

**Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012**



**EFEKTIVITAS MATRIKS KOMPOSIT *BOVINE HYDROXYAPATITE* –
GELATIN SEBAGAI SISTEM PENGHANTARAN GENTAMISIN DAN
REGNERASI TULANG PADA *BONE DEFECT***

**Muhamad Zainuddin, Prof.Dr.Apt
Ferdiansyah, Dr,dr.,SpOT.,Dipl.TB.**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Sesuai dengan
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2012**

**Laporan Hasil Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012**



**EFEKTIVITAS MATRIKS KOMPOSIT *BOVINE HYDROXYAPATITE* –
GELATIN SEBAGAI SISTEM PENGHANTARAN GENTAMISIN DAN
REGNERASI TULANG PADA *BONE DEFECT***

**Muhamad Zainuddin, Prof.Dr.Apt
Ferdiansyah, Dr,dr.,SpOT.,Dipl.TB.**

**Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga Sesuai dengan
Surat Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi
Tahun Anggaran 2012 Nomor: 2613/H3/KR/2012, Tanggal 9 Maret 2012**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
2012**

HALAMAN PENGESAHAN

1. Judul Penelitian :Efektivitas Matriks Komposit *Bovine Hydroxyapatite-Gelatin* sebagai Sistem Penghantaran Gentamisin dan Regenerasi *Bone Defect*
2. Ketua Peneliti
- Nama Lengkap : Prof.Dr.Muhamad Zainuddin, Apt
 - Jenis Kelamin : Laki-laki
 - NIP : 194509181974121001
 - Pangkat/Golongan : Pembina Utama Madya / IV d
 - Jabatan Fungsional : Guru Besar
 - Bidang Keahlian : Kimia Analisis/ Statistik
 - Fakultas/Jurusan/Puslit: Farmasi/-/ LPPM Universitas Airlangga
 - Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga


Tim Peneliti

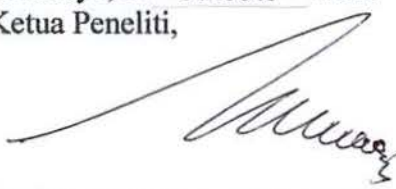
No.	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAH	FAKULTAS/J URUSAN	PERGURUAN TINGGI
1	Prof.Dr.Muhamad Zainuddin, Apt	Kimia Analisis/statistik	Farmasi	Universitas Airlangga
2	Dr. Ferdiansyah dr.,SpOT.,Dipl.TB	Bedah Tulang	Kedokteran/ Orthopaedi	UNAIR-RSUD Dr Soetomo Surabaya

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian
- Jangka waktu penelitian : 3 tahun
 - Biaya yang diusulkan 3 tahun : Rp. 300.000.000
 - Biaya yang disetujui tahun ini : Rp. 60.000.000

Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi

Surabaya, 31 Oktober 2012
Ketua Peneliti,


Dr.Umi Athiyah, Apt.,MS
NIP. 195604071981032001


Prof.Dr.H. Muhamad Zainuddin, Apt.
NIP 194509181974121001

 Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair


Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si
NIP 19590805 198701 1001

DAFTAR PUSTAKA

Regenerasi Bone Marrow
 Gelatin sebagai Sistem Pengantaran Genetamin dan
 Efektivitas Matriks Komposit Berbasis Hydroxyapatite

Label Penelitian

- Ketua Penelitian
 a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Muhammad Zainuddin, Apt
 b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 c. NIP : 194709181974121001
 d. Pangkat/Golongan : Pembina Utama Muda IV b
 e. Jabatan Fungsional : Guru Besar
 f. Bidang Keahlian : Kimia Analisis Statistik
 g. Fakultas/Jurusan/Instansi: Farmasi-IPM Universitas Airlangga
 h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Penelitian

No.	NAMA PENELITIAN	BIDANG KEAHLIAH	FAKULTAS JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1.	Dr. S.POT. Dpl. TB	Bedah Tulang	Kedokteran	Socetomo Surabaya
2.	Prof. Dr. Muhammad Zainuddin, Apt	Kimia Analisis Statistik	Farmasi	Universitas Airlangga

- Pengajuan dan jangka waktu penelitian
 a. Jangka waktu penelitian : 2 tahun
 b. Biaya yang disalurkan 2 tahun : Rp. 300.000.000
 c. Biaya yang disetujui tahun ini : Rp. 60.000.000

Surabaya, 31 November 2012
 Ketua Penelitian

Rektor
 Dekan Fakultas Farmasi

Prof. Dr. H. Muhammad Zainuddin, Apt
 NIP 194709181974121001

Prof. Umi Arikah, Apt, MS
 NIP. 195004071981032001

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Uair

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, M.Si
 NIP 19590205 198701 1001

RINGKASAN

Latar belakang penelitian ini: tentang penggunaan matriks komposit *Bovine hydroxyapatite*-gelatin sebagai sistem penghantaran gentamisin secara lokal untuk profilaksis dan atau terapi infeksi tulang, fiksasi tulang sendi atau pengisi bagian tulang yang hilang atau retak serta mempercepat regenerasi tulang pada *bone defect* akibat fraktur (patah atau retak) tulang, infeksi osteomyelitis, penyakit degeneratif seperti diabetes mellitus (gangren/amputasi), osteoporosis, osteoarthritis, penggantian sendi (lutut, paha, panggul, lengan). Kegunaan dari hasil penelitian ini adalah (1) mencegah terjadinya infeksi dan atau mengobati infeksi, (2) menghindari terjadinya resistensi bakteri akibat antibiotika yang sampai ke tulang lebih kecil dari MIC, (3) mengurangi terjadinya fluktuasi konsentrasi gentamisin, melepas gentamisin secara terkontrol, (4) menghindari terjadinya efek samping gentamisin seperti ototoksik-nefrotoksik, (5) mengurangi frekuensi pemberian antibiotika sehingga meningkatkan kepatuhan pasien dan (6) mengurangi biaya tinggal di RS bagi pasien. Disamping itu dengan matriks komposit BHA-gelatin *bone defect* cepat sembuh dan teratasi, (7) karena matriks tersebut dapat bersatu dengan tulang pasien dan tidak perlu dilakukan operasi pengambilan matriks seperti apabila digunakan matriks polimetil metakrilat (PMMA) yang selama ini digunakan.

Metode yang digunakan adalah: Mencampur secara langsung antara *bovine hydroxyapatite* (BHA) dan gelatin (GEL) serta Gentamisin dengan perbandingan secara berurutan sebagai berikut: (20: 2 /dalam keadaan kering): 10% dan dibuat dalam bentuk granul, kemudian dilakukan *cross-link* dengan (0,5-2,5%) glutaraldehid. Selanjutnya ditimbang 100 mg dan dicetak dalam bentuk pelet silinder, diameter 4 mm dengan beban seberat 3 ton. Untuk membuktikan kualitas pelet, pada tahun pertama dilakukan uji karakteristik secara invitro antara lain pembuktian terjadinya *cross-link* antara bahan BHA-GEN dan BHA-GEN-GEN dengan *cross-linker* GA menggunakan instrumen FTIR, morfologi permukaan pelet dengan SEM, porositas dan densitas, aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherchia coli*; untuk mengetahui profil pelepasan secara in-vitro dengan uji disolusi pelet selama 28 hari dan hasilnya ditanam dalam media agar yang masing-masing mengandung *Staphylococcus aureus* dan *Escherchia*

coli. Untuk membuktikan bahwa BHA-GEL-GA-GEN bersifat tidak toksis/ ramah terhadap sel dilakukan uji MTT.

Hasil dan pembahasan terjadinya *cross-linking* yaitu terbentuknya ikatan kovalen antara BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GA-GEN terlihat hilangnya bilangan gelombang 1715 dari gugus $-C=O$ yang dimiliki oleh GA, karena gugus $-C=O$ tersebut berubah menjadi $-C=N-R$, dimana R adalah rantai dari GEL atau GEN yang memiliki gugus $-NH_2$. Dengan SEM terlihat morfologi permukaan yang lebih tebal dan halus, hal ini menunjukkan bahwa BHA sebagai fase diam dibungkus oleh GEL dimana GEN terdispersi didalamnya. Proses *cross-linking* dengan GA menyebabkan komposit BHA-GEL dan BHA-GEL-GEN porositas menurun dan densitasnya meningkat serta *compress strength* nya juga meningkat dengan perendaman selama 28 hari pelet belum hancur, pelet mengembang dan ada banyak debris/ partikel kecil sehingga pelet memenuhi persyaratan sebagai pengisi tulang keras. Hasil disolusi dari pelet BHA-GEL-GA-GEN yang diambil secara berkala sampai 28 hari dan ditanam pada media agar menunjukkan aktivitasnya terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherchia coli*, hal ini terlihat dari daya hambatnya terhadap pertumbuhan ke dua bakteri tersebut. Dari hasil uji MTT terbukti bahwa pertumbuhan sel lebih dari 60% membuktikan bahwa BHA-GEL-GA-GEN tidak toksis dan ramah terhadap sel sekitarnya.

Kesimpulan: matriks komposit BHA-GEL-GA-GEN dalam bentuk pelet mempunyai aktivitas antibakteri selama 28 hari lebih dan mampu meregenerasi tulang pada defek tulang.

Penelitian selanjutnya untuk tahap ke dua uji secara in vivo yaitu aplikasi penggunaan pelet BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GA-GEN ditanam pada femur kelinci dan dimonitor selama 28 hari. Dilakukan *sacrifed* binatang coba pada hari ke 2; 7; 14; 21 dan 28. Selanjutnya untuk melihat regenerasi tulang dilakukan uji secara histopatologi; imunohistokimia dan radiologi serta konsentrasi gentamisin yang berpetrasi kedalam tulang dilakukan dengan cara memotong femur kelinci 0,5 cm arah proksimal dan distal dari tempat pelet ditanam.

ABSTRACT

MATRIX COPOSITE BOVINE HYDROXYAPATITE –GELATIN EFFECTIVITY for GENTAMICIN DELIVERY SYSTEM and REGERATION BONE DEFECT

Mohammad Zaninuddin#; Ferdiansyah##; Aniek Setiya Budiati** Fathia Rachmadani*
** Doctor candidate , #Lecture of pharmacy;## Lecture of Medicine, ;* Master candidate,

Bovine hydroxyapatite and gelatin (BHA-GEL) were used as bone regeration and a biodegradable delivery system for the administration of gentamicin sulfate (GEN) in prevention and treatment infection of bone defects, were synthesized. The materials, which ovoid bone infection, are exclusively composed of gentamicin sulfate; bioactive bovine hydroxyapatite and gelatin were manufacture as pellet of the mixed components and characterized in vitro. Cross-linking reaction was required to control the water penetration, swelling and release of gentamicin from the pellet. In vitro gentamicin release from the pellet at conditions of pH and temperature body were studied for 4 weeks and the sample was able to inhibit of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* growth, both in surrounding liquid and on matrix surface. The BHA-GEL-GEN cross-linking with glutaraldehyde (GA) were nontoxic to human osteoblasts and promote their proliveration. The results indicate that BHA-GEL-GEN with GA non-toxic and selfiendly- is promising biomaterial of significantly prolonged antibacterial activity.

Keywords: bovine hydroxyapatite; gelatin; gentamicin; gluraldehyde; drug delivery system; bone filler, bidegradable.

ABSTRAK

Efektivitas Matriks Komposit *Bovine Hydroxyapatite*-Gelatin sebagai Sistem Penghantaran Gentamisin dan Regenerasi *Bone Defect*

Bovine hydroxyapatite (BHA) dan gelatin (GEL) digunakan sebagai pengisi tulang dan sistem penghantaran gentamisin sulfat (GEN) yang bersifat biodegradabel, untuk mencegah dan pengobati infeksi pada defek tulang. Karakteristik secara in vitro dari campuran material bioaktif BHA-GEL dan GEN yang digunakan untuk menghindari infeksi tulang dibuat dalam bentuk pelet. Reaksi *cross-link* diperlukan untuk mengatur penetrasi air, mekarnya (swelling) dan pelepasan gentamisin dari pelet. Pelepasan gentamisin secara in vitro dari pelet dilakukan pada kondisi pH dan temperatur tubuh selama 4 minggu, dan filtrat yang diperoleh mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, begitu juga permukaan peletnya. Hasil cross-link BHA-GEL-GEN dengan glutaraldehid (GA) juga menunjukkan tidak toksit pada *human osteoblasts* dan memacu proliferasi / ramah terhadap sel sekitarnya. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa BHA-GEL-GEN-GA tidak toksik dan ramah terhadap sel serta dapat memperpanjang aktivitas antibakteri sehingga dapat dipromosikan.

Kata kunci: *bovine hydroxyapatite*; gelatin; gentamisin; gluraldehid; Sistem penghantaran obat (SPO); pengisi tulang, bidegradabel

PRAKATA

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Kuasa, berkat hidayah dan pertolonganNya maka, peneliti dapat menyelesaikan penelitian kami.

Terima kasih yang setinggi-tingginya peneliti sampaikan kepada Pemerintah Republik Indonesia melalui Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan RI yang telah memberikan bantuan pendanaan atas penelitian ini.

Terima kasih juga peneliti sampaikan kepada Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Universitas Airlangga, serta Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberi kesempatan untuk mendapatkan hibah penelitian Unggulan Universitas ini.

Terima kasih juga peneliti sampaikan kepada Dr. Ferdiansyah, dr. Sp(OT) atas kerjasama dan masukannya yang sangat berguna untuk memperbaiki substansi dan metode penelitian ini.

Terima kasih secara khusus peneliti sampaikan kepada Dra. Aniek Setya Budiatin, MS, Apt. yang telah membantu dalam melaksanakan penelitian ini. Tanpa bantuannya penelitian ini tidak akan dapat diselesaikan. Demikian juga kepada Fathia Ramadiani, S.Farm, Apt yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

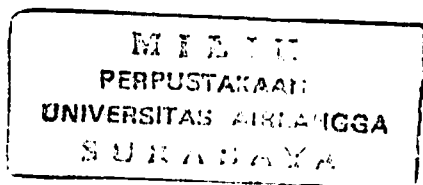
Demikianlah, semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat dan dapat menjadi modal awal serta inspirasi untuk penelitian selanjutnya.

Surabaya, Oktober 2012

Penulis,

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
A. LAPORAN HASIL PENELITIAN	
RINGKASAN DAN SUMMARY	ii
ABSTRAK (bahasa Inggris dan Indonesia)	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	8
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	19
BAB IV. METODE PENELITIAN	21
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	51
B. DRAFT ARTIKEL ILMIAH	
C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN	



DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 5.1.	Hasil pengamatan dan perhitungan uji toksisitas bahan dengan metode MTT	34
Tabel 5.2.	Pengambilan data sampel FTIR dari sediaan matriks komposit	36
Tabel 5.3.	Perhitungan Densitas dan porositas granul	38
Tabel 5.4.	Hasil pengamatan dan perhitungan uji kompresi	39
Tabel 5.5	Hasil pengamatan perendaman pelet dalam bufer fosfat salin	41
Tabel 5.6	Hasil pengamatan daya hambat terhadap <i>S aureus</i> dan <i>E coli</i> dari gentamisin yang berdifusi keluar dari pelet {BHA(G)ELENA}	42

DAFTAR GAMBAR

	Halaman	
Gambar 2.1	Proses pelepasan obat dari matriks komposit BHA-gelatin secara difusi, dimana matriks mengalami pemekaran dan erosi	9
Gambar 2.2.	<i>Bone defect</i> akibat dari beragam fraktur tulang yang dapat di fiksasi dengan matriks komposit	11
Gambar 2.3	Infeksi tulang (osteomyelitis), (A) harus dilakukan debridemen terdahulu, (B) diberi matriks komposit	12
Gambar 2.4.	Penggunaan implantasi pada gigi (Oates, 2007) dan (B) fiksasi pada penggantian sendi panggul secara total	13
Gambar 2.5.	X RD dari paduan HA dari tulang sapi (Biru) dan manusia (merah)	14
Gambar 2.6.	Struktur gelatin merupakan rangkaian asam amino	14
Gambar 2.7.	Struktur Glutaraldehid (glutarat dialdehid)	16
Gambar 2.8.	Pengaruh pemekaran GEL dengan berbagai konsentrasi GA dan waktu perendaman	17
Gambar 2.9.	Struktur gentamisin	18
Gambar 4.1	Skema tahapan kerja penelitian	23
Gambar 4.2.	Contoh penanaman sampel pada medium agar	25
Gambar 4.3.	Posisi implan formula terpilih pada femur kelinci	28
Gambar 5.1.	Gambar granul dari BHA-GEL(putih) dan BHA-GEL-GA (oranye)	29
Gambar 5.2.	Gambar granul dari BHA-GEL-GEN (putih kekuningan) dan BHA-GEL-GA-GEN (coklat)	29
Gambar 5.3.	Cross-linking dengan konsentrasi GA secara berurutan 0,5%; 1,0% dan 2,5% dari BHA-GEL dan BHA-GEL-GEN	30
Gambar 5.4.	Hasil pencucian dari cairan sisa GA (1,0% dan 2,5%) yang dipergunakan untuk merendam granul BHA-GEL-GEN	31
Gambar 5.5.	Gambar 5.5. Alat pencetak pelet dengan diameter lubangnya 4 mm	31
Gambar 5.6.	Bentuk Pelet dari BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GEN-GA dengan tekanan cetak seberat 3 ton	31
Gambar 5.7.	Orientasi analisis Gentamisin secara kromatografi lapisan tipis	32
Gambar 5.8.	Gambaran hambatan pertumbuhan <i>Staphylococcus aureus</i> oleh Gentamisin dari berbagai konsentrasi Gentamisin (dari 1,5 ppm-4ppm) dan 2;4;8 dan 16 ppm	32
Gambar 5.9.	Gambaran hambatan pertumbuhan secara berurutan <i>Kandida</i> , <i>E. Coli</i> dan <i>S. aureus</i> oleh pelet {BHA(G)ELENA} pada hari ke dua setelah inkubasi	33
Gambar 5.10	Elisa reader (Thermo Scientific) dan plate yang berisi sel dan sampel	33
Gambar 5.11.	Spektra FTIR dari glutaraldehid dengan bilangan gelombang	35

	-C=O 1715 cm⁻¹ dan 1638 cm⁻¹	
Gambar 5.12	Kumpulan spektra FTIR dari semua bahan yang digunakan	36
Gambar 5.13	Hasil SEM dari sediaan bentuk Pelet BHA-GEL-GA	37
Gambar 5.14	Hasil SEM dari sediaan bentuk pelet BHA-GEL-GEN dengan GA	37
Gambar 5.15	Degradasi dari BHA-GEL-GEN dan BHA-GEL dengan tekanan 1 dan 2 ton	40
Gambar 5.16	Pelet dari BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GEN-GA dibuat dengan tekanan 3 ton, pada hari ke 2.	40
Gambar 5.17	Besar daya hambat terhadap S aureus dan E coli dari Hasil disolusi yang diambil secara berkala	41

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	ORGANISASI TIM PENELITI	51
Lampiran 2	Gambar Peralatan Yang Dipergunakan	52

BAB I PENDAHULUAN

PERPUSTAKAAN
 UNIVERSITAS AIRLANGGA
 SURABAYA

1.1. Latar Belakang

Gentamisin merupakan antibiotika terpilih yang paling sering digunakan sebagai antibakteri yang bersifat bakterisida yang digunakan untuk profilaksis dan terapi infeksi tulang secara lokal. Hal ini dikarenakan sifatnya yang larut dalam air sehingga mudah berdifusi keluar dari matriks dan melakukan penetrasi kedalam tulang, stabil terhadap pH dan suhu tubuh. Dalam profilaksis dan terapi infeksi tulang diperlukan jangka waktu yang lama dan konsentrasi lebih besar dari konsentrasi hambatan minimal (MIC) agar dapat mengeradikasi bakteri yang masuk ke tulang pada waktu tindakan operasi pembedahan. Pada saat itu bakteri menempel pada implan dan masuk dalam peredaran darah dari tempat infeksi. Untuk mengatasi hal tersebut diperlukan matriks sebagai pembawa antibiotika dalam hal ini gentamisin yang mampu mengontrol pelepasannya.

Bone defect yang diakibatkan oleh berbagai kasus, antara lain : trauma/kecelakaan lalu lintas semakin, kanker/ tumor tulang, penyakit degeneratif seperti diabetes mellitus, osteoporosis, osteoarthritis dan lainnya semakin meningkat. Hal itu didukung oleh berbagai faktor antara lain : semakin meningkatnya populasi geriatri, perubahan gaya hidup serta sebagai efek samping dari modernisasi kehidupan masyarakat. Sebagai bukti dari peningkatan kasus *bone defect* adalah meningkatnya jumlah pasien bagian orthopaedi akhir-akhir ini. Lebih dari 1,5 juta pasien setiap tahunnya dilaporkan terjadi fraktur akibat osteoporosis di USA (Gardner *et al*, 2006) dan menghabiskan biaya lebih dari USD 15 milyar, sedangkan di negara berkembang 10 tahun mendatang diperkirakan 60 juta orang tidak bisa berjalan karena fraktur (Saundrapandian, 2009). Di Inggris kurang lebih 50.000 penggantian tulang paha dan beberapa lutut setiap tahunnya dan di USA 193.000 pasien karena osteoarthritis. Komplikasi infeksi terjadi 2-6% pasien terjadi setelah menjalani penggantian sendi pada paha dan 7-9 % terjadi pada penggantian lutut (Saundrapandian, 2009), pada fraktur tertutup infeksi yang terjadi rata-rata 1-2 %, sedangkan fraktur terbuka antara 30% atau lebih tergantung besarnya jaringan yang rusak, tingkat fraktur, dan tempat fraktur (Montali A, 2006). Semua prosedur operatif cenderung merupakan jalan masuknya kontaminasi bakteri nosokomial, hal ini telah dibuktikan oleh Matathuis *et*

al.(2005) yang mengkultur sampel dari *acebular reamers* dan *femoral rasps* selama digunakan dalam *primary total hip arthroplasties* pada 67 pasien , terdapat 20 pasien (30%) menghasilkan kultur positif, dan infeksi tulang yang terjadi cepat menyebar serta dapat menembus ke bagian medullary, korteks dan periosteum (Di Silvio L, 1999).

Untuk mengatasi terjadinya kasus infeksi pada pembedahan, diperlukan adanya usaha untuk mencegah terjadinya infeksi pada penggantian / pemasangan implan dari *bone defect* karena apabila tidak dilakukan akan mengakibatkan kegagalan dari operasi tersebut. Tindakan profilaksis atau terapi dengan antibiotika dengan jalan intravena maupun oral tidak dapat mencapai tulang yang terinfeksi secara maksimum dan tidak dapat dipertahankan dalam waktu lama secara optimum hal ini disebabkan karena tulang sangat sukar ditembus obat termasuk antibiotika. Selama *bone defect*, aliran darah disekitar tulang terganggu/ berkurang sehingga keberadaan obat tidak mencukupi atau < MIC meskipun diberikan secara intravena hal ini dapat menyebabkan terjadinya resisten bakteri. Untuk menghindari terjadinya resistensi bakteri diperlukan dosis tinggi dan dalam durasi waktu pemberian yang lama. Namun demikian tindakan tersebut tidak menyelesaikan masalah karena akan menimbulkan efek toksik terhadap pasien, antara lain terjadinya nefrotoksis, hepatotoksis dan ototoksis (Montali A, 2006). Sebagai salah satu usaha yang dilakukan untuk mencegah terjadinya resistensi bakteri dan toksisitas tersebut, maka sejak tahun 1970 dikembangkan suatu sistem penghantaran obat (SPO) secara lokal dan baru mendapat perhatian serius pada tahun 2000 (Saundrapandian, 2009)

Dari hasil studi retrospektif yang dilakukan oleh Institutional Review Board USA bekerja sama dengan Operations Iraqi Freedom and Enduring Freedom Tracking Database dari tahun 2001 sampai tahun 2006 diperoleh data lebih dari 1500 pasien mengalami fraktur tulang terbuka, akibat perang sangat. Penderita kasus ini akan sangat riskan terkena infeksi dan mengalami kerusakan pada syaraf atau struktur vaskuler, sehingga harus diamputasi walaupun merupakan keputusan yang berat bagi pasien dan dokter (Helgeson, 2009).

Dalam tindakan perbaikan *bone defect* melalui operasi rekonstruksi,ada beberapa masalah yang harus diperhatikan, antara lain : menentukan pilihan penggunaan bahan pengganti / pengisi tulang apakah autograft, allograft, biomaterial sintetik (hidroksiapatit, trikalsiumfosfat, koral) atau natural (*Bovine hydroxyapatite*, gelatin). Masing-masing bahan pengganti/pengisi tulang yang cacad mempunyai keterbatasan

dan kelebihan. Keterbatasan yang ada pada penggunaan autograft adalah jumlah bagian tubuh yang harus diambil akan menimbulkan morbiditas dan kerusakan ditempat lain, sedangkan allograft adalah resiko terjadinya penularan penyakit. (Hardy *et al*, 1997). Pengganti tulang sintetik seperti polimer akrilik (PA) dan hidroksi apatit (HA) sangat populer sampai saat ini untuk pilihan pengisi perbaikan defek tulang dan sistem penghantaran obat untuk profilaksis maupun terapi infeksi tulang. Namun kedua bahan sintetik tersebut tidak biodegradable, sehingga memerlukan operasi pengambilan kembali yang mengandung resiko infeksi (Habraken *et al*, 2007).

Usaha untuk mengatasi *bone defect* dan pencegahan/ terapi infeksi maka dibuat suatu matriks yang komposisinya menyerupai tulang yaitu komponen organik (kolagen, gelatin) untuk memperkuat komponen inorganik (HA) yang merupakan matriks tempat sel tulang berada seperti osteoblas, osteosit, osteoklas. Berdasarkan pertimbangan tersebut dibuat komposisi HA ditambah gelatin. Komposisi tersebut lebih baik daripada sendiri-sendiri sebagai sistem penghantaran obat disamping sebagai pengisi *bone defect*. Dengan komposisi tersebut diharapkan matriks yang dihasilkan secara mekanik stabil, dapat memperbaiki integritas jaringan dan dapat melepas obat secara kontinyu dan teratur sehingga diperoleh kadar diatas konsentrasi hambatan minimal (MIC) (Saundrapandian *et al*, 2009). Seperti penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al* (2004) membuat matriks komposit HA dengan gelatin sebagai sistem penghantaran gentamisin dalam bentuk mikrosfer yang dapat mengendalikan pelepasan gentamisin, menghasilkan pelepasan baik serta berfungsi sebagai pengisi celah tulang (*scaffold*).

Penelitian yang dilakukan oleh Springer (2004) secara prospektif dari tahun 2000 sampai 2004 pada operasi 36 lutut dari 34 pasien menunjukkan bahwa penggunaan gentamisin dosis tinggi secara lokal tidak memberikan efek samping seperti apabila dilakukan secara oral maupun intravena yaitu ototoksik serta nefrotoksik (de Klaver *et al*, 2009). Alternatif yang menarik dari penelitian sebelumnya adalah penggunaan komposit hidroksiapatit (HA) dan polimer protein gelatin sebagai pembawa antibiotika (Baro *et al*, 2002). Komposit polimer dan protein tersebut secara kimia merupakan komponen yang mirip dengan penyusun tulang, bersifat tidak toksik, biodegradable, biokompatibel, secara fisik tidak menghambat proses regenerasi tulang (*osteogenesis*) dan tidak menyebabkan terjadinya reaksi inflamasi (El-Ghannam *et al*, 2005). Disamping membawa obat, matriks komposit HA-gelatin dapat berfungsi sebagai fiksasi tulang, pengisi tulang yang kosong (*dead spaces*) atau hilang sehingga

tulang bisa saling melekat kembali, tempat berkembangnya sel-sel tulang (*scaffold*) (Hillig *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008). Salah satu kelemahan dari HA sintetik adalah kurang porous dan non biodegradable.

Untuk mengatasi kelemahan HA dari hasil sintesis yang kurang porous sehingga efek osteokonduktifnya rendah, maka dipilih alternatif lain yaitu menggunakan hidroksiapatit yang berasal dari tulang sapi (*Bovine Hydroxyapatite* = BHA). BHA mempunyai beberapa kelebihan diantaranya : lebih porous (porositas antara 250 –450 μm), stabil meskipun terkena radiasi dibanding biomaterial lain (Abe,2008). BHA yang porous bersifat osteokonduktif dapat berfungsi sebagai kerangka (*scaffold*) menyebabkan sel-sel jaringan disekitarnya akan bergerak masuk kedalamnya. Apalagi jika BHA ini digabung dengan gelatin, maka penetrasi sel kedalam pori-pori BHA selanjutnya akan mengalami proliferasi hal ini dipermudah oleh gelatin yang mengembang serta tererosi oleh cairan tubuh (Kim *et al.*, 2005; Hillig *et al.*, 2008). Sel berdiferensiasi membentuk matrik ekstraselular yang memfasilitasi neovaskularisasi, memungkinkan molekul bioaktif melekat dan mencapai sel untuk berintegrasi dengan sel sekitarnya.

Beberapa penelitian dengan BHA menunjukkan hasil yang baik seperti yang dilakukan oleh Hardy (1997) di bagian Orthopaedic Ambrose Pare Hospital, Perancis, pada implantasi dilakukan bulan Pebruari – Desember 1994 dengan produk Endobon[®] (BHA, terdiri dari 39,9% kalsium dan 56,7% fosfat), yang tidak mengandung antibiotika dari 18 pasien, 6 pasien mengalami infeksi dan harus dioperasi ulang untuk mengambil implannya, bakteri yang tumbuh *Staphylococcus* 3 pasien *salmonella*, *enterococcus*, *enterobacter cloacae* masing-masing 1 pasien, sedangkan Ramirez-Fernandez (2011) menggunakan produk BHA (Endobon[®]) untuk implantasi rekonstruksi tulang dalam waktu 4 bulan *bone defect* sudah terisi tulang baru seperti tulang disekitarnya. Sifat biokompatibel dan porositas yang besar dari BHA menyebabkan mudah bersatu (*complete incorporation/ osteoconductiveivity*) dengan jaringan tulang, berikatan secara fisika dan kimia dengan tulang, BHA tidak larut dan tidak diresorpsi sangat ideal sebagai material substitusi dalam pembentukan tulang baru (Ramirez-Fernandez, 2011). BHA sangat cocok/ sesuai, tidak menimbulkan alergi, tidak menularkan penyakit karena protein sudah dihilangkan dalam proses pembuatan (Hardy Ph, 1997; Ferdiansya, 2010, Ramirez-Fernandez, 2011). Produksi BHA relatif mudah yaitu dengan menghilangkan komponen protein terlebih dahulu kemudian dilakukan pemanasan 1000^oC selama 2 jam (Calvache, 2009; Ferdiansyah, 2008).

Kelebihan lain yang menguntungkan bahan baku untuk pembuatan BHA melimpah serta murah dibanding harga 1 gram HA sintesis impor berkisar antara 1 sampai 2,5 juta rupiah dan implan logam mencapai 60.000.000 sampai 150.000.000,- rupiah. Di Indonesia, BHA sudah di produksi oleh Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo Surabaya (Ferdiansyah, 2008) dan sudah dibuktikan bahwa hasil analisis X-ray menunjukkan kemiripan dengan HA manusia dan sebagai *scaffold* dari stem sel mesensimal menghasilkan regenerasi *bone defect* pada femur kelinci dalam waktu 8 minggu (Ferdiansyah, 2010). Sehingga BHA dapat menggantikan HA manusia, dimana ketersediaan HA manusia sangat kurang karena donor tulang manusia sangat terbatas. Dari tahun 1997 sampai 2001 tercatat peningkatan kebutuhan biomaterial sebanyak 4 kali (Abdurrahman, 2002; Ferdiansyah, 2010). Peningkatan produksi BHA-gelatin diperlukan untuk mengatasi kebutuhan bahan implan yang semakin meningkat dan mahal untuk memperbaiki defek tulang akibat kecelakaan lalu lintas yang semakin hari semakin meningkat maupun akibat osteomyelitis, kanker/ tumor tulang, osteoforosis/osteoartritis dan penyakit degeneratif/gangren.

Pada penelitian terdahulu diperoleh perbandingan terbaik antara HA : gelatin (kering) = 20 : 2 dapat mengikat 3% gentamisin, yang dapat dilepaskan selama 28 hari diatas MIC (Baro, 2002; Kim, 2005; Hillig, 2008) , sedangkan dari beberapa produk yang sudah beredar dengan pembawa semen poli metil metakrilik (PMMA) perbandingan antara antibiotika dan semen terutama gentamisin sulfat adalah 0,5g/40g semen (1,25%) untuk profilaksis sedangkan untuk terapeutik 1 – 2 g/40g semen (2,5 – 5%) (Jiranek et al, 2006). Gentamisin digunakan karena stabil pada suhu dan pH tubuh, sangat larut air, mudah berdifusi ke jaringan disekitarnya, sedangkan vankomisin dalam waktu 3 minggu aktivitas turun sampai 40 % dan golongan sefalosporin dalam waktu seminggu turun sampai 90% (Campoccia et al, 2010). Pembawa PMMA yang bersifat nonbiodegradable dan hidrofob menyebabkan gentamisin yang terlepas pada awalnya sangat besar karena obat yang teradsorpsi dipermukaan mudah lepas sedangkan yang terjebak didalamnya sukar terdisolusi karena cairan tubuh sukar masuk kedalam PMMA akibatnya konsentrasi gentamisin yang berdifusi ke tulang < MIC (Montali A, 2006) sehingga menyebabkan mudah terjadi resistensi bakteri terhadap gentamisin, hal ini sudah terjadi di USA dan Eropa (Faber et al, 2003). Pada profilaksis implan setelah penggunaan jangka panjang/retak pada operasi lutut dan panggul atau terapi osteomyelitis setelah obat habis PMMA harus diambil karena bersifat toksis, memerlukan pembedahan ulang yang dapat menyebabkan terjadinya

infeksi kembali dan serpihan kecil-kecil yang terlepas sukar untuk diambil, meninggalkan bagian yang berlubang setelah sembuh, hal inilah yang menjadi masalah bagi dokter dan pasien, (Montali A, 2006). Dari penelitian sebelumnya dilakukan pengambilan semen tulang setelah 10 tahun digunakan pada sendi panggul dari lima pasien, empat menunjukkan konsentrasi gentamisin rendah dalam cairan sendi sedang seorang menunjukkan konsentrasi yang sangat tinggi yaitu 92,3 mg/L akibat dari semen sendi panggul mengalami keretakan sehingga gentamisin yang terjebak dalam semen berdifusi keluar (Powles, 1998). Sedangkan dari penelitian retrospektif antara 2008 - 2010 di RSUD Dr Soetomo Surabaya pada operasi arthroplasti diperoleh data 57 operasi sendi dari 54 pasien masih menggunakan *bone cement* (PMMA) untuk fiksasi tulang sendi yang diberi gentamisin dimana pencampuran antara semen dan serbuk gentamisin dilakukan secara manual, disamping pasien diinjeksi antibiotik lain untuk profilaksis sebelum operasi, 3 sampai 5 hari sesudah operasi, dilanjutkan secara peroral (Fathehah, 2011).

Dengan demikian kemungkinan penggantian HA oleh BHA dengan komposisi BHA : gelatin (kering): 20 : 2 mampu mengikat 3 % gentamisin dan melepaskannya selama 28 hari diatas MIC serta mampu memperbaiki *bone defect*. Dengan komposisi tersebut kemungkinan pelepasan gentamisin tidak optimal karena ikatannya dengan gelatin lemah. Maka kemungkinan dengan penambahan bahan pengikat-silang (cross-link agent) gluteraldehyde akan memperkuat ikatan gentamisin dengan gelatin sehingga pelepasannya dapat terkontrol.

1.2. Permasalahan penelitian

1. Apakah matriks komposit yang terdiri atas BHA dan gelatin dapat digunakan sebagai pengisi celah tulang (*bone defect*)
2. Apakah matriks komposit yang terdiri atas BHA, gelatin dan glueraldehyd dapat digunakan sebagai sistem penghantaran gentamisin lokal pada penanganan *bone defect*?

1.3. Tujuan penelitian

1. Menghasilkan formula matriks komposit pengisi celah tulang (*bone defect filler*) dengan bahan dasar BHA dan gelatin yang telah diuji secara *in vitro* dan *in vivo*.

2. Menghasilkan produk sistem penghantaran lokal gentamisin dengan bahan dasar BHA, gelatin dan gluteraldehid sebagai *cross-link agent*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sistem Penghantaran Obat = SPO (Drug Delevery System=DDS)

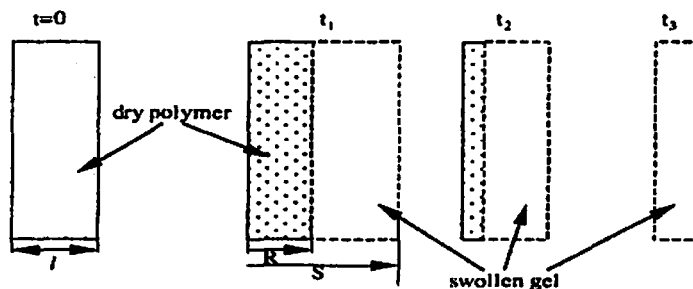
Sistem penghantaran gentamisin dengan target tulang merupakan pemberian gentamisin secara lokal untuk menghasilkan efek yang optimum dapat mengeradikasi bakteri penyebab infeksi. Keuntungan pemberian secara lokal dari gentamisin dapat mencegah terjadinya efek samping sistemik seperti ototoksis dan nefrotoksik serta dapat mencegah resistensi bakteri (de Klaver, 2009). Bentuk formula konvensional seperti tablet, kapsul atau krim yang digunakan secara oral, topikal dimana obat (bahan aktif) akan terlepas, diabsorpsi dan masuk sirkulasi sistemik dengan cepat, hal ini terjadi pada penggunaan obat dalam waktu singkat. Hasilnya konsentrasi maksimum dari obat akan cepat tercapai dan diikuti secara eksponensial penurunan karena adanya proses eliminasi obat. Dalam perkembangan di bidang farmasi untuk penggunaan obat dalam waktu lama digunakan sistem penghantaran dengan pelepasan lambat konsentrasi dilepas terkontrol, mendekati konstan (order nol) pada dosis terapi, untuk menghindari penggunaan berulang kali, meningkatkan kenyamanan/kepatuhan pasien, menjaga dosis terapi dalam waktu lama, mengurangi toksisitas, pengobatan secara lokal, efek profilaksis, terapi tercapai, biaya murah (Nandi, 2009). Sistem penghantaran obat (SPO) atau *Drug Delevery System* (DDS) merupakan suatu sistem yang dirancang untuk membawa dan melepaskan obat secara terkontrol dalam waktu lama pada daerah yang dikehendaki selama terapi (Vergnaud *et al*, 2005). Tiga parameter penting yang harus diperhatikan dalam SPO yang sesuai yaitu sifat obat, keadaan penyakit dan lokasi sakitnya di tubuh.

Banyak keuntungan dan manfaat dari sistem penghantaran obat dibanding dengan sistem konvensional antara lain :

1. Mempertahankan kadar obat terapeutik dalam lingkungan yang dituju dengan respon klinik yang dikehendaki dalam waktu lama dan konsisten pada pasien.
2. Menjaga konsentrasi obat tidak fluktuasi sehingga dapat meminimalkan efek samping yang tidak diinginkannya, dosis terkontrol secara farmakokinetik.
3. Dapat mengurangi frekuensi pemberian obat sehingga meningkatkan kepatuhan pasien dalam penggunaan obat dan memudahkan pemberian obat
4. Dari segi ekonomi, akan mengurangi biaya dari penggunaan obat; yang seharusnya diberikan 3 kali sehari, dapat diberikan sekali dalam waktu lama.

Kerugiannya adalah jika terjadi efek samping sukar untuk segera diatasi; sukar menghilangkan obat yang sudah beredar dalam tubuh, pengaturan dosis juga sukar.

Konsep dan rancangan sistem dari kontrol kecepatan penghantaran obat adalah untuk mengontrol penghantaran obat, penjagaan aktivitas obat selama terapi dan pelepasan pada target jaringan yang dituju. Sehingga diperlukan biomaterial untuk membentuk lapisan pembatas (*barier*) dalam hal ini digunakan polimer baik yang bersifat hidrofobik atau hidrofilik, biodegradabel, biokompatibel dari sintesis maupun alam (hewan, tumbuhan, mineral alam). Pembuatan membran pembatas dapat dilakukan dengan suspensi polimer dibiarkan menguap untuk menghasilkan lapisan yang dapat bertindak sebagai lapisan protektif untuk tablet atau granul yang mengandung obat sebagai pembatas yang mengontrol pelepasan obat, atau pematatan dalam bentuk mikroemulsi dengan pelarut organik berupa minyak nabati yang mengandung 2% surfaktan Span 80. Mekanisme lapisan pembatas akan melepas obat (bahan aktif) ada dua cara yaitu secara cepat dan lambat dengan difusi lambat sebagai aktivitas lapisan gel (Gambar 1).



Gambar 2.1. Proses pelepasan obat dari matriks komposit BHA-gelatin secara difusi, dimana matriks mengalami pemekaran dan erosi (Kim, 2004)

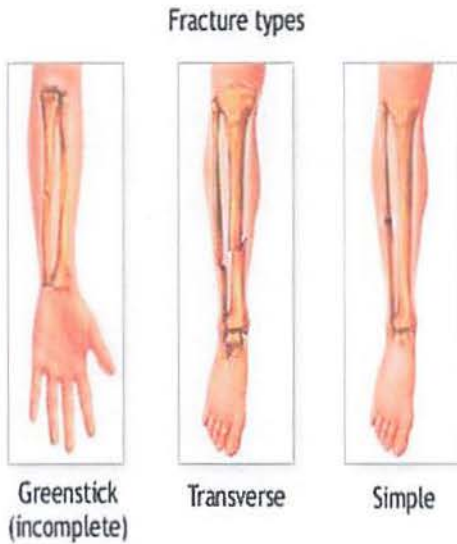
2.2. Aplikasi matriks komposit BHA-gelatin+gentamisin pada: gangguan pada sendi, fraktur tulang, infeksi tulang guna pencegahan dan terapi infeksi tulang.

Terjadinya dislokasi sendi atau penyakit sendi seperti osteoarthritis serta osteoporosis (penyebab fraktur tulang pada geriatri) terutama tulang panggul, tulang lutut memerlukan rekonstruksi jaringan tulang dengan implan tulang buatan yang berasal dari bahan tambahan yang biasa disebut biomaterial. Kurang lebih 50.000 penggantian tulang paha, panggul dan beberapa lutut setiap tahunnya di Inggris dan 193.000 di USA karena osteoarthritis (Saundrapandian, 2009), dari penelitian yang dilakukan oleh Springer (2004) secara prospektif dari tahun 2000 sampai 2004

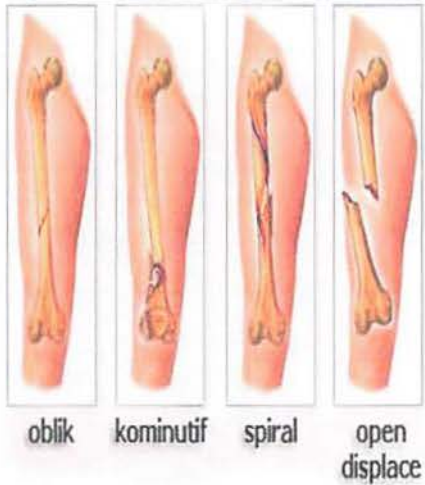
ditemukan operasi 36 lutut dari 34 pasien. Di RSUD Dr Soetomo Surabaya dari penelitian retrospektif antara tahun 2008 sampai 2010 ditemukan data 54 pasien di bagian Orthopaedi dan Traumatologi menjalani operasi sendi dan dilakukan 57 operasi karena ada 3 pasien dua kaki yang dioperasi rekonstruksi dengan menggunakan semen tulang (Fatheha, 2011). Pada penggantian tulang diperlukan biomaterial dalam rekonstruksi jaringan tulang antara lain dari metal yang inert seperti titanium, aluminium dalam penggunaan jangka waktu yang lama dapat kehilangan sifat aseptiknya dan bersifat karsinogenesis. Dikembangkan biomaterial lain polimer sintetis seperti polimetil metakrilat (PMMA), polilaktat, poliglikolak digunakan sebagai polimer untuk menggantikan jaringan yang keras, namun memiliki resiko retak dan meninggalkan pecahan kecil-kecil (debris) yang bersifat toksis dan sukar untuk dibersihkan. Dan sebagai pembawa antibiotika PMMA pada awalnya akan melepaskannya dengan konsentrasi tinggi hal ini disebabkan sifat hidrofob dari PMMA, sehingga obat yang teradsorpsi dipermukaan dilepas semua dan obat yang terjebak didalamnya sukar berdifusi keluar karena PMMA sukar ditembus oleh cairan tubuh, menyebabkan terjadinya bakteri resisten terhadap gentamisin (Faber, 2003). Dari penelitian sebelumnya dilakukan pengambilan semen tulang setelah 10 tahun digunakan pada sendi panggul dari lima pasien, empat menunjukkan konsentrasi gentamisin rendah dalam cairan sendi sedang seorang menunjukkan konsentrasi yang sangat tinggi yaitu 92,3 mg/L akibat dari semen sendi panggul mengalami keretakan sehingga gentamisin yang terjebak dalam semen berdifusi keluar (Powles, 1998), konsentrasi tersebut dapat menyebabkan toksisitas terhadap pasien. Sekarang dicoba dengan biomaterial dari polimer seramik yang mempunyai sifat osteokonduksi bersifat biodegradabel, biokompatibel antara lain hidroksi apatit (HA), kalsium fosfat, kalsium karbonat, kalsium sulfat dan golongan protein seperti kolagen, gelatin.. Golongan seramik diketahui menyebabkan reaksi inflammasi yang merupakan awal terjadinya proses penyembuhan dan penurunan *bone marrow*. Penggunaan partikel HA dan kalsium fosfat menunjukkan kemampuannya menstimulasi ekspresi dan sekresi sitokin dan protease yang meningkatkan resorpsi tulang akibat terbentuknya osteoklas, dengan terjadinya resorpsi tulang maka osteoblas akan terbentuk dan mempercepat terjadinya remodeling sehingga tulang baru segera terbentuk (Korkusuz, 2004).

Aplikasi penggunaan matriks komposit BHA-gelatin yang mengandung gentamisin nantinya dapat diberikan pada berbagai sebab *bone defect* terlihat pada Gambar 2.2 yang memperlihatkan berbagai bentuk fraktur, infeksi tulang

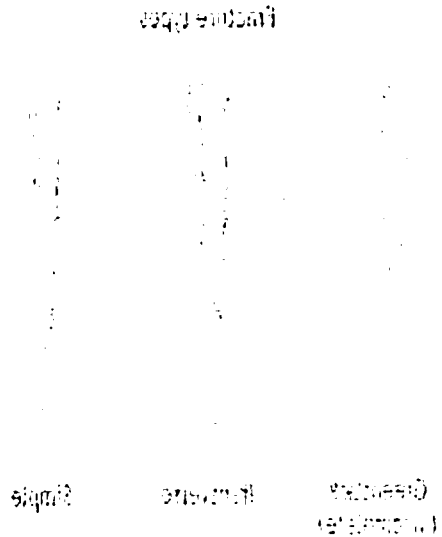
(osteomyelitis) terlihat pada Gambar 2.3, dapat juga digunakan sebagai pengganti/ implan gigi (Gambar 2.3 A), fiksasi dengan matriks komposit dapat dilakukan pada operasi penggantian sendi pinggul pada geriatri (Gambar 2.3.B), dan dapat diinjeksikan pada pasien osteoporosis yang terjadi di tulang belakang.



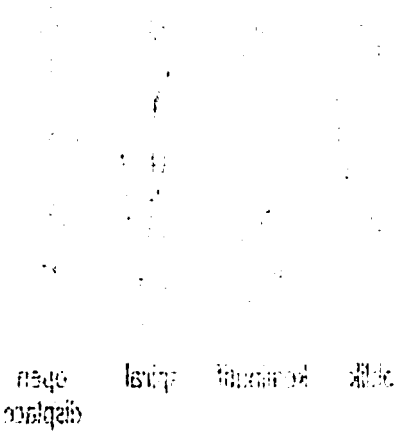
Gambar 2.2. *Bone defect* akibat dari beragam fraktur tulang yang dapat di fiksasi dengan matriks komposit (McGuinness H, 2010)

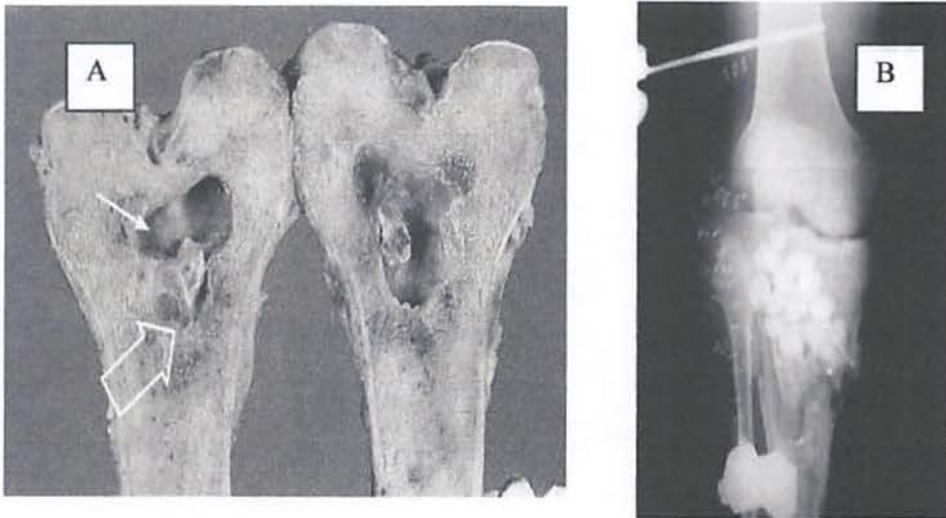


osteomyelitis) terlihat pada Gambar 2.3, dapat juga digunakan sebagai pengganti implan gigi (Gambar 2.4). Iktisasi dengan matriks komposit dapat dilakukan pada operasi penggantian sendi pinggul pada geriatric (Gambar 2.3.13), dan dapat diinjeksikan pada pasien osteoporosis yang terjadi di tulang belakang.

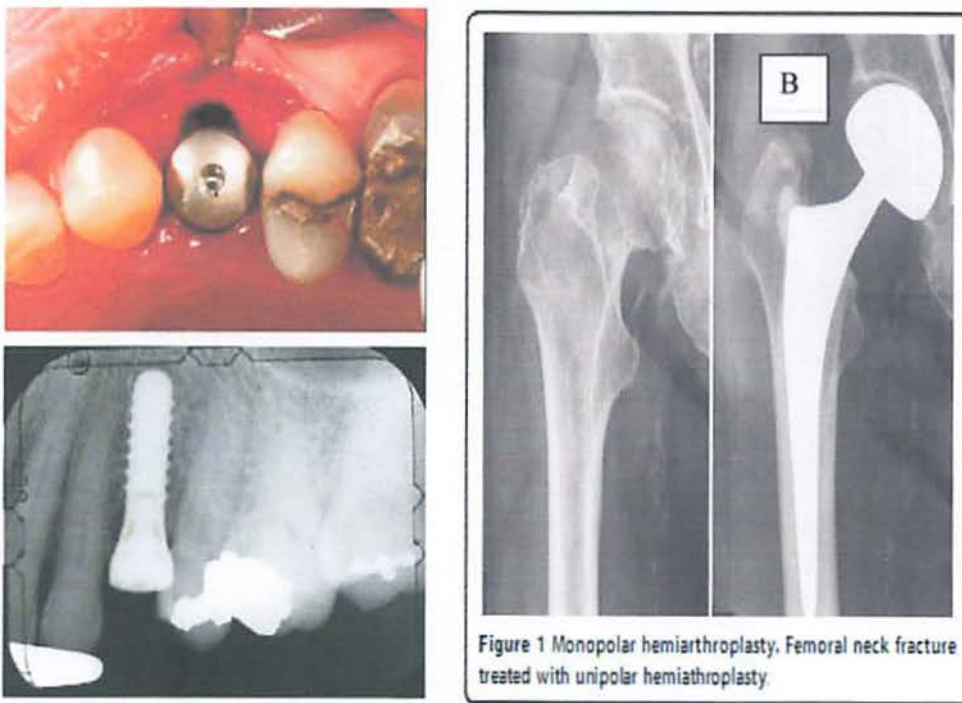


Gambar 2.3. Bone grafts applied on different factors using composite matrix (McGinnies H. 2010)





Gambar 2.3. Infeksi tulang (osteomyelitis), (A) harus dilakukan debridemen terdahulu, (B) diberi matriks komposit (Faber, 2005)



Gambar 2.4.(A) Penggunaan implantasi pada gigi (Oates, 2007) dan (B) fiksasi pada penggantian sendi panggul secara total (Ossendorf, 2010)

2.3. Bovine Hydroxyapatite (BHA) (Walsh, 2003)





Gambar 2.3. Infeksi tulang konvensional (A) dan infeksi tulang konvensional (B) dengan matriks organik (Lambert, 2003)



Gambar 2.4. (A) Partikel HA konvensional (Lambert, 2003) dan (B) Partikel BHA konvensional (Lambert, 2003)

2.3. Bovine Hydroxyapatite (BHA) (Wolke, 2003)

Hidroksiapatit adalah suatu bentuk kristal kecil pipih kalsium fosfat dengan rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ yang merupakan komponen mineral tulang dan gigi bersifat larut dalam suasana asam. Kristal HA mempunyai panjang kira-kira 40 nm dan lebar 1-3 nm dalam tulang tersebar diantara jaringan kolagen secara teratur dengan jarak antara 60-70 nm. Sedangkan BHA merupakan hidroksi apatit (HA) hasil ekstraksi dari tulang sapi, mempunyai sifat dan struktur mirip dengan HA tulang manusia (Ferdiansyah, 2010).

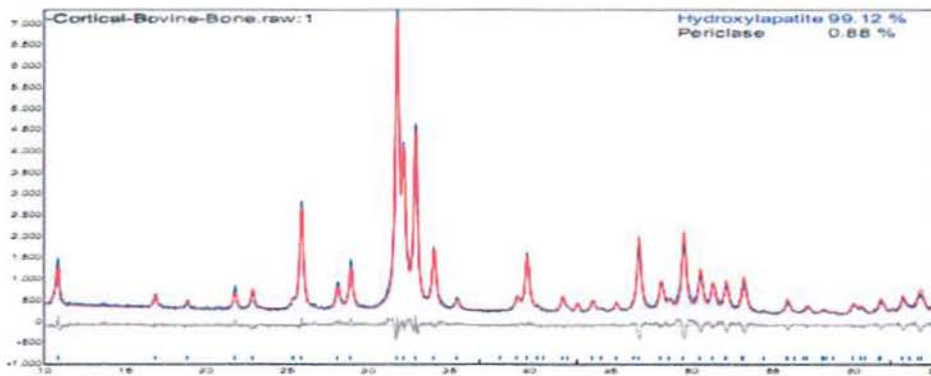
Di Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo Surabaya dilakukan isolasi HA dari tulang sapi dengan cara sebagai berikut : tulang dibersihkan, dipotong-potong bentuk kubus $1 \times 1 \times 1 \text{ cm}^3$. Selanjutnya dilakukan deproteinasi untuk menghilangkan kolagen dan protein yang ada ditulang tersebut direndam dalam H_2O_2 selama seminggu, kemudian dilakukan pengeringan dengan suhu 1000°C sehingga diperoleh HA dalam bentuk kubus dengan porositas antara 150 – 360 μm . Untuk mengetahui kemurnian dan persamaannya dengan HA dari manusia maka dilakukan test dengan defraksi sinar X diperoleh hasil yang hampir berimpit (Gambar 2.13), sehingga HA dari tulang sapi aman digunakan untuk manusia karena kemiripannya dan tidak toksis.

Kelebihan BHA dibanding hasil sintesis adalah (Korkusuz, 2004; Ferdiansyah, 2008; Calvache, 2009):

1. Tidak toksik, porus (150-360 μm) sehingga sel normal mudah masuk ke dalamnya, mudah diterima/bersatu dengan sel normal disekitarnya (biokompatibel), mempunyai sifat osteokonduktif, dengan pori-pori yang besar memudahkan aliran oksigen dan nutrisi masuk sehingga meningkatkan proses osteogenik (bioaktif), osteoinduktif, tidak menimbulkan reaksi inflammasi..
2. Mempunyai sifat mirip seperti HA dari manusia dilihat porositasnya, sifat osteokonduktif, hasil X ray menunjukkan kemiripan (Gambar 2.5), dengan

implan HA pada *bone defect* menunjukkan bagian pinggir dari implan akan mengeras sehingga mencegah memanjangnya fraktur.

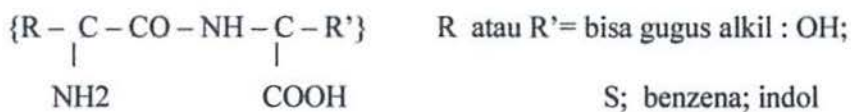
3. Harganya murah dan bahan baku mudah didapat dipasaran (HA sintesis harganya 1-2,5 juta setiap gramnya)
4. Dapat diproduksi dalam jumlah besar dan relatif mudah, murah karena bahan baku tersedia banyak serta mudah mendapatkan sehingga kebutuhan dapat terpenuhi, tidak harus menunggu donor dari manusia yang sangat jarang dan sukar diperoleh.



Gambar 2.5. X RD dari paduan HA dari tulang sapi (Biru) dan manusia (merah) (Ferdiansyah, 2008)

2.4. Gelatin (The Merck Index, 2001)

Rumus kimia gelatin Gambar 2.15.



Gambar 2.6. Struktur gelatin merupakan rangkaian asam amino

Bersifat tidak berwarna sedikit kekuningan, transparan, praktis tidak berbau, tidak keras, serbuk kasar. Bersifat amfoter, mudah mengembang dan menyerap air 5-10 kali beratnya untuk membentuk gel pada suhu dibawah 35-40°C. Larut dalam air panas, campuran panas gliserol-air, asam asetat dan tidak larut dalam etanol, aseton,

eter, kloroform dan minyak lemak/ minyak menguap. Batas mikroba < 51> , jumlah bakteri < 1000/gram dan uji terhadap Salmonella dan E. coli negatif .

Komposisi asam amino gelatin: glycine 26.0-27.0%, alanine 8.7-9.6%, isoleucine 1.4-1.7%, leucine 3.2-3.6%, valine 2.5-2.7%, serine 3.2-3.8%, threonine 1.9-2.2%, proline 14.8-17.6%, phenylalanine 2.2-2.6%, tyrosine 0.49-1.1%, tryptophan 0.0-0.003%, methionine 0.6-1.0%, cystine 0.1-0.2%, histidine 0.6-1.0%, arginine 8.6-9.3%, lysine 4.1-5.9%, aspartic acid 5.5-6.8%, glutamic acid 10.2-11.7%, hydroxyproline 12.6-14.4%, hydroxylysine 0.76-1.5%.

Gelatin adalah produk yang didapat dari hidrolisis atau pemanasan kolagen yang berasal dari kulit, jaringan ikat putih dan tulang hewan digunakan sebagai stabiliser, penguat, perekat merupakan polipeptida yang mempunyai asam amino sama dengan induknya kolagen (The Merck Index, 2001). Di bidang farmasi digunakan untuk bahan pembuatan kapsul, *suspending agent*, suppositoria, perekat serta dianjurkan untuk penggunaan secara parenteral sebagai pengganti plasma dan telah digunakan sebagai adjuvan makanan protein dan memperbaiki tekstur makanan.

Dalam sistem penghantaran obat (SPO) gelatin bertindak sebagai perekat yang bagus bersifat liat dan kuat serta siap diserap oleh jaringan sekitarnya (Hillig *et al*, 2008). Berfungsi untuk memperkuat, mengeraskan dan membungkus sebagai membran hidroksiapatit serta obat dalam bentuk mikroenkapsul, agar obat dapat dikontrol dan dilepas dalam waktu lama (Ginalska *et al*, 2005). Keuntungan bentuk dan cara mencampur dari formula ini dibanding bentuk konvensional adalah dapat memperkecil bentuk molekulnya sehingga mudah bersatu dengan sel jaringan normal disekitarnya dan pelepasan/penghantaran obat dapat diatur untuk penggunaan secara lokal dalam waktu lama. Gelatin (GEL) dapat mengembang (*swelling*) sehingga dapat mengatur pelepasan obat secara difusi serta mengalami erosi akibatnya HA dan GEL

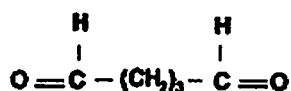
dapat bersatu dengan sel jaringan normal disekitarnya untuk mengisi ruang kosong serta menginduksi terbentuknya tulang baru (Hillig *et al*, 2008). Dengan glutaraldehid dapat membentuk ikatan kovalen dengan gugus lain seperti OH atau NH₂ yang kuat sehingga gelatin menjadi lebih kaku dan reaksi terlihat pada Gambar 2.19. (Nelson *et al*, 2002; Ginalska *et al*, 2005)

Keuntungan penggunaan polimer gelatin karena bersifat:

- biodegradabel (mudah mengembang- tererosi- terlepas) dan merupakan komponen tulang (protein)
- biokompatibel/inkorporasi (mudah bersatu dengan tulang normal)
- bersifat plastis sehingga mudah dibentuk dan dapat sebagai pengisi tulang.
- tidak toksik dan tidak menimbulkan alergi/mudah diterima tubuh
- dalam sistem penghantaran obat (SPO) bertindak sebagai membran pembatas yang dapat mengontrol pelepasan obat.

2.5. Glutaraldehid (The Merck Index, 2001)

Struktur terlihat pada Gambar 2.16. dibawah,

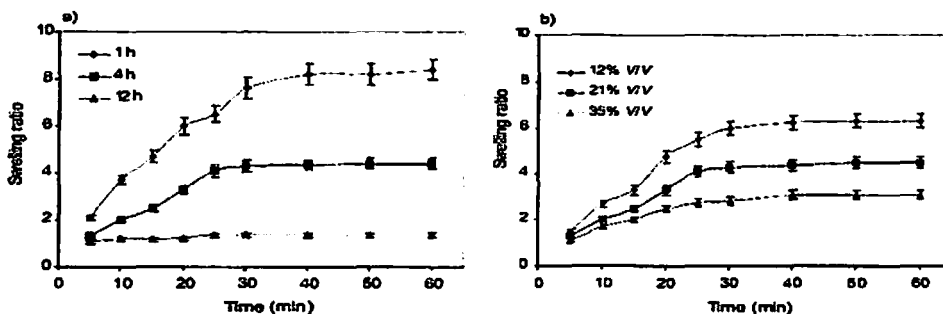


Gambar 2.7. Struktur Glutaraldehid (glutarat dialdehid)

Rumus molekul: C₅H₈O₂, berat molekul: 100.12.

Dalam sistem penghantaran obat, gluraldehid (GA) dipergunakan sebagai *cross-link agent* yang berguna untuk pengikatkan antara PET (poly (ethylene

terephthalate) - GEL dan GEN dengan membentuk ikatan kovalen seperti terlihat pada reaksi Gambar 2.19. Dengan terbentuknya ikatan tersebut maka menyebabkan sediaan menjadi kaku dan keras, hal ini tergantung dari konsentrasi GA yang digunakan dan lama perendaman sediaan dalam GA terlihat pada Gambar 2.17. (Dinarvand, 2005). Sehingga apabila digunakan GA konsentrasi tinggi dan waktu kontak lama, maka matriks komposit menjadi kaku dan keras sehingga mempengaruhi pelepasan obat dalam sistem penghantaran obat, pemekaran gelatin terbatas dan proses difusi juga terpengaruh (Kim, 2005). Dengan terbentuknya ikatan kovalen menyebabkan sediaan gelatin sukar larut tetapi mengembang (*swelling*), menyebabkan gentamisin yang ada didalamnya akan keluar dengan cara difusi dengan masuknya cairan kedalam mikrokapsul gelatin, sehingga pelepasan obat dapat dikontrol, maka perlu dilakukan orientasi berapa konsentrasi GA yang digunakan dan lama perendamannya.



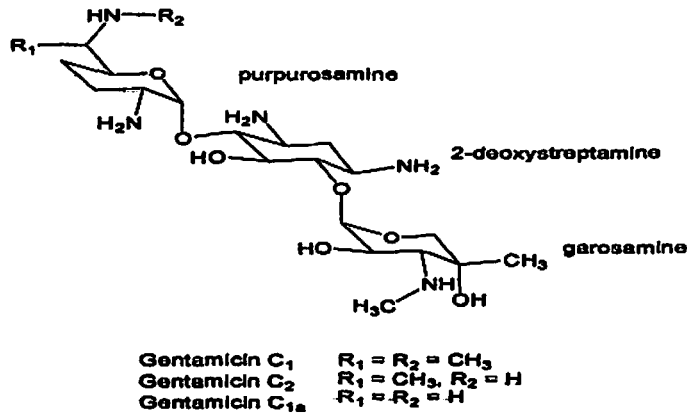
Gambar 2.8. Pengaruh pemekaran GEL dengan berbagai konsentrasi GA dan waktu perendaman (Dinarvand, 2005)

2.6. Gentamisin (The Merck Index, 2001)

Gentamisin (GEN) merupakan antibiotik kompleks terdiri dari C_1 ; C_2 ; C_{1a} (Gambar 2.17) yang dihasilkan dari fermentasi *Micromonospora purpurea* atau *M. echinospora*, dengan rumus molekul $C_{21}H_{43}N_5O_7$ dan berat molekul = 477,59; komposisi atom dalam molekul : C 52.81%, H 9.07%, N 14.66%, O 23.45% ; titik lebur : 94-100°C, rotasi optik : $[\alpha]^{D25} +158^\circ$. Bersifat polar kation sangat larut air ,

aktivitas optimum pada pH 6 – 8 dan aktivitas antibiotikanya dihambat pada suasana asam pada pH rendah dan kation divalen, stabil pada suhu yang relatif tinggi ($\pm 80^{\circ}\text{C}$).

Struktur kimianya adalah terlihat pada Gambar 2.18



Gambar 2.9. Struktur gentamisin (The Merck Index, 2001)

GEN termasuk golongan aminoglikosida yang bersifat sangat aktif/ poten melawan hampir semua bakteri Gram negatif dan Gram positif, spektrum luas. Memiliki hambatan minimal yang rendah dan bersifat bakterisid, jarang menyebabkan alergi.

Mengingat efek samping dari GEN apabila bakteri tersebut peka terhadap ampisilin, sefalosporin atau fluoroquinolon maka dipilih golongan tersebut yang kurang toksik. Namun ke 3 golongan tersebut mudah mengakibatkan terjadinya resistensi dari bakteri, sehingga GEN menjadi pilihan utama, terutama di rumah sakit banyak digunakan karena infeksi nosokomia (*P. Aeruginosa*, *Serratia spp*). Bakteri yang peka terhadap gentamisin adalah *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* dan *Proteus sp*. Dalam sistem penghantaran obat gentamisin banyak digunakan untuk preventif atau kuratif pada pemakaian lokal karena sifatnya yang stabil dalam suhu tinggi dan pH tubuh, mudah larut air dan tidak dimetabolisme di liver (Jiraneck, 2006).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan

Berdasarkan permasalahan diatas maka dalam penelitian ini akan menghasilkan matriks komposit gelatin - BHA yang di *cross-link* dengan glutaraldehid (GA) sebagai SPO yang dapat mengontrol pelepasan gentamisin dan mengisi/mengganti tulang pada celah (*defect*) tulang secara optimal.

3.1.2. Tujuan khusus

1. Membuktikan bahwa matriks komposit BHA-gelatin yang di *cross-link* dengan glutaraldehid mampu bertindak sebagai sistem penghantaran gentamisin dengan model in vitro pada media buffer fosfat salin pH 7,4 suhu 37°C.
2. Membuktikan gentamisin yang dilepas dari matriks komposit BHA-gelatin masih mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri gram negatif : *Enterobacter* atau *E coli*) dalam media agar.
3. Membuktikan matriks komposit BHA-gelatin dapat mengontrol pelepasan gentamisin konsentrasi yang mampu mengeradikasi bakteri.
4. Membuktikan terjadinya pertumbuhan *soft callus* disekitar matriks komposit BHA-gelatin pada celah (*defect*) tulang dengan menggunakan model penanaman bentuk sediaan pelet dari matriks komposit pada femur kelinci.

- berdasarkan bentuk sebagai berikut yang matriks komposisi pada tahun ketujuh
 BHV-gelatin pada setiap (40%) untuk dengan menggunakan model
4. Membandingkan selubung/bungkus bertumbuhnya selubung disekitar matriks komposisi
 gelatinisru konduktansi yang mampu mengidentifikasi partikel
 3. Membandingkan matriks komposisi BHV-gelatin dapat mengontrol pelepasan
 kalsium/oksida atau di dalam media pias
- masih mempunyai aktivitas antimikroba terhadap partikel yang ada di :
2. Membandingkan kemampuan yang berbeda dari matriks komposisi BHV-gelatin
 untuk 3D.C
- gelatinisru dengan model in vitro pada media buffer fosfat saline pH 7.4
 dengan menggunakan metode pertumbuhan selulosa agarose sistem pengamatan
1. Membandingkan partikel matriks komposisi BHV-gelatin yang di cross-link dengan

3.1.2. Tujuan lainnya

dari menggunakan selubung untuk pada setiap (40%) untuk dengan menggunakan model
 menggunakan (CA) sebagai 2PO yang dapat mengontrol pelepasan gelatinisru
 menggunakan matriks komposisi gelatin - BHV yang di cross-link dengan
 berdasarakan berdasarakan diatas maka dalam penelitian ini akan

3.1.1. Tujuan

3.1. Tujuan Penelitian

RESEARCH AND DEVELOPMENT BENEFIT

BAB III

3.2. Manfaat Penelitian

- 1. Temuan ini dapat memperoleh prototipe sistem penghantaran gentamisin matriks komposit BHA-gelatin untuk preventif, terapi infeksi dan regenerasi tulang pada celah (*defect*) tulang.**
- 3. Temuan ini dapat dipakai untuk mengembangkan sistem penghantaran obat dengan biomaterial yang berasal dari komponen tulang sapi (BHA dan gelatin) yang memiliki efektivitas sama dengan komponen tulang manusia.**
- 4. Komposit BHA-gelatin dapat digunakan sebagai pembawa antibiotika untuk preventif atau terapi infeksi tulang dan pengisi/pengganti tulang yang hilang serta mempercepat pertumbuhan tulang.**

- serta membeberai bentuk-bentuk lain:
- berikut ini akan dibahas bentuk-bentuk lain yang mungkin
1. Komposisi BIV-gesam dapat digunakan sebagai pendekatan untuk gesam) yang memiliki struktur sama dengan komposisi lain manusia dengan prosedur yang biasa dan komposisi lain gas (BIV dan
 2. Jumlah ini dapat dipakai untuk mengkonstruksikan sistem berstruktur dari rekonstruksi lain pada setiap (V) (V) lain.
 3. Untuk ini dapat membeberai prosedur sistem berstruktur dengan

3.2. Analisis Penelitian

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. BAHAN PENELITIAN

Hidroksiapatit tulang sapi (BHA) yang diperoleh dari Bank Jaringan RSUD DR Sutomo; Gelatin 150 bloom kulit sapi diperoleh Rousselot (Guangdong China) ; Gentamisin dari Arshine Technology CO, Limited, Wanchai China ; pereaksi semua katagori p.a. dari Aldrich : glutaraldehyd, aseton, etanol, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , Span 80, NaCl, Aqua Bidestilata Steril dari PT Ikapharmindo Putramas , minyak zaitun, agar-agar (Gibco), Gentamisin ELISA Kit Catalog No. CSB-E 12088f.

4.2. METODE PENELITIAN

4.2.1. Tahapan Penelitian

Skema kerja

Tahapan penelitian yang dilakukan pertama kali adalah pembuatan formula implan BHA-gelatin + gentamisin dengan 2 cara yaitu pemadatan dengan aseton dingin dan larutan organik minyak nabati yang mengandung 2% surfaktan span 80, kemudian dilakukan *cross-link* dengan glutaraldehyd 0,01%. Sampel yang diperoleh dievaluasi, meliputi karakteristik fisik meliputi organoleptik dengan SEM dan pemekaran (swelling), uji toksisitas, uji disolusi, uji aktivitas gentamisin terhadap *Stapilococcus* dalam media agar serta uji disolusi, konsentrasi gentamisin ditentukan secara ELISA. Tahapan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

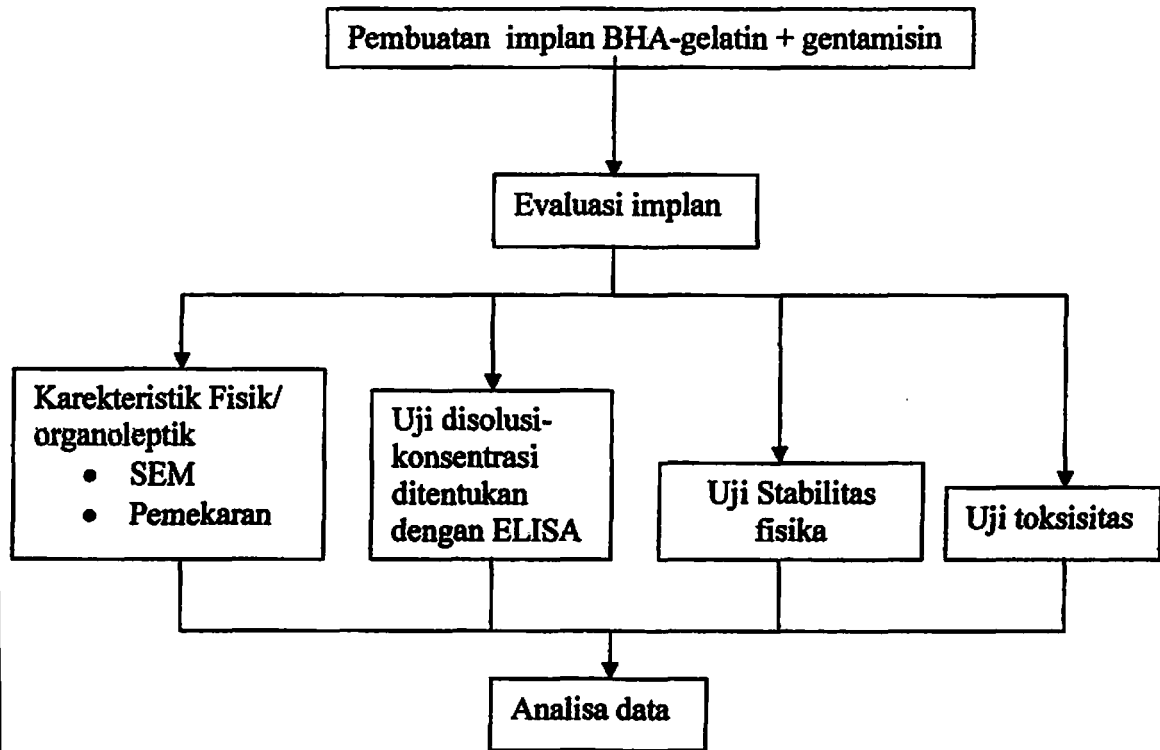
4.2.2. Pembuatan Sediaan Implan BHA-gelatin + gentamisin modifikasi (Kim *et al*, 2005; Ginalska, 2005; Hillig *et al*, 2008)

Pembuatan hidrosol gelatin (GEL) 2 gram dengan cara dilarutkan dalam 20 ml aquabidest pada suhu 60°C. Hidroksiapatit Tulang Sapi (BHA) sebanyak 20 gram dengan diameter 50 - 100 nm dibuat suspensi dalam 40 ml bufer pH = 7,4 panaskan pada suhu 60°C aduk terus selama 24 jam, suspensi dimasukkan dalam hidrosol GEL tetes demi tetes sambil diaduk 1500 rpm selama 3 jam. Buat larutan gentamisin (GEN) 3% dalam 10 ml buffer pH= 7,4 panaskan 60°C diaduk terus dan masukkan dalam campuran hidrosol gelatin-hidroksiapatit dengan cara diteteskan sambil diaduk terus dengan kecepatan 1500 rpm selama 3 jam. Cara pematatan formula ada 2 cara yaitu:

Cara 1. Untuk membuat suspensi W/O dengan cara meneteskan 20 ml campuran GEL+BHA+GEN kedalam 300 ml minyak zaitun yang mengandung 2% Span 80, dimasukkan dalam homogeneser dan diaduk dengan kecepatan 1500 rpm selama 30 menit pada suhu 60°C. Kemudian campuran tersebut direndam dalam bak es kering-aseton teknis pada suhu 4°C selama 60 menit, masukkan 300 ml aseton p.a kedalam campuran untuk membentuk menjadi padat dari mikrosfer. Untuk menghilangkan sisa minyak dicuci dengan campuran aseton – etanol 95% sebanyak 2 kali. Selanjutnya mikrosfer dibuat *cross-link* dengan glutaraldehid (GA) 0.01% dengan cara merendamnya selama 30 menit kemudian dicuci 5 kali dengan aseton – etanol 95 % untuk menghilangkan sisa GA. Dibuat 3 macam perbandingan antara campuran GEL+BHA+GEN (fase air) dan fase minyak : 1 : 30; 2: 30 dan 3: 30.

Cara 2. Dengan meneteskan suspensi sediaan kedalam aseton dingin suhu 4°C sambil diaduk terus menerus, sehingga terbentuk bulatan-bulatan kecil (mikrosfer).

Selanjutnya sama seperti prosedur diatas yaitu di *cross-link* dengan glutaraldehid 0,01%. Morfologi terbentuknya mikro kapsul, porositas dapat diamati dengan SEM, uji pemekaran.



Gambar 4.1. Skema tahapan kerja penelitian

4.2.3. Uji pemekaran dan degradasi invitro komposit (Lei *et al*, 2009)

Dari mikro kapsul tersebut dibuat pelet dari 1 g mikro kapsul (diameter 10 mm, tebal kira-kira 1-1,5 mm) dengan menekan 7Gpa selama 15 menit dalam *cylindrical die* dan diberi pengikat hidrosol gelatin dengan kadar 5 % b/b diuji sifat fisiknya . Dilakukan uji pemekaran (*swelling*) dengan merendam pelet dalam 20 ml PBS (pH 7,4) dan suhu 37°C. Sampel dipindah dalam beberapa titik waktu dan keringkan dengan kertas saring untuk membersihkan sisa cairan, segera ditimbang (W_1). Sampel dicuci dengan air dan keringkan pada suhu konstan 40°C secara vakum (W_2). Selisih berat antara berat mula-

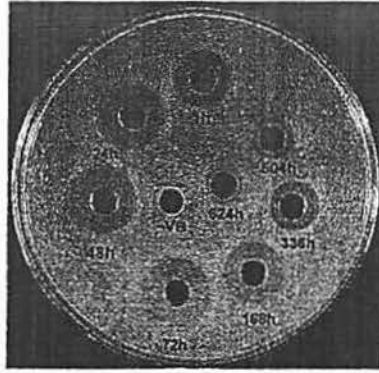
mula (W_0) dan setelah direndam (W_1) dinyatakan dalam % air yang meresap dalam sampel (persamaan 4.1) dan persen berat yang hilang dinyatakan dalam persamaan 4.2.

$$\text{Air yang meresap (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100 \dots\dots\dots(4.1)$$

$$\text{Berat yang hilang (\%)} = \frac{W_0 - W_2}{W_0} \times 100 \dots\dots\dots(4.2)$$

4.2.4. Uji aktivitas antibakteri Gentamisin (El-Ghannam *et al*, 2004; Stallmann *et al*, 2006)

Uji aktivitas antibiotik dengan kultur agar dengan bakteri :*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) sebanyak 10^6 colony-forming units/ml (cfu/ml) disuspensikan dalam 0,45% NaCl sesuai dengan 0,5 McFarland equivalensi standar kekeruhan. Satu mililiter *S. aureus* dalam 5 ml medium agar dipanaskan 45°C , kemudian agar dituangkan dalam petri steril dan dibiarkan pada suhu ruang. Tuju puluh mikroliter sampel/ 1cm^2 pelet (1; 2; 4; 8; 16 mg/ml untuk memperoleh MIC dilakukan optimalisasi) dimasukkan dalam lubang 10 mm yang dibuat dalam agar (Gambar 4.2), dibuat tripel. Sampel diletakkan pada tempat yang berbeda dalam petri dibiarkan pada suhu ruang kurang lebih 30 menit, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C . Setelah 18 jam inkubasi diameter hambatan diukur dari 3 ulangan sehingga diperoleh harga rata $\pm\text{SD}$. Demikian juga dilakukan untuk kontrol (tanpa GEN) dan larutan standar.



Gambar 4.2. Contoh penanaman sampel pada medium agar

4.2.5. Uji toksisitas (Di Silvio, 1999)

4.2.7. Uji toksisitas dengan MTT Assay (Di Silvio, 1999, Ferdiansyah, 2010)

Persiapan sampel: ditimbang sampel 100 mg dimasukkan dalam 2,5 ml larutan bufer fosfat salin diaduk, kemudian didiamkan diambil cairannya sebagai sampel untuk uji MTT dengan pereaksi [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Dilakukan untuk memeriksa viabilitas sel terhadap paparan suatu zat, dengan menggunakan garam tetrazolium MTT. Pemeriksaan dilakukan pada stem sel mesensimal dengan cara sebagai berikut: Dilakukan tripsinasi untuk melepas lapisan sel stem sel pada piring petri. Dibuat suspensi stem sel mesensimal dengan penambahan CCM 20% sebanyak 5 ml. Suspensi sel dimasukkan dalam *plate 96 well* sebanyak 50 μL /*well* dengan kisaran 2×10^5 sel. Kemudian pada setiap well ditambahkan CCM 20% sebanyak 100 μL / *well*. *Plate 96 well* yang telah berisi stem sel mesensimal di inkubasi dalam inkubator CO_2 dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam dimasukkan biomaterial yang telah disiapkan. Pada uji ini biomaterial yang dipakai adalah BHA + gelatin; BHA + gelatin + gentamisin dan BHA + gelatin + gentamisin + glutaraldehid. *Plate 96 well*

yang telah berisi stem sel mesensimal dan biomaterial di inkubasi lagi selama 19 jam. Setelah 19 jam diberikan larutan MTT sebanyak 25 μL /well. Kemudian di inkubasi kembali selama 5 jam. Setelah 5 jam medium diambil dan diganti dengan DMSO 200 μL /well. Di inkubasi selama 5 menit kemudian dibaca dengan ELISA reader.

3.2.6. Uji disolusi (Stallmann *et al*, 2006)

Uji disolusi (perendaman dengan 0,5 ml dH_2O , pengambilan cuplikan pada 30,90,180 menit dan setiap 24 jam selama 21, 28 hari, pemeriksaan konsentrasi GEN secara ELISA

3.2.7. Analisis kuantatif gentamisin ELISA

3.2.7.1. Kit ELISA Gentamisin No CSB-E 12088f berisi :

Plate dengan 96 Sumuran, standar gentamisin 2x250 μL , pelarut sampel 2x20 mL, antibodi gentamisin 1x60 μL (1:100), HRP-anti-antibodi 1x120 μL (1:100), bufer pencuci 1x20 ml, subtrat TMB 1x10 ml, stop larutan 1x10 ml..

3.2.7.2. Prosedur kerja

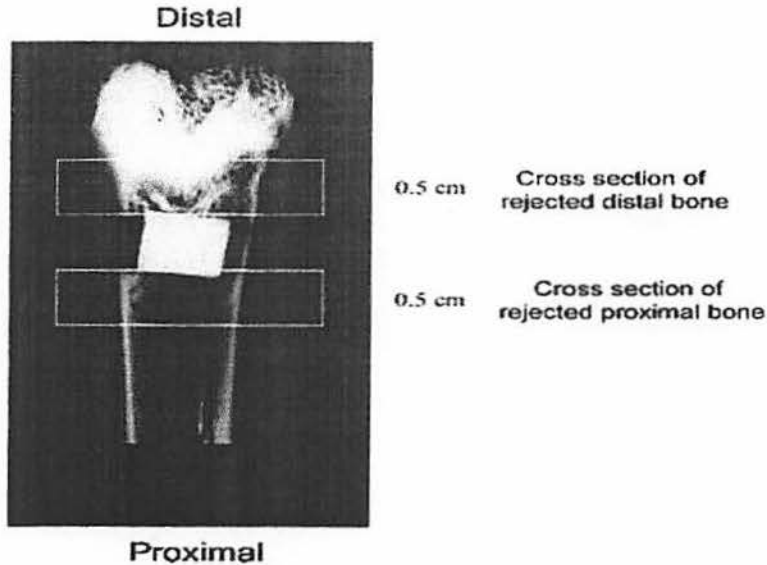
Ditambahkan 50 μL larutan standar atau sampel kedalam sumuran dan 100 μL pelarut sampel sebagai blanko, kemudian ditambahkan 50 μL antibodi gentamisin pada masing-masing sumuran. Sumuran ditutup dan diinkubasi 37⁰C selama 30 menit, cairan dalam sumuran dituang, kemudian sumuran dicuci 3 kali dengan cara mengisi 250 μL bufer pencuci. Cairan pencuci diambil secara tuntas dari masing-masing sumuran sangat diperlukan dan dapat dikeringkan dengan kertas pengering. Kemudian ditambahkan 100 μL HRP-antibodi pada masing-masing sumuran, tutup dan diinkubasi 37⁰C selama 30 menit, setelah itu tuang/buang sisa HRP-antibodi. kemudian sumuran dicuci 5 kali dengan cara mengisi 250 μL bufer pencuci. Tambahkan 90 μL subtrat TMB dan diinkubasi 37⁰C selama 10-30 menit, kemudian tambahkan stop larutan 50 μL , jika perubahan warna tidak merata segera goyang-goyang. Tentukan *optical density* (OD) dengan *microplate reader* pada 450 nm

3.2.8 Kelaikan etik

Pengajuan proposal kelaikan etik ditujukan kepada Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (*Animal Care and Use Committee/ACUC*).

3.2.9. Uji secara *invivo* dengan menanam pelet pada femur kelinci (DILAKUKAN PADA TAHUN KE II)

Uji *invivo*, 30 kelinci strain *New Zealand*, dibagi dalam 5 kelompok, penanaman pelet pada tulang femur kelinci (seperti Gambar 3.3). Cara penanaman pelet pada femur kelinci, dilakukan anestesi pada kelinci dengan ketamin sulfat (50mg/kg BB) dan diinjeksi streptomisin (300mg) sebagai antibiotik profilaksis sebelum operasi pemasangan pelet. Kemudian dilakukan pengamatan perkembangan tulangnya dengan foto tulang pada minggu ke 1, 2, 4, 6, 8 dan 12 untuk kelompok 6 , Kelompok 1-5 dimatikan masing-masing kelompok pada minggu ke 1 , 2, 3, 4 dan 5 diambil tulang sekitarnya untuk melihat regenerasi tulang secara histologi, serta untuk dihitung konsentrasi gentamisin yang terlepas dari pelet dengan mengambil tulang disekitar pelet dan dibersihkan dari sumsum tulang dan daging yang menempel, kemudian ditimbang. Sampel dihomogenizer dalam 3 ml PBS dan distirer 4 jam, sentrifus 4000 rpm 20 menit, ekstrak disimpan -40°C menunggu untuk dianalisis, standar dibuat antara 0,0 – 10 $\mu\text{g/ml}$ (Olmo *et al*, 2002)



Gambar 4.3. Posisi implan formula terpilih pada femur kelinci

4.2.11. Pemeriksaan radiologi dan histopatologi (Ferdiansyah, 2010)

Pemeriksaan perkembangan implantasi dilakukan pada minggu ke 1, 4, 8 dan 12 untuk kelompok 6 dengan menggunakan alat radiologi seri CH0028908-98 buatan RRC dengan *film medical X-ray 100 NIF*. Pemeriksaan histologi pada minggu ke 1, 4, 8 dan 12 dengan memotong daerah disekitar pelet 0,5 cm dibagian proksimal dan distal, direndam dalam bufer formol 10%, dekalsifikasi, diwarnai dengan hematosilin eosin.

3.3. Analisa Data

Studi statistik diskriptif yang menunjukkan perhitungan parameter karakteristik dari konsentrasi yaitu *mean*, *standard mean error* dan koefisien deviasi. Data pelepasan gentamisin dari matriks dan penetrasi ke dalam tulang dianalisis secara statistika menggunakan uji ANOVA. Apabila hasil yang diperoleh t_{hitung} lebih besar dari t_{tabel} ($t_{hitung} > t_{tabel}$), maka ada perbedaan bermakna antara kelompok yang diberi gentamisin (BHA-gelatin+gentamisin) dengan kontrol (matriks komposit BHA-gelatin).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Preparasi matriks komposit BHA-GEL dan BHA-GEL-GEN

Pembuatan granul: karena kesukaran untuk membuat matriks komposit BHA-gelatin dalam bentuk mikrosfer, maka dilakukan pencampuran didalam mortar antara hidrogel gelatin dan BHA dan diaduk terus sampai terbentuk massa yang dapat dibuat granul dengan perbandingan bahan BHA-GEL dan GEN secara berurutan 20:2 (kering) dan 10%.



Gambar 5.1 . Gambar granul dari BHA-GEL(putih) dan BHA-GEL-GA (oranye)



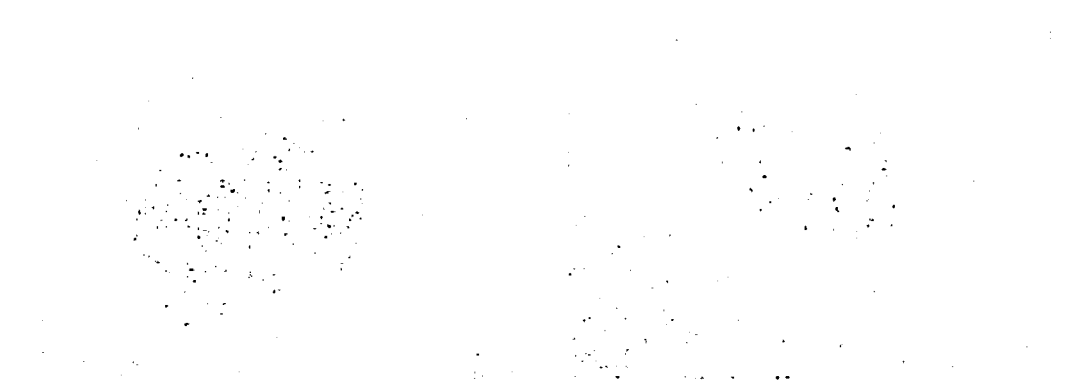
Gambar 5.2. Gambar sebelah kiri menunjukkan granul dari BHA-Gelatin-Gentamisin (BHA-GEL-GEN = putih kekuningan) granul putih sebelum dan sesudah di *cross-link* BHA-Gelatin-Gentamisin-Glutaraldehid (BHA-GEL-GEN-GA) berwarna coklat.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

2.1. Preparasi matriks komposit BHA-GEL dan BHA-GEL-GEN

Pembuatan awal: karena kesukaran untuk membuat matriks komposit BHA-
gelatin dalam bentuk matriks maka dilakukan penyempurnaan dengan matriks
hidrogel gelatin dan BHA dan dibuat tercampur secara homogen yang dapat dibuat
gumpal dengan perbandingan bahan BHA-GEL dan GEN secara berturut-turut 50:50 (kering)
dan 10%.



Gambar 2.1. Gambar gumpal dan BHA-GEL (putih) dan BHA-GEL-GA (orange)



Gambar 2.2. Gambar setelah komposisi komposit gumpal dan BHA-Gelatin-Gentamisin
(BHA-GEL-GEN = putih kebiruan) gumpal putih sebelum dan sesudah
di corakan ke BHA-Gelatin-Gentamisin diadidid (BHA-GEL-GEN-
GA) berwarna coklat.

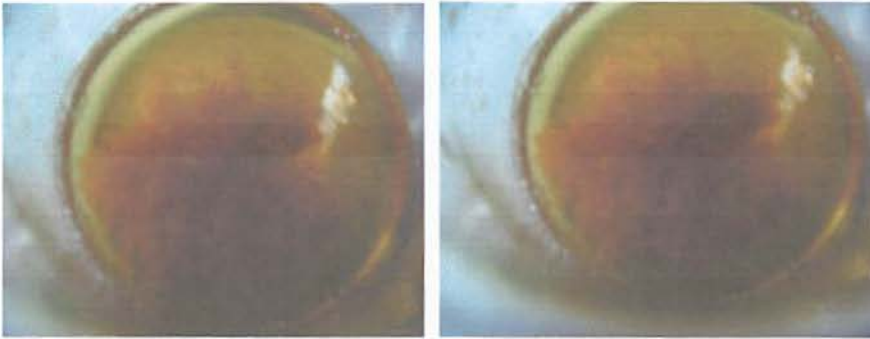
Hasil bagus, tetapi matriks komposit yang mengandung kalsium dari *Bovine Hydroxyapatite* (BHA) bereaksi dengan *mesh* (Aluminium) sebagai cetakan untuk membuat granul yang terbuat dari logam dan granul yang dihasilkan berwarna metalik (abu-abu). Hal ini dapat diatasi dengan menggunakan *mesh* yang dibuat dari plastik dan diperoleh hasil lebih baik yaitu warna lebih putih bersih dan yang mengandung gentamisin warna kekuningan. Selanjutnya granul di *cross-link* dengan glutaraldehid diperoleh hasil yang berwarna oranye untuk matriks komposit BHA-GEL-GA (Gambar 5.1) dan coklat untuk BHA-GEL-GEN-GA terlihat pada Gambar 5.2.

Orientasi tahap kedua: Untuk memperoleh konsentrasi GA yang optimal maka dilakukan dengan berbagai konsentrasi yaitu 0,5%; 1,0% dan 2,5% (Gambar 5.3). Dari percobaan ini penggunaan GA dengan konsentrasi 1% dan 2,5% diperoleh larutan GA yang semula jernih menjadi keruh, hal ini disebabkan konsentrasi GA berlebihan sehingga GA yang berlebih bereaksi dengan GEL yang terlepas dari granul matriks komposit yang di *cross-link* sehingga membentuk gumpalan gelatin (Gambar 5.4) (Omidian *et al.*, 2010).



Gambar 5.3. Cross-linking dengan konsentrasi GA secara berurutan 0,5%; 1,0% dan 2,5% dari BHA-GEL dan BHA-GEL-GEN

Berdasarkan hal tersebut maka dalam penelitian selanjutnya digunakan GA dengan konsentrasi 0,5%.

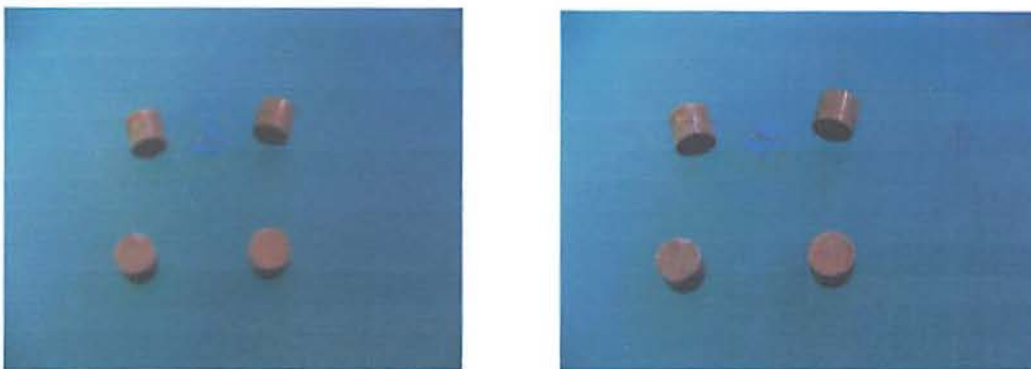


Gambar 5.4. Hasil pencucian dari cairan sisa GA (1,0% dan 2,5%) yang dipergunakan untuk merendam granul BHA-GEL-GEN

Orientasi tahap ketiga: Untuk pemakaian sediaan matriks komposit BHA-GEL-GEN-GA, dalam bentuk granul tidak dapat diatur dan sebagai sistem penghantaran obat tidak optimal maka granul dicetak dalam bentuk pelet silinder dengan diameter 4 mm (Gambar 5.5) disesuaikan dengan diameter dari femur kelinci sebagai binatang coba. Dari hasil orientasi beban yang optimal adalah 3 ton dan dihasilkan pelet seperti Gambar 5.6.



Gambar 5.5. Alat pencetak pelet dengan diameter lubangnya 4 mm

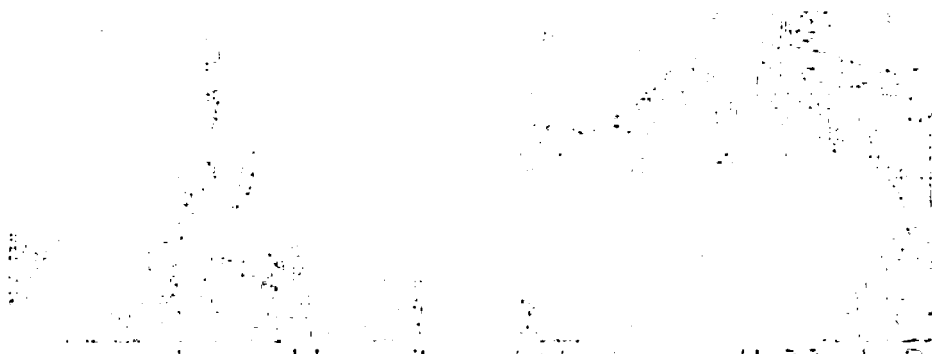


Gambar 5.6. Bentuk Pelet dari BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GEN-GA dengan tekanan cetak seberat 3 ton

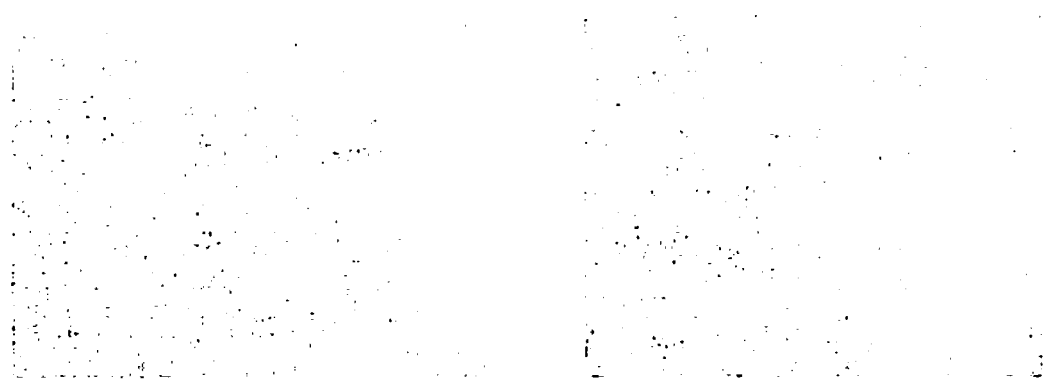


Gambar 2.4. Hasil pemrosesan bahan dengan sistem (a) dan (b) yang diperoleh menggunakan teknik pemrosesan komposit B1A-C1E

orientasi serat ke arah radial pemrosesan sehingga matriks komposit B1A-C1E (B1E-C1A) dalam bentuk paku tidak dapat dibuat dan sebagai sistem pengolahan obat tidak optimal maka gambar berikut dalam bentuk serat sylinder dengan diameter mm (Gambar 2.5) dihasilkan dengan diameter dari bentuk ke arah radial pemrosesan. Dari hasil orientasi serat yang optimal adalah 3 ton dan dihasilkan serat seperti Gambar 2.6.



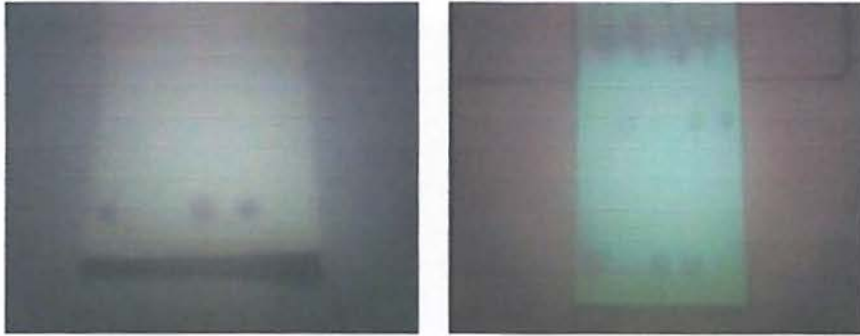
Gambar 2.5. Alat pemrosesan serat dengan diameter paku 4 mm



Gambar 2.6. Bentuk serat dari B1E-C1A dan C1A-B1E (B1E-C1A) dengan sistem pemrosesan 3 ton

5.2. Orientasi Analisis Gentamisin secara Kromatografi Lapis Tipis

Tujuan untuk analisis gentamisin dalam matriks; setelah dicoba dengan fase gerak KH_2PO_4 20% gentamisin dapat terpisah dari matrik komposit BHA-GEL, hasil terlihat pada Gambar 5.7. dengan penampak noda 0,2% larutan ninhidrin dalam alkohol 96%.

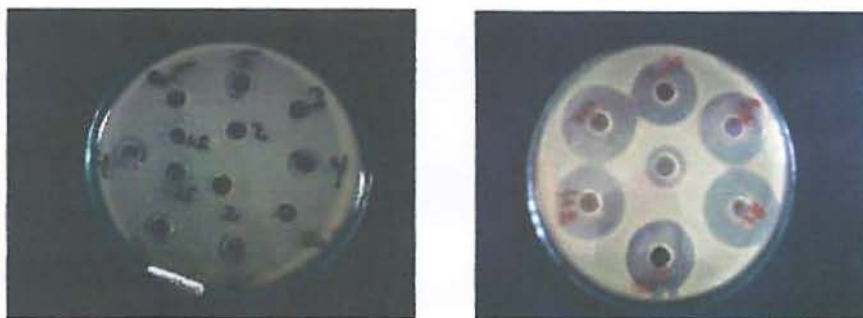


Gambar 5.7. Orientasi analisis Gentamisin secara kromatografi lapisan tipis

Kelemahan dari metode KLT adalah noda yang tampak tidak stabil dan cepat pudar dan hilang, sehingga dalam penelitian selanjutnya digunakan metode ELISA untuk menentukan konsentrasi GEN. Metode ini lebih sensitif dan spesifik.

5.3. Penentuan Potensi Gentamisin Solfat dan *Minimal Inhibition Concentration* (MIC).

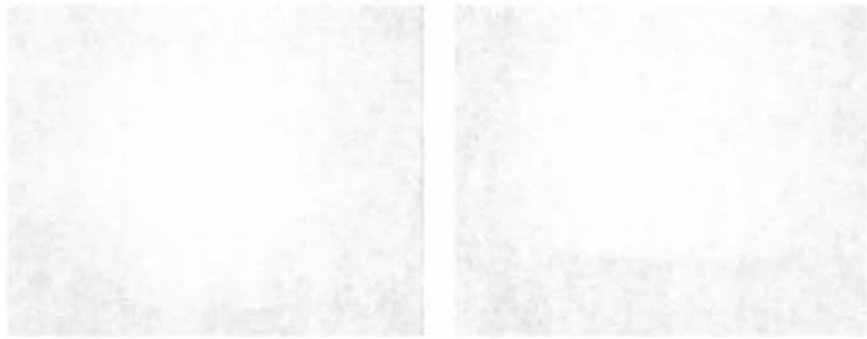
Dari hasil perhitungan diperoleh Potensi Gentamisin Solfat 87,7% (Gambar 5.8 sebelah kanan) dan MIC 1,5 ppm seperti terlihat pada Gambar 5.8. sebelah kiri



Gambar 5.8. Gambaran hambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* oleh Gentamisin dari berbagai konsentrasi Gentamisin (dari 1,5 ppm-4ppm) dan 2;4;8 dan 16 ppm

3.5. Uji Analisis Gram dan Kultur Lapis Tipis

Uji gram untuk analisis gram dilakukan dengan cara mengambil sampel dari komposit H1A-D1E, hasil gram K1H1E1 20% gemarisin dalam tespek dan untuk komposit H1A-D1E, hasil tespek pada Gambar 3.7 dengan pemotretan pada 40x lumen mikroskop dalam alkohol 90%.

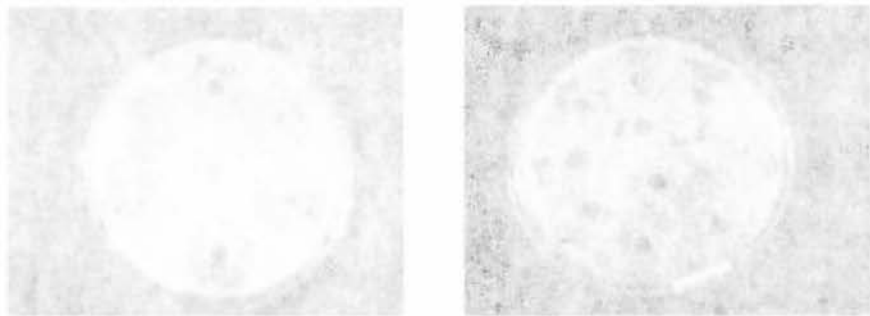


Gambar 3.7. Uji analisis gram komposit H1A-D1E dan komposit K1H1E1 lapis tipis

Ketertarikan dari metode K1E1 adalah media yang mampu tidak stabil dan cepat rusak dan hanya sehingga dalam penelitian selanjutnya digunakan metode EL2A untuk menentukan konsentrasi GSK. Metode ini lebih sensitif dan spesifik.

3.2. Penelitian Potensi Gemarisin Solat dan Minimum Inhibition Concentration (MIC)

Dari hasil penelitian diperoleh bahwa Gemarisin Solat 87,7% (Gambar 3.8) adalah kurang dan MIC 1,2 ppm seperti terlihat pada Gambar 3.8, sebagai berikut:



Gambar 3.8. Gambaran tabung uji pertumbuhan bakteri dengan Gemarisin Solat 87,7% dan 1,2 ppm (dari 1,2 ppm-ppt) dan 1,28 dan 1,0 ppm (dari 1,2 ppm-ppt) dan 1,28 dan 1,0 ppm

Sedangkan Gambar 5.9 menunjukkan daya hambat dari pelet {BHA(G)ELENA} secara berurutan terhadap *Kandida*; *E. Coli* dan *S. Aureus*; yang diamati setelah inkubasi 24 jam Hal ini menunjukkan bahwa GEN aktif menghambat pertumbuhan *S aureus* (Gram positif) dan *E coli* (Gram negatif) tetapi tidak aktif terhadap *Kandida*.



Gambar 5.9. Gambaran hambatan pertumbuhan secara berurutan *Kandida*, *E. Coli* dan *S. aureus* oleh pelet {BHA(G)ELENA} pada hari ke dua setelah inkubasi.

5.4. Hasil uji Toksisitas dengan metode MTT

Tujuan dilakukan uji dengan MTT adalah untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan aman dan tidak menimbulkan toksisitas?. Pada pemeriksaan ini digunakan instrumen Elisa reader (Thermo Scientific) dengan panjang gelombang 620 nm seperti terlihat Gambar 5.10. Dari persyaratan dikatakan bahan tidak toksik apabila pembacaan hasil lebih dari 60%



Gambar 5.10. Elisa reader (Thermo Scientific) dan plate yang berisi sel dan sampel

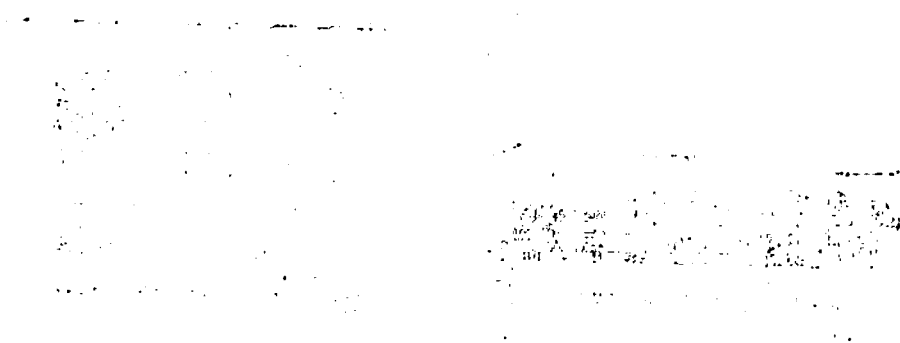
Selanjutnya Gambar 2.9 menunjukkan daya hantar dari pelat B11A(0)EL11A) secara berurutan terhadap kandidat A (0), dan B (0.5) yang diukur setelah inkubasi 24 jam. Hal ini menunjukkan bahwa DEX akan menghambat pertumbuhan *S. aureus* (gram positif) dan *E. coli* (gram negatif) tetapi tidak aktif terhadap Kandida.



Gambar 2.9. (a) menunjukkan pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* dan (b) dan (c) menunjukkan pertumbuhan *S. aureus* dan *E. coli* pada pelat B11A(0)EL11A) pada hari ke dua setelah inkubasi.

2.4. Hasil uji Toksisitas dengan metode MTT

Tujuan dilakukan uji dengan MTT adalah untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan aman dan tidak menimbulkan toksisitas. Pada pemeriksaan ini digunakan instrumen Elisa reader (Thermo Scientific) dengan panjang gelombang 620 nm seperti terlihat Gambar 2.10. Dari persamaan dikatakan bahwa tidak terjadi perubahan pembacaan hasil lebih dari 60%.



Gambar 2.10. (a) Elisa reader (Thermo Scientific) dan (b) grafik yang terlihat dari uji toksisitas

Tabel 5.1. Hasil pengamatan dan perhitungan uji toksisitas bahan dengan metode MTT

No	Nama bahan	Berat (mg)	Absorpsi	Prosentasi sel hidup (%)
1	BHA+GEL	1,005	0,277	98,641
		1,189	0,337	95,662
		0,902	0,271	83,784
		1,110	0,229	65,864
		1,052±	0,279 ± 0,045	85,988±
		0,125		14,872
			0,140	
		1,890	0,208	55,560
		2,050	0,210	70,396
		1,955	0,203	69,070
		2,192	0,190±0,034	82,067
		2,022		
		±0,131		69,273±10,848
2	BHA+GEL+GA	1,118	0,456	147,283
		1,300	0,447	120,776
		1,025	0,448	123,649
		1,000	0,368	93,775
		1,111± 0,136	0,430± 0,041	121,371± 21,898
		2,130	0,216	77,208
		2,190	0,271	85,082
		2,112	0,221	71,821
		2,096	0,196	83,742
		2,132± 0,041	0,226± 0,032	79,463± 6,146
3	BHA+GEL+GEN	1,228	0,186	73,910
		1,212	0,164	56,164
		1,223	0,211	70,270
		0,968	0,190	58,032
		1,158± 0,127	0,188± 0,019	64,594± 8,815
		2,015	0,182	67,521
		2,015	0,336	100,233
		2,191	0,235	83,196
		2,010	0,165	53,422
		2,058± 0,089	0,230± 0,077	76,093± 20,171
4	BHA+GEL+GEN+GA	0,970	0,384	127,717
		0,927	0,357	100,228
		1,237	0,295	89,189
		1,082	0,261	72,289
		1,054 ± 0,138	0,324± 0,056	97,356± 23,274
		2,300	0,266	91,145
		2,205	0,300	91,842
		2,072	0,309	93,766
		2,171	0,312	119,325
		2,187± 0,094	0,297± 0,021	99,020± 13,582

Keterangan : Bahan tidak Toksik apabila prosentase sel hidup \geq 60%

Tabel 3.1. Hasil pengamatan dan perhitungan uji t-tesis pada bahan dengan metode TTT

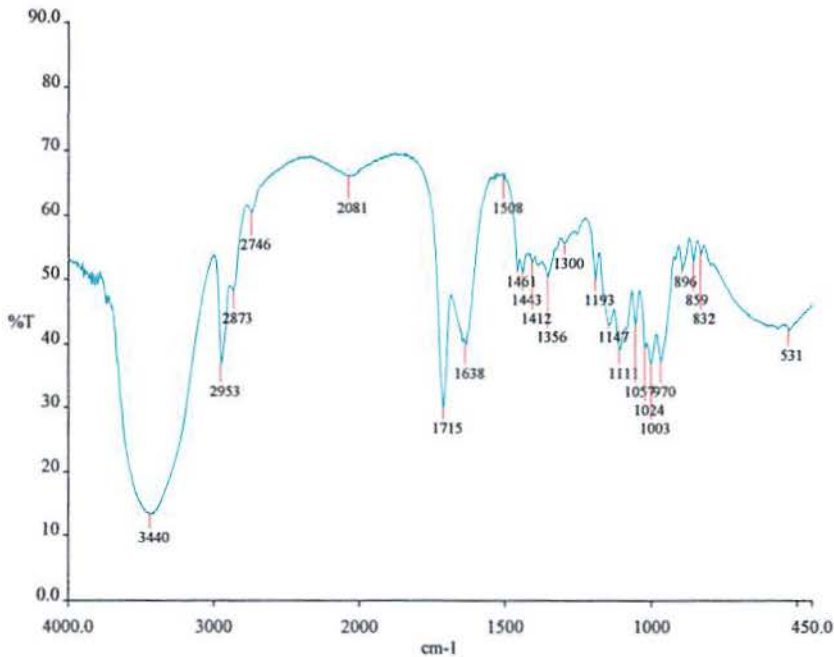
No	Nama bahan	Berat (mg)	Absorpsi	Prosentasi sel hidup (%)
1	BHA+GEL	1.005	0.577	98.041
		1.130	0.327	92.095
		0.905	0.571	82.784
		1.110	0.559	92.804
		1.025	0.579 ± 0.042	82.088 ±
		0.152		14.875
		1.200	0.140	22.200
		2.020	0.508	20.200
		1.022	0.510	90.070
		2.102	0.202	85.007
		2.022	0.100 ± 0.034	90.573 ± 10.848
2	DHA+GEL+GV	1.112	0.420	147.282
		1.300	0.447	150.770
		1.052	0.448	152.040
		1.000	0.308	93.202
		1.111 ± 0.120	0.430 ± 0.041	151.211 ± 21.808
		2.110	0.510	77.508
		2.190	0.571	82.085
		2.112	0.521	71.851
		2.090	0.190	82.715
		2.132 ± 0.041	0.550 ± 0.032	50.103 ± 0.140
3	BHA+GEL+GEN	1.528	0.180	22.910
		1.212	0.104	20.104
		1.523	0.511	20.570
		0.908	0.190	28.022
		1.128 ± 0.122	0.188 ± 0.010	04.204 ± 8.812
		2.012	0.182	07.221
		2.012	0.320	100.222
		2.101	0.522	82.190
		2.010	0.102	22.452
		2.028 ± 0.020	0.330 ± 0.027	20.003 ± 20.171
4	BHA+GEL+GEN+GV	0.970	0.284	127.717
		0.927	0.327	100.228
		1.237	0.292	80.180
		1.082	0.201	72.280
		1.024 ± 0.128	0.224 ± 0.020	07.220 ± 23.224
		2.200	0.200	01.142
		2.202	0.300	01.842
		2.022	0.300	02.200
		2.171	0.312	110.322
		2.187 ± 0.004	0.297 ± 0.021	00.020 ± 12.282

Keterangan : Bahan tidak Toksik apabila prosentase sel hidup > 60%

5.5. Karakteristik secara invitro dari sediaan BHA-GEL-GEN-GA {BHA(G)ELENA}

5.5.1. Karakteristik struktur gugus fungsi dari granul sediaan dengan FTIR

Untuk membuktikan terjadinya *cross-link* (ikatan kovalen) antar komponen penyusun matriks komposit dengan *cross-link agent* glutaraldehid, dilakukan dengan FTIR dengan melihat perubahan struktur molekul dari matriks komposit. Hasil uji dengan FTIR dari GA terlihat puncak tinggi dari bilangan gelombang 1715 menunjukkan gugus -C=O (Gambar 5.11), setelah digunakan untuk *cross-linking* granul BHA-GEL dan BHA-GEL-GEN maka puncak tersebut tidak nampak (Gambar 5.12), hal ini disebabkan karena gugus -C=O menjadi -C=N- (terjadi reaksi antara matriks dan GA membentuk ikatan kovalen), secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 5.2.



Gambar 5.11. Spektra FTIR dari glutaraldehid dengan bilangan gelombang -C=O 1715 cm^{-1} dan 1638 cm^{-1}

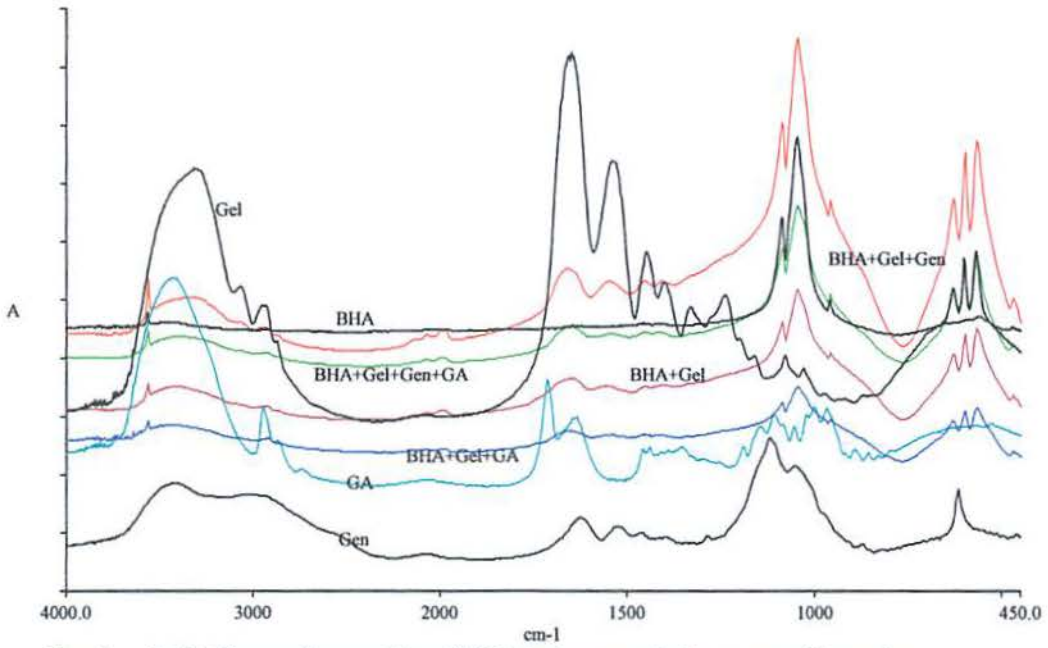
2.2. Karakteristik secara in vitro dari sedimen BHA-GBL-GBN-GA (BHA@EIBA)

2.2.1. Karakteristik struktur gugus fungsi dari granat sedimen dengan FTIR

Untuk membuktikan terjadinya cross-link (ikatan kovalen) antar komponen perwujudan matriks komposit dengan cross-link dengan glutaralhidrid, dilakukan dengan FTIR dengan melihat perubahan struktur molekul dari matriks komposit. Hasil uji dengan FTIR dari GA terlihat puncak tinggi dari bilangan gelombang 1712 menunjukkan gugus $C=O$ (gambar 2.11) setelah digunakan untuk cross-linking granat BHA-GBL dan BHA-GBL-GBN maka puncak tersebut tidak nampak (gambar 2.12). Hal ini disebabkan karena gugus $C=O$ menjadi $C-N$ terjadi reaksi antara matriks dan GA membentuk ikatan kovalen) secara ringkas dapat dilihat pada Tabel 2.2.



Gambar 2.11. Spektra FTIR dari glutaralhidrid dengan bilangan gelombang $C=O$ 1712 cm^{-1} dan 1638 cm^{-1}



Gambar 5.12. Kumpulan spektra FTIR dari semua bahan yang digunakan

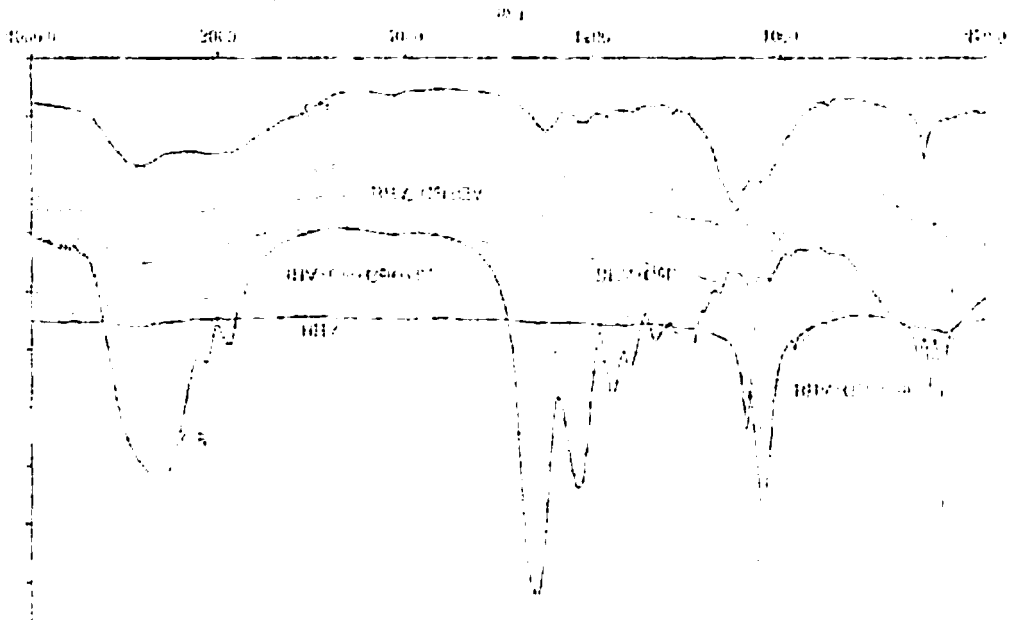
Tabel 5.2. Pengambilan data sampel FTIR dari sediaan matriks komposit

Gugus Sampel	-C=O- 1715, 1450- 1300/	-C-O- 1200-1100	-OH 630	-PO ₄ ³⁻ / O-P- O 1090-1030 957/ 600- 500	-N= / -NH ₂ 1650-1628, 1540,1240
BHA	-	-	+	+	
Gelatin (GEL)	+	+	+	-	+
Glutaraldehyd (GA)	+	-	-	-	-
Gentamisin (GEN)	-	+	+	-	+
BHA-GEL	+	-	+	+	+
BHA-GEL-GA	-	+	+	+	+
BHA-GEL-GEN	+	+	+	+	+
BHA-GEL-GEN-GA	-	+	+	+	+

CEZ-CV	-				
BHV-CEZ-		+	+	+	+
BHV-CEZ-CEZ	+	+	+	+	+
BHV-CEZ-CV	-	+	+	+	+
BHV-CEZ	+	-	+	+	+
(CEZ)					
Compositum	-	+	-	-	+
(CV)					
Compositum	+	-	-	-	-
Compositum (CEZ)	+	+	+	-	+
BHV	-	-	+	+	
	1300			200	
	1120			1020-1030	1240-1540
Wavenumber	1312	1500-1100	930	0	1020-1038
Group	-C=O	-C-O-	-OH	-C-O-	-N= \ -NH ²

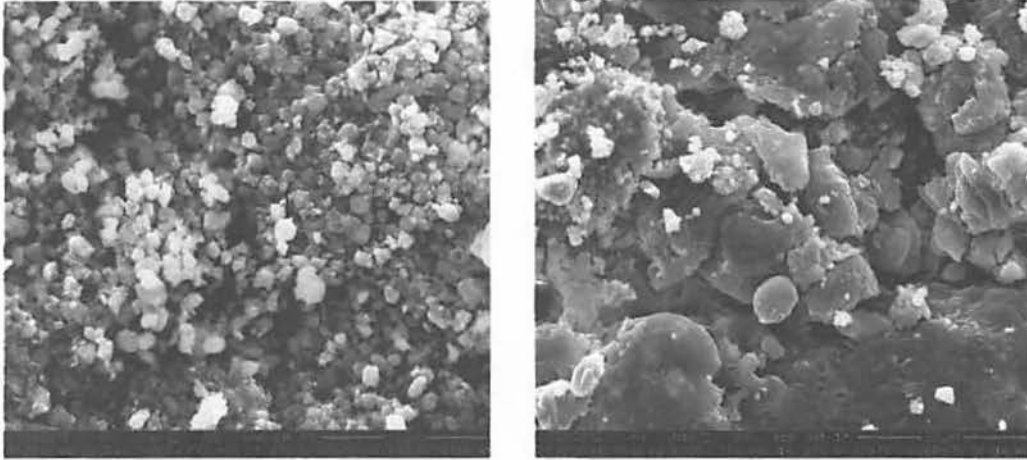
Table 2.5: Comparison of the wavenumber (cm⁻¹) and the wavenumber matrix composition

Table 2.15: Comparison of the wavenumber (cm⁻¹) and the wavenumber matrix composition

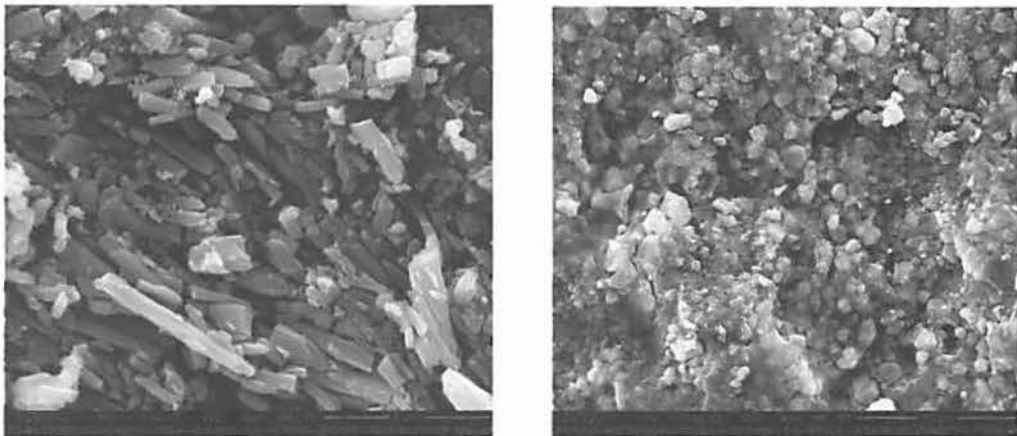


5.5.2. Uji morfologi permukaan dari pelet dengan menggunakan SEM

Untuk mengetahui perubahan morfologi permukaan pelet dari pencampuran antar bahan – bahan dalam matriks komposit {BHA(G)ELENA} terlihat pada Gambar 5.13 dan Gambar 5.14.



Gambar 5.14 . Hasil SEM dari sediaan bentuk Pelet BHA-GEL-GA



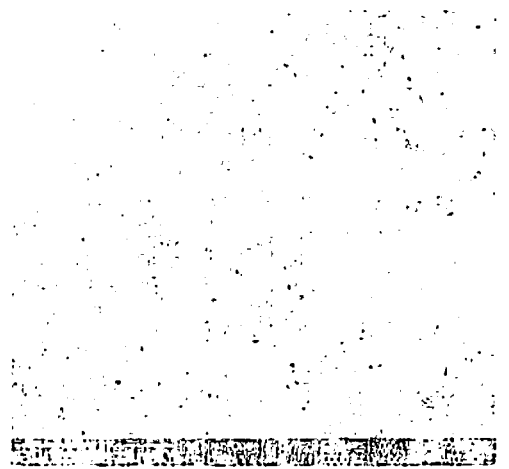
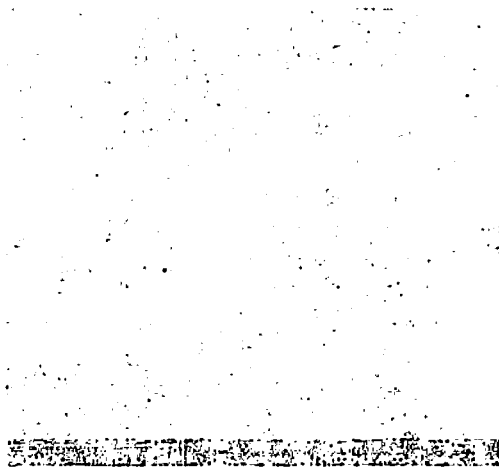
Gambar 5.15 . Hasil *cross-link* dari sediaan bentuk pelet BHA-GEL-GEN dengan GA

5.5.3. Hasil perhitungan densitas dan porositas sediaan

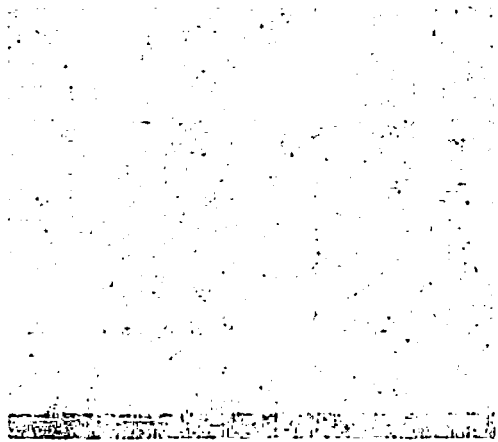
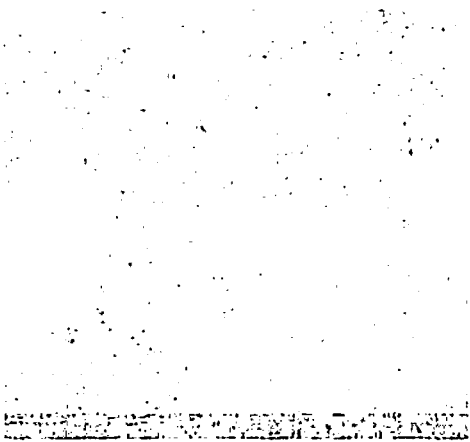
Hasil perhitungan menunjukkan bahwa matriks komposit BHA-GEL maupun BHA-GEL-GEN yang di *cross-link* dengan GA densitasnya meningkat dan porositasnya menurun.

2.2.2 Uji morfologi permukaan dari pelat dengan menggunakan SEM

Untuk mengetahui perubahan morfologi permukaan pelat dari perbandingan antar bahan - bahan dalam matriks komposit (BHA) (B1, B2, B3) terlihat pada Gambar 2.13 dan Gambar 2.14.



Gambar 2.13 Hasil uji morfologi permukaan pelat BHA (B1) dengan komposisi matriks (B1) dan serat (B2) dengan CA



Gambar 2.14 Hasil uji morfologi permukaan pelat BHA (B2) dengan komposisi matriks (B1) dan serat (B3) dengan CA

2.2.3 Hasil perhitungan densitas dan porositas sedimen

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa matriks komposit BHA (B1) dan matriks komposit BHA (B2) yang di-cure dengan CA densitasnya meningkat dan porositasnya menurun.

Tabel 5.3. Perhitungan Densitas dan porositas granul

Sampel	No	Bk (g)	Bb (g)	Vsediaan(cm ³)	Densitas (g/cm ³)	Porositas (%)
BHA+GEL	1	0,0314	0,0471	1,0000	0,3140	15,7000
	2	0,0198	0,0264	0,0750	0,2640	8,8000
	3	0,0193	0,0288	0,0750	0,2570	12,6670
				Rata-rata	0,2780	12,3890
BHA+GEL+GA	1	0,0790	0,0910	0,1500	0,5270	8,0000
	2	0,0349	0,0559	0,1500	0,2330	14,0000
	3	0,0278	0,0417	0,1000	0,2780	13,0000
				Rata-rata	0,3460	11,9670
BHA+GEL+GEN	1	0,0249	0,0390	0,1000	0,2490	14,1000
	2	0,0494	0,0531	0,2000	0,2470	1,8500
	3	0,0362	0,0549	0,1500	0,2410	12,4670
				Rata-rata	0,2460	9,4720
BHA+GEL+GEN+GA	1	0,0135	0,2000	0,0500	0,2700	3,7300
	2	0,0319	0,0380	0,1000	0,3190	0,0610
	3	0,0161	0,0248	0,0750	2,1470	1,1600
				Rata-rata	0,9120	1,6500

Keterangan : $P = \frac{Bb - Bk}{Vsediaan} \times 100\%$, Bk = Berat kering
 Bb= Berat basah; D = Densitas sediaan = $\frac{Bk}{V}$ sediaan

Kesempurnaan reaksi *cross-link* juga dapat dilihat dengan perubahan morfologi permukaan dari matriks komposit BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GEN-GA {BHA-(G)ELENA} terlihat pada Gambar 14 dan Gambar 15, hal tersebut juga terlihat dari menyempitnya pori-pori matriks dan meningkatnya densitas terlihat pada Tabel 5.3. Porositas meningkat maka cairan mudah penetrasi masuk kedalam menyebabkan kelarutan zat aktif meningkat dan matriks mudah *swelling* (mengembang) selanjutnya mengalami degradasi (erosi) terlihat pada Gambar 16 dan Gambar 17 serta Tabel 5.5., hal ini akan mempengaruhi sistem penghantaran obat (gentamisin) dengan memperpendek waktu aktif obat. Sedangkan sebagai pengisi celah (*defect*) tulang, porositas semakin meningkat maka sel jaringan sekitarnya mudah masuk kedalam dan berproliferasi didalamnya hal ini akan meningkatkan sifat osteokonduktif dari matriks sebagai *scaffold* dari sel-sel sekitarnya dari resipien (Hillig *et al.*, 2008). Matriks yang mengandung gelatin dimana gelatin merupakan hasil hidrolisis kolagen sehingga sering disebut sebagai kolagen tipe 1 sebagai protein tulang yang berfungsi membantu

berkembangnya sel jaringan untuk membentuk *challus*, yang selanjutnya bereaksi dengan kalsium dengan bantuan osteoblas membentuk tulang baru (Korkusuz *et al.*, 2004).

5.5.4. Uji kompresi dari pelet

Tujuan dilakukan uji kompresi adalah untuk memenuhi persyaratan bahwa bahan sebagai pengisi tulang/ jaringan keras harus mempunyai tekanan kompresi antara 100-120 MPa

Tabel 5.4. Hasil pengamatan dan perhitungan uji kompresi

No	Nama bahan (*)	Gaya Tekan = P (Newton)	Compresi (MPa)= P/ A
1	BHA+GEL	2070 1820 1900	164,725 144,831 151,197 153,584±10,160
2	BHA+GEL+GA	2530 2410 2580	201,331 191,782 205,310 199,474±6,953
3	BHA+GEL+GEN	1290 1350 1280	84,352 84,352 90,718 86,474±3,675
4	BHA+GEL+GEN+GA	1060 1060 1140	102,655 107,430 101,859 103,981±3,04

* Diameter pelet adalah 4 mm; 1 MPa = Mega Pascal = 1N/ mm²

5.5.5. Sifat degradasi dari pelet BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GEN-GA

Untuk menguji sifat degradasi dari pelet dalam lingkungan basah, maka dilakukan perendaman dari pelet dalam bufer fosfat salin pH 7,4, dapat dilihat dari Gambar 5.15. sampai 5.16. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 5.5.

perkembangan sel jaringan untuk membentuk epitel yang selanjutnya beraksi dengan kalsium dengan bantuan osteoblas membentuk tulang baru (Kochanski et al., 2004).

2.2.4 Uji kompresi dari beton

Tujuan dilakukan uji kompresi adalah untuk mengetahui persyaratan bahan sebagai pengisi tulang jaringan keras harus mempunyai tekanan kompresi antara 100-120 MPa

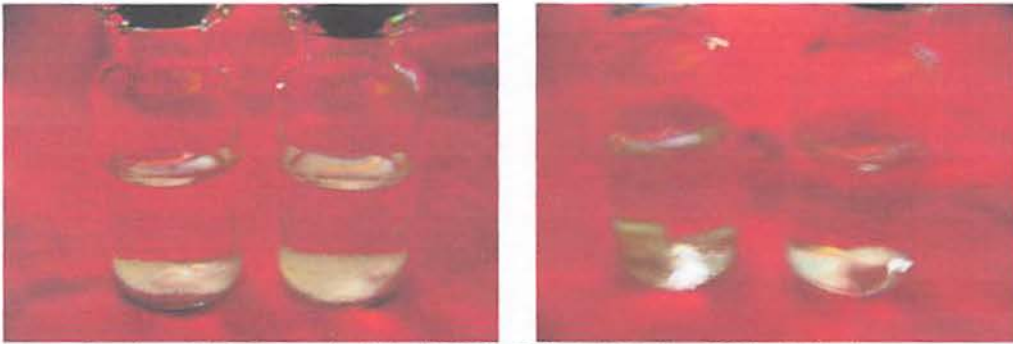
Tabel 2.4 Hasil pengujian dan perhitungan uji kompresi

No	Nama bahan (%)	Gaya Tekan = P (Newton)	Gaya Tekan = P / Luas = P/A (MPa)
1	BHA-GEL	2070	144,725
		1820	144,831
		1900	151,197
		123,284 ± 10,160	
2	BHA-GEL-GA	2230	201,331
		2410	191,782
		2280	207,210
		190,474 ± 0,223	
3	BHA-GEL-GEN	1200	84,322
		1220	84,322
		1280	90,718
		80,474 ± 3,022	
4	BHA-GEL-GEN-GA	1000	102,022
		1050	107,420
		1110	101,829
		102,931 ± 3,04	

* Diameter beton adalah 4 mm, 1 MPa = Mega Pascal = 1N/mm²

2.2.5 Sifat degradasi dari beton BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GEN-GA

Untuk menguji sifat degradasi dari beton dalam lingkungan basah maka dilakukan percobaan dari beton pada faktor satun pd 2.4 dapat dilihat dari gambar 2.12 sampai 2.16. Hasil pengujian dapat dilihat pada tabel 2.2.

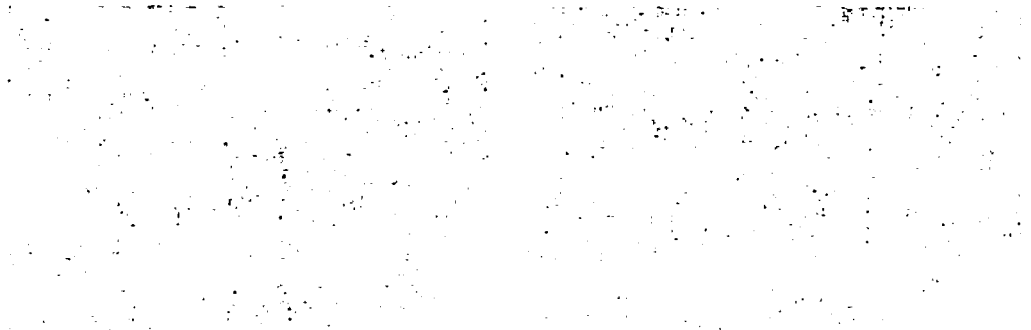


Gambar 5.15. Degradasi dari BHA-GEL-GEN dan BHA-GEL dengan tekanan 1 dan 2 ton

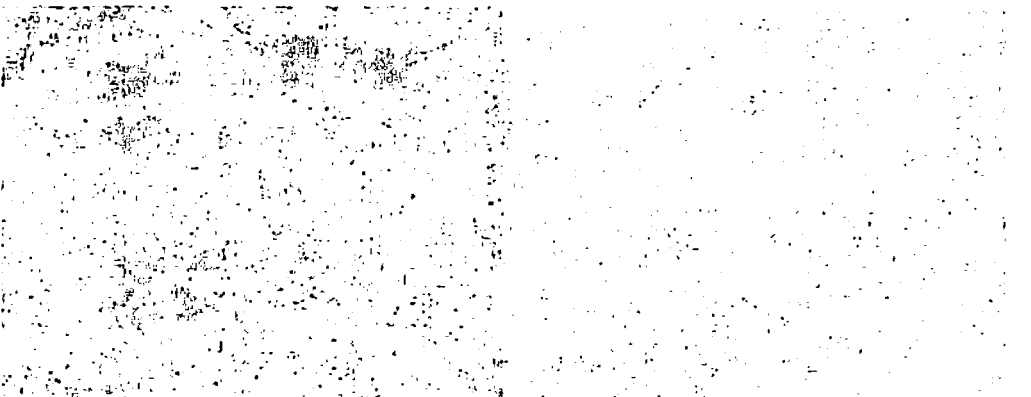


Gambar 5.16. Pelet dari BHA-GEL-GA dan BHA-GEL-GEN-GA dibuat dengan tekanan 3 ton, pada hari ke 2.

Hal ini menunjukkan bahwa dengan *cross-link* maka gelatin dalam matriks komposit BHA-GEL dan BHA-GEL-GEN sebagai hidrogel densitasnya meningkat dengan meningkatnya konsentrasi *cross-linker* dan menyebabkan air/ cairan akan semakin sulit untuk berdifusi kedalam pelet akibatnya besarnya pemekaran (*swelling*) akan menurun dan pelet tidak mudah terdegradasi (Omidian *et al.*, 2010)



Gambar 1.10. Morfologi permukaan matriks komposit BHA-GEL dan BHA-GEL-FA dengan serat karbon 3 mm panjang



Gambar 1.11. Morfologi permukaan matriks komposit BHA-GEL-FA dan BHA-GEL-FA dengan serat karbon 3 mm panjang

Hal ini menunjukkan bahwa dengan *cross-link* maka getas dalam matriks komposit BHA-GEL dan BHA-GEL-FA sebagai hidrogel dasarnya menjadi dengan meningkatnya konsentrasi *cross-linker* dan mendapatkan air cairan akan semakin sulit untuk berdifusi ke dalam pelat akibatnya besarnya pemampatan (*swell*) akan menurun dan pelat tidak mudah terbedakan (Ondrian et al., 2010)

Tabel 5.5. Hasil pengamatan perendaman pelet dalam bufer fosfat salin

No	Nama bahan	Tekanan pelet (ton)	Waktu hancur
1	BHA+GEL	1 2 3	2 jam 3 jam 5 jam
2	BHA+GEL +GA	1 2 3	3 hari 10 hari Hari ke 16 mulai ada debris, belum hancur sampai hari ke 28
3	BHA+GEL +GEN	1 2 3	1 jam 1 jam 1 jam
4	BHA+GEL +GEN+GA	1 2 3	-Belum hancur, tetapi ada debris mulai membesar (1 dan 2 ton mulai hari ke 4), hancur pada hari ke 11. -Mulai hari ke 5 ada debris, semakin banyak pada hari ke 15 dan Belum hancur sampai hari ke 28

5.5.7. Uji disolusi pelet {BHA(G)ELENA}

Untuk melihat profil pelepasan gentamisin dari pelet {BHA(G)ELENA} dilakukan uji disolusi dengan merendam pelet dalam bufer fosfat salin pH 7,4 dan diambil secara berkala, seperti tabel 5.6.



Gambar 5.17. Besar daya hambat terhadap *S aureus* dan *E coli* dari Hasil disolusi yang diambil secara berkala

Karena pesanan *KIT Gentamicin* untuk analisis secara ELISA belum datang, untuk membuktikan bahwa Gentamisin yang terlepas dari pelet selama 28 hari mempunyai daya hambat terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif terlihat pada Gambar 5.18. dan Tabel 5.6, pada hari pertama daya hambat terhadap bakteri lebih

besar dari hari selanjutnya hal ini disebabkan bahwa gentamisin yang ada dipermukaan terlepas terlebih dahulu dalam jumlah besar dan diikuti dengan diameter hambatan yang relatif hampir tetap, berarti pelepasan gentamisin mengikuti order nol seperti rencana peneliti.

Tabel 5.6. Hasil pengamatan daya hambat terhadap *S aureus* dan *E coli* dari gentamisin yang berdifusi keluar dari pelet {BHA(G)ELENA}

No	Jam/ Hari	Diameter hambatan (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherchia coli</i>
1	Jam ke 1	0	0
2	Jam ke 3	17,3	17,7
3	Jam ke 6	20,0	17,5
4	Jam ke 9	19,3	18,9
5	Jam ke 12	18,5	18,2
6	Jam ke 24	19,2	17,5
7	Hari ke 2	19,7	18,1
8	Hari ke 3	19,7	18,2
9	Hari ke 4	18,6	17,4
10	Hari ke 5	17,4	17,4
11	Hari ke 6	17,3	18,7
12	Hari ke 7	17,5	17,7
13	Hari ke 8	17,8	17,1
14	Hari ke 9	17,3	17,9
15	Hari ke 10	17,8	17,4
16	Hari ke 11	18,7	17,1
17	Hari ke 12	17,8	16,2
18	Hari ke 13	16,9	16,9
19	Hari ke 14	15,1	16,9
20	Hari ke 15	15,2	16,9
21	Hari ke 16	15,3	16,7
22	Hari ke 17	15,7	15,5
23	Hari ke 18	14,3	15,1
24	Hari ke 19	15,4	15,0
25	Hari ke 20	14,9	15,8
26	Hari ke 21	15,7	15,6
27	Hari ke 28	17,2	17,8

33	Haji K6 38	135	138
30	Haji K6 31	121	120
32	Haji K6 30	140	128
34	Haji K6 10	124	120
32	Haji K6 18	143	121
35	Haji K6 12	121	122
31	Haji K6 10	123	102
30	Haji K6 12	123	120
16	Haji K6 14	121	100
18	Haji K6 13	100	100
13	Haji K6 13	138	105
10	Haji K6 11	121	121
12	Haji K6 10	138	139
14	Haji K6 8	122	120
12	Haji K6 8	128	121
13	Haji K6 2	122	122
11	Haji K6 0	123	122
10	Haji K6 2	124	124
0	Haji K6 1	120	124
8	Haji K6 3	122	125
2	Haji K6 5	122	121
0	Haji K6 34	123	122
2	Haji K6 15	122	125
4	Haji K6 8	122	120
2	Haji K6 0	300	122
3	Haji K6 2	122	122
1	Haji K6 1	0	0
		Σ (Baris) = 2000	Σ (Kolom) = 2000
0	Haji K6	Σ (Baris) = 2000	

yang berisikan hasil dari tabel (BIVARIAT)

Terdapat 20 Haji yang beribadah di Masjid Al-Farooq di Surabaya dan 200 orang yang beribadah di Masjid Al-Farooq di Surabaya.

tersebut berikut:

yang terdapat dalam tabel tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara jumlah ibadah di Masjid Al-Farooq di Surabaya dan jumlah ibadah di Masjid Al-Farooq di Surabaya.

tersebut tersebut adalah hasil dari uji chi-square yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara jumlah ibadah di Masjid Al-Farooq di Surabaya dan jumlah ibadah di Masjid Al-Farooq di Surabaya.

hasil dari uji chi-square yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara jumlah ibadah di Masjid Al-Farooq di Surabaya dan jumlah ibadah di Masjid Al-Farooq di Surabaya.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil percobaan dan pembahasan dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut :

1. Telah dihasilkan komposit matriks dalam bentuk pelet implant dengan komponen utama bovine hidroksi apatit (BHA), gelatin (GEL), glutaraldehid (GA) sebagai *cross-link agent* untuk mengikat gentamisin (GEN) dengan GEL, disingkat BHA-GEL-GEN-GA dengan komposisi optimal berturut-turut : (20 : 2) : 10% : 0,5%.
2. Komposit matriks BHA-GEL-GEN-GA mempunyai karakteristik yang memenuhi kriteria kekerasan, porositas, densitas, tidak bersifat toksik, dapat melepas gentamisin aktif secara teratur.

Dengan adanya bukti dari uji karakteristik secara *in vitro* disarankan:

1. Dilakukan penelitian lanjutan secara *in vivo* pada binatang coba untuk digunakan sebagai *bone filler* dan sistem penghantar gentamisin untuk preventif dan kuratif infeksi lokal pada pembedahan tulang
2. Dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan bentuk sediaan sistem penghantaran obat yang lebih efektif dan efisien

DAFTAR PUSTAKA

- Abe T, Sakane M, Ikoma T et al., 2008. Intraosseous Delivery of paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-Alginate Composite Beads Delaying Paralysis Caused by metastatic Spine Cancer in rats., *J Neurosurg Spine* 9:502-510
- Abdurrahman, 2002. Indonesian Tissue Banking: *Progress on Tissue Production and Development of Quality Assurance*, the 9th International Conference on Tissue Banking-Asia Pacific Association of Surgical Tissue Bank
- Ahmadi K, Dadgari F, Safarinejad MR, 2011. Assessing the frequency and antibiotic resistance of nosocomial bacterial infections in the intensive care units and general wards. *Journal of Infectious Diseases and Immunity* Vol 3(8): 140-148
- Al-Lanqawi Y, Capps P, Abudlmalik K, Al-Anezi Khalid, 2009. Clinical Pharmacokinetics of Gentamicin, *Med Princ Pract* 18: 209-216
- Armstrong EP, Friedman, 2008. Bone and Joint Infection, in *Pharmacotherapy, A Pathophysiologic Approach*, by Dipiro, 7th ed, Chapter 122
- Baro M, Sanchez E, Delgado, Perera A, et al. 2002. In vitro- in vivo characterization of gentamicin bone implants, *Journal of Controlled Release* 83: 353-364
- Belcarz A, Binalska G, Zalewska J, Rzeski W, Slosarczyk A, 2009. Covalent Coating of Hydroxyapatite by Keratin Stabilizes Gentamicin Release, *J Biomed Mater Res Part B: appl Biomater* 89B: 102-113
- Buranapanitkit B, Srinilta V, Ingvinga N, Oungbho K, Geater A, Ovatlarmprn C, 2004. The efficacy of a hydroxyapatite compoite as a biodegradable antibiotic delivery system, *Clin Orthop Relat Res*, 424:244-252
- Campos MGN, Rawls HR, Innocentini-Mei LH, Satsangi N, 2009. In vitro gentamicin sustained and controlled release from chitosan cross-linked films, *J Mater Sci: Mater Med* 20: 537-542
- Calvache Parra LC, Mora Rojas F A, Narvaez D, et al, 2009. Manufactura and Characterization of a Mixture of Bone Powder and Bioceramic: A 3D-Printing method process, *Ingenieria & Desarrollo. Universidad del Norte*, 26: 22-36
- Campoccia D, Montarano L, Speziale P, et al., 2010, Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use, *Biomaterials* 31: 6363-6377
- Caplan AI, 2005. Mesenchymal Stem Cells: Cell Base Reconstructive Therapy in Orthopaedics. *Tissue Eng.* Vol.11(7/8): 1198-1211

- Chambers HF., 2007. Beta-Lactam Antibiotics & Other Inhibitors of Cell Wall Synthesis. In: Bertram Katzung (Edt.). *Basic and Clinical Pharmacology*, 10th Ed, San Fransisco: Appleton & Lange, pp. 724-41, 752-59
- Combe EC, 1992. *Sari Dental Material*, Tarigan S (terjemahan). Jakarta, Balai Pustaka. Bab 4: 24-27.
- Crowther JR, 2005. *The Elisa Guidebook*, John M Walker (Edt). Second Edition, Humana Press, Austria.
- de Klaver PAG, de Koning J, Janssen RPA, Derijks LJJ, 2009. High Systemic gentamicin levels and ototoxicity after implantation of gentamicin beads in a 70-year-old man –a case report, *Acta Orthopaedic* 80 (6): 734-736
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995. *Farmakope Indonesia Edisi Keempat*: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- De Souza Nunes LS, DeOliveira RV, Holgado LA, Filho HN, Ribeiro DA, Matsumoto MA, 2011. Use of Bovine Hydroxyapatite With or Without Biomembrane in Sinus Lift in Rabbits: Histopathologic Analysis and Immune Expression of Core Binding Factor 1 and Vascular Endothelium Growth Factor. *J Oral Maxillofac Surg* 69: 1064-1069
- Dinarvand R, Mahmood S, Farbout E, et al., 2005. Preparation of gelatin microspheres containing lactic acid- Effect cross-linking on drug release, *Acta Pharm* 55: 57-67
- Di Silvio L, Bonfield W, 1999. Biodegradable Drug Delivery System for the Treatment of Bone Infection and Repair, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10: 653-658
- D'Mello SR, K.Das S, G.Das N, 2009. Polymeric Nanoparticles for Small-Molecule Drug: Biodegradation Of Polymers and Fabrication of Nanoparticles in: *Drug Delivery Nanoparticles Formulation and Characterization*. Editor, Pathak Y, Thassu D, Informa Healthcare USA, Inc, Volume 191: Chapter 2
- Faber C, Stallmann HP, Lyaruu DM, de Blicck JMA, Bervoets TJM, 2003. Release of antimicrobial peptide Dhvar-5 from polymethylmethacrylate beads, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1359-1364
- Faber C, Hoogendoorn Lyaruu DM, Stallmann HP, Marle JV, 2005. Simultaneous release of Dhvar-5 and gentamicin from polymethylmethacrylate beads, *Biomaterials*, 26(28): 5717-5726
- Farmakope Indonesia, 1995,

- Ferdiansyah, Gustiono D, Herdianto D (2008). *Uji Kompabilitas Hidroksiapatit Bovine, batu Gamping dan Koral*. Penelitian Bersama Pusat Biomaterial-Bank Jaringan Dr. Soetomo – Pusat Tehnologi Material BPPT.
- Ferdiansya, 2010. Regenerasi pada *Massive Bone Defect* dengan *Bovine Hydroxyapatite* sebagai *Scaffold* Stem sel Mesensimal, *Desertasi*, Program Pascasarjana Ilmu Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya
- Gardner MJ, Demertrakopoulos D, Shindle MK, Griffith MH, Lane JM, 2006. Osteoporosis and skeletal fractures, *Hospital for Special Srgery J* (1): 62-69
- Ginalska G, Kowalczyk D, Osinska M, 2005. A Chemical method of gentamicin bonding to gelatine-sealed prosthetic vascular grafts, *International Journal of Pharmaceutics* 288: 131-140
- Ginebra MP, Traykova T, Planell, 2006. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review, *Journal of Controlled Release* 113: 102-110.
- Gubernurator J, Drulis-Kawa Z, Kuzubek A, 2006. A simply and sensitive fluorometric method for determination of gentamicin in liposomal suspensions, *International Journal of Pharmaceutics* 327: 104-109.
- Habraken WJEM, Wolke JGC, Jansen JA, 2007. Ceramic Composites as Matrice and Scaffolds for Drug Delevery in Tissue Engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 59, Issues 4-5, 30 May : 234-248
- Hanssen AD, Spangehl MJ, 2004. Practical Applications of Antibiotic-Loaded Bone Cement for Treatment of Infected Joint Replacements, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, No. 427: 79-85
- Hardy Ph, Kania R, Verliac S, Lortat-Jakob A, Benoid J, 1997. Infection Following the Use of Porous Hydroxyapatite Ceramic as a Bone Defect Filler in Articular Fracture, *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 7: 63-67
- Hilgeson MD, Potter BK, Tucker CJ, Frish HM, Shawen SB, 2009, Antibiotic-impregnated Calcium Sulfate Use in Combat-related Open Fractures, *Infection Orthopedics* 32(5): 323-330.
- Hillig WB, Choi S, Murtha S, et al, 2008. An Open-Pored Gelatin/Hidroxyapatite Composite as a Potential Bone Substitute, *J. Mater Sci: Mater Med* 19: 11-17
- Hing KA, Best SM, Bonfield W, 1999. Characterization of Porous Hydroxyapatite. *Journal of Materials Science:Materials in Medicine* 10: 135-145
- Jamel Noor Fatehah, 2011. “Studi Penggunaan Antibiotik pada Pasien Bedah Ortopedi Arthroplasti” di SMF Ortopedi dan Traumatologi RSUD Dr Soetomo Surabaya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya

- Jee Webster S.S., 2000. *Integratete Bone Tissue Physiology:Anatomy and Physiology*. In: (Cowin Stephen C, eds). *Bone Mechanics HANDBOOK*, CRC Press Boca Raton London New York Washington,D.C: 1-6 – 1-19
- Jin Rong and Dijkstra Pieter J., 2010. *Hydrogels for Tissue Engineering Applications.*, in: *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, Edit by: Ottenbrite RM, Park K, Okano T.,Springer Science+Business Media USA., Part III.
- Jiranek WA, Hansen AD, Greenwald S. 2006. Antibiotic-Loaded Bone Cement For Infection Prophylaxis in Total Joint Replacement, *J Bone Joint Surg Am.* 88: 2487-2500
- Khanna R, Katti KS, Katti DR, 2010. In Situ Swelling Behavior of Chitosan-Polygalacturonic Acid/Hydroxyapatite Nanocomposites in Cell Culture Media, *International Journal of Polymer Science*, Volume 2010, Article ID 175264, 12 pages.
- Ken ME, Rapp RP, Smith KM, 2006. Antibiotic Beads and Osteomyelitis: Here Today, What's Coming Tomorrow?, *Orthopaedics*, July 1
- Khanna R, Katti KS, Katti DR, 2010. In Situ Swelling Behavior of Chitosan-Polygalacturonic Acid/Hydroxyapatite Nanocomposites in Cell Culture Media, *International Journal of Polymer Science*, Volume 2010, Article ID 175264, 12 pages.
- Kim Cherng-ju, 2004. *Advanced Pharmaceutics Physicochemical Principles*, Boca Raton, CRC Press: Chapter 5-Chapter 6
- Kim Hae-Won, Knowles JC, Kim HE, 2005. Hydroxyapatite and Gelatin Composite Foams Processed via Novel Freeze-drying and Crooslink for Use as Temporary Hard Tissue Scaffold. *J. Biomed Mater Res 72A*: 136-145
- Kim Hae-Won, Yoon Byung-Ho, Kim Hyoun-Ee, 2005. Microsphere of Apatite-Gelatin Nanocomposite as Bone Regenerative Filler. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16: 1105-1109
- Korkusuz P, Korkusuz F, 2004. Hard Tissue-Biomaterial Interactions in *Biomaterials in Orthopedics*, Yaszemski MJ, Trantolo DJ, Lewandrowski KW editor, Marcel Deccer, Inc, Chapter 1
- Lei L, Li L, Zang L et al., 2009. Structure and Performance of Nano-Hydroxyapatite Filled Biodegradable Poly(1,2-Propanediol-Sebacate)-citrate) Elastomer, *Polymer Degradation and Stability* 94:1494-1502
- Li Xiang-Dong, Hu Yun-yu, 2001. The treatment of osteomyelitis with gentamicin-reconstituted bone xenograft-compsite. *J Bone Joint Surg (Br)* 83B:1063-8

- Lucas-Girot A, Verdier M-C, Tribut O, Sangleboeuf J-C., 2005. Gentamicin-Loaded Calcium Carbonat Materials: Comparison of Two Drug-Loading Modes. *J. Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 73B:164-170
- Lullmann Heinz; Mohr Klaus., Ziegler Albrecht, Bieger Detlef, 2000, *Color Atlas of Pharmacology*, Thieme Stuttgart.New York: 265, 267, 277-279
- Maathuis PG, Neut D, Busscher HJ, van der Mei HC, van Hom JR. 2005. Perioperative contamination in primary total hip arthroplasty, *Clin Orthop Relat Res*, 433: 136-139
- McGuinness H, 2010. *Anatomy and Physiology: Therapy basics*, Hodder Education An Hachette UK Company, Fourth Ed.Chapter 3
- Meseguer- Olmo L., Nicolas-Ros MJ., Sainz-Clavel M.,et al, 2002. Biocompatibility and in vivo Gentamicin Release from Bioactive Sol-Gel Glass Implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol 61 Issue 3: 458-465
- Meredith CJ, Sormana LJ, Keselowsky GJ et al., 2003. Combinatorial Characterization of Cell Interactions With Polymer Surfaces, *J Biomed Mater Res*: 483-490.
- Montali Andrea, 2006. Antibacterial Coating Systems, *Injury, Int. J. Care Injured* 37: S81-S86
- Nandi SK, Mukherjee P, Roy S, et al., 2009. Local antibiotic delivery systems for the treatment of osteomyelitis- A review, *Materials Science and Engineering C* 29: 2478-2485
- Narbat KM, Orang F, Hashtjin SM, Goudarzi A., 2006. Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Iranian Biomed.J.*10 (4): 215-223.
- Nelson Carl L, McLaren Sandra G, Skinner Robert A, Smeltzer Mark S, Thomas J Roby, Olsen Keith M, 2002. The treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of calcium sulfate tobramycin pellets, *Journal of Orthopaedic Research*, 20: 643-647
- Nelson Carl L, 2004. The Current Status of Material Used for Depot Delevery of Drugs. *Clinical Orthopaedics and Related Research* No 427: 72-78
- Oates TW and Cochran DL, 2007. Dental Application of Bone Biology, in: *Engineering of Functional Skeletal Tissue*, Edit by: Bronner F, Farach-Carson M, Micos AG, Springer-Verlad Lodon, Vol 3, Chapter 9: 135
- Omidian H and Park K, 2010. Introduction to Hydrogals, in: *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook*, Edit by: Ottenbrite RM, Park K, Okano T, Springer Sciences+Business Media New York, pp. 1-15

- Ossendorf C, Scheyerer MJ, Wanner GA, Simmen HP, Werner CML, 2010. Treatment of femoral neck fractures in elderly patients over 60 years of age-Which is the ideal modality of primary joint replacement?, *Patient Safety in Surgery*, 4:16
- Porter JR, Ruckh TT, Popat KC, 2009. Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies, *Biotechnol Prog*, Vol 25, No 6:1539-1560.
- Powles JB, Spenser RF, Lovering AM, 1998. Gentamicin release from old cement during revision hip arthroplasty, *J Bone Joint Surg (Br)* 80.B: 607-610
- Price JC, 2000. Diffusion Controlled Systems: *Polymeric Microcapsules in Polymers for Controlled Drug Delivery*, Editor, Tarcha Peter J Abbott Laboratories North Chicago, Illinois, pp. 1-15
- Ramirez-Fernandez MP, Calvo-Guirado JL, Delgado-Ruiz RA, Mate-Sanchez del Val JE, Gomez-Moreno G, Guardia J, 2011. Experimental model of bone response to xenografts of bovine origin (Endone®): a radiological and histomorphometric study, *Clin. Oral Impl. Res.* 22: 727-734
- Ranade VV, Hollinger MA, 2004. Role of polymers in drug delivery. In *Drug Delivery Systems*, CRC Press LLC, second Edition, Chapter 3.
- Reese E Richard, Beets Robert F, Gumustop Bora, 2000, *Hand Book Of Antibiotics*, Lippincott Williams&wilkins, pp. 277-278, 415-426
- Saltzman WM, 2001. *Drug Delivery: Engineering Principles For Drug Therapy*, Oxford University Press : 235-270
- Sivakumar M, Panduranga Rao K, 2002. Preparation, characterization and in vitro release of gentamicin from corallin hydroxyapatite-gelatin composite microspheres. *Biomaterials*. 23:3175-3181
- Sopyan I, Mel M, Ramesh S et al, 2007. Porous Hydroxyapatite for Artificial bone Applications, *Science and Technology of Advanced Materials* 8: 116-123
- Soundrapandian C, Sa B, Datta S, 2009. Organic-Inorganic Composites for Bone Drug Delivery, *AAPS PharmSciTech*, Vol 10, No 4:1158-1171
- Springer BD, Lee GC, Osmon D, Haidukewych GJ, Hanssen AD, Jacofsky D, 2004. Systemic Safety of High-Dose Antibiotic-Loaded Cement Spacer after Resection of an Infected Total Knee Arthroplasty, *Clinical Orthopaedic and Related Research* No 427: 47-51

- Tampieri A, Celotti G, Landi E, 2003. Porous Phosphate-Gelatine Composite as Bone Graft with Drug Delivery Function, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14:623-627
- The Merck Index, 2001, Volume 13th, Monograp no 4393; 4405; 4485
- Torrado S, Frutos P, Frutos G, 2001. Gentamicin bone cement: Characterisation and release (in vitro and in vivo assays), *International Journal of Pharmaceutics* 217: 57-69.
- Tortora GJ., Derrickson B.,2009. *Principles Of Anatomy And Physiology*, John Wiley & Son, 12th, pp. 175-193
- Tsuang Y H, Sun JS, Chen LT, 2006. Direct Effect Of Caffein On Osteoblastic Cells Metabolism : The Possible Causal Effect Of Caffein On The Formation Of Osteoporosis, *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 1:7:1-10
- Walsh W R., Walton M., Bruce W et al, 2003. *Cell Structure and Biology Bone and Cartilage* in : (An Yuehuei H, Martin Kylie L, eds) *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*, Human Press, Totowa, New Jersey, pp.35-45
- Woolf A., Akesson K, 2008. *An Atlas of Investigation and Management Osteoporosis*, Atlas Medical Publishing Ltd, First Published, pp. 5
- Zalavras CG, Patzakis MJ, Holtom P, 2004. Local Antibiotic Therapy in the Treatment of Open Fractures and Osteomyelitis, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, No 427: 86-93
- Zhu Yufang, Kaskel Stevan, 2008. Synthesis and in Vitro Release of Gentamicin From CaMCM-41/PLLA Composite Microspheres, in *Ceramic Materials and Components for Energy and Environmental Application*, Ed. Dongliang Jiang , *Ceramic Transactions*, Vol 210: 79-84

LAMPIRAN

Lampiran 1

ORGANISASI TIM PENELITIAN

Ketua Tim Peneliti

Nama : Prof. Dr.H.M.Zainuddin,Apt
Pangkat /Gol : Pembina Utama Madya /IVd
Jabatan : Guru Besar
Bidang Keahlian : Analisis, Statistik
Unit Kerja : Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi UNAIR

Anggota

Nama : Ferdiansyah, Dr.dr.,SpOT
Pangkat /Gol : Pembina /IVa
Jabatan : Ketua Bank Jaringan RSUD Dr Soetomo Surabaya
Bidang Keahlian : Bedah Orthopaedi dan Traumatologi
Unit Kerja : RSUD Dr Soetomo Surabaya

Mahasiswa Pasca Sarjana

1. Dra. Aniek Setiya Budiadin,Apt.,M.Si. Program Pasca Sarjana UNAIR (S3)
2. Fathia Ramadiani, S.Farm, Apt., Program Pasca Sarjana UNAIR (S2)

Tenaga Laboran:

1. Yuyun (Laboratorium Mikrobiologi)
2. Harmono (Laboratorium Tehnologi)
3. Mursid (Laboratorium Farmasi Klinik)

Lampiran 3.

GAMBAR INSTRUMEN YANG DIPERGUNAKAN.

1. Hot plate dengan *magnitic stirer* dan *electric stirer* digunakan untuk orientasi pembuatan bentuk microsfer dari sediaan.



Gambar 1. Hotplate dengan 2 tombol, tombol kiri untuk *magnitic stirer* dan tombol kanan untuk mengatur kecepatan *electric stirer* (mengaduk dari atas)

2. Pembuatan granul dari matriks komposit BHA-GEL-GA-GEN: menggunakan mortar untuk mencampur bahan dan saringan untuk membuat granul.



Gambar 2. Mortar, saringan (mesh 1 mm) dan granul

3. Untuk mengeringkan granul digunakan lemari pengering (oven) dengan suhu 37⁰C

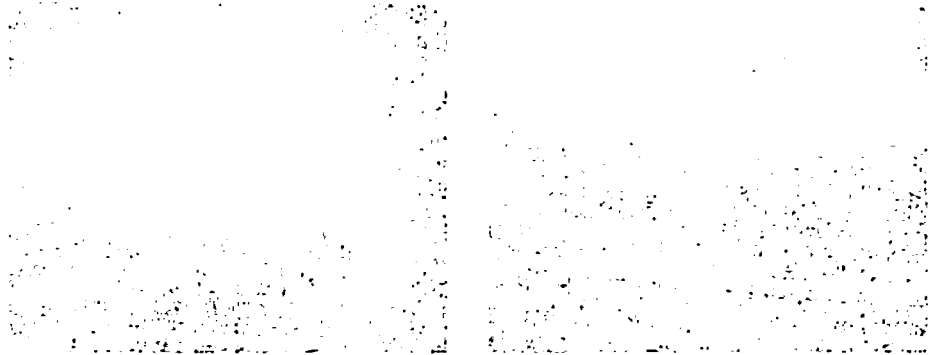


Gambar 3. Oven (Binder) untuk mengeringkan granul dan melakukan *cross-link* antara matrik komposit BHA-GEL dan BHA-GEL-GEN dengan glutaraldehid (GA)

Gambar 3.

AMBAR INSTRUMEN YANG DIPERKUNAKAN

1. Hot plate dengan waduk swiss dan elevator swiss digunakan untuk orientasi pembuatan bentuk mikroster dari sebaran.



Gambar 1. Hot plate dengan 2. Elevator kontrol diri untuk waduk swiss dan kontrol (untuk untuk membuat kecapian elevator swiss (mengalir dari atas)

2. Pembuatan granul dari matriks komposisi BHA-GEL-GA-GEN: menggunakan mortar untuk mencampur bahan dan saringan untuk membuat granul.



Gambar 2. Mortar saringan (mesh 1 mm) dan granul

3. 1. Hot plate dengan waduk swiss dan elevator swiss digunakan untuk orientasi pembuatan bentuk mikroster dari sebaran.



Gambar 3. Oven (Bibler) untuk mengeringkan granul dan matriks komposisi BHA-GEL-GA-GEN dan waduk swiss untuk membuat kecapian elevator swiss (mengalir dari atas) BHA-GEL-GEN dengan glutaraldehyd (GA)

3. Alat pencetak pelet (*cycle dying*) dan *Carver Hydrolic* untuk menekan granul yang ada dalam cetakan.



Gambar 4. Alat pencetak pelet dengan diameter 4 mm dan Carver Hydrolic untuk menekan granul atau serbuk menjadi pelet

5. Instrumen Fourier Transforming InfraRed (FTIR) untuk penentuan struktur matriks



Gambar 5. Instrumen FTIR (Parkin Elmer)

6. Timbangan untuk menentukan kelembaban pelet/Moisture Balance (Mettler Toledo)



Gambar 6. Moisture Balance (Mettler Toledo)

1. Alat pencetak pelat (cold type) dan (warm type) untuk mencetak gambar yang ada dalam cetakan.



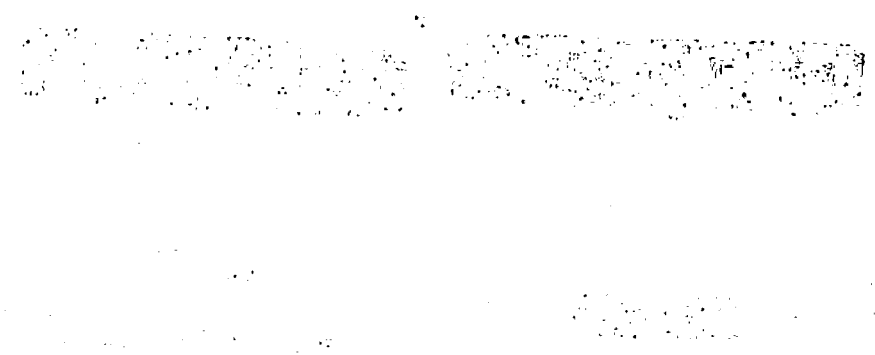
2. Alat pencetak pelat dengan sistem 1 dan 2 dan (cold type) untuk mencetak gambar yang ada dalam cetakan.

3. Instrumen Fourier Transforming Infrared (FTIR) untuk penentuan struktur molekul.



(Gambar 3. Instrumen FTIR (Perkin Elmer))

4.imbangan untuk menentukan kelembaban pelat (Moisture Balance (A letter Toledo))



(Gambar 4. Moisture Balance (Toledo))

7. Timbangan (Mettler Toledo); gelas ukur dan gelas arloji untuk menentukan porositas dan densitas granul.



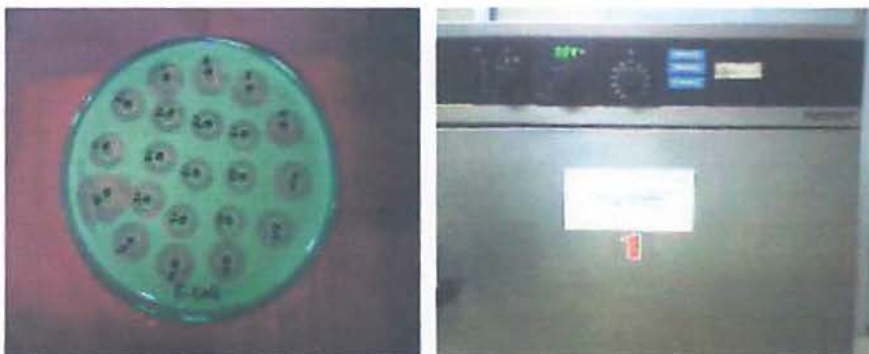
Gambar 7. Timbangan; gelas arloji; gelas ukur dan aquades

8. Penentuan konsentrasi Gentamisin secara kromatografi lapisan tipis (KLT), dieluasi dalam Chamber dan pembacaan dengan Densitometer (Shimadzu)



Gambar 8. Chamber kromatografi (Lamag), sampel yang dieluasi dalam pelat aluminium-silika gel dan Densitometer (Shimadzu)

9. Inkubator untuk mengeramkan bakteri dalam gelas petri pada uji aktivitas Gentamisin



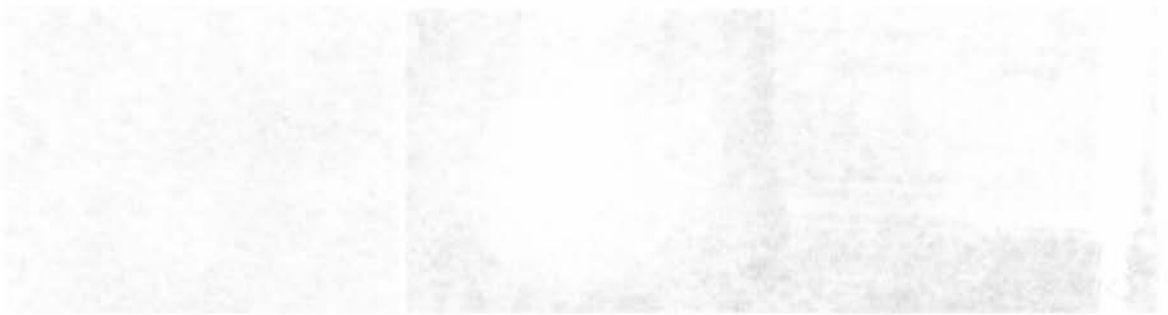
Gambar 9. Gelas petri yang didalamnya terjadi peristiwa pertumbuhan bakteri dan hambatan Gentamisin serta inkubator (Memmert)

Gambar 5. Tembakung (Mentel Tolob) gelas ukur dan gelas ukur untuk menentukan konsentrasi dan densitas gumul.



Gambar 5. Tembakung gelas ukur dan gelas ukur untuk menentukan

Gambar 6. Rancangan komposisi Garam-garam secara kuantitatif lapisan tipis (LPL) di dalam Lamin Chamber dan pembacaan dengan Densimeter (Stimulus).



Gambar 8. Lamin Chamber kromatografi (Lamin Chamber) yang di dalam Lamin Chamber untuk silika gel dan Densimeter (Stimulus).

Gambar 9. Lamin Chamber untuk mengontrol faktor-faktor dalam gelas ukur pada uji aktivitas Garam-garam



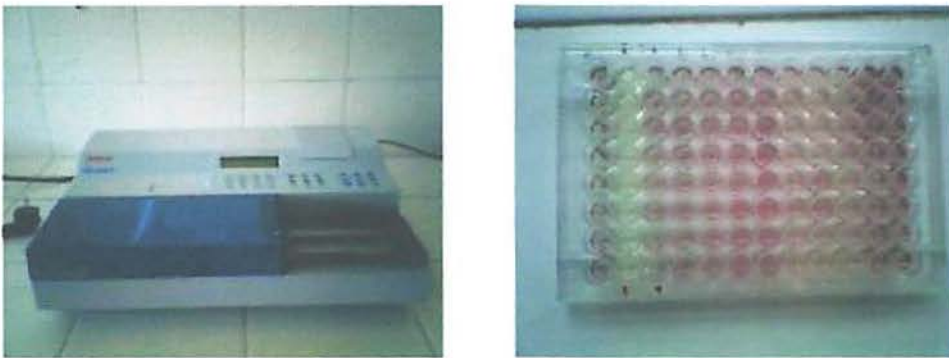
Gambar 10. Gelas ukur yang di dalam Lamin Chamber untuk menentukan faktor-faktor dalam Lamin Chamber untuk mengontrol faktor-faktor dalam Lamin Chamber.

10. AUTOGRAFT E-10 (Untuk mengukur Compressive Strength dari pelet)



Gambar 10. Gambar alat Autografit E-10 untuk mengukur kekuatan tekan dari sampel

11. Elisa reader (Thermo scientific) untuk mengamati uji toksisitas secara MTT dan penentuan konsentrasi Gentamisin dengan Kit Gentamisin



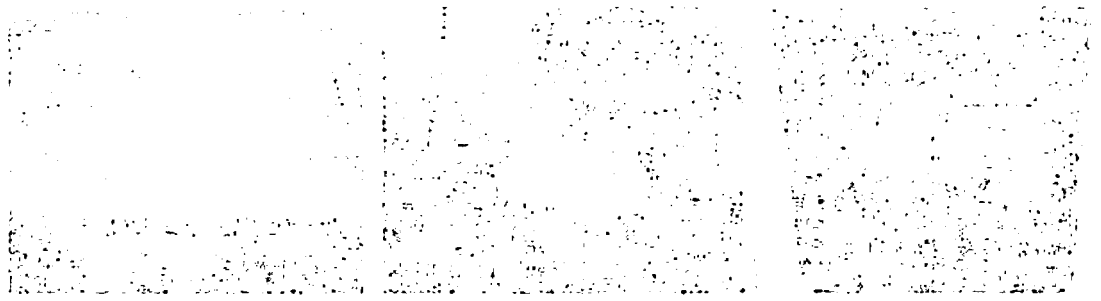
Gambar 11. Elisa reader (Thermo Scientific) dan plate yang berisi sel dan sampel

12. Rak untuk meletakkan vial yang berisi sampel untuk uji disolusi dan water –Batch (Memmert)



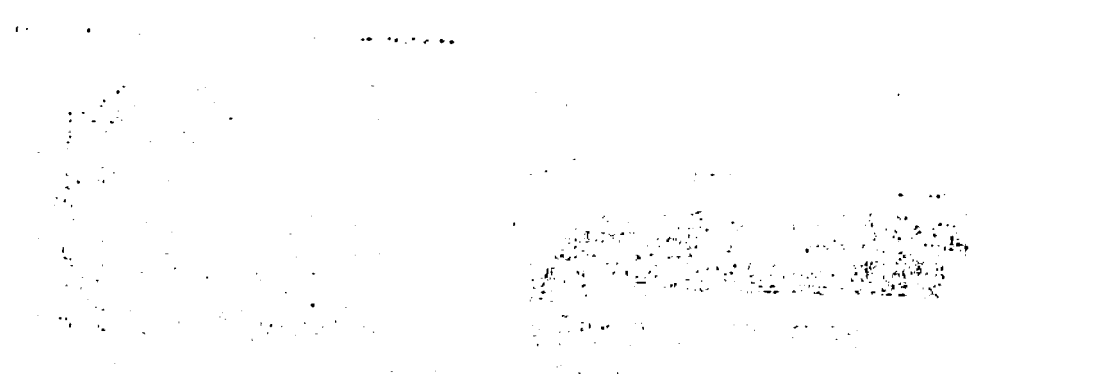
Gambar 12. Gambar kiri: Rak dan Gambar kanan: gambar sebelah depan dari Water bath (Memmert) dan suhu diatur pada 37⁰C.

10. AFTOGRAF E-10 (Untuk mengukur Compressive Strength dari beton)



Gambar 10. Gambar dari Aftograft E-10 untuk mengukur ketahanan tekan dari sampel

11. Elisa reader (Thermo scientific) untuk menganalisa uji oksidasi secara ATTA dan penentuan konsentrasi Gentamisin dengan Kit Gentamisin



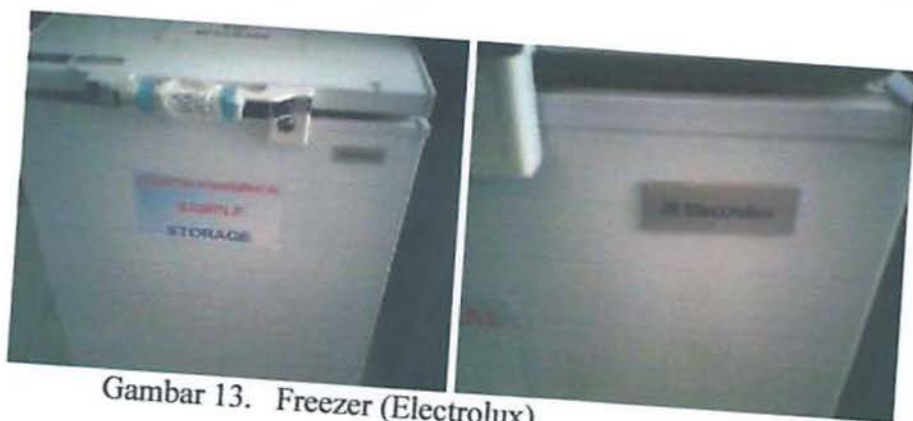
Gambar 11. Elisa reader (Thermo scientific) dan plate yang berisi sel dan sampel

12. 1/2 liter botol melerakkan vital yang berisi sampel untuk uji disolusi dan water-Batch (gambar 11)



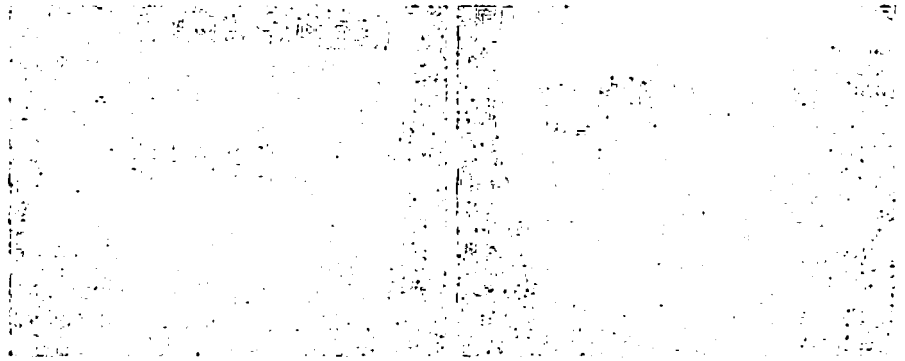
Gambar 12. Gambar dari 1/2 liter dan Gambar kanan gambar adalah 1/2 liter water-Batch (gambar 11) dan gambar kiri adalah 1/2 liter

13. Freezer untuk menyimpan hasil sampling dari uji disolusi dan uji secara in vivo dengan binatang coba kelinci.



Gambar 13. Freezer (Electrolux)

0.3. Proses untuk mengoptimasi hasil sampingan hasil pengolahan limbah dengan bioteknologi dengan memanfaatkan mikroorganisme.



Gambar 0.3. Proses (lanjutan)