

## Effect of nanocrystalline hydroxyapatite implantation on the number of osteoblasts in bone healing post teeth extraction

Pengaruh implantasi hidroksiapatit nanokristalin terhadap jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi

<sup>1</sup>Firdaus, <sup>1</sup>Andreas Pascawinata, <sup>2</sup>Rifka Annisa

<sup>1</sup>Bagian Ilmu Bedah Mulut

<sup>2</sup>Mahasiswa Tahap Profesi

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Baiturrahmah

Padang, Indonesia

Correspondence author: Firdaus, e-mail: firdaus\_drg@yahoo.com

### ABSTRACT

**Background:** Extraction can cause alveolar bone resorption and slow bone healing. Post-extraction treatment is performed to help speed up the bone healing process. **Objective:** to determine the effect of nanocrystalline hydroxyapatite implantation on the number of osteoblasts in the post-extraction bone healing process. **Method:** By using laboratory experimental method and posttest only with control group design, the effect of treatment in the treatment group and the control group was measured using Wistar white male rats. **Results:** There was an effect of nanocrystalline hydroxyapatite implantation on the number of osteoblasts on bone healing after tooth extraction of the rats on days 14 and 28. The highest mean number of osteoblasts was found in the treatment group on day 28. **Discussion:** Administration of nanocrystalline hydroxyapatite increased the number of osteoblasts in bone healing after tooth extraction. **Conclusion:** Nanocrystalline hydroxyapatite implantation increases the formation of osteoblasts in bone healing after tooth extraction.

**Key words:** synthetic hydroxyapatite, osteoblasts, bone remodeling

### ABSTRAK

**Latar belakang:** Ekstraksi dapat menyebabkan resorpsi tulang alveolar dan memperlambat penyembuhan tulang. Perawatan pascaekstraksi dilakukan untuk membantu mempercepat proses penyembuhan tulang. **Tujuan:** mengetahui pengaruh implantasi hidroksiapatit nanokristalin terhadap jumlah osteoblas pada proses penyembuhan tulang pascaekstraksi. **Bahan:** Dengan metode eksperimen laboratorium dan rancangan *the post test only with control group*, diukur pengaruh perlakuan pada kelompok coba dan kelompok kontrol menggunakan tikus putih wistar jantan. **Hasil:** Ada pengaruh implantasi hidroksiapatit nanokristalin terhadap jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus putih wistar hari ke-14 dan ke-28. Rerata jumlah osteoblas terbanyak ditemukan pada kelompok perlakuan hari ke-28. **Pembahasan:** Pemberian hidroksiapatit nanokristalin meningkatkan jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus putih wistar. **Simpulan:** Implantasi hidroksiapatit nanokristalin meningkatkan pembentukan jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi.

**Key words:** hidroksiapatit sintetik, osteoblas, remodeling tulang

Received: 1 December 2020

Accepted: 1 January 2020

Published: 1 April 2021

### PENDAHULUAN

Ekstraksi gigi merupakan salah satu prosedur perawatan gigi yang sehari-hari dilakukan dalam bidang kedokteran gigi ketika gigi tidak dapat dirawat lagi.<sup>1</sup> Komplikasi pascaekstraksi dapat menyebabkan resorpsi tulang alveolar dan perlambatan penyembuhan tulang. Perawatan pascaekstraksi perlu dilakukan untuk membantu mempercepat proses penyembuhan tulang. Penyembuhan pascaekstraksi gigi merupakan proses yang kompleks dan berfokus untuk mengembalikan keutuhan struktur dan fungsi jaringan yang rusak. Proses penyembuhan tergambar oleh tiga fase yang berurut, yaitu inflamasi, proliferasi dan *remodeling*.<sup>2,3</sup>

Preservasi soket adalah prosedur yang dilakukan pascaekstraksi, yang bertujuan untuk meminimalkan resorpsi tulang alveolar. Prosedur ini diharapkan dapat meningkatkan proses *remodeling* tulang alveolar

terutama pascaekstraksi untuk mempersiapkan area bagi perawatan selanjutnya seperti pemasangan gigi tiruan. Salah satu cara preservasi soket adalah dengan menggunakan biomaterial *graft* tulang.<sup>4,5</sup>

*Bone graft* sering digunakan pada bidang kedokteran gigi untuk proses implantasi. Implantasi merupakan usaha peletakan suatu bahan untuk membantu proses penyembuhan, penguatan, dan perbaikan fungsi tulang. *Bone graft* yang saat ini banyak digunakan yaitu *natural bone* antara lain *autograft* dari pasien yang sama, *allograft* dari donor manusia lain, dan *xenograft* dari hewan. *Autograft* memiliki kelemahan yaitu harus dilakukan operasi untuk pengambilan tulang dari bagian tubuh lain pasien yang sama. Sedangkan *allograft* dan *xenograft* dapat menimbulkan reaksi autoimun serta kemungkinan terjadinya transfer penyakit. Akan tetapi pada saat ini biomaterial *bone graft* tergolong

sangat mahal karena masih diimpor. Biomaterial *bone graft* yang baru harus dikembangkan untuk mendapatkan bahan *graft* tulang yang berkualitas dan harga lebih ekonomis, salah satunya adalah hidroksiapatit nanokristalin.<sup>6,7</sup>

Hidroksiapatit (HA),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_{6}(\text{OH})_2$  merupakan salah satu senyawa inorganik penyusun jaringan keras tubuh manusia seperti tulang, gigi, dentin, dan sebagainya serta merupakan salah satu keramik yang biokompatibel. Hidroksiapatit adalah keramik bioaktif yang telah luas penggunaannya pada perbaikan tulang. Hidroksiapatit sintetik merupakan bahan seperti tulang yang memiliki sifat dapat berikatan dengan tulang secara baik, digunakan sebagai pengganti *bone graft* (*allograft* dan *xenograft*) karena memiliki sifat biokompatibilitas yang baik terhadap tulang dan gigi. Hidroksiapatit sintetik telah banyak digunakan sebagai implant biomedik dan regenerasi tulang karena memiliki sifat bioaktif.<sup>8</sup>

Salah satu contoh HA sintetik adalah hidroksiapatit nanokristalin (HAN) yang digunakan karena memiliki bentuk yang sama dengan HA alami pada tulang. Kelebihan HAN adalah dapat menyatu lebih rapat dengan jaringan di sekelilingnya.<sup>9</sup>

Tulang alveolar merupakan jaringan keras rongga mulut yang sangat dinamis, yang merupakan bagian dari maksila dan mandibula, yang membentuk dan mendukung soket gigi. Pascaekstraksi gigi, tulang alveolar mengalami resorpsi yang menyebabkan perubahan bentuk dan kurangnya tulang alveolar secara terus-menerus. Perubahan bentuk tulang alveolar dapat menyebabkan rahang mengecil, tipis, dan rapuh serta mengurangi keberhasilan tindakan perawatan dental yang lain.<sup>10</sup>

Tulang alveolar sama seperti tulang pada umumnya, mengandung osteoblas yang bertanggungjawab untuk pembentukan dan perkembangan tulang. Osteoblas merupakan sel tulang yang dapat berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi komponen sel utama dalam jaringan tulang.<sup>11</sup>

Penggunaan HA sintetik dalam pembentukan tulang alveolar bertujuan untuk menginduksi dan menstimulasi sel-sel punca dan osteoblas untuk berproliferasi dan diferensiasi membentuk tulang baru atau proses regenerasi tulang. Pemberian *bone graft* diharapkan mampu menjadi media bagi sel-sel punca dan osteoblas untuk melekat, hidup dan berkembang dengan baik di dalam defek tulang.<sup>12</sup> Untuk itu perlu diketahui pengaruh implantasi HAN terhadap jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi.

## METODE

Penelitian eksperimen laboratorium ini menggunakan desain penelitian *the posttest only with control*

group yakni diukur pengaruh perlakuan pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dengan populasi tikus putih wistar jenis kelamin jantan.

Sampel adalah tikus jantan berusia 8-16 minggu, berat badan 200-300 g, dan tidak mengalami kelainan anatomi. Tikus yang tidak mau makan selama masa perlakuan, sakit dan mati selama masa perlakuan tidak dimasukkan sebagai data.

### Ekstraksi gigi tikus

Awalnya gigi tikus dipotong sepanjang 1-2 mm sebanyak 2 kali selama 6 hari, lalu pada hari ke-9 dilakukan ekstraksi gigi tikus. Gigi insisivus rahang bawah dibersihkan dari sisa makanan dengan semprotan air menggunakan *syringe* kemudian dikeringkan, lalu daerah kerja injeksi diasepsis dengan alkohol 70%.

Seumur tikus diinjeksi ketamin secara intra peritoneal dengan dosis 1000 mg/10 mL, sebanyak 0,2 mL. Lalu jaringan ikat pada gigi insisivus rahang bawah dipisahkan perlekatan menggunakan *needle holder*. Selanjutnya, gigi diluksasikan ke arah labial, lingual dan rotasi dengan menggunakan *needle holder* hingga goyang kemudian dikeluarkan dari soket. Soket gigi dibersihkan menggunakan *saline*.

### Proses pemberian hidroksiapatit nanokristalin

Bahan HAN dari Laboratorium Kimia Bagian Material Universitas Andalas dimasukan ke dalam soket gigi, menggunakan amalgam pistol dan dipadatkan dengan *burnisher* dan *microbrush* agar soket terisi dengan adekuat. Setelah itu luka pencabutan dijahit dengan benang jahit mono *nylon* 4-0 dengan jarum *cutting* untuk menjahit, kemudian dioles larutan *betadine* sebagai antiseptik.

Hewan coba diberikan antibiotik gentamisin selama 3 hari dan analgesik novalgin selama satu hari dengan dosis masing-masing 0,3 mL.

### Pengambilan sampel

Tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis letal injeksi i.m, lalu kematian tikus dikonfirmasi dengan melihat respirasinya, dilanjutkan dekapsulasi jaringan dengan memotong rahang bawah tikus lokasi soket be-kas pencabutan.

Pembuatan sediaan histologi, jaringan difiksasi jaringan dengan menggunakan larutan *buffer formalin* 10% selama 24 jam. Selanjutnya jaringan didekalsifikasi jaringan atau proses pengeluaran larutan *buffer formalin* dengan menggunakan larutan asam formiat 10 % selama 7 hari.

Dehidrasi untuk mengeluarkan sisa larutan yang digunakan saat dekalsifikasi dimulai dengan alkohol 70% selama 15 menit, 80% selama 1 jam, 95% selama 2 jam, dan 100% selama 3 jam. Dilanjutkan *clearing*

atau penjernihan menggunakan *xylol* sebanyak 3 kali pada 3 tabung yang berbeda; 1 jam pada tabung pertama dan 2 jam pada tabung kedua dan ketiga.

*Embedding* dilakukan dengan penanaman jaringan ke dalam *paraffin* cair; setelah beku, blok *paraffin* disayat menggunakan mikrotom secara vertikal dengan ketebalan 4-6 mm. Sayatan diambil dengan kuas lalu letakkan di atas permukaan air *waterbath* dengan suhu tetap 56-58°C hingga sayatan mekar. Sayatan lalu diambil dengan *object glass* yang diolesi dengan *meyer egg albumin*, dikeringkan dengan suhu 30-35°C minimal selama 12 jam.

Preparat jaringan dicat dengan tahapan deparafinasi yaitu preparat dimasukkan ke dalam *xylol* selama 2-3 menit lalu diulangi dalam wadah yang berbeda selama 2-3 menit, selanjutnya rehidrasi dengan alkohol 100% dan 95% selama 3 menit. Preparat lalu dibilas dengan air mengalir selama 10-15 menit, diwarnai dengan *haematoxylin* selama 15 menit, dibilas ulang dengan air mengalir selama 20 menit dan preparat direndam *eosin* selama 15 detik sampai 2 menit.

Dehidrasi dengan alkohol konsentrasi 95% dan 100% masing-masing 2-3 menit sebanyak 2 kali dalam wadah yang berbeda. Setelah itu, preparat dimasukkan ke dalam *xylol* 3 kali, masing-masing 3 menit dengan wadah yang berbeda. *Mounting* menggunakan cairan entellan lalu ditutup dengan *deck glass*.

### Perhitungan jumlah sel osteoblas

Jumlah sel osteoblas dihitung pada hari ke-14 dan ke-28 setelah pewarnaan *haematoxylin eosin*. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop elektrik dengan pembesaran 400x. Setiap preparat secara sistematis dilihat dari 3 lapangan pandang, 1/3 apikal, 1/3 tengah, dan 1/3 servikal

### Analisis data

Hasil perhitungan sel osteoblas pada perlakuan dan kontrol dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 18.0 dengan tingkat signifikansi 0,05 dan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Uji *Shapiro Wilk* untuk menguji normalitas data dan uji *Levene* untuk menguji variasi populasi. Data berdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji *one way Anova* untuk mengetahui perbedaan antara variabel bebas dan terikat. Jika terdapat perbedaan yang bermakna, dilakukan uji *Least Significant Difference*. Jika data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, diuji non parametrik *Kruskall-Wallis*, dan dilanjutkan uji komparasi antar perlakuan dengan uji *Mann-Whitney*.

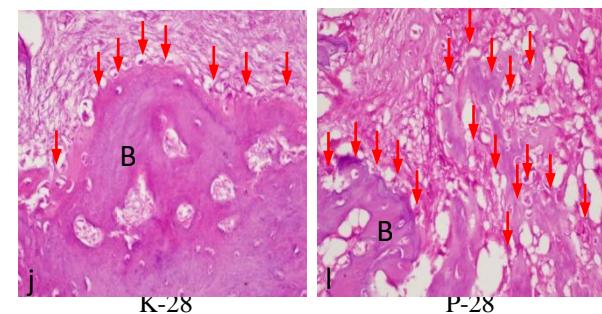
### HASIL

Data pengaruh implantasi HAN terhadap jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi

gigi tikus putih wistar (*rattus norvegicus*) pada kelompok kontrol dan perlakuan selama 14 hari dan 28 hari tampak pada tabel 1. Hal ini membuktikan bahwa pemberian HAN meningkatkan jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus wistar.

**Tabel 1** Rerata osteoblas

No	Variabel	Rerata
1	Kontrol H-14	18,3 Osteoblas
2	Kontrol H-28	21,4 Osteoblas
3	Perlakuan H-14	35,5 Osteoblas
4	Perlakuan H-28	43,6 Osteoblas



**Gambar 1** Perbandingan histopatologi osteoblas kelompok kontrol (j) dan perlakuan H-28 (l)

Pada gambar 1 tampak jumlah sel osteoblas yang lebih tinggi pada hewan coba dengan pemberian HAN dibanding dengan hewan kontrol pada hari yang sama.

Data diuji dengan uji *Shapiro-Wilk* karena data kurang dari 50 diperoleh hasil uji implantasi HAN terhadap pembentukan osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi pada semua kelompok ( $p \geq 0,05$ ) disimpulkan bahwa data terdistribusi normal.

**Tabel 2** Uji *Shapiro-Wilk*

Kelompok	Nilai Sig
Kontrol H-14	0,968
Kontrol H-28	0,877
Perlakuan H-14	0,199
Perlakuan H-28	0,731

**Tabel 3** Uji *Levene*

Variabel	Sig	Batas Sig
Jumlah osteoblas	0,071	0,05*

Tabel 3 uji homogenitas *Levene* diperoleh hasil yang signifikan karena nilai  $sig=0,071 > 0,05$ . Jadi disimpulkan kelompok kontrol dan perlakuan hari ke-14 dan hari ke-28 terbukti homogen. Selanjutnya dilakukan uji parametrik *one way anova* ( $P=0,05$ ).

Hasil uji parametrik *one way Anova* diperoleh nilai  $sig\ 0,000 < 0,05$ , artinya terdapat pengaruh implantasi HAN terhadap pembentukan jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus putih wistar hari ke-14 dan hari ke-28.

Berdasarkan uji *LSD* tampak bahwa pengaruh pada

**Tabel 4** Hasil uji one way Anova jumlah osteoblas

No	Variabel	Sig	Batas Sig	Keterangan
1	Jumlah Osteoblas	0,000	0,05	Ha diterima

**Tabel 5** Uji beda LSD

Variabel	Perlakuan	Perbandingan antar perlakuan	Sig	Batas sig
Osteoblas	Kontrol (-) H-14	Kontrol (-) H28	0,041	0,05*
		Perlakuan H14	0,000	0,05*
		Perlakuan H28	0,000	0,05*
	Kontrol (-) H-28	Perlakuan H14	0,000	0,05*
		Perlakuan H28	0,000	0,05*
	Perlakuan H-14	Perlakuan H28	0,000	0,05*

pengukuran jumlah osteoblas pada dua kelompok berbeda antara kelompok kontrol dan perlakuan hari ke-14 dan hari ke-28 dengan nilai kemaknaan lebih kecil dari 0,05.

## PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa terdapat pengaruh implantasi HAN terhadap jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus putih wistar hari ke-14 dan ke-28; terbanyak pada hari ke-28. Hal ini membuktikan bahwa pemberian HAN meningkatkan jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus putih wistar.

Uji LSD antara kelompok kontrol dan perlakuan hari ke-14 dan hari ke-28 keduanya berpengaruh signifikan sebab nilai *sig* < 0,05. Hal ini membuktikan bahwa implantasi HAN mempengaruhi jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus putih wistar.

Bahan HAN mengalami kontak yang lebih rapat dengan jaringan di sekelilingnya, sifatnya lebih cepat diresorpsi dibandingkan HA konvensional sehingga dapat digantikan tulang baru serta memiliki jumlah molekul yang tinggi pada permukaannya. Tujuan penggunaan HA sintetik dalam pembentukan tulang alveolar adalah menginduksi dan menstimulasi sel-sel punca dan osteoblas untuk berproliferasi dan differensiasi dalam pembentukan tulang baru atau proses regenerasi tulang. *Bone graft* ini mampu menjadi media bagi sel-sel punca dan osteoblas untuk melekat, hidup dan berkembang dengan baik di dalam defek tulang.<sup>12</sup>

Hasil penelitian Ardhiyanto tentang jumlah osteoblas pada proses penyembuhan tulang pascaimplantasi HA sintesis dari kalsit diperoleh hasil implantasi HA sintesis dari kalsit sebagai *bone graft* dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas pada proses penyembuhan tulang. Webster dkk. juga menunjukkan bahwa perlekatan osteoblas dan osteoklas lebih banyak terjadi pada HAN dibandingkan HA konvensional sehingga proses penyembuhan cedera tulang dapat terjadi lebih cepat pada HAN.<sup>12</sup>

Sel osteoblas sudah dapat terlihat pada hari ke-

14 yang merupakan akhir dari fase inflamasi dan awal fase reparatif. Sel-sel *mesenchymal pluripotent* yang berasal dari periosteum maupun dari sumsum tulang berdiferensiasi menjadi sel-sel fibroblas, kondroblas, dan osteoblast, hal ini dihasilkan dari interaksi antar sel yang akan menstimulasi *growth factor*, sitokin, dan reseptor. Osteoinduktif faktor (*growth factor*) seperti *bone morphogenetic protein* (BMP) dan *transforming growth factor-β* (TGF-β) pada HA sebagai bahan *graft* juga membantu menstimulasi formasi tulang baru sehingga tampak peningkatan jumlah osteoblas pada hari ke-28.<sup>13</sup>

Sel osteoblas akan menyebar ke permukaan matriks *bone graft* secara perlahan-lahan. Sekresi komponen adesif yang meliputi *extra cellular matrix* (ECM) dan kompatibilitas permukaan bahan *bone graft* menentukan proses penempelan sel osteoblas ke seluruh permukaan bahan *bone graft*. Proses ini, dimediasi oleh formasi fokus adesi dan pembentukan plak yang tersusun dari integrin transmembran yang menghubungkan *sitoskeleton* dengan ECM hasil sekresi antara bahan dengan sel. Fase adesi ini melibatkan protein ECM, protein membran sel dan protein *sitoskeleton* yang kemudian akan berinteraksi bersama untuk menginduksi sinyal transduksi dan mempromosikan faktor transkripsi serta mengatur ekspresi gen. Media yang cocok akan memudahkan sel-sel osteoprogenitor menempatinya dan analog dengan kondisi tulang yang sebenarnya untuk dapat berproliferasi dan berdiferensiasi untuk menstimulasi proses osteogenesis.<sup>14</sup>

Hasil penelitian bahwa jumlah osteoblas tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan hari ke-28, mendukung hipotesis bahwa terdapat pengaruh implantasi HAN terhadap jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus putih wistar. Selanjutnya, disarankan penelitian tentang pemberian HAN terhadap tulang dengan menggunakan metoda identifikasi yang lebih spesifik, seperti imunohistokimia.

Berdasarkan hasil penelitian, disimpulkan bahwa terdapat pengaruh implantasi HAN terhadap jumlah osteoblas pada penyembuhan tulang pascaekstraksi gigi tikus putih wistar. Selanjutnya, disarankan penelitian tentang pemberian HAN terhadap tulang dengan menggunakan metoda identifikasi yang lebih spesifik, seperti imunohistokimia.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Howe GL. Pencabutan gigi geligi the extraction of teeth, 2<sup>nd</sup> ed. Jakarta: ECG; 1999
2. Sihombing I, Wangko S, Kalangi SJR. Peran estrogen pada remodeling tulang. *Jurnal Biomedik* 2012; 4(3):18-28
3. Jamjoon A, Cohen R. Grafts for ridge preservation. *J Funct Biomater* 2015; 3(6):833-48 [online] <http://www.mdpi.com/2079-4983/63/833/>. Diakses tanggal 13 September 2019.
4. Nurhaeni CSW, Komara I. Socket preservation. *Padjajaran J Dent* 2015; 27(3):133-8
5. Machtei EE, Mayer Y, Horwitz. Prospective randomized controlled clinical trial to compare hard tissue changes following socket preservation using alloplasts, xenografts vs no grafting: clinical and histological findings. *Implant Dent Relat Res* 2018; 21:14-20
6. Darwis D, Warastuti Y. Sintesis dan karakterisasi komposit hidroksiapatit (ha) sebagai graft tulang sintetik. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotope dan Radiasi* 2008; 4(2)
7. Anisa DM, Aisah N, Gustiono D. Pembuatan graft tulang dengan proses ekstraksi senyawa hidroksiapatit dari tulang kor-tekst sapi. *Specta: Jurnal Fisika Dan Aplikasinya* 2018; 3(1)
8. Vidyahayati IL, Dewi AH, Ana ID. Pengaruh substitusi tulang dengan hidroksiapatit (Hap) terhadap proses remodeling tulang. *Medika Medika Muda* 2016; 1(3)
9. Pascawinata A, Prihartiningsih, Dwirahardjo B. Perbandingan proses penyembuhan tulang pada implantasi hidroksiapatit nanokristalin dengan hidroksiapatit mikrokristalin. *Jurnal Kedokteran Gigi* 2013; 4(4): 236-41
10. Hamzah Z, Kartikasari N. Pencabutan gigi yang irrasional mempercepat penurunan struktur anatomis dan fungsi tulang alveolar. *Stomatognatic* 2015; 12(2): 61-6
11. Mescher AL. Buku histologi dasar Junqueira. Edisi ke-12. Jakarta: ECG; 2011.p.118
12. Ardhiyanto HB. Peran hidroksiapatit sebagai bone graft dalam proses penyembuhan tulang. *Stomatognatic* 2011;8(2)
13. Miller MD, Hart JA, Thompson R. Review of orthopaedics. 6th ed. Virginia: Saunders; 2012.p.5-11
14. Abdurrahim T, Sopyan I. Recent progress on the development of porous bioactive calcium phosphate for biomedical applications. *Recent Patents on Biomedical Engineering* 2008.p.213-29