



Indonesian Dental Association

Journal of Indonesian Dental Association

<http://jurnal.pdgi.or.id/index.php/jida>
ISSN: 2621-6183 (Print); ISSN: 2621-6175 (Online)



Research Article

Synthesis and Physical Characterization of Nano-Hydroxyapatite-Collagen-Epigallocatechin-3-Gallate Hydrogel Composite

Hiroko Gabriela Amanda¹, Elline Elline^{2§}, Eko Fibryanto²

¹ Undergraduate Student, Faculty of Dentistry, Trisakti University, Indonesia

² Department of Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry, Trisakti University, Indonesia

Received date: January 31, 2022. Accepted date: March 21, 2022. Published date: May 17, 2022.

KEYWORDS

collagen type I;
composite hydrogel;
EGCG;
nano hydroxyapatite

ABSTRACT

Introduction: Most commonly used vital pulp therapy material is calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) but it has several disadvantages. Previous studies found that nano-hydroxyapatite might induce reparative dentin with no tunnel defect and adding collagen can improve hydroxyapatite mechanical properties. The collagen can also increase pulp cell proliferation and differentiation. The addition of *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) to collagen gel can be beneficial in reducing pulp inflammation. **Objective:** The purpose of this study is to synthesize and analyze the physical characteristics of the nano-Hydroxyapatite-collagen-*Epigallocatechin-3-Gallate* hydrogel composite. **Methods:** Nano-hydroxyapatite from chicken egg shells, 0,2 g/mL collagen type I, and 10 mmol/L EGCG each dissolved in 2 mL deionized water with various ratio of nano-hydroxyapatite:collagen, 40:60 (group 1), 50:50 (group 2), and 60:40 (group 3). Each solution was mixed together then 2% HPMC was added into the mixture. In present study, we observed hydrogel composite pH value, gelation time, and injectability analysis. **Results:** The pH value in 1 hour stirring for each group was $8,05 \pm 0,05$, $8,43 \pm 0,02$, and $8,71 \pm 0,04$. All samples had 1 hour gelation time. Injectability for each group was 90,67%, 91,93%, and 95,03%. **Conclusions:** The nanohydroxyapatite, collagen and EGCG hydrogel composite has a potential physical characterization to be used as a vital pulp therapy material based on its pH value and injectable ability but further study should be considered in determining ideal gelation time.

[§] Corresponding Author

E-mail address: ie_elline23@yahoo.co.id (Elline E)

DOI: [10.32793/jida.v5i1.769](https://doi.org/10.32793/jida.v5i1.769)

Copyright: ©2022 Amanda HG, Elline E, Fibryanto E. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium provided the original author and sources are credited.

KATA KUNCI

EGCG;
hidrogel komposit;
kolagen tipe I;
nano hidroksiapatit

ABSTRAK

Pendahuluan: Bahan perawatan pulpa vital yang paling umum digunakan adalah kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), tetapi bahan tersebut memiliki beberapa kekurangan. Penelitian sebelumnya menunjukkan nano-hidroksiapatit mampu merangsang pembentukan dentin reparatif tanpa tunnel defect dan penambahan kolagen mampu meningkatkan sifat mekanik hidroksiapatit. Penambahan *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG) pada gel kolagen bermanfaat dalam mengurangi respon inflamasi pulpa. **Tujuan:** Penelitian ini dilakukan untuk mensintesis dan melakukan uji karakteristik fisik komposit hidrogel nano-hidroksiapatit-kolagen-*Epigallocatechin-3-Gallate*. **Metode:** Nano-hidroksiapatit dari cangkang telur ayam dilarutkan dengan 0,2 g/mL kolagen tipe I, dan 10 mmol/L EGCG masing-masing ke dalam air deionisasi dengan perbandingan rasio nano-hidroksiapatit dan kolagen, 40:60 (kelompok 1), 50:50 (kelompok 2), dan 60:40 (kelompok 3). Seluruh larutan dicampurkan dan ditambahkan HPMC 2%, lalu dilakukan uji karakteristik gel berupa uji pH, waktu gelasi, dan uji injektabilitas. **Hasil:** Nilai pH 1 jam setelah pengadukan secara berurutan adalah $8,05 \pm 0,05$, $8,43 \pm 0,02$, dan $8,71 \pm 0,04$ dengan waktu gelasi selama 1 jam. Injektabilitas secara berurutan adalah 90,67%, 91,93%, dan 95,03%. **Kesimpulan:** Bahan komposit hidrogel nano-hidroksiapatit, kolagen, dan EGCG memiliki karakteristik fisik yang berpotensi untuk digunakan sebagai bahan terapi pulpa vital jika dilihat dari nilai pH dan kemampuan injektabilitas yang diperoleh.

PENDAHULUAN

Menurut *Global Burden of Disease Study* tahun 2017 sebanyak 2,3 miliar orang dewasa dan 530 juta anak-anak mengalami karies atau gigi berlubang.¹ Menurut *World Health Organization* (WHO), masalah gigi yang paling umum ditemukan di dunia adalah karies atau gigi berlubang. Di Indonesia, data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2018 menunjukkan proporsi masalah gigi yang paling banyak adalah karies, yaitu sebesar 45,3%.²

Karies yang tidak dirawat dapat menyebabkan risiko infeksi pulpa yang akan menimbulkan rasa nyeri dan menyebabkan nekrosis pulpa sehingga memerlukan perawatan pulpa, salah satunya perawatan pulpa vital.³ Bahan yang paling sering digunakan dalam perawatan pulpa vital dan merupakan *gold standard* dalam perawatan karies pulpa adalah kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$).^{3,4} Kalsium hidroksida memiliki pH yang tinggi sehingga mampu merangsang pembentukan dentin reparatif dan membunuh bakteri. Bahan tersebut juga memiliki beberapa kekurangan, seperti mudah larut, kemampuan adhesif terhadap dentin yang rendah, menyebabkan inflamasi, kemampuan sealing dalam jangka waktu lama yang kurang baik, serta pembentukan dentin reparatif dengan *tunnel defect* serta berporus.^{5,6} Penelitian-penelitian terbaru mencoba untuk membuat suatu bahan yang bermanfaat dalam perawatan pulpa salah satunya dengan bahan-bahan seperti, nano-hidroksiapatit, kolagen, dan *Epigallocatechin-3-Gallate* (EGCG).^{4,5,7}

Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) adalah mineral anorganik dengan kandungan utama kalsium dan fosfat dengan rasio Ca/P sebesar 1,67 (stoikiometri).⁸ Hidroksiapatit telah banyak digunakan dalam bidang ortopedi dan kedokteran gigi karena hidroksiapatit memiliki komposisi kimia yang sama dengan tulang dan gigi sehingga memiliki biokompatibilitas yang baik, osteokonduktif, non toksik, bioaktif, dan dapat didegradasi secara perlahan.⁸ Limitasi dari hidroksiapatit adalah memiliki sifat mekanis yang rendah.⁹

Dewasa ini, salah satu penggunaan nanoteknologi di bidang kedokteran gigi adalah nano-hidroksiapatit.¹⁰ Hidroksiapatit yang berukuran nanometer memiliki beberapa keunggulan, salah satunya mampu meningkatkan kelarutan, bioaktivitas serta sifat mekanik dari biokeramik hidroksiapatit.^{8,11} Hal ini disebabkan oleh luas permukaannya lebih besar dibandingkan hidroksiapatit berukuran konvensional.¹¹

Hidroksiapatit dapat disintesis secara kimiawi atau berasal dari sumber alam.¹² Salah satu sumber alami yang dapat digunakan dalam sintesis hidroksiapatit adalah cangkang telur ayam karena mengandung unsur mineral berupa kalsium karbonat (CaCO_3) sebanyak 94%. Hal ini yang membuat cangkang telur ayam dapat digunakan sebagai sumber kalsium dalam sintesis hidroksiapatit.¹³

Hidroksiapatit telah digunakan dalam bidang kedokteran gigi, salah satunya yaitu mampu membentuk dentin reparatif dalam perawatan karies pulpa. Berdasarkan penelitian Swarup et al, hidroksiapatit

berukuran nanometer mampu membentuk dentin reparatif tanpa adanya *tunnel defect* dengan respon inflamasi yang ditimbulkan lebih cepat berkurang dibandingkan $\text{Ca}(\text{OH})_2$.⁷ Penelitian lainnya menunjukkan bahwa penambahan kolagen terhadap hidroksiapatit mampu membantu mengurangi sifat hidroksiapatit yang rapuh serta meningkatkan proliferasi dan adesi sel sehingga *scaffold* hidroksiapatit-kolagen dikatakan dapat berpotensi untuk merangsang diferensiasi dan proliferasi sel stem pulpa.¹⁴ Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa sel pulpa yang dikultur di dalam *scaffold* kolagen dapat berdiferensiasi odontogenik dengan vaskular yang tinggi sehingga berpotensi dalam perawatan pulpa.⁴

Kolagen merupakan protein yang tersusun dari asam amino yang terdiri atas tiga rantai alfa membentuk struktur tripel heliks.¹⁵ Terdapat 28 tipe kolagen yang dapat ditemukan pada tubuh manusia dan kolagen yang umum ditemukan adalah kolagen tipe I-V. Kolagen tipe I dapat ditemukan pada tulang, kulit, tendon, pembuluh darah, dan pada gigi, menyusun sekitar 90% komponen organik dentin.¹⁶ Kolagen tipe I merupakan kolagen yang paling umum digunakan dalam rekayasa jaringan dan sering digunakan dalam industri makanan, kosmetik, dan kimia karena memiliki sifat biokompatibilitas yang baik, dapat diserap, mampu menstimulasi regenerasi jaringan, dan *biodegradable*.^{15,17} Kolagen memiliki kekurangan, yaitu stabilitas termal dan sifat mekanis yang rendah.^{18,19} Penelitian Kwon et al. menunjukkan bahwa kolagen membran dapat berikatan silang dengan EGCG yang berefek pada perbaikan sifat mekanis dan peningkatan kekasaran permukaan kolagen sehingga mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi sel pulpa.²⁰

Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) merupakan salah satu polifenol terbanyak (59%) dalam daun teh yang memiliki efek antiinflamasi, antibakteri, antioksidan, dan antimutagenik.^{4,19,21} EGCG ditemukan berperan dalam perawatan pulpa karena mampu mengurangi respon inflamasi dengan cara mengikat *Nitric Oxide* (NO) sehingga meningkatkan jumlah sel fibroblas serta berperan dalam proses penyembuhan pulpa.⁵

Penelitian ini didasarkan oleh penelitian Hikmawati et al. yang berhasil membuat bentuk injeksi dengan menggunakan hidroksiapatit dan gelatin, serta penggunaan *hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC) sebagai agen suspensi untuk meningkatkan viskositas serta meningkatkan stabilitas.^{17,22,23} Agen suspensi yang paling umum digunakan adalah polimer, seperti *methylcellulose* (MC), *sodium carboxymethylcellulose* (CMC), dan *hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC) dengan karakteristik seperti, tidak berwarna, tidak mempengaruhi analisis kimia, tidak ionik, dan tidak menyebabkan reaksi biologis.²³ HPMC merupakan polimer semi sintesis turunan selulosa yang dapat larut

dalam air dan biasanya digunakan sebagai bahan suspensi, pembentuk film, matriks *drug delivery* karena memiliki biokompatibilitas yang baik dan dapat didegradasi.¹⁷

Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa ketiga bahan ini dapat disintesis menjadi suatu bahan hidrogel komposit dan menganalisis karakteristik fisik yang dapat berpotensi untuk digunakan sebagai bahan terapi pulpa. Uji karakteristik yang dilakukan pada penelitian ini adalah uji pH, waktu gelasi, dan uji injektabilitas

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang telah dilakukan di Puspitek LAPTIB-BPPT. Penelitian ini menggunakan bahan berupa nano-hidroksiapatit dari kulit telur ayam berukuran <60 nm (ProDB, Pertiwi *Technology*, Bogor, Indonesia), kolagen tipe I yang terhidrolisis dari bovin (*Wuhan Healthdream Biological Technology*, Wuhan, China), EGCG (*Sigma Aldrich*, St Louis, Missouri, USA), HPMC 2% (Ashland Benecel, Doel, Belgium), dan air deionisasi (OneLab WaterOne, Sidoarjo, Indonesia).

Alat yang digunakan, yaitu *syringe* 21G 10 cc (OneMed, Sidoarjo, Indonesia), gelas kimia, cawan petri, pH meter (AZ Instrument, Taichung, Taiwan), timbangan analitik (Radwag, Torunsk, Polska), *digital hot plate magnetic stirrer* (Barnstead/ThermoLyne, Dubuque, USA), dan *stopwatch*.

Sintesis hidrogel dilakukan dengan melarutkan 20w/v% atau 0,2 g/mL kolagen ke dalam 2 mL air deionisasi. Nano-hidroksiapatit disesuaikan dengan rasio perbandingan nano-hidroksiapatit dan kolagen setiap kelompok, yaitu 40:60 (kelompok 1), 50:50 (kelompok 2), dan 60:40 (kelompok 3) lalu larutkan dalam 2 mL air deionisasi. EGCG sebanyak 10 mmol/L dilarutkan ke dalam 2 mL air deionisasi, selanjutnya ketiga larutan tersebut dicampurkan dan diaduk hingga homogen menggunakan *magnetic stirrer* dengan suhu 40°C. Kemudian HPMC 2% sebanyak 0,07 g/mL ditambahkan ke dalam campuran dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan suhu 40°C.

Uji pH

Uji pH hidrogel dilakukan untuk melihat stabilitas bahan. Pengukuran dilakukan setelah pengadukan, menit ke-20, 40, dan 60 menggunakan pH meter selama menunggu proses gelasi dalam waktu 1 jam dan dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali untuk setiap kelompok.²⁴

Penentuan Waktu Gelasi

Proses gelasi hidrogel dilakukan berdasarkan penelitian Wu et al.²⁵ yaitu memasukkan 1 mL hidrogel ke dalam gelas kimia lalu gelas kimia direndam ke dalam water bath suhu 37°C selama 10 menit. Waktu gelasi ditentukan setiap menit dengan menggunakan metode inverted tube, yaitu memiringkan gelas kimia hingga terlihat perubahan viskositas bahan menjadi gel.

Uji Injektabilitas

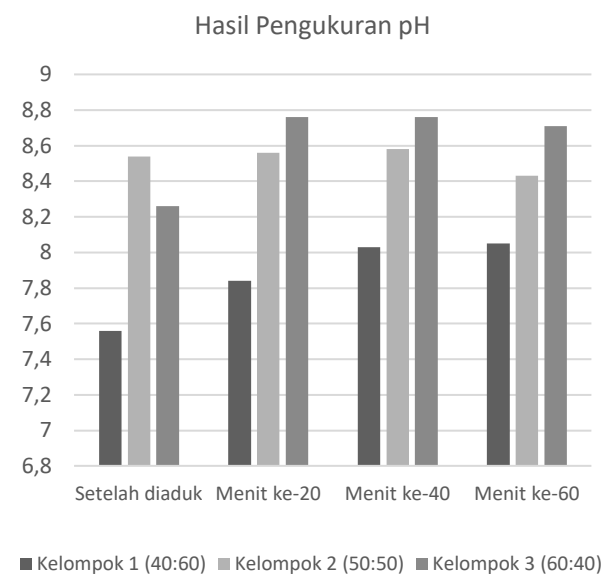
Uji injektabilitas dilakukan untuk melihat kemampuan hidrogel ekstrusi dari *syringe* dengan menggunakan *syringe* 21G.²⁶ Dilakukan dengan cara memasukkan hidrogel ke dalam *syringe* kemudian diinjeksikan ke dalam cawan petri, ditimbang, lalu dihitung persentase injektabilitasnya. Setiap kelompok dilakukan pengukuran sebanyak 3 kali. Rumus persentase injektabilitas adalah sebagai berikut:

Injektabilitas (%) = (Massa yang ekstrusi dari syringe / Total massa sebelum injeksi) x 100%.²²

HASIL PENELITIAN

Hasil Uji pH dan Waktu Gelasi

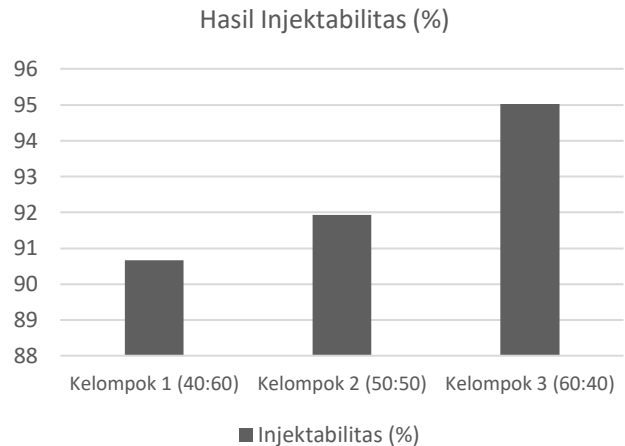
Nilai pH seluruh kelompok setelah pengadukan mengalami peningkatan hingga menit ke-60 dengan rentang sekitar 8,05-8,71 (Gambar 1). Waktu gelasi untuk setiap kelompok (40:60, 50:50, 60:40) adalah 1 jam.



Gambar 1. Hasil Pengukuran pH

Hasil Uji Injektabilitas

Hasil injektabilitas seluruh kelompok bernilai $\geq 90\%$ dengan nilai tertinggi pada kelompok 3 (60:40) sebesar 95,03%, diikuti oleh kelompok 2 (50:50) sebesar 91,93%, dan kelompok 1 (40:60) sebesar 90,67% (Gambar 2).



Gambar 2. Hasil Injektabilitas

PEMBAHASAN

Pada penelitian sebelumnya, nano-hidroksiapatit, kolagen, dan EGCG dapat bermanfaat dalam perawatan pulpa.^{4,5,7,20} Nano-hidroksiapatit mampu merangsang pembentukan dentin reparatif karena memiliki sifat osteokonduktif sehingga mampu merangsang osteoblas untuk membentuk osteodentin tanpa *tunnel defect*. Nano-hidroksiapatit juga dapat menyebabkan respon inflamasi. Hal ini disebabkan karena kondisi pH tinggi dan terjadi pelepasan ion Ca^{2+} . Menurut studi terdahulu, respon inflamasi yang berasal dari nano-hidroksiapatit lebih rendah dan cepat hilang dibandingkan bahan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ karena pada $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ion Ca^{2+} akan larut dalam cairan fisiologis.⁷ Penambahan EGCG pada gel kolagen sebagai *scaffold* mampu meningkatkan proliferasi dan diferensiasi odontogenik sel pulpa karena adanya peningkatan kekuatan mekanis dan waktu gelasi dari *scaffold* kolagen sehingga mempengaruhi sifat biologis *scaffold*. Dalam perawatan pulpa, EGCG juga mampu mengurangi respon inflamasi serta memiliki efek antibakteri terhadap patogen oral, seperti *Streptococcus mutans* dan *Enterococcus faecalis*.²⁰

Penelitian ini didasari oleh penelitian Hikmawati et al. yang membuat bahan injeksi campuran nano-hidroksiapatit-gelatin dan ditambahkan 10w/v% Streptomycin serta HPMC. Pada penelitian tersebut digunakan gelatin sebesar 20 w/v% serta injektabilitas pasta tertinggi ditemukan pada perbandingan nano-hidroksiapatit dan

gelatin 40:60 (98,64%) sehingga penelitian ini menggunakan rasio tersebut.²² Prosedur gelasi dilakukan dengan merendam gel pada water bath suhu 37°C selama 10 menit sesuai dengan penelitian Wu et al. Prosedur gelasi dapat terjadi melalui proses cross-linking secara fisik dengan adanya ikatan antar rantai polimer.²⁵ Penggunaan suhu 37°C dilakukan untuk menyesuaikan dengan suhu tubuh.²⁷ Penelitian ini membuat sediaan dalam bentuk gel karena mudah untuk diaplikasikan pada struktur dentin yang *rigid*, dapat menyesuaikan dengan bentuk anatomi saluran akar yang kompleks, serta mengisi defek tulang irregular.²⁰

Salah satu karakteristik yang perlu diperhatikan pada suatu bahan adalah nilai pH karena berhubungan dengan kemampuan bahan dalam membantu mempertahankan vitalitas pulpa ataupun mendukung terjadinya regenerasi jaringan pulpa. Pengukuran pH dilakukan berdasarkan penelitian Yen et al., yaitu dengan mencatat nilai pH pada menit ke-20, 40, dan 60 selama menunggu proses gelasi dalam waktu 1 jam pada temperatur ruangan.²⁴ Secara teori, pulpa normal memiliki pH sekitar 7,35-7,8, tetapi pada saat gigi terekspos akibat karies atau trauma, terjadi penurunan pH pulpa menjadi asam sehingga menyebabkan inflamasi, nekrosis, serta kematian jaringan pulpa.²⁸ Penelitian sebelumnya menemukan bahwa sel pulpa yang dikultur pada bahan dengan nilai pH <7,5 akan menyebabkan kematian sel, tetapi pada pH bahan sekitar 9,5 menunjukkan adanya proliferasi sel pulpa.²⁹ Nilai pH bahan perawatan di bidang endodontik juga biasanya bersifat basa, seperti kalsium hidroksida (Ca(OH)₂) yang mampu melepaskan ion hidroksil untuk membunuh bakteri dan merangsang reaksi inflamasi untuk merangsang pembentukan dentin reparatif. pH bahan yang bersifat basa diperlukan untuk mempertahankan vitalitas dan mengembalikan pH pulpa optimum.²⁸ pH hidrogel seluruh kelompok sudah bersifat basa dan lebih tinggi dibandingkan pH pulpa normal, tetapi secara teori masih dibawah dari bahan perawatan pulpa vital yang umum digunakan, seperti Ca(OH)₂ (pH 12-13) dan MTA (pH 10,2).²⁹

Proses gelasi dilakukan dengan metode *inverted tube test* lalu diinkubasi pada 37°C untuk mengubah viskositas larutan pada suhu ruangan menjadi gel.²⁵ Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa rentang waktu gelasi optimal adalah 5-30 menit di mana laju gelasi cukup lambat untuk memberikan waktu dalam aplikasinya, tetapi cukup cepat bagi gel untuk mendapatkan stabilitas setelah injeksi.³⁰ Pada penelitian ini, seluruh kelompok memiliki waktu gelasi >30 menit. Hal ini bisa terjadi karena pada penelitian ini menggunakan kolagen tipe I yang terhidrolisis dengan viskositas rendah sehingga mudah untuk larut dalam air dibandingkan kolagen

murni. Kolagen yang terhidrolisis memiliki kekurangan, yaitu kurang mampu untuk membuat suatu film sehingga memerlukan biopolimer lainnya.¹⁵ Salah satu polimer semi sintetik turunan selulosa yang bersifat hidrofilik serta mampu digunakan sebagai bahan suspensi adalah HPMC (*hydroxypropyl methylcellulose*).^{17,23,24} Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi HPMC, semakin tinggi viskositas gel, tetapi pengaruhnya terhadap waktu gelasi belum diketahui secara pasti.^{24,31}

Uji injektabilitas dilakukan untuk melihat kemampuan gel untuk ekstrusi dari sebuah *syringe* dalam waktu tertentu. Persentase injektabilitas dapat diketahui dengan menghitung berat sampel sebelum dan sesudah injeksi dan injektabilitas hidrogel yang diharapkan adalah mendekati 100%. Kemampuan injeksi suatu bahan dipengaruhi oleh karakteristik reologi bahan dan diameter *syringe* yang digunakan.²² Pada penelitian ini, nilai injektabilitas tertinggi dapat ditemukan pada kelompok 3 (60:40), yaitu sebesar 95,03%. Hal ini sesuai dengan penelitian Maulida et al. yang mendapatkan nilai injektabilitas tertinggi sebesar 97,74% pada perbandingan hidroksiapatit:gelatin 65:35.³²

KESIMPULAN

Karakteristik fisik dari bahan komposit hidrogel campuran nano-hidroksiapatit, kolagen, dan EGCG berpotensi untuk digunakan sebagai bahan terapi pulpa vital jika dilihat dari nilai pH dan kemampuan injektabilitas yang diperoleh. Penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk mengetahui waktu gelasi yang ideal dari bahan komposit hidrogel.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada PT. Alesha berkah Utama, Pertiwi Technology yang telah membantu dalam penyediaan hidroksiapatit dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Oral health. Geneva: World Health Organization; 2009
2. Kementerian Kesehatan RI. Infodatin: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Jakarta: Kementerian Kesehatan. 2019.

3. Wells C, Dulong C, McCormack S. Vital pulp therapy for endodontics treatment of mature teeth: a review of clinical effectiveness, cost-effectiveness, and guidelines. Ottawa: Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2019.
4. Hanna SN, Perex Alfayate R, Prichard J. Vital pulp therapy and insight over the available literature and future expectations. *Eur Endod J.* 2020;1:46-53.
5. Widjiastuti I, Setyabudi, Ismiyanti K, Purwanto DA, Sukmawati T. Effect of hydrogel epigallocatechin-3-gallate (EGCG) to the number of fibroblast cell proliferation in the perforation of wistar rat tooth pulp. *Conserv Dent J.* 2019;9(2): 93-96.
6. Akhlagi N, Khademi A. Outcomes of vital pulp therapy in permanent teeth with different medicaments based on review of the literature. *Dent Res J.* 2015;12(5):406-417.
7. Swarup SJ, Rao A, Boaz K, Srikant N, Shenoy R. Pulpal response to nano hydroxyapatite, mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide when used as a direct pulp capping agent: an in vivo study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2014;38(3):201-206.
8. Gshalaev VS, Demirchan AC. Hydroxyapatite: synthesis, properties, and applications. In: *Biomaterials – Properties, Production and Devices.* New York: Nova Science Publisher; 2012. p. 17.
9. Milovac D, Ferrer GG, Ivankovix M, Ivankovic H. PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: morphology, mechanical properties and bioactivity. *Mater Sci Eng C.* 2014;437-445.
10. Imataki R, Shinonaga Y, Nishimura T, Abe Y, Arita K. Mechanical and functional properties of a novel apatite-ionomer cement for prevention and remineralization of dental caries. *Materials (Basel).* 2019;12(3):3998.
11. Pelpa E, Besharat LK, Palaia G, Tenore G, Migliau G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Ann Stomatol (Roma).* 2014;V(3):108-114.
12. Pu'ad NA, Koshy P, Abdullah HZ, Idris MI, Lee TC. Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. *Heliyon.* 2019;5(5):e01588.
13. Abdulrahman I, Tijani HI, Mohammed BA, Saidu H, Yusuf H, Jibrin MN, et al. From garbage to biomaterials: an overview on egg shellbased hydroxyapatite. *J Mater.* 2014;2014;1-6.
14. Trivedi S, Srivastava K, Saluja TS, Shyam H, Kumar S, Singh A, et al. Hydroxyapatite-collagen augments osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Odontology.* 2020;108(2):251-259.
15. Leon-Lopez A, Morales-Penalosa A, Matinez-Juarez VM, Vargas-Torres A, Zeugolis DI, Aguirre-Alvarez G. Hydrolyze collagen: source and applications. *Molecules.* 2019;24(22):4031.
16. Fratzl P. Collagen structure and mechanics. Cham, Switzerland: Springer; 2008. pp. 1-15.
17. Ding C, Zhang M, Li G. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) blend film. *Carbohydr Polym.* 2015;119:194-201.
18. Wu M, Cronin K, Crane JS. Biochemistry, Collagen Synthesis. [Updated 2021 Sep 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507709/> [cited 2021 August 19]
19. Chu C, Deng J, Xiang L, Wu Y, Wei X, Qu Y, et al. Evaluation of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) cross-linked collagen membranes and concerns on osteoblasts. *Mater Sci Eng C.* 2016;67:386-394.
20. Kwon YS, Kim HJ, Hwang YC, Rosa V, Yu MK, et al. Effects of epigallocatechin gallate, an antibacterial cross-linking agent, on proliferation and differentiation of human dental pulp cells cultured in collagen scaffolds. *J Endod.* 2017;43(2):289-295.
21. Narotzki B, Reznick AZ, Aizenbud D, Levy Y. Green tea: a promising natural product in oral health. *Arch Oral Biol.* 2012;57:429-435.
22. Hikmawati D, Maulida HN, Budiati AS. Synthesis and characterization of nanohydroxyapatite-gelatin composite with streptomycin as tuberculosis injectable bone substitute. *Inter J Biomater.* 2019;2019:1-9.
23. Elsevier. Suspending Agent [Internet]. Elsevier: ScienceDirect; 2022. [cited 2022 Apr 19]. Available from: *Suspending Agent-an overview Science Direct Topics*
24. Yan J, Miao Y, Tan H, Zhou T, Ling Z, Chen Y, et al. Injectable alginate/hydroxyapatite gel scaffold combined with gelatin microspheres for drug delivery and bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;63:274-84.
25. Wu S, Zhou Y, Zhou X, Du W, Wan M, et al. Evaluation of chitosan hydrogel for sustained delivery of VEGF for odontogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Stem Cells Int.* 2019;2019:1515040.
26. Sharma LA, Love RM, Ali MA, Sharma A, Macari S. Healing response of rat pulp treated with an injectable keratin hydrogel. *J Appl Biomater Funct.* 2017;15:e244-e250.
27. Hassanazadeh A, Ashrafihelan J, Salehi R, Rahbarghazi R, Firouzamandi M, Ahmadi M, et al. Development and biocompatibility of the injectable collagen/nano-hydroxyapatite scaffolds as in situ forming hydrogel for the hard tissue engineering application. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2021;49(1):136-146.
28. Singh PH. Theory of optimum pH for pulp vitality: a clinical and experimental theory of endodontic. *EC Clinical and Medical Case Reports.* 2020; 3(1):01-03

29. Hirose Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Murakami M, Nakashima M. Effects of extracellular pH on dental pulp cells in vitro. *J Endod.* 2016;5:735-741.
30. Bendtsen ST, Wei M. Synthesis and characterization of a novel injectable alginate-collagen-hydroxyapatite hydrogel for bone tissue regeneration. *J Mater Chem.* 2015;3:3081-3090.
31. Chen CP, Hsieh CM, Tsai T, Yang JC, Chen CT. Optimization and evaluation of a chitosan/hydroxypropyl methylcellulose hydrogel containing toluidine blue o for antimicrobial photodynamic inactivation. *Int J Mol Sci.* 2015;16:20860-20871.
32. Maulida HN, Hikmawati D, Budiati AS. Injectable bone substitute paste based on hydroxyapatite, gelatin and streptomycin for spinal tuberculosis. *J Stem Cell Res Tissue Eng.* 2019;3(2):56-66.