
EFEK PENAMBAHAN KITOSAN MOLEKUL TINGGI NANOPARTIKEL PADA SEMEN IONOMER KACA NANOPARTIKEL TERHADAP KEMAMPUAN BERTAHAN HIDUP SEL PULPA

(EFFECT OF HIGH MOLECULAR CHITOSAN NANOPARTICLE ADDITION
IN GIC NANOPARTICLE TO VIABILITY OF PULP CELLS)

Henny Sutrisman*, Trimurni Abidin*, Harry Agusnar**

*Departemen Ilmu Konservasi Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Sumatera Utara
Jl. Alumni No. 2 Kampus USU, Medan

**Departemen Ilmu Kimia
Fakultas Teknik Kimia, Universitas Sumatera Utara
Jl. Bioteknologi 1 Kampus USU, Medan

Abstract

Some studies suggested to use of RMGIC in atraumatic restorative technique (ART), aiming at a higher success rate of restorations. Nowadays, due to development of nano technology, it is available in nano particle form. Chitosan is one of the natural materials used to increase the bioactivity of the glass ionomer to stimulate cell proliferation. The aim of this study was to investigate horseshoe crab's chitosan nanoparticle roles in GIC nanoparticle to increase viability of pulp cells. Cultured mouse dental pulp cell lines were exposed to each of the restorative materials added with chitosan nanoparticle through a 4x3mm specimen for 72 hours to simulate the *in vitro* situation. Calcium hydroxide was used as a control and the cell viability was measured by the MTT assay. Data was analysed by one-way Anova followed by LSD test, and a statistical significance was determined at $p < 0.05$. The result showed that assessment of cellular viability indicated that the addition of chitosan can increase cells viability both in RMGIC and RMGIC nanoparticle ($p < 0.05$). In conclusion, the addition of 0,015 wt % of horseshoe crab's high molecular chitosan nanoparticle in glass ionomer nanoparticle can increase viability of pulp cells *in vitro*.

Key words: chitosan high molecule, glass ionomer cements, proliferation of cells

Abstrak

Beberapa penelitian menyarankan penggunaan SIKMR untuk teknik ART dengan tujuan untuk mencapai tingkat kesuksesan restorasi yang lebih tinggi. Pada saat ini dengan perkembangan teknologi nano, material ini juga tersedia dalam bentuk partikel nano yang disebut semen ionomer kaca modifikasi resin nanopartikel (SIKMRn). Penggunaan produk alam di dalam dunia kedokteran gigi juga meningkat, kitosan merupakan salah satu produk alam yang digunakan untuk meningkatkan bioaktivitas dari SIK. Penelitian menunjukkan kitosan dapat menstimulasi proses proliferasi sel. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek penambahankitosan molekul tinggi nanopartikel pada semen ionomer kaca nanopartikel untuk meningkatkan viabilitas sel pulpa. Bahan restorasi yang ditambahkan kitosan nanopartikel melalui spesimen berukuran 4x3 mm dipaparkan pada kultur *mouse dental pulp cell lines* selama 72 jam dengan keadaan *in vitro*. Kalsium hidroksida digunakan sebagai kontrol. Viabilitas sel dihitung dengan menggunakan *MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide) assay*. Data diuji dengan uji Anova dan diikuti uji LSD dengan nilai yang signifikan $p < 0,05$. Hasil penelitian menunjukkan penambahan kitosan dapat meningkatkan kemampuan bertahan hidup sel baik pada SIKMR dan SIKMRn ($p < 0,05$). Sebagai kesimpulan, adanya penambahan kitosan molekul tinggi nanopartikel dengan 0,015% berat pada semen ionomer kaca modifikasi resin nanopartikel dapat meningkatkan viabilitas sel pulpa secara *in vitro*.

Kata kunci: Kitosan molekul tinggi, semen ionomer kaca, proliferasi sel

PENDAHULUAN

Ilmu kedokteran gigi restoratif memiliki tujuan utama untuk mengembalikan dan mempertahankan kesehatan jaringan pulpa pada gigi berlubang melalui perawatan restoratif yang adekuat. Respons pulpa terhadap material restorasi dengan formulasi spesifik dapat memicu respons biologis yang menguntungkan.^{1,2} Di antara material kedokteran gigi yang dikembangkan akhir-akhir ini adalah semen ionomer kaca (SIK) yang diperkenalkan oleh Wilson dan Kent pada tahun 1972 serta digunakan sebagai bahan dalam perawatan *Atraumatic Restoration Technique* (ART). Semen ionomer kaca modifikasi resin (SIKMR) dan semen ionomer kaca nanopartikel (SIKMRn) digunakan sebagai alternatif untuk memperbaiki sifat-sifat fisis SIK seperti estetis, translusensi, dan kekuatan yang lebih baik.^{2,4}

SIK yang diaktivasi sinar menunjukkan biokompatibilitas buruk dan sitotoksitas lebih tinggi dibandingkan SIK konvensional. Hal ini disebabkan adanya unsur HEMA (*2-hydroxethyl methacrylate*) yang terlepas dan mampu berdifusi melalui tubulus dentin ke pulpa.⁵ Oleh karena itu, bahan ini menjadi pertimbangan untuk diaplikasikan pada kavitas yang dalam.

Penggunaan produk alam di bidang kedokteran gigi saat ini semakin berkembang pesat. Banyaknya limbah kulit udang dan blangkas di Sumatera Utara memungkinkan untuk dikembangkan bahan baru yaitu kitosan dan derivatnya di bidang kedokteran gigi.

Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat efek penambahan kitosan molekul tinggi nanopartikel pada varian semen ionomer kaca untuk meningkatkan sifat biologis material tersebut sehingga dapat digunakan dalam perawatan ART pada kavitas-kavitas yang luas dan dalam.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium jumlah sampel 30 sampel dan dibagi menjadi enam kelompok. Pembuatan specimen penelitian dilakukan di Laboratorium FMIPA Universitas Sumatera Utara sedangkan kultur sel dan perlakuan terhadap kultur sel dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Universitas Indonesia. Hasil pengamatan viabilitas sel diukur menggunakan metode *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT) assay. Variabel bebas penelitian ini adalah SIKMR, SIKMRn, Modifikasi SIKMR dan SIKMRn yang ditambahkan kitosan nano dari blangkas dengan 0,015%

berat. Variabel tergantungnya adalah viabilitas sel pulpa.

Kalsium hidroksida digunakan sebagai kelompok kontrol. Bahan ini biasa digunakan pada kaping pulpa langsung dan tidak langsung serta merupakan bahan acuan yang digunakan dalam uji biokompatibilitas karena kemampuannya dalam perbaikan pulpa yang terpapar.

Kitosan pasta dibuat dengan melarutkan 1 gram kitosan dalam 50 ml larutan asam lemah (asam asetat 1%) dan diaduk pada kecepatan 200 rpm. Larutan kitosan ditetesi dengan larutan amoniak dan diaduk kembali. Larutan yang telah membentuk pasta tersebut dimasukkan ke dalam *Ultrasonic bath* untuk memecahkan partikel kitosan menjadi nanopartikel. Selanjutnya disaring dan residunya dicuci dengan akuades untuk menghilangkan bau amoniak.

Spesimen dibuat dengan mengaduk pasta SIKMR, pasta SIKMRn, pasta SIKMR ditambahkan kitosan nano sebanyak 0,015% berat, pasta SIKMRn ditambahkan kitosan nano sebanyak 0,015% berat, serta pasta Ca(OH)₂. Pasta yang sudah diaduk dimasukkan ke dalam cetakan yang terbuat dari vinyl polisiloksan dan disinar.

Mouse dental pulp cell line (MDPC) diambil dari stok nitrogen cair di Laboratorium Biologi Oral FKG UI. Pipet transfer dan flask disterilkan dengan cara di sinar dengan sinar ultraviolet selama 15 menit. Kemudian medium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) komplit dimasukkan ke dalam flask 5 ml dan ditambahkan MDPC. Setelah itu dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37⁰ C dan 5% CO₂.

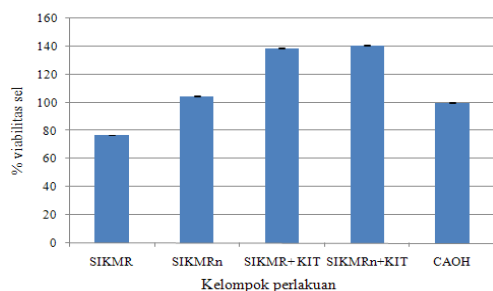
Perlakuan masing-masing kelompok diaplikasikan pada sel yang telah terkonfluen dan diobservasi selama 72 jam. Uji viabilitas sel dilakukan dengan MTT assay. Medium kultur sel pada setiap piringan ditambahkan 15 µl larutan MTT (5mg/ml) dan diinkubasi pada suhu 37⁰C dan 5% CO₂ selama 3 jam. Setiap piringan ditambahkan 150µl *acidified isopropanol* lalu diletakkan di atas pengaduk orbital (50 rpm) selama 1 jam. Kemudian dibaca pada pembaca *microplate* panjang gelombang 650 nm. Nilai absorbansi kelompok perlakuan dipersentasikan terhadap kelompok kontrol untuk menentukan viabilitas sel.

Data yang diperoleh dilakukan uji statistik analisis varian satu arah (Anova) dengan tingkat kemaknaan $\alpha = 0,05$. Uji LSD (*Least Significance Different*) dilakukan untuk mengetahui perbedaan viabilitas sel Di antara kelompok perlakuan. Hipotesis penelitian ini adalah SIKMR dan SIKMRn yang ditambahkan kitosan molekul tinggi dapat menstimulasi proli-

ferasi sel pada jaringan pulpa.

HASIL

Viabilitas sel terlihat meningkat secara signifikan pada seluruh kelompok yang ditambahkan kitosan molekul tinggi nanopartikel. Di antara kelompok tersebut, SIKMRn yang ditambahkan kitosan molekul tinggi nanopartikel menghasilkan viabilitas sel yang lebih tinggi (Gambar 1).



Gambar 1. Rerata nilai viabilitas sel dalam persen yang dipaparkan empat kelompok spesimen terhadap kalsium hidroksida (kelompok kontrol) selama 72 jam

Perbedaan pada masing-masing kelompok terlihat pada uji LSD. Perbedaan viabilitas sel yang signifikan terlihat pada seluruh kelompok yang ditambahkan dengan kitosan molekul tinggi, yaitu K3 ($2,214 \pm 0,199$) dan K4 ($2,236 \pm 0,314$) dengan nilai $p < 0,05$. Pada seluruh kelompok yang ditambahkan kitosan molekul tinggi nanopartikel menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna antara nilai viabilitas sel baik kelompok SIKMR maupun SIKMRn dengan nilai $p > 0,05$ (Tabel 1).

Tabel 1. Perbedaan masing-masing kelompok dalam jumlah viabilitas sel yang dipaparkan pada kultur sel selama 72 jam dengan uji LSD

| Kelompok | Rerata jumlah viabilitas sel ($\bar{x} \pm SD$) | p |
|----------|--|-------|
| K1 vs K5 | $1,222 \pm 0,026$ | 0,061 |
| | $1,593 \pm 0,525$ | |
| K2 vs K5 | $1,664 \pm 0,186$ | 0,712 |
| | $1,593 \pm 0,525$ | |
| K3 vs K5 | $2,214 \pm 0,199$ | 0,003 |
| | $1,593 \pm 0,525$ | |
| K4 vs K5 | $2,236 \pm 0,314$ | 0,002 |
| | $1,593 \pm 0,525$ | |
| K1 vs K2 | $1,222 \pm 0,026$ | 0,027 |
| | $1,664 \pm 0,186$ | |
| K1 vs K3 | $1,222 \pm 0,026$ | 0,000 |
| | $2,214 \pm 0,199$ | |
| K2 vs K4 | $1,664 \pm 0,186$ | 0,005 |
| | $2,236 \pm 0,314$ | |
| K3 vs K4 | $2,214 \pm 0,199$ | 0,907 |
| | $2,236 \pm 0,314$ | |

Keterangan: K1= kelompok SIKMR, K2= kelompok SIKMRn, K3= kelompok SIKMR + Kitosan molekul tinggi, K4= kelompok SIKMRn + Kitosan molekul tinggi, K5= kelompok kalsium hidroksida; K1-K2= Kelompok kontrol (-); K5= kelompok kontrol (+)

PEMBAHASAN

SIK dapat diaplikasikan pada karies awal yang sedang berkembang. SIK melekat pada gigi dan menghentikan atau memperlambat perkembangan lesi terutama karena SIK mengeluarkan fluor secara perlahan. Pada perkembangannya, selain sebagai bahan restorasi SIK juga digunakan sebagai bahan dalam penggunaan ART. Teknik perawatan ART dikembangkan di daerah terpencil untuk perawatan gigi berlubang seperti yang disarankan WHO. ART merupakan teknik pembuangan jaringan karies menggunakan instrumen tangan dan merestorasi dengan bahan restorasi adhesif.⁶⁻⁸

Keberhasilan restorasi gigi dengan menggunakan ART bergantung pada beberapa faktor klinis. Kegagalan ART umumnya karena beberapa faktor, seperti kehilangan sebagian ataupun seluruh struktur gigi, karies yang terjadi pada daerah tepi restorasi, tingkat keausan bahan > 0.5 mm dan kavitas yang dalam.^{6,8} Ferracane dkk. menyatakan bahwa ketika SIK digunakan dalam teknik perawatan ART yang menggunakan prinsip preparasi minimal, terlihat jumlah bakteri yang lebih sedikit dan kandungan kalsium yang lebih tinggi. Hal tersebut menimbulkan keyakinan bahwa dentin telah mengalami remineralisasi.¹

Aplikasi SIK pada jaringan pulpa yang terpapar dalam prosedur iatrogenik dan mengalami *pulpitis reversible* diharapkan dapat membangkitkan daya reparatif pulpa sehingga material ini dapat dikembangkan dalam ART. Hal ini mungkin disebabkan karena SIK merupakan bahan bioaktif dengan didasari adanya komponen SiO_2 yang lebih kecil dari 60%. yang berperan dalam *apatite heterogeneous* dalam lingkungan biologis serta mampu berikatan dengan jaringan gigi secara kimia karena pertukaran ion.⁴ SIKMR dan SIKMRn dikembangkan untuk menghasilkan *properties mechanical* yang lebih baik dibandingkan SIK.^{7,8}

SIKMR dapat melepaskan monomer HEMA (2-hydroxethyl methacrylate). HEMA dapat berdifusi melewati dentin menuju pulpa dan ketika HEMA mencapai pulpa, pulpa dapat mengalami beberapa efek biologis yang merugikan seperti inflamasi persisten.⁵ Beberapa penelitian menunjukkan resin adhesif seperti resin komposit, kompomper, SIKMR dapat menyebabkan sitotoksitas pada sel pulpa dan terhambatnya regenerasi dentin. Hal ini disebabkan

karena pada dentin *bonding agent* terdapat kandungan *triethylene glycol dimethacrylate* (TEGDMA) atau *2-hydroxy-ethyl methacrylate* (HEMA). Bahkan setelah polimerisasi, sejumlah monomer sisa yang dilepaskan dari bahan berbasis resin cukup untuk menimbulkan kerusakan pada populasi sel di sekitarnya.^{9,10}

Berkembangnya aplikasi teknologi nano dalam dunia kedokteran gigi terlihat juga pada penambahan partikel nano ke dalam komposisi SIK yang disebut SIKMRn. Pada prinsip rekayasa jaringan, ukuran partikel material dapat mempengaruhi efek biologi, yaitu makin kecil ukuran partikel, makin luas permukaannya, sehingga makin meningkat pula interaksi material dan jaringan sekitarnya. Silika dan natrium merupakan elemen yang berperan pada bioaktivitas material dimana kandungan silika dan natrium tertinggi terdapat pada SIKMRn.⁴

Biomaterial yang digunakan sebagai bahan kaping pulpa dapat berfungsi sebagai pembawa molekul pemberi sinyal. Potensi penyembuhan melalui stimulasi regenerasi jaringan pulpa terjadi karena adanya pelepasan biomolekul.¹¹ Mekanisme yang terjadi pada pulpa di bawah material kaping diawali dengan adanya proliferasi dan migrasi sel yang dilanjutkan dengan penguraian kolagen yang baru dan kokoh pada daerah yang kontak dengan bagian pulpa nekrotik. Selanjutnya garam mineral dipresipitasi pada zona nekrotik dan membentuk matriks kolagen baru. Akhirnya dentin reparatif mulai dibentuk oleh selapis *odontoblast like cell*.^{4,12}

Kitosan merupakan salah satu biomaterial yang terus dikembangkan karena memiliki berbagai manfaat medik dan biokompatibilitas yang baik. Kitosan dalam bentuk terprotonisasi menunjukkan kerapatan muatan yang tinggi dan bersifat sebagai polielektrolit kationik dan sangat efektif berinteraksi dengan biomolekul bermuatan negatif dan biomolekul permukaan.¹³

Berdasarkan beberapa sifat istimewa dari kitosan, maka kitosan dan modifikasi dengan bahan lain dapat digunakan untuk aplikasi klinis sebagai biomaterial.¹⁴⁻¹⁶ Penggunaan kitosan blankas dan kitosan komersil pada perawatan kaping pulpa direk menunjukkan adanya pembentukan dentin reparatif dan dengan jumlah sel-sel inflamasi yang lebih sedikit dibandingkan dengan kalsium hidroksida sebagai kontrol.¹⁵ Kitosan juga dibuat dalam bentuk nanopartikel. Ukuran partikel kitosan berskala nanometer akan meningkatkan luas permukaan sampai ratusan kali dibandingkan dengan partikel yang berukuran mikrometer, sehingga dapat meningkatkan efektifitas kitosan dalam mengikat gugus kimia lainnya.¹⁷

Penambahan kitosan ke dalam SIK komersil dapat

meningkatkan performa mekanis dan mampu sebagai katalisator dalam pelepasan ion fluor. Efek ini dijelaskan berdasarkan penemuan jaringan polimerik yang berikatan kuat di sekitar pengisi anorganik.¹⁸

Penggunaan kitosan blankas dan komersil sebagai bahan pembanding dengan kalsium hidroksida pada perawatan kaping pulpa direk menunjukkan keduanya lebih mampu menstimulasi pembentukan dentin reparatif dengan kemampuan membentuk koagulum yang padat sebagai sub *base* membran yang memudahkan perlekatan sel-sel pulpa seperti dentinoblast untuk memudahkan migrasi dan proliferasi sel pulpa dentinoblas.¹⁵

Oleh karena itu, dengan adanya perkembangan biomaterial, maka diharapkan kitosan nanopartikel yang ditambahkan pada varian SIK mampu merangsang dentinogenesis dan memperbaiki kerusakan pulpodentino kompleks sehingga dapat digunakan sebagai bahan restorasi pada teknik ART.

Peningkatan signifikan viabilitas sel diperoleh pada SIKMR dan SIKMRn yang ditambahkan kitosan nanoblangkas. Hal ini disebabkan karena kitosan yang merupakan biopolimer alami dan mempunyai glukosamina mempunyai sifat yang sangat istimewa yaitu biokompatibiliti baik, biodegradabiliti baik, tidak bersifat toksik dan bioaktif. Sifat-sifat kitosan ini dihubungkan dengan adanya gugus amino dan hidroksil yang terikat. Adanya gugus-gugus tersebut menyebabkan kitosan mempunyai reaktivitas kimia yang tinggi dan menyumbang sifat elektrolit kation sehingga dapat berperan sebagai amino pengganti.^{14,15}

Pada penelitian ini digunakan kalsium hidroksida sebagai kelompok kontrol karena beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kalsium hidroksida dapat menginduksi mineralisasi dan inhibisi pertumbuhan bakteri. Banyak penelitian menunjukkan perbaikan pulpa dan pembentukan perisai jaringan keras ketika dilakukan kaping pulpa langsung pada pulpa yang terpapar. Adanya perisai jaringan keras setelah perawatan kaping pulpa dianggap suatu keuntungan karena dapat menciptakan perlindungan alami terhadap infiltrasi bakteri dan produk khemis. Namun, kalsium hidroksida tidak bertindak sebagai biostimulator maupun biokompatibel terhadap jaringan pulpa. Sel yang kontak langsung dengan kalsium hidroksida akan mati akibat pH yang basa sehingga membentuk suatu lapisan nekrose. Hal ini dapat mengakibatkan terjadinya kebocoran dan penetrasi bakteri ke dalam pulpa.^{1,19}

Dapat disimpulkan bahwa penambahan kitosan molekul tinggi nanopartikel pada SIKMR dan SIKMRn dapat meningkatkan viabilitas sel bila di-

bandingkan dengan kalsium hidroksida sehingga bahan ini dapat dijadikan suatu biomaterial baru yang mampu merangsang dentinogenesis dan memiliki sifat fisis baik serta dapat digunakan sebagai bahan restorasi pada perawatan ART.

Daftar Pustaka

1. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology* 2010; 98: 2-14.
2. Lohbauer U. Dental glass ionomer cements as permanent filling materials? properties, limitations and future trends. *Materials* 2010; 3: 76-96.
3. Ghavamnasiri M, Mousavinasab M, Mohtahsam M. A histopathologic study on pulp response to glass ionomer cements in human teeth. *J Dent* 2005; 2(4): 135-41.
4. Suprastiwi E. Bioaktivitas semen ionomer kaca dalam menginduksi peningkatan kadar ALP, DMP-1, dan pembentukan dentin reparatif (penelitian in vivo pada Macaca nemestrina). Disertasi. Jakarta: FKG UI, 2011.
5. Nicholson JW, Czarnecka B. The biocompatibility of resin-modified glass-ionomer cements for dentistry. *Dental materials* 2008; 24: 1702-8.
6. Mickenautsch S, Grossman E. Atraumatic restorative treatment (art) - factors affecting success. *J Appl Oral Sci* 2006; 14(sp.issue): 34-6.
7. Cefaly DF, Barata T, Tapety CM, Bresciani E, Navarro MF. Clinical evaluation of multi-surface ART restorations. *J Minim Interv Dent* 2008; 1(1): 52-8.
8. Frencken JE, Leal SC, Navarro MF. Twenty-five-year atraumatic restorative treatment (ART) approach: a comprehensive overview. *Clin Oral Invest* 2012; 16: 1337-46.
9. Quinlan CA, Zisterer DM, Tipton KF, O'Sullivan MI. In vitro cytotoxicity of a composite resin and com-pomer. *International Endodontic J* 2002; 35: 47-55.
10. Mantellini MG, Botero TM, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nor JE. Adhesive resin induces apoptosis and cell-cycle arrest of pulp cells. *J Dent Res* 2003; 82(8): 593-4.
11. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: A biological basis for repair and tissue engineering. *CROBM* 2004; 15: 13-27.
12. Bouillaguet S. Biological risks of resin-based materials to the dentin-pulp Complex. *CROBM* 2004; 15(1): 47-60.
13. Sugita P, Wukisari T, Sjahriza A, Wahyono A. Kitosan sumber biomaterial masa depan. Bogor: IPB Press, 2009; 27: 125.
14. Irawan B. Chitosan dan aplikasi klinisnya sebagai biomaterial. *IJD* 2005; 12(3): 146-51.
15. Trimurni A, Harry A, Wandania F. Efek dentinogenesis kitosan dan derivatnya terhadap inflamasi jaringan pulpa gigi *reversible*. Laporan akhir penelitian riset pembinaan iptek kedokteran. Medan: FKG USU, 2006: 16-8, 27-30, 39-41.
16. Hafdani FN, Sadeghinia N. A review on application of chitosan as a natural antimicrobial. *World Academy of Science* 2011; 74: 257-61.
17. Ningsih W. Pengaruh viskositas larutan kitosan nano-partikel sebagai penyalut asam askorbat untuk menyerap asam lemak bebas (ALB) dalam minyak goreng curah. Medan, Tesis. USU 2010: 1-21.
18. Petri DFS, Donega J, Benassi AM. Preliminary study on chitosan modified glass ionomer restoratives. *J Dent Materials* 2007; 23: 1004-10.
19. Modena KC, Casas-Apayco LC, Atta MT. Cytotoxicity and biocompatibility of direct and indirect pulp capping materials. *J Appl Oral Sci* 2009; 17(6): 544-54.