

Kode/Rumpun : 332/Ilmu Kedokteran Gigi Dasar

**LAPORAN AKHIR
RISET KOLABORASI MITRA LUAR NEGERI**



**SINTESIS DAN KARAKTERISTIK KOMPOSIT
SCAFFOLD KITOSAN-GELATIN-KARBONAT APATIT
BERBASIS BATU KAPUR SEBAGAI KANDIDAT
BIOMATERIAL REGENERASI TULANG**

TIM PENGUSUL :
Ketua: Devi Rianti, drg, M. Kes
NIP : 196309071990022001

UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN 2020

**HALAMAN PENGESAHAN
RISET KOLABORASI MITRA LUAR NEGERI**

Judul Penelitian : Sintesis dan karakteristik komposit Scaffold Kitosan-Gelatin-Karbonat Apatit berbasis batu kapur sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang

Kode / Nama Rumpun Ilmu : 332/Ilmu Kedokteran Gigi Dasar

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Devi Rianti, drg, M.Kes
b. NIDN : 0007096308
c. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
d. Program Studi : Kedokteran Gigi
e. No. HP : 081331308540
f. Alamat Surel (e- mail) : devi-r@fkg.unair.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Prof. Dr. Anita Yuliati, drg, M. Kes.
b. NIDN : 0009075803
c. Fakultas : Kedokteran Gigi

Anggota Peneliti (2)

a. Nama Lengkap : Tanzsa Setiana Putri, drg., PhD
b. NIM : 198909282019086201
c. Fakultas : Kedokteran Gigi

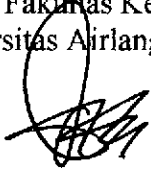
Anggota Peneliti (3)

a. Nama Lengkap : Rania Vivian Nathania
b. NIM : 021711133129
c. Fakultas : Kedokteran Gigi

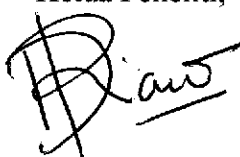
Biaya Penelitian : Rp 100.000.000,-

Surabaya, Desember 2020

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Airlangga


Dr. Agung Sosiawan, drg, M.Kes.
NIP. 197112112008121003

Ketua Peneliti,


Devi Rianti, drg., M Kes
NIP. 196309071990022001

Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat
Universitas Airlangga


Dr. Gadis Meinar Sari, dr., M.Kes.
NIP. 196605041996032001

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian : Sintesis dan karakteristik komposit Scaffold Kitosan-Gelatin-Karbonat Apatit berbasis batu kapur sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang

2. Tim Peneliti

No	Nama	Jabatan	Bidang keahlian	Fakultas asal	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Devi Rianti,drg, M.Kes	Ketua	Biomaterial KG	FKG -UNAIR	40 jam
2.	Tanzsa Setiana Putri, drg., PhD	Anggota I	Biomaterial KG	FKG –UNAIR	40 jam

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):
Material alam batu kapur dari Padalarang dan Cirebon Jawa Barat akan disintesis menjadi *scaffold* komposit Kitosan-Gelatin-Karbonat apatit yang sesuai syarat *scaffold* untuk *bone regeneration*
4. Masa Pelaksanaan
Mulai : bulan : Febuari tahun : 2020
Berakhir : bulan: September tahun: 2020
5. Usulan Biaya: Rp 100.000.000,-
6. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan) :
 - a. Research Center Fakultas Kedokteran Gigi UNAIR
 - b. Laboratorium Material Fakultas Teknologi Industri ITS
 - c. Meditec, UniversitiTeknologi Malaysia
7. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya) :
Meditec –Universiti Teknologi Malaysia Johor Bahru untuk melakukan pemeriksaan MicroCT Scaffold dan pemeriksaan SEM Cooling stage.
Balai Besar Keramik Indonesia Bandung, sebagai penyedia bahan baku batu kapur gunung dari Padalarang dan Cirebon yang telah disintesis menjadi karbonat apatit
8. Temuan yang ditargetkan (penjelasan gejala atau kaidah, metode, teori, produk, atau rekayasa) :
Hasil karakterisasi komposit scaffold Kitosan-Gelatin-Karbonat Apatit berbasis batu kapur pada penelitian ini selanjutnya akan di uji in Vitro maupun in Vivo dan nantinya diharapkan sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang.
Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang akan mendukung pengembangan iptek) :
Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui karakteristik kemampuan komposit *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang, sehingga merupakan salah satu pemanfaatan hasil batu kapur di Indonesia. Manfaatnya untuk merancang teknologi *scaffold* tepat guna sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang, serta peningkatan kualitas luaran publikasi dan sitasi dibutuhkan kolaborasi riset dengan mitra luar negeri.

RINGKASAN

Perbaikan tulang atau *bone grafting* bertujuan menggantikan tulang yang hilang oleh karena suatu trauma ataupun penyakit dan merupakan bagian dari rekayasa jaringan. Dasar *bone grafting* adanya mekanisme biologi yang berupa osteokonduksi, osteoinduksi, dan osteogenesis. Beberapa tahun terakhir komposisi kimia, dan sifat struktural berbagai substitusi tulang *alloplastic* banyak diteliti. Inovasi terkini tidak hanya menggunakan satu macam biomaterial, tetapi menggabungkan beberapa macam biomaterial untuk meningkatkan efektivitasnya. Material biokeramik karbonat hidroksi apatit (KA) adalah hasil substitusi ion karbonat dengan gugus fosfat dari hidroksi apatit. Rumus kimia KA ialah $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ dengan rasio Ca/P 1,6-2,0. KA merupakan senyawa turunan kalsium fosfat yang memiliki sifat osteokonduktif lebih baik dibanding hidroksiapatit dan bersifat biokompatibel, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai material pengganti tulang. Kelarutan yang tinggi dari KA merupakan hal yang menguntungkan, tetapi juga merugikan, karena sebagai bahan dasar *scaffold* harus mempunyai sifat *biodegradable* yang sesuai yaitu waktu degradasi sesuai dengan waktu *remodelling*. Kelarutan yang tinggi dikhawatirkan terjadi ketidakseimbangan antara waktu degradasi dan waktu *remodelling*. Kekurangan penggunaan biomaterial dari polimer alami adalah ketika digunakan satu jenis polimer yaitu kekuatan mekanik rendah dan cepat terdegradasi, sehingga diperlukan kombinasi biomaterial untuk menutupi kekurangan dan memaksimalkan kelebihan. Pada penelitian ini akan menggabungkan tiga material sebagai *scaffold* komposit 3 dimensi yang terdiri dari kitosan, gelatin dan KA berbasis batu kapur. *Scaffold* harus dapat berfungsi sebagai support selama proses regenerasi jaringan pada lokasi defek. Dibanding *scaffold* geometri dua dimensi, rekayasa jaringan tulang menggunakan 3 dimensi lebih baik. Rekayasa jaringan mengintegrasikan secara relevan prinsip *engineering* dan teknologi dalam memperbaiki organ atau struktur tubuh yang rusak. Konsep rekayasa jaringan dengan menggabungkan tiga komponen dasar berupa sel, *scaffold*, dan regulator signal yang disebut *triad tissue engineering*. Syarat sebagai bahan biomaterial *scaffold* harus memiliki sifat biokompatibel, bioaktif, *biodegradable*, mikrostruktur dan sifat mekanik yang sesuai. Biomaterial yang sering digunakan sebagai bahan dasar *scaffold* terdiri dari tiga kelompok yaitu keramik, polimer sintesis, dan polimer alami. Indonesia sebagai negara yang kaya akan hasil alam memiliki kelimpahan di berbagai sektor. Salah satu sumber daya alam yang dihasilkan adalah batu kapur dengan kandungan CaCO_3 yang besar. Secara umum, jumlah batu kapur di Indonesia mencapai 28,678 milyar ton. Balai Besar Keramik di Bandung mengolah batu kapur menjadi KA, untuk mengembangkan kebutuhan medis, sehingga penelitian ini menggunakan KA berbasis batu kapur yang diproduksi oleh Balai Besar Keramik Bandung. Balai Besar Keramik Kementerian Perindustrian Republik Indonesia bertempat di Bandung memiliki Badan Penelitian dan Pengembangan Industri. Badan ini telah berhasil mengekstraksi KA dari batu kapur, tetapi belum pernah diaplikasikan di bidang kesehatan. Penelitian ini mengembangkan *scaffold* biomimetik yang terbuat dari KA, gelatin dan kitosan yang diharapkan mampu menyerupai *Extracellular matrix* (ECM) tulang, yang terdiri dari komponen inorganik (70%) dan komponen organik (30%). Hasil penelitian ini diharapkan dapat mengetahui karakteristik kemampuan komposit *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang, sehingga merupakan salah satu pemanfaatan hasil batu kapur di Indonesia. Manfaatnya untuk merancang teknologi *scaffold* tepat guna sebagai kandidat biomaterial regenerasi tulang, serta peningkatan kualitas luaran publikasi dan sitasi dibutuhkan kolaborasi riset dengan mitra luar negeri. Dalam hal ini kolaborasi dengan Meditec Universiti Teknologi Malaysia.

PENDAHULUAN

Perkembangan metode rekayasa jaringan tulang mengalami kemajuan pesat, dan melibatkan kombinasi tiga pilar yaitu sel progenitor, sinyal regulasi, dan biomaterial yang dikenal sebagai *triad* rekayasa jaringan. Kombinasi tersebut penting untuk keberhasilan aplikasi rekayasa jaringan.¹ Syarat biomaterial *scaffold* harus memiliki sifat biokompatibel,^{2,3} bioaktif,² *biodegradable*,³ sifat mekanik yang sesuai.⁴ Biomaterial yang sering digunakan sebagai bahan dasar *scaffold* terdiri dari tiga kelompok yaitu keramik, polimer sintesis, dan polimer alami.

Karbonat hidroksi apatit (KA) merupakan senyawa turunan kalsium fosfat yang memiliki sifat osteokonduktif, dan dapat dimanfaatkan sebagai material pengganti tulang.⁵ Kelarutan yang tinggi dari KA merupakan hal yang menguntungkan, tetapi juga merugikan, karena sebagai bahan *scaffold* harus bersifat *biodegradable* yang sesuai dengan waktu *remodelling*. Kekurangan penggunaan biomaterial dari polimer alami ketika digunakan satu jenis polimer yaitu kekuatan mekanik rendah dan cepat terdegradasi, sehingga diperlukan kombinasi biomaterial untuk menutupi kekurangan dan memaksimalkan kelebihan.^{6,7}

Strategi pengembangan *scaffold* dengan cara menggabungkan dua material atau lebih sehingga menghasilkan *scaffold* yang kuat dan bersifat bioaktif. Biokeramik berperan penting dalam *scaffold* rekayasa jaringan yang osteokonduktif. *Scaffold* komposit osteokonduktif berpotensi besar untuk rekayasa jaringan tulang.⁸ Pada penelitian ini menggabungkan tiga material sebagai *scaffold*, yaitu *scaffold* komposit 3 dimensi terdiri dari kitosan, gelatin dan KA berbasis batu kapur. *Scaffold* 3 dimensi adalah *scaffold* dengan arsitektur pori saling berhubungan yang memungkinkan terjadi vaskularisasi pembuluh darah ke segala arah.⁹

Kitosan sebagai bahan *scaffold* tulang terbukti meningkatkan proliferasi sel osteoblas serta pembentukan matriks tulang termineralisasi secara *in vitro*.¹⁰ Gelatin adalah kolagen tipe-I yang merupakan komponen organik utama tulang (90%). Gelatin bersifat *biodegradable* dan biokompatibel, namun memiliki sifat biomekanis yang rendah.¹¹

Indonesia negara yang kaya hasil alam. Salah satu sumber daya alam yang dihasilkan adalah batu kapur dengan kandungan CaCO_3 yang besar.¹² Sumber batu kapur Indonesia mencapai 28,678 milyar ton.¹² Balai Besar Keramik di Bandung mengolah batu kapur menjadi KA, bertujuan untuk mengembangkan kebutuhan medis, sehingga penelitian ini menggunakan KA yang diproduksi oleh Balai Besar Keramik Bandung.

Prosedur rekayasa jaringan menggunakan pendekatan berbasis sel, dengan menggabungkan *scaffold* biokeramik dengan *adult stem cell*. *Mesenchymal stem cell* dewasa mampu berdiferensiasi menjadi semua turunan jaringan ikat, termasuk kartilago dan tulang. *Human umbilical cord mesenchymal stem cell* dapat diisolasi dan disimpan dengan mudah, dan berdiferensiasi lebih cepat, sehingga *hUMSCs* dipilih sebagai model dalam penelitian ini.¹³

Scaffold biomimetik 3D diharapkan menyerupai *Extracellular matrix* tulang, yang terdiri dari komponen inorganik (70%) dan komponen organik (30%).¹⁴ Berdasarkan pemikiran tersebut dan salah satu rencana induk penelitian fakultas kedokteran gigi adalah bidang rekayasa jaringan maka perlu dilakukan penelitian uji karakteristik komposit *scaffold* kitosan-gelatin:KA berbasis batu kapur.

Rumusan Masalah

Apakah karakteristik komposit *scaffold* K-GEL:KA berbasis batu kapur dengan rasio 40:60 (w/w) 30:70 (w/w), 20:80 (w/w) dapat memenuhi syarat sebagai biomaterial rekayasa jaringan?

Tujuan Khusus

Menganalisis karakteristik *scaffold* melalui Uji FTIR, EDX, *dynamic degradation*, permeabilitas, *compressive strength*, ukuran pori, persentasi *water content*, viabilitas *hUCMSC* yang ditanam pada *scaffold* secara in vitro sebagai standar biomaterial rekayasa jaringan.

Manfaat Penelitian

Merupakan perancangan teknologi *scaffold* tepat guna, sebagai kandidat *scaffold* produk dalam negeri komersial, yang memberi keuntungan kepada masyarakat terkait pemanfaatan sumber daya alam Indonesia.

TINJAUAN PUSTAKA

Rekayasa jaringan

Terapi defek tulang dengan *bone graft* yang tidak menyebabkan morbiditas daerah donor dalam jumlah banyak merupakan sebuah tantangan. Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang rekayasa jaringan telah memberikan harapan besar untuk mewujudkan tantangan tersebut. Tiga komponen utama yang berperan di dalam rekayasa jaringan yaitu *stem cell*, *scaffold* matriks ekstra seluler dan sinyal morfogenetik yang bersifat induktif yang disebut juga Triad rekayasa jaringan.¹

Scaffold

Biomaterial *scaffold* harus memberikan lingkungan yang sesuai untuk regulasi sel dalam adhesi, proliferasi, migrasi, dan diferensiasi sehingga dapat terbentuk jaringan fungsional.¹⁵

Pertimbangan utama dalam penentuan desain *scaffold* adalah sistem biomekanik tulang yang kompleks. *Scaffold* harus memiliki porus yang berhubungan satu sama lain hingga terbentuk interkonektif porus. Struktur interkonektif porus *scaffold* dibutuhkan untuk penetrasi sel, pertumbuhan jaringan, dan transportasi nutrisi.¹⁶ Keramik, polimer natural dan sintetik sering digunakan sebagai material pembuatan *scaffold*. Keramik memiliki kekerasan yang tinggi, kombinasi bahan *scaffold* dikembangkan untuk mendapatkan *scaffold* yang memiliki ukuran porus, distribusi, daya biodegradasi dan kekuatan mekanis ideal.¹⁷

Kitosan

Kitosan adalah produk deasetilasi kitin yang merupakan polimer rantai panjang. Kitosan murni mengandung gugus amina (NH_2) sedangkan kitin murni mengandung gugus asetamida (NH-COCH_3). Kitosan memiliki struktur mirip dengan glikoaminoglikan yang merupakan salah satu komponen utama matrik ekstraseluler tulang dan tulang rawan.¹⁸

Kitosan memiliki peran penting dalam pembuatan *scaffold*. Kitosan dapat mendukung perlekatan, diferensiasi dan morfogenesis osteoblas, pembentukan sel tulang karena kitosan memiliki struktur mirip dengan glikoaminoglikan pada tulang rawan ataupun kartilago.¹⁹

Kitosan sebagai bahan dasar *scaffold* memiliki kekurangan yaitu nilai mekanis yang rendah, sehingga penambahan biokeramik disarankan untuk mendukung *scaffold* kitosan.¹⁷

Gelatin

Gelatin digunakan sebagai pengganti kolagen tipe I, merupakan komponen organik dari tulang. Gelatin digunakan dalam *scaffold* karena memiliki sifat *biocompatible* dan *biodegradable*.¹⁷ Gelatin kitosan sering dijadikan campuran dalam pembuatan *scaffold*. Gelatin yang dicampur dengan kitosan akan membentuk senyawa mirip Arg-Gly-Asp (RGD) yang mendukung perlekatan adhesi dan migrasi tulang. Gelatin merupakan bahan yang ideal untuk transportasi protein.²⁰

Karbonat Apatit dari Batu Kapur

Saat ini ilmuwan melakukan penelitian pada batu kapur untuk menjadi alternatif dibidang kesehatan sebagai pengganti kerusakan pada tulang manusia. Batu kapur yang banyak mengandung CaCO_3 , sangat mirip dengan kandungan tulang manusia yaitu HA yang merupakan unsur atau kelompok apatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$).²¹

Hidroksiapatit (HA) digunakan dibidang kesehatan sebagai tulang buatan serta pengisi tulang keropos, karena mempunyai sifat yang biokompatibel, tidak toksis dan osteokonduktif. Penambahan komponen karbonat pada hidroksiapatit dapat mempengaruhi sifat yang dimilikinya, seperti peningkatan kelarutan, penurunan kristalinitas, serta perubahan morfologi dari Kristal.²² Dibandingkan dengan hidroksi apatit (HA), karbonat apatit atau karbonat hidroksi apatit (KA) memiliki keunggulan sifat dalam proses remodeling tulang, yaitu:²² (1) merupakan komposisi pada tulang manusia. (2) dapat diresorpsi dengan baik oleh osteoklas. (3) memiliki kelarutan yang baik pada kondisi asam lemah yaitu saat osteoklas bekerja meresorpsi tulang dengan mengeluarkan ion H^+ . (4) memacu osteogenesis secara sempurna.

Karbonat apatit atau $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4.\text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ sering digunakan untuk kandidat *scaffold* jaringan karena sifat biokompatibel dan sifat osteokonduktifitas sehingga material ini memiliki kemiripan dengan komponen inorganik jaringan keras tulang.²³

Karbonat apatit dijadikan kandidat material rekayasa jaringan karena memiliki beberapa sifat, antara lain meningkatkan kelarutan, menurunkan kristalisasi dan perubahan morfologi dari kristal sehingga penggunaan karbonat apatit berpotensi menghasilkan *scaffold* dengan sifat osteokonduktif yang baik.²⁴

Karakteristik Biomaterial Scaffold

Polimer alami yang banyak digunakan dalam regenerasi tulang adalah kitosan, kolagen, gelatin, fibrin, dan elastin. Beberapa karakteristik yang ideal dimiliki *scaffold* antara lain:²⁵

Tingkat degradasi *scaffold* yang ideal tidak mengganggu penyembuhan tulang. Uji karakteristik *scaffold* telah dilakukan menunjukkan bahwa tingkat degradasi *scaffold* yang

ideal sebesar 18% - 35% selama 7 hari.²⁶ Uji tingkat degradasi secara statis untuk *scaffold* biasa digunakan dan sebagai *gold standard*.²⁷ Uji *dynamic degradation* dirancang untuk meniru kondisi tulang kanselus yang didalamnya terdapat pergerakan sumsum tulang dan terdapat beban karena aktivitas fisiologis. Uji *dynamic degradation* dapat mengintegrasikan lingkungan pergerakan fluida melewati tulang kanselus.^{28,29}

Porositas pada *scaffold* diperlukan untuk suplai oksigen dan transpor nutrisi, neovaskularisasi, dan tempat perlekatan sel. Ukuran pori yang cukup untuk pertumbuhan sel osteoblas yaitu berkisar antara 20 μm - 30 μm .³⁰ Ukuran porositas dalam *scaffold* dapat dilihat menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan Mikro CT.³¹

Rasio *swelling* adalah berat akhir dikurangi berat awal *scaffold* dibandingkan dengan berat awal, dengan kata lain, rasio *swelling* adalah berapa kali *scaffold* tersebut mengalami pembengkakan setelah direndam di dalam aqua destilata. Sifat *swelling scaffold* dapat memfasilitasi infiltrasi sel ke dalam *scaffold*. Nilai rasio *swelling* yang ideal adalah 1.8 ± 0.2 .³²

Water content percentage (WCP) berperan penting dalam meningkatkan absorpsi cairan dari dalam tubuh atau media, transfer nutrisi, dan transfer sisa metabolisme. Nilai WCP yang ideal adalah $65 \pm 4\%$.³²

Viabilitas merupakan salah satu pengujian paling awal dan penting dilakukan terhadap material yang diaplikasikan. Dasar pengujian ini untuk mengetahui apakah material tersebut memenuhi syarat dapat diterima jaringan, tidak mengandung substansi yang menyebabkan respons sistemik, bebas dari reaksi alergi dan karsinogenik.³³ Viabilitas sel dapat diukur menggunakan uji MTT. Uji MTT merupakan pengukuran viabilitas sel secara tidak langsung berdasarkan konsentrasi kristal formazan. MTT yang diaplikasikan pada sel akan direduksi menjadi kristal formazan oleh enzim dehidrogenase dalam mitokondria sel yang hidup.³⁴

Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell

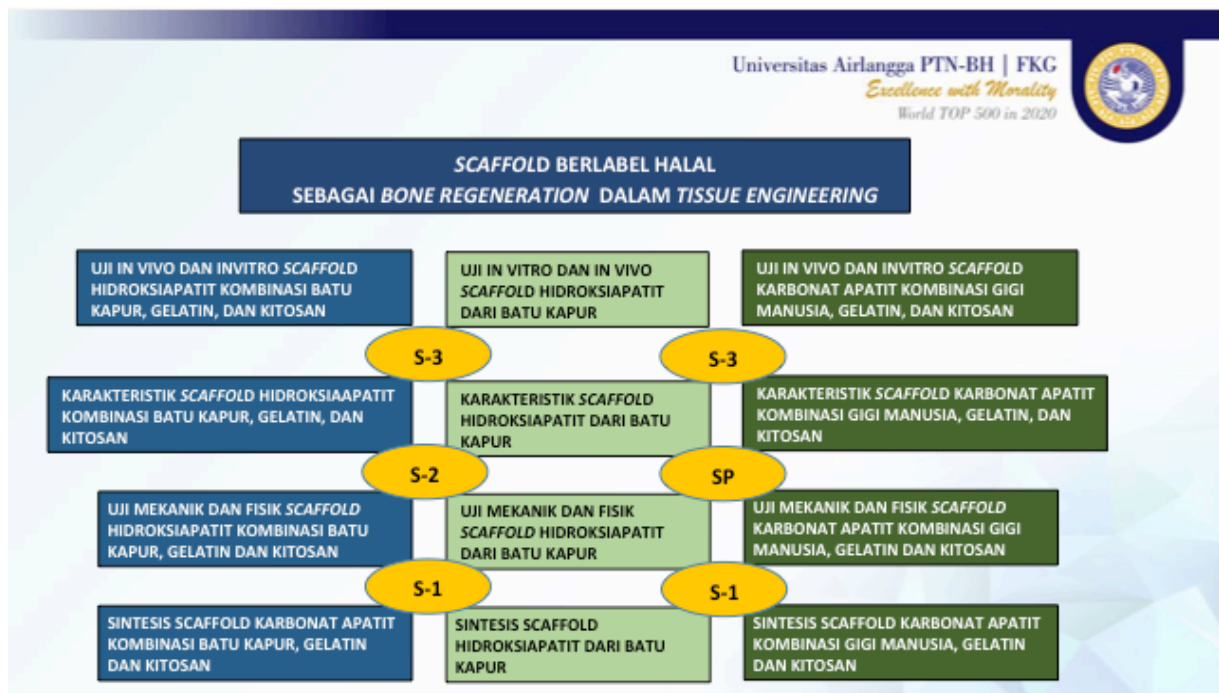
Human umbilical cord mesenchymal stem cell (hUCMSC) adalah populasi sel jaringan ikat multipoten yang melekat di plastik, mempunyai marker permukaan seperti CD 73, CD 90, dan CD 105, dan bukan merupakan sel hematopoietik. Sel tersebut merupakan sumber sel ekstra embrionik yang mempunyai laju proliferasi yang cepat dengan waktu penggandaan yang lebih singkat.³⁵ *Human umbilical cord mesenchymal stem cell* merupakan populasi sel heterogen, yang menunjukkan fenotip dan multipotensi yang mirip dengan *bone marrow mesenchymal stem cell* (BM-MSC), termasuk CD 44, CD 73, CD 90, CD 105, dan *human leukocyte antigen* (HLA) ABC. Setelah isolasi, sel sub amniotik mengekspresikan *stem cell*

(SSEA-4, Oct-4, dan Nanog) dan marker CD 73 dan CD 105, serta mempunyai kemampuan diferensiasi adipogenik, osteogenik, kondrogenik.³⁶

RIP DAN PETA JALAN PENELITIAN FAKULTAS

Salah satu *roadmap* penelitian di Fakultas Kedokteran Gigi adalah bidang biomaterial dan *tissue engineering*. Kedua bidang tersebut menjadi perhatian para peneliti khususnya Departemen Material Kedokteran Gigi. Biomaterial yang digunakan di kedokteran gigi kebanyakan berasal dari impor dan terus berkembang. Pemanfaatan biomaterial yang bersumber dari alam atau herbal belum banyak dimanfaatkan, padahal sumber tersebut bahan bakunya sangat melimpah.

Defek tulang sampai saat ini masih menjadi tantangan besar di bidang kedokteran gigi. Defek tulang dapat disebabkan oleh penyakit degeneratif, periodontitis agresif, trauma, reseksi rahang, dan kelainan kongenital dapat menyebabkan defek pada tulang rahang. Pada defek tulang yang kecil tubuh mampu melakukan *remodeling* secara spontan sedangkan pada defek tulang yang besar, *remodeling* tulang terbatas diperlukan biomaterial untuk memfasilitasi ke arah perbaikan dan meregenerasi jaringan yang telah rusak. Salah satu bahan yang banyak digunakan dalam perawatan ini adalah menggunakan material *bone graft* sebagai *scaffold*. Saat ini, biomaterial *bone graft* yang digunakan banyak berasal dari impor, sedangkan berasal dari alam seperti batu kapur perlu dikaji lebih dalam untuk menggantikan



produk impor.

METODE PENELITIAN

Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah penelitian eksperimental laboratoris, dengan desain penelitian *Post Test Only Control Group Design*.

Variabel Penelitian

- a. Variabel bebas : *scaffold* K-GEL:KA rasio 40:60 (w/w) 30:70 (w/w), 20:80 (w/w)
- b. Variabel terikat : gugus fungsi, kandungan, ukuran pori, rasio *swelling*, prosentasi *Water content*, dynamic degradation, *compressive strength*, ukuran porositas, Viabilitas dan prolifersi *hUCMSC* pada *scaffold* K-GEL :KA.

Definisi Operasional

- a. **Karbonat apatit (KA)** adalah bahan berupa serbuk putih yang terbuat dari kalsium karbonat yang di sintesis dari batu kapur produksi Balai riset keramik Bandung Indonesia
- b. **Gelatin** adalah bubuk putih yang berasal dari denaturasi kolagen sapi yang diproduksi oleh *Wako Pure Chemical Industries* (Cat. No. 076-02765).
- c. **Kitosan** adalah serbuk putih yang dibuat dari Pabrik Sigma (93646, USA) dengan derajat deasetilasi >81%.
- d. **Scaffold kitosan-GEL:KA berbasis batu kapur** adalah komposit berbentuk tabung berdiameter 5 mm dan tinggi 5 mm yang terbuat dari kitosan (K), gelatin (GEL), dan karbonat apatit (KA) berbasis batu kapur dengan perbandingan 30:70 (w/w) dengan metode *freeze-drying*.
- e. **Rasio swelling** adalah pengukuran kemampuan *scaffold* mengembang yang dihitung dari berat kering dan berat basah *scaffold* setelah direndam 24 jam di dalam aqua destilata melalui suatu rumus. Rumus untuk mencari rasio *swelling* adalah berat basah *scaffold* (*scaffold* yang sudah direndam dalam aqua destilata) dikurangi berat

kering *scaffold* kemudian dibagi dengan berat kering dan dikali 100%. Hasil akhir dalam satuan persen (%).

- f. **Permeabilitas** adalah Kemampuan struktur *scaffold* untuk mentransmisikan nutrisi melalui media berpori. Permeabilitas *scaffold* dalam (m^2).
- g. **Dynamic degradation** adalah Uji degradasi yang dirancang untuk meniru atau mendapatkan kondisi pada tulang karsinoma yang didalamnya terdapat pergerakan sumsum tulang dan terdapat beban karena aktivitas fisiologis. Tingkat degradasi *scaffold* dihitung melalui dua metode yaitu pengukuran penurunan berat dan evolusi gas hidrogen. Pengukuran tingkat degradasi dihitung hari ke 1, 3, 7, 14, 21, 28 Hasil akhir pengukuran degradasi dalam (mg/cm^2)
- h. **Mikro-struktur Morphology** adalah mempelajari ciri-ciri dan ukuran suatu struktur yaitu Porositas, *volume fraction*, *structure thickness*, *structure separation*, densitas *scaffold* atau ukuran pori *scaffold* adalah pengukuran diameter pori *scaffold* dan prosentasi poros *scaffold* dengan menggunakan micro CT dan *imaging analysis*.
- i. **Biokompatibilitas scaffold** pada penelitian ini menguji viabilitas dan proliferasi menggunakan MTT. Dasar pengujian ini adalah mengukur viabilitas sel hUCMSC berdasarkan aktivitas mitokondria sel yang dapat mereduksi garam *tetrazolium bromide* yang berwarna kuning menjadi endapan formazan berwarna ungu yang terdeteksi pada *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) *reader* panjang gelombang 595 nm. Hasil dari uji MTT berupa *optic density* (OD). Persentase viabilitas dihitung berdasarkan rumus yaitu OD kelompok perlakuan dibagi dengan kelompok kontrol.

Lokasi Penelitian

- a. Research center Fakultas kedokteran gigi Unair
- b. Medical Devices and Technology Centre (MEDITEC), Institute of Human Centred and Engineering (iHumEn), Universiti Teknologi Malaysia (UTM).
- c. Laboratorium Stem Cell, *Institut of Tropical Disease*, Unair.
- d. Laboratorium Material, Fakultas Teknologi Industri, ITS

Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama bulan Februari – September 2020.

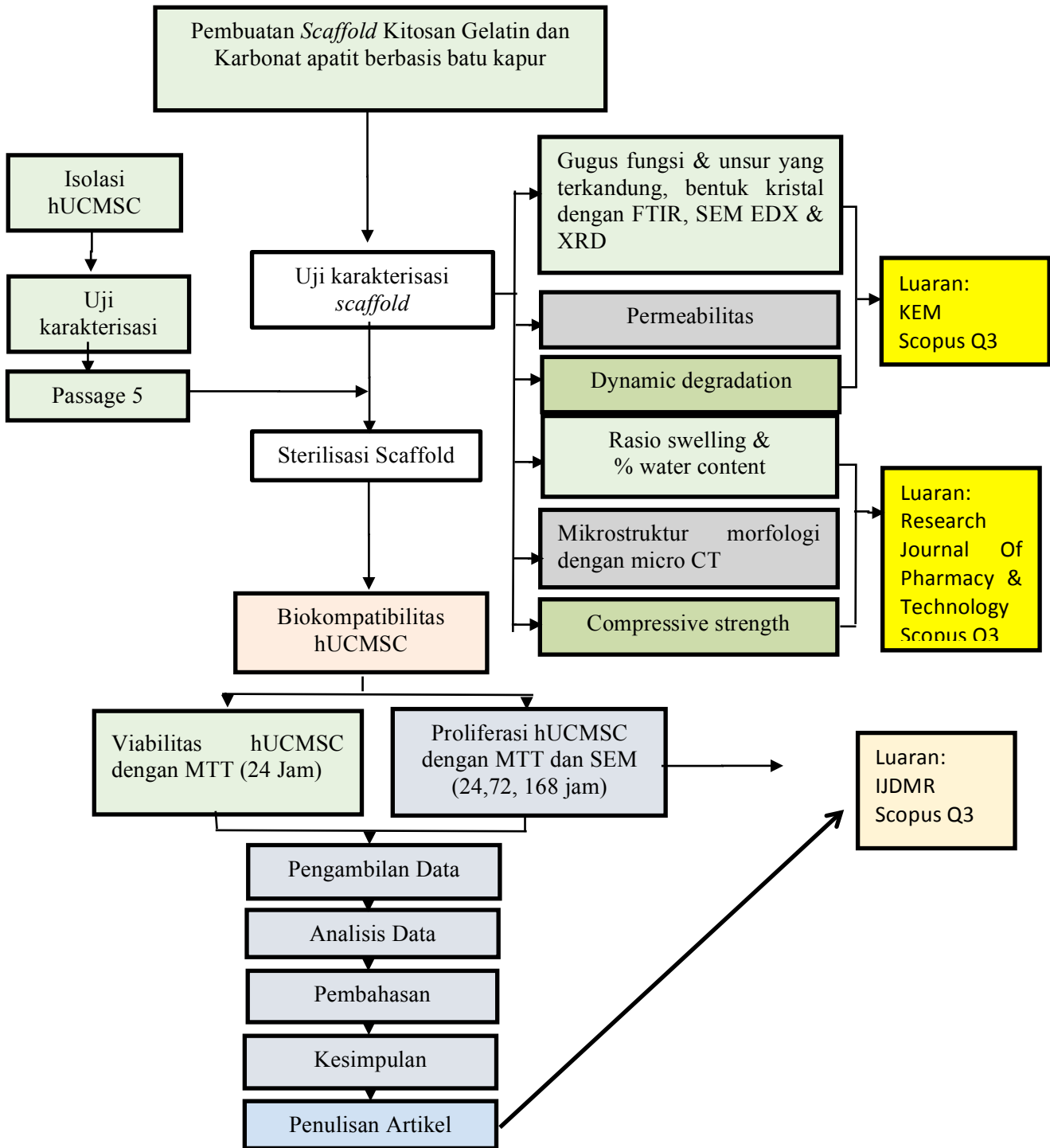
Bahan dan Alat

- a. Bahan : Kitosan dari cangkang kepiting dengan derajat deasetilasi 81% (Sigma

Aldrich 93646, USA), gelatin dari denaturasi kolagen sapi (Rousselot, Guangdong, China), karbonat apatit (sintesis batu kapur Balai Riset Keramik Bandung), NaOH (Merck), asam asetat (Merck), , etanol 70% (Sigma Aldrich), Simulated Body Fluid (SBF) (Merck), dan aqua destilata (Aqua Bidestilata Steril[®], Ikapharmindo), *carbon tape*, serta *plasma coating* Au dan Pb.

- b. Alat : Alat FTIR (Shimadzu 8400s, Jepang) , Skyscan 1172 micro-CT device (Kontich, Belgium), Mimics (MIMICS; materialise,Louvain, Belgium),universal testing machine (The FastTrack 8874, Instron, Norwood, USA , neraca Ohaus (Sigma[®], Adventurer R 3130), alat *freeze-dry* (VirTis Bechtol "K" Series[®]), SEM (FEI, Inspect-S50), *sputter coater* (Quorum), dan *vacuum*, komputer, monitor, *Energy-dispersive X-ray spectroscopy* (EDX), *laminar air flow* dilengkapi sinar UV, ELISA reader.

4.7 Alur Penelitian

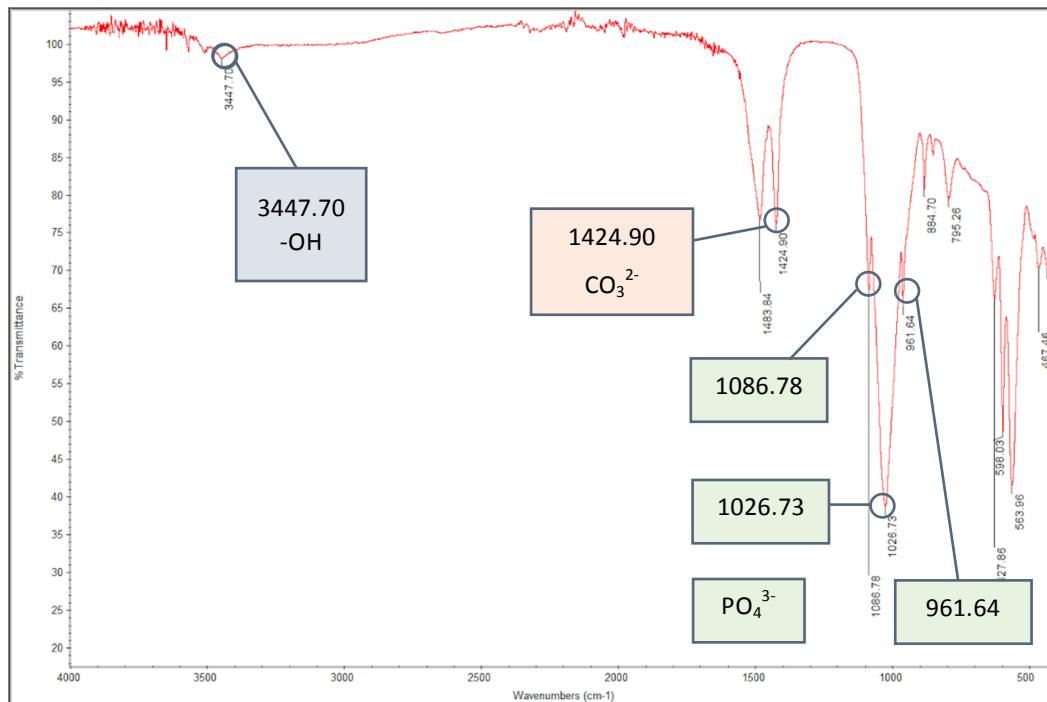


Keterangan:

- 1. Dilakukan peneliti UNAIR
- 2. Dilakukan peneliti mitra UTM
- 3. Dilakukan bersama sama
- 4. Luaran wajib
- 5. Luaran tambahan

HASIL PENELITIAN

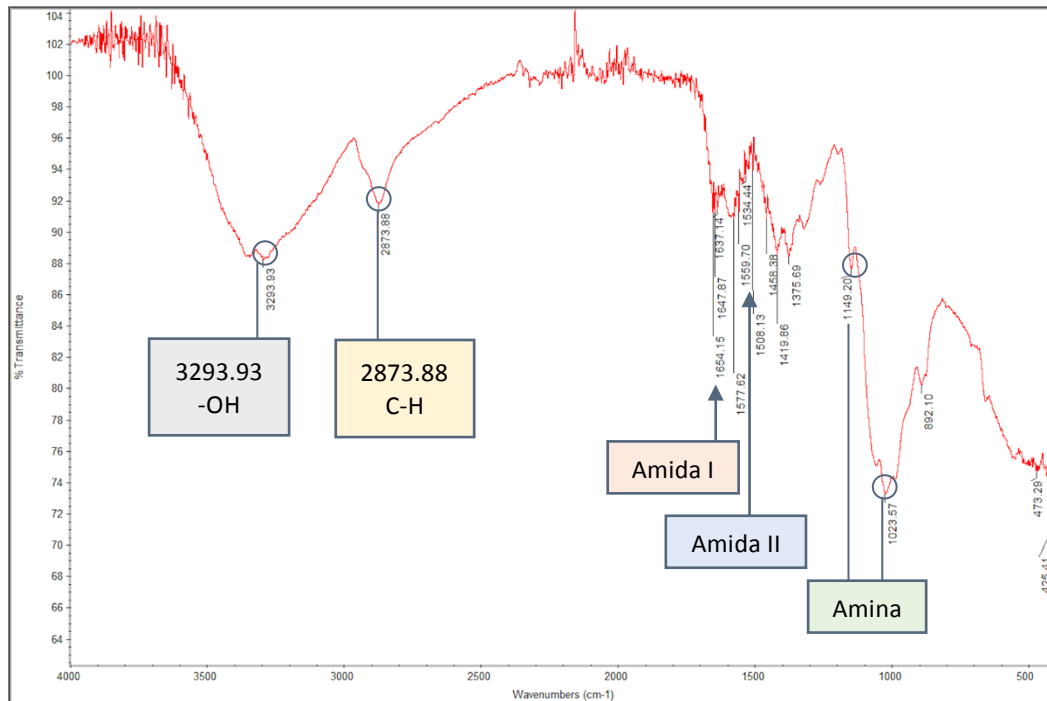
1. Hasil Uji *Fourier Transform Infra Red* (FTIR)



Gambar 1. Hasil *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) karbonat apatit berbahan dasar batu kapur Balai Besar Keramik

Hasil uji FTIR karbonat apatit berbahan dasar batu kapur Balai Besar Keramik diperoleh *peak* dari grafik transmisi (%) terhadap bilangan gelombang (cm⁻¹) (Gambar 1). Berdasarkan uji FTIR yang dilakukan pada kontrol karbonat apatit berbahan dasar batu kapur Balai Besar Keramik (BBK), didapatkan bahwa karbonat apatit memiliki gugus hidroksil (-OH), ion karbonat (CO₃²⁻), dan ion fosfat (PO₄³⁻). Gugus hidroksil (-OH) berada pada rentang gelombang 3700-3400 cm⁻¹, 3550-3500 cm⁻¹, dan 3300-2500 cm⁻¹ (Stuart, 2005; Nikolić, 2012). Karbonat apatit menunjukkan adanya gugus hidroksil (-OH) yang ditandai dengan *peak* pada bilangan gelombang 3447.70 cm⁻¹. Ion karbonat (CO₃²⁻) memiliki rentang panjang gelombang 1450-1410 cm⁻¹ (Nikolić, 2012). Sampel karbonat apatit menunjukkan adanya ion karbonat yang ditandai dengan *peak* pada 1424.90 cm⁻¹. Ion fosfat (PO₄³⁻) memiliki

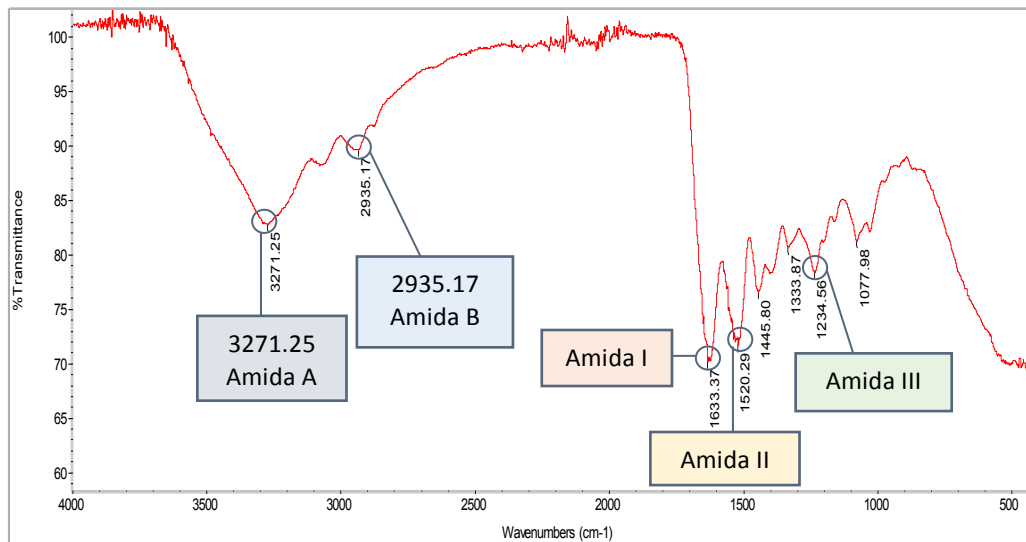
rentang gelombang 1100-950 cm^{-1} (Stuart, 2005). Adanya ion fosfat dalam sampel karbonat apatit berbahan dasar batu kapur ditandai dengan munculnya *peak* pada 1086.78 cm^{-1} , 1026.73 cm^{-1} , dan 961.64 cm^{-1} .



Gambar 2 Hasil *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) kitosan

Berdasarkan uji FTIR yang dilakukan pada kontrol kitosan dengan berat molekul medium, didapatkan bahwa kitosan memiliki gugus hidroksil (-OH), metil (C-H), amida I, amida II, dan amina (C-N). Gugus hidroksil (-OH) memiliki rentang gelombang antara 3300-2500 cm^{-1} (Stuart, 2005). Kitosan menunjukkan adanya gugus hidroksil (-OH) yang ditandai dengan *peak* pada 3293.93 cm^{-1} . Gugus metil (C-H) berada pada rentang gelombang 2960-2850 cm^{-1} , adanya gugus metil pada bubuk kitosan ditandai dengan *peak* pada bilangan gelombang 2873.88 cm^{-1} (Zúñiga-Zamora *et al.*, 2016). Gugus amida I berada pada rentang gelombang antara 1685-1630 cm^{-1} , adanya gugus amida I ditandai dengan *peak* pada 1654.14 cm^{-1} , 1647.87 cm^{-1} , dan 1637.14 cm^{-1} (Nikolić, 2012). Gugus amida II berada pada rentang gelombang antara 1550-1450 cm^{-1} (Stuart, 2005). Adanya gugus amida II pada kitosan

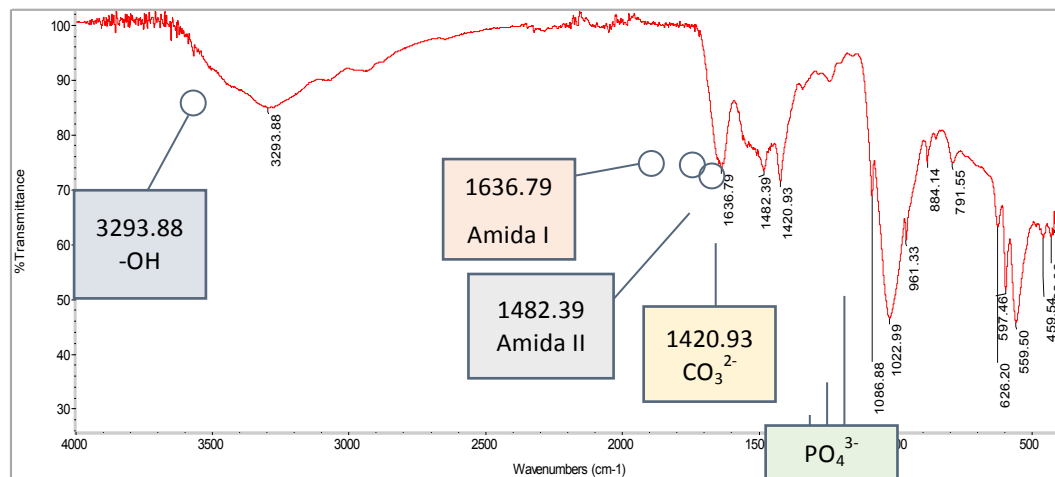
ditandai dengan *peak* pada 1559.70 cm^{-1} , 1534.44 cm^{-1} , 1508.13 cm^{-1} , dan 1458.38 cm^{-1} . Gugus amina berada pada rentang gelombang $1220\text{-}1020\text{ cm}^{-1}$ (Stuart, 2005). Gugus amina pada kitosan ditandai dengan adanya *peak* pada 1149.20 cm^{-1} dan 1023.57 cm^{-1} .



Gambar 3 Hasil *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) gelatin

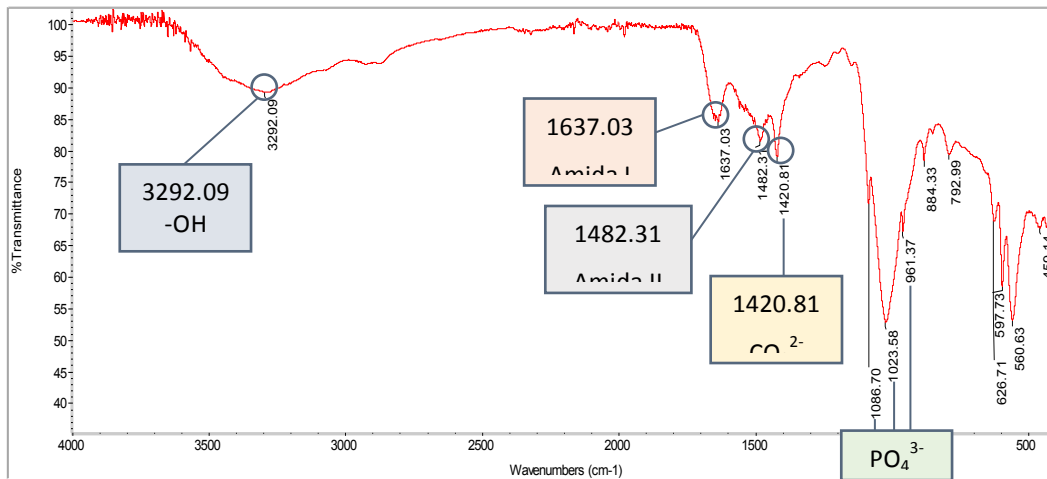
Berdasarkan uji FTIR yang dilakukan pada kontrol gelatin didapatkan adanya **amida A, amida B, amida I, amida II, amida III**. Gugus fungsi amida A (N-H) memiliki rentang gelombang antara $3300\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ (Stuart, 2005). Pada gelatin terdapat gugus fungsi amida A yang ditandai dengan *peak* 3271.25 cm^{-1} . Gugus fungsi amida B (N-H) memiliki rentang gelombang antara $2935\text{-}2915\text{ cm}^{-1}$ (Andakke *et al.*, 2020). Pada gelatin terdapat gugus fungsi amida B yang ditandai dengan adanya *peak* 2935.17 cm^{-1} . Gugus amida I berada pada rentang gelombang $1685\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ (Nikolić, 2012). Pada gelatin terdapat gugus amida I yang ditandai dengan adanya *peak* 1633.37 cm^{-1} . Gugus amida II berada pada rentang gelombang $1550\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$ (Stuart, 2005). Pada gelatin terdapat gugus amida II yang ditandai dengan adanya *peak* 1520.29 cm^{-1} . Gugus amida III berada pada rentang gelombang

1240-1234 cm^{-1} (Andakke *et al.*, 2020). Pada gelatin terdapat gugus amida III yang ditandai dengan adanya *peak* 1234.56 cm^{-1} .



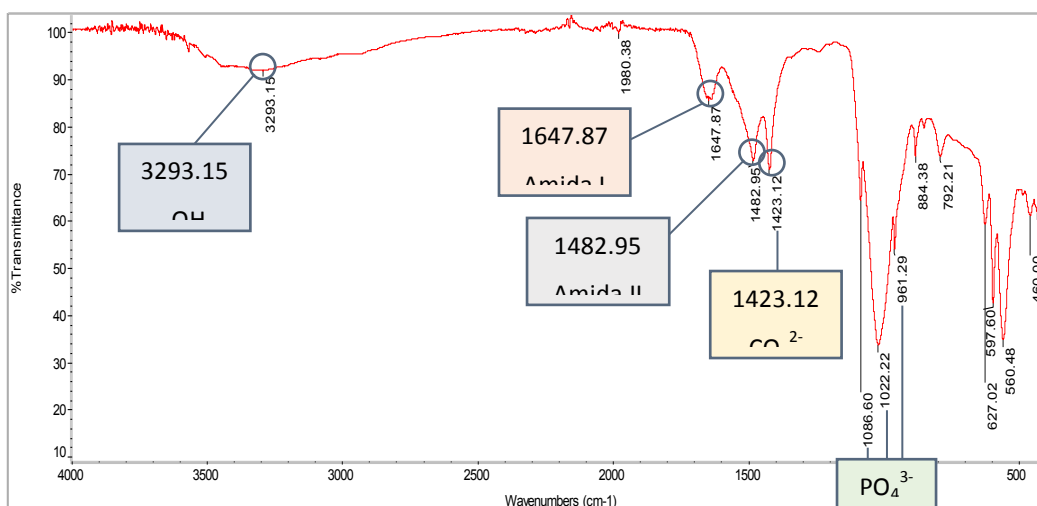
Gambar 4 Hasil *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) *scaffold* K-G:KA 40:60 (w/w)

Hasil identifikasi gugus fungsi *scaffold* K-G:KA dengan rasio 40:60 (w/w) didapatkan adanya gugus hidroksil (-OH) pada bilangan 3298.88 cm^{-1} . Gugus amida I yang terletak pada *peak* 1636.79 cm^{-1} . Gugus amida II yang ditandai dengan *peak* 1482.39 cm^{-1} . Ion karbonat (CO_3^{2-}) terletak pada *peak* 1420.93 cm^{-1} . Ion fosfat (PO_4^{3-}) yang terletak pada *peak* 1086.88 cm^{-1} , 1022.99 cm^{-1} , dan 961.33 cm^{-1} (Gambar 4).



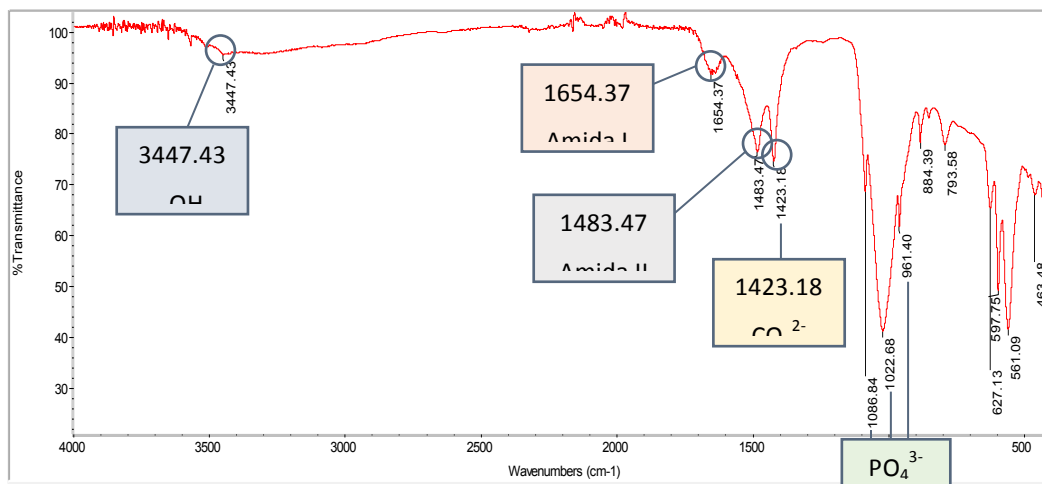
Gambar 5 Hasil *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) scaffold K-G:KA 30:70 (w/w)

Hasil identifikasi gugus fungsi scaffold K-G:KA dengan rasio 30:70 (w/w) didapatkan adanya gugus hidroksil (-OH) pada bilangan 3292.09 cm^{-1} . Ikatan amida I yang terletak pada *peak* 1637.03 cm^{-1} . Gugus amida II yang ditandai dengan *peak* 1482.31 cm^{-1} . Ion karbonat (CO_3^{2-}) terletak pada *peak* 1420.81 cm^{-1} . Ion fosfat (PO_4^{3-}) yang terletak pada *peak* 1086.70 cm^{-1} , 1023.58 cm^{-1} , dan 961.37 cm^{-1} (Gambar 5).



Gambar 6 Hasil *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) scaffold K-G:KA 20:80 (w/w)

Hasil identifikasi gugus fungsi *scaffold* K-G:KA dengan rasio 20:80 (w/w) didapatkan adanya gugus hidroksil (-OH) pada bilangan 3293.15cm^{-1} . Ikatan amida I yang terletak pada *peak* 1647.87cm^{-1} . Gugus amida II yang ditandai dengan *peak* 1482.95cm^{-1} . Ion karbonat (CO_3^{2-}) terletak pada *peak* 1423.12cm^{-1} . Ion fosfat (PO_4^{3-}) yang terletak pada *peak* 1086.60cm^{-1} , 1022.22cm^{-1} , dan 961.29cm^{-1} (Gambar 6).



Gambar 7 Hasil Fourier Transform Infra Red (FTIR) scaffold K-G:KA 10:90 (w/w)

Hasil identifikasi gugus fungsi *scaffold* K-G:KA dengan rasio 10:90 (w/w) didapatkan adanya gugus hidroksil (-OH) pada bilangan 3447.43cm^{-1} . Ikatan amida I yang terletak pada *peak* 1654.37cm^{-1} . Gugus amida II yang ditandai dengan *peak* 1483.87cm^{-1} . Ion karbonat (CO_3^{2-}) terletak pada *peak* 1423.18cm^{-1} . Ion fosfat (PO_4^{3-}) yang terletak pada *peak* 1086.84cm^{-1} , 1022.68cm^{-1} , dan 961.40cm^{-1} (Gambar 7).

2. Hasil Uji Scanning Electron Microscopy-Energy Dispersive X-Ray (SEM EDX)

Uji Scanning Electron Microscopy (SEM) dilakukan pada sampel kontrol karbonat apatit batu kapur BBK dan *scaffold* K-G:KA dengan 4 rasio (w/w), yaitu 40:60, 30:70, 20:80,

10:90. Permukaan sampel diamati dengan uji SEM menggunakan pembesaran 100x dan 500x. Berdasarkan hasil pengamatan SEM didapatkan ukuran pori pada *scaffold* K-G:KA 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 dengan pembesaran 100x (Tabel 5.1) memiliki *range* sebesar 30.42-282.7 μm , 40.59-153.8 μm , 43.71-441.0 μm , 44.10-145.2 μm . Pada pembesaran 500x memiliki *range* sebesar 13.52-95.81 μm , 12.01-107.3 μm , 12.90-58.10 μm , dan 5.245-30.60 μm .

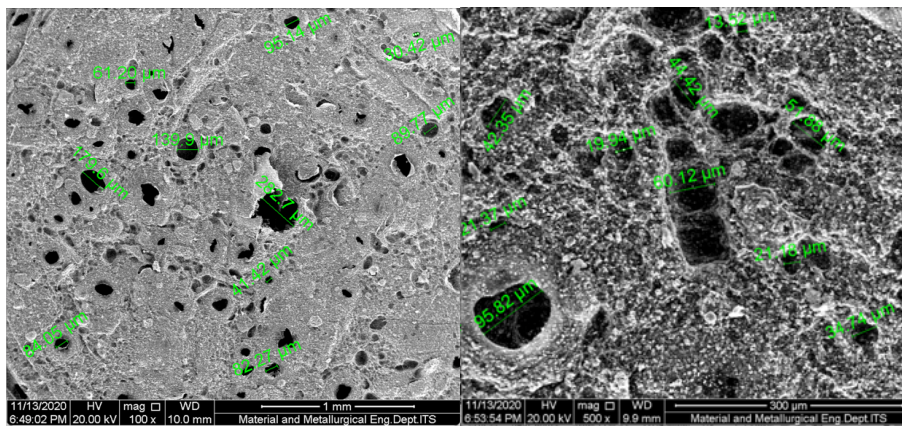
Uji *Energy Dispersive X-Ray* (EDX) dilakukan pada sampel kontrol karbonat apatit batu kapur BBK dan *scaffold* K-G:KA dengan 4 rasio (w/w), yaitu 40:60, 30:70, 20:80, 10:90. Uji dilakukan pada bagian tengah sampel dengan 5x pembesaran untuk sampel kontrol, dan 4x untuk sampel *scaffold*. Hasil uji menunjukkan terdapat enam unsur yang terkandung pada sampel kontrol, yaitu O, Mg, Al, Si, P, dan Ca, serta delapan unsur yang terkandung pada *scaffold* K-G:KA, yaitu C, N, O, Mg, Al, Si, P, dan Ca.

Tabel 1 Ukuran pori *scaffold* dengan pembesaran SEM sebesar 100x

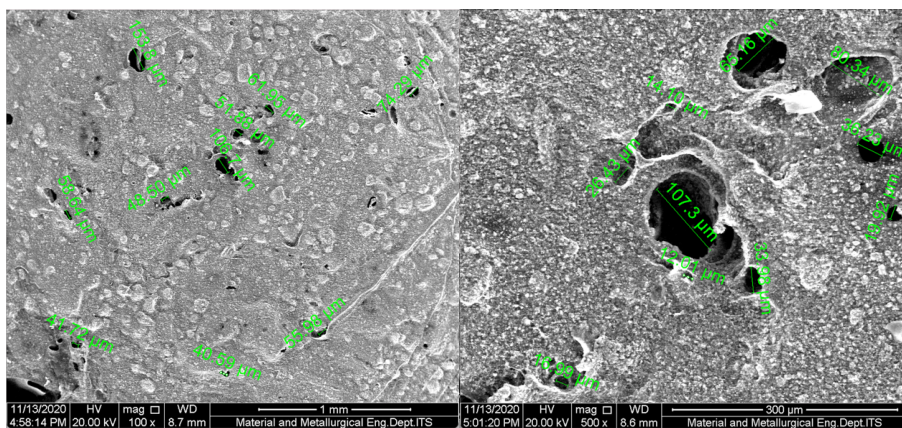
Pembesaran	Rasio			
	40:60	30:70	20:80	10:90
100x	30.42	40.59	43.71	44.10
	41.42	41.72	52.53	55.37
	61.40	48.50	67.09	84.51
	82.87	51.88	70.18	95.28
	84.05	55.98	77.59	117.8
	89.77	58.64	106.4	136.1
	95.14	61.95	106.9	138.4
	139.9	74.29	111.5	138.4
	179.6	106.7	200.0	142.4
	282.7	153.8	441.0	145.2

500x	13.52	12.01	12.90	5.245
	19.94	14.10	14.62	5.373
	21.18	16.99	28.61	6.195
	21.37	19.92	38.59	8.345
	34.74	26.43	40.42	15.04
	42.35	33.93	41.87	16.04
	44.42	36.23	45.36	20.33
	51.88	65.16	47.70	24.34
	60.12	80.34	58.10	25.67
	95.82	107.3	30.60	

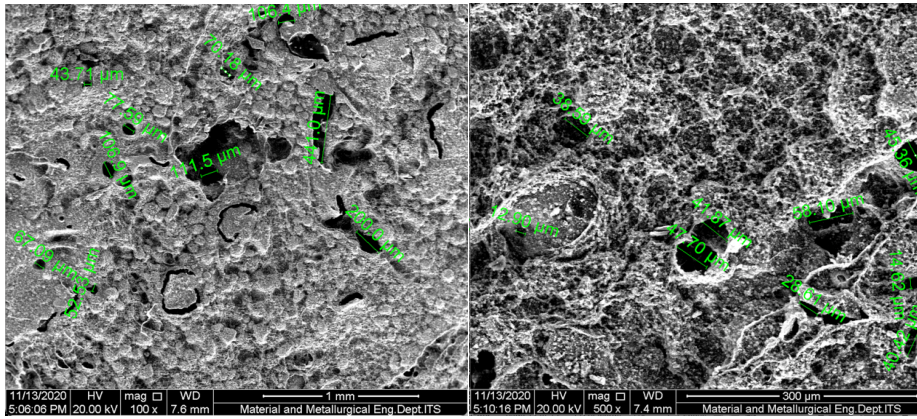
Hasil Uji *Scanning Electron Microscopy* (SEM)



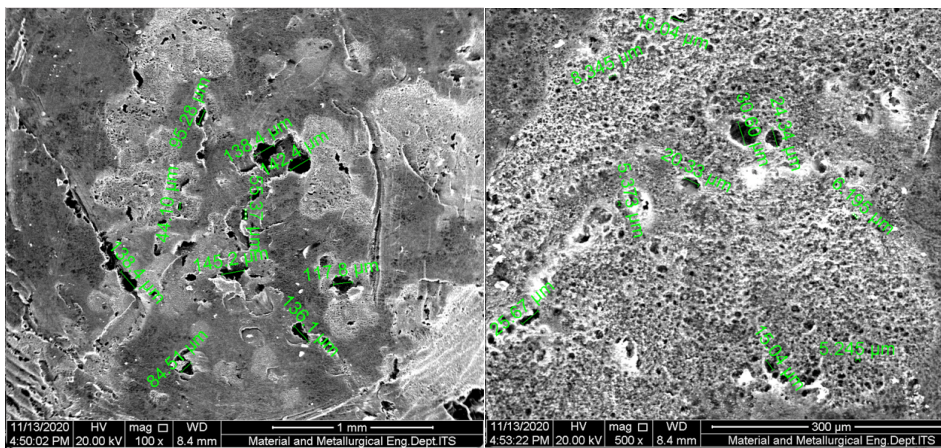
Gambar 8. Hasil uji SEM *scaffold* K-G:KA 40:60 (w/w) (a) pembesaran 100x, (b) pembesaran 500x



Gambar 9. Hasil uji SEM *scaffold* K-G:KA 30:70 (w/w) (a) pembesaran 100x, (b) pembesaran 500x



Gambar 10. Hasil uji SEM *scaffold* K-G:KA 20:80 (w/w) (a) pembesaran 100x, (b) pembesaran 500x



Gambar 11. Hasil uji SEM *scaffold* K-G:KA 10:90 (w/w) (a) pembesaran 100x, (b) pembesaran 500x

Tabel 2 Hasil uji *Energy Dispersive X-ray* (EDX) kontrol karbonat apatit

Percobaan	Elemen (At%)		Perbandingan Ca:P
	Ca	P	
1.	26.43	14.59	1.81
2.	21.46	12.65	1.69
3.	24.44	13.20	1.85
4.	11.98	07.28	1.64
Rerata	21.08	11.93	1.77

Uji EDX pada sampel kontrol karbonat apatit baru kapur BBK menunjukkan rerata elemen Ca sebesar 21.08% dan elemen P sebesar 11.93%. Perbandingan rerata atomik elemen Ca : P sebesar 1.77.

Tabel 2 Hasil uji *Energy Dispersive X-ray* (EDX) *scaffold* K-G:KA 40:60

Percobaan	Elemen (At%)		Perbandingan Ca:P
	Ca	P	
1.	15.92	09.65	1.65
2.	16.51	09.23	1.79
3.	17.22	09.40	1.83
4.	15.71	09.13	1.72
Rerata	16.34	09.35	1.75

Uji EDX pada sampel *scaffold* K-G:KA dengan rasio 40:60 (w/w) menunjukkan rerata elemen Ca sebesar 16.34% dan elemen P sebesar 9.35%. Perbandingan rerata atomik elemen Ca : P sebesar 1.75.

Tabel 3 Hasil uji *Energy Dispersive X-ray* (EDX) *scaffold* K-G:KA 30:70

Percobaan	Elemen (At%)		Perbandingan Ca:P
	Ca	P	
1.	18.02	10.66	1.69
2.	18.26	10.76	1.70
3.	19.04	10.24	1.86
4.	17.28	10.03	1.72
Rerata	18.15	10.42	1.74

Uji EDX pada sampel *scaffold* K-G:KA dengan rasio 30:70 (w/w) menunjukkan rerata elemen Ca sebesar 18.15% dan elemen P sebesar 10.42%. Perbandingan rerata atomik elemen Ca : P sebesar 1.74.

Tabel 4 Hasil uji *Energy Dispersive X-ray* (EDX) *scaffold* K-G:KA 20:80

Percobaan	Elemen (At%)		Perbandingan Ca:P
	Ca	P	
1.	20.44	10.27	1.99
2.	21.89	10.96	2.00
3.	20.69	10.12	2.00
4.	18.50	10.02	1.85
Rerata	20.38	10.34	1.97

Uji EDX pada sampel *scaffold* K-G:KA dengan rasio 20:80 (w/w) menunjukkan rerata elemen Ca sebesar 20.38% dan elemen P sebesar 10.34%. Perbandingan rerata atomik elemen Ca : P sebesar 1.97.

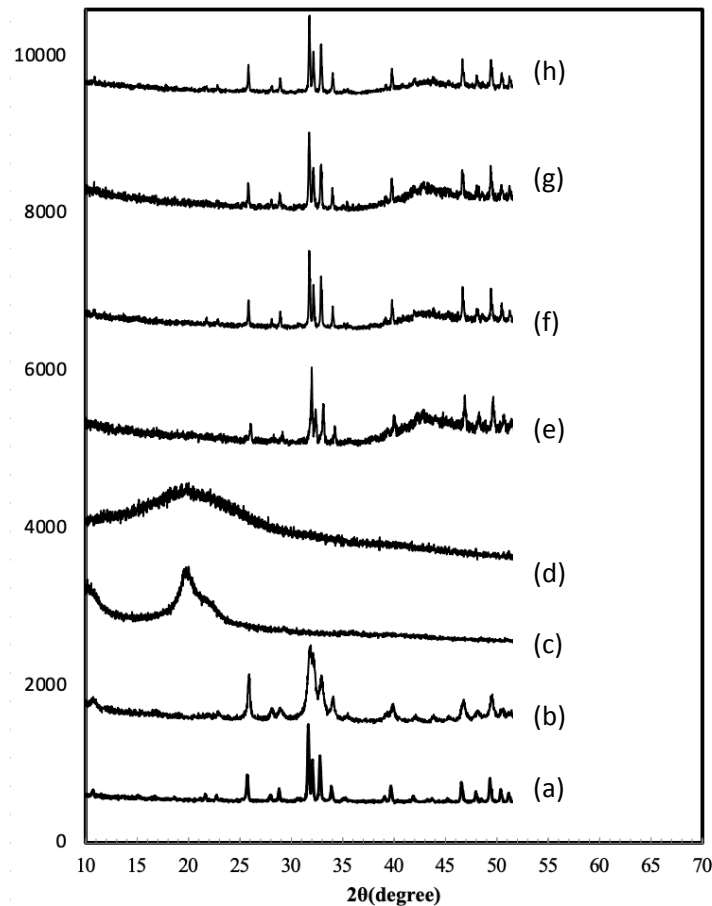
Tabel 5 Hasil uji *Energy Dispersive X-ray* (EDX) *scaffold* K-G:KA 10:90

Percobaan	Elemen (At%)		Perbandingan Ca:P
	Ca	P	
1.	21.41	11.57	1.85
2.	22.69	12.20	1.86
3.	22.76	12.08	1.88
4.	23.37	12.26	1.91
Rerata	22.56	12.02	1.88

Uji EDX pada sampel *scaffold* K-G:KA dengan rasio 10:90 (w/w) menunjukkan rerata elemen Ca sebesar 22.56% dan elemen P sebesar 12.02%. Perbandingan rerata atomik elemen Ca : P sebesar 1.88.

3. Hasil Uji *X-Ray Diffraction* (XRD)

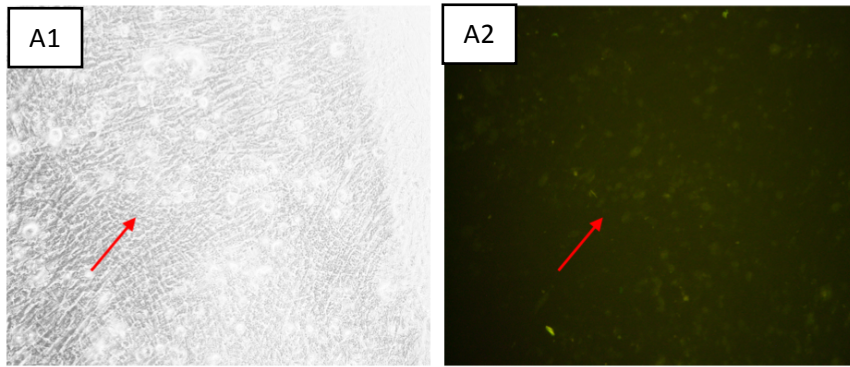
Hasil uji XRD (Gambar 12) pada sampel kontrol karbonat apatit batu kapur BBK memiliki pola grafik dengan *peak* yang tegas sehingga diartikan bahwa sampel yang diuji memiliki bentuk kristal, kemudian karbonat apatit menunjukkan adanya kemiripan pola grafik dengan hidroksiapatit sintesis. Pada sampel kitosan didapatkan ada dua *peak* tinggi dengan jarak yang lebar atau landai sehingga diartikan bahwa kitosan memiliki bentuk semi-kristal. Sampel gelatin menunjukkan *peak* yang landai sehingga diartikan bahwa gelatin memiliki bentuk amorf. Pada sampel *scaffold* dengan rasio 40:60, 30:70, 20:80, 10:90 didapatkan adanya pola grafik dengan *peak* yang serupa dengan karbonat apatit, hal ini menunjukkan bentuk sampel adalah kristal karena kristalinitas karbonat apatit yang tinggi sedangkan puncak *peak* dari kitosan dan gelatin tidak terlihat karena kristalinitas yang rendah.



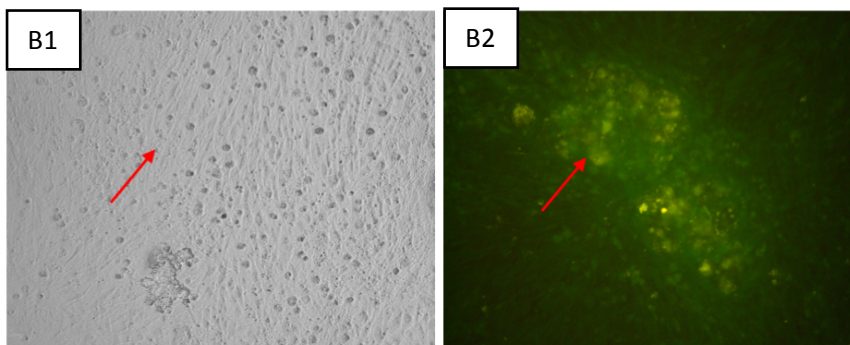
Gambar 12 Grafik hasil *X-Ray Diffraction* (XRD) (a) karbonat apatit batu kapur BBK, (b) hidroksiapatit sintesis, (c) kitosan, (d) gelatin, (e) *scaffold* K-G:KA 40:60, (f) *scaffold* K-G:KA 30:70, (g) *scaffold* K-G:KA 20:80, (h) *scaffold* K-G:KA 10:90

4. Hasil karakterisasi hUCMSC

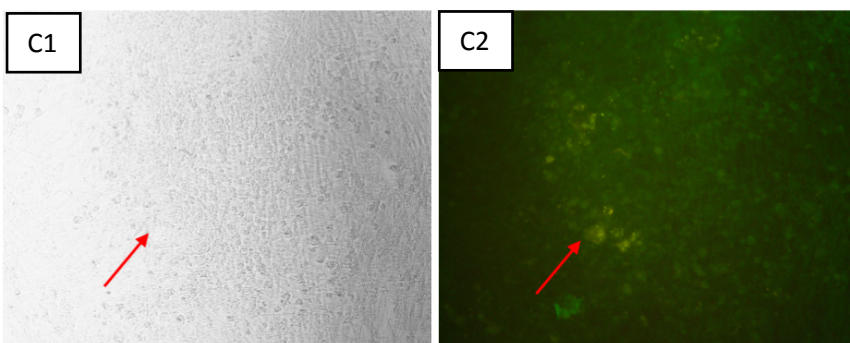
Pada penelitian ini karakterisasi hUCMSC dilakukan dengan metode imunositokimia berlabel FIT-C. Pemeriksaan imunositokimia menunjukkan hasil negatif pada pencengatan CD 45 yang merupakan marker *hematopoietic stem cell*. Pencengatan dengan CD 90 dan CD 105 di bawah mikroskop fluoresen menunjukkan ekspresi kuat yang merupakan ekspresi positif MSC. Karakterisasi hUCMSC dengan menggunakan CD 45, CD 90 dan CD 105 pada mikroskop fluorescence dengan pembesaran 40x terlihat pada gambar 13



CD45



CD90



CD105

Gambar 13. Karakterisasi hUCMSC dengan pengecatan imunositokimia berlabel FIT-C. Karakterisasi dengan menggunakan CD 45 (A1-A2), CD 90 (B1-B2) dan CD 105 (C1-C2) pada mikroskop fluorescens dengan pembesaran 40x. Hasil pengecatan menunjukkan (A2) ekspresi negatif CD 45 (panah merah), (B2) ekspresi kuat CD 90 (panah merah) dan ekspresi kuat CD 105 (panah merah)

5. Hasil uji viabilitas dan proliferasi hUCMSC menggunakan MTT Assay

Tabel 7. Hasil persentasi viabilitas dan proliferasi *hUCMSC* setelah kontak dengan

Scaffold Kitosan-Gelatin: Karbonat Apatit (K-Gel:KA)

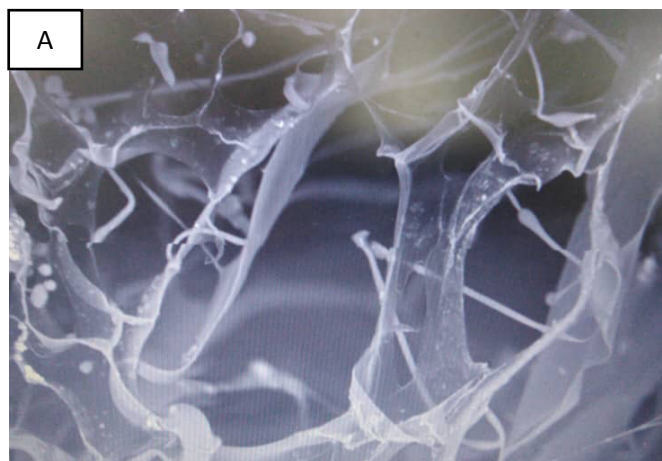
Berdasarkan tabel 7. rerata persentasi jumlah sel hidup paling banyak pada scaffold K-Gel:KA 30:70 dengan waktu kontak 24 jam sebesar 101,70%, dengan waktu kontak 72 jam sebesar 113.61%. Persentasi jumlah sel hidup paling rendah pada scaffold K-Gel:KA 10:90 dengan waktu kontak 24

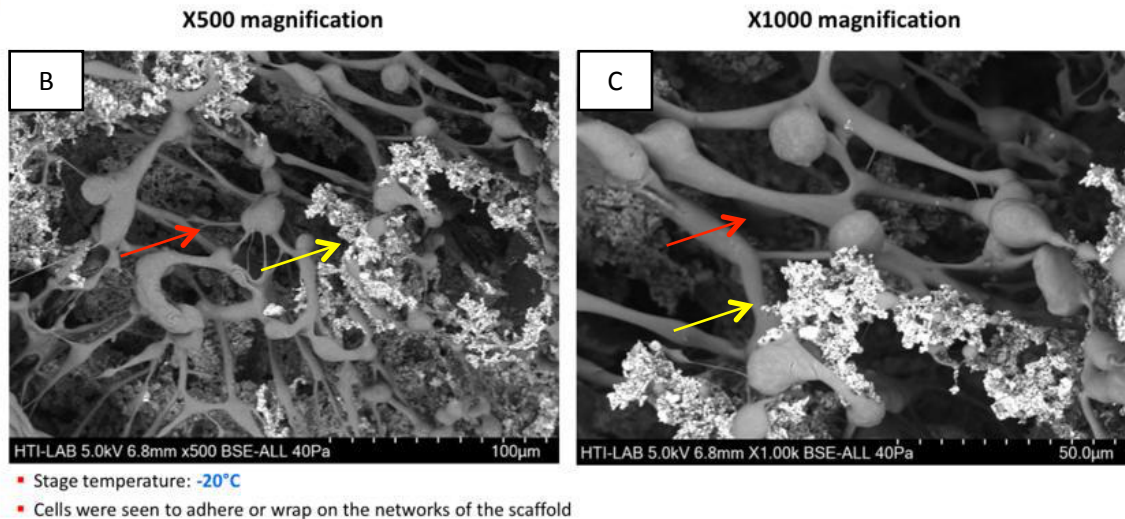
jam
sebes
ar
81,84
%,
denga
n

No	Scaffold K-Gel:KA	N	Viabilitas hUCMSC 24 Jam			Proliferasi hUCMSC 72 jam		
			Rerata OD	SD	% sel hidup	Rerata OD	SD	% sel hidup
1	40:60	5	0.59	3.89	101.10	0.70	2.52	111.91
2	30:70	5	0.59	3.89	101.70	0.77	2.55	113.61
3	20:80	5	0.52	4.82	87.76	0.65	1.58	95.22
4	10:90	5	0.49	5.58	81.84	0.64	2.55	93.75

waktu kontak 72 jam sebesar 93,75%. Jumlah sel hidup meningkat seiring dengan bertambahnya waktu kontak. Pada uji Oneway Anova dan *Post Hoc* dengan *Tukey HSD* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada setiap kelompok perbandingan Scaffold K-Gel:KA dengan kontrol sel saat kontak selama 24 jam dan 72 ja

6. Hasil pengamatan scaffold Kitosan-Gelatin: KA dengan SEM Cooling stage





Gambar 3 Gambaran Cooling stage SEM pada temperatur -20°C (A) Scaffold Kitosan-Gelatin: KA tanpa sel dengan pembesaran 1000x (B) hUCMSC tampak menempel dan membuat ikatan dengan Scaffold Kitosan-Gelatin: KA (panah merah), dikelilingi oleh mineral (panah kuning) dengan pembesaran 500x (C) hUCMSC tampak menempel dan membuat ikatan dengan Scaffold Kitosan-Gelatin: KA (panah merah), dikelilingi oleh mineral (panah kuning) dengan pembesaran 1000x

DAFTAR PUSTAKA

1. Murphy CMC, O'Brien FJ, Little DDG, Schindeler A, O'Brien F, Little DDG, et al. Cell scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cells Mater.* 2013 Sep;26:120–32.
2. Tuzlakoglu K, Reis RL. Formation of bone-like apatite layer on chitosan fiber mesh scaffolds by a biomimetic spraying process. *J Mater Sci Mater Med.* 2007 Jun;18(7):1279–86.
3. Kim G, Ahn S, Kim Y, Cho Y, Chun W. Coaxial structured collagen–alginate scaffolds: fabrication, physical properties, and biomedical application for skin tissue regeneration. *J Mater Chem.* 2011 Apr;21(17):6165–72.
4. Ariani MD, Matsuura A, Hirata I, Kubo T, Kato K, Akagawa Y. New development of carbonate apatite-chitosan scaffold based on lyophilization technique for bone tissue engineering. *Dent Mater J.* 2013;32(2):317–25.
5. Roveri N, Battistella E, Foltran I, Foresti E, Iafisco M, Lelli M, et al. Synthetic Biomimetic Carbonate-Hydroxyapatite Nanocrystals for Enamel Remineralization. *Adv Mater Res.* 2008 Jun;47–50:821–4.
6. Costa-Pinto AR, Reis RL, Neves NM. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Eng Part B Rev.* 2011 Oct;17(5):331–47.
7. Rodriguez I. Tissue engineering composite biomimetic gelatin sponges for bone

regeneration. Thesis. Virginia Commonwealth University: Virginia; 2013.

8. Nie W, Peng C, Zhou X, Chen L, Wang W, Zhang Y, et al. Three-dimensional porous scaffold by self-assembly of reduced graphene oxide and nano-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Carbon N Y*. 2017;116:325–37.
9. Barralet J, Akao M, Aoki H, Aoki H. Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats. *J Biomed Mater Res*. 2000 Feb;49(2):176–82.
10. Levengood SL, Zhang M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B [Internet]*. 2014 Jun 7 [cited 2019 Jul 11];2(21):3161–84.
11. Alizadeh M, Abbasi F, Khoshfetrat AB, Ghaleh H. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Mater Sci Eng C*. 2013 Oct;33(7):3958–67.
12. Lukman MW, Yudyanto, Hartatiek. Sintesis Biomaterial Komposit CaO-SiO₂ Berbasis Material Alam (Batuan Kapur Dan Pasir Kuarsa) Dengan Variasi Suhu Pemanasan Dan Pengaruhnya Terhadap Porositas, Kekerasan Dan Mikrostruktur. Skripsi. Universitas Negeri Malang: Malang; 2013.
13. Duya P, Bian Y, Chu X, Zhang Y. Stem cells for reprogramming: could hUMSCs be a better choice? *Cytotechnology*. 2013 May;65(3):335–45.
14. Sobczak A, Kowalski Z, Wzorek Z. Preparation of hydroxyapatite from animal bones. *Acta Bioeng Biomech*. 2009;11(4):23–8.
15. Yalcinkaya TM, Sittadjody S, Opara EC. Scientific principles of regenerative medicine and their application in the female reproductive system. *Maturitas*. 2014 Jan;77(1):12–9.
16. Pace A, Valenza A, Vitale G. Mechanical characterisation of human cancellous bone tissue. In: *I materiali biocompatibili per la medicina/Biomaterials for Medicine*. Palermo: Universitas Studiorum; 2014. p. 15–8.
17. Khanchan M, Dasgupta S, Kundu B & Bissoyi A .Development of gelatin-chitosan-hydroxyapatite based bioactive bone scaffold with controlled pore size & mechanical strength. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2015; 26(16): 1190-1209.
18. Thein-Han WW, Saikhun J, Pholpramoo C, Misra RDK, Kitiyanant Y. Chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP–buffalo embryonic stem cells. *Acta Biomater*. 2009 Nov;5(9):3453–66.
19. Hunter KT, Ma T. In vitro evaluation of hydroxyapatite-chitosan-gelatin composite membrane in guided tissue regeneration. *J Biomed Mater Res Part A*. 2013 Apr;101A(4):1016–25.
20. Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, et al. Biodegradable Polymer

Membranes Applied in Guided Bone/Tissue Regeneration: A Review. *Polymers (Basel)*. 2016 Mar;8(4):115.