

## **Sintesis dan Karakterisasi Membran Kitosan-Kolagen-Hidroksi Apatit**

**Erizal<sup>1</sup>, Basril Abbas<sup>1</sup>, R. Setyo A.K.<sup>1</sup>, dan Nofita Chairni<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN, Jl. Lebak Bulus Raya no.49. Jakarta*

<sup>2</sup>*Universitas Pancasila, Fakultas Farmasi, Srengseng Sawah. Jaga Karsa, Jakarta*

*E-mail: erizal.batan.go.id atau izza3053@yahoo.com*

*Diterima: 24-Sep-2015    Diperbaiki: 30-Okt-2015    Disetujui: 21-Des-2015*

### **ABSTRAK**

#### **Sintesis dan Karakterisasi Membran Kitosan-Kolagen-Hidroksi Apatit.**

Pada saat ini, pengembangan bahan biomaterial untuk aplikasi di bidang kesehatan berkembang dengan sangat pesat. Membran polimer merupakan salah satu bahan biomaterial yang potensial untuk dikembangkan. Pada penelitian ini dilakukan sintesis membran kitosan (KS)-kolagen (Kol)-hidroksi apatit (HA) dan mempelajari karakteristiknya sebagai bahan *Guided Tissue Regeneration (GTR)*. Campuran KS-HA (2/4 % berat) dengan variasi konsentrasi kolagen (0,25-1%) ditaut silang dengan larutan NaOH dan dicetak (*casting*) pada suhu kamar. Sifat mekanik membran yang terdiri dari kekuatan tarik dan perpanjangan putus diukur menggunakan *Universal Testing Machine (UTM)*. Morfologi membran diobservasi menggunakan *Scanning Electron Microscope (SEM)*. Degradasi dan air terserap membran ditentukan secara gravimetri. Hasil evaluasi menunjukkan membran berkapasitas menyerap air relatif cepat dan stabil dengan meningkatnya waktu pengujian. Meningkatnya konsentrasi kolagen menyebabkan kekuatan tarik, perpanjangan putus dan degradasi membran meningkat.

**Kata kunci:** *GTR*, kitosan, kolagen, nano karbonat hidroksi apatit

### **ABSTRACT**

***Synthesis and Characterization of Chitosan-Collagen-Hydroxy Apatite Membrane.*** Nowadays, the development of biomaterials for the healthcare applications has been progressed rapidly. One potential of biomaterials to be developed is the polymeric membrane. The aim of this work is to synthesis of chitosan (CS)-collagen (Col) - hydroxyapatite (HA) membrane for *Guided Tissue regeneration (GTR)* and study of their characteristics. The mixtures of CS-HA (2/4, wt%) with different concentrations of collagen (0.25-1.0 wt%) respectively were crosslinked with sodium hydroxide (NaOH), casted at room temperature. Mechanical properties of the membrane were measured in tensile and elongation at break mode using universal testing machine (UTM). The morphology of membranes were observed using Scanning electron microscope (SEM). Degradation and water

---

*absorption of the membranes were determined by a gravimetric method. The results showed that the membrane capable to absorb water relatively fast (10 min) and stable with the increase of time. With increasing of collagen content, the tensile strength, elongation at break and degradation of membranes increase.*

**Keywords:** *GTR, chitosan, collagen, nano carbonate hydroxy apatite*

## PENDAHULUAN

Di Indonesia, kebutuhan akan bahan biomaterial setiap tahunnya meningkat walaupun secara statistik belum diketahui secara pasti. Menurut informasi yang diperoleh dari Bank Jaringan Riset BATAN yang merupakan salahsatu penyedia kebutuhan biomaterial seperti *allograft*, *xenograft* dan jaringan amnion. Kebutuhan biomaterial tersebut meningkat secara signifikan setiap tahunnya [1,2]. Produk tersebut digunakan secara luas di bidang *orthopedic* oleh  $\pm$  49 Rumah Sakit di Indonesia. Selain itu, kebutuhan bahan biomaterial untuk masalah periodontitis meningkat pula di pasaran dunia dengan meningkatnya populasi orang dewasa. Data yang diperoleh dari National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR, National Institutes of Health, Amerika Serikat) menunjukkan bahwa  $\pm$  90% populasi orang dewasa berumur sekitar 70 tahun mengalami penyakit gigi secara moderat [3]. Dari temuan beberapa penelitian menyatakan adanya hubungan antara periodontitis dengan gangguan sistemik, seperti diabetes, penyakit jantung dan pernapasan [4,5].

*Guided Tissue Regeneration* (GTR) adalah salah satu teknik yang dipakai pada pasien periodontitis untuk memperlakukan kerusakan gigi yang memberikan kesempatan untuk tumbuhnya gigi baru. Teknik ini menggunakan membran sebagai barrier fisik untuk membentuk suatu ruang disekeliling kerusakan gigi yang memungkinkan regenerasi tulang dan mencegah migrasi sel epitel kebagian tulang [6]. *Polytetrafluoroetilen* (PTFE) dan kolagen merupakan membran *GTR* yang populer pada saat kini dengan harga yang relatif mahal. Membran PTFE mempunyai kelemahan antara lain pada pemakaiannya diperlukan prosedur bedah tambahan untuk mengeluarkan membran setelah pemakaian [7,8]. Sedangkan pada membran kolagen tidak diperlukan prosedur tambahan akan tetapi pada pemakaiannya terjadi degradasi yang relatif cepat dikarenakan sifat mekaniknya yang buruk (rapuh). Walaupun demikian membran kolagen berkeunggulan karena bersifat *bioresorbable*, biokompatibel dan mudah mengikat sel [9,10]. Oleh karena pentingnya kolagen dengan sifat biologis tersebut di atas, maka dalam penelitian ini akan dilakukan modifikasi membran berbasis kolagen dengan tujuan untuk menaikkan sifat mekaniknya dengan tanpa mengurangi fungsinya sebagai membran *GTR*.

Hidroksiapatit [ $\text{HA}, \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ] merupakan material yang banyak diaplikasikan dalam bidang medis untuk menggantikan mineral jaringan tulang. Hal ini dikarenakan HA memiliki komposisi dan kristalinitas yang hampir mirip dengan tulang manusia yaitu tersusun dari mineral kalsium (Ca) dan fosfat (P). Selain itu, HA tidak toksik, bioaktif, dan terserap dengan baik (resorpsi) menjadikan HA merupakan material biokeramik yang dikenal luas dan relatif sukar dibuat menjadi membran [11,12]. Kolagen memegang peranan yang sangat penting pada setiap tahap proses penyembuhan luka. Kolagen mempunyai kemampuan antara lain homeostasis, interaksi dengan trombosit, interaksi dengan fibronektin, meningkatkan eksudasi cairan, meningkatkan komponen seluler, meningkatkan faktor pertumbuhan dan mendorong proses fibroplasia dan terkadang pada proliferasi epidermis. Kolagen dan HA dapat diisolasi dari sisik ikan dan kolagen hasil isolasi sukar dibuat menjadi membran dikarenakan kolagen sisik ikan berbentuk serbuk bukan seperti kolagen hasil isolasi dari tulang atau tendon tulang sapi.

Kitosan [poli(1,4)- $\beta$ -D-glukopiranosamin] merupakan polimer alam jenis polisakarida, berantai linear merupakan turunan dari khitin, berasal dari ekstraskeliton antropoda. Kitosan (Ks) berderajat kereaktifan yang tinggi disebabkan oleh adanya gugus amino bebas sebagai gugus fungsional. Sebagai biopolimer alami, kitosan bersifat bioaktif, *biodegradable*, dan sebagai anti bakteri [13]. Pada penggunaannya kitosan dapat dibuat menjadi membran menggunakan crosslinker glutaraldehid bersifat racun dan yang relatif aman adalah menggunakan larutan NaOH.

Berdasarkan deskripsi tersebut diatas dan hanya kitosan yang dapat dibuat membran, maka dalam penelitian ini HA dan kolagen dijebak dalam membran kitosan yang disintesis dengan crosslinker NaOH pada variasi konsentrasi kolagen 0,25 hingga 1% dengan perbandingan kitosan/HA yang konstan 2:4 (% berat). Membran hasil sintesis yang ditujukan untuk GTR, diuji sifat fisiknya yang meliputi tegangan tarik dan perpanjangan putus menggunakan *universal testing machine*. Morfologinya diobservasi menggunakan *scanning electron microscope* (SEM). Daya serap air dan degradasi diukur secara gravimetri.

## **METODOLOGI**

Kitosan dengan derajat deasetilisasi 90 % diperoleh dari *Biotech* Surindo, Cirebon. Karbonat hidroksi apatit dan kolagen diisolasi dari sisik ikan buatan Laboratorium Biomaterial, Bidang Proses Radiasi, PATIR-BATAN. Natrium hidroksida (NaOH), natrium klorida (NaCl), kalium klorida (KCl), dinatrium hydrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), kalium dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) diperoleh dari Merck.

### Pembuatan Membran Kitosan-Kolagen-HA

Disiapkan satu seri campuran 100 mL larutan kitosan 2% dalam pelarut asam asetat 1% mengandung 4 g HA yang telah dihomogenkan pada suhu kamar. Selanjutnya ke dalam masing-masing campuran dimasukkan 0,25; 0,50 ; 0,75 dan 1 g kolagen secara berturut-turut. Selanjutnya campuran diaduk dengan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 200 rpm hingga homogen dan kemudian dituangkan ke dalam wadah cetak plastik dengan ukuran 10x10x0,3 cm<sup>3</sup>, dan dikeringkan pada suhu kamar selama 48 jam. Membran yang telah kering direndam di dalam larutan NaOH 0,25 N selang waktu 1 jam, dan membran dikeringkan kembali dalam oven pada 60 °C selama 24 jam.

### Pengukuran Air Tserterap (Absorpsi Air)

Tiga buah cuplikan membran dengan ukuran 2x2x0,5 cm<sup>3</sup> dikeringkan dalam oven pada 60 °C hingga berat konstan, lalu ditimbang ( $W_o$ ). Kemudian membran kering direndam dalam 25 mL air suling. Setelah 1 menit, membran dikeluarkan dari media perendaman. Air permukaan membran dilap dengan kertas saring, selanjutnya ditimbang kembali ( $W_s$ ). Setelah itu, membran direndam kembali ke dalam air dalam wadah yang sama pada interval waktu selanjutnya. Perlakuan yang sama dikerjakan untuk pengujian air terserap membran dalam waktu interval menit lainnya. Akhirnya membran dikeringkan dalam oven pada 60 °C hingga berat konstan. Air yang terserap pada masing-masing waktu perendaman dihitung dengan menggunakan persamaan berikut.

$$\text{Air terserap} = \frac{W_s - W_o}{W_o} \times 100\% \quad (1)$$

### Uji Biodegradasi

Komposit membran dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm<sup>2</sup> lalu dikeringkan dalam oven pada -60 °C selama 24 jam hingga bobot konstan. Kemudian komposit membran ditimbang ( $W_o$ ). Selanjutnya komposit membran direndam dalam larutan PBS (buffer posfat) (pH 7,4) selama 1 hari dan dikocok dalam *shaker inkubator* dengan kecepatan 40 rpm pada suhu kamar, lalu komposit membran dikeluarkan dari wadah pengujian dan selanjutnya dikeringkan dalam oven vakum pada 60°C selama 2 jam dan ditimbang ( $W_1$ ). Selanjutnya direndam kembali ke dalam wadah semula yang mengandung larutan PBS. Perlakuan diatas diulang untuk pengujian biodegradasi pada selang waktu 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, dan 28 hari. Bobot komposit membran yang tersisa dihitung dengan persamaan berikut:

$$\text{Berat membran yang tersisa} = \frac{W_1}{W_o} \times 100\% \quad (2)$$

Membran yang terdegradasi= 100% - berat yang tersisa (3)

#### *Pengujian Kekuatan Tarik dan Perpanjangan Putus*

Kekuatan tarik dan perpanjangan putus merupakan parameter fisik yang penting dari membran, diukur berdasarkan metode standar ASTM D3039 (*American Standard Testing Mechanical*) menggunakan alat Instron. Membran berbentuk *dumbbell* dengan kedua ujungnya dijepit pada mesin Instron. Kecepatan gerak penjepit 30 mm/menit pada suhu kamar dengan data hasil pengukuran direkam. Pengujian dilakukan dengan 5 kali ulangan dan perpanjangan putus dihitung dengan persamaan berikut.

$$\text{Perpanjangan putus} = \frac{L_1 - L_0}{L_0} \times 100\% \quad (4)$$

dengan  $L_0$  ukuran panjang sampel mula-mula dan  $L_1$  ukuran panjang sampel akhir. Kekuatan tarik sampel dihitung dengan persamaan berikut.

$$\text{Kekuatan tarik} = \frac{F}{A} \quad (5)$$

dengan  $F$  adalah beban dari alat hingga bahan putus (kg) dan  $A$  adalah luas penampang bahan ( $\text{cm}^2$ ).

#### *Pengamatan Morfologi Membran menggunakan SEM*

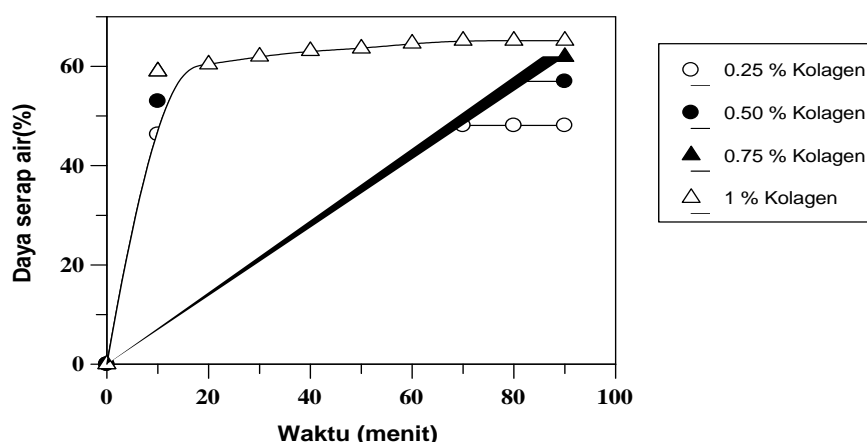
Pengujian morfologi dari kitosan, HA, dan membran kitosan-HA dilakukan menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscope*). Sampel dilapisi dengan lapisan tipis emas dengan ketebalan 100Å menggunakan Denton *vacuum*. Morfologi dari sampel diperoleh menggunakan SEM 515/RDAX PV 9900.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### *Daya Serap Air*

Kemampuan membran dalam menyerap air merupakan parameter yang menentukan layak atau tidaknya membran digunakan sebagai GTR [3]. Fungsi waktu perendaman terhadap air terserap oleh membran dengan variasi persentase kolagen (0,25-1 %) disajikan pada Gambar 1. Terlihat bahwa pada awal perendaman dalam waktu pengukuran 10 menit, membran menyerap air dengan kisaran 46 hingga 60 %. Selanjutnya dengan meningkatnya waktu perendaman, daya serap air meningkat secara perlahan-lahan hingga mencapai keadaan yang relatif konstan pada waktu 60 menit dengan nilai kisaran daya serap air 48 hingga 65% yang meningkat dengan meningkatnya persentase kolagen. Dengan kata lain, meningkatnya waktu perendaman dan konsentrasi kolagen tidak menyebabkan peningkatan air terserap secara

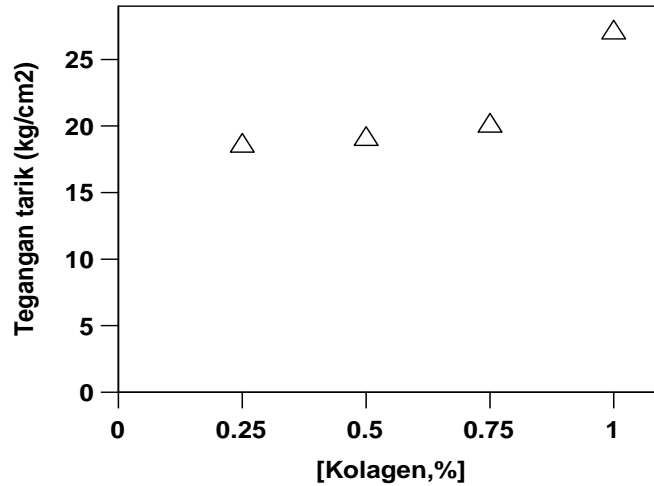
signifikan. Oleh karena membran yang ideal untuk aplikasi sebagai pelindung bagian rongga gigi yang telah dicabut adalah berdaya serap air yang konstan selama pemakaian atau tidak mengalami *swelling* yang besar. Hal ini mengindikasikan bahwa membran memiliki daya serap air yang relatif konstan setelah selang waktu pengukuran 60 menit.



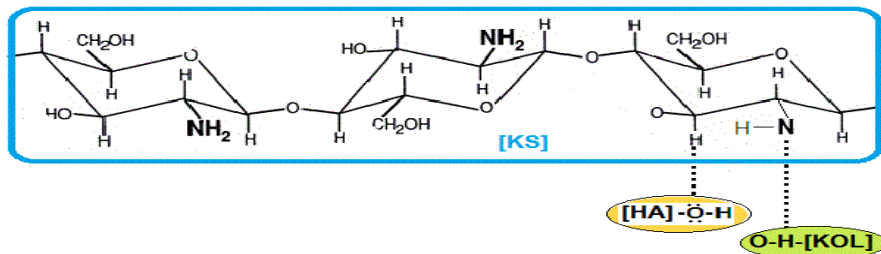
**Gambar 1.** Hubungan antara waktu terhadap air terserap membran kitosan- HA-kolagen pada variasi persentase kolagen

#### *Pengaruh Konsentrasi Kolagen pada Kekuatan Tarik Membran*

Pengujian kekuatan tarik merupakan salah satu parameter fisika yang penting pada membran untuk aplikasi GTR [3]. Membran umumnya digunakan pada daerah gigi yang sering dilakukan pergerakan seperti mengunyah dan mengigit. Oleh karena itu, membran seharusnya elastis, fleksibel dan cukup kuat sehingga tahan terhadap tarikan dan tekanan ketika digunakan pada daerah gigi serta dapat mengikuti pergerakan gigi. Pengaruh konsentrasi kolagen terhadap kekuatan tarik membran dengan variasi persentase kolagen disajikan pada Gambar 2. Terlihat bahwa kekuatan tarik membran pada awal pengujian dengan konsentrasi kolagen 0,25% adalah 18,5 kg/cm<sup>2</sup>, meningkatnya konsentrasi kolagen hingga 1% menyebabkan kekuatan tarik membran meningkat mencapai 27 kg/cm<sup>2</sup>. Hal ini diduga kuat kolagen dengan struktur molekul mengandung gugus NH dan OH yang dominan dapat bergabung dengan baik bersama HA yang mengandung gugus OH serta kitosan mengandung gugus NH dan OH melalui ikatan hidrogen yang reaksinya dapat diilustrasikan seperti terlihat pada Gambar 3 [14]. Meningkatnya konsentrasi kolagen, kekuatan tarik membran juga meningkat. Hal ini mengindikasikan bahwa membran kitosan-kolagen-HA tidak menjadi rapuh dengan meningkatnya konsentrasi kolagen.



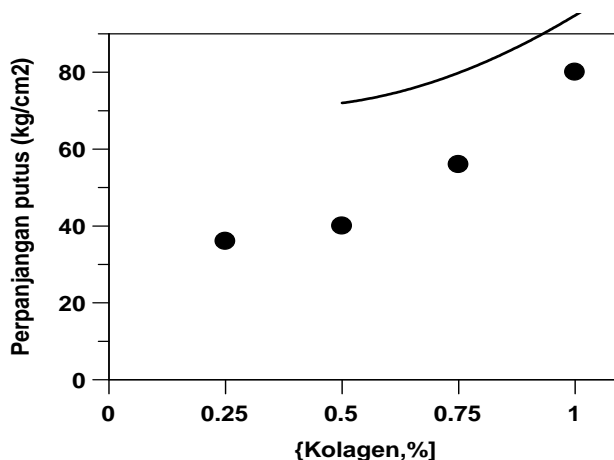
Gambar 2. Hubungan konsentrasi kolagen vs kekuatan tarik membran kitosan-kolagen-HA



Gambar 3. Reaksi ikatan hidrogen antara kitosan-kolagen dan HA

#### *Pengaruh Konsentrasi Kolagen pada Perpanjangan Putus Membran*

Pengaruh konsentrasi kolagen terhadap perpanjangan putus membran disajikan pada Gambar 4. Terlihat bahwa perpanjangan putus membran kitosan pada pengujian awal (0,25% kolagen) adalah 36% dan meningkat hingga 80 % dengan meningkatnya konsentrasi kolagen. Hal ini menunjukkan membran kitosan-kolagen-HA dapat menjadi elastis dengan meningkatnya konsentrasi kolagen. Oleh karena itu, pada pemakaiannya membran ini akan lebih mudah diletakkan pada posisi yang dikehendaki tanpa mudah mengalami kerusakan atau putus.

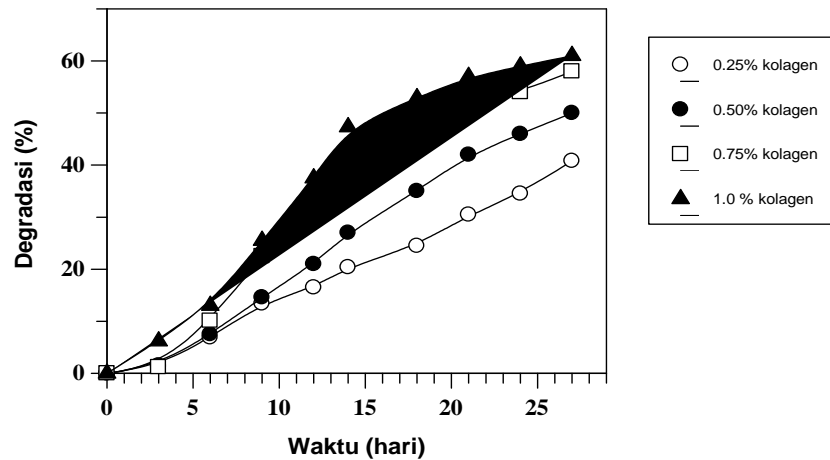


**Gambar 4.** Hubungan konsentrasi kolagen vs perpanjangan putus membran kitosan-kolagen-HA

#### *Degradasi Membran Kitosan-Kolagen-HA*

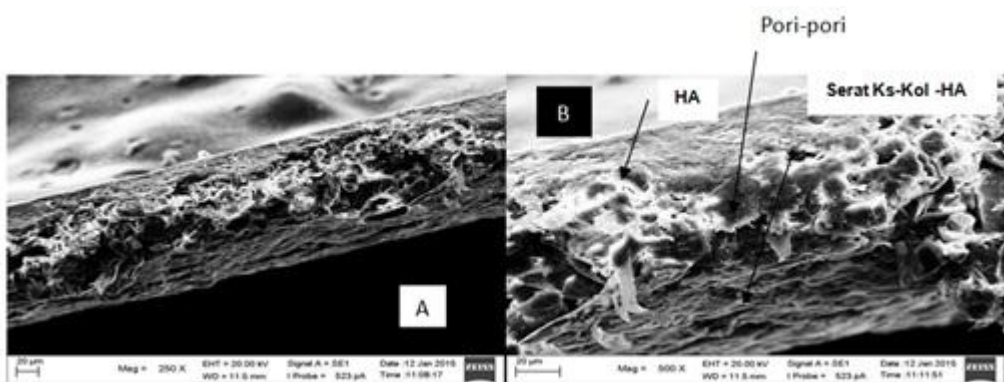
Uji degradasi dari membran ini sangat perlu dilakukan, karena membran tersebut diharapkan akan mengalami degradasi dalam waktu bersamaan dengan tertutupnya rongga gigi yang bolong oleh bahan pengisi. Pengaruh waktu perendaman dalam larutan PBS terhadap persentase degradasi membran dengan variasi konsentrasi kolagen yang diukur hingga 27 hari disajikan pada Gambar 5. Terlihat bahwa pada awal pengujian (hari ke-3), membran mengalami degradasi rata-rata pada kisaran 1-6%. Meningkatnya waktu perendaman hingga 27 hari disertai dengan meningkatnya konsentrasi kolagen dari 0,25 hingga 1,0% menyebabkan degradasi membran meningkat hingga 60%. Terjadinya peningkatan degradasi membran dengan meningkatnya konsentrasi kolagen, diduga kuat kemungkinan lepasnya HA dari matrik membran dengan meningkatnya waktu perendaman atau sebab lain yang perlu diteliti lebih lanjut. Selain itu, menurut Ming Kuo [13] bahwa degradasi dari membran hingga 60 % yang mengandung kitosan dan HA dengan kisaran berat total 5-10 % cukup layak memenuhi syarat untuk aplikasi pada GTR dalam bidang periodontal.





**Gambar 5.** Pengaruh waktu perendaman vs persen degradasi membran dalam larutan PBS

Pengamatan morfologi penampang melintang membran kitosan-kolagen-HA dengan SEM disajikan pada Gambar 6. Terlihat bahwa bentuk mikroskop membran berpori dan berserat. Membran terdiri dari serbuk HA berupa senyawa anorganik yang sukar bercampur secara sempurna dengan kitosan dan kolagen membentuk suspensi yang terdispersi membentuk campuran heterogen. Hal tersebut yang membuat permukaan membran yang kontak pada udara membentuk laminer, sedangkan bagian membran yang kontak dengan cetakan lebih memadat karena kandungan serbuk HA lebih besar. Pada Gambar 5B terlihat bahwa serbuk HA terdispersi dalam membran, yang ditandai dengan warna putih.



**Gambar 6.** Mikrofotograph SEM membran Ks-Kol-HA, a) perbesaran 250 X, b) 500 X

## **KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa membran kitosan-kolagen-hidroksi apatit dapat disintesis menggunakan larutan NaOH dengan variasi kolagen. Meningkatnya konsentrasi kolagen menyebabkan meningkatnya tegangan tarik dan perpanjangan putus membran dan tidak menyebabkan peningkatan daya serap air yang relatif besar pada membran. Selain itu, meningkatnya konsentrasi kolagen dapat meningkatkan kemampuan degradasi membran.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ibu Dewi S.P. atas bantuannya untuk analisis perpanjangan putus dan kekuatan tarik membran hingga penelitian ini selesai.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- [1]. Basril A. Pembentukan radikal bebas pada graft tulang manusia dan bovine Iradiasi. *Prosiding Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi 2000*;57-8.
- [2]. Global Biomaterials Market Worth US \$ 58.1 Billion by 2014. <http://blog.taragana.com/pr/global-biomaterial-market-worth-us581-billion-by-2014-5363/> Diakses 2 Mei 2012.
- [3]. Bottino MC, Thomas G. Schmidt, Vohra YK, Tien-Min GC, Kowolik MJ, Janowski GM. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration: A materials perspective. *Dent Mater* 2012;28(7):703-21.
- [4]. Southerland JH, Taylor GW, Moss JD, Beck S. Offenbacher. Commonality in chronic inflammatory diseases: periodontitis, diabetes, and coronary artery disease. *Periodontology* 2006;40:130-43.
- [5]. Nishimura F, Iwamoto Y, Soga Y. The periodontal host response with diabetes. *Periodontology* 2007;43:245-53.
- [6]. Rohini M, Priya L, Vishakha. Guided tissue regeneration in communicating periodontal and endodontic lesions-A hope for the hopeless. *J Indian Soc Periodontal* 2011;15(4):410-3.
- [7]. Kasaj A, Reichert C, Gotz H, Rohrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 2008;4:22.
- [8]. Liu J, David GK. Mechanism of bone regeneration: A review. *Open Dent J* 2014;8:56-65.

- [9]. Wang HL, Mudarresi M, Fu JH. Utilizing collagen membranes for guided tissue regeneration based root coverage. *Periodontology* 2000 2012;59(1):40-57.
- [10]. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration—a materials perspective. *Dent Mater* 2012; 28(7):703-21.
- [11]. Müller Conforto LE, Caillard D, Müller F A. Biomimetic apatite coatings: Carbonate substitution and preferred growth orientation, *Biomol Eng* 2007;24:462-6.
- [12]. Magallanes-Perdomo M, Luklinska ZB, De Aza AH., Carrodegua RG., De Aza S, Pena P. Bone-like forming ability of apatite–wollastonite glass ceramic. *J Eur Ceram Soc* 2011;31:1549-61.
- [13]. Jones DS, Mawhinney HJ. Chitosan, *Handbook of Pharmaceutical Excipient*, fifth ed. American Pharmaceutical Association and The Pharmaceutical Press 2006:159-62.
- [14]. Kuo SM, Niu GCC, Lan CW, Cheng MF, Chiang MY, Chang SJ. Guided tissue regeneration with use of CaSO<sub>4</sub>-chitosan composite membran. *J Med Bio Eng* 2009;29(6):304-10.