

SINTESIS DAN KARAKTERISASI KOMPOSIT HIDROKSIAPATIT DARI TULANG IKAN LAMURU (*Sardinella Longiceps*)-KITOSAN SEBAGAI BONE FILLER

Astuti Amin, Maria Ulfah

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar
Jalan Perintis Kemerdekaan Km.13,7 Daya - Makassar 90242
amin.astuti@gmail.com

Pada Penelitian telah dilakukan sintesis hidroksiapatit (HA) dari tulang Ikan Lamuru (*Sardinella*) dan komposit HA-kitosan untuk aplikasi bone filler. HA diperoleh dengan reaksi hidrotermal antara 1M aragonit (CaCO_3) dari tulang Ikan Lamuru dan 0,6M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ dengan suhu 200°C dan variasi durasi 12, 24 dan 36 jam. Kemudian dilakukan sintering dengan suhu 900°C selama 1 jam. Sampel dengan kandungan HA tertinggi dijadikan matriks untuk mensintesis komposit, dengan kitosan sebagai serat/filler. Sintesis komposit HA-kitosan dilakukan dengan metode pencampuran sederhana dengan variasi kitosan dari 20 hingga 35%. Uji XRD, kekuatan tekan, dan MTT assay dilakukan untuk menentukan sampel terbaik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diperoleh 100% CaCO_3 dari tulang sotong dan berhasil diproses menjadi 100% HA amorf. Proses sintering mengakibatkan perubahan prosentase HA dengan derajat kristalinitas yang jauh lebih baik. Kandungan HA tertinggi diperoleh pada durasi hidrotermal 36 jam setelah disintering, yaitu 91%. Sampel terbaik diperoleh pada komposit dengan kitosan 20% yang mengindikasikan terjadinya penyatuan secara sempurna antara HA dan kitosan. Penambahan kitosan meningkatkan viabilitas sel dari 89,00% menjadi 92,11%. Komposit HA dari tulang Ikan Lamuru -kitosan berpotensi untuk aplikasi bone filler pada tulang cancellous.

Kata kunci : Hidroksiapatit, Tulang Ikan Lamuru , Hidrotermal, Komposit HA-kitosan, Bone filler

PENDAHULUAN

Berdasarkan data di Asia, Indonesia adalah negara dengan jumlah penderita patah tulang tertinggi. Diantaranya, ada sebanyak 300-400 kasus operasi bedah tulang per bulan di RS. Dr. Soetomo Surabaya (Gunawarman dkk, 2010). Setiap tahun kebutuhan substitusi tulang terus bertambah. Hal tersebut disebabkan meningkatnya kecelakaan yang mengakibatkan patah tulang, penyakit bawaan dan non-bawaan (Ficai *et al.*, 2011). Klasifikasi material substitusi tulang meliputi *autograft*, *allograft*, dan *xenograft*. Setiap material tersebut memiliki kekurangan dan kelebihan sebagai material untuk memperbaiki tulang.

Kelemahan *autograft* adalah sering menyebabkan komplikasi dalam penyembuhan luka, operasi tambahan, nyeri pada donor dan pasokan tulang tidak memadai untuk mengisi *gap*. Sedangkan *allograft* dan *xenograft* terkait dengan reaksi infeksi, inflamasi, dan penolakan. Teknik *allograft* yang menggunakan tulang mayat, memiliki masalah dalam reaks imunogenik dan resiko penyakit menular (AIDS dan hepatitis). *Xenograft* juga membawa resiko penyakit menular antar spesies (Wahl dan Czernuszka, 2006 dan Venkatesan *et al.*, 2010). Keterbatasan tersebut memicu perkembangan riset di bidang biomaterial, yaitu dengan melakukan berbagai modifikasi pembuatan biomaterial sintetik. Dengan

biomaterial sintetik diharapkan karakter bahan diketahui secara pasti dan terkontrol.

Hidroksiapatit (HA) telah dipelajari selama bertahun-tahun dan digunakan secara luas untuk pembuatan implan karena kesamaannya dengan fase mineral tulang dan terbukti biokompatibel dengan tulang dan gigi manusia (Ivankovic, 2010 dan Earl, 2006). HA dengan rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ adalah komponen anorganik utama dari jaringan keras tulang dan menyumbang 60-70% dari fase mineral dalam tulang manusia. HA mampu menjalani ikatan osteogenesis dan relatif tidak larut *in vivo*. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa HA tidak menunjukkan toksisitas, respon peradangan, respon pirogenetik (menimbulkan demam). Selain itu, pembentukan jaringan fibrosa antara implan dan tulang sangat baik, dan memiliki kemampuan menjalin ikatan langsung dengan tulang *host*. HA menunjukkan sifat bioaktif dan osteokonduktif (Hui, 2010) yang sangat bermanfaat dalam proses mineralisasi tulang (Dewi, 2009). HA yang disintesis dari bahan alam memiliki osteokonduktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan dari bahan sintetik (Saraswathy, dalam Dewi, 2008). Bahan alam yang dapat digunakan untuk sintesis HA adalah tulang Ikan Lamuru (*Sardinella*). Tulang Ikan Lamuru (*Sardinella*) merupakan residu budidaya perikanan yang biasanya dimanfaatkan sebagai pakan ayam petelu dan ayam pedaging sebagai asupan kalsium. Dengan harganya yang terjangkau, 85% kalsium karbonat (CaCO_3) yang terkandung dalam tulang Ikan Lamuru (*Sardinella*) dapat

dimanfaatkan sebagai sumber kalsium dalam sintesis HA yang ekonomis dan dapat dijangkau oleh masyarakat luas. *Scaffolds* HA dari tulang sotong pertama kali disintesis pada tahun 2005 oleh Rocha *et al.* dengan metode hidrotermal pada suhu 200°C. Hasil uji *scaffolds* tersebut menunjukkan stabilitas termal yang tinggi. Selain itu, hasil uji *in vitro* bioaktivitas pada SBF dan biokompatibilitas dengan osteoblas, menunjukkan *scaffolds* HA dari tulang sotong cocok untuk aplikasi implan atau rekayasa jaringan. Dalam pengaplikasiannya, biokeramik seperti HA dan trikalsium fosfat (TKF) bersifat rapuh. Untuk menyempurnakan sifat mekanik HA dapat dilakukan modifikasi dengan menambahkan polimer sebagai serat/*filler*. Kitosan adalah salah satu polimer alami yang berpotensi untuk digunakan sebagai serat/*filler* dalam pembuatan komposit. Kitosan memiliki karakter bioresorbabel, biokompatibel, non-toksik, nonantigenik, biofungsional dan osteokonduktif. Karakter osteokonduktif yang dimiliki kitosan dapat mempercepat pertumbuhan osteoblas pada komposit HA-kitosan sehingga dapat mempercepat pembentukan mineral tulang. Pramanik *et al.* (2009) mensintesis nanokomposit HA-kitosan dengan cara pelarutan sederhana berdasarkan metode kimia. Variasi HA yang dilakukan dari 10% hingga 60%. Hasil penelitian menunjukkan nano-komposit yang dihasilkan dapat digunakan untuk aplikasi *bone tissue engineering*. Namun, sekitar 70% penyusun tulang manusia merupakan senyawa kalsium fosfat, sehingga pada penelitian ini akan

dilakukan sintesis komposit HA dari tulang sotong (*Sepia sp.*)-kitosan dengan variasi HA : kitosan = (80 : 20), (75 : 25), (70 : 30), (65 : 35). Komposit diharapkan memiliki sifat mekanik yang baik untuk tujuan aplikasi *bone filler*. Selain itu, diharapkan penambahan kitosan dapat meningkatkan osteokonduktivitas HA, sehingga dapat mempercepat pembentukan mineral tulang.

METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah CaCO_3 ($M_r = 100$) 1M diperoleh dengan menambahkan 100 gram CaCO_3 ke dalam 1 liter aquades. Sedangkan larutan $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ($M_r = 115$) 0,6 M dibuat dengan melarutkan 69 gram ke dalam 1 liter aquades. Pembuatan komposit HA-kitosan dilakukan dengan metode pencampuran sederhana. Kitosan dilarutkan dalam 10 ml aquades bersuhu 70°C , kemudian ditambahkan bubuk HA secara perlahan. Massa kitosan dan HA disesuaikan dengan komposisi. Campuran tersebut diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Setelah semua bahan tercampur sempurna, bubur didiamkan selama semalam untuk gelembung udara. Bubur yang dihasilkan dari proses tersebut kemudian dikeringkan dengan suhu 70°C selama 14 jam.

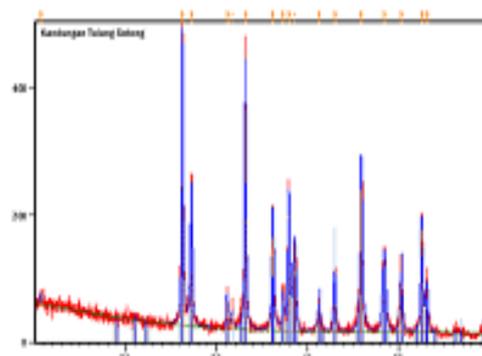
Karakterisasi

Uji analisis dengan metode rietveld. Difraktometer sinar-X PANalytical X'Pert PRO digunakan untuk uji XRD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

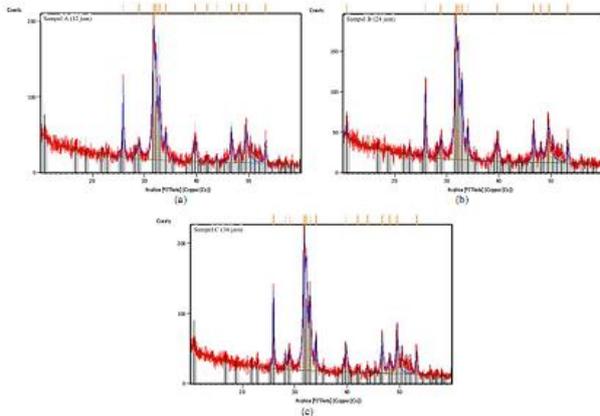
Hasil Uji XRD

Hasil uji XRD terhadap bubuk tulang ikan lamuru yang telah diberi perlakuan panas 350°C selama 3 jam menunjukkan kandungan 100% kalsium karbonat (aragonit, CaCO_3) (Gambar 1). Spektrum XRD sampel menunjukkan kesesuaian dengan ICDD 01-71-4891. Pada penelitian ini digunakan aragonit dari bagian tulang ikan lamuru untuk mensintesis HA. Karena aragonit lebih mudah bertransformasi menjadi HA dibandingkan kalsit.



Gambar 1. Spektrum XRD bubuk tulang Ikan Lamuru

Hasil uji XRD terhadap Sampel A, B, dan C dengan durasi hidrotermal berturut-turut 12, 24, dan 36 jam menunjukkan bahwa kandungan dari ketiga sampel tersebut adalah 100% hidroksiapatit [HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. Seluruh spektrum XRD yang terbentuk pada ketiga sampel tersebut bersesuaian dengan ICDD 01-72-1243. Intensitas puncak tertinggi Sampel A sebesar 110 (Gambar 2(a)), Sampel B sebesar 104 (Gambar 2(b)), dan Sampel C sebesar 115 (Gambar 2(c)).

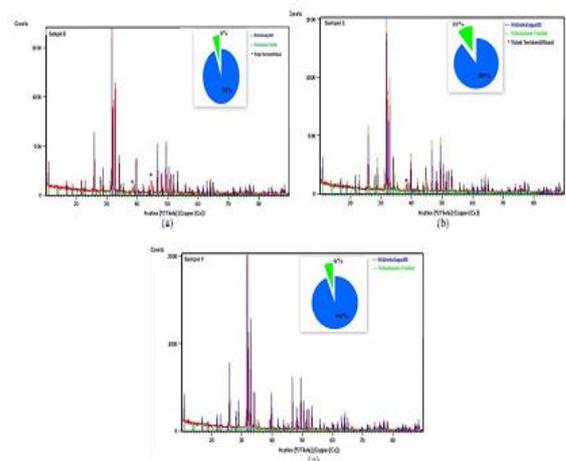


Gambar 2 Spektrum XRD (a) Sampel A, (b) Sampel B, (c) Sampel C

Rendahnya intensitas difraksi puncak tertinggi pada Sampel A, B dan C menunjukkan bahwa derajat kristalinitas HA yang dihasilkan masih rendah (amorf). Selain itu, dimungkinkan Sampel A, B dan C masih mengandung pengotor. Hal tersebut didukung oleh warna bubuk dari ketiga sampel yang kecoklatan (Gambar 3). Diperkirakan pengotor merupakan ion karbonat (CO_3^{2-}). Ion karbonat dapat hilang pada pemanasan dengan suhu di atas 600°C (Septiarini, 2009). Dengan demikian, perlu ditambahkan proses sintering untuk menghilangkan pengotor dan meningkatkan derajat kristalinitas HA yang telah diperoleh dari proses hidrotermal.

Sampel A, B, dan C yang telah disintering dengan suhu 900°C selama 1 jam berturut-turut disebut sebagai Sampel D, E, dan F. Hasil uji XRD menunjukkan bahwa ketiga sampel tersebut mengandung hidroksiapatit [HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] dan trikalsium fosfat [TKF, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] sesuai dengan ICDD berturut-turut 01-72-1243 dan 01-073-4869. Selain itu, terdapat pula puncak yang tidak teridentifikasi pada sampel D dan

E. Hasil uji XRD menunjukkan peningkatan intensitas yang sangat drastis dibandingkan sampel sebelum disintering yang berkisar dari 104 – 115 saja. Intensitas puncak tertinggi Sampel D sebesar 1258,43 (Gambar 4(a)), Sampel E sebesar 1072,35 (Gambar 4(b)), dan Sampel F sebesar 1538,59 (Gambar 4(c)). Sintering juga menyebabkan perubahan warna dari yang semula kecoklatan menjadi putih (Gambar 5). Hal tersebut menunjukkan bahwa pengotor dalam sampel telah hilang. Berdasarkan analisis kuantitatif dengan metode rietveld terhadap hasil uji XRD, diperoleh kandungan masing-masing sampel.

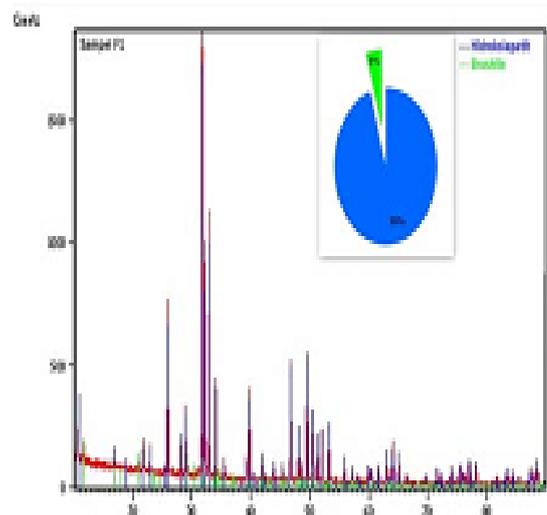


Gambar 3. Spektrum XRD (a) Sampel D, (b) Sampel E, (c) Sampel F

Terbentuknya senyawa TKF pada sampel diakibatkan hilangnya OH akibat perlakuan temperatur tinggi. Namun, kehadiran TKF dalam sampel sebenarnya bukanlah hal yang fatal. Hal tersebut dikarenakan TKF juga digunakan sebagai material implan tulang. TKF memiliki sifat biodegradabel, bioaktif dan memiliki kelarutan

yang tinggi (Dewi, 2009). Berdasarkan Tabel II diketahui bahwa sampel D dan F yang kandungan HA tertinggi dengan jumlah yang sama, yaitu 94%. Namun, dengan mempertimbangkan adanya 2 puncak yang tidak teridentifikasi sebagai HA atau TKF pada spectrum XRD Sampel D, yaitu pada posisi 2θ 35,4365 dan 39,6553, maka sampel F yang digunakan sebagai matriks dalam sintesis komposit dengan kitosan. Telah dilakukan sintesis komposit antara sampel F dengan kandungan HA 91% sebagai matriks dan kitosan sebagai serat/filler. Berdasarkan hasil uji kekuatan tekan yang akan dibahas pada sub bab selanjutnya, dipilih Sampel F1 sebagai sampel komposit yang terbaik. Hasil uji XRD terhadap Sampel F1 ditunjukkan oleh Gambar 6. Apabila dibandingkan dengan hasil uji XRD Sampel F, dapat diketahui bahwa terjadi penurunan intensitas dan pergeseran posisi puncak pada komposit. Di antaranya pada puncak difraksi bidang (002), (211), dan (300). Pada bidang (002) terjadi penurunan intensitas dari 737,25 menjadi 702,44 dan pergeseran posisi puncak dari 215,8674 menjadi 21,8648. Pada bidang (211) terjadi penurunan intensitas dari 1538,59 menjadi 1330,03 dan pergeseran posisi puncak dari 27,7576 menjadi 27,7554. Pada bidang (300) terjadi penurunan intensitas dari 1048,14 menjadi 882,17 dan pergeseran posisi puncak dari 32,8924 menjadi 32,8873. Penurunan intensitas dan pergeseran puncak mengindikasikan terjadinya ikatan antara matriks dan filler, yaitu HA dan kitosan dari proses pembentukan komposit.

Analisis kuantitatif terhadap hasil uji XRD menunjukkan bahwa Sampel F1 mengandung 93% HA dan 7% brushite [$\text{CaHPO}_4(\text{H}_2\text{O})_2$]. Hal tersebut seiring dengan penelitian Sari (2012) yang menyatakan terbentuknya CaHPO_4 pada komposit kemungkinan diakibatkan ketidakstabilan stoikiometri pada HA sehingga rasio molar Ca/P > 1,67 yang membentuk CaO. Dimana, kandungan CaO diatas 55 % akan membentuk CaHPO_4 . Ketidakstabilan stoikiometri tersebut juga dimungkinkan karena Sampel F yang digunakan untuk mensintesis komposit F1 mengandung TKF sebesar 6%. Selain itu, afinitas yang tinggi akibat penambahan asam fosfat pada kitosan juga dapat menyebabkan ketidakstabilan stoikiometri, karena ion fosfat pada kitosan dapat bertukar dengan ion fosfat pada HA (Pramanik et al., 2009).



Gambar 4. Spektrum XRD (a) Sampel D, (b) Sampel E, (c) Sampel F

Uji MTT Assay

Hasil uji MTT assay menunjukkan bahwa Sampel F, yaitu HA yang disintesis dari tulang ikan lamuru tidak bersifat toksik.

Hal tersebut dikarenakan nilai viabilitas sel yang diperoleh sebesar 89,00%. Material tidak bersifat toksik pada sel fibroblast (cell lines) apabila prosentase viabilitas sel masih di atas 60%, yaitu OD dari perlakuan masih mendekati OD dari kontrol (Wijayanti, 2010). Hasil uji MTT assay pada Sampel F1, yaitu komposit dengan HA : kitosan sebesar 80 : 20 menunjukkan jumlah viabilitas sel sebesar 91,11%. Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan kitosan mampu meningkatkan viabilitas sel dibandingkan dengan Sampel F.

KESIMPULAN

1. Uji X-Ray Diffraction (XRD) menunjukkan dari reaksi hidrotermal antara CaCO₃ dari tulan sotong (*Sepia sp.*) dan NH₄H₂PO₄ dengan variasi waktu 12, 24, dan 36 jam menghasilkan 100% HA pada ketiga sampel dengan derajat kristalinitas yang rendah (amorf). Proses sintering mengakibatkan perubahan prosentase HA dengan derajat kristalinitas yang jauh lebih baik. Komposit HA-kitosan disintesis dengan memanfaatkan sampel dengan kandungan HA tertinggi, yaitu sampel dengan durasi hidrotermal 36 jam setelah disintering. Hasil uji XRD komposit dengan HA : kitosan sebesar 80 : 20 menunjukkan adanya penurunan intensitas dan pergeseran posisi puncak difraksi karena pengaruh kitosan yang bersifat amorf.
2. Penambahan kitosan 20% pada komposit meningkatkan viabilitas sel sebesar 92,11% dibandingkan dengan viabilitas sel pada HA sebesar 89,00%.

KEPUSTAKAAN

- Dewi, Setia Utami. Pembuatan Komposit Kalsium Fosfat – Kitosan dengan Metode Sonikasi, Tesis Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 2009
- Cai, X., Tong, H., Shen, X., Chen, W., Yan, J., Hu, J., *Preparation and Characterization of Homogeneous Chitosan–Poly(lactic Acid)/Hydroxyapatite Nanocomposite for Bone Tissue Engineering and Evaluation of Its Mechanical Properties*, *Acta Biomaterialia* 5 (2009) 2693-2703, China. 2009
- Earl, JS., Wood, DJ., Milne, SJ., *Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite*, *Journal of Physics: Conference Series* 26 (2006) 268–271. 2006
- Ficai, A., Andronescu, E., Voicu, G., Ficai, D., *Advances in Collagen/Hydroxyapatite Composite Materials*. Politehnica University of Bucharest, Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, Romania. 2011
- Gunawarman, M.A., Mulyadi S., Riana, H.A., *Karakteristik Fisik dan Mekanik Tulang Sapi Variasi Berat Hidup sebagai Referensi Desain Material Implan*. Seminar Nasional Tahunan Teknik Mesin (SNMTTM) ke-9. 2010.
- Hui, P., Meena, S.L., Singh, G., Agarawal, R.D., Prakash, S., *Synthesis of Hydroxyapatite Bio-Ceramic Powder by Hydrothermal Method*, *Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering*, Vol. 9, No.8, pp.683-692, India. 2010
- Ivankovic, H., Orlic, S., Kranzelic, D., Tkalcec, E., *Highly Porous Hydroxyapatite Ceramics for Engineering Applications*, *Advances in Science and Technology* Vol. 63 (2010) pp 408-413, Switzerland. 2010

- Paljar, K., Orlic, S., Tkalcec, E., Ivankovic, H., *Preparation of Silicon Doped Hydroxyapatite*. Croatia : Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb. 2009
- Pramanik, N., Mishra, D., Banerjee, I., Maiti, T.K., Bhargava, P., Pramanik, P., *.Chemical Synthesis, Characterization, and Biocompatibility Study of Hydroxyapatite/Chitosan Phosphate Nanocomposite for Bone Tissue Engineering Applications*, International Journal of Biomaterials, doi : 10.1155/2009/512417, India. 2009
- Rocha, J.H.G., Lemos, A.F., Agathopoulos, S., Valério, P., Kannan, S., Oktar, F.N., Ferreira, J.M.F. *Scaffolds for Bone Restoration from Cuttlefish*, Elsevier : Bone 37. 2005.
- Sari, RA Irindah F, Sintesis dan Karakterisasi Mikroskopik Nano-Komposit Hidroksiapatit/Kitosan (n-HA/Cs) untuk Aplikasi Jaringan Tulang, Skripsi Fsaintek Unair Surabaya. 2012.
- Septiarini, Savitri. Pelapisan Apatit pada Baja Tahan Karat Lokal dan Ternitridasi dengan Metode Sol-Gel, Skripsi FMIPA Institut Pertanian Bogor. 2009.
- Venkatesan, J., Kim, S., *Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering—An Overview*, Mar. Drugs 2010, 8, 2252-2266, Korea. 2010
- Wahl, D.A. dan Czernuszka, J.T., *Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair*, European Cells and Materials Vol. 11. (pages 43-56), University of Oxford, UK. 2006.
- Wijayanti, Fitria. Variasi Komposisi Cobalt - Chromium Pada Komposit Co-Cr-HAP Sebagai Bahan Implan, Skripsi FSAINTEK Unair. 2010