

EFEK KITOSAN TERHADAP VIABILITAS SEL PUNCA LIGAMENTUM PERIODONTAL

(EFFECT OF CHITOSAN ON THE VIABILITY OF PERIODONTAL LIGAMENT STEM CELL)

Yuniarti Soeroso, Endang Bachtiar, Prayitno

Departemen Periodonsia
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia
Jl. Salemba Raya Jakarta 10430
E-mail: yuniarti_22@yahoo.co.id

Abstract

Periodontal therapy using bone graft has been attempted to achieve periodontal regeneration. In cellular level, stem cells have been used extensively for periodontal regeneration of new bone formation in osteogenesis process. The biological and mechanical property of chitosan can be used as a scaffold for tissue regeneration. Chitosan has an effect as blood and tissue interphase in healing process and non toxic. The aim of study was to observed the effects of chitosan on the ability of osteogenesis PDL stem cells, which was evaluated through viabilitas level PDL stem cells. Periodontal ligament stem cells harvested from the apical region of healthy and periodontitis third molar. Human PDL stem cells was isolated by magnetic bead selection and identified using an antibody anti Stro-1 (marker of mesenchymal stem cells). PDL stem cells viability was tested using the MTT technique. The samples were divided into experimental group consisted of 6 PDL stem cells groups were coated by chitosan 0.025, 0.5, 0.1, 0.15, 0.2, and 0.25% and a control group without chitosan. A total of approximately 10,000 PDL stem cells were cultured with medium containing of 10% fetal bovine serum (FBS), 10% NCS, penstrep, and 250µg/ml fungizone/amphoteresin B. The results showed that the viability of PDL stem cells isolated from healthy tooth which coated by chitosan 0,15%, has the highest proliferation compared to other groups. In conclusions, the exposure of chitosan 0.15% in PDL cultures showed the highest cell viability, it's explained that chitosan 0,15% has the highest effect in stimulated cell proliferation.

Key words: stem cell, osteogenesis, chitosan, cell viability

Abstrak

Pada kerusakan tulang alveolar, pembentukan tulang baru dapat dirangsang oleh bahan yang bersifat merangsang osteogenesis. Kitosandapat sebagai interfase darah dan jaringan serta memiliki efek regeneratif sebagai scaffold pada pertumbuhan tulang. Tujuannya mengamati efek kitosan terhadap sel punca *PDL* pada proses osteogenesis, diamati melalui viabilitas sel punca *PDL*. Sel punca dipanen dari apikal gigi molar 3 sehat dan gigi periodontitis, diidentifikasi dengan Antibodi Stro-1. Kelompok eksperimen terdiri atas sel punca *PDL* yang dipapar kitosan 0,025, 0,5, 0,1, 0,15, 0,2 dan 0,25% dan kelompok kontrol tanpa dipapar kitosan. Viabilitasnya diamati dengan tehnik *MTT*. Sejumlah 10.000 sel punca *PDL* ditebar dalam plat kultur jaringan yang berisi 10% *FBS*, 10% *NCS*, penstrep, and 250µg/ml *fungizone/amphoteresin B*. Hasil penelitian menunjukkan viabilitas sel tertinggi terdapat pada kelompok sel punca *PDL* sehat yang dipapar kitosan 0,15%, artinya pada konsentrasi tersebut kitosan memiliki efek tertinggi dalam menstimuli proliferasi sel. Kesimpulannya, kelompok sel punca *PDL* sehat yang dipapar kitosan menunjukkan viabilitas sel yang tertinggal dalam menstimulasi proliferasi sel.

Kata kunci: sel punca, osteogenesis, kitosan, viabilitas sel

Pendahuluan

Hasil survei distribusi penyakit periodontal di Klinik Periodontologi Rumah Sakit Gigi dan Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia tahun 2002 menunjukkan bahwa periodontitis kronis menduduki urutan pertama, yaitu 89%.¹ Perio-

odontitis kronis merupakan penyakit periodontal yang paling sering terjadi dan merupakan penyakit infeksi, disebabkan plak gigi yang mengandung mikroorganisme.^{2,3} Gejala klinis terjadi perdarahan saat probing, pembentukan poket periodontal, ke-rusakan tulang alveolar serta kehilangan perlekatan jaringan ikat gigi.

Perawatan periodontitis kronis dapat berupa tindakan nonbedah dan bedah periodontal. Pada periodontitis berat disertai poket dalam dan kerusakan tulang, perlu dilakukan perawatan bedah periodontal dan kombinasi perawatan regenerasi berupa cangkok tulang guna menggantikan tulang yang rusak.⁴⁻⁶ Kondisi ideal yang ingin dicapai pada suatu perawatan periodontal adalah terjadinya perlekatan baru dan regenerasi periodontal, yang secara klinis terjadi pendangkalan poket dan rekonstruksi jaringan periodonsium.⁴ Pada kenyataannya, suatu perawatan periodontal baik bedah maupun non bedah, sering terjadi penyembuhan yang disertai pembentukan *long junctional epithelium*, ankilosis tulang dan gigi, resorpsi akar, rekurensi poket periodontal, resesi karena hilangnya pendukung jaringan periodonsium, sehingga fungsi terganggu dan estetis buruk, atau kombinasi dari keadaan yang ada.^{4,5}

Pada regenerasi periodontal diharapkan terjadi pembentukan ligamentum periodontal, sementum dan tulang al

perlu dimodifikasi untuk mengatasi sifat-sifat dasar-nya. Pemrosesan pembuatan kitosan memenuhi spesifikasi dan standard BATAN dan telah berhasil menurunkan sifat viskositasnya yang tinggi dengan dilarutkan dalam asam asetat 0,5%. Kitosan ini dapat memenuhi beberapa persyaratan sebagai ba-han regeneratif yang dapat dijadikan alternatif dalam perawatan periodontal.^{7,13,16}

Kitosan pada penelitian ini didapat dari 25 gram kulit udang campuran udang putih (*Penaeus merguensis*), udang krosok (*Metepeneus* sp.) dan udang belang (*Parapneosis* sp.) yang diproses secara diasetilasi. Kemudian dilakukan *chipping* dan se-lanjutnya dilakukan radiasi untuk sterilisasi. Pem-prosesan pembuatan kitosan memenuhi spesifikasi dan standard Badan Tenaga Atom Nasional (BA-TAN) dan telah berhasil menurunkan sifat visko-sitasnya yang tinggi dengan dilarutkan dalam asam asetat 0,5%. Tahap 1, kitosan dibuat pada 6 kon-sentrasi (0,1, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 dan 3%).¹⁷ Di-lakukan uji viabilitas sel dengan metode *MTT*, hasilnya hanya kitosan konsentrasi di bawah 0,5 yang memiliki viabilitas sel baik. Tahap 2 pem-buatan kitosan konsentrasi 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, dan 0,25%.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik *in vitro*; dibagi atas kelompok eksperi-mental yang terdiri atas 6 kelompok sel punca *PDL* yang diisolasi dari gigi sehat dan 6 kelompok sel punca *PDL* yang diisolasi dari gigi periodontitis dan dipapar kitosan dengan 6 konsentrasi yaitu 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 dan 0,25%. Kelompok kontrol adalah kelompok sel punca *PDL* sehat dan sel punca *PDL* gigi periodontitis tanpa dipapar kitosan.

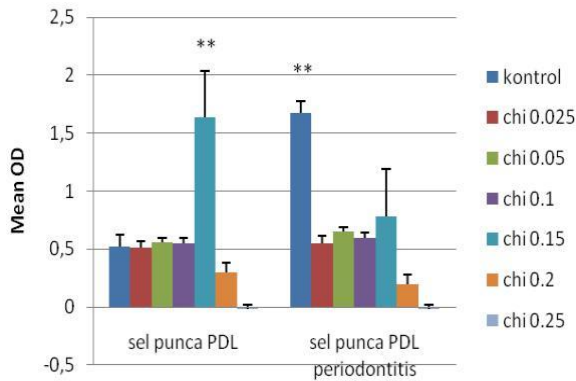
Penelitian ini dilakukan 3 tahap yaitu: 1) Di-lakukan persiapan pembuatan kitosan dengan ber-bagai konsentrasi di BATAN, 2) Panen sel punca *PDL* dari gigi sehat dan sel punca *PDL* gigi dengan diagnosis periodontitis kronis dengan teknik kultur jaringan, 3) Pemaparan kitosan pada sel punca *PDL* yang diisolasi dari gigi sehat dan sel punca *PDL* gigi periodontitis kronis. Pengambilan sampel penelitian dilakukan di paviliun khusus Rumah Sakit Gigi dan Mulut FKG UI. Kultur sel punca ligamentum perio-dontal dilakukan di Laboratorium Biologi Oral FKG UI.

Sel punca dipanen dari kerokan sepertiga apikal gigi molar 3 sehat dan gigi dengan diagnosis perio-dontitis kronis yang terindikasi ekstraksi. Selanjut-nya dilakukan isolasi sel punca menggunakan *magnetic bead* dan antibodi *anti STRO-1 (Magna-Bind™ Protein A and Protein G Beads, Pierce, Rockford, IL)*, yang merupakan penanda sel punca mesenkimal. Hasil isolasi stem sel selanjutnya di-identifikasi menggunakan metoda imunositokimia

dengan antibodi anti *Stro-1*. Pada proses kultur sel *magnetic beads* akan terlepas dari sel punca. Untuk mengkonfirmasi bahwa hasil isolasi sel punca adalah benar positif *STRO-1* maka setelah panen sel punca dilakukan identifikasi sel punca secara imu-nositokimia menggunakan anti bodi anti *STRO-1* yang berlabel *FITC*.

Pemaparan kitosan pada sel punca *PDL* sehat dan sel punca *PDL* gigi periodontitis, dan diamati via-bilitas sel nya dengan Uji *MTT*.²³ Uji viabilitas menggunakan Uji *MTT (3-(4,5-Di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetra-zole)* dianggap sebagai metode yang tepat untuk mengetahui viabilitas sel. Penelitian ini untuk me-nentukan bahwa kitosan tidak toksik terhadap asi-

diinduksi kitosan 0,15% ($p < 0,001$).



Gambar 2. Viabilitas Sel Setelah Dipapar Kitosan 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2 dan 0,25% dengan Me-tode *MTT* ** $p < 0,01$

PEMBAHASAN

Kemampuan antibodi anti *Stro-1* dalam mendeteksi keberadaan sel punca tidak ditentukan oleh kondisi klinis dari keadaan sampel *PDL* baik yang diisolasi dari jaringan *PDL* gigi sehat maupun gigi yang periodontitis. Keadaan ini dapat dikaitkan dengan kondisi klinis bahwa walaupun jumlah sel punca pada keadaan periodontitis hampir sama dengan keadaan kondisi sehat, tetapi kemungkinan kemampuan berproliferasinya berbeda dengan keadaan sehat. Kapasitas terbesar dari tulang untuk beregenerasi secara sempurna dilihat dari keberadaan sel punca, dan keberadaannya antara lain dapat dikonfirmasi dengan antibodi anti *Stro-1*.

Dari gambar 1 hasil uji *MTT* menunjukkan viabilitas sel punca yang dipapar kitosan konsentrasi 0,5% hingga 2,5% sangat rendah dan jauh di bawah kontrol. Dari penelitian ini ternyata konsentrasi kitosan yang dibutuhkan sel punca *PDL* sehat dan sel punca *PDL* yang diisolasi dari gigi periodontitis pada proses osteogenesis adalah berbeda. Agaknya kemungkinan bahwa keparahan kerusakan tulang alveolar atau keparahan penyakit periodontal sangat mempengaruhi kemampuan sel punca untuk berproliferasi dalam menerima induksi suatu bahan regeneratif setelah dipapar kitosan.

Gambar 2 hasil uji *MTT* pada pengamatan panjang gelombang 490 nm terlihat viabilitas sel punca tertinggi pada kelompok sel punca *PDL* sehat yang diinduksi kitosan 0,15% ($p < 0,001$) artinya pada konsentrasi tersebut kitosan merangsang pro-liferasi sel punca *PDL* sehat. Viabilitas sel punca yang dipapar kitosan pada konsentrasi 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,25 terlihat di bawah kontrol. Pada kelompok sel punca *PDL* yang diisolasi dari penderita periodontitis terlihat di bawah kontrol. Dari hasil

penelitian ini juga menunjukkan perlunya pertimbangan klinis yang teliti dalam mempertahankan gigi dengan kelainan periodontal pada kerusakan lebih dari sepertiga akar, karena kemampuan regenerasi sel punca pada keadaan ini telah menurun.

Dapat disimpulkan bahwa paparan kitosan pada sel punca ligamentum periodontal gigi yang sehat beregenerasi lebih baik daripada paparan kitosan pada sel punca yang berasal dari gigi periodontitis. Paparan kitosan 0,15% pada sel punca *PDL* menunjukkan viabilitas sel tertinggi artinya pada konsentrasi tersebut kitosan memiliki efek tertinggi dalam menstimuli proliferasi sel. Kitosan terbukti tidak toksik terhadap sel punca ligamentum periodontal manusia, dan mempunyai efek dalam meningkatkan proses osteogenesis sel punca ligamentum periodontal

Daftar Pustaka

1. Syafril Y. The Diagnosis of periodontal diseases in periodontal clinic, Dental Hospital, University of Indonesia. In: Bartold PM. Current trends in periodontal diagnosis. Diseases recognition and management. Brisbane. Asian Pasific Society of Periodontology. 2003: 34-38.
2. Beck JD, Arbes SJ. Epidemiology of gingival and periodontal diseases. In Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranza's Clinical Periodontology. St Louis: Saunders, 2006; 110-31.
3. Albandar J M, Tinoco E M. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. Periodontol 2000 2002; 29: 153-76.
4. Carranza FA, Henry HT, and David L, Cochran. Reconstructive periodontal surgery. Clinical Periodontology 10 ed. Philadelphia: Saunders, 2006: 968-90.
5. Kinane D F, J. L, Trombelli L. Chronic periodontitis In Lindhe J, Lang NP, Karring T. Clinical periodontology and implant dentistry. 5th Ed, Oxford UK Blackwell Munksgaard, 2008: 420-27.
6. Bhongade M, L., Tiwari I, R., A Comparative evaluation of the effectiveness of an anorganic bone matrix/cell binding p

10. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Barthold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-55.
11. Fwu-Long Mi, Chin-Tsung Huang, Hsiang-Fa Liang, Mei-Chin Chen, Ya-Ling Chiu, Chun-Hung Chen, et al. Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by naturally occurring cross-linking agent, aglycone genipocidic acid. *J. Agric Food Chem* 2006; 54: 3290-96.
12. Syafril Y, Endang Winiati B, BM. B. Prospek pemberian Poly-N- Acetyl glycosaminoglycan (chitosan) dari limbah kulit udang pada osteogenesis stem sel ligamen periodontal. (Unpublished). 2009.
13. Yamada S, Ganno T, Ohara N, Hayashi Y. Chitosan monomer accelerates alkaline phosphatase activity on human osteoblastic cells under hypofunctional conditions. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83(2): 290-5.
14. Matsunaga T, Yanagiguchi K, Yamada S, Ohara N, Ikeda T, Hayashi Y. Chitosan monomer promotes tissue regeneration on dental pulp wounds. *J Biomed Mater Res A* 2006 15; 76(4): 711-20.
15. Polimeni G, Albandar JM, Wikesjo UME. Prognostic factors for alveolar regeneration: effect of space provision. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 951-54.
16. 17. Satsangi ASN, Glover R, Satsangi RK, Ong JL. Osteoblast response to phospholipid modified titanium surface. *Biomaterials* Nov; 2003; 24(25): 4585-9.
17. Katalinich M. Characterization of chitosan films for cell culture applications. University of Maine, 2001: 2-24.