

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**SCAFFOLDGELATIN-CHITOSAN SEBAGAI SISTEM
PENGHANTARAN DIKLOFENAK DAN PENGGANTI KARTILAGO
PADA OSTEOARTHRITIS**

TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. ANIEK SETIYA BUDIATIN	0012125911
Dr. SUHARJONO, MS., Apt	0022125202
SAMIRAH, S.Si., SpFRS., Apt	0020048001
WENNY PUTRI N, S.Farm., SpFRS., Apt	0026018401

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDRAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



KPB
KK-2
LP.85/19
Sca

**SCAFFOLDGELATIN-CHITOSAN SEBAGAI SISTEM
PENGHANTARAN DIKLOFENAK DAN PENGGANTI KARTILAGO
PADA OSTEOARTHRITIS**

TAHUN KE – 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. ANIEK SETIYA BUDIATIN	0012125911
Dr. SUHARJONO, MS., Apt	0022125202
SAMIRAH, S.Si., SpFRS., Apt	0020048001
WENNY PUTRI N, S.Farm., SpFRS., Apt	0026018401

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDRAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Scaffold gelatin-chitosan sebagai sistem penghantaran diklofenak dan pengganti kartilago pada osteoarthritis

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr. Dra ANIEK SETIYA BUDIATIN, M.Si
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0012125911
 Jabatan Fungsional : Lektor
 Program Studi : Farmasi Klinik
 Nomor HP : 0818597732
 Alamat surel (e-mail) : aniek-s-b@ff.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr. Drs SUHARJONO Apt, M.S
 NIDN : 0022125205
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : Sp.FRS. SAMIRAH S.Si, Apt
 NIDN : 0020048001
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (3)

Nama Lengkap : Sp.FRS. WENNY PUTRI NILAMSARI S.Farm, Apt
 NIDN : 0026018401
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 190,700,000



Mengetahui,
 Wakil Dekan II Fakultas Farmasi Unair
 (Dr. Dwi Setyawan, S.Si., M.Si., Apt)
 NIP/NIK 197111301997031003

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018
 Ketua,

(Dr. Dra ANIEK SETIYA BUDIATIN, M.Si)
 NIP/NIK 195912121989032001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan inovasi Unair



(Prof. Drs. Hery Purnobasuki, M.Si., PhD)
 NIP/NIK 196705071991021001



RINGKASAN

**SCAFFOLD GELATIN-CHITOSAN SEBAGAI SISTEM PENGHANTARAN
DIKLOFENAK DAN PENGGANTI KARTILAGO PADA OSTEOARTRITIS****Aniek Setiya Budiatin, Suharjono, Samirah, Wenny Putri**

Osteoarthritis terjadi karena lapisan kartilago hilang atau rusak, secara normal lapisan ini akan menahan beban tubuh dan gesekan gerakan sendi, akibatnya sendi bila digerakkan akan menimbulkan rasa nyeri. Hal tersebut perlu segera dilakukan perbaikan dengan cara implantasi scaffold dari lapisan chitosan-gelatin dan analgesik yaitu diklofenak. Chitosan dan gelatin merupakan bahan biokompatibel biodegradable akan mengalami degradasi dan degradan yang dihasilkan dapat bersatu dengan sel di sekitarnya, membentuk kartilago baru. *Scaffold* tersebut akan mengembang dengan mengisap air 10 kali beratnya, mengalami erosi di bagian luarnya sedikit demi sedikit sambil melepaskan diklofenak. Chitosan merupakan polimer biokompatibel yang mampu meningkatkan fungsi polimorfonuklear (PMN) dan makrofag dengan demikian memiliki sifat antibakteri. Zat aktif diklofenak mempunyai aktivitas sebagai inflamasi/ antinyeri akan mendukung formula dalam mempercepat penyembuhan osteoarthritis dan mencegah terjadinya inflamasi/ nyeri berlanjut.

Tujuan dari penelitian ini membuat formula berbentuk lapisan tipis, berfungsi untuk membentuk lapisan kartilago dengan mempercepat terbentuknya lapisan kartilago yang hilang akibat osteoarthritis. Penelitian menghasilkan produk yang sesuai dengan rencana penelitian PT tentang Penanggulangan Penyakit Tropis.

Metode: Pembuatan scaffold dari beberapa macam perbandingan antara gelatin dengan chitosan dan masing masing ditambah diklofenak sebagai antiinflamasi dan analgesik: (1) Scaffold dari Gelatin 2% , 5 ml larutan GEL 1% dituang dalam tabung freeze drying berdiameter 3,5 cm, difreezer 24 jam, selanjutnya di freeze dryer pada suhu -60°C selama 24 jam diperoleh lapisan tipis. (2) Chitosan 2% dalam asam asetat 1%, (3) Larutan CH 2% + GEL 2% (CH:GEL=1:1); selanjutnya dibuat dengan perbandingan 1:2; 2 :2 dan 2 : 1. Lapisan tipis direndam dengan NaOH 10%, dicuci dengan air sampai netral, dikeringkan kembali dengan freeze dryer.

Evaluasi karakteristik fisik formula yang dilakukan pada tahun pertama antara lain: FTIR, ketebalan; kekenyalan; kemampuan menyerap air; *tensile strength*.. Tahun ke dua: bioevaluasi formula dengan stem cell

Hasil: Karakteristik fisikokimia dari formula Gelatin dan Chitosan: FTIR ada persamaan gugus antara gelatin dan chitosan ($-\text{C}=\text{O}$; $-\text{C}-\text{O}-$; NH_2 ; OH ; CH_2). Karena freeze

drying sering ngadat hasil pengeringan *scaffold* tidak begitu baik seperti yang diharapkan yaitu ketebalan tidak merata.

Karakterisasi fisikokimiaformula baru yaitu dari formula Gelatin dan Chitosan dengan penambahan Polietilen glikol (PEG 400) sebagai pelentur/ plastisizer formula agar nyaman digunakan sebagai implant di lutut. Freeze drying yang digunakan pinjam di Metalurgi Fakultas Industri ITS, begitu juga SEM untuk menguji Porositas.

Hasil dari FTIR formula baru mirip dengan formula lama terdapat gugus $-C=O$; $-C-O-$; NH_2 ; OH dan CH_2 . Diuji pada bilangan gelombang $4000 - 400 \text{ Cm}^{-1}$. Sampel hasil freeze drying lebih bagus, lentur dengan analisis secara morfologi. Pengamatan SEM berhasil melihat porositasnya cukup baik untuk pertumbuhan sel kondrosit

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. Suharjono, M.S., Apt . atas kerjasama dan masukannya yang sangat berguna untuk memperbaiki substansi dan metode penelitian ini.

Terima kasih secara khusus peneliti sampaikan kepada Samirah, S.Si, Apt. Dan Wenny Putri Nilam Sari, S.Farm., Sp.FRS., Apt yang telah membantu dalam melaksanakan penelitian ini. Tanpa bantuannya penelitian ini tidak akan dapat diselesaikan. Demikian juga kepada Yusuf, dr., Sp.OT yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

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

Surabaya, November 2018

Penulis,

DAFTAR ISI

	Halaman
1. HALAMAN JUDUL	1
2. HALAMAN PENGESAHAN	2
3. RINGKASAN	3
4. PRAKATA	5
5. DAFTAR ISI	6
6. DAFTAR TABEL	6
7. DAFTAR GAMBAR	6
8. DAFTAR LAMPIRAN	6
9. BAB I. PENDAHULUAN	7
10. BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
11. BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	14
11. BAB IV. METODE PENELITIAN	15
12. BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	22
13. .BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	25
14. BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN	29
15. DAFTAR PUSTAKA	30
11. LAMPIRAN	31

DAFTAR TABEL

Tabel IV.1. TAHAPAN SASARAN DAN METODOLOGI	13
TABEL V.1. SCAFFOLD dari Gelatin, Gelatin-Chitosan (GEL:CH)	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur kimia gelatin (Chaplin, 2012)	12
Gambar 3.2. Bentuk lapisan kartilago tulang sendi lutut	17
Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian Tahun Pertama dan Kedua	21

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Jadwal Penelitian	31
2. SUSUNAN ORGANISASI TIM PENELITI DAN PEMBAGIAN TUGAS	32
3. Formulir Pendaftaran Paten dan bukti kirimnya	34
4. Sertifikat Seminar ACCP	38

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Kartilago merupakan jaringan yang avaskular dengan kemampuan untuk memperbaiki diri secara terbatas (Medrado *et al.*,2006). Arthritis merupakan penyakit degenerative yang biasa diderita oleh orang-orang lanjut usia yang menyebabkan kerusakan terus menerus lapisan kartilago yang mengarah pada nyeri kronik dan berkurangnya aktivitas tubuh (Zang *et al.*, 2011). Osteoarthritis (OA) mempengaruhi laki-laki dan perempuan dari semua etnik dan menurut WHO diperkirakan 10% penduduk dengan usia lebih dari 60 tahun menderita OA (Puttini *et al.*,2005). Osteoarthritis kronik akan menyebabkan komplikasi antara lain pembengkakan (inflamasi) dan nyeri sendi sehingga susah untuk digerakkan. Terapi OA yang biasa diberikan adalah analgesik NSAIDs, opioids, steroid dan lokal anastesi secara terus menerus secara oral atau intra artikular dan hyaluronat sebagai suplemen (Dyondi *et al.*, 2012). Tetapi terapi tersebut tidak menunjukkan keberhasilan yang baik dan pemakaian terus menerus obat-obatan seperti di atas akan memberikan beberapa efek samping seperti pendarahan saluran cerna, gagal ginjal atau gangguan jantung, osteoporosis, dan ketergantungan. Untuk mengatasi masalah tersebut dilakukan terapi secara lokal dengan implan *scaffold* biodegradabel, biokompatibel yang membawa analgesik (Aniek *et al.*,2014).

Biomaterial yang merupakan polimer natural dan bersifat biodegradabel,biokompatibel digunakan untuk regenerasi jaringan, material implantabel, kontrol pelepasan obat dan sebagai *scaffold* untuk perbaikan jaringan (Reis, 2008). Biomaterial dibuat dalam bentuk *scaffold* bersifat biodegradabel, terdiri dari biomaterial organik yang mudah terdegradasi dan biokompatibel, sehingga dapat bersatu dengan sel-sel di sekitarnya untuk membentuk lapisan kartilago baru (Bindu *et al.*,2010). *Scaffold* sebagai kerangka yang porus tempat sel-sel sekitarnya bermigrasi, menempel, berproliferasi dan berdiferensiasi membentuk lapisan baru yaitu kartilago (Aniek., 2014). Komposisi utama dari *scaffold* adalah memiliki komposisi mirip kartilago (komponen organik seperti kolagen dan hyaluronat) alami dan mampu melepas analgesik yang dibawa secara perlahan dalam jangka waktu panjang. *Scaffold* memiliki 2 fungsi yaitu sebagai pengisi/pengganti lapisan kartilago sendi dan pembawa obat (sistem pembawa/pengantaran obat=SPO/ *drug delivery system*=DDS). Selulose, chitin, chitosan, kolagen dan gelatin merupakan polimer natural yang sering digunakan secara luas.Keuntungan polimer natural adalah bersifat biodegradable, biokompatibel sehingga tidak memerlukan operasi ulang untuk pengambilan kembali (Aniek,

2014). Chitin merupakan homopolimer dari 1,4 β -linked N-acetyl-D-glukosamin, sedangkan chitosan merupakan deasetilasi dari chitin. Chitosan dan chitin banyak digunakan sebagai bahan biomedikal di industri karena memiliki aktivitas biologi seperti antimikroba (Murakami *et al.*, 2010) mirip dengan komponen kartilago yaitu glukosaminoglikan. Gelatin merupakan hasil hidrolisis kolagen yang merupakan komponen utama kulit maupun tulang. Gelatin (kolagen tipe 1) bersifat biokompatibel dan biodegradabel, dapat membentuk film/ lapisan yang baik dan diketahui mempercepat terjadinya jaringan lunak (*softcallus*) (Tanaka *et al.*, 2005; Bindu *et al.*, 2011). Diharapkan *scaffold* chitosan dan gelatin dapat berfungsi sebagai sistem penghantaran obat (SPO) secara lokal dan juga berfungsi sebagai pembentuk jaringan lunak yaitu lapisan kartilago.

Diklofenak merupakan obat Non Steroid antiinflamasi (NSAID) yang berfungsi sebagai analgesik dan antiinflamasi yang digunakan dalam keadaan osteoarthritis. Penggunaan obat NSAID yaitu diklofenak sering menimbulkan efek samping yaitu gangguan saluran pencernaan. Salah satu cara untuk mengatasi terjadinya efek samping secara sistemik maka dibuat *scaffold* agar diklofenak dapat terlepas lokal secara bertahap dalam jangka waktu lama. Selain itu *scaffold* juga berfungsi sebagai pengganti kartilago yang hilang pada kondisi osteoarthritis. Agar *scaffold* sebagai pembawa obat degradasinya dapat dikontrol dengan baik maka dilakukan *cross-linking* dengan *cross-link agent* glutaraldehid (Aniek *et al.*, 2014).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sistem Penghantaran Obat

Bentuk sistem penghantaran obat (SPO) yang ideal yaitu setelah matriks ditanam maka akan melepas suatu dosis terapeutik awal yang disebut sebagai dosis muatan yang akan diikuti oleh suatu pelepasan obat yang lambat dan konstan yang disebut sebagai dosis penunjang. Dosis muatan diberikan untuk mendapatkan konsentrasi obat di target diantara konsentrasi efektif minimal dan konsentrasi aman maksimal, sehingga dapat memberikan efek terapeutik yang cepat dan diikuti oleh pelepasan obat secara konstan sampai obat yang ada dalam matriks habis.

Tujuan pemakaian sediaan dalam bentuk SPO adalah dirancang untuk menyediakan konsentrasi obat ditarget konstan atau mendekati konstan sehingga mengurangi fluktuasi yaitu dengan mengendalikan pelepasan obat dalam jangka waktu yang dikehendaki, menghindari efek samping sistemik obat.

Pemakaian 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, terjadi pada penggunaan obat dalam waktu singkat, konsentrasi maksimum dari obat akan cepat tercapai dan diikuti secara eksponensial penurunan karena adanya proses eliminasi obat. Tulang dan kartilago merupakan bagian yang sukar ditembus obat dan celah (*defect*) tulang menyebabkan terjadinya devaskularisasi yang menyebabkan obat sampai ketarget dibawah konsentrasi efektif, dengan meningkatkan dosis maka dapat menimbulkan berbagai efek samping yang merugikan pasien.

Perkembangan obat di bidang farmasi untuk pemakaian obat dalam jangka waktu lama digunakan sistem penghantaran obat (SPO) yang berfungsi untuk mengatur pelepasan obat secara terkontrol, mendekati konstan pada dosis terapi. Tiga parameter penting yang harus diperhatikan dalam SPO yang yaitu sifat obat, keadaan penyakit dan lokasi sakitnya di tubuh (Nandi, 2009).

Beberapa 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 farmakoekonomi, akan mengurangi biaya dari penggunaan obat; yang seharusnya diberikan 3 kali sehari, dapat diberikan sekali dalam waktu lama, memperpendek waktu tinggal di rumah sakit.

Selain keuntungan ada kerugiannya adalah jika terjadi efek samping pada pasien sukar untuk segera diatasi; sukar menghilangkan obat yang sudah beredar dalam tubuh, serta pengaturan dosis juga sukar untuk pasien tertentu.

2.2. Sistem penghantaran obat dengan matriks Hidrogel (Saltzman, 2001; Ranade VV, 2004).

Matriks hidrogel dibuat dari polimer yang semula larut dalam air di disambung silang (*cross-link*) secara fisik dan kimia untuk membentuk material 3 dimensi, dari sifat polimer yang semula larut air menjadi tidak larut air tetapi menyerap air kemudian mengembang (*swelling*). Kecepatan difusi obat melalui matriks hidrogel tergantung pada besarnya *cross-link*. *Cross-link* atau interkoneksi antar rantai polimer merubah sifat rantai polimer secara individual menjadi jaringan makromolekul dengan ikatan kovalen secara fisika membentuk jaringan yang berbelit-belit. Matriks yang mengembang (*swelling*) disebabkan oleh difusi air kedalam celah-celah jaringan (*network*) matriks dan besarnya *swelling* dibatasi oleh gaya osmosis serta keutuhan fisik dari jaringan itu sendiri. Bila ada molekul lain seperti obat yang terjebak didalamnya juga ikut berdifusi keluar jaringan dan kecepatan difusi tergantung pada pelepasan interrantai serta ukuran dari obat yang berdifusi. Adapun karakter pelepasan obat dari hidrogel dikontrol oleh kopolimer dari monomer kompatibel, dengan demikian material ini mempunyai potensi digunakan sebagai SPO. Beberapa polimer larut air yang digunakan sebagai basis hidrogel bersifat biodegradabel, bioerodibel, biokompatibel. Sistem penghantaran obat dari matriks hidrogel berbentuk hidrat atau kering, dan pada waktu dipergunakan akan mengabsorpsi air atau cairan dari lingkungan eksternal yang menyebabkan matriks tersebut mengembang (*swelling*).

Ada 3 tahapan mekanisme pelepasan obat dari matriks hidrogel yang berasal dari bahan biodegradabel atau bioerodibel yaitu (1) erosi permukaan matriks bersamaan dengan pelepasan obat yang secara fisika teradsorpsi dipermukaan, (2) matriks mengembang (*swelling*) sehingga menyebabkan obat yang terikat secara kovalen lepas diikuti proses difusi obat, (3) kontrol pelepasan obat secara difusi dari obat yang terjebak. Pelepasan obat dari dalam matriks melalui proses bioabsorpsi polimer dan berlangsung terus menerus sampai

semua obat yang terjebak habis. Keuntungan penggunaan polimer dalam sistem penghantaran obat adalah dapat dibuat dalam berbagai bentuk dan ukuran dengan mengatur porositas matriks, sifat mekaniknya dan kecepatan degradasi sesuai dengan tujuan penggunaannya. Dengan memilih tipe polimer yang sesuai, berat molekul dan rasio campuran polimer kecepatan degradasi/ erosi dari matriks dapat dikontrol sehingga efek terapi yang diinginkan tercapai.

Pelepasan obat dari matriks ditentukan oleh difusi obat keluar matriks, yang mengikuti hukum Ficks dalam prosesnya. Berdasarkan konsentrasi obat yang dibawa sistem penghantaran obat dibagi menjadi 3 kategori yaitu:

1. Bila jumlah obat yang ada sama atau kurang dari keadaan jenuh, maka kecepatan pelepasan tergantung pada koefisien difusi obat dalam polimer dan jumlah awal obat yang ada dalam matriks. Sebaliknya koefisien difusi tergantung pada sifat obat dan polimer
2. Bila jumlah awal obat lebih besar dari titik jenuh tetapi relatif lebih kecil dibanding volume total polimer (10% b/b), kecepatan pelepasan obat tergantung pada koefisien difusi dari obat dalam matriks polimer.
3. Bila jumlah obat > 10% b/b, dengan jumlah lebih dari 10% maka obat akan membentuk partikel yang menyebabkan terbentuknya kanal atau pori-pori, sehingga kecepatan pelepasan obat tergantung pada difusi cairan dalam kanal dan ditentukan oleh elusi media. Sistem ini terjadi pada matriks yang porus atau berupa granul.

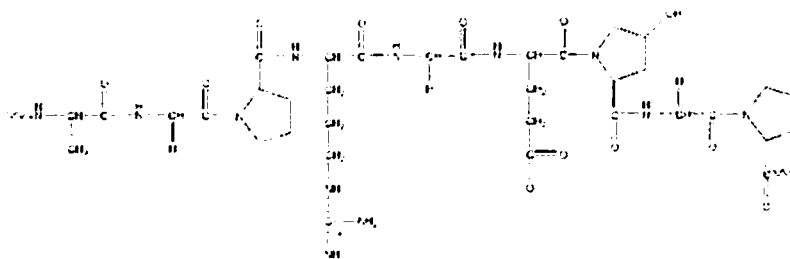
2.3 Gelatin – chitosan sebagai Sistem Penghantaran Obat

Matriks komposit organik-anorganik merupakan campuran dua atau lebih dari biomaterial dari bahan organik dan anorganik. Matriks ini dipergunakan untuk memperbaiki tulang sehingga harus mempunyai potensi sebagai pengisi atau pengganti tulang yang hilang dan mampu membawa bahan aktif seperti obat, hormon. Matriks yang diisi obat atau sebagai sistem penghantaran obat dirancang dapat melepaskan bahan aktif secara bertahap dengan kecepatan, waktu serta konsentrasi seperti yang diharapkan, dan menstimulir angiogenesis serta proliferasi osteoblas (Belcarz A, 2009).

Ada beberapa macam sifat komponen matriks polimer antara lain: nondegradabel (nonresorbabel/ stabil), biodegradabel, organik, anorganik, berasal dari sintesis atau natural. Polimer biodegradabel yang umum digunakan dalam sistem penghantaran obat adalah (i) polierster: laktida dan kopolimer glikolida, polikaprolakton, poli (β -hidroksibutirat), (ii) poliamida: (a) polimer natural contohnya kolagen, gelatin dan albumin, (b) semi sintetik:

pseudo-poly(amino acid) contohnya poly(N-palmitoyl hydroxyproline ester), (iii) polyurethanes, (iv) polyphosphazenes, (v) polyorthoester, (vi) polyanhydrides, (vii) poly(alkyl cyanoacrylates). Syarat material biodegradabel adalah mudah ditempatkan, diambil, diganti, ramah terhadap lingkungan, tidak toksik dan tidak mahal serta bersifat biokompatibel yaitu bahan dapat bersatu dengan sel disekitarnya (Nelson, 2004).

Gelatin merupakan komponen protein dari tulang yang sudah dipergunakan di klinik sebagai pengisi cedera tulang, pelapis luka bersifat biodegradabel dan biokompatibel serta sebagai penghantaran obat karena cukup plastis dan hidrogel, Gelatin adalah protein yang diperoleh dari hidrolisis kolagen hewan yang terdapat di kulit, tulang dan jaringan ikat. Gelatin memiliki gugus asam amino mirip dengan kolagen tipe 1 antara lain glisin, prolin, dan hidroksiprolin yang tinggi. Gambar 2.1 adalah struktur kimia dari gelatin (kolagen tipe 1).



Gambar 2.1. Struktur kimia gelatin (Chaplin, 2012)

Gelatin memiliki kemampuan *reversible* dari fase sol ke gel atau sebaliknya, mengembang dalam air, membentuk film, mempengaruhi viskositas suatu bahan dan melindungi sistem koloid (Parker dalam Hajrawati, 2006). Gelatin lebih murah harganya dan banyak diperdagangkan serta sudah digunakan dalam berbagai produk farmasi.

2.4. Tinjauan tentang *Cross-link* (Ginalska *et al.*, 2005)

Cross-link atau disambung silang adalah ikatan kimia dari atom atau gugus yang disambung dari dua rantai sehingga membentuk molekul yang lebih besar seperti polimer atau protein dengan jaringan tiga dimensi yang mengakibatkan perubahan sifat dari senyawa yang di *cross-link*, seperti polimer cair yang mudah mengalir menjadi kental atau padat, perubahan sifat ini tergantung dari kekuatan (konsentrasi) dan lama waktu kontak dengan *cross-link agent*. Kedua bahan dapat membentuk ikatan kovalen atau ionik. Biasanya *cross-*

link dilakukan dengan tujuan untuk membuat sintetik polimer (karet, PMMA), atau natural polimer seperti protein.

Cross-link agents adalah sekelompok reagen yang mempunyai homo atau hetero-bifungsional dengan identik atau non identik gugus reaktif yang dapat menstabilkan. Salah satu contoh *Cross-link agents* yang sering dipergunakan adalah glutaraldehid, turunan etilen glikol di(meth) akrilat, divinilbenzenena.

Strategi *cross-link* untuk membentuk ikatan kovalen dipergunakan pada beberapa teknologi perdagangan dan ilmu pengetahuan yang menarik adalah untuk mengontrol dan memperbaiki sifat dari sistem polimer yang dihasilkan atau sifat permukaan seperti tahan panas (thermosets) , penyalutan (*coating*).

Aplikasi *cross-link* telah dilakukan pada sintesis resin pertukaran ion (*ion exchange resins*) dan hidrogel yang terbuat dari molekul polimer, terdiri dari gugus polar. Terjadinya perubahan sifat dasar polimer yang semula larut air menjadi tidak larut tetapi dapat menyerap air dan bahan menjadi mengembang (*swelling*).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Khusus Penelitian

Ikut serta dalam renstra Penelitian Perguruan Tinggi untuk membuat produk kesehatan, yang berfungsi untuk mencegah kerusakan berlanjut dari lapisan kartilago tulang sendi dan membantu mengatasi nyeri dari osteoarthritis dengan membuat *scaffold* diklofenak dari chitosan dan gelatin yang berfungsi sebagai:

- (1) Pembawa diklofenak dan penggantikartilago yang rusak tulang akibat osteoarthritis.
- (2) Sistem penghantaran obat langsung ke target dari diklofenak dengan pembawa chitosan - gelatin, sehingga pelepasan obat terkontrol secara terus menerus untuk menghindari efek samping sistemik.

3.2. Manfaat Penelitian

Dengan meningkatnya jumlah penderita osteoarthritis sehingga menyebabkan peningkatan kebutuhan biomaterial untuk rehabilitasi kartilago. Targeted terapi berupa *Scaffold* diklofenak saat ini sangat dibutuhkan karena sediaan serupa hingga saat ini masih belum diproduksi di Indonesia. Sediaan tersebut untuk membantu mengembangkan produk lokal sehingga akan meringankan beban pemerintah maka perlu diproduksi *scaffold* dari bahan lokal yaitu chitosan dari kulit udang dan gelatin dari kulit sapi, untuk mengisi defek kartilago akibat osteoarthritis disamping membawa obat diklofenak yang dapat mempercepat penyembuhan kerusakan berlanjut dari lapisan kartilago tulang sendi, menghilangkan nyeri dan inflamasi penderita osteoarthritis, sehingga menurunkan morbiditas dan mortalitas penderita osteoarthritis dan akhirnya dapat menurunkan beban pemerintah dalam Era JKN

BAB IV
METODE PENELITIAN

Tabel IV. TAHAPAN SASARAN DAN METODOLOGI

No	Tahapan	Sasaran	Luaran	Metodologi
1	Tahap I Formulasi sediaan <i>scaffold</i> yang di <i>cross link</i> dengan glutaraldehid dan karakterisasi in vitro	Memperoleh informasi sediaan <i>scaffold</i> yang optimal dan matriks yang berperan pada proses formulasi	Sediaan <i>scaffold</i> yang di <i>cross link</i> dengan glutaraldehid berbentuk membran dengan bahan aktif diklofenak untuk terapi secara lokal dan pengganti kartilago pada osteoarthritis serta. Luaran yang diperoleh berupa produk <i>scaffold</i>	Pembuatan dan evaluasi secara fisik sediaan <i>scaffold</i> meliputi uji organoleptis (SEM), pemekaran (<i>swelling</i>), uji toksisitas, elastisitas, uji stabilitas, FTIR
2	Tahap II Formulasi baru sediaan <i>scaffold</i> yang di <i>cross link</i> dengan glutaraldehid dan karakterisasi in vitro	Memperoleh informasi sediaan <i>scaffold</i> yang optimal dan matriks yang berperan pada proses formulasi	Sediaan <i>scaffold</i> yang di <i>cross link</i> dengan glutaraldehid berbentuk membran dengan bahan aktif diklofenak untuk terapi secara lokal dan pengganti kartilago pada osteoarthritis serta. Luaran yang diperoleh berupa produk <i>scaffold</i>	Pembuatan dan evaluasi secara fisik sediaan <i>scaffold</i> meliputi uji organoleptis (SEM), pemekaran (<i>swelling</i>), uji toksisitas, elastisitas, uji stabilitas, FTIR

2.1 Alat dan Bahan Penelitian

2.1.1 Alat Penelitian Gelatin (150 bloom) diperoleh dari Guadhong Cina; diklofenak (PT Bernoform Indonesia); Chitosan (kulit udang) dari Fakultas Sain Tehnologi Unair. Bahan kimia katagori pro analisis dari Sigma Aldrich: NaCl; NaOH; Asam Asetat; Na₂HPO₄; NaH₂PO₄; HCl, Aqua Bidestilata Steril dari PT Ikapharmindo Putramas

2.2 Proses Penelitian

A. Pembuatan Chitosan

2.1.2 Kulit udang dicuci bersih, dikeringkan dalam freezer, setelah kering ditumbuk halus. Kulit yang sudah kering ditimbang 10 g dan dimasukkan ke dalam beker glass 250 ml yang berisi NaOH 4% dididihkan selama 1 jam. Selanjutnya didinginkan pada suhu ruang selama 30 menit dan hasilnya diblender. Kulit udang yang sudah bebas protein, ditimbang 25 gram didemineralisasi dengan 100 ml HCl 1,0% dibiarkan selama 24 jam. Selanjutnya dicuci dan direndam dalam NaOH 2% selama 1 jam, kemudian dicuci dengan aquadem, dikeringkan hasilnya disebut chitin. Untuk

membuat chitin menjadi chitosan dilakukan deasetilisasi dengan cara memasukkan chitin ke dalam 100 ml NaOH 5

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain timbangan digital, gelas *beaker*, pipet, gelas ukur, pencetak pelet, *Magnetic stirrer*, pHmeter, *stopwatch*, *Viscotester VT-04F RION CO. LTD* (Laboratorium Fisika Material Universitas Airlangga), Spektrofotometer *Fourier transform Infrared* (FTIR) (Laboratorium Material dan Metalurgi Institut Sepuluh Nopember), seperangkat alat uji resuspensi (Laboratorium Fisika Material Universitas Airlangga), seperangkat alat uji sitotoksitas (*MTT assay*) (Pusat Veterinaria Farma) dan *Scanning Electron Microscope*(SEM) (Laboratorium Sentral FMIPA Universitas Negeri Malang). Freser homogenizer, peralatan disolusi, ELISA, spektrofotometer Uv-Vis, Autografit (Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya)

2.1.3 Bahan Penelitian

0% dan dipanaskan selama 2 jam 100°C. Selanjutnya dikeringkan pada suhu 120°C selama 24 jam hasilnya disebut chitosan (Felicity *et al.*,2007).

B. Pembuatan Scaffold

Pembuatan scaffold chitosan: Chitosan ditimbang 1 gram dilarutkan dalam asam asetat 1% sampai 10 ml, diaduk sampai larut, tuang ke dalam cetakan plastik dan selanjutnya dikeringkan dengan freeze drying selama 24 jam.

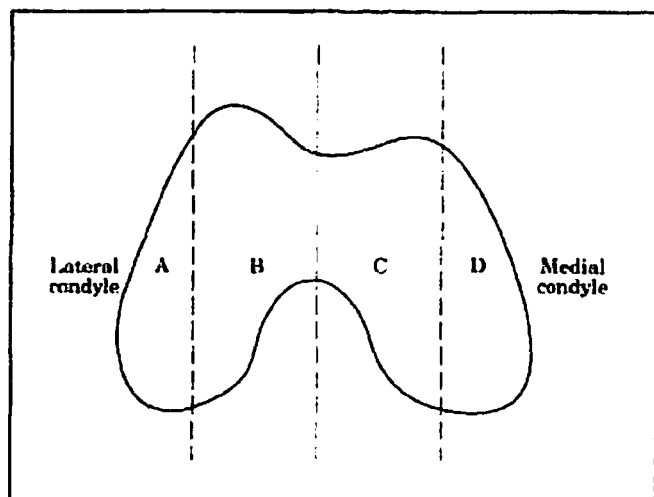
Pembuatan scaffold gelatin: Gelatin ditimbang 1 gram dilarutkan dalam air hangat sampai 10 ml, diaduk sampai larut, tuang ke dalam cetakan plastik dan selanjutnya dikeringkan dengan freeze drying selama 24 jam

Pembuatan scaffold komposit Chitosan-Gelatin: Chitosan 10 % dan Gelatin 10% dibuat secara terpisah. Untuk memperoleh komposisi maksimal dibuat chitosan 10% tetap dan Gelatin dibuat 20%; 30% dan 40%. Pembuatan sesuai seperti *scaffold* chitosan atau *scaffold* gelatin. Agar obat dilepas secara bertahap dalam waktu lama dan degradable dapat dikontrol maka dilakukan *cross-linking* dengan *cross-link agent* Glutaraldehyd (0,5%) (Aniek, 2014), tambahkan etilen glikol (0,2%) agar *scaffold* bersifat lentur.

Pembuatan scaffold chitosan-gelatin-diklofenak: Komposisi formula *scaffold* komposit yang optimal dipilih melalui evaluasi sifat fisiko-kimia. Selanjutnya komposisi terpilih ditambah beberapa konsentrasi diklofenak ke dalamnya yaitu 1; 2; 3; dan 4%

berat/volume. Sesudah homogen dicetak dalam nampan plastik, dikeringkan pada suhu kamar 24 jam.

Model Scaffold pengganti kartilago lutut dengan formula gelatin-chitosan dan analgesik diklofenak yang akan dihasilkan



Gambar 3.2. Bentuk lapisan kartilago tulang sendi lutut (Yoshioka *et al.*, 1996)

C. Karakterisasi sampel

Uji *Fourier Transform Infra Red (FTIR)*: Pengujian ini dilakukan untuk masing-masing komponenyaitu chitosan, gelatin,diklofenak dan glutaraldehid campuran dari komponen tersebut. Uji FTIR untuk mengetahui adanya ikatan baru yang terbentuk pada sampel komposit chitosan-gelatin-glutaraldehid dengan penambahan diklofenak. Sampel tersebut akan diambil dalam jumlah sedikit, ditambah bubuk KBr terlebih dahulu dan dikompaksi. Sampel yang telah kompaksi kemudian diletakkan dalam *holder* alat spektrofotometer FTIR dan akan disinari oleh *infrared*. Hasilnya berupa grafik daerah serapan bilangan gelombang terhadap intensitas dari sampel dan siap dianalisis.

Pemeriksaan SEM: Untuk melihat morfologi permukaan suatu bahan yang dalam hal ini adalah sampel chitosan-gelatin-glutaraldehid dengan penambahan diklofenak selama satu jam dan dikeringkan selama semalam. Analisis yang dapat dilakukan dari hasil uji Scanning Electron Microscopes (SEM) yaitu untuk diketahui ukuran pori yang terbentuk sebelum dan setelah adanya proses perendaman. Selain itu, akan terlihat bagian dari sampel chitosan -gelatin yang tertutup oleh komposit tersebut. Sampel yang telah kering dilapisi terlebih dahulu dan diletakkan dalam stake holder yang telah dilapisi carbon tip. Uji

morfologi ini dapat diketahui porositas chitosan, perubahan permukaan antara chitosan-Gelatin; chitosan-Gelatin-diklofenak; chitosan-Gelatin-diklofenak yang ter *cross-link* dengan Glutaraldehyd maupun tidak.

Uji pemekaran dan degradasi invitro komposit (Lei *et al*, 2009). Dilakukan uji pemekaran (*swelling*) dengan metode gravimetri sebagai berikut pelet direndam dalam 20 ml PBS (pH 7,4) pada suhu 37⁰C. Sampel dipindah dalam beberapa titik waktu dan keringkan dengan kertas saring untuk membersihkan sisa cairan, segera ditimbang (W_1). Sampel dicuci dengan air dan dikeringkan pada suhu konstan 40⁰C secara vakum (W_2). Selisih berat antara berat mula-mula (W_0) dan setelah direndam (W_1) dinyatakan dalam % air yang meresap dalam sampel melalui persamaan 1 dan persen berat yang hilang dinyatakan dalam persamaan 2.

$$\text{Air yang meresap (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100 \dots\dots\dots(\text{Persamaan 1})$$

$$\text{Berat yang hilang (\%)} = \frac{W_0 - W_2}{W_0} \times 100 \dots\dots\dots(\text{Persamaan 2})$$

Uji Sitotoksisitas (*MTT assay*): Uji sitotoksisitas yang dilakukan menggunakan pereaksi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT). Uji sitotoksisitas ini dilakukan dengan tiga tahap mulai dari pembiakan atau kultur sel *fibroblastBHK-21*, peletakan sampel dan pembacaan hasil. Penjelasan setiap tahapan tersebut adalah sebagai berikut:

a. **Pembiakan atau Kultur Sel *FibroblastBHK-21***

Proses pembiakan dilakukan di bawah *laminar air flow* untuk menjaga keadaannya tetap steril. Sel *fibroblastBHK-21* yang sudah ada dalam botol kulturroux dalam media *Eagle's* dicuci terlebih dahulu dengan membuang media *Eagle's* tersebut. Sel tersebut menempel pada dinding botol kultur dan dicuci dengan menggunakan PBS⁻ sebanyak lima kali dengan tujuan menghilangkan media yang tersisa. Setelah itu, ditambahkan *Versene Tripsin*(VT)dengan tujuan untuk memisahkan sel-sel yang menggerombol. Ketika dilihat di bawah mikroskop akan terlihat perbedaan sel *fibroblast* awal sebelum dan sesudah diberi VT. Sebelum diberi VT sel-sel tersebut berbentuk seperti lonjoran-lonjoran dan menggerombol, namun setelah diberi VT maka sel tersebut akan terpisah-pisah dan berbentuk lingkaran-lingkaran ketika dilihat di bawah mikroskop.

Sel tersebut diberi media *Eagle's* lagi dan dipindahkan ke dalam *96-microwell plate* sesuai dengan jumlah sampel yang dibutuhkan sebanyak 100 μ l untuk setiap sumur atau *well*. Setelah itu, *96-microwell plate* tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C untuk pembiakannya.

b. Peletakan Sampel

Sampel suspensi yang akan diuji sitotoksisitas diencerkan terlebih dahulu dengan menggunakan aquabides untuk menghindari kematian sel akibat terlalu asam. Pengenceran dilakukan sebanyak dua dan empat kali dengan cara mengambil 1 ml sampel suspensi komposit Chitosan-gelatin dengan penambahan Na diklofenak yang dilarutkan dengan aquabidest sampai 10 ml dan dikocok sampai merata dan diambil 1 ml. Hal ini dilakukan sebanyak jumlah pengenceran untuk setiap sampel. *96-microwell plate* yang telah diinkubasi disiapkan untuk peletakan sampel. Setiap sampel diambil 1 μ l untuk setiap sumur dan dilakukan perulangan sesuai dengan jumlah sampel. Setelah semua *well* terisi dengan sampel yang diinginkan, *96-microwell plate* tersebut diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C untuk melihat reaksi sel *fibroblast BHK-21* terhadap sampel yang telah diletakkan.

c. Pembacaan Hasil

Proses inkubasi *96-microwell plate* pada sel *fibroblastBHK-21* yang terpapar sampel selesai dan siap untuk dilihat jumlah sel yang masih hidup. Proses pencucian dilakukan terlebih dahulu dengan membuang isi *96-microwell plate* dan dicuci dengan menggunakan PBS⁻. Untuk bisa menentukan jumlah sel yang hidup digunakan pereaksi MTT 5 mg/ml sebanyak 10 μ l untuk setiap sumur dan diinkubasi selama 2-4 jam pada suhu 37°C untuk mereaksikan MTT dengan sel yang masih hidup. Setelah itu, ditambahkan Dimetil Sulfoksida (DMSO) untuk menghentikan reaksi MTT dengan sel yang masih hidup sebanyak 10 μ l untuk setiap sumur. *96-microwell plate* yang telah ditambahi DMSO kemudian digetarkan dengan menggunakan *shaker* selama 5 menit untuk meratakan DMSO, dan siap dibaca dengan menggunakan *ELISA reader*.

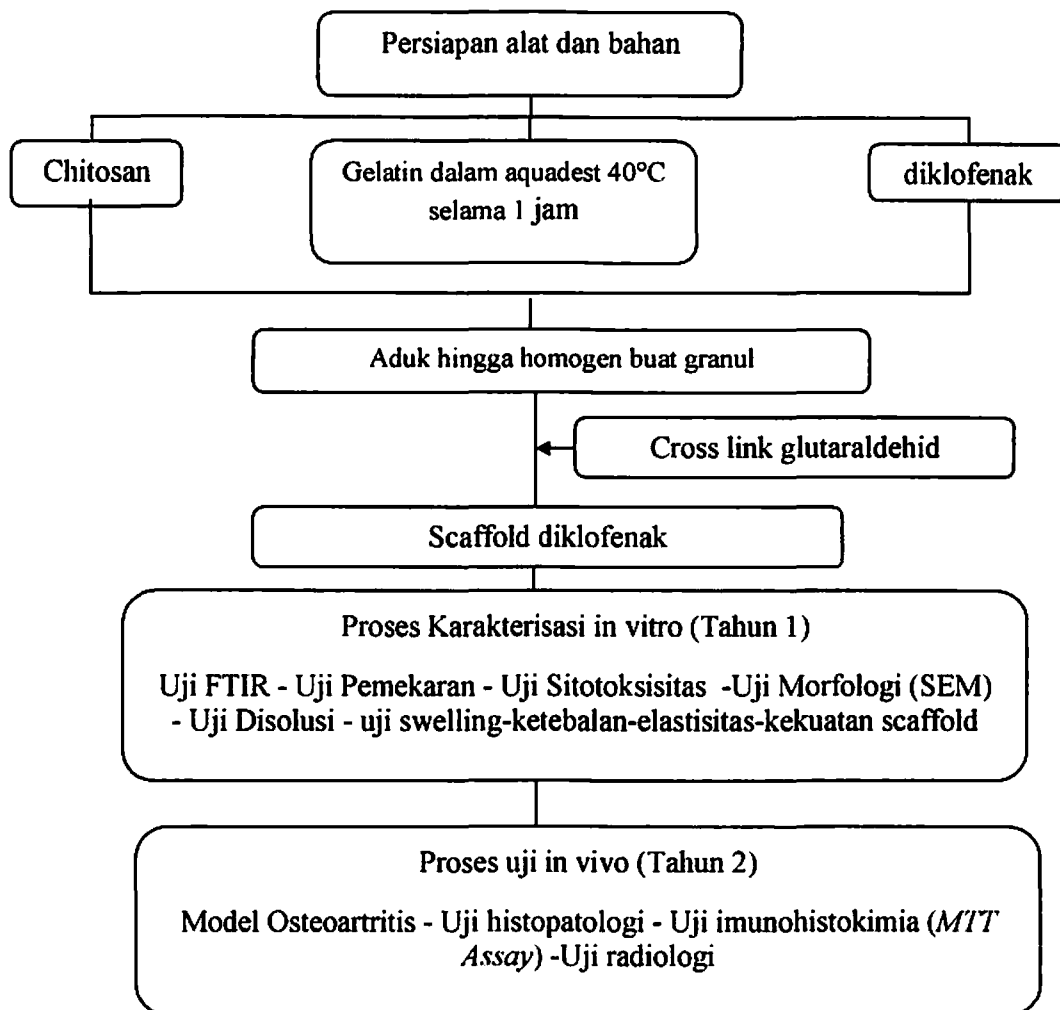
Uji ketebalan: ketebalan dari *scaffold* mempengaruhi kekuatan untuk menyerap cairan dan jumlah obat yang terlepas. Ketebalan diukur menggunakan jangka sorong.

Elatisitas Scaffold: *Scaffold* di bentuk lebar 2 cm panjang 6 cm, dijepit bagian ujungnya dengan alat autograft, ditarik sampai *scaffold* mencapai maksimum memanjang dan bisa memendek kembali ke semula.

Aktivitas antibakteri: *Scaffold* dibuat lingkaran dengan diameter 1 cm, diletakkan pada gelas petri yang berisi agar dan bakteri Gram negatif atau Gram positif. Diinkubasi selama 24 jam, selanjutnya diukur zona hambatnya yang menunjukkan kekuatan daya hambatnya.

Tensile strength: mengukur kekuatan film, untuk menahan tekanan hingga robek. Menggunakan autografit, bagian ujung *scaffold* dijepit sampai sobek.

Uji disolusi: Untuk mengetahui pelepasan diklofenak yang terjebak dalam *scaffold*. *Scaffold* dimasukkan dalam 5 ml air dalam gelas beker 50 ml. Diambil 0,5 ml tiap 10 menit dan volume yang diambil diganti lagi sehingga volume tetap sampai waktu 180 menit. Hasil sampling diamati secara spektrofotometri.



Gambar 3.2 Diagram Alir Penelitian Tahun Pertama dan Kedua

Homogenitas: untuk melihat keseragaman konsentrasi diklofenak dalam *scaffold* di beberapa bagian *scaffold*, secara spektrofotometri .

Secara keseluruhan kerangka kerja selama 2 tahun terlihat seperti Gambar 3.2 di bawah ini, tahun pertama untuk formulasi dan evaluasi sifat fisiko-kimia formula secara in vitro, sedang tahun ke 2 evaluasi *scaffold* secara in vivo.

BAB V HASIL PENELITIAN

1. Pembuatan Chitosan dari kulit udang (diperoleh dari pabrik Udang ,PT Surya Alam Tunggal, Sidoarjo). Diperoleh hasil chitosan rendemen 95%. (Gambar 5.1) karakterisasi menggunakan FTIR terlihat pada Gambar 5.4
2. Scaffold dibuat dengan berbagai perbandingan dari Gelatin dan Chitosan, dibuat dari 5 ml larutan dituangkan ke dalam tabung dengan berdiameter 3,5 cm, menghasilkan preparat dengan tebal awal 1,0 cm. Hasil dari freeze drying (Gambar 5.2), direndam dalam NaOH untuk netralisasi asam asetat (Gambar 5.3C), di *cross-link* dengan Glutaraldehid 0,5% (Gambar 5.3F) dan dikeringkan lagi tersaji seperti Tabel 1.



Gambar 5.1. Pembuatan Chitosan dari kulit udang, dalam lemari pemana Rak atas dan tengah kulit udang dikeringkan setelah direbus,Rak bawah Chitin, dari serbuk kulit udang setelah diproteinasi (NaOH 4%) didemineralisasi dengan HCl 0,1N, direndam dalam NaOH 2%



Gambar 5.2. Proses pembuatan scaffold gelatin – chitosan, diaduk dengan pengaduk magnetik pada suhu 40 – 50⁰C, selama 2 jam



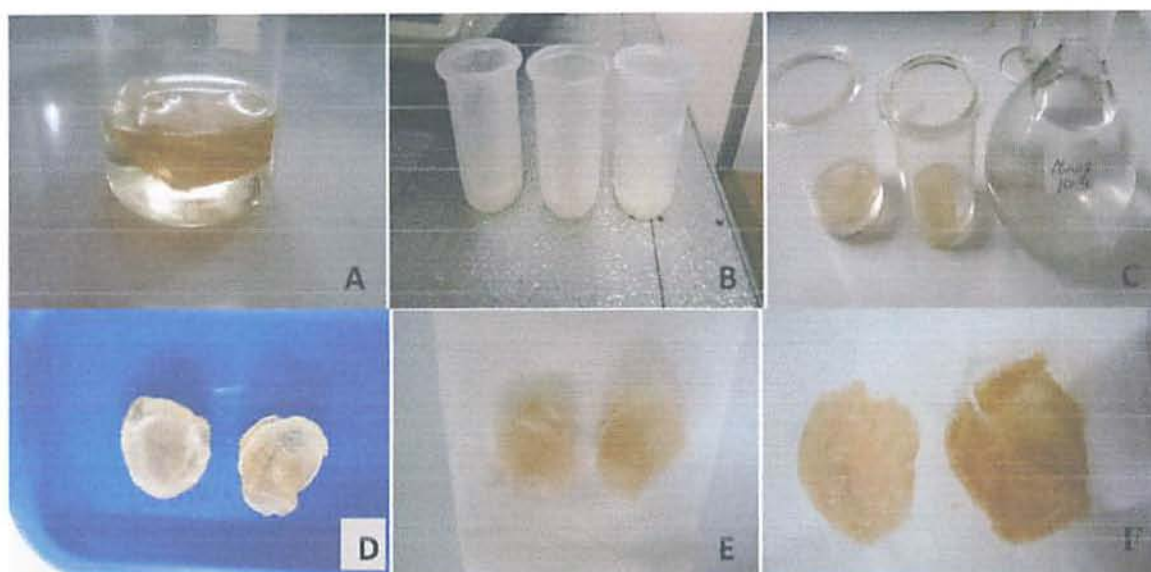
Gambar 5.3. Campuran Gelatin- Chitosan cair dicetak dengan gelas petri, masuk freezer sampai beku, terus di freeze dryer



Gambar 5.4. Proses pengeringan scaffold menggunakan freeze dryer

Tabel V.1. Tebal SCAFFOLD dari Gelatin, Gelatin-Chitosan (GEL:CH)

Nama	Tebal (mm)				
	Awal	Freeze drying (kering)	Direndam NaOH 10 % (1 jam)	Cross-link Glu 0,5 %	Kering
Gelatin	10	0,4	0,6		
Gel : CH					
0,8 : 1,2	10	0,4	0,6	0,6	0,5
1,5 : 3,0	10	1,15	1,25	1,24	1,16
		1,05	1,20	1,20	1,06
		1,10	1,30	1,28	1,08



Gambar 5.5. Proses Pembuatan *Scaffold*: A. Larutan Gelatin-Chitosan (GEL-CH); B. Larutan setelah di freezer; C. Hasil freeze drying dinetralkan dengan NaOH; D. *Scaffold* setelah freeze drying. E. Setelah dinetralkan dengan NaOH; F. *Scaffold* setelah di *cross-linking* dengan glutaraldehid 0,5% . Hasil jelek, dibuat formula baru seperti table V.2

Hasil orientasi Tahap II dari beberapa formula baru dengan penambahan polietilen glikol (PEG) sebagai pelentur scaffold (Tabel V.2)

Tabel V.2. Formulasi baru dari Scaffold dengan penambaha PEG

Bahan	Fungsi	Konsentrasi dalam sediaan					
		I	II	III	IV	V	Blanko
Chitosan	Basis	4%	4%	4%	4%	4%	4%
Gelatin	Basis	4%	4%	4%	4%	4%	4%
PEG-400	Plastisizer	-	0,50%	1%	3%	5%	-
Na-Diklofenak	Bahan aktif	1%	1%	1%	1%	1%	-
NaOH	Penetral	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Asam asetat	Pelarut chitosan	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Glutaraldehid	Crosslink agent	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%	0,25%
Aquadem	Pelarut	qs	qs	qs	qs	qs	qs



Gambar 5.6. Hasil Tiga Macam Formula dengan berbagai tahapan proses pencampuran yang berbeda, untuk mengatasi suasana asam dari asam asetat (pelarut chitosan), yang menyebabkan bahan aktif (natrium diklofenak) mengendap (menjadi Kristal)

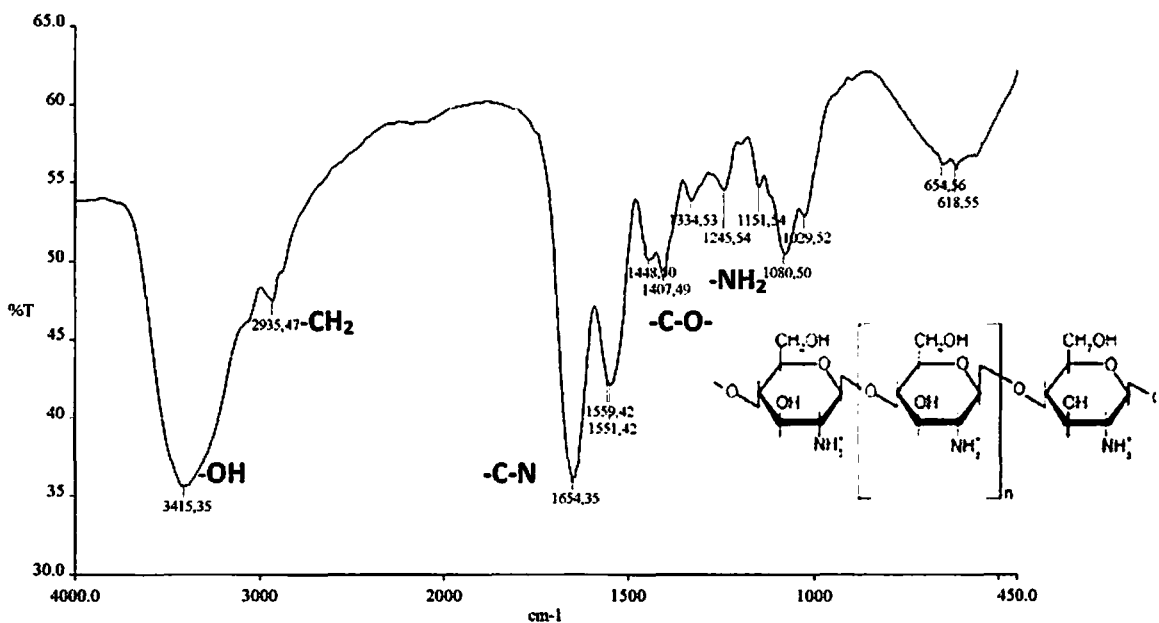
Proses penambahan/ pencampuran bahan mempengaruhi hasil yang diperoleh, ditemukan beberapa kendala dalam penambahan natrium diklofenak yaitu terjadi kristal diklofenak saat ditambahkan ke dalam campuran gelatin chitosan dalam suasana asam. Suasana asam tersebut berasal dari asam asetat 1% sebagai pelarut chitosan. Natrium hidroksida dapat digunakan untuk menetralkan asam asetat setelah pencampuran chitosan dan gelatin, namun perlakuan ini akan berakibat pemakaian freeze dryer berulang kali, yaitu saat penerangan scaffold setelah pencucian. Selanjutnya setelah perendaman dengan diklofenak, di *cross-link* dengan glutaraldehid. Penambahan polietilen glikol dalam formula dapat mengatasi masalah kelarutan diklofenak karena suasana menjadi tidak terlalu asam, diklofenak dilarutkan dalam PEG baru dicampurkan dalam campuran Chitosan -Gelatin

3. Pengamatan dengan FTIR

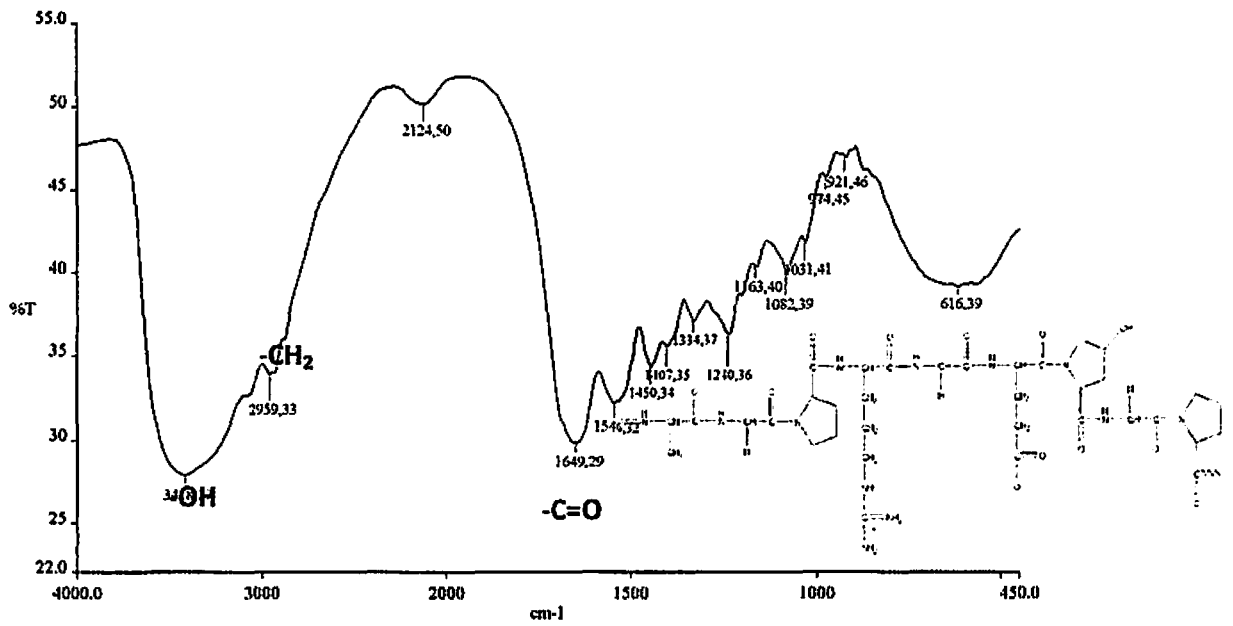
Hasil karakteristik bahan bahan dari scaffold Gelatin – Chitosan, polietilen glikol dan diklofenak terlihat seperti Gambar 5.7 sampai Gambar 5.10. Dan bilangan gelombang berbagai gugus fungsi dirangkum dalam Tabel V.3.

Tabel V.3. Besaran bilangan gelombang dari berbagai gugus fungsi

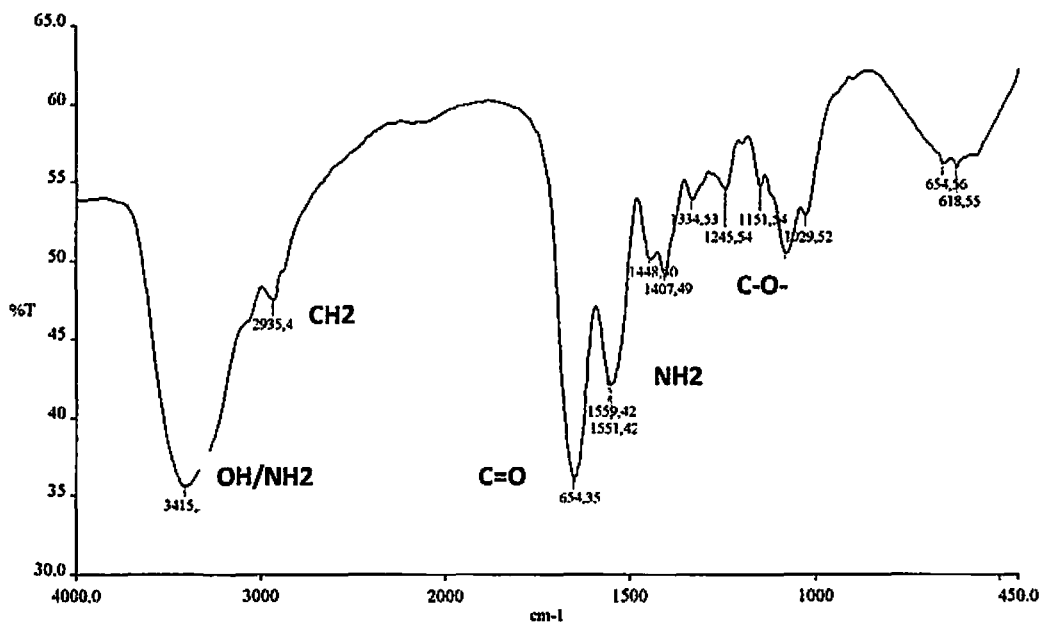
Nama	GUGUS (Cm)				
	-OH	-CH- -CH ₂ -	-NH ₂	-CH ₂ -HC- O-	O-C=O C=N; HO-C=N
Chitosan (CH)	3450-3100	2990-2850	1220-1020, C2 glukosamin	1424- 1384	1649 (Asetilasi gugus amino)
Gelatin (GEL)	3418	2959	1240	1450- 1334	1649 dan 1546 amida
Polietilen glikol (PEG)	3450	2990-2850		1600 1467	
Na Diklofenak	3585 (bentuk asam)	2970 dan gugus aromatis 3080- 3037	1305-1283 3387-3257	1470- 1454	1574-1507



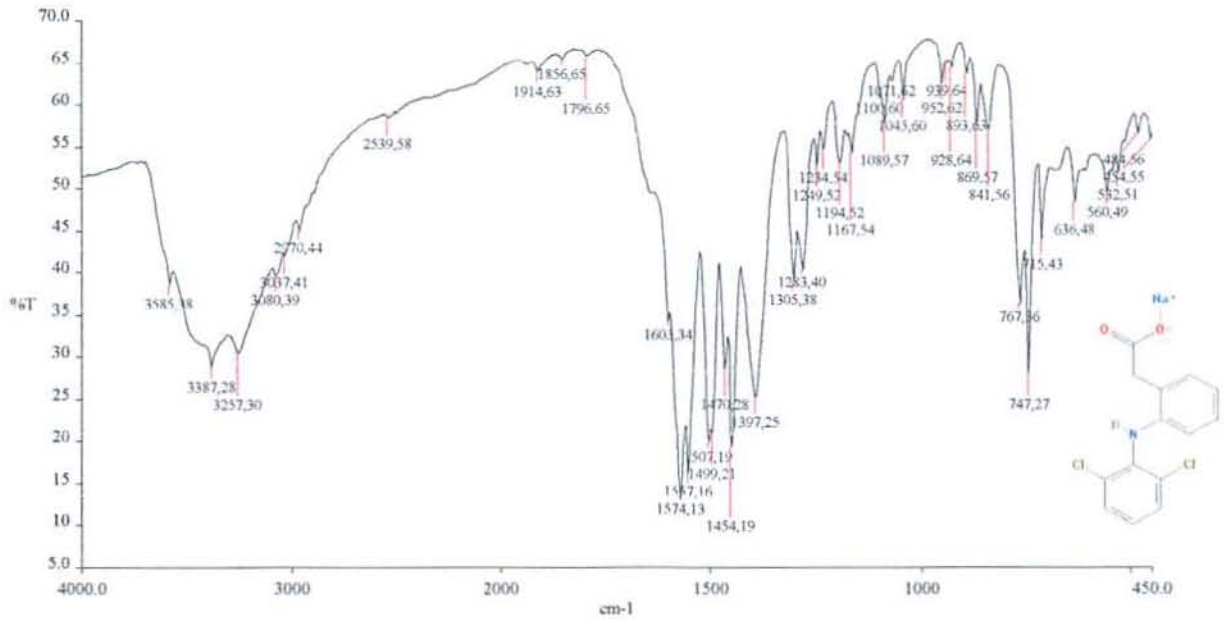
Gambar 5.7. Hasil spektra FTIR dari Chitosan



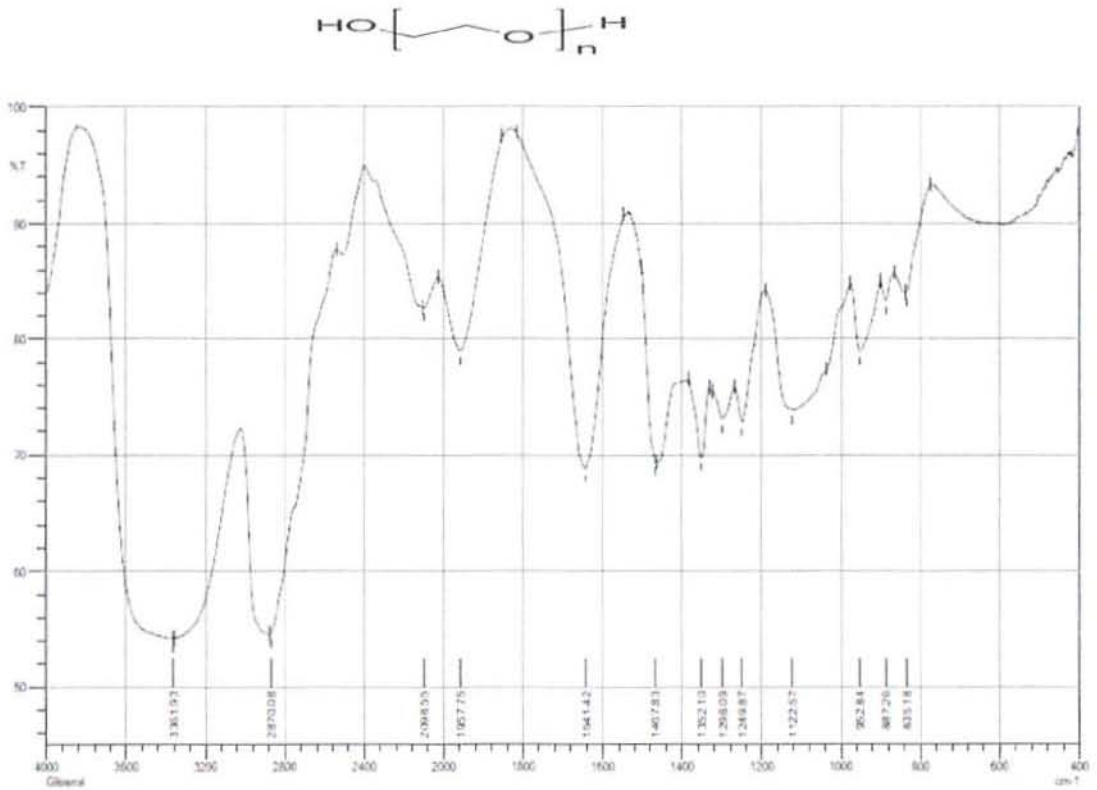
Gambar 5.8. Hasil FTIT dari Gelatin



Gambar 5.9. Campuran Gelatin dan Chitosan



Gambar 5.10. Hasil FTIR dari Na Diklofenak

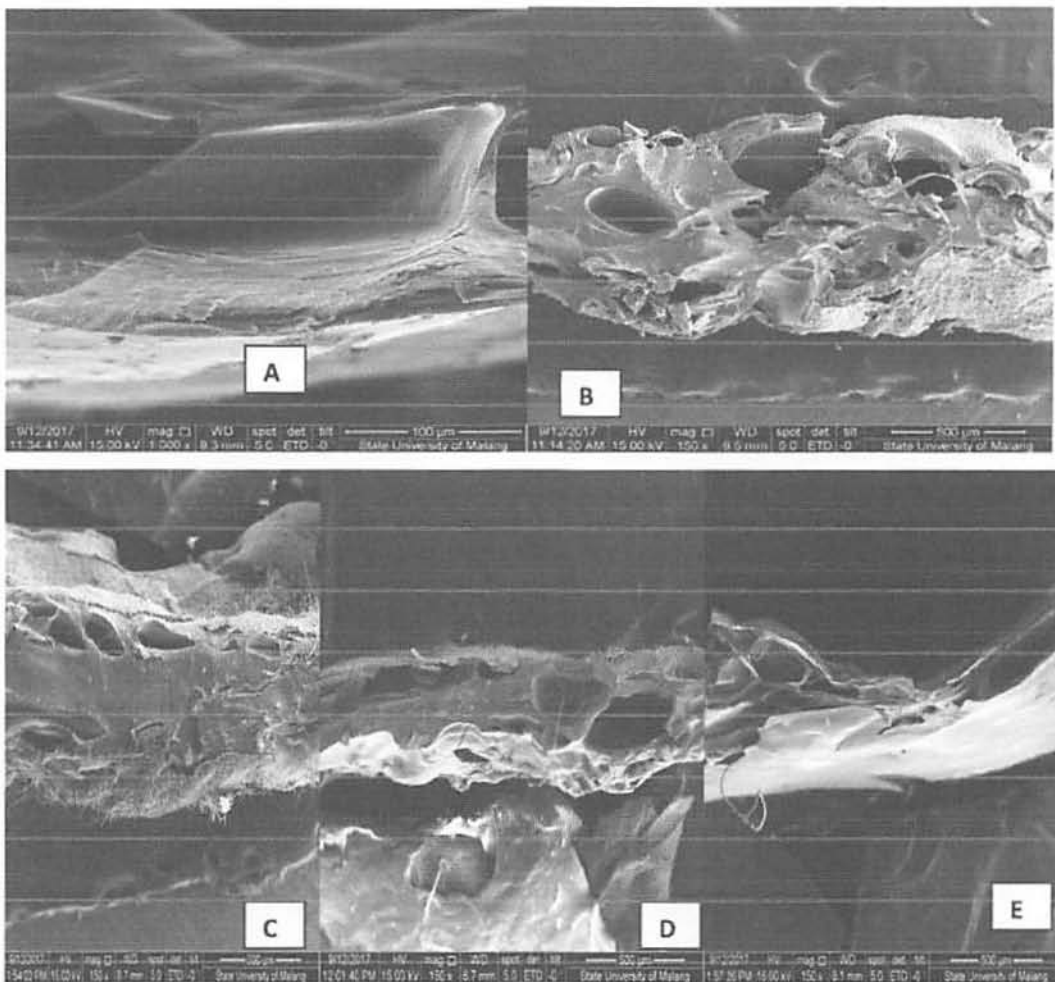


Gambar 5.12. Spektra FTIR Polietilen glikol: gugus -OH (3600) -CH₂ (2870.08) -C-O-(1600, 1467.83)

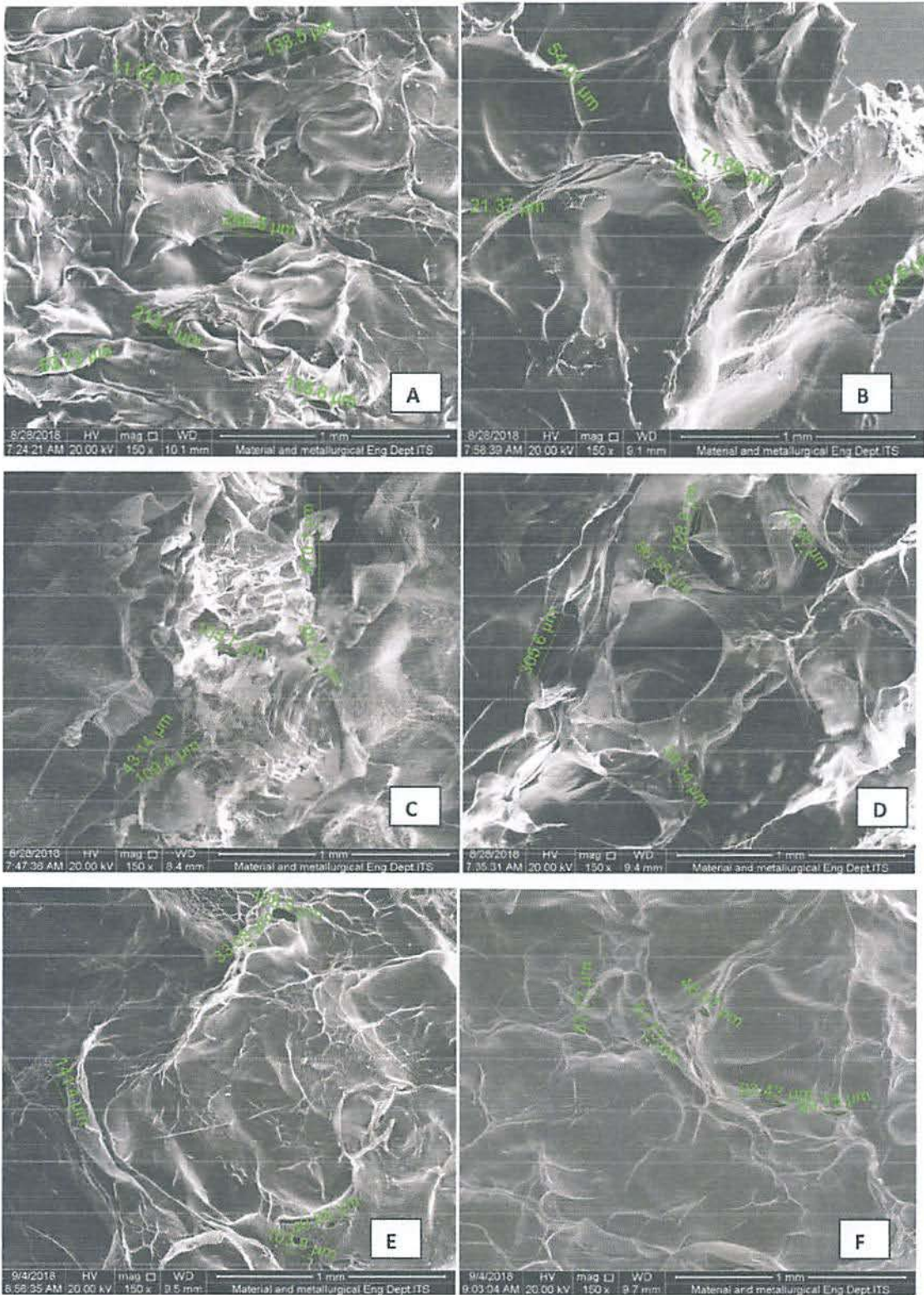
Karakterisasi dengan SEM

Struktur permukaan dari berbagai perbandingan dari gelatin dan chitosan diamati dengan menggunakan SEM (Scanning Electron Microscopy). Gambar 5.13 merupakan hasil SEM untuk formula awal tanpa PEG, hasil kaku dan keras serta freeze dryer bekerja tidak optimal, hasil tidak sesuai dengan keinginan.

Selanjutnya dibuat formula baru dengan menambahkan polietilen glikol sebagai pelumas dan menambah suasana basa sehingga meningkatkan kelarutan natrium diklofenak dalam formula yang mengandung asam asetat. Scaffold lebih lentur, porus, tidak kaku dan porositas lebih besar seperti terlihat pada Gambar 5.14



Gambar 5.13. Hasil SEM dari : A. Gelatin 1,2%; B. Gelatin:Chitosan; 2:1 cross-link; C. Gelatin:Chitosan =2:1; D. Gelatin 1,2% Chross-link; E. Chitosan 2%. Formula lama diperiksa di UNM Malang



Gambar 5.14. Hasil SEM dari : A. Chitosan-Gelatin; B. Formula 1; C. Formula 2; D. Formula 3; E. Formula 4 dan F. Formula 5 (Perbesaran 150 X). Dilakukan di Dep. Material dan Metalurgi Fak Tehnik Industri ITS



BAB VI

RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

RENCANA MELANJUTKAN UJI KARAKTERISASI FORMULA BARU

Karakteristik *scaffold* dengan: elastisitas; disolusi, MTT dan Stem Cell

BAB VII

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. FTIR: gelatin dan chitosan memiliki gugus fungsi yang mirip yaitu: OH; CH; -C-O- ; -C=O dan NH₂. Polietilen glikol gugus -OH dan -CH₂ serta -C-O-
2. Semakin meningkat konsentrasi dari Gelatin dan Chitosan mempengaruhi ketebalan dari membran yang terbentuk dan elastisitas serta kelenturan *scaffold*(organoleptis)
3. Konsentrasi glutaraldehyd mempengaruhi: ukuran porositas (SEM); kecepatan terdegradasi, kepadatan scaffold
4. Penambahan polietilen glikol mempermudah bercampurnya (meningkatkan kelarutan) natrium diklofenak ke dalam formula

DAFTAR PUSTAKA

- Aniek Setiya Budiati, 2014. Pengaruh Glutaraldehid Sebagai Cross-link Agent Gentamisin dengan Gelatin Terhadap Peningkatan Efektivitas Bovine Hydroxyapatite-Gelatin Sebagai Sistem Penghantaran Obat Dan Pengisi Tulang, *Desertasi*. Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Anonim, 2008, *Bone Healing*. American College of Foot and Ankle Surgeons. www.footphysicians.com, 6 Agustus 2014.
- Askarzadeh, K., Orang, F., and Moztarzadeh, F., 2004, *Fabrication and Characterization of a Porous Composite Scaffold Based on Gelatin and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering*, Iranian Polymer Journal 14 (6), Tehran, Iran: 511-520.
- Azami, M., Tavakol, S., Samadikuchaksaraei, A., Hashjin, M. S., Baheiraei, N., Kamali, M., dan Nourani, M. R., 2012, *A Porous Hydroxyapatite/Gelatin Nanocomposite Scaffold for Bone Tissue Repair: In Vitro and In Vivo Evaluation*, Journal of Biomaterials Science, Tehran, Iran: 1-16.
- GinalskaG, Kowalczyk D, Osinska M, 2005. A Chemical method of gentamicin bonding to gelatine-sealed prosthetic vascular grafts, *International Journal of Pharmaceutics* 288: 131-140
- Hajrawati, 2006, Sifat Fisik dan Kimia Gelatin Tulang Sapi dengan Perendaman Asam Klorida pada Konsentrasi dan Lama Perendaman yang Berbeda, *Tesis*, Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kim, H. W., Knowles, J. C. and Kim, H. E., 2004, *Hydroxyapatite and Gelatin Composite Foam Process via Novel Freeze-Drying and Cross-linking for Use as Temporary Hard Tissue Scaffolds*, Wiley Interscience, Seoul, South Korea: 136-145.
- Lei L, Li L, Zang L. 2009. Structure and Performance of Nano-Hydroxyapatite Filled Biodegradable Poly(1,2-Propanediol-Sebacate)-citrate) Elastomer, *Polymer Degradation and Stability* 94:1494-1502.
- Meseguer- Olmo L., Nicolas-Ros MJ., Sainz-Clavel M. 2006. 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.
- Park, J., 2008, *Bioceramics: Properties, Characterization and Applications*, Springer Business and Media, Iowa, USA.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J. and Lemons, J. E., 2004, *Biomaterial Science: An Introduction to Materials in Medicine, Second Edition*, Elsevier Academic Press, San Diego, USA.
- Suryati. 2006. Organ Tubuh Manusia. Yogyakarta: CV. Empat Pilar Pendidikan.
- Warastuti, Y. dan Abbas, B., 2011, Sintesis dan Karakterisasi Pasta *Injectable Bone Substitute* Iradiasi Berbasis Hidroksiapatit, *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*, Jakarta: 73-93.



LAMPIRAN

Lampiran1

Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Tahun ke-1						Tahun ke-2						
		1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	1-2	3-4	5-6	7-8	9-10	11-12	
1	Praformulasi	X												
2	Formulasi Matriks		X											
3	Uji FTIR			X										
4	Pengamatan homogenitas : SEM			X										
5	Uji disolusi			X										
6	Konsentrasi ALE setelah disolusi				X									
7	Uji Toksisitas (MTT)				X									
8	Uji Stabilitas		X	X	X	X								
9	Publikasi jurnal						X							
10	Model osteoporosis kelinci							X						
11	Pemasangan implant tulang								X					
12	Penentuan konsentrasi ALE									X				
13	Uji Radiologi tulang										X			
14	Uji Histopatologi										X			
15	imunohistokimia											X		
16	Publikasi jurnal													X

Lampiran 2.**SUSUNAN ORGANISASI TIM PENELITI DAN PEMBAGIAN TUGAS**

No	Nama / NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu (jam/minggu)	Uraian Tugas
1	Aniek Setiya Budiatin 0012125911	FFUA	Biofarmasetika	10	Proposal; merancang formula, analisis hasil
2	Dr. Suharjono, MS., Apt (0022125202)	Universitas Airlangga	Farmakoterapi	6	Uji in vivo, pencarian jurnal
3	Samirah, S.Si., Apt., SpFRS. (0020048001)	Universitas Airlangga	Farmasi klinik	6	Pengelola keuangan dan perijinan dan analisa hasil penelitian.
4	Wenny Putri Nilamsari, S Farm, SpFRS, Apt. (0026018401)	Universitas Airlangga	Farmasi klinik	6	Membuat formula , uji invitro.

JNE
DIRECT

JNE SURABAYA
JL RAYA JUANDA KM2-3 SEMAMBUNG
031-95209000 * 5686905

www.jne.co.id

e-CONSIGNMENT NOTE (e-connote)

28-SEP-2017 10:40

Layanan : YES15 No.e-connote
Jenis Kiriman : Document

Keterangan : Jml Berat Asli L H W Berat Volume
DOC : 1 1 X X 0

Halaman 1 dari 6
LEMBAR UNTUK PENGIRIM

030380085306717
Stempel : Tidak Asuransi, Tidak Packing Kayu

Kota Asal : SUB10000 Kota Tujuan : JAKARTA
No. Pelanggan : 10601900 Pembayaran : Cash
Pengirim : ANIEK SETIYA BUDIATIN SB

SURABAYA
INDONESIA
Attn :
Kode Pos :
Telepon : +62815497732
JLC #



Penerima :
KASUBDIT VALUASIA& FASILITAS
KEKAYAAN INTELEKTUAL DIREKTORA
KEKAYAAN INTELEKTUAL DITJEN RI SSANG, JL MH THAMRIN NO 8 GD II
JAKARTA

Jumlah	1	Berat	1	
Biaya Kirim	IDR			26,000,00
Biaya Lain Lain	IDR			0,00
Asuransi	IDR			0,00
Adm. Asuransi	IDR			0,00
Total Biaya	IDR			26,000,00

Attn : BP ENDANG TARYONO
Instruksi Khusus : ALAMAT JELAS ADA DI PAKET
Catatan :
Nilai Barang : 0,00
Keterangan Barang : DOC
Kode Pos :
Telepon : +6251

Petugas Ttd. Pengirim

(LASETYA)
(COUNTER DHARMAWANGSA)
28-SEP-2017 10:40

KIRIMAN MAKSIMAL DIANTAR TGL 29/09/17

Dengan menandatangani e-connote ini pengirim telah membaca, memahami dan sepakat untuk te-ikat dengan Syarat Standar Pengiriman (SSP) PT. TIKI Jaiur Nugraha Ekakurir yang tercantum dalam halaman 2 (dua) yang merupakan satu kesatuan tidak terpisahkan dari e-connote ini.

Dokumen ini di cetak secara otomatis dengan "JNE online system"
Untuk pengecekan status kiriman silahkan mengunjungi www.jne.co.id
Hal. 0004 PT. TIKI, JNE

36



KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA
REPUBLIK INDONESIA
DIREKTORAT JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL
Jl. H.R. Rasuna Said Kav. B-9, Kuningan, Jakarta Selatan, 12940
Telepon: (021) 57905611 Faksimil: (021) 57905611
Laman: <http://www.dgpp.go.id> Surel: dotpatent@dgpp.go.id

Nomor : HKI.3-HI.05.01.01.P00201709134 Jakarta, 21 Desember 2017
Lampiran : 1 (satu) berkas
Hal : Pembentahan Kekurangan Persyaratan
Formalitas Permohonan Paten

Yth. UNIVERSITAS AIRLANGGA
LPBI, Gedung Kahunpan Lt.2
Kampus C UNAIR, Mulyorejo
Kota Surabaya

Dengan ini diberitahukan bahwa Permohonan Paten

Tanggal Pengajuan : 15 Desember 2017
(21) Nomor Permohonan : P00201709134
(71) Pemohon : UNIVERSITAS AIRLANGGA
(54) Judul Invensi : PROSES DAN PRODUK INJEKTABEL BOVINE
HYDROXYAPATITE-GELXTM SEBAGAI SISTEM
PENGHANTARAN ALENDRONAT PADA CELAH (DEFECT)
TULANG
(30) Data Prioritas :
(74) Konsultan HKI :
(22) Tanggal Penerimaan : 15 Desember 2017

masih terdapat beberapa kekurangan sehingga Saudara harus memperbaiki kekurangan seperti yang tersebut dalam lampiran I dalam waktu yang telah ditentukan.



03-2017-125982

a.n. Direktur Paten, Desain Tata Letak
Sirkuit Terpadu dan Rahasia Dagang
Kasubdit Permohonan dan Publikasi,

Ir. Arif Syamsudin, S.H., M.Si
NIP. 196303021987111001

Tembusan:
Direktur Jenderal Kekayaan Intelektual

10/15/2018

Gmail - M18_706_Alfian_Pramudita_Putra / Accept letter



Alfian Pramudita <pramuditaalfian@gmail.com>

M18_706_Alfian_Pramudita_Putra / Accept letter

2 messages

izzet yavuz <izzetyavuz@hotmail.com>

Mon, Oct 8, 2018 at 12:14 AM

To: "pramuditaalfian@gmail.com" <pramuditaalfian@gmail.com>

Subject: Your article has been accepted for Publication. (Alfian Pramudita Putra, Dyah Hikmawati, Aniek Setiya Budiatin, "Injectable Bone Substitute of Hydroxyapatite-Gelatin Composite with Alendronate for Bone Defect Due to Osteoporosis")

Dear Prof. Dr. Alfian Pramudita Putra,

It's a great pleasure for me to inform you that your manuscript which titled "Injectable Bone Substitute of Hydroxyapatite-Gelatin Composite with Alendronate for Bone Defect Due to Osteoporosis" has been accepted and will be finalized for Issue 2019; volume 12 number 2.

Send us Transfer of Copyright Agreement please, it is necessary before sending manuscript to press <http://www.jdmr.com/journal>

http://www.kfodermadepan.com/emails/transfer_of_copyright_agreement.doc

Before sending manuscript to press, I will send to you the press ready copy for your final checking.
Sincerely yours.

Publication processing charges for your article is 400 US\$.

Please complete to the publication process for your accepted article.

Sincerely yours.

1- By bank transfer to the my account (as 400 US\$).

Please carefully fill in transaction form and indicate to the: Full Account Beneficiary Name, Account IBAN number and article ID number to the "Remittance Information" section over the transaction or swift bill (pay slip).

Please inform me money order date when you did.

FINANCIAL INSTITUTION Vakıf Bank	BANK CODE/ABA = Vakıf Bank 015
BRANCH Dicle Universitesi (Diyarbakir)(S0527)Bağlı Şube	ACCOUNT HOLDER / BENEFICIARY NAME= izzet yavuz
CITY/STATE/ZIP/COUNTRY	SWIFT CODE TVBATR2A BIC CODE XXX

<https://mail.google.com/mail/u/079k=481a03a3db&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1613687678664089008&siml=msg-f%3A1613687...> 1/2

10/15/2018

Gmail - M18_706_Alfian_Pramudita_Putra / Accept letter

Dicle Universitesi Kampüs Alanı Sur. Diyarbakir /
21280/ Turkey

IBAN / ACCOUNT NUMBER #

TR190001500158048013204615

Prof. Dr. Izzet YAVUZ

Dean of D.Ü. Faculty of Dentistry

Editor-in-Chief and General Director

Journal of International Dental and Medical Research [ISSN 1309 - 100X](#)

<http://www.jidmr.com/journal/>

MSc, PhD, D Ped Dent.

Professor, Pediatric Dentistry

MSc, PhD, D Ped Dent.

Professor, Pediatric Dentistry

Faculty of Dentistry, University of Dicle

21280 Diyarbakir, TURKEY

E-mail: izzetyavuz@hotmail.com, iyavuz@dicle.edu.tr

ECTODERMAL DYSPLASIA GROUP - TURKEY

<http://www.ektodermaldisplazi.com>

Alfian Pramudita <pramuditaalfian@gmail.com>

To: izzetyavuz@hotmail.com

Tue, Oct 9, 2018 at 8:07 PM

Dear Prof. Dr. Izzet Yavuz,

Thank you for accepting our manuscript to be published in your journal.

We have a question regarding the payment. Is it possible for us to pay the article-processing charge via Paypal? Or it needs to be done by bank transfer only?

We will send you the transfer of copyright agreement soon.

Thank you in advance.

--

Sincerely,

Alfian Pramudita Putra, S.T, M.Sc

Biomedical Engineering

Department of Physics

Faculty of Science and Technology

Universitas Airlangga

E: alfian.pramudita@outlook.com, pramuditaalfian@gmail.com

M: +62812 1997 8730

Injectable Bone Substitute of Hydroxyapatite-Gelatin Composite with Alendronate for Bone Defect Due to Osteoporosis

Alfian Pramudita Putra^{1,a*}, Dyah Hikmawati^{1,b}, Aniek Setiya Budiati^{2,c}

¹Biomedical Engineering, Department of Physics, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga Surabaya, Indonesia

²Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

^apramuditaalfian@gmail.com, ^bdyah-hikmawati@fst.unair.ac.id, ^canieksb@yahoo.co.id

*Corresponding Author: Alfian Pramudita Putra

Email: pramuditaalfian@gmail.com phone: +6281219978730

Address: Biomedical Engineering Study Program, Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Surabaya, East Java, Indonesia, 60115

Abstract

World Health Organization mentioned that there were 200 million people in the world suffered from osteoporosis in 2013 and half of them has bone fractures. Hydroxyapatite as a bioactive material was explored as a substitute for bone defect or osteoporosis. The conventional bone filler was lack of the ability to let the filler to fill the irregular defect due to osteoporosis. Thus, a new method was introduced called an injectable bone substitute. While the bone filler performs its function to stabilize the mechanical property of the defected bone, the addition of a drug, such as an alendronate, would be beneficial. The injectable bone substitute (IBS) based on hydroxyapatite-gelatin was synthesized with the addition of alendronate. The Fourier Transform Infrared (FTIR) result showed a bond formation of hydroxyapatite and gelatin by shifting of carboxyl group wavenumber from 1332,72 cm^{-1} to 1559-1543 cm^{-1} from gelatin with Ca^{2+} from hydroxyapatite. The IBS viscosity was (38.7±0.53) dPa.s and was able to be extruded from the syringe. The IBS could become suspension again after sedimentation and did not change the pH of SBF solution. The IBS was precipitated with a suitable substrate. The cytotoxicity test showed that the samples were non-toxic. The results of IBS characterizations demonstrated that it has potential to be used as a bone filler as well as drug delivery system to the bone defect due to osteoporosis.

Keywords: Injectable Bone Substitute, Hydroxyapatite-Gelatin Composite, Alendronate, Osteoporosis, Bone Defect

INTRODUCTION

Bone defects caused by traumatic accident, tumor and total joint reconstruction often occurred and needed bone substitute materials. There were some implanted synthetic materials in the bone defect and still encapsulated by fibrous tissue and did not attach to bone¹. Osteoporosis was bone deformation marked by bone strength reduction and influenced by increasing of bone fracture risk². World Health Organization (WHO) in 2013 reported that around 200 million people in the world suffer from osteoporosis, and 50% of them had a bone fracture, especially in the upper leg³. Bone defect was caused by external factor and osteoporosis was caused by an internal factor, such as reduction of bone ability to do bone remodeling process because of an unbalanced process of osteoblast and osteoclast. This case could be handled by increasing the bone density or filling the bone defect with a suitable material. Hydroxyapatite as a bioactive material was explored as a substitute for bone defect or osteoporosis⁴. Hydroxyapatite is brittle. So, in its application, it needs another material from polymer group, like gelatin to support it. The addition of gelatin was aimed to increase osteoblast adhesion, migration, and mineralization. The hydroxyapatite-gelatin composite was already studied and proved that this composite was suitable to use as a bone substitute material with high biocompatibility and non-toxicity⁵.

The application of bone filler nowadays was not effective for the defect caused by the osteoporosis since the defect was in an irregular shape. The bone filler should fill the irregular defect while maintaining its mechanical function. Because of that, a new method called injectable bone substitute was introduced. Injectable bone substitute (IBS) was bone substitute material in an injectable form. There were two kinds of IBS, IBS in ready-to-use suspension form and IBS with ionic hydraulic cement that could harden *in vivo* after injection⁶. Weiss et al. (2007) already conducted research about calcium phosphate-based IBS paste that could harden after injection⁶. The results showed that the paste could form suspension or paste by using hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) polymer 2% w/v as a suspending agent. Another study from Warastuti and Abbas (2012) already succeeded to synthesize IBS from hydroxyapatite and chitosan with HPMC 2% w/v as suspending agent. That research showed the effect of irradiation in physics characterization of IBS. The results showed that irradiation 25 kGy did not affect the IBS⁷. The function of IBS could be added as drug delivery to help bone defect healing by using a bisphosphonate drug, like alendronate. Alendronate has high-affinity electron to Ca^{2+} ion that could improve the interaction with bone calcium and inhibit the osteoclast in the bone remodeling process⁸. Thus, there is a need to investigate the potential of hydroxyapatite-gelatin-based injectable bone substitute with the addition of alendronate for application in bone defect due to osteoporosis.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Materials used in this research were hydroxyapatite powder from cow bone (Tissue Bank dr. Soetomo General Hospital, Surabaya, Indonesia), Gelatin (150 bloom Rousselot, Guangdong, China) from cow skin, Alendronate (Arshine Technology Co., Limited, Wanchai, China), *Hydroxypropylmethylcellulose* (HPMC)(Sigma Aldrich H7509, Singapore), distilled water, and *Simulated Body Fluid* (SBF) solution.

Methods

The samples were synthesized by dissolving 2% w/v HPMC in distilled water at 90-100°C and dissolving 5% w/v gelatin in distilled water at 40°C. The hydroxyapatite (HA) powder was added to the gelatin solution with a variation of 45:55, 50:50 and 55:45. The alendronate was added to that solution with a ratio of 1 to 10 compared to the mass of hydroxyapatite⁹. The final step was added HPMC solution to hydroxyapatite-gelatin-alendronate solution gradually until that solution became a white suspension.

Fourier Transform Infrared (FTIR) Analysis. The samples were characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) in Faculty of Mathematics and Natural Science, Institute of Sepuluh November, Surabaya, Indonesia. The sample was freeze-dried first at -20°C for 4 hours. KBr was added to the sample and compacted into a pellet. The FTIR test was performed in the wavenumber range of $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$.

Viscosity Test. This test was performed in the Material Physics Laboratory Faculty of Science and Technology, Universitas Airlangga, Indonesia by using Viscotester VT-04F RION Co. Ltd. The composite suspension of hydroxyapatite-gelatin poured to the 300 ml Becker glass. The test used Rotor Number 1. The motor would stir the solution and the reader would read the viscosity of the solution corresponding to the second scale due to the use of rotor no. 1. The test was replicated 5 times.

Resuspension Test. This test aimed to observe the ability of the solution to form suspension again after sedimentation in term of time to reform a suspension again and the pH of the solution. The test was performed by adding PBS to the suspension and shacked them. The time and pH after shaking until forming suspension again were recorded. The pH was measured by using pH-indicator strips (Merck®).

Cytotoxicity Test. This test used MTT assay method to evaluate the cytotoxicity properties of materials. The test was performed at PUSVETMA, Surabaya by using fibroblast cell from Baby Hamster Kidney (BHK)-21. The living cell would react by changing the tetrazolium salt to formazan. The fibroblast cell of BHK-21 in Eagle's media was incubated for 48 hours and cleaned by using Phosphate Buffer Saline (PBS). 86% Eagle's media, 1% Penicillin streptomycin and 100 unitsof Fungizone/ml was prepared for $100 \mu\text{l}$ and the cultured cell was inserted to it. The cell culture was moved to 96-microwell plate. The suspension sample was diluted four times to be neutral. 1 ml of that suspension was dissolved in 10 ml aquabidest. $1 \mu\text{l}$ of that sample was placed in each well and was incubated for 24 hours at 37°C . The micro well plate was rinsed with PBS and was added $10 \mu\text{l}$ of 5mg/ml MTT solution ineach well. Every well was added with $50 \mu\text{l}$ of DMSO and then centrifuged for 5 minutes with 30 rpm. The measurement process was performed by Elisa reader showing the violet level as Optical Density (OD) which represents the cell viability of the material based on Eq. 2¹⁰. The test was replicated four times.

$\% \text{ cell viability} = (\text{OD treatment} + \text{OD media control}) / (\text{OD cell control} + \text{OD media control})$
(2)

Setting Time and Morphology Test. The setting time and morphology test was performed aimed to obtain the time which the suspension needed to set in the application. Two types of substrate were used, glass and hydroxyapatite-collagen scaffold. After that, the substrate that was treated with the suspension was observed in its physical appearance and furthermore, characterized by Scanning Electron Microscope (SEM) Inspect S20 with magnification of 1000.

The Statistical Test. The data was analyzed by using statistical test which was one-way ANOVA test with p-value of 0.05 and presented as its average and standard deviation.

RESULTS

FTIR Test

The sample was freeze-dried and characterized by Fourier Transform Infrared (FTIR) first. The result showed the spectra of the functional bond in the sample as shown in Figure 1.

Based on spectra in Figure 1, there were some absorbance peaks that represented specific functional groups of the material, such as 3262.65 cm^{-1} which represented the hydroxyl O-H group (intermolecular hydrogen bond) that came from HPMC, gelatin, hydroxyapatite, and alendronate¹¹. The absorbance at a wave number of 1332.72 cm^{-1} represented the carboxyl (COO^-) bond from proline of the gelatin which was the specific characteristic of type I collagen¹¹. Besides that, the absorbance at a wave number of 1627.82

cm^{-1} represented the amine (NH_2) group from gelatin and alendronate. The most important part was the presence of a new bond shifting from 1332.72 cm^{-1} to 1558.65 cm^{-1} which was an absorbance peak of the interaction of Ca^{2+} from hydroxyapatite and carboxyl group from gelatin^{11,12}. The P-O-C and phosphate group from hydroxyapatite and alendronate was also present at 1042.24 cm^{-1} and 547.13 cm^{-1} , respectively¹⁰.

Viscosity Test

The viscosity of IBS is essential as the injectability property is defined by the viscosity. The viscosity IBS suspension was characterized by Viscotester VT-04F Rion Co. Ltd. The results of viscosity test showed in Figure 2.

It showed the viscosity of IBS suspension from different hydroxyapatite-gelatin composition variation in five replications. The results of hydroxyapatite-gelatin composition variation viscosity 45:55, 50:50 and 55:45 were $(38.7 \pm 0.53) \text{ dPa.s}$, $(49.6 \pm 1.02) \text{ dPa.s}$, and $(66 \pm 1) \text{ dPa.s}$, respectively. The One-way ANOVA test showed that the result were significantly different with p value < 0.05 .

Resuspension Test

There were two parameters observed in the resuspension test, which were time and pH to show that the IBS suspension was able to reform and the sediment part could disperse again, did not harden and did not change the pH of Simulated Body Fluid (SBF). The test was performed by applying SBF solution to the suspension samples and measuring the pH and time to form suspension again after mixing or shaking the suspension. The result of resuspension test showed in Figure 3, 4 and 5.

Figure 4 showed the results of resuspension test based on pH. The pH was around 7 to 7.9. All samples indicated a stable result and above 7. Besides that, it did not show any abnormality and did not change pH of SBF solution drastically which had pH around 7.4. Figure 5 showed the resuspension test result based on IBS suspension time of forming suspension again. In the first to second day, the time of resuspension was not stable because of the particles in the suspension was still spread in the suspension. After the third to seventh day, the result showed the stable line of resuspension time.

Cytotoxicity Test

The cytotoxicity test in this study was using MTT assay method to observe the viability of Baby Hamster Kidney-21 (BHK-21) fibroblast cells towards the IBS suspension. This method was evaluating the change from the tetrazolium rings from MTT due to the activity of mitochondria of the living cells. The amount of the change could be measured by using Elisa reader to obtain the optical density which indicated the viability of the cells. The result showed in Figure 6 and in indicated that all samples were non-toxic since the cell viability exceeded 50%. The sample with a hydroxyapatite-gelatin ratio of 55:45 exceeded 100%¹³. Based on the One-way ANOVA test, the result was significantly different with p value < 0.05 .

Morphology Test

The setting time test was performed to obtain the time of hardening process of IBS suspension. This test was conducted in a petri dish. The result showed that the suspension could not harden until seven days. This IBS suspension needed a suitable substrate for hardening process with a similar component to the human bone. Because of that, a freeze-dried hydroxyapatite-collagen scaffold was used in this research as a substrate media. That scaffold was immersed in IBS suspension for an hour and was dried at room temperature. The scaffold needed 5-6 hours for setting and hardening process.

The change in scaffold mass was measured before and after the immersion in IBS suspension. The result showed that the mass increased from 0.12 gram to 0.26 gram in wet condition and 0.21 gram in dry condition. The height and diameter of the scaffold also changed from 9.2 mm and 4.2 mm to $(9.178 \pm 0.053) \text{ mm}$ and $(3.824 \pm 0.156) \text{ mm}$. This result

showed that the IBS suspension was able to set in the suitable substrate. Hydroxyapatite-collagen that was synthesized in the freeze-dried process produced some pores that facilitated the IBS suspension to infiltrate the scaffold. The dried scaffold after immersion was characterized by Scanning Electron Microscope (SEM). The SEM image of dried hydroxyapatite-collagen scaffold after immersion was shown in Fig. 7. The average of pore size was $(19.125 \pm 0.201) \mu\text{m}$. This size was bigger than scaffold pore size before immersion. This size indicated that alendronate in this IBS suspension could bind the calcium ion of hydroxyapatite and formed some pores with increasing its size. This could occur because alendronate had high electron affinity to Ca^{2+} ion⁸.

Discussions

In this study, an Injectable Bone Substitute (IBS) based on hydroxyapatite and gelatin with the addition of alendronate was developed. The presence of HPMC aimed to form the composite as a suspension. The Fourier Transform Infrared (FTIR) study of Injectable Bone Substitute (IBS) showed that there was a new bond between Ca^{2+} ion from hydroxyapatite and carboxyl group (COO^-) from gelatin, as mentioned by Narbat et al. (2006) and Wang et al. (2010) in their studies^{11,12}. This bond was a covalent bond which presented in the composite. The presence of HPMC would provide more interaction between the Ca^{2+} ion from hydroxyapatite and the carboxyl group from gelatin. The alendronate was also still present in the composite as shown in absorbance peak at 1627.82 cm^{-1} in the FTIR test result¹⁴.

The standard viscosity for IBS application based on Bourges *et al.* (2001) study was $40 \text{ dPa}\cdot\text{s}$ ¹⁵. The IBS composition that has viscosity value around the standard was the combination of hydroxyapatite and gelatin at 45:55 which was $38.7 \text{ dPa}\cdot\text{s}$. The viscosity of IBS suspension had an important role in its application because it determined the injectability. The sample in suspension form was able to sediment and need a mixing or shaking to make it in homogeneous state again⁶. The samples that were characterized by viscosity test were also tried in 10 ml syringe with 2 mm inner diameter tip¹⁶. All the IBS suspensions can be injected from that syringe easily. It showed that the samples had good injectability.

The resuspension test observed the change in pH and time to form suspension again. It indicated that the alendronate addition in the IBS suspension could not change the pH of the body when it applied in the bone fracture. Alendronate had low pH or prominent acidity around 4 – 4.5, and it could affect human body when it applied to the body directly. The pH of IBS solution also affected the material ability in setting time when applied to the bone. The average pH of hydroxyapatite for an application that could set in the bone was 6¹⁶. The amount of hydroxyapatite used in IBS solution increased the resuspension time because hydroxyapatite powder was affected by gravitation although there were still hydroxyapatite powders that flew around in the IBS suspension⁶. Its characteristic as suspension caused its particle sediment less than an hour and could form suspension again after shaking and did not harden at the bottom of the glass vial.

The setting time test result indicated that the IBS suspension needs a suitable substrate to set. In the application case, the bone is the most ideal substrate. Thus, the IBS suspension would set in the bone. The use of hydroxyapatite-collagen scaffold with the application of IBS suspension showed that it could set and also infiltrate the scaffold which represented the bone. The dimensional change of the scaffold also emphasized the result of the FTIR test which showed that there was an interaction between the hydroxyapatite and gelatin.

All of the results mentioned above was also strengthened by the result of the cytotoxicity test that all the samples were non-toxic with the cell viability of around 100% and even stimulate the proliferation of the fibroblast cells¹⁰. The other studies need to be

conducted to investigate the behavior of this IBS suspension thoroughly, especially in the injectability, alendronate release, the stability, and also in vivo study.

Conclusion

The hydroxyapatite-gelatin based injectable bone substitute with addition of alendronate can be synthesized and showed good characteristics in FTIR, viscosity, resuspension and setting time.

Acknowledgement

The authors would like to thank the Indonesian Ministry of Research, Technology and Higher Education for funding this research.

Conflict of Interest

The authors declare there is no conflict of interest.

References

1. Murugan, R. & Ramakrishna, S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials* 2004;25:3829–3835.
2. Noor, Z. *et al.* Atomic Mineral Characteristics of Indonesian Osteoporosis by High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Sci. World J.*2012; 1–6.
3. International Osteoporosis Foundation. THE ASIA-PACIFIC REGIONAL AUDIT: Epidemiology, costs & burden of osteoporosis in 2013 - Indonesia Country Overview. 2013.
4. Azami, M., Rabiee, M. & Moztafzadeh, F. Glutaraldehyde crosslinked gelatin/hydroxyapatite nanocomposite scaffold, engineered via compound techniques. *Polym. Compos.* 2010;31: 2112–2120.
5. Askarzadeh, K., Orang, F. & Moztafzadeh, F. Fabrication and characterization of a porous composite scaffold based on gelatin and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Iran. Polym. J.*2005; 14: 511–520.
6. Weiss, P., Gauthier, O., Bouler, J.-M., Grimandi, G. & Daculsi, G. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. *Bone*1999; 25: 67S–70S.
7. Warastuti, Y. & Abbas, B. Sintesis dan karakterisasi pasta injectable bone substitute iradiasi berbasis hidroksiapatit. *J. Ilm. Apl. Isot. dan Radiasi*2011; 7:73–95.
8. Shi, X., Wang, Y., Ren, L., Gong, Y. & Wang, D.-A. Enhancing alendronate release from a novel PLGA/hydroxyapatite microspheric system for bone repairing applications. *Pharm. Res.*2009; 26: 422–430.
9. Budiati, A. S., Zainuddin, M. & Khotib, J. Biocompatible composite as gentamicin delivery system for osteomyelitis and bone regeneration. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*2014; 6: 223–226.
10. Putra, A. P. *et al.* The Effect of Glutaraldehyde on Hydroxyapatite-Gelatin Composite with Addition of Alendronate for Bone Filler Application. *J. Biomimetics, Biomater. Biomed. Eng.*2018; 37: 107–116.
11. Narbat, M. K., Orang, F., Hashtjin, M. S. & Goudarzi, A. Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Iran. Biomed. J.* 2006;10: 215–223.
12. Wang, F. Structure and properties of bone-like-nanohydroxyapatite/gelatin/polyvinyl alcohol composites. *Adv. Biosci. Biotechnol.*2010; 1:185–189.
13. Khoswanto, C., Arijani, E. & Soesilawati, P. Cytotoxicity test of 40, 50 and 60% citric acid as dentin conditioner by using MTT assay on culture cell line. *Dent. J. (Majalah Kedokt. Gigi)*2008; 41: 103.
14. Capra, P. *et al.* A preliminary study on the morphological and release properties of hydroxyapatite-alendronate composite materials. *J. Microencapsul.* 2011;28: 395–405.
15. Bourges, X., Weiss, P., Daculsi, G. & Legeay, G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Adv. Colloid*

Interface Sci.2002; 99:215–228.

16. Dorozhkin, S. V. Self-Setting Calcium Orthophosphate Formulations: Cements, Concretes, Pastes and Putties. Int. J. Mater. Chem.2012; 1:1–48.

FIGURES

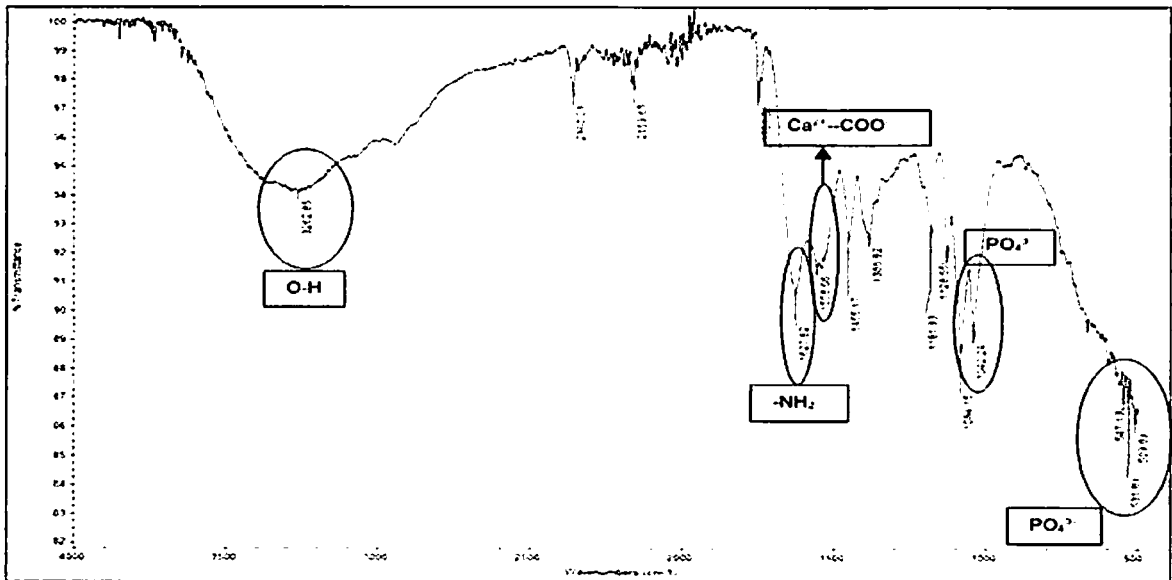


Figure 1. The Hydroxyapatite-Gelatin Based IBS Suspension with Addition of Alendronate

FTIR Spectra

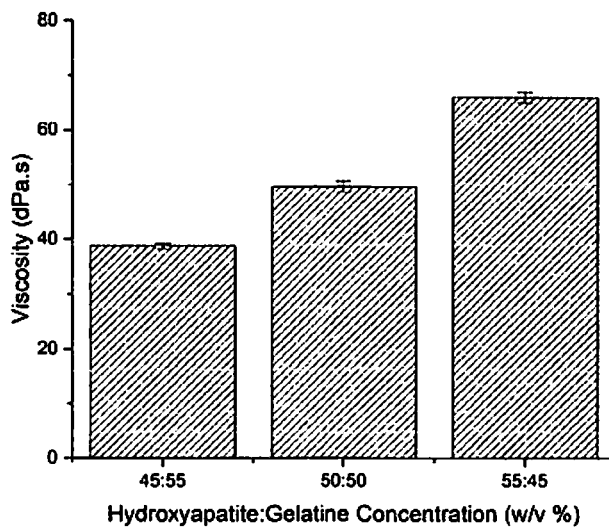


Figure 2. The Average Viscosity of Hydroxyapatite-Gelatin Based IBS Suspension with Addition of Alendronate

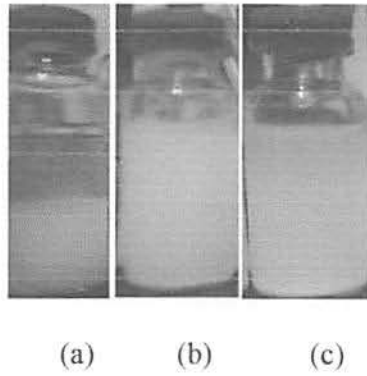


Figure 3. The Resuspension Test of Hydroxyapatite-Gelatin Based IBS Suspension with Addition of Alendronate (a) Before Mixing with SBF (b) After Mixing (c) After Sedimentation

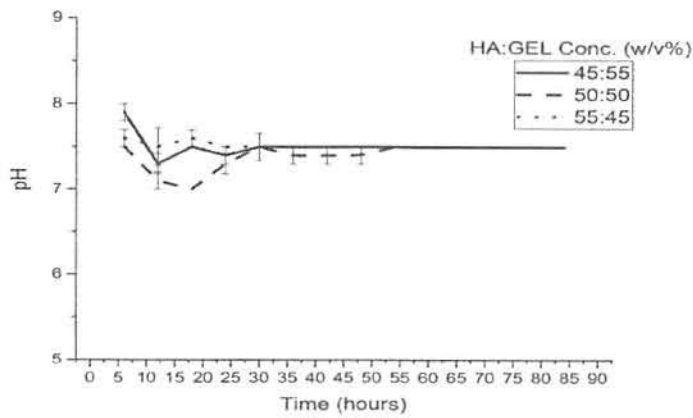


Figure 4. Resuspension Test Result of Hydroxyapatite-Gelatin Based IBS Suspension with Addition of Alendronate Based on pH

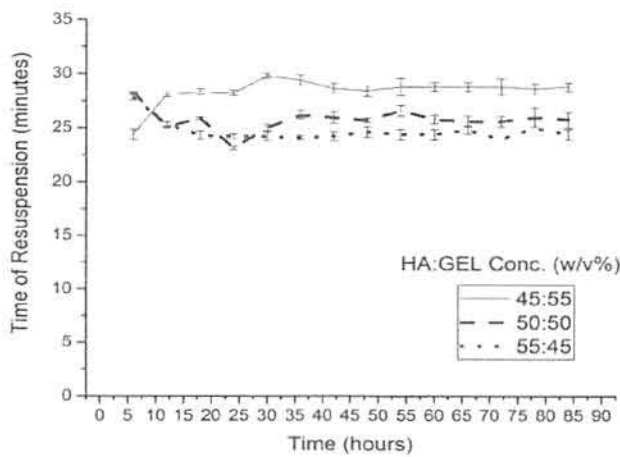


Figure 5. The Resuspension Test Result of Hydroxyapatite-Gelatin Based IBS Suspension with Addition of Alendronate Based on Time

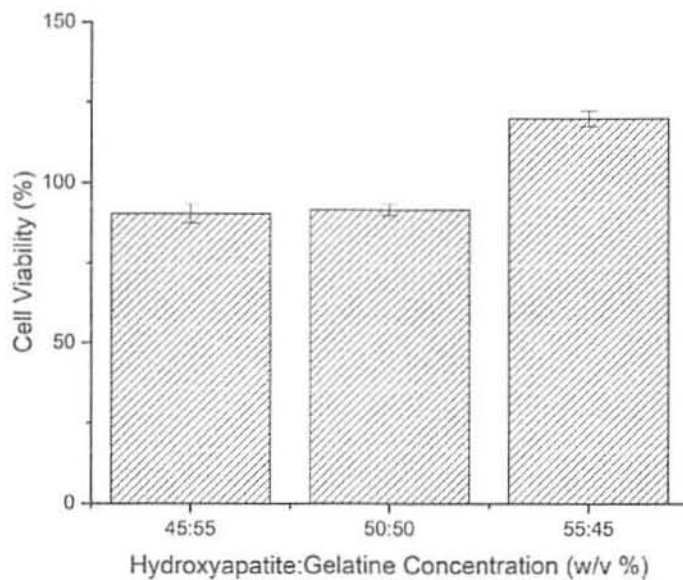


Figure 6. The Cytotoxicity Test Result of Hydroxyapatite-Gelatin Based IBS Suspension with Addition of Alendronate

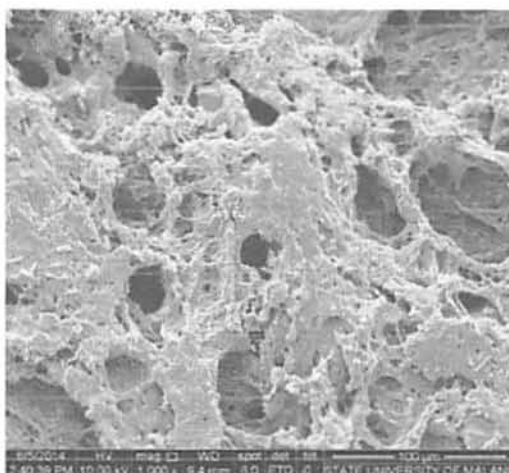


Figure 7. SEM Image of Dried Hydroxyapatite-Collagen Scaffold after Immersion in Hydroxyapatite-Gelatin Based IBS Suspension with Addition of Alendronate



SK SKP:
2017/SK-SKP/PP/IAI/II/2017
Moderator : 1,5 SKP
Judge : 4,5 SKP
Presenter : 4,5 SKP

Certificate of Participation Awarded to:

Aniek Setiya Budiatin

Oral Presenter

who has contributed as

in the 20 Years of ACCP: 17th Asian Conference on Clinical Pharmacy
"Unity in Diversity and the Standardisation of Clinical Pharmacy Services"
held on July 28-30, 2017 in Yogyakarta - Indonesia

Dr. Yunita Nita, M.Pharm., Apt.
President of Asian Conference on Clinical Pharmacy

Dr. Umi Athiyah, M.S., Apt.
Dean of the Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga

Drs. Nurul Falah Eddy Pariang, Apt.
President of Indonesian Pharmacists Association

