

## Research Report

## Perbandingan sitotoksitas tiga jenis algyrogel terhadap sel fibroblas

*(Citotoxicity comparation of three types of algyrogel on fibroblast cells)*

Stefany Elan Saktiyawardani,<sup>1</sup> Hardono Jaya Lauson,<sup>1</sup> Anugerah Pekerti Astamurtiningrum,<sup>1</sup> Mahadna Aulia Rahmah,<sup>1</sup> Pramana Pananja Putra<sup>2</sup> dan Juni Handajani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada

<sup>2</sup> Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

Yogyakarta - Indonesia

### ABSTRACT

**Background:** The prevalence of osteoporosis and bone defects in the world and Indonesia increase each year. Algyrogel is a alginate-based hydrogel material recently very popular used as a bone substitute through injectable bone substitute (IBS) method. One of advantages algyrogel is biocompatibility to the body tissues. Some natural-based polymer (alginate, chitosan, dan hyaluronat) have different biocompatibility. **Purpose:** The study was aimed to determine the cytotoxicity of three types algyrogel against fibroblast cells. **Methods:** This study used three types algyrogel, there were algyrogel containing alginate (Alg), a mixture of alginate with chitosan (Alg/Ch), and a mixture of alginate with hyaluronic acid (Alg/Ha). Each type algyrogel was exposed in the Vero cell line of fibroblast with volume 2  $\mu$ L; 4  $\mu$ L; 6  $\mu$ L; 8  $\mu$ L; 10  $\mu$ L; 12  $\mu$ L; 14  $\mu$ L; 16  $\mu$ L; 18  $\mu$ L; and 20  $\mu$ L respectively. The cytotoxicity performed by MTT method to determine the percentage of cell death. The optical density was measured by an ELISA plate reader then data was analyzed using ANOVA and probit. **Results:** The percentage of cell death in all groups of algyrogel have below 30%. LC<sub>50</sub> value at Alg was 651.017 mg/mL (21.56%), Alg/Ch was 280.478 mg/mL (20.91%), and Alg/Ha was 1054.094 mg/mL (17.2%). **Conclusion:** Alg/Ha has the lowest cytotoxicity on fibroblast cells and may have potential as an osteoconductor-synthetic bone product.

**Key words:** Algyrogel, cytotoxicity, fibroblasts, bone synthesis

### ABSTRAK

**Latar belakang:** Prevalensi osteoporosis dan cacat tulang di Indonesia maupun dunia semakin meningkat tiap tahunnya. Algyrogel sebagai bahan hidrogel yang berbasis alginat akhir-akhir ini sangat populer digunakan sebagai bahan pengganti tulang melalui metode Injectable Bone Substitute. Kelebihan algyrogel antara lain biokompatibel terhadap jaringan tubuh. Beberapa hidrogel berbasis polimer alami (alginat, chitosan, dan hyaluronat) memiliki perbedaan biokompatibilitas. **Tujuan:** Studi ini bertujuan meneliti sitotoksitas tiga jenis algyrogel terhadap sel fibroblas. **Metode:** Penelitian ini menggunakan 3 jenis algyrogel yaitu algyrogel dengan kandungan alginat (Alg), campuran alginat dengan chitosan (Alg/Ch), dan campuran alginat dengan asam hyaluronat (Alg/Ha). Setiap jenis algyrogel dipaparkan pada sel fibroblas jenis Vero cell line dengan volume 2  $\mu$ L; 4  $\mu$ L; 6  $\mu$ L; 8  $\mu$ L; 10  $\mu$ L; 12  $\mu$ L; 14  $\mu$ L; 16  $\mu$ L; 18  $\mu$ L; dan 20  $\mu$ L. Pengujian sitotoksitas dilakukan dengan metode MTT untuk mengetahui persentase kematian sel. Penghitungan optical density menggunakan ELISA plate reader lalu data diuji Anova dan probit. **Hasil:** Persentase kematian sel pada semua jenis algyrogel memiliki angka dibawah 30%. Nilai LC<sub>50</sub> pada Alg sebesar 651,017  $\mu$ g/ $\mu$ L (21,56%), Alg/Ch sebesar 280,478  $\mu$ g/ $\mu$ L (20.91%), dan

*Alg/Ha sebesar 1054,094 µg/µL (17,2%).* **Simpulan:** *Alg/Ha memiliki sitotoksitas paling rendah pada sel fibroblas sehingga memiliki potensi sebagai produk osteokonduktor sintesis tulang.*

**Kata kunci:** *Algyrogel, sitotoksitas, fibroblas, sintesis tulang*

Korespondensi (*correspondence*): Juni Handajani, Bagian Biologi Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada. Jl. Denta I, Sekip Utara Yogyakarta 55281, Indonesia. E-mail: junihandajani@yahoo.com

## PENDAHULUAN

Tindakan pencabutan gigi sering dilakukan dalam bidang kedokteran gigi dan dapat menimbulkan perlukaan pada tulang alveolar maupun mukosa rongga mulut. Pencabutan gigi dapat menyebabkan kehilangan tulang secara progresif.<sup>1</sup> Kehilangan tulang juga dapat disebabkan osteoporosis maupun kecacatan tulang. Prevalensi kehilangan tulang di Indonesia dan dunia menunjukkan peningkatan prevalensi setiap tahunnya.

Hasil analisis data dan resiko osteoporosis yang dilakukan Departemen Kesehatan RI bersama dengan PT. Fonterea Brands Indonesia tahun 2006 menunjukkan prevalensi osteoporosis di Indonesia telah mencapai 41,75%. Hal ini berarti setiap 2 dari 5 penduduk beresiko terkena osteoporosis, lebih tinggi dari prevalensi dunia yang hanya 1 dari 3 beresiko osteoporosis.<sup>2</sup> Data sistem informasi rumah sakit (SIRS) pada tahun 2010 menunjukkan angka insidensi patah tulang paha atas tercatat sekitar 200/100.000 kasus, pada wanita dan pria usia 40 tahun atau lebih yang diakibatkan oleh osteoporosis. World Health Organization (WHO) menunjukkan bahwa 50% patah tulang paha atas akan menimbulkan kecacatan seumur hidup dan menyebabkan angka kematian mencapai 30% pada tahun pertama akibat komplikasi imobilisasi. Data ini belum termasuk patah tulang belakang dan lengan bawah serta yang tidak memperoleh perawatan medis di rumah sakit. Selain itu, hasil *review* retrospektif yang dilakukan pada 59 pasien fraktur maksilofasial usia 60 tahun atau lebih di sebuah *trauma centre* antara tahun 1989 dan 2000, diketahui bahwa semakin parah kondisi osteoporosis, semakin besar kemungkinan jumlah fraktur maksilofasial yang dialami. Benturan ringan akibat terjatuh pada penderita osteoporosis yang parah dapat menimbulkan fraktur maksilofasial multipel sebagaimana yang terjadi pada kecelakaan kendaraan bermotor.<sup>3</sup>

Bahan pengganti tulang sangat dibutuhkan untuk merekonstruksi morfologi anatomi dan memulihkan stabilitas tulang yang rusak.<sup>4</sup> Kebutuhan bahan pengganti tulang saat ini dikembangkan dalam bentuk sediaan injeksi sebagai pengisi rongga tulang. Kelebihan sediaan bentuk injeksi antara lain dapat dibentuk sesuai dengan bentuk rongga tulang yang akan diisi, steril, dan siap pakai.<sup>5</sup>

Bahan hidrogel saat ini sedang dikembangkan untuk membuat bahan pengganti tulang sintesis dalam sediaan injeksi.<sup>6</sup> Syarat hidrogel sediaan injeksi antara lain hanya menimbulkan respon inflamasi maupun respon imun ringan, menyerupai sifat mekanis jaringan tubuh,

membantu infiltrasi dan interaksi sel yang dibutuhkan, menyediakan sinyal selular melalui molekul bioaktif, dan dapat didegradasikan seiring perbaikan jaringan.<sup>7</sup> Hidrogel berbasis polimer alami bersifat biokompatibel dan hanya memiliki stimulasi ringan terhadap respon inflamasi maupun respon imun tubuh. Polimer alami yang sering digunakan dalam bidang medis antara lain, alginat, *chitosan*, dan hyaluronat.<sup>8,9</sup> Ketiga polimer tersebut dibantu dengan bahan *crosslinking* dapat memenuhi syarat dari hidrogel sediaan injeksi.

*Algyrogel* merupakan bahan hidrogel berbasis alginat. Komponen yang dapat ditambahkan dalam algyrogel antara lain cerium (Ce), *chitosan* (Ch), dan hidroksiapatit (HA). Cerium diketahui dapat meningkatkan aktivitas antimikrobal dari hidrogel. HA merupakan komponen utama jaringan tulang dan gigi. Sifat utama HA antara lain memiliki biokompatibilitas, dapat berikatan dengan ikatan tulang, dan dapat tumbuh serta berkembang bersama-sama dengan tulang atau regenerasi tulang yang baik.<sup>6,10,11</sup>

Hidrogel berbasis alginat yang dikombinasikan dengan polisakarida alami seringkali dikaji dalam berbagai publikasi. Baysal *et al.*,<sup>12</sup> mengkaji pembuatan, karakterisasi, dan aplikasi dari hidrogel *crosslinked* berbasis kombinasi alginat dan *chitosan*. Morais<sup>6</sup> dalam penelitiannya melaporkan perbandingan sitotoksitas *alginate* (Alg), *alginate/chitosan* (Alg/Ch), dan *alginate/hyaluronat* (Alg/Ha) terhadap sel MG63 sebagai sel osteoblas manusia. Pada penelitian tersebut ke dalam sumuran yang berisi sel MG63 diberikan masing-masing 0,6 µL Alg, Alg/Ch, dan Alg/Ha. Dari hasil penelitian ketiga jenis *algyrogel* terhadap sel MG63 diketahui bahwa Alg/Ha memiliki sitotoksitas terendah.

Beberapa hasil penelitian belum menyebutkan konsentrasi yang aman atau sitotoksitas yang paling rendah dari ketiga jenis *algyrogel* terhadap sel fibroblast, yaitu sel yang memproduksi serat kolagen pada lapisan periosteum dan dapat diketahui perubahannya baik yang fisiologis maupun patologis.<sup>10</sup> Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk membandingkan sitotoksitas tiga jenis algyrogel terhadap sel fibroblas.

## BAHAN DAN METODE

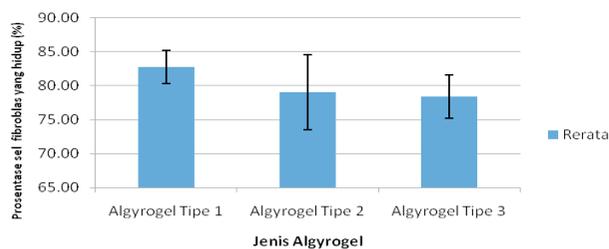
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan subjek penelitian berupa kultur sel fibroblas jenis *vero cell line* yang diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT)

Unit 2 Universitas Gadjah Mada (UGM). Prosedur penelitian telah mendapat persetujuan dari Tim Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (No. 594/KKEP/FKG-UGM/EC/2012 tanggal 27 Maret 2014).

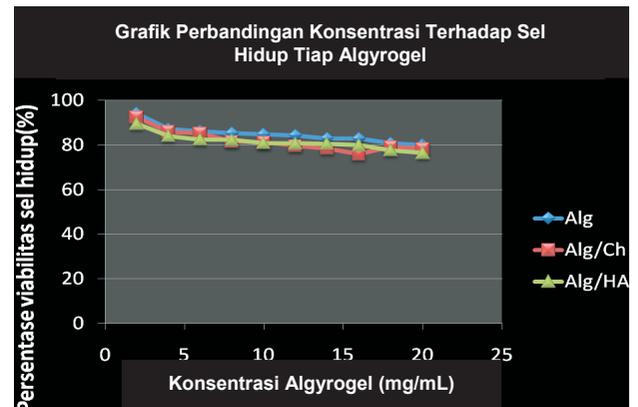
Bahan penelitian yang digunakan adalah natrium alginat, natrium hialuronat, *chitosan* HCl, *HA sintesis bovine* (Laboratorium Bioceramics UGM), Cerium (III) nitrat ( $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ ), dan  $\text{CaCl}_2$ . Pembuatan 3 jenis *algyrogel* sesuai Morais<sup>6</sup> diawali dengan pembuatan larutan *crosslink* yaitu larutan penstabil menggunakan  $\text{CaCl}_2$  dan  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ . Alg dibuat dengan cara menambahkan larutan *crosslink* pada natrium alginat 7% dengan perbandingan 1:4. Alg/HA dibuat dengan menambahkan natrium hialuronat 7% pada larutan *crosslink* kemudian larutan natrium alginat dengan perbandingan 4:1:4. *Chitosan* HCL 0,5% ditambahkan pada larutan *crosslink* kemudian larutan natrium alginat dengan perbandingan 4:1:4 untuk menghasilkan Alg/Ch.

Pembuatan *injectable bone substitute* (IBS) dengan cara menambahkan HA pada ketiga jenis *algyrogel* dengan proporsi 41% *algyrogel* dan 59% HA. Setelah itu masing-masing IBS dengan volume 0,1  $\mu\text{L}$ ; 0,2  $\mu\text{L}$ ; 0,3  $\mu\text{L}$ ; 0,4  $\mu\text{L}$ ; 0,5  $\mu\text{L}$ ; 0,6  $\mu\text{L}$ ; 0,7  $\mu\text{L}$ ; 0,8  $\mu\text{L}$ ; 0,9  $\mu\text{L}$ ; dan 1  $\mu\text{L}$  diencerkan 20 kali dengan menggunakan akuades bersuhu 60<sup>0</sup> C. Pada penelitian ini menggunakan hidroksiapatit *sintesis bovine* yang berasal dari tulang sapi produksi Laboratorium Bioceramic Fakultas Teknik Universitas Gadjah Mada.

Pengujian MTT *assay* dimulai dengan memasukkan sel fibroblas ke dalam sumuran *plate 96 well* sebanyak  $2 \times 10^4$  sel/ml dalam suspensi sebanyak 100  $\mu\text{l}$ . Ketiga *algyrogel* dimasukkan ke dalam sumuran yang berbeda dengan volume 2  $\mu\text{L}$ ; 4  $\mu\text{L}$ ; 6  $\mu\text{L}$ ; 8  $\mu\text{L}$ ; 10  $\mu\text{L}$ ; 12  $\mu\text{L}$ ; 14  $\mu\text{L}$ ; 16  $\mu\text{L}$ ; 18  $\mu\text{L}$ ; 20  $\mu\text{L}$  dan dilakukan triplet. Uji tersebut dilakukan dengan lama perlakuan 24 jam. Jika waktu perlakuan telah tercapai, maka dilakukan uji MTT pada sel fibroblas dengan menambahkan reagen MTT, lalu diinkubasi selama 5 jam pada suhu 37<sup>o</sup> C. Medium dibuang perlahan dan ditambahkan 200  $\mu\text{l}$  *dimethyl sulfoxide* (DMSO) ke setiap sumuran lalu dibaca pada  $\lambda$  570 nm menggunakan *elisa reader*, sehingga diperoleh *optical density*. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji-t untuk mengetahui perbandingan sitotoksitas ketiga



**Gambar 1.** Rerata dan standar deviasi tiga jenis *algyrogel* terhadap prosentase sel fibroblas hidup.



**Gambar 2.** Grafik perbandingan konsentrasi jenis *algyrogel* terhadap sitotoksitas sel fibroblas. Tampak ketiga jenis *algyrogel* memiliki pola grafik yang sama antara konsentrasi *algyrogel* terhadap viabilitas sel fibroblas.

**Tabel 1.** Hasil uji-t (p) perbandingan 3 jenis *algyrogel* terhadap viabilitas sel fibroblas

Jenis <i>algyrogel</i>	Alg/HA	Alg/Ch	Alg
Alg/HA	-	0,68	0,03
Alg/Ch	0,68	-	0,75
Alg	0,03	0,75	-

**Tabel 2.** Nilai  $\text{LC}_{50}$  masing-masing jenis *algyrogel* menggunakan analisis probit.

Jenis <i>algyrogel</i>	Nilai $\text{LC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )
Alg	651,017
Alg/Ch	280,478
Alg/HA	1054,094

*algyrogel*. Selanjutnya data dilakukan analisis probit untuk mengetahui nilai *lethal concentration 50%* ( $\text{LC}_{50}$ ). Analisis probit merupakan salah satu tipe dari analisis regresi yang digunakan untuk menentukan toksisitas relatif suatu bahan kimia pada makhluk hidup.<sup>14</sup> Menurut ISO 10993-5,<sup>15</sup> suatu bahan dapat dikategorikan tidak toksik apabila jumlah kematian sel kurang dari 30%, sehingga *algyrogel* aman jika prosentase kehidupan sel lebih dari 70 %.

## HASIL

Hasil rerata dan standar deviasi prosentase sel fibroblas yang hidup sesuai jenis *algyrogel* ditampilkan pada Gambar 1. Hasil penelitian menunjukkan prosentase sel fibroblas yang hidup, terendah terlihat pada jenis Alg, sedangkan pada jenis Alg/HA tampak prosentase sel fibroblas yang hidup diperoleh lebih tinggi daripada ketiga jenis *algyrogel* (Gambar 1). Pada penelitian ini diuji 10 konsentrasi terendah pada masing-masing *algyrogel* (2  $\mu\text{g}/$

$\mu\text{L}$ ; 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 12  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 14  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; 16  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ; dan 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) untuk mengetahui dosis yang aman atau toksisitas yang paling rendah terhadap sel fibroblas. Hasil pengujian prosentase sel fibroblas hidup pada masing-masing konsentrasi dan hasil uji-t perbandingan masing-masing jenis algyrogel ditampilkan pada Gambar 2 dan Tabel 1.

Perbandingan viabilitas sel fibroblas antara Alg/Ha dan Alg menunjukkan hasil bermakna, maka asam hyaluronat maupun *chitosan* berpengaruh terhadap tingkat kehidupan sel fibroblas (Tabel 1). Perbandingan viabilitas sel fibroblas antara Alg/Ch dengan Alg maupun Alg/Ha menunjukkan hasil tidak bermakna. Hasil perhitungan nilai  $\text{LC}_{50}$  (*Lethal Concentration 50%*) dari setiap jenis hidrogel dihitung dengan analisis probit (Tabel 2).

Hasil Tabel 2 menunjukkan semua jenis Algyrogel memiliki  $\text{LC}_{50} > 60 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sehingga dapat dikatakan bahwa ketiga algyrogel memiliki tingkat sitotoksisitas yang rendah terhadap sel fibroblas. Hasil Gambar 1 dan Tabel 2 mengindikasikan semua jenis *algyrogel* yang digunakan pada penelitian ini dapat dikategorikan aman digunakan untuk sel fibroblas.

## PEMBAHASAN

Sel fibroblas diketahui sebagai sel yang memproduksi serabut kolagen pada lapisan periosteum, merupakan sel normal yang dapat diketahui perubahannya baik yang fisiologis maupun patologis.<sup>10</sup> Rerata prosentase sel fibroblas hidup tertinggi diperoleh pada jenis algyrogel Alg/Ha kemudian diikuti Alg/Ch sedangkan yang terendah pada jenis *algyrogel* Alg (Gambar 1). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa penambahan material asam hyaluronat maupun *chitosan* diduga dapat meningkatkan viabilitas kehidupan sel fibroblas. Seperti dikemukakan oleh Andersen<sup>11</sup> bahwa alginat memiliki sifat biokompatibel pada tulang karena dapat didegradasi dengan baik. Namun, alginat tidak dapat memicu perlekatan sel, sehingga sel yang membutuhkan substrat untuk perlekatan tidak dapat bertahan dalam gel alginat.

Penambahan *chitosan* dan hyaluronat pada *algyrogel* dapat meningkatkan viabilitas sel karena keunggulan kedua bahan tersebut yang tahan terhadap perubahan kimia dan enzimatis, bertindak sebagai adesif karena muatan positifnya pada pH fisiologis, *biodegradable*, biokompatibel, dan siap diolah menjadi berbagai bentuk. *Chitosan* memiliki karakteristik non-toksik, non-antigenik, biofungsional dan osteokonduktif. Selain itu, *chitosan* mampu memicu proliferasi dan diferensiasi sel. Hyaluronat dapat ditemukan pada jaringan ikat, ditemukan dalam konsentrasi tinggi pada kalus, dan dapat menghambat diferensiasi dari osteoklas. Polimer ini merupakan penyusun utama dari matriks ekstraseluler tubuh. Penggunaan  $\text{CaCl}_2$  dan  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  pada

larutan *crosslink* bertujuan membuat sediaan gel menjadi stabil dengan  $\text{CaCl}_2$ , sedangkan  $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$  memiliki fungsi sebagai antimikroba.<sup>6,12,13</sup>

Hasil persentase kematian sel pada semua kelompok *algyrogel* dan pada semua konsentrasi menunjukkan angka dibawah 30%. ISO 109993-5 menyatakan bahwa suatu bahan dapat dikategorikan tidak toksik apabila jumlah kematian sel kurang dari 30%.<sup>15</sup> Hasil ini menunjukkan bahwa *algyrogel* dengan menggunakan HA *synthesis bovine* yang berasal dari tulang sapi produksi Laboratorium Bioceramic Fakultas Teknik Universitas Gadjah Mada aman digunakan pada sel fibroblas.

*Lethal concentration 50%* ( $\text{LC}_{50}$ ) adalah konsentrasi suatu bahan pada suatu media yang dapat membunuh 50% sel yang diuji.<sup>17</sup> Nilai  $\text{LC}_{50}$  dapat ditentukan dengan menggunakan analisis probit.<sup>14</sup> Hidrogel termasuk kategori aman jika memiliki sitotoksisitas ( $\text{LC}_{50}$ ) sebesar 60  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  atau lebih.<sup>16</sup> Hasil penelitian ini menunjukkan semua *algyrogel* (Alg, Alg/Ch, dan Alg/Ha) memiliki  $\text{LC}_{50} > 60 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  sehingga aman bagi tubuh. Berdasarkan hasil yang tersaji pada Tabel 2, hidrogel campuran alginat/hyaluronat (Alg/Ha) memiliki tingkat keamanan yang paling tinggi, ditandai dengan  $\text{LC}_{50}$  terbesar.<sup>15,16</sup> Mekanisme hidrogel Alg/Ha memiliki tingkat keamanan yang paling tinggi diduga karena peran biologis dari hyaluronat (Ha) sebagai hasil interaksi dengan sejumlah *Ha-binding protein* yang disebut *hyaladherins*. Hyaluronat diketahui dapat berikatan dengan reseptor spesifik *cell-surface* antara lain CD44, *receptor for HA-mediated motility* (RHAMM) dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). Interaksi Ha dengan reseptor tersebut dapat menginduksi transduksi berbagai signal intraseluler untuk pengaturan berbagai proses seluler seperti morfogenesis, penyembuhan luka, dan inflamasi serta keterlibatannya pada saat kondisi patologis. Dari hasil penelitian ini diduga hyaluronat memiliki interaksi dengan reseptor spesifik *cell-surface* pada fibroblas sehingga terjadi *Ha-binding* dengan fibroblas. Beberapa reseptor yang dibutuhkan pada saat *Ha-binding* diketahui dapat diekspresikan oleh fibroblas antara lain RHAMM dan ICAM-1.<sup>18</sup> Penelitian ini menunjukkan bahwa hidrogel Alg/Ha memiliki sitotoksisitas terhadap sel fibroblas yang paling rendah dibandingkan hidrogel Alg/Ch maupun hidrogel Alg sehingga memiliki potensi menjadi produk osteokondutor sintesis tulang yang aman dan bermanfaat.

---

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Departemen Pendidikan Tinggi atas Dana Program Kreativitas Mahasiswa bidang Penelitian (PKM-P) 2014. Terimakasih kepada drg. Heni Susilowati, M.Kes., Ph.D, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada atas masukan dan bimbingannya.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Alveolar wound healing after implantation with a pool of commercially available Bovine Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) - A histometric study in rats. *Braz Dent J.* 2007; 18(1): 29-33.
2. Sihombing HC. Karakteristik kasus menopause osteoporosis di Makmal Terpadu Imunoendokrinologi FK UI tahun 2006-2008. Jakarta: Universitas Indonesia; 2009. p.25-30.
3. Werning JW, Downey NM, Brinker RA, Khuder SA, Davis WJ, Rubin AM, Elsamaloty HM. The impact of osteoporosis on patients with maxillofacial trauma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 130: 353-6.
4. Bintarti TW, Izak JR, Ady J. Sintesis dan karakterisasi bone graft berbasis hidroksiapatit dan alginat. *JFT.* 2013; 1(2): 108-24.
5. Warastuti Y, Abbas B. Sintesis dan karakterisasi pasta *injectable bone substitute* iradiasi berbasis hidroksiapatit. *J Ilmiah Apl Isotop Radiasi.* 2011; 7(2): 74-5.
6. Morais DS, Rodrigues MA, Lopes MA, Coelho MJ, Mauricio AC, Gomes R, Amorim I, Ferraz MP, Santos JD, Botelho CM. Biological evaluation of alginate-based hydrogels, with antimicrobial features by Ce(III) incorporation, as vehicles for a bone substitute. *J Mater Sci Mater Med.* 2013; 24: 2145–55.
7. Overstreet DJ, Duta D, Stabenfeldt SE, Vernon BL. Injectable Hydrogels. *Polymer Physics.* 2012; 50: 881-903.
8. Zao W, Jin X, Chong Y, Liu Y, Fu J. Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J Chem Technol Biotechnol.* 2013; 88: 327–39.
9. Rahman K. Pengaruh lama milling pada sintesis biokeramik Hydroxyapatite (HA) dengan metode solid-state reaction terhadap kekristalan, mikrostruktur, dan kuat tekan. Available at: <http://karya-ilmiah.um.ac.id/index.php/fisika/article/view/21069>. Diakses pada 12 Oktober 2013.
10. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology Text & Atlas.* Edisi 11. USA: McGrawHill; 2005. p. 95.
11. Andersen T, Strand F, Alsberg C. Alginates as biomaterials in tissue engineering. *J Carbohydrate Chem.* 2012; 37: 227-58.
12. Baysal K, Aroguz A, Adiguzel Z, Baysal B. Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: preparation, characterization and application for cell growth purposes. *Int J Biol Macromol.* 2013; 59: 342–48.
13. Muzzarelli RAA. Chitosan composites with inorganics, morphogenetic proteins and stem cells, for bone regeneration, carbohydrate polymers. 2011; 83(4): 1433-45.
14. Vincent, K. Probit analysis. Available at: <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>. Diakses pada 11 Oktober 2014.
15. ISO 10993-5. *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Test for in vitro cytotoxicity*, International Organization for Standardization, Geneva. 2009.
16. Xu X, Jha AK, Harrington DA, Carson MCF, Jia X. Hyaluronic acid-based hydrogels: form a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter.* 2012; 8(12): 3280-94.
17. Sharma PD, *Environmental Biology & Toxicology.* India: Rastogi Publications; 2005. P.122.
18. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling properties of Hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002; 277: 4589-92.