

Peningkatan Biokompatibilitas Komposit Hidroksiapatit Nanopartikel – Poly Vinyl Alkohol Dengan Penambahan ***Poly Lactic-Co-Glycolic Acid*** Untuk Regenerasi Tulang: Studi *In Vitro*

Feni Istikharoh^{1*}, Hidayat Sujuti², Edi Mustamsir³, Lalita El Milla¹

¹ Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Brawijaya, Indonesia

² Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Indonesia

³ Departemen Ortopaedi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Indonesia

*Penulis Korespondensi: Feni Istikharoh, email: feni.istikharoh@ub.ac.id

ABSTRAK

Pendahuluan Kerusakan tulang alveolar sering terjadi paska pencabutan gigi, odontektomi, dan enukleasi. Kerusakan tulang dapat berdampak pada proses mastikasi, estetik dan periodontitis. Umumnya, rekonstruksi tulang alveolar menggunakan bone graft. Bone graft konvensional memiliki kekurangan antara lain biaya yang relatif mahal, waktu penanganan yang Panjang, dan resiko reaksi penolakan oleh tubuh. Hidroksiapatit nanopartikel (HANP) merupakan salah satu biomaterial yang memiliki ukuran kurang dari 100 nm. Poli-vinyl alcohol (PVA) merupakan polimer hidrofilik yang memiliki fleksibilitas yang tinggi. Komposit HANP-PVA dapat meningkatkan stabilitas dimensi sebagai bone graft sintetik. *Poly lactic-co-glycolic acid* (PLGA) merupakan polimer generasi baru yang banyak digunakan sebagai *drug carrier* dalam biomedik. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui biokompatibilitas komposit HANP-PVA yang dikombinasi dengan PLGA pada sel MC3T3-E1. **Metode** Preparasi komposit HANP-PVA dan komposit HANP-PLGA-PVA dengan 20% HANP (w/w); 20% PLGA (w/w) menggunakan freeze drying -20°C. Sel *line* MC3T3-E1 dikultur dan dibagi 2 kelompok: kelompok HANP-PVA (K1) dan kelompok HANP-PLGA-PVA (K2) diinkubasi selama 3 hari. Masing-masing kelompok diberi perlakuan 18,8 uL MTT reagent dan dinkubasi selama 4 jam, selanjutnya diukur absorbansinya pada *plate reader* OD 570 nm. Pengujian dilaksanakan sebanyak 4 kali. Hasil absorbansi di rata-rata dan dikonversi menjadi persentase jumlah sel. Analisa statistik menggunakan uji homogenitas dan independent T-test ($p < 0.05$) **Hasil** Pada hari ketiga, hasil MTT assay K1 adalah 992.4% sel, sedangkan K2 adalah 1111.17% sel ($p < 0.05$) **Kesimpulan** Penambahan PLGA dapat meningkatkan biokompatibilitas komposit HANP-PVA pada kultur sel MC3T3-E1

Kata kunci: Hidroksiapatit Nanopartikel, PLGA, PVA, regenerasi tulang

PENDAHULUAN

Kerusakan tulang alveolar memiliki angka kejadian yang tinggi, lebih dari empat juta operasi setiap tahunnya di dunia ^{1,2}. Kerusakan tulang alveolar sering terjadi paska pencabutan gigi, odontektomi, dan enukleasi ³. Kerusakan tulang alveolar dapat berdampak pada proses mastikasi, estetik dan periodontitis ⁴. Tulang alveolar akan mengalami atrophi secara horizontal dan vertical, sehingga menghasilkan alveolar ridge yang tajam dan pendek ⁴. Menurut Ulm et al, tulang alveolar mengalami kerusakan paska ekstraksi secara horizontal dengan prevalensi 29% - 63%, dan secara vertical sebanyak 11% - 22% ⁵. Umumnya, rekonstruksi tulang alveolar menggunakan perawatan tradisional, termasuk autograft, allograft, dan xenograft ^{6,7}. Bone graft konvensional memiliki kekurangan antara lain biaya yang relatif mahal, waktu penanganan yang panjang, dan resiko reaksi penolakan oleh tubuh ⁸. Oleh karenanya, perlu dikembangkan bonegraft sintesis yang biokompatibel dan memiliki

struktur sama dengan tulang, salah satunya adalah hidroksiapatit nanopartikel ².

Hidroksiapatit nanopartikel (HANP) merupakan salah satu biomaterial yang memiliki ukuran kurang dari 100 nm. HANP memiliki sifat biodegradabilitas yang lebih cepat, perlekatan sel yang lebih baik, dapat meningkatkan proliferasi sel osteoblast dibandingkan dengan hidroksiapatit yang berukuran mikro ^{1,2,9-11}. HANP juga dapat dimodifikasi agar dapat menyerupai dengan ukuran pori tulang sebenarnya ⁹. Poli-vinyl alcohol (PVA) merupakan polimer hidrofilik yang memiliki fleksibilitas dan stabilitas yang tinggi ^{12,13}. Komposit HANP-PVA dapat meningkatkan stabilitas dimensi sebagai bone graft sintetik, akan tetapi komposit HANP-PVA memiliki ukuran pori yang sangat kecil ¹⁴. *Poly lactic-co-glycolic acid* (PLGA) merupakan polimer generasi baru yang banyak dalam bidang biomedik, antara lain *drug delivery*, benang

jahit, dan scaffold¹⁵. Akan tetapi, PLGA memiliki sifat osteokonduktif yang kurang baik, sehingga perlu dikombinasikan dengan material lain^{1,10,16}. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui biokompatibilitas komposit HANP-PVA yang dikombinasi dengan PLGA pada sel MC3T3-E1

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian laboratoris eksperimental yang dilaksanakan secara *in vitro* dengan menggunakan *cell line* MC3T3-E1. Material yang digunakan antara lain: HANP 60 nm (BATAN, Indonesia); PLGA 50:50 Mw 15.000-25.000 Da (PolySciTech, USA); PVA Mw 73.000 Da (Merck, USA); *Phosphate-Buffer Saline* (Gibco, USA); *cell line* MC3T3-E1 *subclone* 4 (ATCC, USA); alpha MEM (No cat A1049001, Gibco, USA); Fetal Bovine Serum US Origin (Gibco, USA); Penicillin-Streptomycin 10.000 U/ml (Gibco, USA); Tripsin-EDTA 0.25% (Gibco, USA). Penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok, K1 (HANP/PVA) dan K2 (HANP/PLGA/PVA). Masing-masing komposit tersusun dari 20% HANP (w/w). Pada K2 kandungan PLGA yang diberikan juga 20% (w/w). Seluruh komposit disintesis dengan freeze drying pada -80°C selama 24 jam dan di sterilisasi menggunakan gamma radiasi 15 kGy

Menyiapkan media komplit yang terdiri dari 10% FBS, 1% penstrep dan alpha mem, selanjutnya diinkubasi 37°C CO₂ 5% selama 15 menit. *Cell line MC3T3-E1* dilakukan pencairan dalam water bath pada suhu 37°C selama 2 menit. Memasukkan *Cell line MC3T3-E1* pada media komplit dan disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 3 menit. Membuang supernatant, menambahkan media komplit, memasukkan ke dalam flask T25, dan menginkubasi pada 37°C CO₂ 5%. Mengganti media setiap 48 jam. Kultur sel sudah *confluent* 80% maka dilakukan *passage / plating*.

Menumbuhkan *cell line MC3T3-E1* pada well plate 96 sebanyak 5x10³ sel/mL setiap well, mengaplikasikan komposit yang telah dipotong sekitar 5 mg, dan menginkubasi selama 3x24 jam. Masing-masing kelompok dilakukan 4 replikasi. Menambahkan 10uL MTT reagent dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Menambahkan 100uL detergent reagent dan menginkubasi dalam gelap selama 24 jam pada suhu 18-25°C. Mengukur absorbansi pada well plate dengan menggunakan kolorimeter. Menganalisa hasil absorbansi (A) untuk menginterpretasi prosentasi sel dengan rumus:

$$\text{Persentase sel}(\%) = \frac{A \text{ Perlakuan} - A \text{ Komposit}}{A \text{ Kontrol} - A \text{ Media}} \times 100\%$$

Dimana A perlakuan adalah absorbansi kelompok perlakuan, A komposit adalah absorbansi komposit dan media tanpa sel, A kontrol adalah absorbansi sel

dan media, A media adalah absorbansi media tanpa sel. Selanjutnya dilakukan Analisa statistic untuk mengetahui normalitas, homogenitas, dan *independent t-test*.

HASIL

Hasil absorbansi pada penelitian ini tampak pada tabel 1. Pada Tabel 1 menunjukkan kelompok perlakuan K2 (HANP/PLGA/PVA) memiliki absorbansi lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Pada kelompok perlakuan K1 (PVA/HANP) menunjukkan absorbansi dengan rata-rata dan standar deviasi sebesar 3.57 ± 0.11. Pada kelompok K2 (HANP/PLGA/PVA) menunjukkan absorbansi dengan rata-rata dan standar deviasi sebesar 3.943 ± 0.12. Hasil absorbansi diinterpretasikan menjadi persentase sel, yang tampak pada Tabel 2. Pada Tabel 2 menunjukkan kelompok perlakuan K2 (1111.17%) memiliki persentase pertumbuhan sel yang meningkat dibandingkan kelompok K1 (992.4%). Hasil uji *independent t-test* diperoleh *p*<0.05 yang menunjukkan terdapat perbedaan presentase sel antar kelompok

DISKUSI

Pada penelitian ini menunjukan komposit HANP/PVA yang ditambahkan dengan PLGA memiliki biokompatibilitas yang lebih tinggi dibandingkan tanpa penambahan PLGA pada hari ke-3. Bone graft yang ideal mampu merangsang penyembuhan tulang dan memiliki sifat osteogenic, osteoinduktif, serta osteokonduktif⁹. PLGA merupakan ko-polimer sintetik yang merupakan gabungan asam laktat dan asam glikolat¹⁷. Sifat fisik PLGA dipengaruhi oleh beberapa factor, antara lain berat molekul monomer, rasio asam laktat dan asam glikolat¹⁷. Pada penelitian sebelumnya, menunjukkan komposit yang ditambahkan dengan PLGA dapat meningkatkan ukuran pori dan porositas pada komposit¹⁴. Peningkatan sifat fisik ini dapat meningkatkan pertumbuhan sel. Menurut Zhang, et al., PLGA memiliki sifat biokompatibilitas yang baik, sehingga sangat baik digunakan dalam biomedik¹⁸. Namun, PLGA ini juga memiliki sifat mekanik dan osteokonduktif yang rendah, sehingga perlu dikombinasikan dengan material lainnya¹⁶. Komposit pada regenerasi tulang sangat dibutuhkan agar dapat mengoptimalkan material yang ada. Pada penelitian ini pertumbuhan sel, juga dipengaruhi oleh adanya HANP pada komposit. Menurut Stankovic et al, HANP dapat memproduksi matriks ekstra seluler yang merupakan prekursor terbentuknya tulang baru dibandingkan hidroksiapatit yang berukuran mikro¹⁵. Ukuran partikel yang kecil dapat mengoptimalkan bone graft dengan meningkatkan pertumbuhan sel dan jaringan, menurunkan respon inflamasi, dan menurunkan infeksi bakteri¹⁶. Selain itu, HANP dapat meningkatkan 30% pertumbuhan osteoblast jika dibandingkan

Tabel 1. Hasil absorbansi pada hari ketiga

Sampel	Perlakuan		Komposit	Kontrol	Media
	PVA/HANP	HANP/PLGA/PVA			
1	3.575	4.1	0.458	0.499	0.178
2	3.44	3.901	0.456	0.468	0.164
3	3.523	3.771	0.453	0.434	0.131
4	3.742	4	0.43	0.497	0.167
Rata-rata ± SD	3.57 ± 0.11	3.943 ± 0.12	0.45 ± 0.01	0.47 ± 0.02	0.16 ± 0.01

Tabel 2. Hasil interpretasi persentase sel (*p<0.05)

Sampel	K1 (PVA/HANP)	K2 (HANP/PLGA/PVA)
1	971%	1135%
2	982%	1133%
3	1013%	1095%
4	1004%	1082%
Rata-Rata ± SD	992.4% ± 0.16*	1111.17% ± 0.23*

dengan HA yang berukuran mikro¹⁶. PVA merupakan salah satu polimer yang sering digunakan dalam kebutuhan biomedik, karena stabilitas mekanik dan biokompatibilitas yang baik¹³. PVA juga memiliki sifat hidrofilik, sehingga mudah larut dengan air²⁰. Akan tetapi, PVA memiliki ukuran pori biodegradabilitas yang rendah¹³. Menurut Istikharoh et al, komposit HANP/PVA memiliki ukuran pori yang lebih kecil dibandingkan dengan kelompok yang telah diberi PLGA¹⁴. Ukuran pori memiliki peran penting dalam perlekatan dan pertumbuhan sel²⁰.

KESIMPULAN

Komposit HANP/PVA yang ditambahkan PLGA dapat meningkatkan biokompatibilitas sel MC3T3-E1 pada hari ke-3

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Laboran LSIH UB, antara lain Helly Nurul Karima, S.Pt., MP; Choirunil Chotimah, S.Si., M.Si dan Yuslinda Annisa, S.Si., M.Si yang telah membantu penelitian kami. Penelitian ini merupakan pendanaan PNBPK FKG UB.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan pada penelitian ini

REFERENSI

1. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact Mater*. 2017 Dec 1;3(3):278-314. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.10.001. PMID: 29744467; PMCID: PMC5935790.
2. Mohammadi M, Mousavi Shaegh SA, Alibolandi M, Ebrahimzadeh MH, Tamayol A, Jaafari MR, et al. Micro and nanotechnologies for bone regeneration: Recent advances and emerging designs. *J Control Release*. 2018 Mar 28;274:35-55. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.01.032. Epub 2018 Feb 1. PMID: 29410062.
3. Perjuci F, Ademi-Abdyli R, Abdyli Y, Morina E, Gashi A, Agani Z, et al. Evaluation of Spontaneous Bone Healing After Enucleation of Large Residual Cyst in Maxilla without Graft Material Utilization: Case Report. *Acta Stomatol Croat*. 2018 Mar;52(1):53-60. doi: 10.15644/asc52/1/8. PMID: 30034005; PMCID: PMC6050746.
4. Hong CE, Lee JY, Choi J, Joo JY. Prediction of the alveolar bone level after the extraction of maxillary anterior teeth with severe periodontitis. *J Periodontal Implant Sci*. 2015 Dec;45(6):216-22. doi: 10.5051/jpis.2015.45.6.216. Epub 2015 Dec 28. PMID: 26734492; PMCID: PMC4698948.
5. Ulm C, Strbac GD, Stavropoulos A, Esfandeyari A, Dobsak T, Bertl K. Improved access to the bone marrow space by multiple perforations of the alveolar bundle bone after tooth extraction-A

- case report. Clin Exp Dent Res. 2022 Feb;8(1):3-8. doi: 10.1002/cre2.474. Epub 2021 Jul 23. PMID: 34296542; PMCID: PMC8874110
6. Kohli N, Ho S, Brown SJ, Sawadkar P, Sharma V, Snow M, et al. Bone remodelling in vitro: Where are we headed?: -A review on the current understanding of physiological bone remodelling and inflammation and the strategies for testing biomaterials in vitro. Bone. 2018 May;110:38-46. doi: 10.1016/j.bone.2018.01.015. Epub 2018 Feb 3. PMID: 29355746.
7. Kuttappan S, Anitha A, Minsha MG, Menon PM, Sivanarayanan TB, Vijayachandran LS, et al. BMP2 expressing genetically engineered mesenchymal stem cells on composite fibrous scaffolds for enhanced bone regeneration in segmental defects. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2018 Apr 1;85:239-248. doi: 10.1016/j.msec.2018.01.001. Epub 2018 Jan 10. PMID: 29407153.
8. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. Biomaterials. 2018 Oct;180:143-162. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.017. Epub 2018 Jul 11. PMID: 30036727; PMCID: PMC6710094.
9. Kubasiewicz-Ross P, Hadzik J, Seeliger J, Kozak K, Jurczyszyn K, Gerber H, et al. New nano-hydroxyapatite in bone defect regeneration: A histological study in rats. Ann Anat. 2017 Sep;213:83-90. doi: 10.1016/j.aanat.2017.05.010. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28655570.
10. Diaz-Gomez L, García-González CA, Wang J, Yang F, Aznar-Cervantes S, Cenis JL, et al. Biodegradable PCL/fibroin/hydroxyapatite porous scaffolds prepared by supercritical foaming for bone regeneration. Int J Pharm. 2017 Jul 15;527(1-2):115-125. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.038. Epub 2017 May 21. PMID: 28539234.
11. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. Bioact Mater. 2017 Jun 7;2(4):224-247. doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.05.007. PMID: 29744432; PMCID: PMC5935655.
12. Chaudhary C, Garg T. Scaffolds: A Novel Carrier and Potential Wound Healer. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 2015;32(4):277-321. doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2015011246. PMID: 26080925.
13. Ortega-Oller I, Padial-Molina M, Galindo-Moreno P, O'Valle F, Jódar-Reyes AB, Peula-García JM. Bone Regeneration from PLGA Micro-Nanoparticles. Biomed Res Int. 2015;2015:415289. doi: 10.1155/2015/415289. Epub 2015 Oct 5. PMID: 26509156; PMCID: PMC4609778.
14. Istikharoh F, Sujuti H, Mustamsir E, Swastirani A. Preparation and biodegradable properties of hydroxyapatite nanoparticle composite coated with poly lactic-co-glycolic acid/polyvinyl alcohol for bone regeneration. Dent Med Probl. 2020 Oct-Dec;57(4):363-367. doi: 10.17219/dmp/125775. PMID: 33448162.
15. Ana Stanković, Meltem Sezen, Marina Milenković, Sonja Kaišarević, Nebojša Andrić, Magdalena Stevanović, "PLGA/Nano-ZnO Composite Particles for Use in Biomedical Applications: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity", *Journal of Nanomaterials*, vol. 2016, Article ID 9425289, 10 pages, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9425289>
16. Laurencin, C. T. & Jiang, T., 2014. *Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering*. 2nd penyunt. West Conshohocken: ASTM International
17. Gentile P, Chiono V, Carmagnola I, Hatton PV. An overview of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. Int J Mol Sci. 2014 Feb 28;15(3):3640-59. doi: 10.3390/ijms15033640. PMID: 24590126; PMCID: PMC3975359.
18. Zhang Y, Li R, Wu W, Qing Y, Tang X, Ye W, et al. Adhesion and Proliferation of Osteoblast-Like Cells on Porous Polyetherimide Scaffolds. Biomed Res Int. 2018 Nov 27;2018:1491028. doi: 10.1155/2018/1491028. PMID: 30598988; PMCID: PMC6288576.
19. Chocholata P, Kulda V, Babuska V. Fabrication of Scaffolds for Bone-Tissue Regeneration. Materials (Basel). 2019 Feb 14;12(4):568. doi: 10.3390/ma12040568. PMID: 30769821; PMCID: PMC6416573.
20. Loh QL, Choong C. Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. Tissue Eng Part B Rev. 2013 Dec;19(6):485-502. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437. Epub 2013 Jun 25. PMID: 23672709; PMCID: PMC3826579.