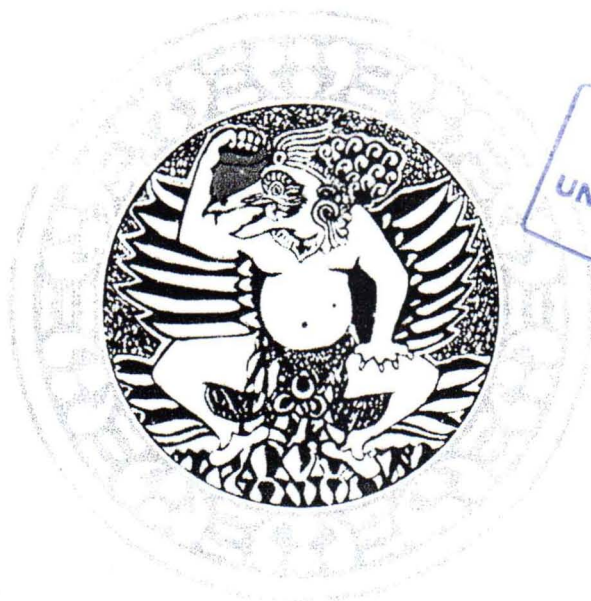


**LAPORAN TAHUN TERAKHIR
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



KKC
KK
LP 28/19
Ami
S



**SINTESIS DAN KARAKTERISASI KOMPOSIT HIDROKSIAPATIT-
KITOSAN DENGAN PENAMBAHAN KONDROITIN SULFAT DAN
CMC SEBAGAI KANDIDAT SCAFFOLD TULANG**

TAHUN KE 2 DARI RENCANA 2 TAHUN

Dr. AMINATUN, Ir, M.Si

NIDN: 0028106810

PROF. Dr. MOH. YASIN, M.Si

NIDN: 0003126704

DYAH HIKMAWATI, S.Si.,M.Si

NIDN: 0028116902

DIBIYAI OLEH:

**DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL 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**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit -
Kitosan Dengan Penambahan Kondroitin Sulfat dan CMC
Sebagai Kandidat Scaffold Tulang

Peneliti/Pelaksana
 Nama Lengkap : Dr. Ir AMINATUN, M.Si
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0028106810
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 Program Studi : Fisika
 Nomor HP : 085854653468
 Alamat surel (e-mail) : aminatun@fst.unair.ac.id

Anggota (1)
 Nama Lengkap : Dr. Drs MOH YASIN M.Si
 NIDN : 0003126704
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)
 Nama Lengkap : DYAH HIKMAWATI S.Si, M.Si
 NIDN : 0028116902
 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,
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi-Unair

Kota Surabaya, 9 - 11 - 2018
Ketua,

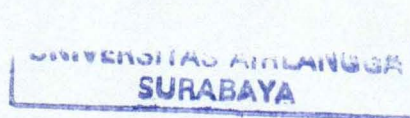


(Prof. Wia Darmanto, M.Si., Ph.D)
NIP/NIK 196106161987011001

(Dr. Ir AMINATUN, M.Si)
NIP/NIK 196810281993032003

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi

(Prof. H. Hery Purnobasuki, Drs., M.Si., Ph.D)
NIP/NIK 196705071991021001





RINGKASAN

Kerusakan tulang akibat penyakit maupun kecelakaan memicu tingginya kebutuhan terhadap material implan tulang yang dapat berbentuk *scaffold* yang dapat memberikan kondisi yang dibutuhkan oleh sel untuk berproliferasi dan mempertahankan fungsinya masing-masing. *Scaffold* yang ideal memiliki karakteristik tiga dimensi dan berpori dengan jaringan pori yang saling berhubungan sebagai tempat untuk pertumbuhan sel dan transport aliran nutrisi serta limbah metabolik. *Scaffold* harus biokompatibel dan *bioresorbable* dengan tingkat degradasi yang terkendali yang cocok dengan pertumbuhan sel. Selain itu *scaffold* juga harus memiliki sifat mekanik yang cocok dengan jaringan pada daerah implantasi.

Tujuan umum penelitian adalah mendapatkan material *scaffold* tulang yang berasal dari komposit hidroksiapatit-kitosan/kondroitin sulfat dan komposit hidroksiapatit-kitosan/CMC. Tujuan umum ini akan tercapai mengacu pada tujuan khusus penelitian yaitu sebagai berikut. **Tujuan tahun pertama:** 1) Mengetahui pengaruh variasi komposisi kondroitin sulfat terhadap karakteristik gugus fungsi, morfologi, porositas, biodegradasi, sifat mekanik kuat tekan dan sitotoksitas komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit sebagai kandidat *bone graft*. 2) Mendapatkan komposisi terbaik dari variasi komposisi kondroitin sulfat pada komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit sebagai kandidat *bone graft*. **Tujuan tahun kedua:** 1) Menentukan pengaruh variasi *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) pada komposit hidroksiapatit-kitosan/CMC. 2) Menentukan komposisi *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) yang tepat pada komposit hidroksiapatit-kitosan/CMC.

Hasil penelitian **tahun pertama** adalah berdasarkan uji gugus fungsi terdapat gugus fungsi yang sesuai dengan material pembentuknya. Hasil uji morfologi didapatkan *range* ukuran pori 26-239 μm sesuai dengan ukuran pori *scaffold* yang ideal. Hasil uji porositas *scaffold* sebesar 90,06 - 93,48% sesuai dengan porositas tulang *cancellous*. Hasil uji biodegradasi terjadi penurunan massa pada setiap sampel dengan rentang 27,149 - 60,658%. Uji toksisitas menunjukkan kelima sampel komposit *scaffold* tidak bersifat toksik terhadap sel fibroblas. Berdasarkan hasil karakterisasi ini, *scaffold* komposit hidroksiapatit- kitosan-kondroitin sulfat memiliki potensi sebagai *bone graft* dengan variasi terbaik pada sampel C yaitu 50:35:15 %wt. dengan ukuran pori 27-208 μm , porositas sebesar 90,06 %, *compressive strength* 6,531 MPa, persentase massa hilang sebesar 27,149% selama 4 minggu dan persentase viabilitas sel hidup sebesar 65,52%.

Hasil penelitian **tahun kedua** variasi komposisi terbaik nHA:CH:CMC terdapat pada sampel C (40:50:1010%wt) yang memiliki ukuran pori antara 92,1 - 136 μm , porositas 49,7699%, *compressive strength* 3,8858 MPa serta persen massa hilang pada minggu ke-4 sebesar 29,9214% dengan laju degradasi yang cenderung konstan dan diprediksi untuk 4 minggu berikutnya sampel masih tersedia untuk proses pertumbuhan sel tulang baru. Perbandingan kedua hasil tersebut menunjukkan bahwa penambahan kondroitin sulfat lebih baik daripada CMC.

Luaran penelitian pada tahun 1 adalah paper yang telah accepted di *Journal of International Dental and Medical Research* (publish awal 2019-Q3) dan telah diseminarkan pada **Seminar Nasional Material 2017** tanggal 26 Agustus 2017 di ITB. Luaran pada **tahun kedua** adalah paper telah diseminarkan pada *The 2nd International Conference Postgraduate School Universitas Airlangga July, 10th - 11th, 2018, Surabaya*. Artikel tersebut dalam proses submit untuk dipublikasi pada Scitepress, Science and Technology Publication, edisi proceeding series. Artikel yang lain telah di submit pada *Journal of International Dental and Medical Research* (scopus Q3).

Keywords: *scaffold*, hidroksiapatit, kitosan, kondroitin sulfat dan CMC

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT, hanya atas rahmat dan karuniaNya laporan akhir tahun kedua Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) yang berjudul **Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit-Kitosan dengan Penambahan Kondroitin Sulfat dan CMC sebagai Kandidat Scaffold Tulang** dapat diselesaikan.

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kemenristek Dikti atas bantuan dana penelitian ini
2. Rektor Universitas Airlangga atas disetujuinya penelitian ini
3. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi atas kesempatan, sarana dan prasarana yang diberikan untuk melakukan penelitian ini
4. **Ketua Departemen Fisika- Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga**, atas segala fasilitas yang diberikan
5. Teman sejawat khususnya dosen Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga atas segala saran dan diskusinya

Penelitian ini masih berlangsung sehingga saran dan diskusi dari berbagai pihak sangat kami harapkan demi kesempurnaan hasil penelitian ini.

Surabaya, 11 November 2018

Peneliti

DAFTAR ISI



	Hal
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Ringkasan	iii
Kata Pengantar	iv
Daftar Isi	v
Daftar Tabel	vii
Daftar Gambar	viii
Daftar Lampiran	ix
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tulang	4
2.2. Regenerasi Tulang	6
2.3. Scaffold	10
2.3.1. Kitosan	11
2.3.2. Hidroksiapatit	12
2.3.3. Kondroitin sulfat	13
2.3.4. Carboxymethyl cellulose	14
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	16
3.1. Tujuan Penelitian	16
3.1.1. Tujuan khusus tahun pertama	16
3.1.2. Tujuan khusus tahun kedua	16
3.2. Manfaat	16
BAB IV. METODE PENELITIAN	18
4.1. Waktu dan Tempat	18
4.2. Bahan dan Alat penelitian	18
4.2.1. Bahan penelitian	18
4.2.2. Alat penelitian	18
4.3. Prosedur Penelitian	19

4.3.1. Persiapan Sampel	19
4.3.2 Sintesis komposit HA-kitosan-kondroitin sulfat	19
4.4. Karakterisasi dan Analisis Sampel	20
4.4.1. Uji gugus fungsi	20
4.4.2. Uji morfologi	20
4.4.3. Uji porositas	22
4.4.4. Uji biodegradasi	22
4.4.5. Uji sitotoksitas	22
BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI.....	25
5.1. Hasil Sintesis	25
5.2. Hasil Karakterisasi	25
5.2.1. Uji gugus fungsi	25
5.2.2. Uji morfologi	27
5.2.3. Uji porositas	30
5.2.4. Uji biodegradasi	32
5.2.5. Uji sitotoksitas	34
5.3. Luaran Penelitian	36
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	37
6.1. Kesimpulan	37
6.2. Saran	38
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

No. Tabel	Judul Tabel	Halaman
2.1	Sifat mekanik tulang	6
4.1	Nama sampel komposit	19
5.1	Daerah serapan gugus fungsi FTIR	27
5.2	Diameter pori sampel komposit	30
5.3	Persentase porositas sampel komposit	31
5.4	Persentase massa hilang sampel komposit	32
5.5	Persentase viabilitas sel uji sitotoksitas	35

DAFTAR GAMBAR

No. Gambar	Judul Gambar	Halaman
2.1	Mikrostruktur tulang	5
2.2	Tahap regenerasi tulang	6
2.3	Tahap inflamasi regenerasi tulang	7
2.4	Tahap perbaikan regenerasi tulang	8
2.5	Pembentukan kalus pada tahap perbaikan	9
2.6	Tahap remodeling tulang	10
2.7	Struktur kimia kitosan	12
2.8	Struktur 3 dimensi hidroksiapatit	13
2.9	Struktur kimia kondroitin sulfat	14
2.10	Struktur kimia carboxymethyl cellulose	14
4.1	Skema penelitian tahun kedua	21
5.1	Sampel scaffold komposit	25
5.2	Spektrum FTIR scaffold	26
5.3	Hasil uji morfologi scaffold komposit	29
5.4	Porositas sampel komposit	32
5.5	Persentase massa hilang	33
5.6	Grafik persentase viabilitas sel	35

DAFTAR LAMPIRAN

No. Lampiran	Judul Lampiran	Halaman
1.	Bukti copyright agreement Journal International of Dental and Medicine Material	
2.	Bukti sertifikat sebagai pemakalah pada Seminar Nasional Material 2017 tanggal 26 Agustus 2017 di ITB	
3.	Bukti sebagai presenter pada <i>The 2nd International Conference Postgraduate School Universitas Airlangga July, 10th – 11th, 2018, Surabaya.</i>	
4.	Bukti <i>acceptance letter</i> dipublikasi pada Scitepress (Scopus) edisi proceeding series.	
5.	Bukti submitted pada Journal International of Dental and Medicine Material (scopus Q3).	

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Setiap tahun terjadi lebih dari 2,2 juta cangkok tulang di seluruh dunia. Di Indonesia tercatat kebutuhan biomaterial untuk cangkok tulang dalam bentuk *bone graft* meningkat sebanyak 4 kali dan akan terus meningkat seiring dengan meningkatnya *bone defect* karena trauma, tumor, kelainan kongenital, infeksi dan lain sebagainya (Ferdiansyah *et al.*, 2011). Pada saat ini bidang ortopedi banyak menggunakan *bone graft* dari *natural bone* yaitu *autograft*, *allograft* dan *xenograft* (Darwis dkk., 2008; Schieker, *et al.*, 2006), akan tetapi ketiganya memiliki kekurangan sehingga sebagai penggantinya banyak dikembangkan *bone graft* artifisial.

Bone graft artifisial dapat berupa *scaffold* yang dapat memberikan kondisi yang dibutuhkan oleh sel untuk berproliferasi dan mempertahankan fungsinya masing-masing (Hutmacher., 2000). *Scaffold* tulang merupakan matriks sementara untuk pertumbuhan tulang dan menyediakan lingkungan yang spesifik dan rancangan bentuk untuk pengembangan jaringan (Schieker, *et al.*, 2006). Osteoblast dan kondrosit dapat tumbuh pada *scaffold* yang secara perlahan-lahan akan diserap tubuh dan tumbuh sebagai jaringan tulang baru (Hutmacher, 2000).

Scaffold yang ideal memiliki karakteristik tiga dimensi dan berpori dengan jaringan pori yang saling berhubungan sebagai tempat pertumbuhan sel dan transport aliran nutrisi serta limbah metabolik. *Scaffold* harus biokompatibel dan *bioresorbable* dengan tingkat degradasi yang terkendali dan tingkat absorpsi yang cocok dengan pertumbuhan sel atau jaringan. Selain itu *scaffold* juga harus memiliki sifat mekanik yang cocok dengan jaringan pada daerah implantasi (Hutmacher, 2000). Dengan demikian biomaterial *scaffold* tulang merupakan alternatif potensial untuk teknik perbaikan *bone defect* akibat trauma, reseksi tumor dan perkembangan abnormal (Mitsak *et al.*, 2011).

Terdapat beberapa material yang berpotensi dan memiliki karakteristik yang baik untuk dijadikan material *scaffold*, diantaranya adalah kitosan dan hidroksiapatit. Komposit kitosan-hidroksiapatit masih memiliki kuat tekan yang rendah (Istifarah, 2012). Oleh karena itu saat ini sistem komposit *scaffold* tiga-komponen lebih populer dibandingkan dengan menggunakan kitosan/hidroksiapatit saja. Variasi dengan tiga komponen ini membentuk sistem komponen yang efektif untuk teknik jaringan, yaitu dengan

ditambahkan material seperti kolagen, gelatin, kondroitin sulfat, *carbon nanotube*, karboksimetil selulosa/CMC dan lain sebagainya (Venkatesan *et al.*, 2012).

Untuk membentuk komposit *scaffold* tiga-komponen yang memiliki bentuk tiga dimensi, berpori, biokompatibel dan *biodegradable*, serta untuk memenuhi sifat mekanik yang sesuai dengan tulang dapat ditambahkan material seperti kondroitin sulfat dan CMC. Kondroitin sulfat merupakan komponen struktural penting dari tulang rawan (Izquierdo, *et al.*, 2014). Dalam jaringan tulang rawan, kondroitin sulfat berperan dalam menjaga integritas elastisitas dalam jaringan (Martin, 2013). Studi menunjukkan bahwa penambahan kondroitin sulfat pada kolagen/hidroksiapatit menyebabkan adanya peningkatan *remodeling* tulang, pembentukan tulang baru dan diferensiasi osteoblas (Venkatesan *et al.*, 2012). Sedangkan *Carboxymethyl cellulose* (CMC) merupakan bahan alami yang memiliki kemampuan *biodegradable* dan biokompatibel yang diperoleh dari selulosa alami dengan modifikasi kimia dan CMC ini memiliki struktur yang sangat mirip dengan kitosan sehingga dapat terjadi struktur jaringan *polyelectrolyte* yang kuat antara CMC dengan kitosan (Liuyun *et al.*, 2009).

Berdasarkan latar belakang di atas diperlukan penelitian untuk mengkaji pengaruh variasi kondroitin sulfat dan CMC terhadap hidroksiapatit-kitosan meliputi morfologi, porositas, biodegradasi, sifat mekanik (kuat tekan) dan sitotoksisitas. Membandingkan efektifitas keduanya dalam meningkatkan sifat biodegradabilitas dan sifat mekanik hidroksiapatit-kitosan.

Komposit *scaffold* hidroksiapatit-kitosan/kondroitin sulfat dan hidroksiapatit-kitosan/CMC dianalisis dengan uji gugus fungsi dengan menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) untuk mengetahui apakah terdapat ikatan kimia baru yang terjadi saat pembentukan komposit *scaffold* atau hanya terjadi ikatan fisik saja antar molekul penyusunnya. Uji morfologi dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dilakukan untuk mengetahui ukuran pori pada komposit *scaffold*, uji porositas dilakukan untuk mengetahui seberapa baik tingkat porositas pada *scaffold* mengingat sifat *scaffold* adalah memiliki pori dimana sel dapat berproliferasi di dalamnya. Uji biodegradasi dilakukan dengan larutan SBF untuk mengetahui tingkat degradasi pada *scaffold*. Uji kuat tekan (*compressive strength*) dilakukan untuk mengetahui sifat mekanik dari komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit. Uji sitotoksisitas dengan metode *MTT Assay* dilakukan untuk mengetahui toksisitas sel pada *scaffold* dengan variasi komposisi kondroitin sulfat.

1.2. Rumusan masalah

- 1 Bagaimana pengaruh variasi komposisi kondroitin sulfat terhadap karakteristik gugus fungsi, morfologi, porositas, biodegradasi, sifat mekanik kuat tekan, dan sitotoksisitas komposit *scaffold* hidroksiapatit-kitosan/kondroitin sulfat sebagai kandidat *bone graft* ?
- 2 Berapa komposisi terbaik dari variasi komposisi kondroitin sulfat pada komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit sebagai kandidat *bone graft* ?
- 3 Bagaimana pengaruh variasi *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) pada komposit hidroksiapatit-kitosan/CMC ?
- 4 Berapa komposisi *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) yang memberikan hasil terbaik pada komposit hidroksiapatit-kitosan/CMC ?
- 5 Bagaimana perbandingan kualitas kedua komposit tersebut dan komposit yang manakah yang paling baik sebagai kandidat *scaffold* tulang?

Keterangan :

Rumusan masalah 1 dan 2 diselesaikan pada tahun pertama penelitian, sedangkan sisanya diselesaikan pada tahun kedua.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA



2.1. Tulang

Pada tulang manusia normal, komponen material anorganik terutama terdiri dari kalsium dan fosfat yang menyerupai kristal hidroksiapatit. Mineral yang terkandung dalam tulang ini memiliki berat 60 – 70 % dari berat kering tulang dan menyebabkan konsistensi kepadatan tulang. Selain mineral kalsium dan fosfat, terdapat air dengan kapasitas 5 – 8 % dan sisanya adalah matriks organik (Nordin *et al.*, 2001).

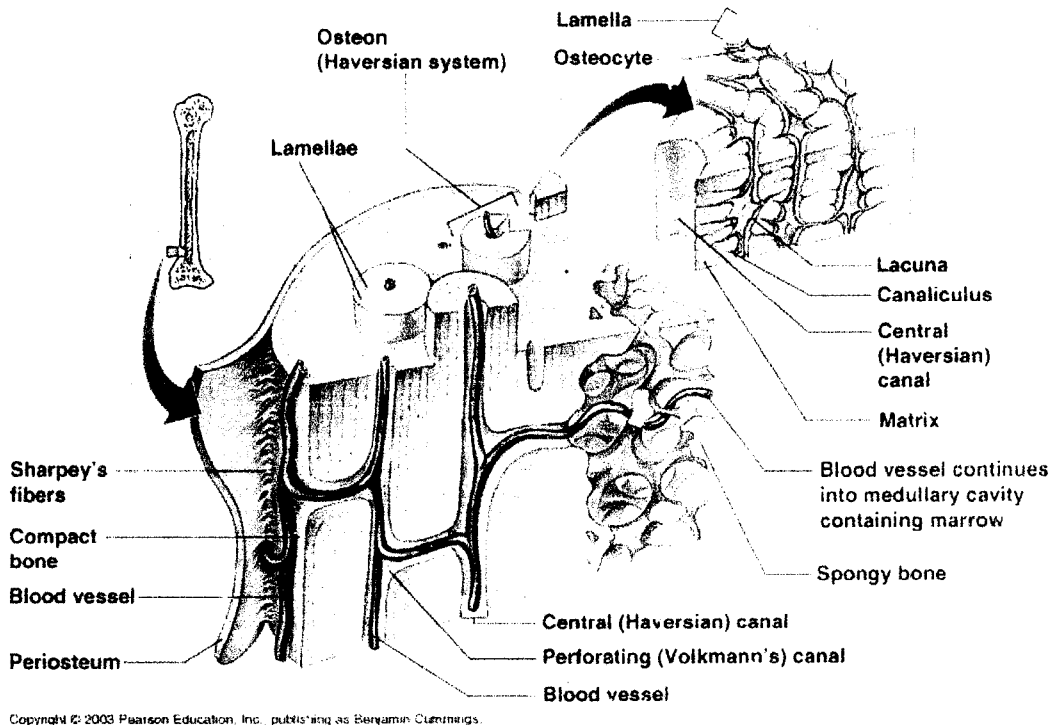
Kolagen sebagai material organik menyusun sekitar 90 % dari matriks ekstraseluler. *Weight dry* tulang didominasi sekitar 25 sampai 30 % oleh kolagen. Substansi dasar gelatin di sekitar serat kolagen terutama terdapat mineral protein polisakarida, atau glukosaminoglikan (GAGs). GAG disini berfungsi sebagai zat penyemen di antara lapisan serat kolagen mineral (Nordin *et al.*, 2001).

Komponen selular tulang terdiri atas osteogenik, sel prekursor, osteoblas, osteoklas, osteosit dan hematopoetik sumsum tulang. Osteoblas dewasa aktif secara metabolik dan membentuk sel tulang, kemudian menghasilkan osteoid yaitu matriks organik yang termineralisasi untuk membuat tulang kuat dan kaku. Pembentukan tulang dilanjutkan dengan mengubah beberapa osteoblas menjadi osteosit, sedangkan yang lain tetap pada permukaan periosteal atau endosteal tulang sebagai lapisan sel (Kalfas, 2001).

Osteosit merupakan osteoblas dewasa yang terperangkap di dalam matriks tulang, masing-masing jaringan osteosit memperluas proses sitoplasmik melewati kanalikuli ke pembuluh darah dan osteosit yang lain. Sel osteosit mengontrol konsentrasi ekstraseluler kalsium dan fosfor, serta dalam adaptasi perbaikan dengan interaksi sel untuk menyesuaikan dengan lingkungan lokal. Osteoklas memiliki inti, hormon dan mekanisme selular mengontrol absorpsi sel tulang. Sel-sel ini memiliki fungsi untuk melepaskan enzim hidrolitik, melarutkan matriks anorganik dan organik dari tulang rawan dan tulang keras (Kalfas, 2001).

Tulang dibagi menjadi 2 macam berdasarkan porositasnya, yaitu tulang kortikal (*compact bone*) dan tulang trabekular (*cancellous bone*). Tulang kortikal merupakan tulang yang padat dan kokoh, sedangkan tulang trabekular memiliki struktur berpori dan

disisipi oleh sumsum tulang. Baik tulang kortikal dan *cancellous* terdiri dari osteon (Clarke B, 2008). Mikrostruktur tulang kortikal dan *cancellous* dapat dilihat pada Gambar 2.1. Pada tulang manusia dewasa terdiri atas 80% tulang kortikal dan 20 % tulang trabekular secara keseluruhan.



Gambar 2.1 Mikrostruktur Tulang Kortikal dan Tulang *Cancellous*

(https://home.comcast.net/~pegglestoncbds/0503_StructreCompactBone_1.jpg)

Pada level mikroskopik, struktur dasar pada tulang adalah osteon yang disebut juga sebagai sistem haversian. Setiap pusat osteon terdapat saluran kecil yang disebut dengan kanal haversian, kanal haversian berisi pembuluh darah dan serabut saraf. Osteon terdiri dari serangkaian lapisan konsentris (*lamella*) pada matriks mineral yang mengelilingi kanal pusat (Nordin *et al.*, 2001).

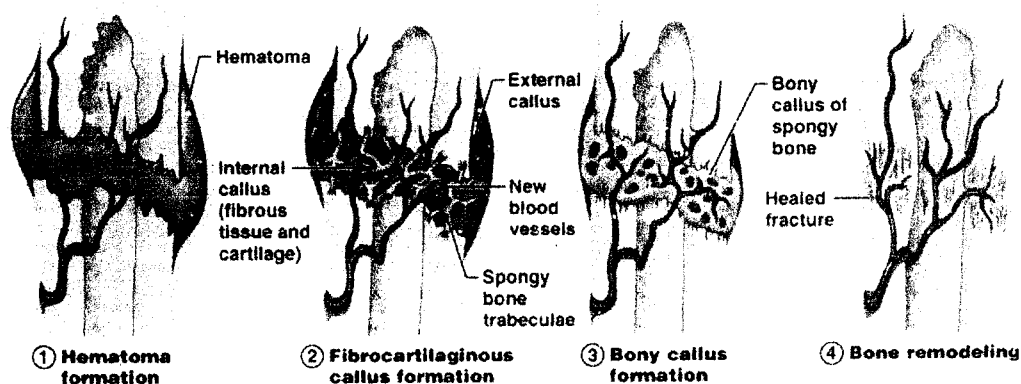
Tulang kortikal memiliki porositas sebesar $\pm 30\%$, sedangkan tulang *cancellous* pada *femoral neck* memiliki porositas $\pm 70\%$ dan tulang belakang porositasnya sebesar $\pm 95\%$ (Keaveny dalam Handayani, 2014). Densitas rata-rata tulang kortikal sebesar $\pm 1,85 \text{ g/cm}^3$, densitas ini hampir sama pada tiap lokasi tulang, sedangkan densitas rata-rata tulang *cancellous* berbeda-beda tergantung pada lokasi secara anatomis tulang tersebut (Handayani, 2014). Sifat mekanik pada tulang seperti *compressive strength*, *tensile strength* dan modulus elastisitasnya dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Sifat Mekanik Pada Tulang

<i>Tissue</i>	<i>Compressive strength, MPa</i>	<i>Tensile strength, MPa</i>	<i>Modulus of normal elasticity, GPa</i>
<i>Cortical tissue of bone (Orlovskii et al., 2002)</i>	88-164	89-114	3,9-11,7
<i>Cancellous Bone (Liebschner et al., 2003)</i>	2,23-7,36	-	67-445

2.2. Regenerasi Tulang

Regenerasi tulang bertujuan untuk mengembalikan jaringan tulang pada sifat fisik dan mekanik oleh variasi sistemik dan faktor lokal. Proses regenerasi atau penyembuhan tulang dibagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap inflamasi awal, tahap perbaikan dan tahap *remodelling* akhir (Kalfas, 2001).

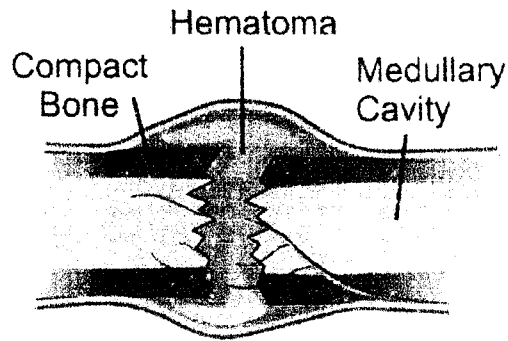
**Gambar 2.2** Tahap Regenerasi Tulang

(http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/anatomy%20&%20physiology/2010/2010%20exam%20reviews/exam%20%20review/06-14_BoneHealing.JPG)

a. Tahap Inflamasi

Pada saat terjadi cedera kerusakan tidak hanya terjadi pada sel, pembuluh darah dan matriks tulang saja, tetapi kerusakan juga terjadi pada jaringan lunak sekitarnya, termasuk otot dan saraf. Respon inflamasi yang ditimbulkan sesaat setelah terjadi cedera puncak pada 48 jam pertama dan menghilang hampir sepenuhnya pada 1 minggu pasca terjadinya fraktur (Sfeir *et al.*, 2005).

Di lokasi cedera, kerusakan pembuluh darah endotel menghasilkan aktivasi komplemen kaskade, agregasi platelet, pelepasan α -granule. Degranulasi platelet ini melepaskan *growth factor* dan memicu sinyal kemotaktik. Konduktor dari kaskade pembekuan darah adalah trombosit, yang memiliki tugas hemostasis dan mediator sinyal melalui elaborasi faktor pertumbuhan (Sfeir *et al.*, 2005).



Gambar 2.3 Tahap Inflamasi Pada Regenerasi Tulang (Sfeir *et al.*, 2005)

Leukosit polimorfonuklear (PMN), limfosit, monosit darah dan makrofag jaringan tertarik ke daerah luka dan diaktifkan untuk melepaskan sitokin yang dapat merangsang angiogenesis. Hematoma menumpuk dalam saluran medula antara ujung fraktur dan di bawah periosteum dan otot. Pembentukannya berfungsi sebagai plug hemostatik untuk membatasi perdarahan lebih lanjut serta menjadi jaringan fibrin yang menyediakan jalur migrasi seluler. Hematoma berfungsi sebagai sumber sinyal molekuler yang memulai peristiwa seluler penting untuk penyembuhan fraktur. Keseluruhan proses ini menghasilkan granuloma reparatif dan disebut sebagai kalus eksternal (Sfeir *et al.*, 2005).

b. Tahap Perbaikan (Reparatif)

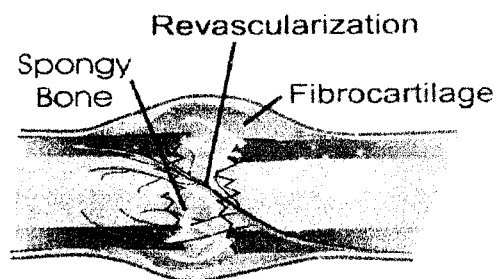
Tahap perbaikan terjadi dalam beberapa hari pertama, sebelum tahap inflamasi mereda dan berlangsung selama beberapa minggu. Hasil dari tahap ini akan menjadi pengembangan jaringan kalus reparatif di dalam dan sekitar lokasi cedera atau fraktur, yang pada akhirnya akan digantikan oleh tulang. Kalus berperan untuk meningkatkan stabilitas mekanik dengan mendukung situs lateral. Osteosit yang terletak pada daerah fraktur berakhir menjadi kekurangan nutrisi dan mati, yang dapat diamati dengan adanya lakuna kosong memanjang jauh dari lokasi fraktur (Sfeir *et al.*, 2005).

Periosteum rusak dan sumsum serta jaringan lunak sekitar lainnya juga dapat menyebabkan kontribusi jaringan nekrotik ke situs fraktur. Sementara jaringan ini sedang diserap, sel mesenchymal pluripoten mulai membentuk sel-sel lain seperti fibroblast, kondroblas dan osteoblas. Sel-sel ini dapat berasal dari jaringan yang terluka, sementara sel lain bermigrasi ke lokasi fraktur melalui pembuluh darah. Selama fase ini, kalus dapat terdiri dari jaringan ikat fibrosa, pembuluh darah, tulang rawan, tulang woven dan osteoid (Sfeir *et al.*, 2005).

Komposisi perbaikan jaringan dan tingkat perbaikan mungkin berbeda, bergantung pada lokasi dimana terjadinya fraktur, tingkat kerusakan jaringan lunak dan stabilitas mekanik. Tahap perbaikan ini memiliki fokus pada pengerasan intramembran, khondrogenesis dan pengerasan endokhondral (Sfeir *et al.*, 2005).

Pengerasan intramembran dimulai dalam beberapa hari pertama fraktur, namun proliferasi tampak berhenti sebelum 2 minggu setelah fraktur. Bukti histologis pertama menunjukkan aktivitas osteoblas pada tulang woven menentang korteks pada beberapa milimeter dari lokasi fraktur. Formasi tulang di daerah ini terjadi dengan diferensiasi osteoblas dari sel-sel prekursor, tanpa pembentukan tulang rawan sebagai langkah perantara. Pada daerah ini pembentukan tulang terjadi dalam kalus eksternal sering disebut sebagai kalus keras (Sfeir *et al.*, 2005).

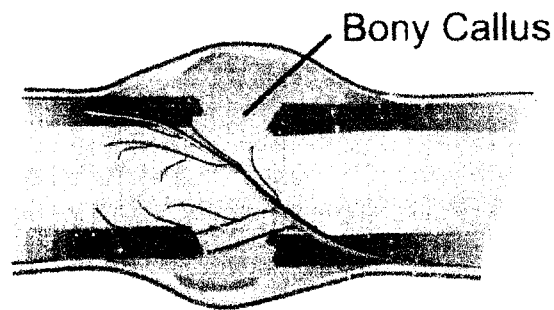
Ketika terjadi pengerasan intramembran, khondrogenesis terjadi di pinggiran kalus, dimana tekanan oksigen rendah. Sel dibedakan dari periosteum dan jaringan lunak eksternal yang berdekatan juga terlihat di jaringan granulasi diatas lokasi fraktur. Sel-sel ini menjadi lebih besar, mulai mengambil bentuk tulang rawan. Daerah jaringan fibrosa dan tulang rawan baru disebut sebagai kalus lunak dan akhirnya tulang rawan akan mengganti semua jaringan fibrosa (Sfeir *et al.*, 2005).



Gambar 2.4 Tahap Perbaikan (Reparatif) Pada Regenerasi Tulang (Sfeir C *et al.*, 2005)

Pada pertengahan minggu kedua selama penyembuhan patah tulang, terdapat tulang rawan yang melapisi lokasi fraktur dan kalsifikasi dimulai dengan proses osifikasi endokondral. Kodrosit hipertrofik pertama mengeluarkan proteoglycanases netral yang menurunkan glikosaminoglikan, karena tingginya tingkat glikosaminoglikan terbukti menghambat mineralisasi. Kemudian, sel-sel ini dan osteoblas kemudian merilis membran yang berasal dari vesikel yang mengandung kalsium fosfat kompleks ke dalam matriks (Sfeir *et al.*, 2005).

Saat hasil proses mineralisasi, kalus mengalami kalsifikasi menjadi lebih kaku. Kapiler tulang yang berdekatan menginvasi tulang rawan yang kaku, diikuti dengan invasi osteoblas, yang membentuk sponjiosa utama yang terdiri dari kedua tulang rawan dan tulang woven. Pada akhir tahap perbaikan ini kalus terdiri dari tulang woven, yang menghubungkan dua ujung fraktur dan proses *remodeling* dimulai (Sfeir *et al.*, 2005).



Gambar 2.5 Pembentukan Kalus Tulang Pada Tahap Perbaikan (Sfeir *et al.*, 2005)

c. Tahap *Remodeling*

Tahap *remodeling* merupakan tahap akhir dalam penyembuhan patah tulang dan diawali dengan penggantian tulang woven oleh tulang pipih dan resorpsi kalus berlebih. Tahap ini merupakan kegiatan remodeling tulang normal, dan terjadi pada beberapa tahun. *Remodeling* perbaikan fraktur setelah semua tulang woven digantikan terdiri dari resorpsi osteoklastik dan pembentukan tulang baru (Sfeir *et al.*, 2005).

Hasil dari tahap ini yaitu modifikasi secara bertahap dari daerah fraktur dibawah pengaruh beban mekanik sampai stabilitas yang optimal tercapai, dimana korteks tulang biasanya mirip dengan rancangan bentuk tulang sebelum terjadi fraktur (Sfeir *et al.*, 2005).



Gambar 2.6 Tahap *Remodeling* Pada Regenerasi Tulang (Sfeir *et al.*, 2005)

Pada fraktur yang terjadi pada tulang trebekular (*cancellous bone*) dapat dilakukan pemasangan *bone graft* untuk membantu proses regenerasi tulang. Salah satu *bone graft* yang dapat digunakan untuk perbaikan jaringan tulang *cancellous* adalah *bone graft* berupa *scaffold*.

2.3. Scaffold

Scaffold adalah salah satu *bone graft* yang dapat memberikan kondisi yang dibutuhkan oleh sel untuk berproliferasi dan mempertahankan fungsinya masing-masing (Hutmacher, 2000). *Scaffold* merupakan matriks sementara untuk penyembuhan tulang dan menyediakan lingkungan yang spesifik dan bentuk yang cocok untuk pengembangan jaringan. Tiga faktor penting untuk dapat menghasilkan jaringan tulang baru, yaitu sel progenitor osteogenik, *growth factor* osteokonduktif dan matriks osteokonduktif (Schieker, 2006).

Tujuan penggunaan *scaffold* tulang adalah untuk implantasi cacat tulang (*bone defect*) ukuran kritis, yang dalam banyak kasus perlu mempertahankan beban mekanisnya. Desain *scaffold* yang baik harus merangsang pertumbuhan tulang baru, pada tahap akhir tumbuh jaringan tulang asli dan *scaffold* terdegradasi secara sempurna (Liebschner, 2003). Osteoblast dan kondrosit dapat tumbuh pada *scaffold* yang secara perlahan-lahan akan diserap tubuh dan tumbuh sebagai jaringan tulang baru (Hutmacher, 2000).

Biomaterial *scaffold* yang dapat memberikan faktor osteogenik merupakan cara alternatif yang berpotensi untuk perbaikan jaringan cacat tulang klinis akibat trauma, reaksi tumor, dan perkembangan abnormal. Untuk ukuran dan bentuk yang relevan cacat tulang secara klinis, *scaffold* harus memungkinkan difusi nutrisi yang cukup dan sekaligus memberikan bantalan yang cukup kapabilitas untuk menahan beban. Porositas, ukuran pori dan permeabilitas saling terkait dengan sifat arsitekturnya yang telah terbukti mempengaruhi baik difusi dan sifat mekanik *scaffold*. Tidak seperti porositas, ukuran pori, dan beberapa parameter struktural lainnya yang telah dipelajari, permeabilitas mendefinisikan sifat fisik transport masal, yang pada dasarnya menggambarkan efek bahwa sifat struktural desain terhadap transpor cairan ke dan dari suatu konstruksi (Mitsak, 2011).

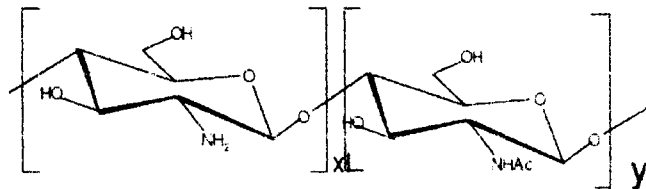
Scaffold yang ideal memiliki karakteristik tiga dimensi dan berpori, dengan jaringan pori yang saling berhubungan sebagai tempat untuk pertumbuhan sel dan transport aliran nutrisi serta limbah metabolik, *scaffold* harus biokompatibel dan *bioresorbable* dengan tingkat degradasi yang terkendali dan tingkat absorpsi yang cocok dengan pertumbuhan sel atau jaringan, selain itu *scaffold* juga harus memiliki sifat mekanik yang cocok dengan jaringan pada daerah implantasi (Hutmacher, 2000).

Selain itu, secara ideal *scaffold* juga harus mendukung keterikatan seluler, pertumbuhan dan diferensiasi. Mikroporositas dengan ukuran *scaffold* kurang dari 10 μm diperlukan untuk pertumbuhan kapiler dan interaksi antar matriks sel. Makroporositas dengan ukuran pori 150-900 μm memungkinkan untuk pasokan nutrisi dan menghilangkan sisa sel tumbuh pada *scaffold*. Untuk memenuhi berbagai tuntutan implantasi, *scaffold* harus mendukung adanya neovaskularisasi, merangsang jaringan sekitar untuk membentuk tulang baru dan *resorbable*, sehingga memungkinkan penggantian dengan tulang baru dalam jangka panjang. Bentuk luar dari *scaffold* disesuaikan dengan ukuran cacat tulang (Liebschner, 2003). Terdapat beberapa material yang dapat digunakan sebagai material pembentuk *scaffold*, salah satunya adalah kitosan yang memiliki sifat dapat membentuk pori.

2.3.1. Kitosan

Kitosan merupakan polimer linear dari $\alpha(1\rightarrow4)$ 2-amino-2-deoksi- β -D-glucopyranose yang mudah diperoleh dari N-deasetilasi, pada tingkat yang berbeda-beda yang ditandai dengan derajat deasetilasi dan merupakan kopolimer dari N-

asetilglukosamin dan glukosamin. Kitosan merupakan polimer alami yang melimpah dan terbarukan. Kitosan memiliki sifat yang sangat baik seperti, biodegradabilitas, biokompatibilitas, non-toksisitas dan dapat diserap (Dutta, 2004). Struktur kimia dari kitosan terdapat pada Gambar 2.7.



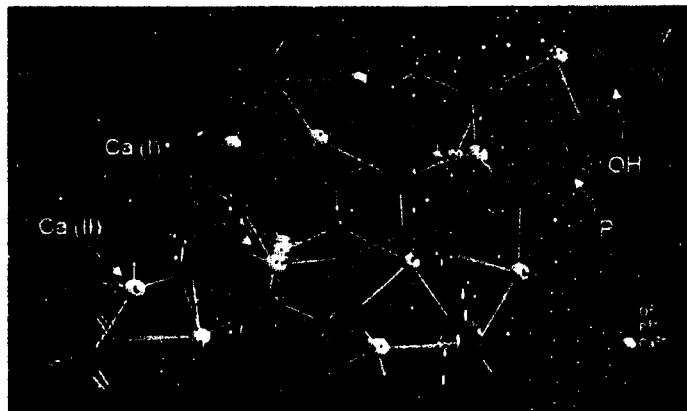
Gambar 2.7 Struktur Kimia Kitosan (Dutta , 2004)

Kitosan merupakan biopolimer yang telah banyak digunakan dalam aplikasi biomedis, ortopedi dan lain-lain. Kitosan memiliki sifat biokompatibilitas, biodegradabilitas, dapat membentuk pori, sesuai untuk pertumbuhan sel dan memiliki sifat antibakterial (Venkatesan *et al.*, 2012). Selain biokompatibilitas dan biodegradasi yang baik, kitosan juga dapat meningkatkan adhesi dan ekspresi fungsional osteoblast karena memiliki kesamaan struktur dengan glikosaminoglikan (Jiang, Liuyun *et al.*, 2008). Sifat kimia yang dimiliki kitosan yaitu kitosan merupakan polimer linear, memiliki gugus amino reaktif, memiliki gugus hidroksil yang reaktif dan *chelates* (senyawa yang mengandung ligan terikat pada atom logam pusat di dua titik atau lebih) pada ion logam transisi (Dutta , 2004). Kitosan berbasis komposit biomaterial memiliki kekuatan mekanik optimum dan interkoneksi porositas yang rendah untuk melekatnya sel, membutuhkan peningkatan lebih lanjut (Venkatesan *et al.*, 2012). Untuk meningkatkan proliferasi sel dalam *scaffold* dapat dilakukan dengan penambahan material seperti hidroksiapatit karena selain merupakan material anorganik tulang, hidroksiapatit juga bersifat osteokonduktif.

2.3.2. Hidroksiapatit (HA)

Timbunan garam kristalin dalam matriks organik tulang terutama terdiri atas kalsium dan fosfat. Rumus kimia garam kristalin utama yang dikenal sebagai hidroksiapatit adalah $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Guyton & John , 2006). Hidroksiapatit berpotensi untuk menggantikan *graft* tulang khususnya jenis *allograft* dan *xenograft* (Darwis *et al.*, 2008).

Hidroksiapatit memiliki kemiripan dengan komponen mineral anorganik jaringan keras dan memiliki biokompatibilitas yang baik, selain itu hidroksiapatit juga tidak menimbulkan efek sitotoksik, dan dapat berikatan langsung dengan tulang (Yoruç *et al.*, 2012). Sifat baik lainnya yang dimiliki hidroksiapatit adalah bioaktif dan *biodegradable*. Akan tetapi, hidroksiapatit memiliki kelemahan antara lain bersifat rapuh, sifat mekanik yang rendah dan memiliki struktur yang kurang stabil apabila bercampur dengan cairan tubuh (Darwis *et al.*, 2008).



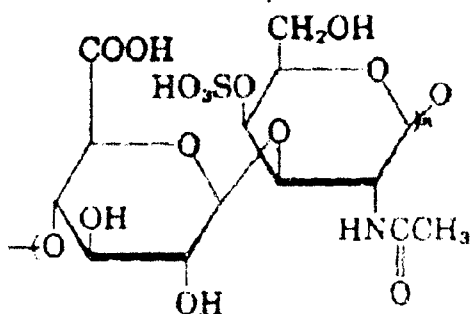
Gambar 2.8 Struktur Tiga Dimensi Hidroksiapatit

(<http://www.intechopen.com/source/html/17643/media/image2.png>)

Sifat *scaffold* yang ideal tidak hanya berpori dan tempat dimana proliferasi sel dapat terjadi, namun juga harus memiliki sifat mekanik yang sesuai dengan jaringan yang digantikan. *Scaffold* dengan tri-komponen telah terbukti lebih efektif untuk teknik jaringan. Untuk meningkatkan sifat mekanik pada *scaffold* dan memenuhi *scaffold* dengan tri-komponen dapat ditambahkan suatu material yang memiliki kemampuan untuk menghasilkan sifat yang diinginkan, salah satunya yaitu kondroitin sulfat.

2.3.3. Kondroitin Sulfat

Kondroitin sulfat merupakan polisakarida bercabang dan tersulfasi (Venkatesan *et al.*, 2012). Kondroitin sulfat terdiri dari unit berulang disakarida dari asam sulfat D-glukoronat dan N-asetil-D-galaktosamin yang melekat pada protein inti dalam bentuk proteoglikan (Vittayont & Jaroenviriyapap, 2013). Struktur kimia dari kondroitin sulfat ditunjukkan oleh Gambar 2.9.

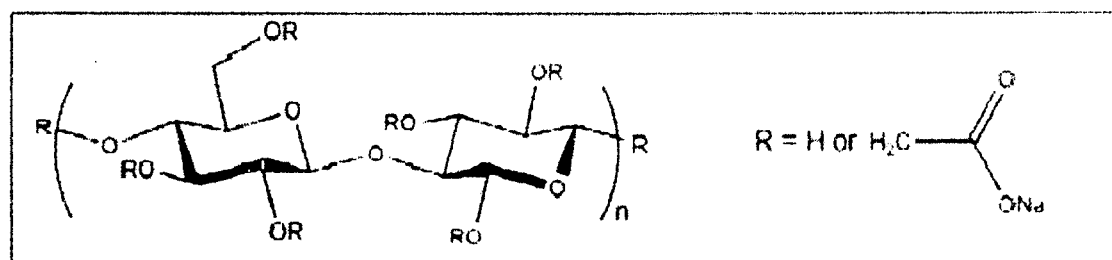


Gambar 2.9 Struktur Kimia Kondroitin Sulfat (Oprea *et al.*, 2009)

Dalam jaringan tulang rawan, kondroitin sulfat berperan menjaga integritas elastisitas dalam jaringan (Martin, 2013). Kondroitin sulfat merupakan komponen struktural penting dalam jaringan ikat dan tulang rawan.. Kondroitin sulfat juga telah dikenal berperan penting secara biologis dalam tubuh manusia, seperti kontrol ion periselular, melindungi jaringan ikat, penanganan osteoarthritis, pelindung kornea dan aktivitas koagulatif. Penemuan kondroitin sulfat yang memiliki berbagai aktivitas fungsional memberikan daya guna sebagai bahan fungsional dalam bidang pengobatan, kosmetik dan beberapa bahan makanan (Vittayont & Jaroenviriyapap, 2013).

2.3.4. Carboxymethyl Cellulose (CMC)

Carboxymethyl cellulose merupakan suatu turunan dari selulosa dengan gugus karboksimetil (-CH₂-COOH) berwarna putih, tidak berbau, padat, dapat digunakan sebagai bahan penstabil (Sumardikan, 2007). Turunan ini terbentuk dengan adanya reaksi alkali dengan asam kloroasetat. Pada Gambar 2.10 mengenai struktur *carboxymethyl cellulose* yang dapat diamati adalah adanya gugus hidroksil yang mengambil peran penting dari adanya derajat substitusi yang akan menentukan fungsi dan kegunaannya.



Gambar 2.10. Struktur kimia CMC

CMC yang larut dalam air memiliki derajat substitusi lebih dari 0,5, yang memiliki kekentalan yang tinggi. Derajat substitusi adalah rata-rata nomor dari grup karboksimetil per unit *anhydroglucose*. Secara teori nilai maksimum untuk derajat substitusi adalah 3. Derajat substitusi untuk CMC komersial berkisar antara 0.5 - 1.5, yang memiliki efek pengentalan, memiliki sifat melindungi koloid dan adhesif (Etri, 2012). CMC biasa digunakan karena memiliki kekentalan yang tinggi, non-toksik dan bersifat tidak alergi. Kemampuan dari CMC lainnya yaitu dapat menyerap air dengan jumlah yang banyak walaupun dalam viskositas yang rendah terutama ketika bertemu dengan garam Ca^{2+} (Luc Teot, 2008 dalam Adhitioso, 2014).

Menurut Jiang *et al.*, 2008, CMC memiliki sifat biodegradabel, biokompatibilitas dan memiliki kemiripan struktur dengan kitosan sehingga memungkinkan terjadinya ikatan ionik antara CMC dan kitosan.



BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian adalah mendapatkan material *scaffold* tulang yang berasal dari komposit hidroksiapatit-kitosan/kondroitin sulfat dan komposit hidroksiapatit-kitosan/CMC. Tujuan umum ini akan tercapai mengacu pada tujuan khusus penelitian yaitu sebagai berikut.

3.1.1. Tujuan khusus tahun pertama:

1. Mengetahui pengaruh variasi komposisi kondroitin sulfat terhadap karakteristik gugus fungsi, morfologi, porositas, biodegradasi, sifat mekanik kuat tekan dan sitotoksisitas *scaffold* komposit hidroksiapatit- kitosan-kondroitin sulfat sebagai kandidat *bone graft*.
2. Mendapatkan komposisi terbaik dari variasi komposisi kondroitin sulfat pada *scaffold* komposit hidroksiapatit- kitosan-kondroitin sulfat sebagai kandidat *bone graft*.

3.1.2. Tujuan tahun kedua:

1. Menentukan pengaruh variasi *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) pada komposit hidroksiapatit-kitosan/CMC
2. Menentukan komposisi *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) yang tepat pada komposit hidroksiapatit-kitosan/CMC

3.2. Manfaat Penelitian

Kerusakan tulang merupakan masalah kesehatan yang serius dalam setiap pekerjaan klinik karena tulang merupakan komponen yang sangat penting dalam tubuh manusia sebagai penyokong fungsi tubuh, sehingga penggunaan material yang tepat merupakan faktor keberhasilan dalam penanganan *bone defect*. Material yang digunakan harus bersifat dapat diterima oleh tubuh (*biocompatible*), tidak korosif, desain yang tepat dan dapat berintegrasi dengan cepat.

Hidroksiapatit (HA) merupakan salah satu bahan yang paling efektif digunakan dalam bidang orthopedic untuk memperbaiki bagian tulang yang rusak karena kecelakaan

atau penyakit. Kelebihan material ini disamping tahan korosi, juga bersifat bioaktif yang dapat merangsang tumbuhnya sel tulang. Telah dihasilkan material HA dari tulang sotong dan telah diuji efektifitasnya pada pertumbuhan tulang mencit. Namun, HA rapuh dan memiliki modulus elastisitas 2-5 kali lipat dari modulus elastisitas tulang, sehingga perlu dicampur dengan material polimer kitosan. Namun demikian hidroksiapatit-kitosan masih memiliki kuat tekan yang rendah sehingga perlu ditambahkan material lain yaitu kondroitin sulfat dan *Carboxymethyl cellulose* (CMC). Kondroitin sulfat dipilih karena merupakan komponen struktural penting dari tulang rawan sedangkan CMC merupakan bahan alami yang memiliki kemampuan *biodegradable* dan biokompatibel yang diperoleh dari selulosa alami yang memiliki struktur yang sangat mirip dengan kitosan sehingga dapat terjadi struktur jaringan yang kuat antara CMC dengan kitosan.

Dengan melakukan penelitian ini diharapkan dapat menghasilkan material *scaffold* tulang dari material komposit tiga komponen yaitu hidroksiapatit-kitosan/kondroitin sulfat atau hidroksiapatit-kitosan/CMC dengan sifat-sifat yang unggul yaitu biokompatibel, biodegradabel dan sifat mekanik yang memenuhi syarat sebagai material implan tulang

Hasil temuan dan luaran penelitian yang ditargetkan berupa publikasi internasional yang diharapkan dapat memperkaya riset dibidang pengembangan material maju di bidang kesehatan. Jika hal ini dikaitkan dengan arah riset nasional dan *roadmap* penelitian Universitas Airlangga yang salah satu prioritasnya pengembangan riset-riset unggulan di bidang material baru dan terbarukan (*new and renewable material*) penelitian yang diusulkan ini **sangat penting** untuk dilakukan karena menghasilkan material tulang yang biokompatibel, biodegradabel dan memiliki sifat mekanik yang memenuhi syarat sebagai material *scaffold* tulang.

BAB IV

METODE PENELITIAN



4.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian akan dilaksanakan selama 2 tahun. Tempat penelitian pembuatan sampel komposit *scaffold* akan dilaksanakan di Laboratorium Fisika Material Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga dan Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya untuk proses *freeze drying* pembuatan sampel komposit *scaffold*.

Karakterisasi uji gugus fungsi dan uji morfologi dilakukan di Teknik Material dan Metalurgi- Institut Teknologi 10 November Surabaya. Uji porositas dan biodegradasi dilakukan di Laboratorium Fisika Material Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga. Uji kuat tekan dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama Fakultas Farmasi Kampus B Universitas Airlangga. Uji Sitotoksitas di Laboratorium MTT *Assay* Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA).

4.2 Bahan dan Alat Penelitian

4.2.1 Bahan Penelitian

a. Bahan Sintesis

Bahan yang digunakan untuk pembuatan sampel komposit *scaffold* yaitu hidroksiapatit komersil produk Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo Surabaya, kitosan dengan DA 70 % merk, kondroitin sulfat merk, asam asetat 2 %, larutan NaOH 10 %, CMC dan aquades.

b. Bahan Uji

Bahan yang digunakan untuk uji karakteristik pada komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit adalah etanol dan alkohol terdehidrasi untuk uji porositas. Pembuatan larutan *Simulation Body Fluid* (SBF) digunakan $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, NaCl, $NaHCO_3$, Na_2SO_4 , KCl, HCl, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ dan $(HOCH_2)_3CNH_2$.

4.2.2 Alat Penelitian

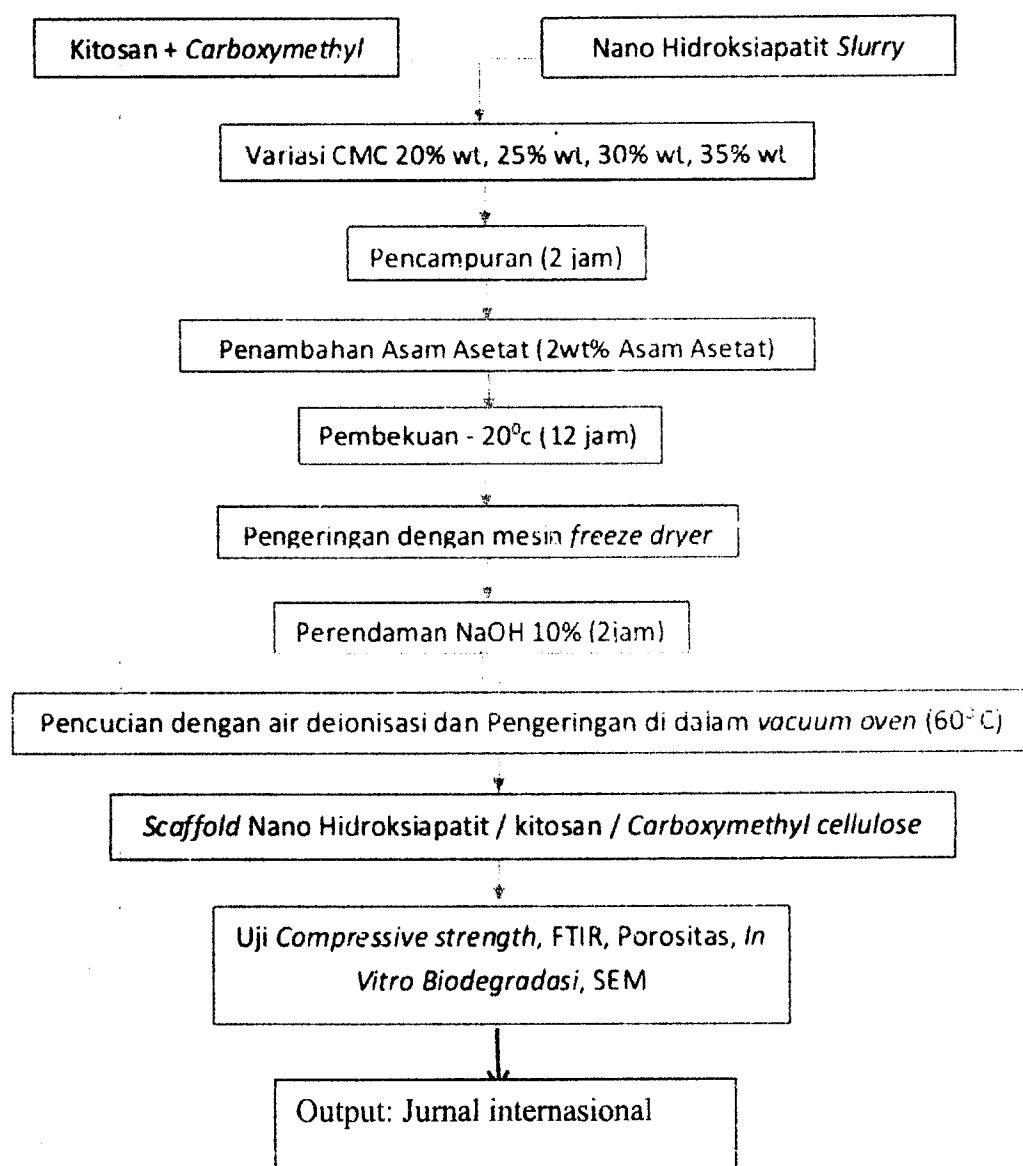
Alat yang digunakan untuk pembuatan sampel komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit untuk aplikasi *bone graft* meliputi alat sintesis dan alat uji.

Alat sintesis yang digunakan antara lain, neraca digital (Excellent scale BL-6000), gelas ukur, gelas *beaker*, pipet tetes, cawan petri berukuran 35 x 10 mm, 79 - 1 *magnetic stirrer* dan *freeze dryer* (LYOFAC GT 2).

Alat yang digunakan untuk uji karakteristik komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit untuk aplikasi *bone graft* antara lain FTIR (*from American Perkin Elmer Co.*), SEM (*inspect S50, FEI Corp., Jepang*), uji kuat tekan (*Shimadzu Universal Testing Machine*) dan uji MTT Assay (*Elisa reader*).

4.3 Prosedur Penelitian Tahun Kedua

Pada tahun kedua dilakukan sintesis dan karakterisasi komposit Hidroksiapatit- Kitosan/CMC sebagai kandidat *scaffold* tulang dengan prosedur penelitian ditunjukkan pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1. Skema penelitian tahun kedua

Data hasil penelitian dianalisis sifat biodegradabilitas dan sifat mekaniknya, selanjutnya ditentukan komposisi terbaik yang menghasilkan sifat-sifat terbaik sebagai bone graft. Kemudian dilakukan perbandingan antara kedua komposit hasil penelitian tahun pertama dan tahun kedua untuk dipilih komposit yang paling bagus sebagai *bone graft*.

4.3.1. Pembuatan sampel

Pembuatan sampel terdiri dari 3 tahapan pelaksanaan yaitu pembuatan n-HA *slurry*, pencampuran n-HA *slurry* dengan CH/CMC serta proses *freeze drying* sampel.

4.3.1.1. Pembuatan n-HA *slurry*

n-HA *slurry* dibuat dengan cara mencampurkan 0,5 g PVA dan aquades 98 %wt diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam kemudian ditambah serbuk n-HA sebanyak 4 g sedikit demi sedikit sambil terus diaduk selama 1 jam sehingga diperoleh n-HA *slurry*.

4.3.1.2 .Pencampuran n-HA/CH/CMC

CH dan CMC dicampurkan dengan variasi komposisi masing-masing seperti pada Tabel 3.1. Campuran CH dan CMC kemudian ditambahkan pada n-HA *slurry* yang telah dibuat sebelumnya dan diaduk kurang lebih selama 2 jam dengan *magnetic stirrer* hingga CH dan CMC tercampur dengan n-HA *slurry*. Proses ini diikuti dengan penambahan asam asetat 2 %wt dan terus diaduk hingga 2 jam.

Tabel 4.1 Variasi Komposisi n-HA/CH/CMC

Sampel	n-HA : CH : CMC (wt%)	n-HA (g)	CH (g)	CMC (g)
A	40:60:0	4	6	0
B	40:55:5	4	5,5	0,5
C	40:50:10	4	5	1
D	40:45:15	4	4,5	1,5
E	40:40:20	4	4	2

4.3.1.3 . Proses *freeze drying*

Campuran bahan kemudian dibekukan pada suhu -80°C selama 12 jam. Setelah itu sampel yang sudah membeku dipindahkan ke dalam ruang *drying* kurang lebih selama 48 jam sehingga diperoleh salah satu sampel seperti pada Gambar 3.2. Sampel kemudian direndam dalam NaOH 10% selama 2 jam untuk menetralkan residu asam asetat yang terdapat pada sampel. Sampel yang telah direndam dalam NaOH kemudian dicuci dengan

menggunakan aquades hingga pH 7 dan dikeringkan dalam *oven* pada suhu 60°C dengan tujuan untuk menghilangkan air yang tersisa pada sampel tersebut.

4.4 Karakterisasi dan Analisis Sampel

4.4.1 Uji Gugus Fungsi

Uji gugus fungsi dilakukan untuk mengetahui adakah gugus baru yang terbentuk selain kitosan, kondroitin sulfat, dan hidroksiapatit setelah terbentuk komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit. Alat yang digunakan untuk uji gugus fungsi ini adalah *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (FTIR) Tensor 27 merk Bruker. Sampel komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit yang berbentuk seperti kubus diletakkan di atas sinar inframerah pada FTIR dengan kisaran pemindaian antara 4000-450 cm^{-1} (Tripathi, 2011).

4.4.2 Uji Morfologi

Uji morfologi dilakukan untuk mengetahui porositas dari komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit. Uji ini dilakukan menggunakan SEM (*inspect S50*, FEI Corp., Jepang). Dalam pengujian ini sampel berbentuk kubus, ditembak dengan *electron beam* menggunakan *electron gun* pada SEM. Hasil dari uji morfologi ini adalah citra morfologi dari sampel (Setiawan, 2014).

4.4.3 Uji Porositas

Porositas suatu material dapat ditentukan dengan menggunakan metode perpindahan cairan. Langkah awal yang dilakukan adalah mengukur berat *scaffold* dan volume etanol. Setelah itu, *scaffold* direndam dalam alkohol terdehidrasi selama 48 jam, kemudian *scaffold* ditimbang setelah terjadi penyerapan alkohol Porositas dari sampel dapat dihitung dengan Persamaan 1 (Venkatesan *et al.*, 2012). Data yang diperoleh berupa W_1 yaitu berat awal *scaffold*, W_2 yaitu berat etanol dan *scaffold* dan W_3 yaitu berat etanol setelah *scaffold* diambil.

$$\text{Porositas} = \frac{(W_1 - W_3)}{(W_2 - W_3)} \dots \dots \dots 1$$

dimana W_1 adalah berat awal *scaffold*, W_2 adalah jumlah dari bobot etanol dan *scaffold* yang telah direndam, W_3 merupakan berat etanol setelah *scaffold* diambil. Dari uji porositas ini akan diketahui nilai porositas untuk setiap sampel *scaffold*.

4.4.4 Uji Biodegradasi

Degradasi *scaffold* dapat diketahui dengan uji biodegradasi. Dalam uji ini digunakan larutan *simulated body fluid* (SBF). Larutan SBF dibuat dengan aqua trides 1 liter, NaCl 7,996 g, NaOHCO₃ 0,350 g, KCl 0,224 g, K₂HPO₄.3H₂O 0,228 g, MgCl₂.6H₂O 0,305 g, HCl (1M) 40 mL, CaCl₂.2H₂O 0,278 g, Na₂SO₄ 0,071 g dan (HOCH₂)₃CNH₂ 6,057 g.

Aqua trides 1 liter diaduk menggunakan *magnetic stirrer*, kemudian bahan kimia diatas dimasukkan satu persatu sesuai dengan urutan seperti diatas, dengan ketentuan untuk penambahan satu bahan kimia harus diaduk hingga larut, baru ditambahkan bahan kimia yang berikutnya. Suhu larutan diatur hingga 36,5°C dengan pH larutan dibuat hingga 7,4 dengan larutan HCl 1M. Larutan SBF siap digunakan, suhu penyimpanan larutan SBF adalah 5 - 10°C (Warastuti *et al.*, 2013).

Sampel komposit *scaffold* kitosan-kondroitin sulfat/hidroksiapatit dimasukkan ke dalam botol plastik dengan 15 mL larutan SBF, kemudian botol ditutup rapat dan disimpan pada suhu 37°C. Untuk uji biodegradasi larutan SBF yang berisi sampel komposit *scaffold* ini disimpan selama 2 sampai 12 minggu untuk pengamatan (Warastuti *et al.*, 2013). Degradasi tiap sampel dapat dihitung dengan Persamaan 2. Pada penelitian ini uji biodegradasi diamati dalam jangka waktu 2, 4, dan 8 minggu.

$$W_L = \frac{(W_0 - W_1)}{W_0 \times 100\%} \dots \dots \dots 2$$

dimana, W_0 dan W_1 merupakan berat sampel sebelum dan sesudah perendaman. Uji biodegradasi dilakukan pada tiap sampel sehingga dapat diketahui degradasi pada tiap-tiap sampel (Venkatesan *et al.*, 2012).

Data yang didapatkan pada uji biodegradasi menggunakan larutan SBF ini yaitu W_0 merupakan berat sampel sebelum perendaman, W_1 merupakan berat sampel sesudah

perendaman, dan W_L merupakan penurunan berat *scaffold* yang diperoleh dari Persamaan 2.

4.4.5 Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksitas dilakukan menggunakan metode MTT *Assay*. Pada persiapan kultur sel dilakukan di dalam laminar flow. Kultur sel yang digunakan dalam uji sitotoksitas dengan MTT *Assay* adalah kultur sel BHK-21 dalam bentuk monolayer dengan media Eagle's dan FBS 5 % ditanam di dalam botol kultur *roux* kemudian dilakukan perlakuan dalam inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.

Selanjutnya, kultur sel yang telah diinkubasi dicuci dengan PBS sebanyak 5 kali dengan tujuan untuk membuang serum yang tersisa pada kultur sel. Kemudian ditambahkan *trypsin versene* untuk melepaskan sel dari dinding botol yang bertujuan untuk memisahkan ikatan antar sel agar sel tidak mengumpul. Sel dengan kepadatan 2×10^5 dimasukkan dalam 100 μL medial (media eagle's 86 %, *penicilin streptomycin* 1 % *fungizone* 100 unit/mL), setelah itu dipindahkan dalam 96-*microwell plate*.

Setiap sampel disterilisasi dengan sinar UV selama lebih dari semalam, 0,05 gram dilarutkan dalam 1ml etanol. Kemudian larutan sampel dimasukkan dalam 96-*microwell plate* sebanyak 50 μL dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pereaksi MTT 5 mg/mL yang sudah dilarutkan dalam PBS ditambahkan ke media sebanyak 10 μL untuk setiap *well*, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Pada setiap *well* ditambahkan pelarut DMSO sebanyak 50 μL dan di sentrifuse 30 rpm selama 5 menit.

Setelah dilakukan proses sentrifuse, optikal densitas sel dapat dihitung dengan menggunakan alat Elisa Reader. Hasil pengujian dapat dihitung menggunakan Persamaan 3 dimana suatu bahan tidak toksik jika persentase sel hidup lebih dari 50 %.

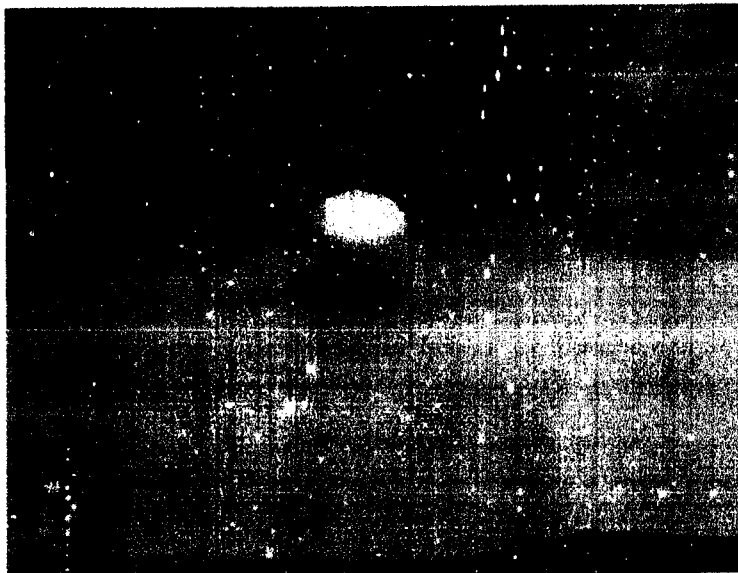
$$\% \text{ Viabilitas Sel} = \frac{OD \text{ Perlakuan} - OD \text{ Kontrol Media}}{OD \text{ Kontrol Sel} - OD \text{ Kontrol Media}} \times 100 \% \dots \dots \dots (3)$$

BAB V

HASIL DAN LUARAN PENELITIAN

5.1. Hasil sintesis scaffold n-HA/CH/CMC

Pada penelitian tahun kedua dihasilkan sampel komposit *scaffold* nano-Hidroksiapatit/Kitosan/*Carboxymethyl cellulose* (n-HA/CH/CMC) yang salah satunya ditunjukkan pada Gambar 4.1. Pembuatan sampel ini menggunakan metode *freeze drying* dengan 5 variasi komposisi CH dan CMC yang tercantum pada Tabel 4.1.



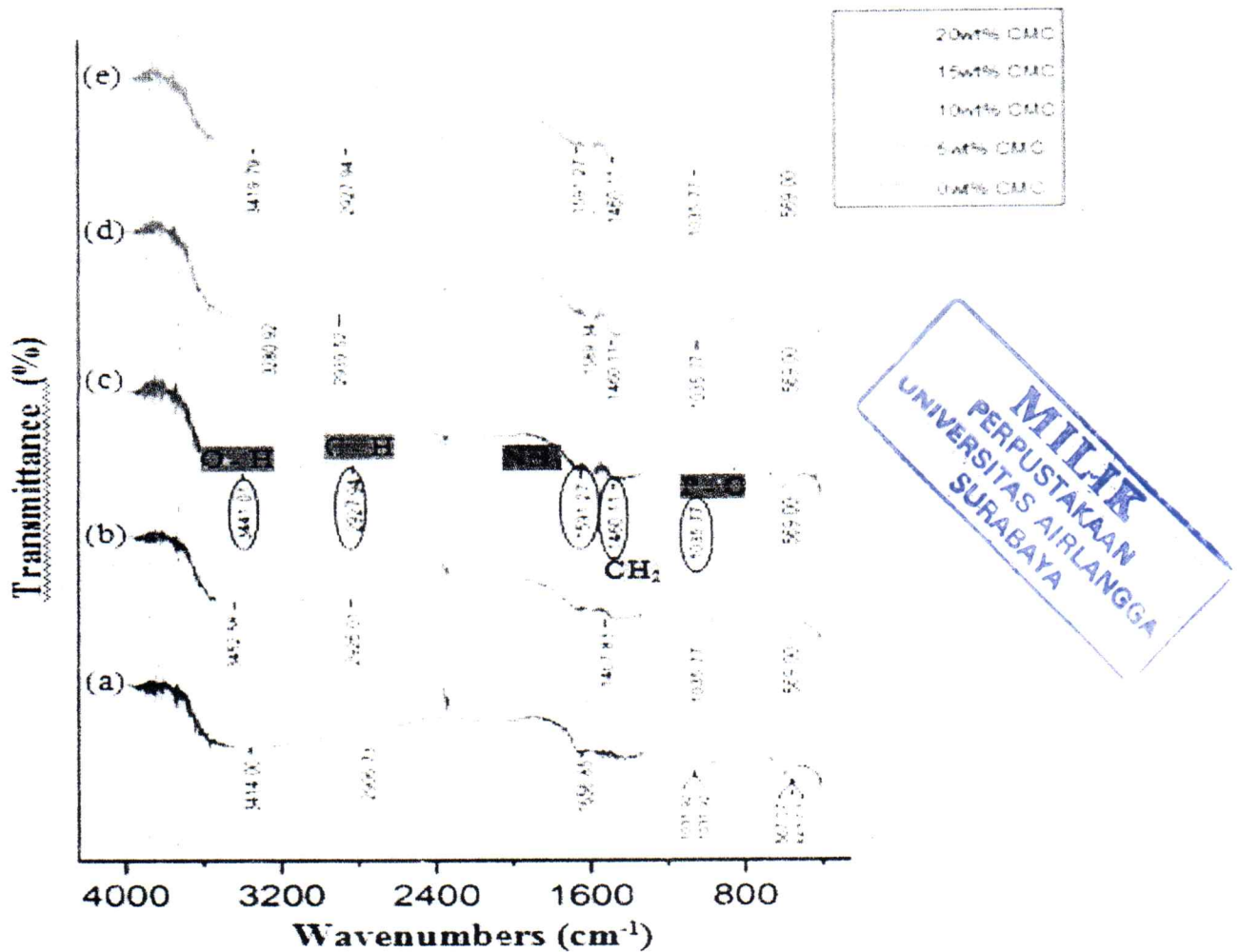
Gambar 5.1 Sampel komposit *scaffold* n-HA/CH/CMC

Lima sampel komposit *scaffold* n-HA/CH/CMC kemudian diuji dengan tujuan untuk mengetahui kelayakan komposit *scaffold* sebagai tempat untuk bertumbuhnya jaringan tulang baru. Pengujian atau karakterisasi sampel meliputi uji identifikasi gugus fungsi, uji morfologi, uji porositas, uji kuat tekan dan uji biodegradasi.

5.2 Hasil Karakterisasi Sampel

5.2.1 Uji identifikasi gugus fungsi

Fourier Transformation Infrared (FTIR) dalam penelitian ini digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dan interaksi antar bahan komposit. Gambar 5.2 merupakan hasil spektra IR untuk kelima sampel. Hasil identifikasi gugus fungsi dari tiap-tiap bilangan gelombang ($\bar{\nu}$) pada spektra IR (Gambar 5.2) disajikan dari bagian kiri hingga kanan.



Gambar 5.2 Spektrum FTIR komposit n-HA/CH/CMC

Berdasarkan Gambar 5.2, gugus fungsi dari bahan n-HA, CH dan CMC terdapat pada seluruh sampel. Hal ini dibuktikan dengan adanya gugus O – H dan P – O sebagai keberadaan dari n-HA, adanya gugus NH_2 , C – H dan O – H sebagai keberadaan CH, serta adanya gugus O – H, C – H, COO^- dan CH_2 sebagai keberadaan CMC. Hal ini membuktikan bahwa seluruh sampel teridentifikasi dengan puncak-puncak *transmittan* pada Gambar 5.2a yang masih dapat ditemukan pada 4 sampel lainnya dengan sedikit pergeseran yang menandakan bahwa tidak ada perubahan gugus-gugus fungsi n-HA dan CH setelah penambahan CMC.

Gugus P – O untuk bahan n-HA pada Gambar 5.2a terdeteksi pada bilangan gelombang $1031,92 \text{ cm}^{-1}$ yang kemudian bergeser menjadi $1035,77 \text{ cm}^{-1}$ pada Gambar 5.2c, dimana hal ini dapat diindikasikan sebagai adanya interaksi bahan n-HA yaitu gugus

PO_4^{3-} dengan bahan CH dan CMC yang merujuk mekanisme reaksi pada Gambar 2.5. Kemudian untuk bahan CH pada Gambar 5.2a, gugus NH_2 dengan bilangan gelombang $1656,85 \text{ cm}^{-1}$ pada komposit n-HA/CH bergeser menjadi $1591,27 \text{ cm}^{-1}$ pada komposit n-HA/CH/CMC (Gambar 5.2c) dapat diindikasikan sebagai interaksi gugus NH_3^+ dengan bahan n-HA dan CMC. Pada sampel B (Gambar 5.2b) gugus fungsi untuk CMC teridentifikasi sebagai CH_2 yaitu pada bilangan gelombang $1467,83$ dimana pada sampel C, D dan E (Gambar 4.2 c,d,e) gugus CH_2 terdeteksi pada bilangan gelombang yang sama yaitu $1460,11 \text{ cm}^{-1}$. CMC juga memiliki gugus spesifik COO^- yang tidak terdeteksi pada sampel B dengan kandungan CMC 5%wt dan hanya terdeteksi pada sampel C, D dan E yaitu berturut-turut $1591,27$; $1589,34$; $1591,27 \text{ cm}^{-1}$.

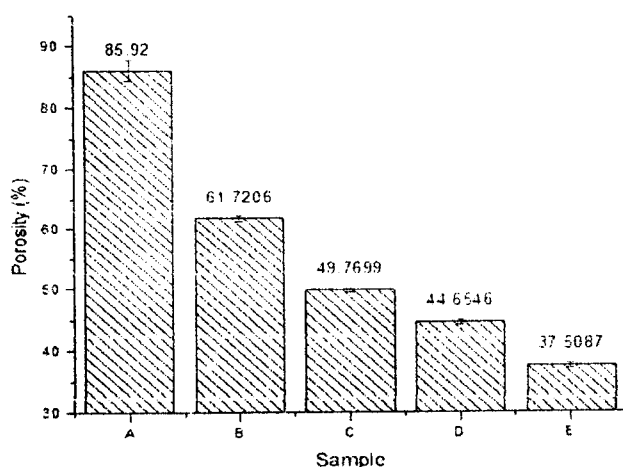
Berdasarkan spektrum FTIR diatas (Gambar 4.2b,c,d,e), gugus *carboxyl* (COO^-) dari bahan CMC yang berperan dalam ikat silang (*cross link*) dengan gugus NH_3^+ dari bahan CH terindikasi memiliki bilangan gelombang yang sama. Sehingga disimpulkan bahwa gugus NH_3^+ pada CH berikatan dengan gugus COO^- pada CMC yang memungkinkan untuk membentuk ikatan lebih kuat yang mana berpengaruh pada nilai *compressive strength*nya (Jiang *et al.* 2009)

5.2.2 Uji porositas

Hasil dari uji porositas sampel n-HA/CH/CMC dapat dilihat pada Tabel 5.1 dan Gambar 5.3. Menurut Hawkins. (2001) besarnya porositas *cancellous bone* berkisar antara 30% - 90%. Pada Tabel 5.2 dapat diketahui bahwa hasil pengujian porositas sampel yang memiliki kandungan CMC (sampel B, C, D dan E) termasuk dalam rentang porositas yang diharapkan yaitu berkisar antara 37,5087 – 61,7206%. Sedangkan besarnya porositas untuk sampel A dengan komposisi n- HA/CH mencapai porositas sebesar 85,92%. Porositas terbesar diantara sampel dengan kandungan CMC dimiliki oleh sampel B yaitu sebesar 61,7206%. Namun berdasarkan uji kuat tekan, sampel B hanya memiliki nilai kuat tekan sebesar 1,5714 MPa yang mana nilai ini tidak memenuhi standar literatur untuk batas minimal nilai kuat tekan tulang *cancellous* yaitu 2 MPa (Ficai *et al.*, 2011).

Tabel 5.2 Hasil Uji Porositas

Sampel	Komposisi CMC	$(\bar{P} \pm \Delta P)\%$
A	0%wt	(85,9200±1,6475)
B	5%wt	(61,7206±0,5396)
C	10%wt	(49,7699±0,2380)
D	15%wt	(44,6546±0,3809)
E	20%wt	(37,5087±0,4364)



Gambar 5.3. Persen Porositas scaffold nHA/CH/CMC

Pada Gambar 5.3 tampak bahwa semakin banyak kandungan CMC pada sampel, maka porositas yang dihasilkan semakin menurun. Hal ini disebabkan karena semakin banyaknya kandungan CMC yang mengikat CH sebagai pembentuk pori. Sehingga menghasilkan semakin banyak ikatan kuat antara CH dan CMC menyebabkan porositas yang semakin menurun seiring dengan bertambahnya kandungan CMC. Karakteristik *scaffold* sebagai implan tulang tidak hanya dilihat dari uji porositasnya saja namun juga dari uji kuat tekannya dimana nilai kuat tekan sampel tersebut harus memenuhi rentang kuat tekan tulang yaitu 2 – 12 MPa. Dalam penelitian ini, sampel C dianggap sebagai sampel terbaik diantara sampel lain dengan porositas sebesar 49,7699%.

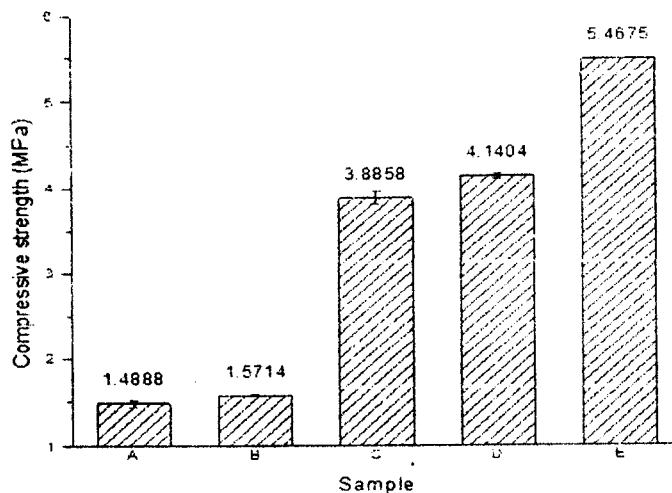
5.2.3 Uji kuat tekan

Teknik rekayasa jaringan tulang (BTE) memiliki kriteria nilai kuat tekan minimal yang harus dimiliki oleh *scaffold*. Nilai kuat tekan untuk tulang *cancellous* berkisar antara 2 – 12 MPa (Ficai *et al.*, 2011) sehingga nilai kuat tekan *scaffold* setidaknya berada dalam rentang literatur tersebut. Hasil dari uji kuat tekan sampel n-HA/CH/CMC dapat dilihat pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.4.

Berdasarkan Tabel 5.2 dapat dilihat bahwa tanpa adanya kandungan CMC pada sampel A nilai kuat tekan yang dihasilkan cenderung paling rendah apabila dibandingkan dengan sampel lain dan tentunya nilai kuat tekan sampel A tidak masuk pada rentang kuat tekan tulang *cancellous*. Sedangkan untuk sampel B hingga E semakin meningkatnya komposisi CMC dalam sampel tersebut nilai kuat tekannya cenderung untuk semakin meningkat. Hal ini dapat disebabkan oleh lebih banyak komposisi CMC dalam sampel maka semakin banyak pula ikatan kuat antara CH dan CMC yang dihasilkan sehingga dapat menambah besar nilai kuat tekannya. CH memiliki muatan positif dan CMC memiliki muatan negatif sehingga keduanya dapat membentuk ikatan ion dan terbentuk *cross link* (Tiitu *et al.*, 2006) sehingga kuat tekan sampel akan cenderung meningkat seiring dengan bertambahnya komposisi CMC dalam sampel.

Tabel 5.2 Hasil Uji Kuat Tekan

Sampel	Komposisi CMC	$(\bar{\sigma} \pm \Delta\sigma)$ MPa
A	0%wt	(1,4888±0,0465)
B	5%wt	(1,5714±0,0065)
C	10%wt	(3,8858±0,0757)
D	15%wt	(4,1404±0,0357)
E	20%wt	(5,4675±0,0012)



Gambar 5.4. Nilai Kuat Tekan scaffold nHA/CH/CMC

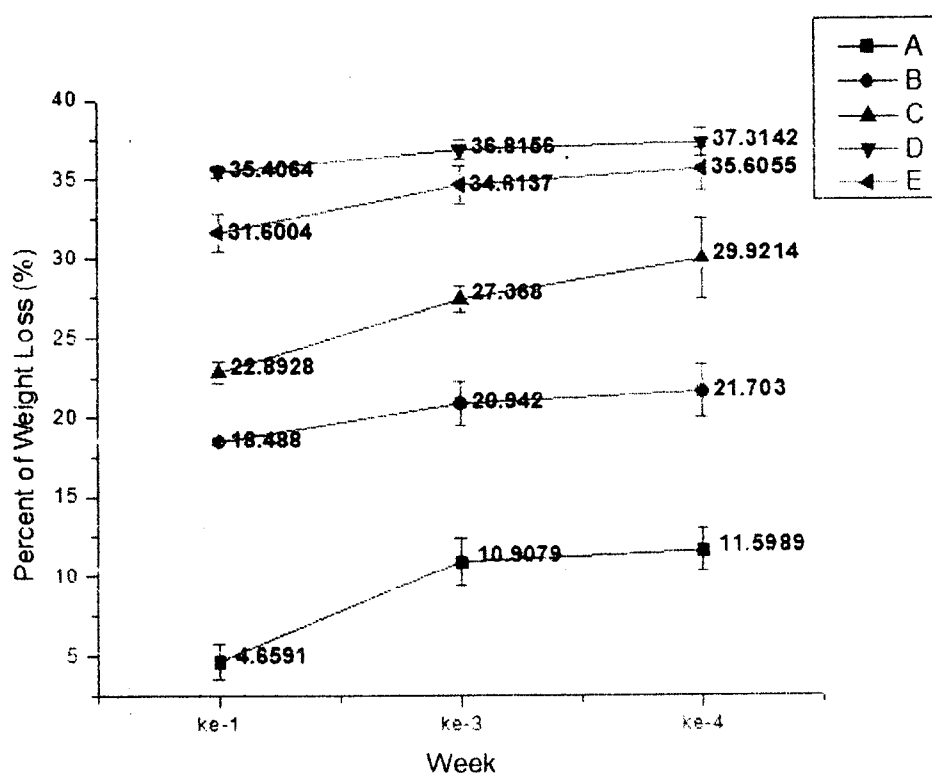
Nilai kuat tekan yang memenuhi untuk standar tulang *cancellous* yaitu 2 – 12 MPa, maka hanya sampel C, D dan E yang memenuhi standar tersebut. Meskipun sampel E memiliki nilai kuat tekan yang lebih besar jika dibandingkan dengan sampel C dan D, sampel E memiliki nilai porositas yang paling kecil jika dibandingkan dengan keduanya. Hasil ini tentunya menguatkan pernyataan bahwa nilai porositas dan kuat tekan saling berhubungan dimana semakin tinggi nilai porositas maka menyebabkan semakin menurunnya nilai kuat tekan karena persen pori yang cenderung lebih banyak dan mengakibatkan kerapuhan pada sampel. Dari hasil uji kuat tekan ini, dapat diketahui bahwa penting memberikan penambahan CMC pada komposit *scaffold* n-HA/CH agar diperoleh *scaffold* yang layak sebagai tempat bertumbuhnya sel tulang baru yaitu dengan meningkatkan nilai kuat tekannya. Oleh karena itu sampel C dengan 10%wt CMC dipilih sebagai sampel terbaik dengan nilai kuat tekannya yaitu 3,8858 MPa.

5.2.4 Uji *in vitro* biodegradasi

Suatu *scaffold* yang berfungsi sebagai implan tulang dalam tubuh, setidaknya harus terdegradasi secara bertahap agar dapat memberikan waktu untuk tumbuhnya sel tulang baru pada *scaffold*. Oleh sebab itu dilakukan uji *in vitro* biodegradasi pada penelitian ini untuk mengetahui persen massa hilang dari tiap sampel dalam larutan *simulated body fluid* (SBF) untuk minggu ke 1, 3 dan 4. Pada Tabel 5.3 dan Gambar 5.5 dapat dilihat hasil dari uji *in vitro* biodegradasi.

Tabel 5.3 Hasil Uji *In Vitro* Biodegradasi

Sampel (%wt CMC)	$(\overline{W}_L \pm \Delta W_L)\%$		
	Minggu ke-1	Minggu ke-3	Minggu ke-4
A (0%wt)	4,6591±1,0993	10,9079±1,4977	11,5990±1,3461
B (5%wt)	18,4885±0,1537	20,9417±1,3790	21,7033±1,6802
C (10%wt)	22,8928±0,6461	27,3680±0,8258	29,9214±2,5675
D (15%wt)	35,4064±0,3716	36,8156±0,6207	37,3142±0,8873
E (20%wt)	31,6004±1,1721	34,6137±1,2312	35,6055±1,3367



Gambar 5.5. Persen Massa Hilang scaffold nHA/CH/CMC

Dapat diamati pada Gambar 5.5 bahwa semakin banyak kandungan CMC maka semakin besar pula massa hilang yang dialami oleh sampel. Hal ini terjadi pada sampel B, C dan D namun tidak untuk sampel E yang memiliki massa hilang yang lebih sedikit dari sampel D. Dapat diamati pula hingga minggu ke-4 perendaman sampel yang memiliki kandungan CMC (sampel B, C, D dan E) dalam larutan SBF, massa hilang dari tiap sampel cenderung meningkat secara konstan apabila dibandingkan dengan sampel A (tanpa CMC). Hal ini mungkin diakibatkan terdegradasinya ikat silang antara CH dan

CMC sehingga sampel B, C, D dan E cenderung untuk mempertahankan massa hilang yang terjadi. CH dalam tubuh terutama dapat terdegradasi oleh enzim *lysozyme* dengan produk terdegradasinya adalah gula amino yang mana nantinya akan dikeluarkan dari dalam tubuh (Saravanan, 2016).

Pada minggu ke-4 dapat diamati bahwa untuk seluruh sampel, kenaikan massa hilang yang terjadi tidak terlalu signifikan seperti pada minggu pertama hingga minggu ke-3. Menurut Kokubo dan Hiroaki, 2006 dikatakan bahwa suatu material yang diimplankan dalam tubuh dan membentuk ikatan dengan tulang diketahui dari adanya lapisan apatit yang terbentuk. Kemampuan material membentuk lapisan apatit dapat memprediksi sifat bioaktif material secara *in vivo*. Sedangkan pembentukan lapisan apatit pada permukaan sampel biasanya terjadi dalam 4 minggu. Dalam penelitian ini belum terlihat adanya penurunan massa hilang pada minggu ke-4 namun kenaikan massa hilang dari minggu ke-3 hingga minggu ke-4 cenderung konstan. Maka dari itu perlu adanya penambahan waktu perendaman sampel setelah minggu ke-4 untuk mengetahui penurunan massa sampel. Berdasarkan data pada Tabel 5.3 untuk sampel dengan kandungan CMC, sampel D memiliki massa hilang yang paling tinggi dan sampel B memiliki massa hilang yang paling rendah.

5.2.5 Uji morfologi

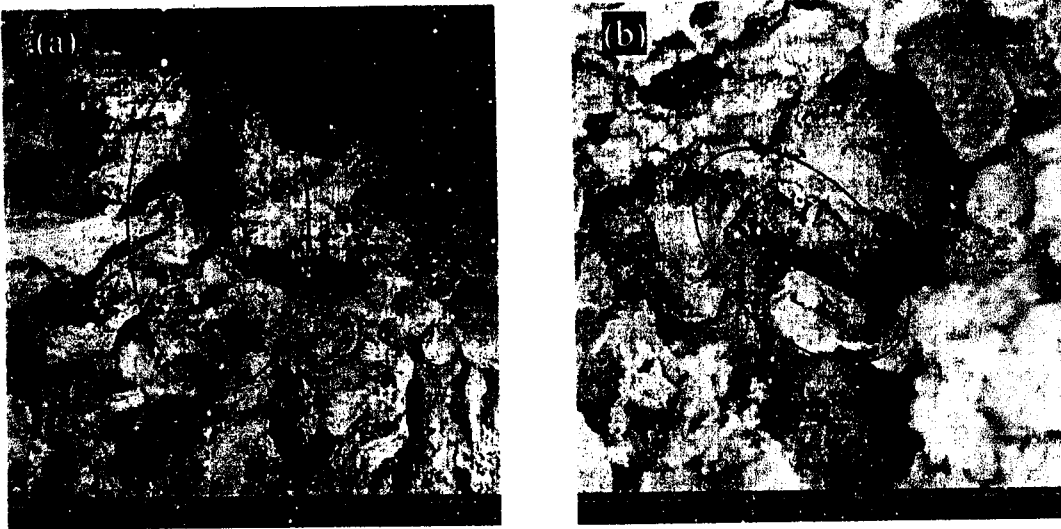
Hasil pengujian morfologi sampel n-HA/CH/CMC dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dapat dilihat pada Gambar 5.6 s/d 5.8. Berdasarkan hasil SEM tersebut dapat diamati bahwa kelima sampel memiliki struktur dan ukuran pori yang beragam. Hal ini dapat diakibatkan dari metode *freeze drying* yang dilakukan dalam penelitian, karena struktur pori oleh metode *freeze drying* merupakan replikasi dendrit kristal es yang terjerat (Ibrahim, 2015) kemudian pada saat tahap sublimasi kristal es tersebut akan menguap sehingga meninggalkan pori pada sampel.

Rentang diameter pori pada bagian sampel tampak muka dan melintang secara keseluruhan dapat dilihat pada Tabel 5.4 yang merupakan rentang ukuran diameter pori dari kelima sampel. Hasil SEM pada Tabel 5.4 menunjukkan bahwa kelima sampel memiliki ukuran pori yang mencapai $\sim 100 \mu\text{m}$ dimana menurut Hulbert *et al.*, 1970 ukuran pori ini dianggap sebagai batas minimal yang dibutuhkan untuk pembentukan mineral tulang.

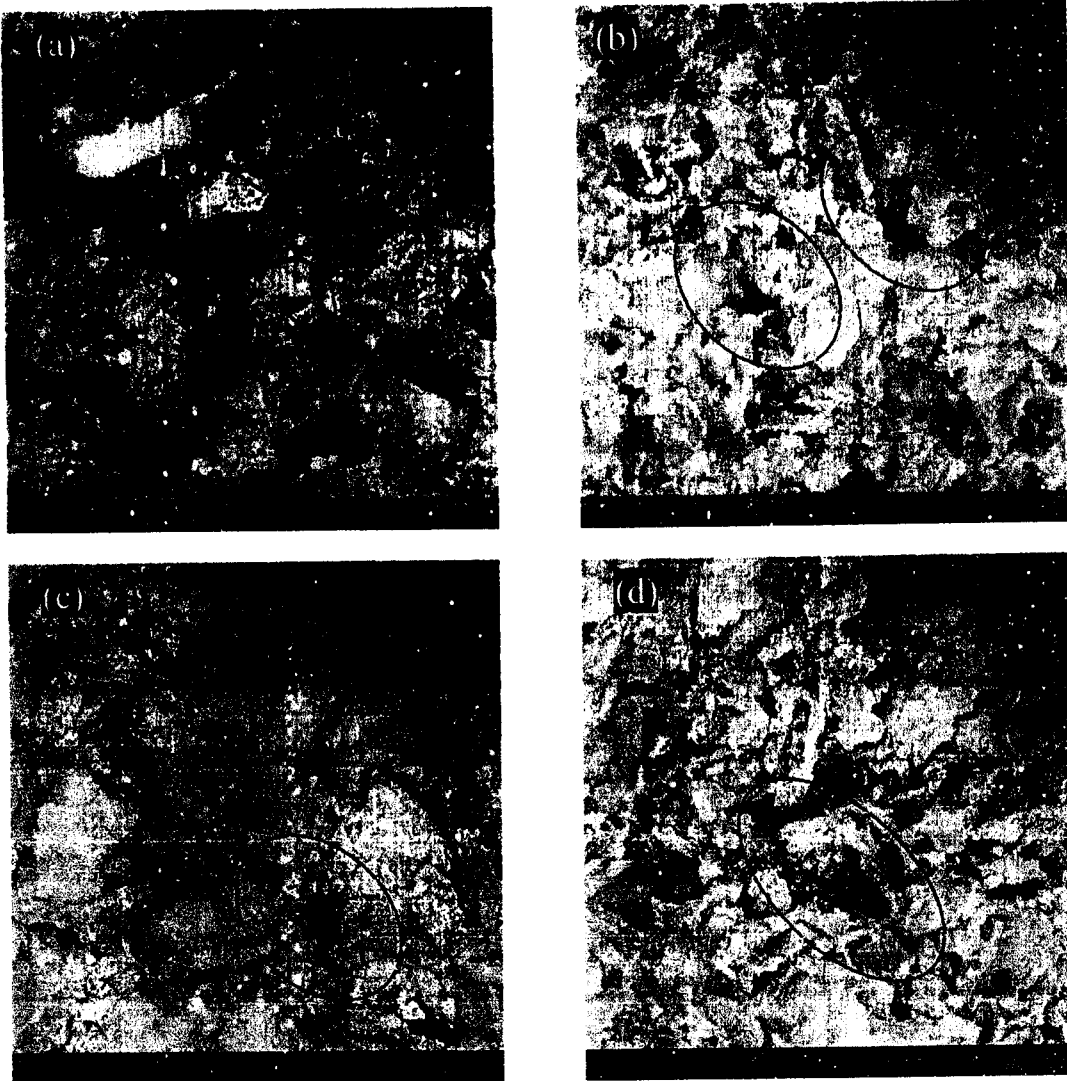
Tabel 5.4 Rentang Nilai Diameter Pori dengan SEM

Sampel	Komposisi CMC	Rentang Diameter Ukuran Pori (μm)
A	0%wt	24,80 – 136,00
B	5%wt	46,10 – 155,00
C	10%wt	92,10 – 136,00
D	15%wt	25,46 – 150,10
E	20%wt	26,82 – 177,30

Hasil SEM pada Gambar 5.6 untuk 0%wt CMC (sampel A), secara visual tampak memiliki pori yang lebih banyak apabila dibandingkan dengan 4 sampel lain yang memiliki kandungan CMC dan diperkuat dengan hasil dari porositas untuk sampel A yang mencapai 85,9200%. Menurut Venkatesan *et al.* (2012) CH mampu membentuk pori, sehingga hal ini dapat disebabkan karena lebih banyaknya komposisi CH pada sampel A dibanding 4 sampel lainnya sehingga menyebabkan pembentukan pori yang lebih banyak. Dapat diketahui secara visual pada Gambar 5.6 dan 5.7 bahwa semakin banyak komposisi CMC yang terdapat pada sampel maka semakin sedikit pori yang terbentuk. Pada irisan melintang untuk sampel B (Gambar 5.6b) dan sampel C (Gambar 5.6d) struktur pori yang dihasilkan nampak lebih besar daripada tampak depannya. Kemudian pada sampel D dapat diamati bahwa pori yang terbentuk semakin jarang, begitupun untuk irisan melintangnya nampak seperti pori saling menyatu. Hal ini mungkin diakibatkan karena makin banyaknya komposisi CMC dengan muatan negatifnya dan berperan sebagai *cross linker* untuk mengikat CH dengan muatan positifnya sehingga dapat memperkuat ikatan antar bahan komposit. Hasilnya, pori yang dihasilkan pada sampel E paling sedikit jika dibandingkan dengan sampel lain karena adanya ikatan CH dan CMC yang juga lebih banyak. Hal ini diperkuat dengan hasil dari persen porositas pada sampel E yaitu sebesar 37,5087%.

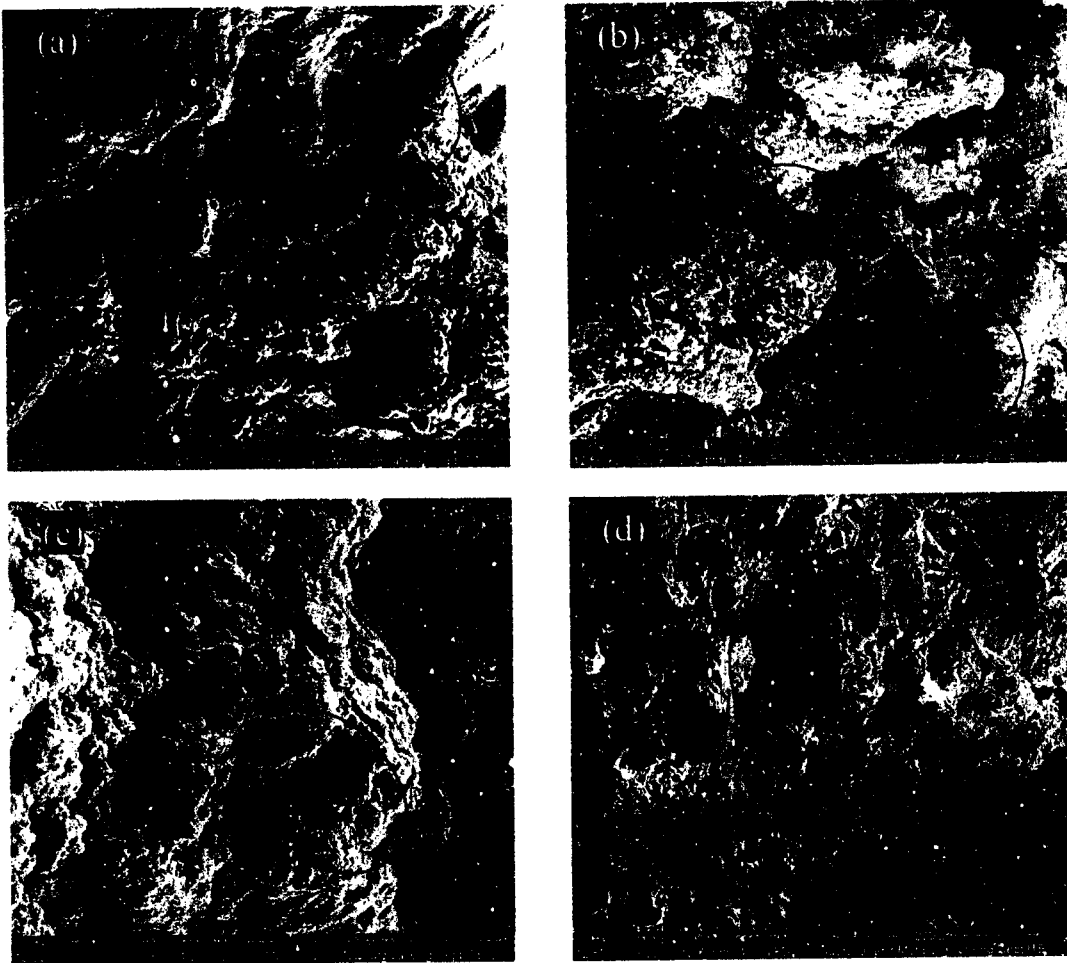


Gambar 5.4 Hasil SEM komposit n-HA/CH/CMC dengan komposisi CMC 0%wt
(a) tampak depan dan (b) melintang



Gambar 5.5 Hasil SEM komposit n-HA/CH/CMC dengan komposisi CMC (a) tampak depan dan (b) melintang untuk sampel B (5%wt); (c) tampak depan dan (d) melintang untuk sampel C (10%wt)

Berdasarkan ukuran diameter pori pada Tabel 4.5 diketahui bahwa sampel yang mengandung CMC (sampel B, C, D dan E) memiliki ukuran pori yang melebihi $100\ \mu\text{m}$, dimana ukuran pori ini telah mencapai batas minimal ukuran pori yang diharapkan terjadi adanya pertumbuhan tulang. Hal ini dikemukakan oleh Hulbert *et al.* (1970) dengan *scaffold* berporositas 46% yang diimplankan dalam tulang paha anjing dimana pori berukuran besar ($100\text{-}150$ dan $150\text{-}200\ \mu\text{m}$) menunjuk –



Gambar 5.6 Hasil SEM komposit n-HA/CH/CMC dengan komposisi CMC (a) tampak depan dan (b) melintang untuk sampel D (15%wt), (c) tampak depan dan (d) melintang untuk sampel E (20%wt)

kan adanya pertumbuhan tulang. Namun, tentu saja diameter pori sampel secara keseluruhan tidak dapat terukur sehingga rentang ukuran diameter pori yang terdapat pada Tabel 4.2 hanya dapat mewakili sebagian kecil ukuran pori yang terdapat pada penampang muka dan melintang sampel karena proses penembakan elektron pada SEM sendiri terbatas hanya mengambil pada satu atau dua titik penembakan elektron saja. Sedangkan hasil persen porositas pada subbab 4.2.2 dapat dijadikan acuan untuk mengetahui persen pori yang terbentuk pada sampel secara keseluruhan. Adapun uji SEM ini hanya dipakai sebagai pendukung karakteristik *scaffold* untuk memastikan ukuran pori yang cukup bervariasi yang sesuai dengan ukuran pori untuk pertumbuhan sel tulang baru.

5.3. Luaran Penelitian

Luaran tahun ke 1:

1. Telah accepted di *Journal of International Dental and Medical Research* (publish awal 2019-Q3), copyright terlampir
2. Telah diseminarkan pada **Seminar Nasional Material 2017** tanggal 26 Agustus 2017 di ITB

Luaran tahun ke 2 :

1. Telah diseminarkan pada *The 2nd International Conference Postgraduate School Universitas Airlangga July, 10th – 11th, 2018, Surabaya, East Java, Indonesia*
Postgraduate School Universitas Airlangga
Artikel dipublish pada Scitepress (Scopus) edisi proceeding series, acceptance letter dan copy right terlampir
2. Proses submit pada *Journal of International Dental and Medical Research* (scopus Q3), bukti terlampir



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

1. Variasi komposisi CH dan CMC mempengaruhi nilai porositas *compressive strength* dan biodegradasi pada komposit *scaffold* n-HA/CH/CMC dimana semakin meningkatnya komposisi CMC maka nilai porositas semakin rendah diiringi dengan meningkatnya nilai *compressive strength* serta laju terdegradasinya yang diprediksi masih dapat menyediakan tempat untuk pertumbuhan sel tulang baru.
2. Variasi komposisi terbaik nHA:CH:CMC terdapat pada sampel C (40:50:1010%wt yang memiliki nilai rentang diameter pori antara 92,1 – 136 μm , porositas 49,7699%, *compressive strength* 3,8858 MPa serta persen massa hilang pada minggu ke-4 sebesar 29,9214% dengan laju degradasi yang cenderung konstan dan diprediksi untuk 4 minggu berikutnya sampel masih tersedia untuk proses pertumbuhan sel tulang baru.
3. Dibandingkan hasil terbaik variasi kondroitin sulfat komposisi terbaik hidroksiapati:kitosan:kondroitin sulfat 50:35:15% wt dengan ukuran pori 27-208 μm , porositas sebesar 90,06 %, *compressive strength* 6,531 MPa persentase massa hilang sebesar 27,149% selama 4 minggu dan persentase viabilitas sel hidup sebesar 65,52%. Jadi penambahan kondroitin sulfat lebih baik daripada CMC.

6.2 Saran

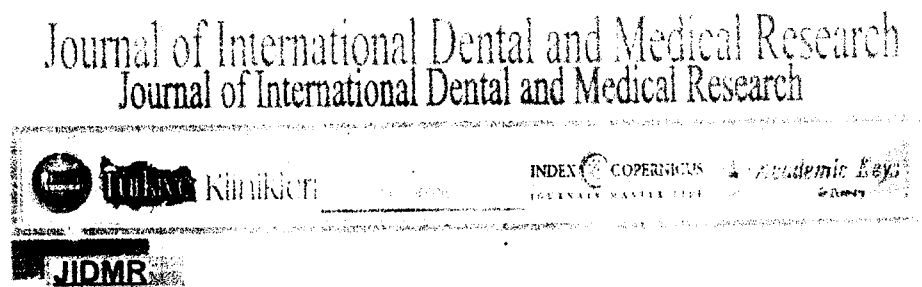
Pada uji *in vitro* biodegradasi sebaiknya dilakukan perendaman sampel yang lebih lama agar dapat memastikan bahwa sampel masih tersedia selama proses pertumbuhan tulang. Setelah proses perendaman sampel dalam SBF selama 4 minggu, dalam hal untuk mengetahui sifat bioaktifnya dapat dilakukan uji SEM untuk melihat adanya lapisan apatit yang terbentuk dan dapat dilakukan uji FTIR untuk mengidentifikasi gugus fungsi dari sampel yang memungkinkan terjadi interaksi dengan larutan SBF untuk memastikan proses degradasi sampel dalam SBF.

DAFTAR PUSTAKA

- Aminatun, Siswanto, Y.M, Penga, Istifarah, R. Apsari, 2013. The Effect Of Sintering Process On The Characteristics Of Hydroxyapatite From Cuttlefish Bone (*Sepia Sp.*), *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4 (4) : 1431-1442
- Aminatun, Efinda Putri N.S, Arista Indriani, Umi Himawati, Dyah Hikmawati, Suhariningsih, 2014. Synthesis of Cobalt Alloy Through Smelting Method and Its Characterization as Bone Implant Prosthesis. *AIP Proceedings*. 137-143
- Aminatun, Suhariningsih, Retna A Dan Yusril Yusuf, 2013, Studi Sifat Mikroskopis Lapisan Hidroksiapatit Pada Paduan Kobalt Hasil Metode *Dip Coating*, Prosiding Seminar Nasional Biomaterial 2013, LIPI-Jakarta
- Aminatun, Dyah Hikmawati, Jan Ady, Tri Saktiani, Maratus Sholikhah, 2013, Pengaruh Perlakuan Panas Terhadap Sifat Mikro Paduan Kobalt Melalui Metode Peleburan Dan Metalurgi Serbuk, Prosiding Seminar Fisika Nasional XXVI, Universitas Negeri Malang
- Aminatun, Siswanto, Wheni Kusuma, 2010, Sintesis dan Karakterisasi Sifat-Sifat Fisis *Cobalt Implant Composite* (CIC) karena Variasi Hidroksiapatit, prosiding Seminar Nasional Sains, Pascasarjana Unesa, Surabaya.
- Aminatun, Siswanto, Ita Fauriya, 2010, Analisis Sifat Fisis *Cobalt Implant Composite* (CIC) karena pengaruh Proses Sintering, prosiding Seminar Nasional Basic Science VII, Universitas Brawijaya Malang
- Aminatun, Siswanto, Fitri Wijayanti, 2011, The Effect of Co:Cr Variation to Mechanical Properties and Cytotoxicity Co-Cr-HA Composite, proceeding of 3rd International Conference and Workshop on Basic and Applied Science, Unair – Surabaya
- Anatomy Gross Anatomy Physiology. 2010. Diakses tanggal 11 Desember 2014 pukul 18:05 WIB, tersedia pada :
http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/anatomy%20&%20physiology/2010/2010%20exam%20reviews/exam%202%20review/06-14_BoneHealing.JPG
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS 2013)*. Diunduh dari http://www.litbang.depkes.go.id/sites/download/rkd2013/Laporan_Riskesdas2013.PDF pada 10 Desember 2014 pukul 06.09 WIB.
- Chang, Byeong S., dan Sugunakar Y. Patro. 2004. *Freeze-drying Process Development for Protein Pharmaceuticals*. American Association of Pharmaceutical Scientist Page 113-138.

- Darwis, Darmawan, dan Yessy Warastuti. 2008. *Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit (HA) Sebagai Graft Tulang Sintetik*. Jurnal Ilmiah Aplikasi dan Radiasi Vol 4 No.2 Desember 2008.
- Dutta, Pradip Kumar, Joydeep Dutta, dan V S Tripathi. 2004. *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications*. Journal of Scientific & Industrial Research Vol.63, pp 20-31.
- Fauzi A, Rahyussalim, Aryadi, Tobing SD. Cedera Sistem Muskuloskeletal. Departemen Bedah Divisi Orthopaedi dan Traumatologi FKUI/RSCM. Desember 2009.
- Fawcett DW. 2002. Buku Histopatologi 12th ed. Jakarta: ECG, 178-179, 185-190.
- Ferdiansyah, Djoko Rushadi, Fedik Abdul Rantam, Aulani'am. 2011. Regenerasi pada *Massive Bone Defect* dengan *Bovine Hydroxyapatite* sebagai *Scaffold Mesenchymal Stem Cell*. JBP Vol 13, No.3.
- Guyton, Arthur C. Dan John E. Hall. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 11*. Jakarta : ECG Medical Publisher.
- Handayani, Fadhilah Dwi Estri. 2014. *Regenerasi Tulang Femur Pada Tikus Putih (Rattus novergicus) Melalui Penggunaan Hidroksiapatit dari Tulang Sotong (Sepia sp) Sebagai Bone Filler*. Skripsi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Hutmacher, Dietmar W. 2000. *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*. Elsevier B.V : Biomaterials 21 (2000) halaman 2529-2543.
- Kalfas, Iain H.2001. *Principles of Bone Healing*. *Neurosurg Focus* 10 (4) : Article 1, 2001.
- Kini, Usha dan B.N. Nandecsh.2012. *Physiology of Bone Formation, Remodelling, and Metabolism. India*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/978-3-642-02400-9_2.
- Liebschner, M.A.K, dan M.A Wettergreen. 2003. *Optimization of Bone Scaffold Engineering for Load Bearing Applications*. University of Oulu : Topics in Tissue Engineering.
- Martin, Craig W. 2013. *Glucosamine and Chondroitin Sulfate for Osteoarthritis. Clinical Services-Worker and Employer Services*.
- Mitsak, Anna G, Jesscia M. Kemppainen, Matthew T, Harris, Scott J Hollister. 2011. *Effect of Polycaprolactone Scaffold Permeability on Bone Regeneration In Vivo*. Michingan : *Tissue Engineering* : Part A, Vol 17, Numbers 13 and 14.
- Orlovskii, V.P., V. S. Komlev, dan S. M. Barinov. 2002. *Hydroxyapatite and Hydroxyapatite-Based Ceramics. Russia: Inorganic Materials*, Vol. 38, No. 10, 2002, pp.973-984.

- Schieker, Matthias, Herman Seitz, Inga Drosse, Sebastian Seitz, Wolf Mutschier. 2006. *Biomaterials as Scaffold for Bone Tissue Engineering*. German: European Journal of Trauma 2006 No.2.
- Setiawan, Dio Nurdin. 2014. *Efek Variasi Coating Kitosan-Glutaraldehyd Terhadap Karakteristik Hollow-Fiber Poly L-Lactic Acid (PLLA) Sebagai Kandidat Pembuluh Darah*. Skripsi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Sfeir, Charles *et al.* 2005. *Bone Regeneration and Repair: Biology And Clinical Applications*. New Jersey : Humana Press Inc. halaman 21 – 44.
- Siswanto, Aminatun, Suryani D.A, Yohana M.P dan Haryati, 2014, Sintesis Dan Karakterisasi Hidroksiapatit Dari Tulang Sotong (*Sepia Sp.*) Untuk Aplikasi Bone Repair, Jurnal Telaah LIPI
- Spielmann, H. Hoffman, S. Botham, P. Roguet, R. Jones, P. 2007. *The ECV4 International Validation Study on In Vitro Test for Acute Skin Irritation Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays on the Skin Integrity Function Test*. Germany : ATLA.
- Subia, B., J. Kundu, dan S.C. Kundu. 2002. *Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications*. Diakses tanggal 10 Desember 2014. Tersedia pada: www.intechopen.com.
- Venkatesan, Jayachandran, Ramjee Pallela *et al.* 2012. *Chitosan-amylopectin/hydroxyapatite and chitosan-chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering*. International Journal of Biological Macromolecules 51 (2012) halaman 1033-1042.
- Zilberman, Meital, 2011, *Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials, Volume 8 : Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration*. <http://www.springer.com/series/8415>

LAMPIRAN: Luaran Penelitian selama 2 tahun**Lampiran 1: Copyright agreement Journal of Interbational Dental and Medical Research****Transfer of Copyright Agreement**

I and my colleagues who the undersigned, declare that the article entitled: "Synthesis and Characterization of Nano-Hidroxyapatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Composite Scaffold" is original, and that I (as author or co-author) hold exclusive copyright of the material. I hereby transfer exclusive copyright for this material to "Journal of International Dental and Medical Research" through the publication, The Ektodermal Displazi Gurubu Türkiye. The following rights are reserved by the author(s).

The right to use, free of charge, all or part of this article in future works of their own, such as books and lectures, giving reference to the original place of publication and copyright holding.

Authors may include a copy of their article on their Web page as long as it is clearly noted that the Association for Information Systems owns the copyright and that use for profit is not allowed. Such an author version must be identical to the final published version, and include a link to The Ektodermal Displazi Gurubu Türkiye.

All authors agree to the terms of copyright transfer as indicated along with the manuscript "Synthesis and Characterization of Nano-Hidroxyapatite/Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Composite Scaffold" submission process.

The Ektodermal Displazi Gurubu Türkiye (Journal of International Dental and Medical Research) owns copyright of any contribution, and its licensees, have the right to use, reproduce, transmit, derivate, publish, and distribute the contribution, in the journal or otherwise, in any form or medium. Authors will not use or authorize the use of the contribution without the Ektodermal Displazi Grubu Türkiye's written consent, except as may be allowed by world fair use law.

10-August 2018

Name of Authors	Sign of Authors
Dr. Aminatun, Ir., M.Si	
Muhammad Husni Ibrahim, ST	
Jan Ady, S.Si., M.Si	
Dyah Hikmawati, S.Si., M.Si	
Prof. Dr. Moh. Yasin, M.Si	

Int Dent Med Res

ISSN 1309-100X

Publisher: Ektodermal Displasia Group-Turkey

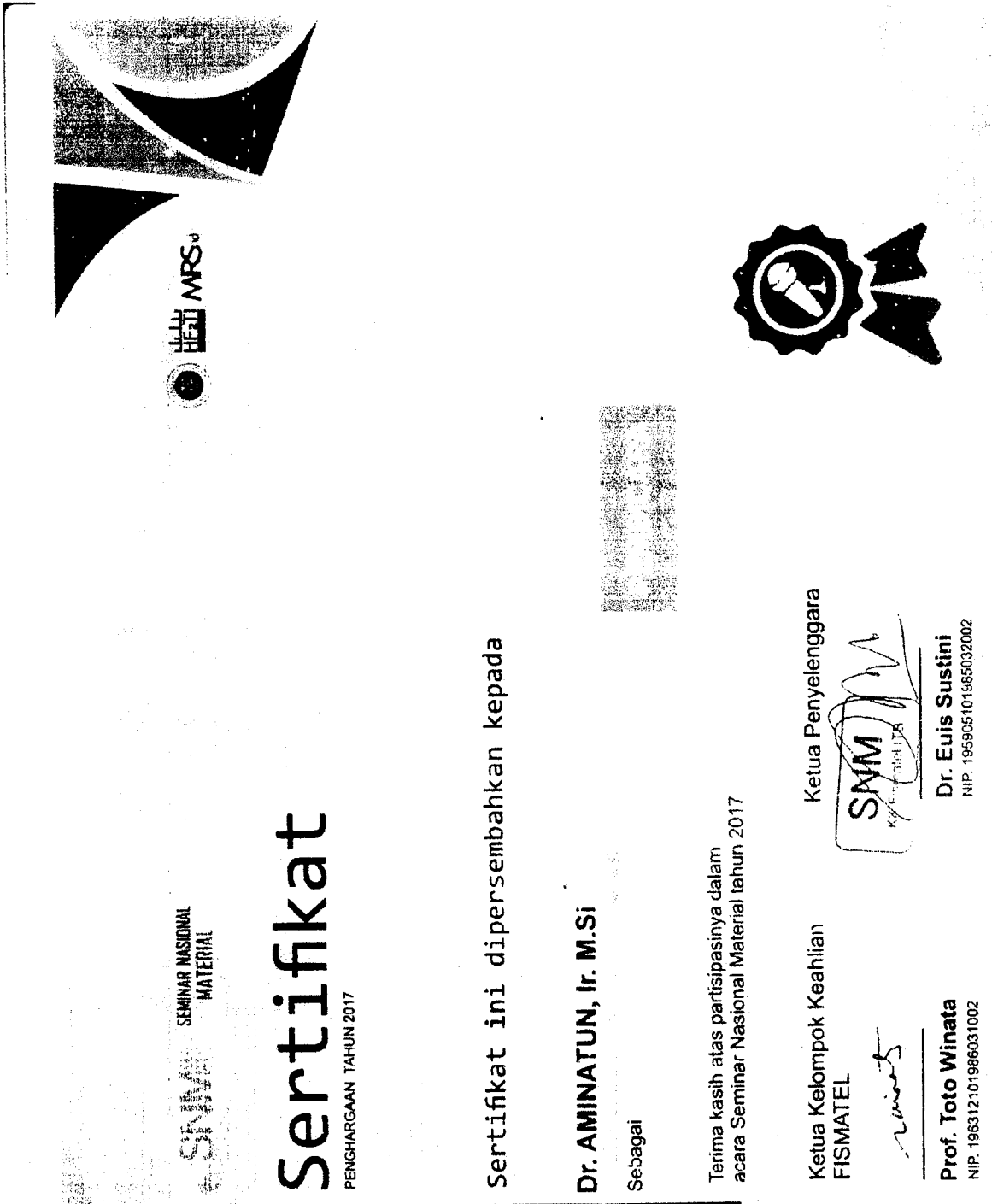
Corresponding Address: Assoc. Prof. Dr. İzzet YAVUZ, Dicle University, Faculty of Dentistry, 21280 Diyarbakır - TURKEY.

Web page: <http://www.ektodermadisplazi.com>e-mail: izzetyavuz@hotmail.com ; yavuz@dicle.edu.tr

Phone: +90 512 348 80 01 - 3100 Fax: +90 512 348 31 00

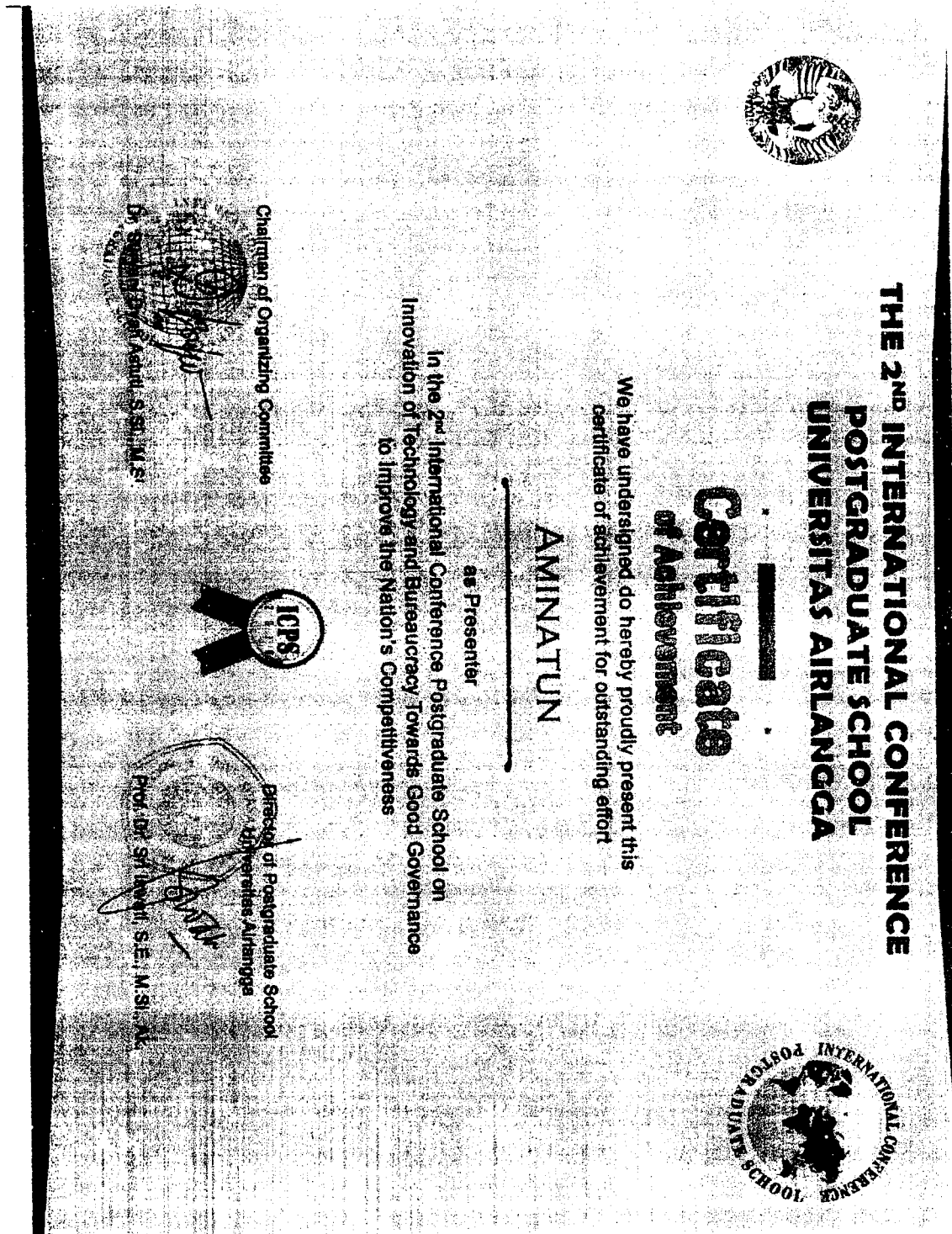
Lampiran 2:

Bukti sertifikat sebagai presenter pada Seminar Nasional Material 2017-ITB pada tanggal 26 Agustus 2017



Lampiran 3.

Bukti sertifikat sebagai presenter pada *The 2nd International Conference Postgraduate School Universitas Airlangga July, 10th – 11th, 2018, Surabaya.*



Lampiran 4: *Bukti acceptance letter* dipublikasi pada Scitepress (Scopus) edisi proceeding series.

ICPS 2018

The 2nd International Conference Postgraduate School Universitas Airlangga
July, 10th – 11th, 2018, Surabaya, East Java, Indonesia
Postgraduate School Universitas Airlangga
Website: <http://pasca.unair.ac.id/icpsuas/> Email: internationalconference@pasca.unair.ac.id



ACCEPTANCE LETTER

Ref: 1900/UN.3.1.15/PPd/2018

Dear Authors,

Paper ID : ID 19

Title : Characteristics of Composite Scaffold Chitosan-Chondroitin
Sulphate/Hydroxyapatite as The Candidate of Bone Graft

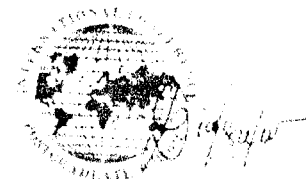
Authors : Aminatun, Tia Rahayu W, Dolfi Varton and Prihartini Widiyanti

Affiliation : Universitas Airlangga

We are pleased to inform you that your paper submitted to The 2nd International Conference Postgraduate School (ICPS 2018) has been **accepted for publication** in SCITEPRESS – Science and Technology Publications.

On behalf of the committee, we would like to thank you for your participation in The 2nd International Conference Postgraduate School (ICPS 2018). This conference would not have been a success without you.

Sincerely yours,



Dr. Suryani Dyah Astuti, M.Si.

Conference Chair

Supported by:

Organized by:



POSTGRADUATE SCHOOL
UNIVERSITAS AIRLANGGA

CONSENT TO PUBLISH

For the mutual benefit and protection of Author and Publisher, it is necessary that the Author provides formal written Consent to Publish before publication of the Book. The signed Consent ensures that the publisher has the Author's authorization to publish the Contribution. Copyright remains with Author.

Conference: ICPS 2018 - The 2nd International Conference Postgraduate School Universitas Airlangga Surabaya

Place/Date: Surabaya, Indonesia, 10th - 11st July 2018

Book Title: Innovation of Technology and Bureaucracy Towards Good Governance to Improve the Nation's Competitiveness

Edited by: Subagyo Adam, Ahmad Yudianto, Christijogo Samartono, Sri Hartaningrum, Sarwirini, Suparto Wijaya,

Suryani Dyah Astuti and Windjarto.

Publisher: SCITEPRESS.

Paper number: 1019
 Title of the contribution: Characteristics of Composite Catalysts Chitosan-Chondroitin Sulfate / Hydroxyapatite as the Catalyst of Benzene
 Author: (please print the name and address of corresponding first author): Aminatun, Muhammad, Dwi Vastika and Purnamasari W.

It is herein agreed that:

The Author give "Science and Technology Publications, Ltd" (here forth known as SCITEPRESS) the unlimited right to publish the contribution identified above, without any restraints, in any form, at any time, directly or through others, to reproduce, transmit, archive, lease, lend, sell and distribute the contribution or parts thereof individually or together with other works in any language, revision and version (digital and hard), including reprints, translations, photographic reproductions, microform, audiograms, videograms, electronic form (offline, online), or any other reproductions of similar nature, including publication in the aforementioned book or any other book, as well as, the usage for advertising purposes. SCITEPRESS is also entitled to carry out editorial changes in the contribution with the sole purpose of enhancing the overall organization and form of the contribution. The Author retains the rights to publish the contribution in his/her own web site and thesis, in his/her employer's web site and to publish a similar or revised version elsewhere, as long as it is clearly stated that the contribution was presented first at ICPS 2018, a link to the event web site is made available there and the corresponding DOI is associated with the contribution.

The Author warrants that his/her contribution is original, except for such excerpts from copyrighted works as may be included with the permission of the copyright holder and author thereof, that it contains no libelous statements, and does not infringe on any copyright, trademark, patent, statutory right, or proprietary right of others; and that Author will indemnify SCITEPRESS against any costs, expenses or damages for which SCITEPRESS may become liable as a result of any breach of this warranty. The Author signs for and accepts responsibility for releasing this material on behalf of any and all co-authors.

This agreement shall be governed by, and shall be construed in accordance with, the laws of Portugal. The courts of Portugal shall have the exclusive jurisdiction.

In return for these rights:

The publisher agrees to have the identified contribution published, at its own cost and expense, in the conference proceedings.

The undersigned hereby gives permission to SCITEPRESS to have the above contribution published.

Date: 20 August 2018
 Author's Signature: Aminatun

Please return to: ICPS 2018 Secretariat (e-mail: aminatun@icps2018.ac.id)

Lampiran 5: Bukti proses submit pada *Journal of International Dental and Medical Research* (scopus Q3).

