



Pengaruh Iradiasi Gamma terhadap Perubahan Gugus Fungsi, Daya Serap Air dan Sterilitas *Scaffold* Kitosan/Kolagen

Fajar Lukitowati^{a†}, Rimma Patricia^b, Noor Anis Kundari^b

Dalam rangka mendapatkan biomaterial sebagai media penyangga untuk mendukung proses pertumbuhan maupun perkembangan jaringan baru, telah dilakukan pembuatan *scaffold* kitosan/kolagen steril iradiasi gamma. Kitosan dan kolagen merupakan bahan alami yang biodegradabilitas dan biokompatibilitasnya tinggi serta banyak tersedia di alam. Iradiasi gamma dipilih sebagai cara sterilisasi tanpa merusak sifat fisika, kimia maupun biologi dari bahan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan *scaffold* kitosan/kolagen yang disterilkan dengan sinar gamma pada dosis steril (15 dan 25 kGy), dan mempelajari pengaruh iradiasi gamma terhadap perubahan gugus fungsi, daya serap air dan sterilitas *scaffold* kitosan/kolagen. *Scaffold* paduan kitosan/kolagen (50-50% v/v) dibuat dengan cara *freeze-drying* dan diiradiasi gamma (dosis 0, 15 dan 25 kGy). Perubahan gugus fungsi diuji menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), daya serap air menggunakan timbangan analitik digital dan sterilitas *scaffold* dengan media fluid thioglycolate. Hasil pengukuran daya serap air dianalisis statistik dengan *posthoc* Tukey tingkat kepercayaan 0,05. *Scaffold* kitosan/kolagen menunjukkan penurunan intensitas pada gugus hidroksil dan amida setelah diiradiasi gamma. Dosis iradiasi yang diberikan tidak memberikan pengaruh bermakna pada daya serap air. Hasil berupa *scaffold* yang steril diberikan oleh *scaffold* yang diiradiasi dosis 15 dan 25 kGy. Kitosan/kolagen steril iradiasi dapat dipertimbangkan sebagai bahan biomaterial.

To obtain biomaterials as a supporting the growth process and the development of tissues, sterile chitosan/collagen scaffolds have been made by gamma irradiation. Chitosan and collagen are natural materials that have high biodegradability and biocompatibility and are widely available in nature. Gamma irradiation is chosen as a method of sterilization without damaging the physical, chemical and biological properties of the material. The aims of this present study are to obtain chitosan/collagen scaffolds which are sterilized with gamma at sterile doses (15 and 25 kGy), and analyze the effect of gamma-ray irradiation doses on their functional groups, water absorption and sterility. Chitosan/collagen scaffolds (50-50% v/v) were prepared using the freeze-drying method and irradiated by gamma-rays (doses of 0, 15, and 25 kGy). Changes of functional groups were tested using Fourier Transform Infra Red (FTIR), water absorption using digital analytic scales, and scaffolds sterility with media fluid thioglycollate. The results of measurements of water absorption were analyzed statistically by Tukey's posthoc confidence level of 0.05. Chitosan/collagen scaffolds show decreased intensity in hydroxyl and amide groups after gamma irradiation. The dose of irradiation given does not give a significant effect on water absorption. Sterile scaffold results were given by scaffold irradiated at 15 and 25 kGy. Irradiated chitosan/collagen scaffolds can be considered as a promising biomaterial.

Received

10 October 2018

Received in revised form

-

Accepted

28 December 2018

Published

28 June 2019

DOI: 10.37889/mpi.2019.22.1.2

Kata kunci: Daya serap air, iradiasi sinar gamma, kitosan, kolagen, perubahan gugus fungsi, *scaffold*, sterilitas.

Pendahuluan

Perbaikan, perawatan maupun pergantian jaringan sangat penting dilakukan untuk mengatasi degenerasi jaringan yang terjadi dalam tubuh manusia dapat disebabkan karena trauma, penyakit, penuaan maupun cacat bawaan.¹ *Scaffold* merupakan biomaterial tiga dimensi berpori yang digunakan sebagai media penyangga sementara untuk mendukung proses pertumbuhan dan pengembangan jaringan baru.² Menurut Gunatillake et al.,³ *scaffold* harus bersifat

fleksibel sesuai organ target, *biocompatible*, mendukung perkembangan seluler dan proliferasi sel serta kecepatan biodegradasinya dapat dikendalikan.

Selama beberapa dekade terakhir, polimer alam banyak digunakan dalam aplikasi dalam bidang biomedis. Polimer alam yang digunakan dapat berupa polimer tunggal maupun campuran. Polimer campuran mulai banyak diteliti karena memadukan sifat-sifat menguntungkan dari beberapa polimer tunggal. Campuran polimer seperti dari kitosan dan kolagen (kitosan/kolagen) banyak digunakan sebagai *scaffold* karena sifat-sifat menguntungkan dari kedua bahan tersebut.

Kitosan merupakan polisakarida hasil deasetilasi dari kitin dan banyak ditemui pada cangkang hewan kelas Crustacea. Kitosan memiliki gugus aliphatic (-CH), eter (-C-O-C), hidroksil (-OH) yang bersifat hidrofilik⁴ serta amida (-NH) yang bertindak sebagai kation dan pengubah muatan (*ion exchanger*).⁵⁻⁶ Serupa dengan beberapa

^a Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR-BATAN), Jakarta

^b Sekolah Tinggi Teknologi Nuklir-BATAN, Yogyakarta

† Corresponding author: flukitowati@batan.go.id or ukilukitowati@gmail.com.

polimer kationik lainnya, kitosan dapat merusak membran terluar bakteri yang mengandung anion yang selanjutnya dapat menghambat pertumbuhannya. Namun demikian, kekurangan dari kitosan adalah sifatnya yang kurang lentur sehingga mengakibatkan keterbatasan dalam pengaplikasianya.

Kolagen dapat ditemukan pada kulit hewan mamalia atau cumi-cumi, sisik ikan,⁷⁻⁹ tendon sapi.¹⁰⁻¹² Dari tendon bovine dapat diekstrak kolagen sebanyak 85%.^{8,11} Kolagen tersusun dari tiga rantai polipeptida (yaitu glisin, prolin dan hidroksiprolin) yang tersusun dalam rantai *triple helix*. Gugus hidrofilik yang terkandung dalam glisin, prolin dan hidroksiprolin adalah karboksil (-COOH), amida (-NH) dan hidroksil (-OH). Kolagen membentuk suatu jaringan makromolekul yang diketahui mampu meningkatkan kekuatan struktural dan keelastisitasan suatu bahan.

Bahan kesehatan terutama bahan implan yang langsung berkontak dengan cairan tubuh harus bersifat steril. Salah satu metode untuk meningkatkan sterilitas suatu bahan adalah dengan iradiasi gamma. Dibanding metode yang lain, metode ini lebih murah, efektif dan aman karena tidak meninggalkan residu pada bahan. Menurut ISO 11137,¹³ dosis iradiasi gamma yang diberikan untuk sterilisasi bahan kesehatan adalah 15 atau 25 kGy. Namun demikian, iradiasi mengakibatkan perubahan sifat fisika, kimia dan biologi pada bahan.

Pengujian kekuatan mekanik dan perubahan gugus fungsi membran kitosan/kolagen iradiasi gamma telah dilakukan oleh Indrani et al.⁴ Sionkowska et al.¹⁴ melakukan pengujian pengaruh iradiasi gamma terhadap sifat thermal dan mekanik pada kolagen tendon sapi. Pada penelitian sebelumnya Lukitowati dan Indrani¹⁵ telah melakukan analisa mengenai daya serap air pada membran kitosan/kolagen iradiasi gamma, sedangkan pengaruh iradiasi sinar gamma terhadap daya antibakteri kitosan telah diteliti oleh Tahtat et al.¹⁶ Namun demikian belum ada penelitian mengenai pengaruh iradiasi gamma terhadap sifat fisiko-kimia *scaffold* kitosan/kolagen. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan pembuatan *scaffold* kitosan/kolagen yang disterilkan dengan sinar gamma pada dosis steril (15 dan 25 kGy), dan mempelajari pengaruh iradiasi gamma terhadap perubahan gugus fungsi, daya serap air dan sterilitas *scaffold* kitosan/kolagen.

Metode Percobaan

Alat dan Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain adalah kitosan *medical grade* dengan derajat deasetilasi 90% dan berat molekul 170 kDa yang diperoleh dari PT. Biotech Surindo (Cirebon), tendon sapi yang telah tersedia di laboratorium Bank Jaringan PAIR-BATAN. Reagen yang digunakan adalah asam asetat, natrium klorida (NaCl), buffer fosfat, natrium hidroksida (NaOH) buatan Merck dan media *fluid thioglycolate* buatan Difco.

Cara Kerja

1. Pembuatan *scaffold* kitosan/kolagen

Pembuatan larutan kitosan mengikuti prosedur dari Ramasamy and Shanugam.⁷ Pembuatan larutan kolagen dalam asam asetat 0,7M

sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Fernandes.¹⁷ Selanjutnya *scaffold* kitosan/kolagen dibuat mengikuti prosedur dari Uriarte-Montoya et al.⁸ Larutan kitosan dan kolagen dicampur dengan rasio 50:50 (v/v) kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 700 rpm pada suhu kamar selama 12 jam. Selanjutnya campuran ini dicetak dengan cetakan berukuran 7x7 cm², dibekukan pada suhu -80 °C selama 24 jam dan dikeringkan dengan metode liofilisasi (*freeze-drying*) selama ± 72 jam.

2. Iradiasi *scaffold*

Scaffold yang telah kering dikemas dalam plastik *polypropylene* (PP) untuk selanjutnya disterilkan menggunakan radiasi sinar gamma dengan dosis 15 dan 25 kGy (dosis 0 kGy digunakan sebagai kontrol).

3. Pengujian gugus fungsi

Pengujian gugus fungsi *scaffold* menggunakan *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) Spektrofotometer UV-mini 1240 (Shimadzu). Sampel kering dicampur dengan kalium bromide (KBr) dengan perbandingan 1:200 dan dimasukkan ke dalam tempat sampel (*pan*) untuk selanjutnya diukur spektrumnya pada bilangan gelombang 4000 cm⁻¹ sampai 400 cm⁻¹.

4. Pengujian daya serap air

Pengujian daya serap air dilakukan sesuai ASTM F2150¹⁸ dan mengikuti prosedur pada penelitian Sultana and Khan.¹⁹ Spesimen *scaffold* iradiasi berukuran 1x1 cm dikeringkan dengan oven pada suhu 37 °C selama 48 jam. Selanjutnya spesimen ditimbang dengan timbangan digital analitik dan dicatat beratnya. Masing-masing spesimen kemudian direndam pada akuades pH 7,4 dengan interval waktu 0,5; 1 dan 24 jam. Setelah mencapai interval waktu tersebut, spesimen dikeluarkan dari akuades, dikeringkan permukaannya dengan kertas saring dan kemudian ditimbang kembali untuk mengetahui perubahan beratnya. Persentase daya serap air diukur dengan persamaan:

$$\text{Persentase daya serap air (\%)} = \frac{W_0 - W_1}{W_1} \times 100\% \quad (1)$$

di mana W_0 adalah berat *scaffold* kitosan/kolagen sebelum perendaman, W_1 adalah berat *scaffold* kitosan/kolagen setelah perendaman sesuai interval waktu.

Hasil pengukuran selanjutnya dianalisis secara statistik dengan program *Statistical Package for the Social Science* versi 16.0 (SPSS v. 16.0) dengan menggunakan sistem analisis *One Way Analysis of Variance* (*One Way ANOVA*) menggunakan *posthoc Tukey* tingkat kepercayaan 0,05.

5. Pengujian sterilitas

Media *fluid thioglycolate* digunakan untuk pengujian sterilitas sesuai dengan metode *Test Sterility* dari World Health Organization.²⁰ Masing-masing spesimen *scaffold* dimasukkan dalam media *fluid thioglycolate* secara aseptis dan diinkubasi pada suhu 37 °C. ada tidaknya perubahan kekeruhan pada media *fluid thioglycolate* diamati dari hari ke-0 sampai dengan hari ke-7.

Hasil dan Pembahasan

Ada tidaknya perubahan gugus fungsi *scaffold* kitosan/kolagen yang diiradiasi gamma pada dosis 0, 15 dan 25 kGy ditampilkan pada

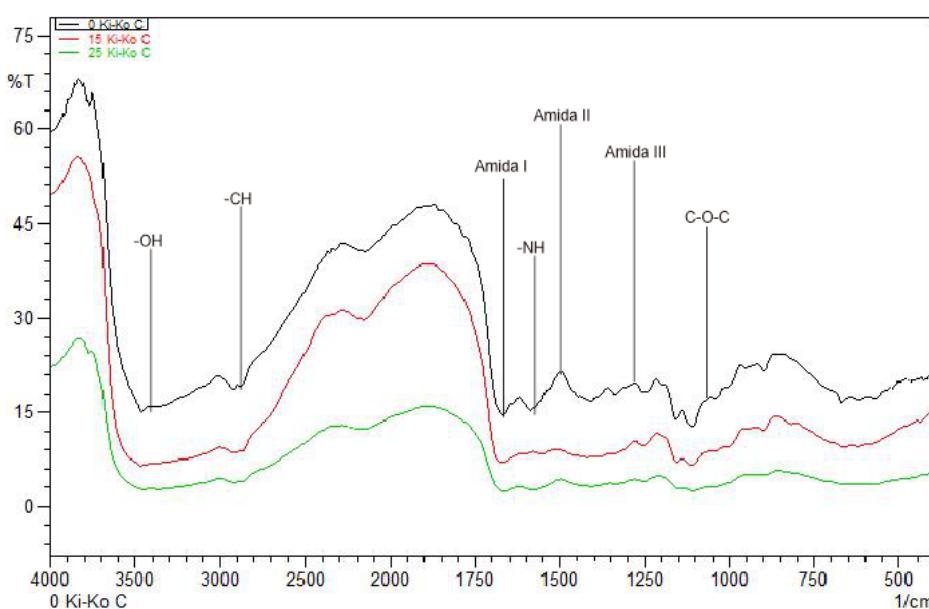
Gambar 1. Sumbu X menunjukkan bilangan gelombang (dalam cm^{-1}) dan sumbu Y menunjukkan *transmittance* (dalam %). Dari Gambar 1, terlihat bahwa puncak dari gugus penyusun *scaffold* kitosan/kolagen merupakan gabungan antara puncak dari gugus kitosan ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$, $-\text{NH}$, $-\text{CH}$ dan $-\text{OH}$) dan kolagen (amida I, amida II dan amida III). Pengamatan hasil spektrum FTIR secara visual menunjukkan bahwa dengan pemberian iradiasi sinar gamma menimbulkan perubahan intensitas puncak akibat pemberian iradiasi gamma. *Scaffold* kitosan/kolagen yang diiradiasi dengan dosis 15 kGy memiliki intensitas puncak gugus $-\text{OH}$ yang lebih rendah dibanding *scaffold* kitosan/kolagen tanpa iradiasi. Hal yang sama juga nampak pada *scaffold* kitosan/kolagen yang diberi dosis iradiasi sebesar 25 kGy, yang mana menunjukkan intensitas yang lebih rendah lagi.

Daya serap air *scaffold* tanpa dan dengan iradiasi gamma (15 dan 25 kGy) ditampilkan pada Gambar 2. Daya serap air *scaffold* berkisar dari 595 sampai 903%. Namun demikian, hasil analisa statistik menunjukkan tidak ada beda signifikan antara perlakuan. *Scaffold* menunjukkan nilai daya serap yang besar pada setengah jam pertama dan terus meningkat seiring waktu perendamanannya. Seperti nampak pada hasil, pada waktu perendaman yang sama daya serap *scaffold* yang diiradiasi gamma dosis 15 kGy memiliki nilai yang tertinggi yaitu sebesar, diikuti oleh *scaffold* yang diiradiasi pada dosis 25 kGy dan *scaffold* tanpa iradiasi secara berurutan. *Scaffold* kitosan/kolagen tanpa iradiasi pada perendaman 30 menit pertama memiliki nilai daya serap air sebesar $595 \pm 19,90\%$, yang mana nilai ini mendekati nilai daya serap air pada *scaffold* kitosan/kolagen/poly(*N,N*-diethylacrylamide) yang dilakukan oleh Barroso et al.²² yaitu sebesar 500%. Dengan penambahan dosis iradiasi sebesar 15 kGy terjadi peningkatan nilai daya serap air menjadi $837,63 \pm 41,32\%$. Hal ini kemungkinan disebabkan karena iradiasi menyebabkan putusnya ikatan-ikatan rangkap dari kitosan menjadi ikatan polar yang menjadi lebih banyak untuk berikatan dengan gugus polar dari air. Namun untuk *scaffold* yang diiradiasi dengan dosis 25 kGy terlihat bahwa nilai daya serap airnya lebih rendah

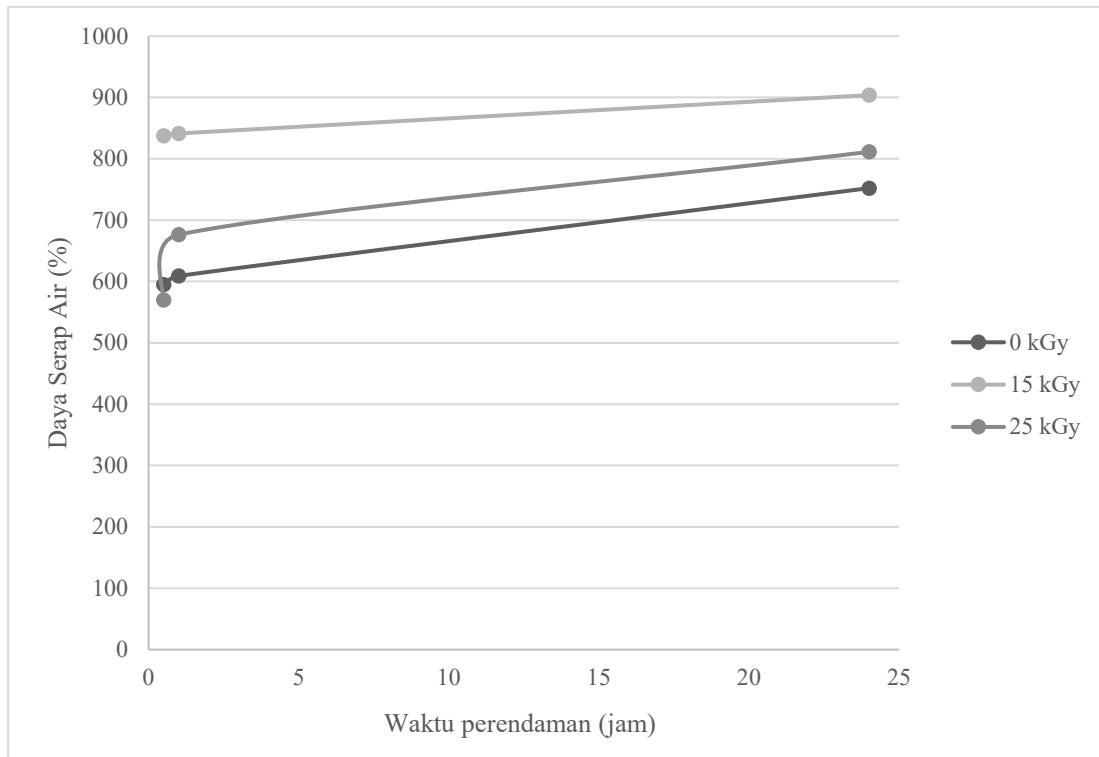
dibanding dosis 15 kGy. Kemungkinan yang menyebabkan hal ini adalah turunnya intensitas dari dari gugus-gugus fungsional yang bersifat polar.

Pengujian sterilitas *scaffold* dilakukan menggunakan media *fluid thioglicolate*. Pengujian ini bertujuan untuk memastikan *scaffold* yang ditujukan bahan implan yang langsung berkontak dengan cairan tubuh bersifat aman dan tidak membawa kontaminasi dari luar. Media *fluid thioglicolate* merupakan media yang mampu mendeteksi adanya bakteri baik aerob maupun anaerob. Ada tidaknya pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan perubahan kekeruhan media *fluid thioglicolate*. Hasil uji sterilitas *scaffold* tanpa dan dengan iradiasi sinar gamma (15 dan 25 kGy) ditampilkan pada Tabel 1.

Dari Tabel 1 terlihat perbedaan sterilitas untuk *scaffold* akibat pengaruh pemberian iradiasi sinar gamma. Media *fluid thioglicolate* untuk *scaffold* tanpa iradiasi sampai dengan hari ke-3 masih menunjukkan media yang bening, hal ini berarti *scaffold* masih steril dan tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Setelah hari ke-4, media *fluid thioglicolate* untuk *scaffold* tanpa iradiasi menunjukkan kekeruhan yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri. Hal ini mungkin disebabkan karena pada *scaffold* tanpa iradiasi terdapat bakteri yang berkembang karena asupan energi dari media *fluid thioglicolate*. Lain halnya untuk *scaffold* yang diberikan dosis iradiasi sinar gamma 15 dan 25 kGy, sampai dengan hari ke-7 pengamatan tidak ditemukan perubahan pada media *fluid thioglicolate* dan media tetap bening. Hal ini berarti iradiasi yang diberikan pada masing-masing *scaffold* mampu mengeliminasi adanya bakteri sehingga tidak menimbulkan kontaminasi. Iradiasi gamma mengakibatkan efek ionisasi pada mikroorganisme secara molekuler. Efek ini mengenai ke penyusun materi genetik terutama DNA yang mengakibatkan kerusakan. Kerusakan pada DNA menyebabkan gangguan pada sistem metabolisme bakteri yang selanjutnya mengakibatkan kematian bakteri.



Gambar 1. Spektroskopi FTIR *scaffold* kitosan/kolagen iradiasi gamma dosis 0, 15 dan 25 kGy.



Gambar 2. Daya serap air *scaffold* kitosan/kolagen iradiasi gamma dosis 0, 15 dan 25 kGy.

Tabel 1. Uji sterilitas *scaffold* kitosan/kolagen dengan iradiasi gamma dosis 0, 15 dan 25 kGy

Hari ke-	Hasil		
	Dosis iradiasi sinar gamma 0 kGy	Dosis iradiasi sinar gamma 15 kGy	Dosis iradiasi sinar gamma 25 kGy
0	-	-	-
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	+	-	-
5	+	-	-
6	+	-	-
7	+	-	-

Kesimpulan

Dosis iradiasi gamma yang diberikan tidak memberikan pengaruh bermakna terhadap daya serap air namun menyebabkan penurunan intensitas pada gugus hidroksil dan amida serta perubahan sterilitas dari *scaffold* kitosan/kolagen. Dengan demikian *scaffold* kitosan/kolagen yang diirradiasi gamma dapat dipertimbangkan sebagai bahan biomaterial.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih pada Drs. Erizal atas diskusi dan masukan yang diberikan serta pada M. Yasin atas bantuan untuk mengiradiasi *scaffold* kitosan/kolagen ini.

Referensi

- 1 F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. Today*, 2011, **14(3)**, 88–95.
- 2 M.R. Aufan, A.H. Daulay, D. Indriani dan A. Nuruddin, Sintesis Scaffold Alginat-Kitosan-Karbonat Apatit sebagai Bone Graft Menggunakan Metode, *J. Biofisika*, 2012, **8(1)**, 16–24.
- 3 P.A. Gunatillake, R. Adhikari dan N. Gadegaard, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *Eur. Cells Mater.*, 2003, **5**, 1–16.
- 4 D.J. Indrani, F. Lukitowati dan Y. Yulizar, Preparation of Chitosan/Collagen Blend Membranes for Wound Dressing: A Study on FTIR Spectroscopy and Mechanical Properties, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, 2017, **202(1)**.

- 5 S.K. Nitta dan K. Numata, Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering, *Int. J. Mol. Sci.*, 2013 **14(1)**, 1629–1654.
- 6 Z. Chen, X. Mo, C. He dan H. Wang, Intermolecular interactions in electrospun collagen-chitosan complex nanofibers, *Carbohydr. Polym.*, 2008, **72(3)**, 410–418.
- 7 P. Ramasamy dan A. Shanmugam, International Journal of Biological Macromolecules Characterization and wound healing property of collagen–chitosan film from Sepia kobiensis (Hoyle, 1885), *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **74**, 93–102.
- 8 M.H. Uriarte-Montoya et al., Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101(11)**, 4212–9.
- 9 C.Y. Huang, J.M. Kuo, S.J. Wu dan H.T. Tsai, Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydro-extraction process, *Food Chem.*, 2016, **190**, 997–1006.
- 10 D. Rushadi dan F. A. Rantam, Regenerasi pada Massive Bone Defect dengan Bovine Hydroxyapatite sebagai Scaffold Mesenchymal Stem Cell (Regeneration of Massive Bone Defect with Bovine Hydroxyapatite as Scaffold of Mesenchymal Stem Cells), 2011, **13(3)**, 179–195.
- 11 S. Techatanawat, R. Surarit, T. Sudhasthira dan S. O. P. Khovidhunkit, Type I collagen extracted from rat-tail and bovine Achilles tendon for dental application: A comparative study, *Asian Biomed.*, 2011, **5(6)**, 787–798.
- 12 K.S. Silvipriya, K. Krishna Kumar, A.R. Bhat, B.D. Kumar, A. John dan P. Lakshmanan, Collagen: Animal sources and biomedical application, *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2015, **5(3)**, 123–127.
- 13 A.N. Standard, *American National Standard Ansi/Iso*, 2008, 2010.
- 14 A. Sionkowska, M. Wisniewski, J. Skopinska dan G.F. Poggi, Thermal and mechanical properties of UV irradiated collagen / chitosan thin films, 2006, **91**, 3026–3032.
- 15 F. Lukitowati dan D. Joesiana, Water Absorption of Chitosan, Collagen, and Chitosan/Collagen Blend Membranes Exposed to Gamma-Ray Irradiation, 2018, **14(1)**, 57–66.
- 16 D. Tahtat, M. Mahlous dan S. Benamer, Influence of some factors affecting antibacterial activity of PVA/Chitosan based hydrogels synthesized by gamma irradiation, 2011, 2505–2512.
- 17 L.L. Fernandes, C.X. Resende, D.S. Tavares, G.A. Soares, L.O. Castro dan J.M. Granjeiro, Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering, *Polímeros*, 2011, **21(1)**, 1–6.
- 18 A. Ratcliffe, *Tissue Engineered Medical Products (TEMPS)*, 2004.
- 19 N. Sultana dan T.H. Khan, Water absorption and diffusion characteristics of nanohydroxyapatite (nHA) and poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate-) based composite tissue engineering scaffolds and nonporous thin films, *J. Nanomater.*, 2013, **2013(May)**.
- 20 P. Against dan M. Contamination, 3.2 Test for Sterility, 2012, March, 1–5.