

SIFAT OSTEOINDUKTIF SILIKA AMORPHOUS SEKAM PADI

(OSTEOINDUCTIVITY OF AMORPHOUS SILICA FROM RICE HUSK)

Didin Erma Indahyani*, Zahreni Hamzah**, Izzata Barid*

* Laboratorium Biologi Mulut

** Laboratorium Fisiologi

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember

Jl. Kalimantan 37 Jember

E-mail: didinermae@yahoo.com

Abstract

Currently, bone graft is recommended to improve and support the biological repair of bone defects properly. Bone graft was found to cause death in the donor area, long pain, infection, cosmetic deformity, hematoma, the amount of blood loss, injury or damage to the nervous in the donor area. Synthetic bone graft material was developed as a scaffold that serves to template the formation of bone. The ideal scaffold should be biodegradable, osteoconductive and osteoinductive. During there graft materials have not optimally provide the morphological, mechanical properties, biocompatibility and biodegradation, and osteoinductive-osteoinductive. Silica is proven to support and promote primary osteoblast growth, synthesis of matrix proteins, collagen type I, so that it can cause bone formation. Rice husk contains of silica is high enough. Because of abundant material and its potential in bone formation, needs to be done research on silica from rice husk in the manufacture of synthetic bone graft. The purpose of this study was to analyze the amorphous silica from waste rice husks as synthetic bone graft material (scaffold), especially against osteoblasts proliferation. Type of study was an experimental laboratory. This research was conducted by isolating the amorphous silica from rice husk. Primary osteoblast cultures derived from calvaria rats aged 2 days, growing in Alpha Modified Eagle Medium (α -MEM) (as negative control), α -MEM that in condition with 58S silica (as positive control group) and α -MEM condition with silica from rice husk (as treatment group). Osteoblast proliferation was observed with Quick Cell Proliferation Assay Kit for 7 and 14 days. The result showed that the rice husk silica was significantly ($p < 0.05$) osteoinductive, osteoblast cultures demonstrated that its proliferation was higher in the groups that were implanted in the culture medium condition with 58S silica. In conclusion, rice husk amorphous silica is potentially osteoinductive scaffold for synthetic bone graft material.

Key words: bone remodeling, bone graft, scaffold, silica

PENDAHULUAN

Pada saat ini, bahan sintesis *bone graft* sedang dikembangkan untuk menghindari keterbatasan perawatan secara konvensional pada transplantasi dan biomaterial implan.¹ Secara khusus bahan *graft* ditujukan untuk memberikan *scaffold* yang porus untuk *template* regenerasi tulang dan pembentukan tulang baru.^{2,3} Biomaterial *scaffold* mengganti fungsi biologis dan mekanis matriks ekstraseluler jaringan di dalam tubuh dengan bertindak sebagai matriks ekstra seluler artifisial.⁴ Data dkk. menyatakan bahwa secara *in vivo*, matriks ekstraseluler mempunyai peranan penting dalam mempertahankan dan memediasi fungsi tulang, karena mengandung beberapa faktor osteoinduktif dan osteokonduktif.⁵ Oleh karena itu, *scaffold* sintesis harus mempunyai sifat osteoinduktif, osteokonduktif, integritas mekanisnya tinggi, biodegradabilitas, biocompatibili-

tas (mudah diterima secara imun) dan porositas yang akan menyebabkan pertumbuhan jaringan dalam tulang. Selain itu, *scaffold* harus didegradasi ketika jaringan yang rusak telah diregenerasi.⁶

Peristiwa seluler yang terjadi pada pembentukan tulang merupakan peristiwa pergerakan prekursor osteoblas ke daerah resorpsi dengan proses kemotaksis, dan juga adanya proliferasi prekursor osteoblas yang diikuti oleh diferensiasi untuk menjadi sel yang matur. Osteoblas matur mampu mensintesis protein tulang yaitu kolagen tipe I, osteokalsin, osteopontin, alkaline fosfatase, proteoglikan dan komponen-komponen faktor regulasi pertumbuhan, misalnya *fibroblast growth factors (FGFs)*, *transforming growth factors (TGF)*, *insulin-like growth factors (IGFs)* yang disimpan dalam matriks tulang termasuk bone sialoprotein juga osteonektin.⁷

Selama ini beberapa bahan *graft* telah banyak digunakan misalnya metal, keramik, polimer, hidro-

siapatit dll, tetapi bahan-bahan tersebut belum memberikan morfologis, sifat mekanis, biokompatibilitas dan biodegradasi yang optimal dan mempunyai harga yang mahal.⁶ Silika bahan semi konduktor mempunyai potensi untuk mencapai sifat-sifat tersebut di atas. Silika terbukti mempengaruhi pembentukan tulang. Makanan yang mengandung silikon dapat menstimulasi sel osteoblas dan *osteo-blast-like* untuk mensekresi kolagen tipe I dan marker biokimia lain pada maturasi sel tulang dan pembentukan tulang.⁸

Bioactive glass berbasis silika yang digunakan sebagai *coating implant* menunjukkan percepatan pembentukan tulang baru dengan adanya ekspresi *bone morphogenic proteins-2* (BMP-2) dan komponen-komponen matriks tulang (kolagen tipe I, II dan III, osteokalsin, serta marker-marker resorpsi tulang yaitu katepsin K dan *matrix metalloproteinase-9* (MMP-9)).⁹ Silikon atau silika ini mudah dilakukan resorpsi setelah pembentukan tulang, sehingga *scaffold* silika akan diganti dengan tulang.⁶ Menurut Koh dan Atala⁴ biomaterial yang ideal harus kompatibel yaitu *biodegradable* dan *bioresorbable* untuk mendukung penggantian jaringan normal tanpa inflamasi. Silika banyak berasal dari bebatuan maupun pasir. Sekam padi ternyata banyak juga mengandung silika. Kandungan silika dari abu sekam adalah 94 - 96 % dan atau mendekati di bawah 90%. Silika yang terdapat dalam sekam dalam bentuk amorf terhidrat.¹⁰ Tujuan penelitian ini adalah menganalisis sifat osteoinduktif silika amorf dari sekam padi sebagai bahan sintesis *bone graft (scaffold)*, khususnya terhadap proliferasi osteoblas pada media kultur yang di kondisikan dengan silika amorf limbah sekam padi.

BAHAN DAN METODE

Ekstraksi silika diperoleh dengan cara mengeringkan sekam padi di bawah sinar matahari, kemudian dilakukan proses pengabuan. Abu sekam padi dimurnikan dengan cara pengasaman, kemudian diuapkan dan diberi akuades dan HCL untuk dipanaskan kembali. Hasilnya disaring dan dicuci 4 sampai 5 kali dengan akuades panas. Hasil penyaringan berupa residu padat beserta kertas saringnya dipanaskan hingga kertas saring menjadi arang. Kemudian dilanjutkan dengan memanaskan pada suhu 600°C hingga yang tersisa hanya endapan silika (SiO₂) berwarna putih.¹⁰ Identifikasi dilakukan dengan menggunakan Gravimetri.

Silika amorf sekam padi (60%) ditambahkan CaO (36%) dan P₂O (54%), sedangkan 58S *bioactive glass* (60% SiO₂, CaO (36%) dan P₂O (54%), dalam mol persen) disiapkan sebagai kontrol. Bahan ter-

sebut masing-masing digiling (dihaluskan) dalam wadah dan diayak untuk mendapatkan ukuran partikel antara 90-710µm. Medium yang belum disuplemen akan dikondisikan dalam silika amorf dari sekam padi dan 58S *bioactive glass*, disiapkan dengan perendaman partikel silika amorf dan juga 58S *bioactive glass* (antara 0,1 dan 0,5 g/100mL) selama 24 jam pada suhu 37°C. Ekstraks tersebut kemudian disterilisasi dengan *vacum filtration* menggunakan membran nilon dengan ukuran pori-pori 0,2- µm. Medium yang telah dikondisikan tersebut, kemudian disuplemen dengan 10-15% FBS, penisilin-streptomisin (100 U/mL), 2mM L-glutamin, askorbat -2 fosfat (50 µg/mL) dan 10mM β-glycerophosphate.¹¹

Setelah kalvaria diambil dari tikus umur 2 hari, dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dan dipotong-potong kecil dengan gunting, kemudian dihancurkan 5 kali dengan kolagenase selama 10 menit pada suhu 37°C. Masing-masing hasil pemotongan diambil supernatannya dan dipindahkan dalam *Fetal bovine serum* (FBS). Kumpulan dari ke 3,4 dan 5 supernatan tersebut, dikumpulkan dan disentrifuse pada 1500 rpm selama 5 menit, kemudian diresuspensi dalam *basic medium culture* (*α-modified Eagle's medium* (α-MEM) dengan 15% FBS, penisilin G (50U/mL) dan streptomisin (50µg/mL). Sel dipertahankan dalam *basic medium* dan *passaged* 3 kali sebelum digunakan untuk eksperimen dalam medium yang diberi suplemen.

Sel-sel ditumbuhkan dalam *plate 96 well* selama 7 dan 14 hari, dalam medium yang dikondisikan dengan silika, glas dan pada medium yang tidak dikondisikan. Sel-sel disuplai dengan mitomycin C (100 µg/mL) atau *human recombinant basic fibroblast growth factors* (bFGF, 10ng/mL). Sel primer osteoblas yang diperoleh melalui kultur sel, ditreatment dengan mengkondisikan medium kultur dengan bahan silika dan juga silika yang berasal dari sekam padi. Sebagai kontrol digunakan α-MEM sebagai mediumnya.¹¹ Proliferasi osteoblas di amati dengan *Quick Cell Proliferasi Assay Kit* sesuai instruksi pabrik. Hasil yang diperoleh berdasarkan nilai absorbansi yang dilakukan dengan pengukuran 405 nm. Nilai absorbansi diinterpolasikan dengan kurva standar. Data yang telah diperoleh dilakukan analisa statistik dengan uji Anava Satu satu arah.

HASIL

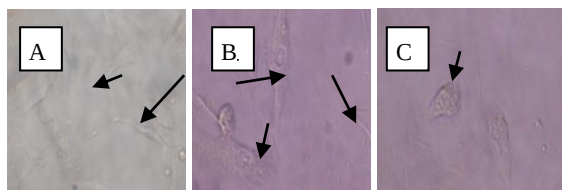
Penelitian ini menunjukkan nilai absorbansi pada kelompok silika sekam mempunyai nilai absorbansi yang lebih tinggi di bandingkan yang lain pada hari ke 14 , tetapi pada hari ke 7 kelompok kontrol mempunyai nilai absorbansi yang paling tinggi, sedang-

kan silika 58S *Bioactive Glass*, mempunyai absorbansi yang paling rendah. Hal ini menunjukkan bahwa silika yang berasal dari sekam padi mempunyai kemampuan untuk menstimulasi proliferasi osteoblast. Pada hari ke 14, nilai absorbansi cenderung menurun, tetapi mempunyai pola yang sama dengan hari ke 7, yaitu pada kelompok silika sekam, mempunyai nilai absorbansi yang paling tinggi di antara yang lain, sedangkan absorbansi dari kelompok silika 58S *Bioactive Glass* mempunyai nilai yang lebih rendah di bandingkan dua kelompok yang lain. Dalam Tabel 1 dapat dilihat dengan jelas.

Tabel 1. Rerata proliferasi kultur primer osteoblast

Kelompok	Lama Perlakuan	N	Rerata $\pm$ SD
SILIKA58	7 hari	24	33.31 $\pm$ 0.81
	14 hari	24	13.67 $\pm$ 1.02
SEKAM	7 hari	24	35.13 $\pm$ 0.77
	14 hari	24	15.69 $\pm$ 0.68
KONTROL	7 hari	24	35.33 $\pm$ 0.67
	14 hari	24	13.88 $\pm$ 0.80

Analisis statistik dengan uji Anova menunjukkan terdapat perbedaan rerata nilai absorbansi kultur osteoblast secara bermakna ($p < 0,05$) pada kelompok penelitian. Hal ini menunjukkan bahwa medium mempunyai pengaruh kuat pada tingkat proliferasi sel osteoblast. Medium yang dikondisikan dengan glas silika sekam padi secara bermakna ($p < 0,05$) mempunyai rerata yang lebih tinggi dibandingkan medium tanpa glas silika maupun medium yang dikondisikan dengan 58S *Bioactive glass*. Pada hari ke 14 perlakuan rerata proliferasi osteoblas menurun dalam semua kelompok (Gambar 1).



Gambar 1. Sel-sel yang mengalami pertumbuhan dan proliferasi A. medium α -MEM, B. Medium silika dari sekam padi, C. Medium 58S *bioactive glass*, (tanda panah menunjukkan osteoblas)

PEMBAHASAN

Scaffold pada *bone tissue engineering* secara ideal harus bersifat osteokonduktif dan osteoinduktif. Osteokonduktif berhubungan dengan kemampuannya untuk mendukung perlekatan dan pembentukan serta deposisi matriks tulang. Osteoinduktif dimaksudkan untuk *template* sel prekursor osteogenik untuk berdiferensiasi menjadi sel yang mampu

membentuk tulang. Dengan demikian model *scaffold* harus mampu merekrut sel progenitor ataupun stem untuk penyembuhan daerah tulang di mana mereka akhirnya akan berdiferensiasi menjadi matriks ekstraseluler yang disekresi oleh osteoblas. *Scaffold* harus mempunyai integritas mekanis, biodegradabilitas, biocompatibilitas dan porositas yang akan menyebabkan pertumbuhan jaringan dalam tulang.⁶

Silika atau *silicon* telah lama diketahui mempengaruhi pembentukan tulang. Peranan silika dalam metabolisme tulang secara jelas belum begitu diketahui. Namun, beberapa penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi plasma yang tinggi oleh silika setelah mengkonsumsi makanan yang banyak mengandung silika, menstimulasi osteoblas dan sel-sel *osteoblast-like* untuk mensekresi kolagen tipe I dan marker biokimia lain pada sel tulang yang matur dan pembentukan tulang. Silika yang terlarut dapat menstabilkan spesies radikal hidroksil cairan dan beberapa menyatakan bahwa silika terlibat dalam jalur *radical dependent prolyl-hydroxylase* selama pembentukan kolagen tipe I.¹²

Di klinik, penggunaan silika secara umum dalam bentuk *bioactive glass*. Di pasaran berbagai macam *bioactive glass* dapat ditemukan, misalnya 45S dan 58S dan keduanya berbeda pada komposisinya. Dalam penelitian ini digunakan 58S yang terdiri atas 60% SiO_2 , 36% CaO dan 4% P_2O_5 , dalam mol persen, sedangkan 58S digunakan sebagai kontrol. Silika amorf sekam padi, digunakan untuk menggantikan unsur SiO_2 yang terdapat di dalam komposisi 58S.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kultur primer osteoblas yang berasal dari kalvaria tikus yang dikondisikan dalam medium *bioactive glass* (58S) dan silika yang berasal dari sekam padi mengalami proliferasi. Dasar mekanisme terjadinya proliferasi osteoblas tersebut adalah adanya reaksi permukaan yang melepaskan spesies ionik yang terlarut dengan cepat dari glas dalam larutan interfasi (medium). Menurut Hench dan Polak, silika terhidrat yang tinggi di daerah permukaan, dan *polycrystalline hydroxyl carbonate apatit* (HCA) bilayer terbentuk beberapa jam.¹³ Lapisan tersebut mempertinggi adsorpsi dan daya desorpsi faktor pertumbuhan. Perlekatan sel, proliferasi dan diferensiasi secara cepat terjadi pada permukaan bahan bioaktif. Pada saat itu juga dimulai memproduksi faktor-faktor pertumbuhan yang menstimulasi divisi sel, mitosis dan produksi protein matriks ekstra seluler. Peranan aktif ion-ion yang terlepas pada sel osteoblas adalah mengaktifkan gen-gen yang berhubungan dengan perlekatan, proliferasi dll. Gen-gen tersebut mengontrol siklus sel osteoblas, mitosis

dan diferensiasi yang menyebabkan peningkatan regenerasi tulang dengan cepat. Selain itu diperlukan untuk sel progenitor mengalami mitosis dan menerima stimuli kimia yang benar dari lingkungan lokalnya yang menginstruksikannya untuk memasuki segmen aktif pada siklus sel yang berperan untuk mitosis sel.¹⁴

Medium silika yang berasal dari sekam padi mempunyai tingkat proliferasi yang lebih tinggi. Hal ini disebabkan bahwa sekam padi berasal dari bahan alami yang lebih sesuai dengan kultur sel osteoblas. Proses pengolahan yang sederhana menyebabkan bahan silika dari sekam padi tidak berubah menjadi bentuk kristalin. Silika dalam bentuk kristal akan dapat menyebabkan terjadinya kematian sel. *Bioactive glass* mempunyai 5 mekanisme utama dalam pertumbuhan tulang yaitu *surface chemistry*, topografi, rata-rata dan tipe kelarutan ion-ion yang terlepas dan sifat mekanis dari interface tulang itu sendiri.¹⁴ *Bioactive glass*, secara kimia dapat berikatan dengan jaringan lunak dan keras, sehingga dapat menimbulkan pembentukan lapisan apatit yang aktif secara biologi pada permukaan implan dan jaringan secara interface tanpa menimbulkan toksik, inflamasi, juga respon imun yang berlebihan yang dapat menimbulkan gangguan. Secara *in vitro*, penilaian *bioactive glass* dilakukan dengan membasahi *glass* dengan medium dan memonitor pertumbuhan osteoblas sampai pembentukan lapisan apatitnya.¹⁵ Dalam penelitian ini dilakukan dengan membasahi bubuk *glass* 58S dan 58S yang unsur silikanya diganti dengan silika yang berasal dari sekam padi.

Menurut Henc dan Polak,¹³ siklus sel baru dimulai setelah sel selesai mitosis sempurna. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kontrol siklus sel osteoblas dicapai dengan mengontrol pelepasan produk ionik yang terlarut dari bahan bioaktif. Sel tersebut berkoloni di permukaan *bioactive glass*. Konsentrasi Si yang terlarut dan ion Ca pada *interface* larutan sel penting untuk mengontrol siklus sel. Hal ini juga nampak terlihat pada hari ke 14, yang terjadi penurunan jumlah proliferasi osteoblas dalam semua kelompok. Pada hari ke 14 konsentrasi Si menurun dan berkurang, sehingga siklus sel mengalami penurunan.

Scaffold yang dilakukan pada *bone tissue engineering* adalah untuk mengkondisikan sel-sel yang akan ditanam dapat tumbuh dengan baik. *Marrow stromal cells* (MSCs) merupakan sel multipoten yang ditemukan kebanyakan di dalam sumsum tulang, yang tidak berdiferensiasi tetapi pada lingkungan yang tepat dapat berpotensi berdiferensiasi menjadi beberapa tipe sel termasuk tulang, kartilago, dan adipose. Secara *in-vivo*, *osteodifferentiation* terjadi dengan beberapa rangkaian tahapan prolif-

ferasi seluler, maturasi matriks ekstra seluler tulang dan mineralisasi matriks. Oleh karena itu, diperlukan *scaffold* yang mempunyai sifat osteoinduksi dan osteokonduktif. Hal ini sesuai dengan pernyataan Data dkk⁵ bahwa secara *in-vivo*, matriks ekstra-seluler mempunyai peranan penting dalam mempertahankan dan memediasi fungsi tulang. Matriks ekstra seluler mengandung beberapa faktor osteoinduktif, yang terletak diseluruh matriks tulang yaitu glikoprotein, misalnya thrombospondin, fibronectin, vitronektin, and fibrilin yang membantu mempromosikan perlekatan seluler. Ada juga protein adesi yaitu osteopontin, *bone sialoprotein*, dan *matrix glycoproteins* yang lain juga terlibat dalam proses mineralisasi matriks. Dapat disimpulkan bahwa silika amorf yang berasal dari sekam padi mempunyai sifat osteoinduktif, yang mampu menyebabkan terjadinya proliferasi sel kultur osteoblas. Selain itu, sifat osteoinduktif silika amorf akan mengalami penurunan dengan panjangnya waktu kultur, oleh karena adanya pengurangan konsentrasi Si terlarut dalam medium kultur.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih tak terhingga kepada Menristek yang telah membiayai penelitian ini pada anggaran tahun 2010. Terimakasih juga disampaikan kepada pihak-pihak yang telah membantu penyelesaian penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Rosenberg T. Anterior cervical dicectomy & fusion : advanced level. <<http://www.mayfieldclinic.com>> (4 Oktober 2011).
2. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering, PLoS Medicine <www.plosmedicine.org> (24 Agustus 2010).
3. Sachlos E, Czernuszka JT. Making tissue engineering scaffolds work review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *E.u Sroapchealons Caenldls Mzeartneruisazlksa* 2003; 5: 29-40.
4. Koh CJ, Atala A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1113-25.
5. Datta N, Pham QP, Sharma U, Sikavitsas VI, Jansen JA, Mikos AG. In vitro generated extracellular matrix and fluid shear stress synergistically enhance 3D osteoblastic differentiation. *PNAS* 2005; 21: 2488-93.
6. Sun W. Porous silicon based biomaterials for bone tissue engineering. Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Doctor of Philosophy. Department of Biomedical Engineering The College

- School of Engineering and Applied Science, New York: University of Rochester, 2007: 8-20.
7. Stannard, Schmidt AH, Kregor PJ. Surgical treatment of orthopaedic trauma. New York: Thieme Medical Publishers Inc., 2007: 95.
 8. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2003; 32:127-35.
 9. Valimaki, Ville-Valtteri BM., Yrjans JJ, Vuorio EI, Aro HT. Molecular biological evaluation of bioactive glass microspheres and adjunct bone morphogenetic protein 2 gene transfer in the enhancement of new bone formation. *Bone* 2005; 11:1.
 10. Harsono H. Pembuatan silika amorf dari limbah sekam padi, *J Ilmu Dasar* 2002; 3: 98-103.
 11. Bielby RC, Christodoulo IS, Pryce RS, Radford WJP, Hench LL, Polak JM, Time-and concentration-dependent effects of dissolution products of 58s sol-gel bioactive glass on proliferation and differentiation of murine and human osteoblasts. *Tissue Engineering* 2004; 10: 200.
 12. Waked W, Grauer J. Silicates and bone fusion. *Orthopedics* 2008; 31:591.
 13. Hench LL, Polak JM. A genetic basis for design of biomaterials for in situ tissue regeneration. *Key Enginer Mater* 2008; 377: 151-66.
 14. Lutz-Christian G, Boccaccini AD. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials* 2010; 3: 3867-910.
 15. Shi Q, Wang J, Zhang J, Fan J, Stucky GD. Rapid-setting, mesoporous, bioactive glass cements that induce accelerated in vitro apatite formation. *Adv Mater* 2006; 18: 1038-42.