., Mohammad A.M., Marveh R., dkk. 2018. Health concerns of various nanoparticles: A review of their in vitro and in vivo toxicity. *Nanomaterials*, 1-28.

Ardhiyanto H B. 2011. Peran Hidroksiapatit sebagai Bone Graft dalam Proses Penyembuhan Tulang. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Jember* 8(2): 118-121.

Aueran, Himanshu., Varun Kumar., Shashank Uniyal., Pooja Tanwer. 2015. Nanodentistry: Is just a Fiction or Future. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 5(3):207-211

Bernard, Sheldon Ainsworth. 2005. Influence of Silicon Dioxide, Magnesium Oxide and Zinc Oxide on Resorbable Tricalcium Phosphate Based Bioceramics. *Thesis*. Washington State University. Washington.

Cancer Chemoprevention Research Center. Fakultas Farmasi UGM. (http://ccrc.farmasi.ugm.ac.id/wp-content/uploads/10_sop-uji-sitotoksik-metode-mtt.pdf) diakses pada 19 September 2018.

Carranza F. A., Henry H. T., Michael G. N., Perry R.K., 2015. Clinical Periodontology. In: 12th ed. Canada: Elsevier : W. B. Saunders Co, pp. 88-89

Cahyani, Yuniar Dwi. 2017. Uji Toksisitas ekstrak Daun Mangrove Api-api (*avicennia marina*) Terhadap Kultur Sel Fibroblas

Gingiva Manusia Sebagai Obat Kumur. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Unair. Surabaya.

Chithrani, B.D., Chan,W.C. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. Nano Lett. 2007, 7, 1542–1550.

Darwis D. dan Warastuti Y. 2008. Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit (HA) sebagai Graft Tulang Sintetik. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi* 4(2): 143-153.

Demirkol, Nermin., Meydanoglu, Onur., Gokce, Hwan *et al*. 2012. *Comparison of Mechanical Properties of Sheep Hydroxyapatite (SHA) and Commercial Synthetic Hydroxyapatit (CHSA)-MgO Composite*. Switzerland: Trans-Tech Publication.

Erizal, Abbas B., Warastuti Y., dan Darmawan. 2013. Sintesis dan Karakterisasi Membran Komposit Kitosan-Hidroksi Apatit Berikatan Silang Sebagai Guided Tissue Regeneration (GTR). *Majalah Metalurgi*: 55-64.

Farzadi, Arghavan., Farhad Bakhshi., Mehran S.H., Mitra Asadi.E., Noor Azuan A.O. 2014. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. *Ceramics International :* 6021-6029.

Harahap SA. dan Sastrodihardjo S. 2014. Teknologi Nano di Bidang Kedokteran Gigi. *Dentika Dental Journal* 18(2): 194-198.

Hartono, Cindy Karina. 2014. Sitotoksisitas Material Restorasi Alternatif Kitosan-Hidroksiapatit Terhadap Sel BHK-21 Menggunakan Esei MTT. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Airlangga.

Hickey, Daniel J., Ercan B, Sun L, Webster. 2014. *Adding MgO nanoparticles to hydroxyapatite-PLLA nanocomposites for improved bone tissue engineering application*. Amerika: Elsevier.

Hickey, Daniel J., Thomas J. Webster. 2015. *MgO Nanomaterials Improve Fibroblast Adhesion and Proliferation*. Materials Research Society.

Istifarah. 2012. Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit dari Tulang Sotong (*Sepia sp.*)- Kitosan untuk Kandidat Aplikasi *Bone Filler*. *Skripsi*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Surabaya.

Junqueira LC, Carneiro J. 2007. *Histologi Dasar*. Edisi 10. Jakarta:EGC

Kurniasari, Fadhillah. 2007. Toksisitas Serbuk Hidroksiapatit Hasil Sintesis Limbah *Dental Gypsum* Tipe II Dengan *Sintering* Pada *Mesenchymal Stem Cells* (Mscs) Tikus. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jember.

Kattimani, Vivekanand Sabanna., Sudheer Kondaka., Krishna Prasad L. 2016. Hydroxyapatite – Past, present, and Future in Bone Regeneration. *Libertas Academica*. 7:9-19

Liu, Wei., Yuan Wu., Chang Wang., dkk. 2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology*. 4(3):319-330

Marthanti, Ria. 2007. Uji Sitotoksitas Aloe Vera Gel 100% Metode Freeze Drying Terhadap Sel *Fibroblastt* Ditinjau Dari Waktu Inkubasi. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Surabaya.

Martins, O., Figueiredo, M. H., Viegas, C., Dias, I., Azevedo, J., Vieira, T., Baptista, I. P.. Guerra, F. 2011. Qualitative Evaluation of The Histological Bone Response to an Optimize Hydroxyapatite, *Journal De Paradontologie & d'implantologie Orale*, 30(2) :1-10.

Maryani, Intan., Yayun Siti R., Anang Dwi P. 2018. Analisa Gel Kombinasi *Platelet Rich Plasma* dan *Chitosan* Terhadap Peningkatan Jumlah Osteoblas Sebagai *Bone Regeneration*

Pada Luka Pasca Ekstraksi Gigi Tikus Wistar. ODONTO Dental Journal. 8 (2): 89-96

Na, Li., Gang WU., Hua YAO., Ruikang TANG., Xinhua GU., Chengwei TU. 2019. Size effect of Nano Hydroxyapatite on proliferation of odontoblast like MDPC-23 cells. *Dental Materials Journal*, pp: 1-6

Nur, Adrian., Arief Jumari., Heru Setyawan. 2012. Sintesis dan Karakterisasi *Monetite* Ukuran Nano Secara Elektrokimia. *Prosiding SNAST Periode III*, Hal. 226-232.

Pascawinata, A., Prihartiningsih., Bambang Dwirahardjo. 2013. Perbandingan Proses Penyembuhan Tulang pada Implantasi *Hydroxyapatite* Nanokristalin dengan *Hydroxyapatite* Mikrokristalin (Kajian pada Tulang Tibia Kelinci). *Bagian Ilmu Bedah Mulut, FKG UGM*, 4(4): 237

Prabaningtyas RAJMS. 2015. Karakterisasi Hidroksiapatit dari Kalsit (PT. Dwi Selo Giri Mas Sidoarjo) sebagai Bone Graft Sintesis Menggunakan X-Ray Diffractometer (XRD) dan Fourier Transform Infra Red (FTIR). *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jember.

Pepla E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G. 2014. Nano-hydroxyapatite and its application in preventive and regenerative dentistry. *Journal of Medicine National Institutes of Health* 20;5(3):108-14.

Ramadhani, Tiaranita., Rina Parwati Sari., Widyastuti. 2016. Efektivitas Kombinasi Pemberian Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella longiceps*) dan Aplikasi Hidroksiapatit terhadap Ekspresi FGF-2 pada Proses *Bone Healing*. *Denta Jurnal Kedokteran Gigi*. Vol. 10. No.1. Halaman 20-30.

Riset Kesehatan Dasar. 2008. (https://www.k4health.org/sites/default/files/laporanNasional%20Riskesdas%202007.pdf) Diakses April 2018

ScienceLab. 2016. *Material Safety Data Sheet Magnesium Oxide MSDS*.

Selvia, N., K. Dahlan., S.U. Dewi. 2012. Sintesis dan Karakterisasi β-Tricalsium Phosphate Berbasis Cangkang Kerang Ranga pada Variasi Suhu Sintering. *Jurnal Biofisika*, 8 (1): 42-53

Septania, Dhystika Zahrah. 2018. Uji Sitotoksisitas Kopi Robusta Dekafeinasi pada Kultur Fibroblas Gingiva Manusia. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. Jember.

Sharma G., Soni R., dan Jasuja ND. 2017. Phytoassisted Synthesis of Magnesium Oxide Nanoparticles with Swertia chirayaita. *Journal of Taibah University for Science* 11: 471-477.

Sumbayak Erma M. 2016. Fibroblas: Struktur dan Peranannya dalam Penyembuhan Luka. Histologi FK Ukrida

Suryadi. 2011. Sintesis dan Karakterisasi Biomaterial Hidroksiapatit dengan Proses Pengendapan Kimia Basah. *Tesis.* Program Studi Teknik Metalurgi dan Material Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok.

Swain, Subhasmita., Tapash Ranjan R., Ramaswamy N. 2016. Sr, Mg, and Co Substituted Hydroxyapatite Coating on TiO_2 Nanotubes Formed by Electrochemical Methods. *American Scientific Publisher*, 22 (2): 482-487(6)

Warastuti, Yessy., Emil Budianto., Darmawan. 2015. Sintesis dan Karakterisasi Membran Komposit Hidroksiapatit Tulang Sapi-Khitosan-Poli (Vinil Alkohol) Untuk Aplikasi Biomaterial. *Jurnal Sains Materi Indonesia*. Vol. 16. No.2. Halaman 83-90.

Widyawati, Ekiyantini., Didin Erma Indahyani. 2016. Approaches Of Nanotecnology In Restorative Dentistry. *Proccedings FORKINAS VI FKG UNEJ* 14^{th}*-*15^{th}, 426-434.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA