

Enhancement of Osteoconductivity of TNTZ by Hydrothermal Treatment

Zuldesmi^{1,*}, Masazumi Okido

¹Prodi Teknik Mesin, Fakultas Teknik, Universitas Negeri Manado

²EcoTopia Science Institute, Nagoya University, Nagoya, Japan

*Corresponding author: zuldesmi@unima.ac.id

Abstract. The surface wettability of implants is a significant factor in their osteoconductivity because it influences the adsorption of cell-attached proteins onto the surface. In this study, a single-step hydrothermal surface treatment using distilled water at a temperature of 180 °C for 3 h was applied Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ) mass%) and compared with as-polished TNTZ and with implants produced by anodizing TNTZ in 0.1 M of H₃PO₄ with applied voltages of 150 V at a scanning rate of 0.1 V s⁻¹. The surface-treated samples were stored in a five time phosphate buffered saline (×5 PBS(-)) solution to prevent increasing the water contact angle (WCA) with time. The surface characteristics were evaluated using scanning electron microscopy, X-ray diffraction, Auger electron spectroscopy, surface roughness, and contact angle measurement using a 2 μL droplet of distilled water. The relationship between WCA and osteoconductivity at various surface modifications was examined using in vivo tests. The results showed that a superhydrophilic surface with a WCA ≤ 10° and a high osteoconductivity (RB-I) of up to 50% in the cortical bone part, about four times higher than the as-polished TNTZ, were provided by the combination of the hydrothermal surface treatment and storage in ×5 of PBS(-).

Abstrak. Wettabilitas permukaan merupakan faktor krusial dari osteoconductivitas implan karena berpengaruh terhadap penyerapan protein pada pelekatan sel. Pada penelitian ini, perlakuan hydrothermal menggunakan air destilasi pada temperatur 180 °C selama 3 h diaplikasikan kepada TNTZ dan dibandingkan dengan TNTZ pada kondisi as-polished dan as-anodized pada larutan 0.1 M of H₃PO₄ dengan tegangan 150 V pada scanning rate of 0.1 V s⁻¹. Karakteristik permukaan dievaluasi menggunakan scanning electron microscopy, X-ray diffraction, Auger electron spectroscopy, surface roughness, and pengukuran contact angle menggunakan 2 μL droplet of distilled water. Hubungan antara WCA dan osteoconductivity pada berbagai modifikasi permukaan dilakukan melalui in vivo tes. Hasilnya menunjukkan bahwa permukaan yang superhydrophilic dengan WCA ≤ 10° dan osteoconductivity yang tinggi meningkat sampai 50 % pada cortical bone part, sekitar 4 kali lebih tinggi dibanding dengan as-polished TNTZ diperoleh dari kombinasi antara hydrothermal treatment dan penyimpanan dalam ×5 PBS(-).

Kata kunci: TNTZ, wettability, osteoconductivity, hydrophilic, superhydrophilic

© 2018. BKSTM-Indonesia. All rights reserved

Pendahuluan

Biomaterial logam dan paduannya banyak dipilih sebagai bahan dasar pembuatan implan ortopedi, karena mempunyai kompatibilitas biomekanik, kompatibilitas biokimia dan kompatibilitas biologi yang cukup baik [1,2]. Sekitar 70-80% biomaterial logam yang banyak digunakan sebagai bahan dasar implan adalah SUS 316L stainless steel, paduan Co-Cr, dan paduan titanium., memiliki modulus elastisitas berturut-turut, 200 GPa, 220-230 GPa dan 110 GPa. Diantara material tersebut, titanium paduan mendapat perhatian besar karena mempunyai sifat unggul seperti biokompatibilitas yang tinggi, ketahanan korosi yang sangat baik, kekuatan tarik yang tinggi dengan modulus elastis yang rendah. Pada saat ini, salah satu paduan titanium yang paling banyak digunakan adalah paduan titanium β-type Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ) karena selain mempunyai kekuatan yang tinggi dengan modulus

elastisitas yang rendah, material ini mengandung elemen anti toksik dan anti alergi seperti Nb, Ta dan Zr [3-6]. Meskipun memiliki sifat-sifat yang unggul, namun titanium paduan memiliki bone-forming properties (osteoconductivity) yang kurang baik. Osteoconductivity dari implan material biasanya dipengaruhi oleh karakteristik permukaannya. Sangat penting untuk memodifikasi karakteristik permukaan yang bertujuan untuk meningkatkan osteoconductivitas implan material [4]. Kekasaran permukaan dan *hydrophilicity* merupakan dua faktor yang paling penting dari biomaterial karena memberikan pengaruh yang cukup kuat terhadap penyerapan protein dan pelekatan sel setelah proses implantasi [7-9]. Berbagai jenis perlakuan permukaan sudah banyak dilakukan untuk mendapatkan permukaan yang baik dan hydrophilic, seperti; *ultraviolet radiation*, *plasma radiation*, *anodizing*, *thermal oxidation* dan *hydrothermal treatment*. Dari penelitian

sebelumnya diketahui bahwa osteoconductivitas *pure titanium* meningkat secara signifikan melalui proses perlakuan permukaan *single-step hydrothermal treatment* [10]. Berdasarkan referensi tersebut, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui apakah perlakuan *hydrothermal* juga efektif untuk memperbaiki osteoconductivitas TNTZ dan membandingkannya dengan material TNTZ yang sudah dianodizing. Investigasi tentang osteoconductivitas TNTZ dilakukan melalui tes *in vivo*.

Metode Penelitian

Material yang digunakan. Plat Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (TNTZ) dengan luas permukaan 1.1 cm² digunakan sebagai spesimen untuk perlakuan permukaan (*anodizing dan hydrothermal treatment*) dan spesimen berupa batangan dengan diameter 2 mm dan panjang 5 mm digunakan untuk *in vivo* testing. Komposisi kimia dari material TNTZ ditunjukkan pada tabel berikut:

Table 1 Komposisi kimia Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr (mass %)

Ti	Ta	Zr	Fe	C	N	O	Nb
Bal.	12.2	4.3	0.05	0.02	0.04	0.10	29.2

Pre-treatment spesimen uji. Sebelum dilakukan perlakuan permukaan, spesimen uji di amplas dengan kertas amplas sampai mesh #2000. Kemudian diikuti dengan proses pemolesan (*polishing*) menggunakan partikel Al₂O₃ berukuran 0.05 µm. Selanjutnya, spesimen dibersihkan dengan ethanol dalam *ultrasonic cleaner* selama 5 menit, diakhiri dengan pengeringan di udara. Setelah pre-treatment, beberapa perlakuan permukaan berikut ini dilakukan.

Anodic Oxidation. Proses anodizing dilakukan pada tegangan 100V dengan laju 0.1 Vs⁻¹. Sampel TNTZ dan Pt coil berfungsi sebagai anoda dan katoda. Larutan elektrolit yang digunakan adalah 0.1M H₃PO₄ yang diaduk menggunakan magnetic stirrer selama proses anodizing berlangsung. Kemudian, specimen disterilisasi menggunakan autoclave unit pada 121°C selama 20 menit.

Hydrothermal treatment. Sampel uji (TNTZ) di rendam di dalam gelas ukur 300 ml yang berisi air terdestilasi dan diletakkan dalam unit autoclave. Temperatur *hydrothermal* dari bejana di atur sampai 180 OC selama 180 menit. Setelah proses selesai, gelas ukur dikeluarkan dari unit autoclave

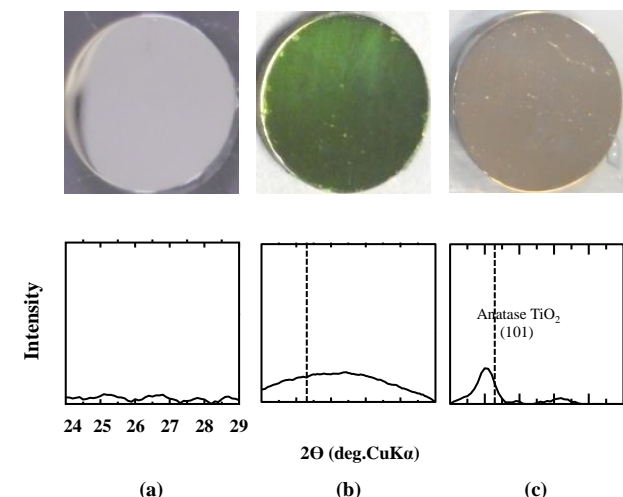
dan sampel dibiarkan dingin secara natural di dalam gelas ukur.

Karakterisasi Permukaan. Karakteristik permukaan dari semua sample yang sudah mengalami perlakuan permukaan di teliti dengan menggunakan SEM dan mikroskop optik. Lapisan film dianalisa dengan menggunakan XPS dan XRD. Kekasaran permukaan diukur dengan menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope* dengan daerah pengukuran 150 µm × 112 µm dan di tampilkan dalam bentuk kekasaran permukaan (Ra). Sudut kontak air (*Water contact angle/WCA*) diukur menggunakan 2 µL droplet air terdestilasi.

In vivo test. Semua sampel uji yang sudah di rendam dalam media tertentu (5X PBS) digunakan dalam *in vivo* testing. Dalam penelitian ini, metode yang digunakan untuk *in vivo* tes merujuk pada penelitian sebelumnya [11].

Hasil dan Pembahasan

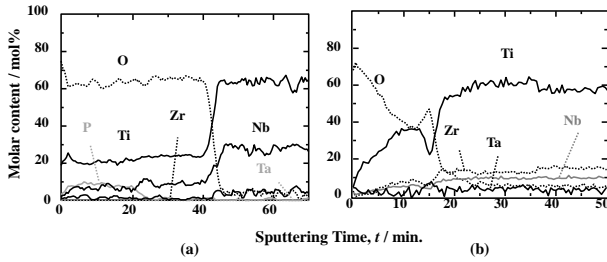
Gambar 1 menunjukkan variasi warna dari spesimen TNTZ baik sebelum (*as-polished*) dan setelah diperlakukan (*as-treated*) secara anodizing dan *hydrothermal*. Warna abu-abu metallic terlihat pada sampel TNTZ dalam kondisi *as-polished*. Setelah proses anodizing, spesimen TNTZ berubah warna menjadi hijau. Sementara, sampel menjadi berwarna keemasan ketika di lakukan proses *hydrothermal*.



Gambar 1. Photo dan XRD pattern sampel TNTZ pada berbagai perlakuan: (a) *as-polished*, (b) *as-anodized* dan (c) *as-hydrothermalealed*.

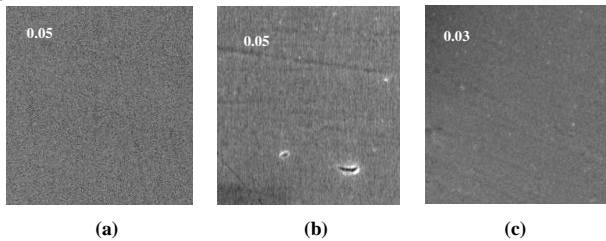
Perubahan warna ini menunjukkan bahwa lapisan oksidasi terbentuk selama proses anodizing dan *hydrothermal*. Hal ini dibuktikan dengan pola XRD pada kedua jenis sampel (tanpa perlakuan dan dengan perlakuan permukaan). Pada spesimen *as-treated*, tidak ditemukan oxide peaks selain anatase (TiO₂). Namun karena intensitas peak yang relative

lemah, maka peak yang terbentuk diperkirakan amorphous TiO_2 dan semakin membesar pada sampel TNTZ yang dianodizing. Disamping itu, hasil Auger spectroscopy juga menunjukkan bahwa elemen-elemen paduan dari TNTZ (Nb dan Cr) dan P (yang berasal dalam larutan H_3PO_4) berada pada permukaan spesimen dalam jumlah yang cukup besar (Gambar 2). Sebaliknya, permukaan as-hydrothermaled TNTZ mengandung sedikit elemen-elemen paduan.



Gambar 2. Depth profile TNTZ pada beberapa kondisi: (a) as-anodized dan (b) as-hydrothermaled.

Observasi dari SEM pada gambar 3 memperlihatkan bahwa permukaan yang dihasilkan relatif halus. Sampel TNTZ yang sudah diperlakukan (as-treated) menunjukkan nilai rata-rata kekasaran permukaan yang sama dengan sampel yang belum diperlakukan (as-polished) yaitu $Ra/\mu m < 0.01$.

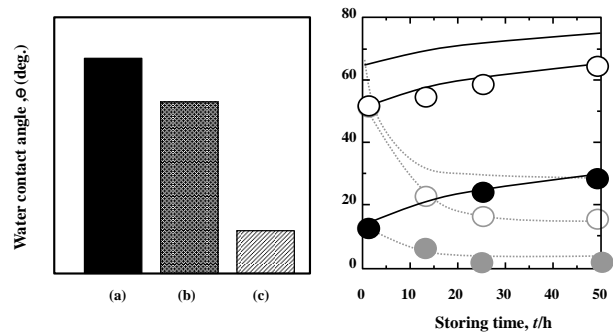


Gambar 3. Surface morphology dan kekasaran permukaan TNTZ: (a) as-polished, (b) as-anodized dan (c) as-hydrothermaled.

Sementara itu, dari hasil pengukuran sudut kontak (contact angle) diperoleh data bahwa sampel as-polished TNTZ memiliki permukaan yang hydrophobic dengan WCA berkisar 65 deg. Penurunan yang tidak terlalu signifikan terjadi pada TNTZ setelah dianodizing (menjadi 53 deg.). Hal ini menunjukkan bahwa proses anodizing tidak memberikan dampak yang begitu signifikan pada hydrophilicity permukaan TNTZ. Seperti yang sudah diketahui, besarnya jumlah penyerapan C-H dapat menyebabkan permukaan menjadi hydrophobic. Sebaliknya, permukaan TNTZ menjadi lebih hydrophilic ketika perlakuan hydrothermal diaplikasikan kepada permukaannya. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya penurunan

WCA yang cukup besar dibawah 15 deg. Laju absorb hydrocarbon (C-H) kemungkinan disebabkan karena keberadaan elemen-elemen paduannya.

Sangatlah penting untuk mempertahankan permukaan yang hydrophilic sampai operasi dilakukan, karena sifat hydrophilic permukaan dapat berubah seiring waktu [11]. Metode yang optimum perlu dipertimbangkan dalam mempersiapkan permukaan yang hydrophilic dan untuk mempertahankannya dengan cara memilih lingkungan penyimpanan (storage environment) yang tepat. Gambar 4 menunjukkan pengaruh lingkungan penyimpanan (udara dan x5 PBS(-)) terhadap WCA pada untreated dan treated TNTZ.

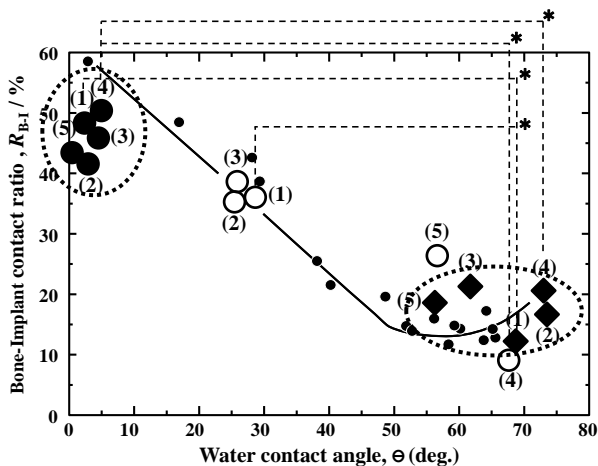


Gambar 4. WCA TNTZ pada berbagai perlakuan: (a) as-polished, (b) as-anodized dan (c) as-hydrothermaled.

Ketika sampel dibiarkan di udara terbuka, WCA dari treated sampel TNTZ cenderung meningkat seiring meningkatnya waktu penyimpanan. Sementara, penurunan WCA yang sangat signifikan terjadi pada untreated dan treated sampel TNTZ setelah disimpan di dalam larutan x5 PBS(-). Nilai WCA yang rendah tetap bertahan setelah 24 jam penyimpanan. Diantara media penyimpanan yang berbeda, sampel hydrothermal yang disimpan pada x5 PBS(-) menunjukkan nilai WCA yang terendah (di bawah 5 deg.). Penyerapan solute ions seperti Na^+ and Cl^- sangat mempengaruhi sifat hydrophilic permukaan dari pelapisan TiO_2 [12]. Dapat disimpulkan bahwa penyimpanan TNTZ pada larutan x5 PBS(-) dapat mempertahankan permukaan yang super-hydrophilic untuk waktu yang lebih lama.

Pada *in vivo* tes, sampel untreated dan treated disimpan selama 24 jam di dalam larutan x5 PBS(-). Gambar 5 memperlihatkan hasil *in vivo* tes dari penelitian sebelumnya untuk *TiO₂-coated samples* dengan rasio $Ra/\mu m$ kecil dari 0.1 sebagai referensi. Seperti ditunjukkan pada gambar 5, sampel as-polished dengan permukaan hydrophobic menghasilkan

osteoconductivity yang sangat rendah (R_{B-I} bernilai 10%). Kondisi ini juga terlihat pada sampel TNTZ setelah di anodizing, dimana nilai R_{B-I} nya hampir sama dengan sampel as-polished. Hal ini membuktikan bahwa proses anodizing tidak dapat meningkatkan osteoconductivity TNTZ. Namun, fenomena yang berbeda terjadi ketika TNTZ di perlakukan secara hydrothermal yang diikuti dengan penyimpanan pada x5 PBS(-), dimana osteoconductivity TNTZ meningkat secara signifikan 50% lebih besar dibandingkan dengan sampel as-polished.



Gambar 5. Hubungan antara nilai R_{B-I} dan WCA dari Ti and Ti alloys samples dengan beberapa modifikasi permukaan dan media storage yang berbeda: \blacklozenge as-polished, \circ as-anodized in H₃PO₄ solution, \bullet as-hydrothermaled in distilled water at 180 °C for 180 min after stored in x5 PBS(-) solution of (1) Ti, (2) Ti64, (3) Ti67, (4) TNTZ, and (5) TCFA; and \bullet as-anodized Ti in different aqueous solutions ($R_a/\mu\text{m} < 0.1$), * $p < 0.05$.

Sifat hydrophilic permukaan memegang peranan yang sangat penting dalam respon biologi dari permukaan biomaterial. Hal ini sangat berpengaruh pada pelekatan sel, sepanjang fase pelekatan timbul melalui proses awal yang melibatkan koneksi antara sel dan permukaan atau melalui perubahan dalam penyerapan protein [13]. Hydrophilicity yang tinggi dapat meningkatkan interaksi antara permukaan implant dengan lingkungan biological [14]. Pada penelitian ini, sampel hydrothermal TNTZ lebih hydrophilic dibanding dengan sampel as-polished dan as-anodized. Ini berarti bahwa dengan meningkatnya sifat hydrophilic permukaan

TNTZ, maka osteoconductivity TNTZ juga dapat diperbaiki dengan mengaplikasikan kombinasi antara proses hydrothermal dengan proses penyimpanan di dalam larutan x5 PBS(-).

Kesimpulan

Dari hasil yang diperoleh, maka dapat disimpulkan bahwa proses anodizing tidak memberi pengaruh terhadap peningkatan osteoconductivitas TNTZ. Namun sebaliknya, dengan proses *hydrothermal treatment* yang disimpan di dalam larutan x5 PBS(-), osteoconductivitas TNTZ meningkat hampir 50% dibandingkan dengan material yang tidak diperlakukan.

Penghargaan

Ucapan terima kasih disampaikan kepada pemerintah Indonesia melalui Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (DIKTI) yang telah membantu dalam pendanaan penelitian ini dan pemerintah Jepang melalui Project of Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) Japan.

Referensi

- [1] Niinomi M, Nakai M, and Hieda J. Development of new metallic alloys for biomedical applications Acta Biomater 2012;8:3888-3903.
- [2] Thair L, Mudali UK, Rajagopalan S, Asokamani R, and Raj B. Nitrogen ion implantation and in vitro corrosion behavior of as-cast Ti-6Al-7Nb alloy. Corros Sci 2003;45:1951-1967.
- [3] Lopez MF, Jimenez JA, and Gutiérrez A. Corrosion study of surface-modified vanadium-free titanium alloys. Electrochem. Acta Biomater 2003;48:1395-1401.
- [4] Morant C, Lopez MF, Gutiérrez A, and Jimenez JA. AFM and SEM characterization of non-toxic vanadium-free Ti alloys used as biomaterials. Appl Surf Sci 2003;220:79-87.
- [5] Semlitsch M. Classic and new titanium alloys for production artificial hip joints. Titan 1986;2:721-740.
- [6] Akahori T, Niinomi M, Fukui H, and Suzuki A. Fatigue, fretting fatigue and corrosion

characteristics of biocompatible beta type titanium alloy conducted with various thermo-mechanical treatments. *Mater Trans* 2004;45:1540-1548.

- [7] Tanaka Y, Nakai M, Akahori T, Niinomi M, Tsutsumi Y, Doi H, and Hanawa T. Characterization of air-formed surface oxide film on Ti–29Nb–13Ta–4.6Zr alloy surface using XPS and AES. *Corros Sci* 2008;50:2111-2116.
- [8] Chen HT, Hsiao CH, Long HY, Chung CJ, Tang CH, Chen KC, and He JL. Micro-arc oxidation of beta-titanium alloy: structural characterization and osteoblast compatibility. *Surf Coat Tech* 2009;204:1126-1131.
- [9] de Jonge LT, Leeuwenburgh SCG, Wolke JGC, and Jansen JA. Organic–inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharma Res* 2008;25:2357-2369.
- [10] Zuldesmi M, Waki A, Kuroda K, and Okido M. High osteoconductive surface of pure titanium by hydrothermal treatment, *J Biomat Nanobiotech* 2013;4:284-290.
- [11] Dexter SC. Influence of substratum critical surface tension on bacterial adhesion-in situ studies. *J Coll Interf Sci* 1979;70:346-354.
- [12] Baier RE, Shafrin EG, and Zisman. Adhesion: mechanisms that assist or impede it. *Sci* 1968;162:1360-1368.
- [13] K.L. Kilpadi, P.L. Chang, S.L. Bellis, Hydroxyapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel, *J. Biomed.Mater. Res. A* 57 (2001) 258–267.
- [14] M. Omori, S. Tsuchiya, K. Hara, K. Kuroda, H. Hibi, M. Ueda, The application of atmospheric pressure plasma treatment for immobilizing stem cells from human exfoliated deciduous teeth-conditioned medium on titanium implants, *Clin. Oral. Implant. Res.* (2014).