

UJI IN VITRO HIDROKSIAPATIT BERPORI YANG DILAPISI KITOSAN MENGGUNAKAN LARUTAN SBF (SIMULATED BODY FLUID) DENGAN VARIASI PENAMBAHAN KITOSAN

Toni Ardi¹⁾, Ahmad Fadli²⁾, Silvia Reni Yenti²⁾

¹⁾Mahasiswa Program Studi Sarjana Teknik Kimia, ²⁾Dosen Jurusan Teknik Kimia
Laboratorium Material dan Korosi
Jurusan Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Riau
Kampus Bina Widya Jl. HR Soebrantas KM 12,5 Pekanbaru, 28293
Email: toni.ardi@student.unri.ac.id

ABSTRACT

One of biological method for hydroxyapatite test is in vitro test, which is testing the material outside the system or not directly on living things. Some ways include using cell culture media, test tubes or SBF (Simulated Body Fluid) solutions. This research aims to determine the effect of variations of chitosan on the results of in vitro test of porous HA coated with chitosan. This research was carried out by synthesis CaO from cockle shells followed by synthesis HA from a mixture of CaO and $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ using low-temperature hydrothermal method. Porous HA is made by mixing HA, potato starch and distilled water using the starch consolidation method. A coating solution is prepared by mixing 0.75%w/v and 1.50%w/v into 2%v/v 100 ml acetic acid. The porous HA is then dipped into the solution for 60 minutes then dried at room temperature for 24 hours. The sample was then immersed in a SBF (Simulated Body Fluid) solution for 28 days. Samples were then analyzed using XRD and SEM analyzes. Apatite layers were formed on the entire surface of the samples based on SEM analysis. Samples have degree of crystallinity of 86.581%-88.067% with crystal diameter of 41.220-42.340 nm. The use of more chitosan as coating reduced degree of crystallinity and crystal diameter.

Keywords: chitosan, hydroxyapatite, in vitro test, SBF (Simulated Body Fluid)

1. PENDAHULUAN

Kasus cedera tulang di Indonesia terus meningkat setiap tahunnya. Kasus cedera tulang dapat terjadi akibat kecelakaan lalu lintas, terjadinya bencana alam, serta penyakit tulang seperti osteoporosis. Menurut Badan Pusat Statistik [2019], jumlah kecelakaan di Indonesia pada tahun 2015 mencapai 98.970 kasus dan mengalami peningkatan pada tahun 2016 menjadi 106.644 kasus. Tingginya angka kasus kerusakan tulang mendorong permintaan prosthesis, komponen buatan serupa tulang yang diganti atau implan tulang. Untuk memenuhi kebutuhan prosthesis, pemerintah mengimpornya sebanyak

90% dari total kebutuhan. Produk prosthesis impor tersebut masih tidak sesuai dengan ukuran tulang masyarakat Indonesia yang lebih pendek sehingga penanganan medis tidak optimal [Lipi, 2018]. Untuk itu dibutuhkan produksi implan tulang dalam negeri agar dapat mengurangi impor implan tulang.

Salah satu biomaterial sintetik yang dapat dijadikan implan tulang adalah hidroksiapatit [Dumitrescu, 2011]. Hidroksiapatit (selanjutnya disebut HA) merupakan senyawa apatit yang memiliki rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Hidroksiapatit merupakan komponen anorganik utama pada jaringan keras biologis seperti tulang dan gigi [Qi et al.,

2012]. HA banyak digunakan dalam bentuk berpori ketika akan digunakan sebagai material implan. Pori – pori tersebut bermanfaat untuk adhesi sel jaringan biologis dan pertumbuhan fase tulang baru [Swain *et al.*, 2015]. Akan tetapi, HA berpori masih memiliki nilai kuat tekan yang rendah sehingga perlu ditingkatkan melalui proses pelapisan. Pelapis yang umum digunakan biasanya material polimer berupa kitosan. Fungsi utama dari kitosan adalah sebagai *biodegradability* [Onishi *et al.*, 1999], tetapi dia juga baik di gunakan sebagai larutan asam organik dan resistensi dalam lingkungan alkali

Salah satu metode pengujian hidroksiapatit secara biologi adalah uji in vitro, yaitu pengujian material diluar sistem atau bukan secara langsung terhadap makhluk hidup. Beberapa cara diantaranya dengan menggunakan media kultur sel, tabung reaksi ataupun larutan SBF (*Simulated Body Fluid*). SBF telah banyak digunakan dalam pengaplikasian. Salah satunya, SBF telah digunakan secara luas untuk studi secara in vitro bioaktifitas jaringan-jaringan keras buatan dari tubuh manusia (seperti tulang, gigi, enamel dan dentin) melalui pengujian kemampuan pembentukan apatit didalam fluida [Cziko, 2013].

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan kitosan terhadap hasil uji HA berpori yang dilapisi kitosan setelah direndam didalam larutan SBF (*Simulated Body Fluid*).

2. METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Bahan dan alat yang digunakan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah HA hasil sintesis, akuades (Brataco id), pati kentang (*starch*) (PT Indofood Sukses Makmur Tbk), minyak goreng (PT Multimas Nabati Asahan, Indonesia), kitosan (Sigma Aldrich), CH_3COOH , NaCl , NaHCO_3 , KCl , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Jerman), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Jerman),

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 (HOCH_2) $_3\text{CNH}_2$ (*Tris-hydroxymethyl aminomethane*), HCl 1M (Merck, Jerman) dan *sterile water*.

Peralatan yang digunakan diantaranya *oven*, cawan porselen, *furnace*, timbangan analitik, gelas *beaker* 1000 ml, gelas ukur 50 dan 100 ml, *mechanical stirrer*, gelas piala 100 dan 250 ml, *stainless steel mold*, *magnetic stirrer*, termometer, pH meter, jumbo *hot plate*, dan labu ukur 1000 ml, batang pengaduk, pipet tetes, corong, pinset, aluminium foil, kaca arloji, dan botol kaca

2.2 Variabel penelitian

Variabel penelitian merujuk pada penelitian yang telah dilakukan Yenti *et al.* [2016] untuk sintesis HA, Najela *et al.* [2016] untuk sintesis HA berpori dan Arosyidin *et al.* [2018] untuk proses *coating* HA berpori dengan variasi penambahan kitosan 0,75 dan 1,50%b/v.

Pada sintesis SBF suhu sintesis yang digunakan $36,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ dengan pH 7,40-7,45 dan kecepatan pengadukan 300 rpm. Lama perendaman selama 7, 14, 21 dan 28 hari.

2.3 Prosedur penelitian

Larutan kitosan sebagai *coating* di siapkan dengan cara mencampurkan 0,75%b/v dan 1,50%b/v kitosan kedalam 2%v/v asam asetat 100 ml. HA berpori kemudian direndam didalam larutan kitosan selama 60 menit dengan temperatur ruang. Selanjutnya HA berpori hasil *coating* dikeringkan dalam suhu ruang selama 24 jam.

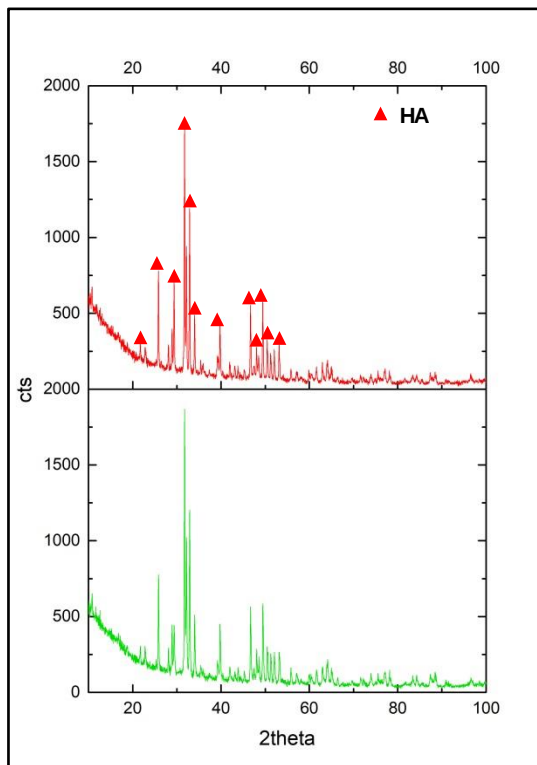
Larutan SBF dibuat berdasarkan standar pembuatan larutan SBF ISO/FDIS 23317 yang mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh kokubo [1991].

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Analisa XRD

Pengujian XRD dilakukan pada HA berpori yang telah di *coating* dengan

variabel penambahan kitosan 0,75%b/v dan 1,50%b/v setelah direndam didalam larutan SBF selama 28 hari.



Gambar 1. Pola difraksi HA berpori setelah di *coating* dengan variasi kitosan (a) 0,75%b/v dan (b) 1,50%b/v setelah perendaman selama 28 hari

Gambar 1 menunjukkan bahwa tinggi puncak meningkat dari 1725,376 cts menjadi 1868,265 cts seiring meningkatnya jumlah kitosan yang ditambahkan didalam larutan pelapis. Nilai puncak-puncak yang didapat pada sudut 2θ pada hkl (002), (211), (112), (300), dan (202) untuk variasi penambahan kitosan 0,75%b/v adalah $25,8211^\circ$, $31,7491^\circ$, $32,1651^\circ$, $32,8671^\circ$ dan $34,0111^\circ$, sementara pada penambahan kitosan 1,50%b/v adalah $25,8471^\circ$, $31,7491^\circ$, $32,1651^\circ$, $32,8931^\circ$ dan $34,0371^\circ$. Kedua pola difraksi memiliki pola yang sama dengan data ICDD (*International Centre for Diffraction Data*) No. 01-072-1432 pada nilai hkl yang sama.

Nilai derajat kristanilitas yang didapat untuk kedua sampel adalah 88,067% dan 86,581% secara berturut. Nilai derajat kristanilitas yang didapat menurun seiring peningkatan jumlah kitosan yang ditambahkan didalam larutan pelapis. Hasil ini berbanding terbalik jika dibandingkan dengan nilai tinggi puncak yang didapat. Hal ini dapat disebabkan karena semakin banyaknya jumlah kitosan yang ditambahkan didalam larutan pelapis, maka akan menurunkan kristanilitas HA karena kitosan merupakan polimer amorf.

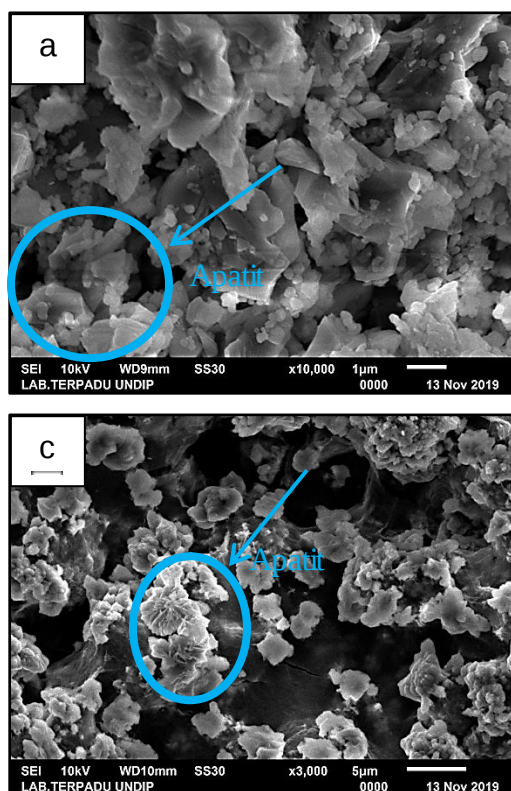
Nilai derajat kristanilitas pada kedua sampel meningkat setelah direndam didalam larutan SBF selama 28 hari. Dimana nilai derajat kristanilitas pada HA berpori yang telah di *coating* sebelum perendaman adalah 83,097%. Hal ini dikarenakan sampel awalnya bermuatan negatif pada permukaannya, dan bergabung dengan ion Ca^{2+} yang bermuatan positif dalam SBF. Akibatnya, amorf kalsium fosfat yang kaya Ca terbentuk pada sampel. Ketika ion Ca^{2+} terakumulasi, sampel menjadi bermuatan positif di permukaannya dan bereaksi dengan ion fosfat yang bermuatan negatif. Sehingga, kalsium fosfat amorf yang memiliki kadar Ca rendah terbentuk yang kemudian diubah menjadi lebih stabil, yaitu kristalin apatit seperti tulang [Takadama *et al.*, 2004]. Selain itu, perendaman dengan larutan SBF juga menyebabkan susunan atom dalam sampel semakin teratur sehingga semakin banyak fasa kristal yang terbentuk [Ainunnisa, 2013].

Dari hasil pengukuran diameter kristal didapat diameter kristal yang terbentuk adalah 42,320 nm dan 41,220 nm. Nilai diameter kristal yang didapat menurun seiring peningkatan jumlah kitosan yang ditambahkan kedalam larutan pelapis. Hasil ini selaras dengan nilai derajat kristanilitas yang didapat. Semakin banyak kitosan yang melapisi HA berpori, maka HA berpori akan semakin tebal dan pori-pori akan

mengecil. Ukuran pori yang lebih kecil akan memperlambat pembentukan apatit didalam pori. Sementara itu, ukuran pori yang lebih besar dapat meningkatkan sifat bioaktif, karena semakin besar ukuran pori maka akan mempermudah pertukaran ion antara sampel dengan larutan SBF [Romawarni, 2011].

3.2 Analisa SEM

Analisa SEM berfungsi untuk melihat morfologi apatit yang terbentuk setelah perendaman selama 28 hari.



Gambar 4.2 Morfologi permukaan HA berpori yang telah di *coating* dengan variasi penambahan kitosan (a) 0,75%b/v dan (b) 1,50% b/v setelah direndam selama 28 hari

Pada Gambar 4.2 dapat dilihat bahwa pada setiap sampel terdapat lapisan yang diindikasikan sebagai lapisan apatit. Pada variasi penambahan kitosan 0,75%b/v didapat bahwa apatit tumbuh sangat banyak, hal ini sesuai dengan hasil yang didapat pada analisa

XRD dimana diameter kristal dan derajat kristanilitas yang dihasilkan lebih besar dibandingkan penambahan kitosan 1,50%b/v.

Penambahan kitosan yang terlalu besar didalam larutan apatit memperlambat pelepasan ion Ca^{2+} dari sampel kedalam larutan. Hal ini disebabkan karena semakin tebalnya lapisan akan mempersulit proses degradasi sampel. Hal ini mengakibatkan rekristalisasi apatit pada permukaan sampel melambat sehingga pertumbuhan kristal apatit pada variasi penambahan kitosan 0,75%b/v lebih kecil jika dibandingkan dengan pertumbuhan kristal apatit pada penambahan kitosan 1,50%b/v.

4. KESIMPULAN

Penambahan kitosan yang terlalu besar kedalam larutan pelapis menurunkan laju pertumbuhan apatit, derajat kristanilitas dan diameter kristal. Nilai kristanilitas yang didapat adalah 88,067% dan 86,581% dengan ukuran diameter kristal 42,320 nm dan 41,220 nm.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada RISTEKDIKTI atas pembiayaan penelitian ini pada tahun 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Ainunnisa, R. R. (2013). Variasi Waktu Perendaman Dalam Simulated Body Fluid Pada Komposisi Hidroksiapatit-Gelatin Sebagai Kandidat Bone Graft. *Skripsi*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Arosyidin, Fadli, A., & Saputra, E. (2018). Coating scaffold hidroksiapatit dengan kitosan menggunakan metode *dip-coating*. *Jom FTEKNIK*, 5.
- Badan Pusat Statistik. (2019). <https://www.bps.go.id/site/resultTab>. Diakses pada 9 April 2019.

- Czikó1, M., Bogya, E. S., Barabás R., & Răzvan L. B. (2013). In vitro biological activity comparison of some hydroxyapatite-based composite materials using simulated body fluid. *Central European Journal of Chemistry*, 11, 1583-1598.
- Dumitrescu, A. L. (2011). Chemicals in surgical periodontal therapy. <http://www.springerlink.com>. ISBN:976-3-642-18224-2. Diakses 28 November 2019.
- Kokubo, T. (1991). Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials*, 12, 155 – 163.
- Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. (2018). [http://lipi.go.id/lipimedia/padukan-logam-gantikan tulang/19869](http://lipi.go.id/lipimedia/padukan-logam-gantikan-tulang/19869). Diakses pada 31 Maret 2019.
- Najela, R., Fadli, A., & Zultinar. (2016). Pengaruh penambahan wheat particles dan waktu sintering pada fabrikasi tricalcium phosphate dengan metode starch consolidation. *Jom FTEKNIK*, 3.
- Onishi, H., Kushitani, S., Yasukawa, E., Iwaki, H., Hench, L. L., Wilson, J., Tsuji, E. & Sugihara, T. (1997). Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 334, 316-325.
- Qi, C., Y.J. Zhu., B.Q. Lu., X.Y. Zhao., J. Zhao., & F. Chen. (2012). Hydroxyapatite nanosheet-assembled porous hollow microspheres: DNA-templated hydrothermal synthesis, drug delivery and protein adsorption. *Journal of Material Chemistry*, 22, 22642-2650.
- Romawarni, A. (2011). Sintesis Dan Uji In Vitro Hidroksiapatit Berporogen Kitosan Dengan Metode Sol Gel. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Swain, S. K., S. Bhattacharyya., & D. Sarkar. (2015). Fabrication of porous hydroxyapatite scaffold via polyethylene glycol-polyvinyl alcohol hydrogel state. *Materials Research Bulletin*, 64, 257-261.
- Takadama H, Hashimoto M, Mizuno M, & Kokubo T. (2004). Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials. *Phosphorus Research Bulletin*, 17, 119–25.
- Yenti, S. R., Ervina, Fadli, A., & Amri, I. (2016). Konversi kulit kerang darah (*Anadara granosa*) menjadi serbuk hidroksiapatit. *Seminar Nasional Teknik Kimia*, pp 89-94. ISSN: 1907-0500.