

Uji Viabilitas Sel dan Biokompatibilitas Hidroksiapatit yang Disintesis dari Sisik Ikan

Sinta Candra Wardani^{1*}, Hidayat Sujuti², Edi Mustamsir³, Diwya Nugrahini Hapsari¹

¹Department of Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Brawijaya University, Malang, Indonesia

²Department of Biochemistry-Molecular Biology, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang, Indonesia

³Orthopaedic and Traumatology Department, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Indonesia

*Penulis Korespondensi: Sinta Candra Wardani, email: sinta.candra@ub.ac.id

ABSTRAK

Pendahuluan – Kebutuhan akan bone graft sebagai bahan regenerasi tulang menghasilkan berbagai inovasi sumber biomaterial untuk memproduksi xenograft. Beberapa bahan alami yang digunakan antara lain tulang hewan vertebrata, cangkang telur, cangkang tiram, karang, termasuk sisik ikan. Bahan-bahan tersebut disintesa menjadi hidroksiapatit yang memiliki sifat biokompatibel dan osteokonduktif. Selain itu, hidroksiapatit juga dianggap sebagai bahan ideal bone graft karena memiliki struktur komponen anorganik yang mirip dengan tulang dan gigi manusia. Metode – Pada penelitian ini hidroksiapatit yang disintesa dari sisik ikan diaplikasikan pada sel line preosteoblas MC3T3-E1 dengan variasi konsentrasi 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml. Setelah inkubasi selama 72 jam, dilakukan uji viabilitas dengan uji MTT. Selanjutnya dilakukan uji flowsitometri pada konsentrasi 50 µg/ml untuk melihat apoptosis sel dan menilai biokompatibilitas bahan. Hasil – Viabilitas sel terbaik setelah 72 jam ditunjukkan pada sel dengan konsentrasi hidroksiapatit 100 µg/ml tapi tidak menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok. Sedangkan hasil uji flowsitometer menunjukkan apoptosis sel dibawah 10%. Kesimpulan – Hidroksiapatit dari sisik ikan memiliki viabilitas sel dan biokompatibilitas yang baik sehingga berpotensi digunakan sebagai bahan regenerasi tulang.

Kata kunci: hidroksiapatit, sisik ikan, viabilitas, biokompatibilitas

PENDAHULUAN

Tulang merupakan jaringan unik yang dapat secara terus-menerus mengalami regenerasi. Salah satu bukti regenerasi tulang adalah proses penyembuhan patah tulang. Terdapat tiga elemen utama yang dibutuhkan dalam generasi tulang, antara lain; sel, faktor pertumbuhan dan bahan scaffold. Ada dua pilihan scaffolds untuk menyembuhkan defek tulang yaitu bone graft alami atau sintetik. Berdasarkan sumbernya, bone graft alami dapat diklasifikasikan menjadi autograft, allograft serta xenograft.¹ Autograft bebas dari resiko penularan penyakit dan penulakan autoimun namun penggunaannya terbatas karena morbiditas di tempat pengambilan tulang yang menyebabkan berbagai komplikasi termasuk infeksi, hematoma, patah tulang, cedera saraf dan pembuluh darah serta nyeri kronis. Allograft penggunaannya lebih luas karena bone graft yang dihasilkan jumlahnya lebih banyak. Namun integrasi bahan ini lebih lama dan tidak sebaik autograft. Sedangkan xenograft sumbernya tidak terbatas bila diproses dengan tepat agar aman bagi penerima.^{2,3} Selama ini, terdapat banyak penelitian untuk menggali potensi bahan sumber alami alternatif untuk scaffold sintetik menjadi biomaterial alloplast. Bahan yang digunakan antara lain tulang hewan vertebrata,

cangkang telur, cangkang tiram, karang, termasuk sisik ikan. Bahan seperti sisik ikan merupakan limbah yang dapat diolah menjadi bahan biokompatibel dan osteokonduktif seperti hidroksiapatit yang dapat digunakan untuk aplikasi regenerasi tulang.⁴ Proses mengubah limbah sisik ikan menjadi hidroksiapatit merupakan proses yang ramah lingkungan dan merupakan peluang yang baik untuk mengurangi biaya perawatan penyembuhan defek tulang dengan sedikit dampak terhadap lingkungan.⁵⁻⁷ Hidroksiapatit telah sering digunakan secara luas dalam regenerasi tulang. Secara alami, hidroksiapatit terdiri dari kalsium fosfat yang merupakan komponen anorganik terbanyak dalam tulang dan gigi manusia.⁸ Hidroksiapatit merupakan bahan osteokonduktif yang tidak menyebabkan reaksi inflamasi ketika diaplikasikan secara klinis. Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya banyak memanfaatkan karakteristik biokompatibel dari hidroksiapatit untuk meningkatkan diferensiasi atau mendorong proliferasi sel punca mesenkim dengan merangsang adhesi osteoblas sehingga dapat meningkatkan regenerasi tulang in vivo.^{1,9} Pada penelitian ini dilakukan pengujian pada hidroksiapatit yang disintesa dari sisik ikan. Tujuan penelitian ini adalah sebagai uji awal untuk

melihat biokompatibilitas bahan hidroksiapatit dari sisik ikan, kemudian menguji viabilitas sel yang diberi aplikasi bahan tersebut. Diharapkan viabilitas dan biokompatibilitasnya baik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai biomaterial untuk regenerasi tulang. **Metode**

Hidroksiapatit Sisik Ikan

Penelitian ini menggunakan hidroksiapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dari sisik ikan nila yang (BATAN, Indonesia). Hidroksiapatit tersebut berbentuk serbuk dengan ukuran nano kemudian ditimbang agar memperoleh variasi konsentrasi 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml dalam media kultur sel. Sebelum pengaplikasian pada kultur sel, hidroksiapatit disterilisasi dengan gamma.

Kultur Sel

Kultur sel yang digunakan adalah sel preosteoblas cell line MC3T3-E1 subklon 4 (ATCC). Sel dikultur dalam *complete growth medium* yang terdiri dari *Alpha Minimum Essential Medium* (Gibco), *fetal bovine serum* (Sigma) 10% dan antibiotik antimikotik (Gibco) 1%. Media kultur diganti setiap 2 hingga 3 hari serta diinkubasi dalam inkubator dengan tekanan atmosfer CO_2 5% pada suhu 37°C. Pada awal passage, sel ditanam dalam flask T-75. Passage dilakukan hingga mencapai konfluensi dan jumlah sel yang diharapkan. Sel dipanen dengan 0.25% (w/v) Trypsin 0.53 mM EDTA (Gibco).

Uji Viabilitas

Sel yang telah disubkultur dipanen dan dihitung dengan hemocytometer. Selanjutnya ditanam dalam 96-well plate pada densitas $0,5 \times 10^4$ sel per well lalu kembali diinkubasi. Setelah 3 hari, well dibagi dalam 4 kelompok yaitu 1 kelompok kontrol yang hanya diberi *complete growth medium*, serta 3 kelompok perlakuan yang ditambahkan hidroksiapatit sisik ikan dengan konsentrasi 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml. Kemudian well plate kembali diinkubasi selama 72 jam. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan uji MTT dan diukur viabilitas sel dengan rumus = $\text{OD perlakuan} / \text{OD kontrol} \times 100\%$.

Uji Biokompatibilitas

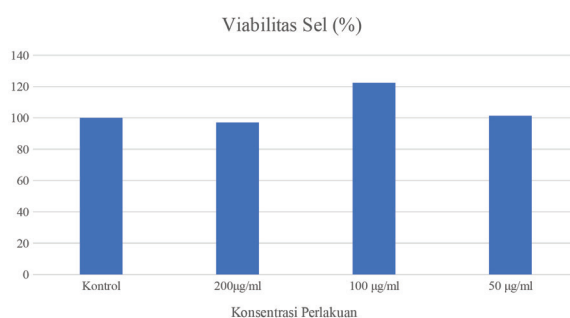
Sel subkultur dipanen dan ditanam pada 6-well plate dengan kepadatan 3×10^5 sel per well. Tiga hari kemudian, well dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol hanya dilakukan pergantian media tanpa penambahan hidroksiapatit, sedangkan kelompok perlakuan diberi hidroksiapatit pada konsentrasi 50 µg/ml. Keduanya kemudian diinkubasi selama 72 jam. Selanjutnya dilakukan staining Annexin V-PI (Biolegend) dan dianalisa menggunakan mesin flow cytometri untuk menunjukkan nilai apoptosis sel dalam bentuk prosentase.

HASIL

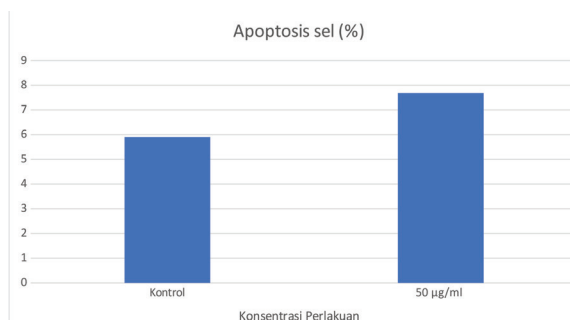
Hasil uji viabilitas sel preosteoblas setelah diaplikasikan hidroksiapatit sisik ikan ditunjukkan dalam grafik sebagai berikut.

Nilai viabilitas adalah dalam satuan persentase, Hasilnya menunjukkan variasi naik dan turun viabilitas sel pada ketiga konsentrasi dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan dengan nilai tertinggi pada konsentrasi 100 µg/ml. Akan tetapi, hasil uji statistik uji Anova menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok ($p > 0.05$).

Hasil uji biokompatibilitas sel dilihat dari nilai apoptosis sel pada konsentrasi 50 µg/ml dibandingkan dengan kontrol tanpa perlakuan, ditampilkan dalam grafik berikut.



Gambar 1. Grafik persentase viabilitas sel



Gambar 2. Grafik persentase apoptosis sel

Nilai apoptosis juga ditampilkan dalam bentuk persentase. Kelompok perlakuan menunjukkan nilai apoptosis yang lebih tinggi dibandingkan kontrol. Hasil uji statistik dengan t-test menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antar kelompok ($\text{sig} < 0.05$). Akan tetapi, hasil keduanya sama-sama menunjukkan nilai kurang dari 8%.

DISKUSI

Penelitian tentang hidroksiapatit berkembang pesat dalam beberapa tahun terakhir. Salah satu alternatif hidroksiapatit sintetis dan tulang sapi adalah dari tulang dan sisik ikan karena sifat kimiawinya serupa serta dapat diproses dengan metode yang sederhana dan murah. Selain itu, hidroksiapatit yang berbahan dasar ikan cenderung aman dan memiliki resiko penularan penyakit yang rendah. Indonesia sendiri kaya akan produk olahan ikan sehingga dengan pemanfaatan sisiknya akan dapat mengurangi limbah, mengurangi pencemaran lingkungan serta ancaman biologis bagi manusia. Telah banyak spesies ikan yang diteliti untuk mendapatkan hidroksiapatit seperti salmon, ikan mas, ikan teri Jepang, sarden, tilefish, tuna. Pada penelitian ini, hidroksiapatit diproses dari sisik ikan nila (*Nile tilapia*).^{5,10,11} Hidroksiapatit (HAp) adalah bentuk mineral alami dari kalsium apatit dengan rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Secara alami, hidroksiapatit menyusun sekitar 50% dari berat tulang. Hal ini menyebabkan hidroksiapatit memiliki sifat osteokonduktif dan osteointegrasi yang sangat baik. Makroporositas (pori dengan diameter > 100 μm) dan interkoneksi pori dari HAp sintetis memungkinkan adhesi, proliferasi, dan diferensiasi sel osteoprogenitor, serta revaskularisasi, dan selanjutnya pertumbuhan tulang baru, ketika ditanamkan in vivo.⁸ Pada penelitian ini dilakukan uji in vitro viabilitas dan biokompatibilitas hidroksiapatit dari sisik ikan pada sel preosteoblas MC3T3-E1 yang telah sering dipergunakan untuk mengevaluasi efek suatu biomaterial.^{12,13} Uji viabilitas sel dilakukan dengan uji MTT. Reagen MTT dapat melewati membran sel serta membran dalam mitokondria sel. Sifat kromogenik dari reaksi kimia ini memberikan pengukuran berbasis kolorimetri dari produksi formazan intraseluler. Telah banyak penelitian sebelumnya yang menggunakan uji MTT ini. Ghasemi et al dan Panda et al juga menyatakan bahwa aktivitas metabolisme sel dilihat dari nilai densitas optik (optical density/OD). Oleh karena itu viabilitas sel diuji dengan menggunakan rumus yang membandingkan nilai OD kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol.^{14,15} Hasil uji viabilitas pada penelitian ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan antara sel yang diberi perlakuan hidroksiapatit dibandingkan dengan sel kontrol tanpa perlakuan setelah diinkubasi selama 72 jam, meskipun konsentrasinya bervariasi. Hal ini menunjukkan bahwa hidroksiapatit sisik ikan tidak toksik dengan nilai rata-rata sel viabel di atas 90%.¹⁶ Hasil penelitian ini juga sesuai dengan penelitian Szymonowicz, et al yang menunjukkan adanya peningkatan viabilitas sel atau menunjukkan proliferasi sel dibandingkan dengan kontrol yang terlihat dari warna kristal formazan yang terbentuk.¹⁷

Uji biokompatibilitas bahan dilihat dengan flowsitometri melalui nilai apoptosis sel. Hasilnya menunjukkan bahwa sel dengan penambahan hidroksiapatit memiliki

nilai apoptosis yang lebih tinggi dibandingkan sel kontrol dengan nilai apoptosisnya di bawah 8%. Hasil penelitian Postnikof et al juga menunjukkan bahwa adanya apoptosis merupakan bentuk kematian sel yang terprogram dan berfungsi antara lain sebagai mekanisme pertahanan dalam membuang sel yang rusak. Apoptosis adalah jalur kematian sel yang sangat teratur dan terprogram, yang sebagian dimediasi oleh aksi caspases.¹⁶ Aplikasi hidroksiapatit dapat menyebabkan kerusakan membran sel dan peningkatan permeabilitas membran. Penyerapan kristal kalsium fosfat dapat menginduksi peningkatan Ca intraseluler, mempromosikan produksi ROS melalui aktivasi oksidase NADPH dan menghasilkan apoptosis sel. Penelitian Liu, et al tahun 2021 menyebutkan bahwa kristal nano hidroksiapatit dapat menginduksi produksi ROS dan kemudian mengaktifkan jalur pensinyalan JNK, yang menginduksi tidak hanya diferensiasi osteogenik, namun juga dapat menginduksi apoptosis sel. Proses ini memainkan peran penting dalam perkembangan kalsifikasi vaskular.¹⁸

KESIMPULAN

Evaluasi biokompatibilitas nanopartikel merupakan kriteria penting untuk menentukan kegunaannya untuk keperluan biomedis dan lingkungan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hidroksiapatit dari sisik ikan bersifat biokompatibel dan non toksik sehingga dapat dikembangkan menjadi bahan regenerasi tulang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada FKG Universitas Brawijaya, Laboratorium LSIH Universitas Brawijaya dan PAIR Batan.

REFERENSI

1. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res*. 2019;23(4).
2. Battafarano G, Rossi M, de Martino V, Marampon F, Borro L, Secinaro A, et al. Strategies for bone regeneration: From graft to tissue engineering. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22:1–22.
3. Kattimani VS, Kondaka S, Lingamaneni KP. Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone Tissue Regen Insights*. 2016; 7:9–19.
4. Ayyanar CB, Marimuthu K, Gayathri B, Sankarajan. Characterization and in vitro cytotoxicity evaluation of fish scale and seashell derived nano-hydroxyapatite high-density

- polyethylene composite. *Polymers and Polymer Composites*. 2021; 29(9):1534–42.
5. Granito RN, Renno ACM, Yamamura H, de Almeida MC, Ruiz PLM, Ribeiro DA. Hydroxyapatite from fish for bone tissue engineering: A promising approach. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 2018; 7:80–90.
 6. Mondal B, Mondal S, Mondal A, Mandal N. Fish scale derived hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Mater Charact*. 2016; 121:112–24.
 7. Soulissa A, Nathania I. The efficacy of fish scales as bone graft alternative materials. *Scientific Dental Journal*. 2018; 2(1):9.
 8. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. 2017; 2:224–47.
 9. Kobayashi M, Nihonmatsu S, Okawara T, Onuki H, Sakagami H, Nakajima H, et al. Adhesion and proliferation of osteoblastic cells on hydroxyapatite-dispersed ti-based composite plate. 2019; 33(4):1067–79.
 10. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci*. 2013; 5 Suppl 1.
 11. Cahyanto A, Kosasih E, Aripin D, Hasratiningsih Z. Fabrication of hydroxyapatite from fish bones waste using reflux method. *IOP Publishing IOP Conf Series: Materials Science and Engineering*. 2017; 172(1).
 12. Izumiya M, Haniu M, Ueda K, Ishida H, Ma C, Ideta H, et al. Evaluation of mc3t3-e1 cell osteogenesis in different cell culture media. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(14).
 13. Wardani SC, Sujuti H, Mustamsir E, Hapsari DN. Proliferation and viability of preosteoblast cells treated with Katsuwonus pelamis bone hydroxyapatite. In: *AIP Conference Proceedings*. American Institute of Physics Inc.; 2022: 1665(012032).
 14. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I. The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(23).
 15. Panda PK, Kumari P, Patel P, Samal SK, Mishra S, Tambuwala MM, et al. Molecular nanoinformatics approach assessing the biocompatibility of biogenic silver nanoparticles with channelized intrinsic steatosis and apoptosis. *Green Chemistry*. 2022; 24(3):1190–210.
 16. Postnikoff CK, Pintwala R, Williams S, Wright AM, Hileeto D, Gorbet MB. Development of a curved, stratified, in vitro model to assess ocular biocompatibility. 2014; 9(5).
 17. Szymonowicz M, Korczynski M, Dobrzynski M, Zawisza K, Mikulewicz M, Karuga-Kuzniewska E, et al. Cytotoxicity evaluation of high-temperature annealed nanohydroxyapatite in contact with fibroblast cells. *Materials*. 2017; 10(6).
 18. Liu Q, Xiang P, Chen M, Luo Y, Zhao Y, Zhu J, et al. Nano-sized hydroxyapatite induces apoptosis and osteogenic differentiation of vascular smooth muscle cells via jnk/c-jun pathway. *Int J Nanomedicine*. 2021; 16:3633–48.