

SINTESIS DAN UJI POROSITAS SCAFFOLD HIDROKSIAPATIT/ALGINAT

Lalita El Milla*, Decky J. Indrani**, Bambang Irawan**

Keywords:

Scaffolds, Porosity,
Hydroxyapatite,
Alginate

ABSTRACT

Background: In bone tissue engineering, scaffold is required with a large porosity of 80-90%. The porosity of the hydroxyapatite/alginate scaffold can be affected by the alginate concentration used. The objective of this study was to determine whether hydroxyapatite/alginate scaffolds with alginate concentration of 1% and 3% could be synthesized and to determine whether the use of low concentration alginates in hydroxyapatite/alginate scaffolds could increase the scaffold porosity.

Methods: The method used in making scaffold was freeze drying method, while the method used to measure porosity was liquid displacement method

Result: In this study, it was found that hydroxyapatite/1% alginate scaffolds porosity had greater porosity compared with hydroxyapatite/3% alginate scaffolds with significant difference.

Conclusion: So, it can be concluded that the use of lower alginate concentration can increase porosity in hydroxyapatite/alginate scaffolds.

PENDAHULUAN

Maksila dan mandibula merupakan tulang pada manusia yang dapat mengalami kerusakan berupa defek akibat adanya trauma, inflamasi maupun akibat tindakan bedah. Oleh sebab itu, perbaikan tulang mandibula atau maksila menjadi permasalahan klinis¹. Kerusakan tulang dapat diatasi dengan pencangkokan tulang yaitu dengan *autograft*, *allograft* dan *xenograft*. *Autograft* menjadi standar emas, namun keterbatasan jumlah menjadi kelemahannya². Sedangkan pada *allograft* dan *xenograft* memiliki keterbatasan pada masalah kompatibilitas dan potensi transfer penyakit dari pendonor. Salah satu alternatif penanganan kerusakan tulang adalah dengan rekayasa jaringan tulang³.

Dalam rekayasa jaringan terdapat tiga komponen utama yaitu sel, *growth factors* dan *scaffold*⁴. *Scaffold* merupakan struktur tiga dimensi yang berfungsi sebagai kerangka/

template untuk pertumbuhan sel tulang⁵. Untuk memungkinkan terjadinya pertumbuhan sel, *scaffold* harus memiliki struktur berpori dengan nilai porositas untuk mendukung regenerasi tulang adalah 80-90%⁵. Diketahui bahwa semakin besar porositas *scaffold* akan menghasilkan proliferasi dan diferensiasi sel tulang lebih cepat⁶. Untuk menghasilkan *scaffold* berpori tersebut, digunakan beberapa bahan yang berbeda-beda.

Tulang terdiri dari bahan apatit, oleh karena itu salah satu bahan yang telah dimanfaatkan sebagai bahan *scaffold* adalah hidroksiapatit yang memiliki kesamaan kimia dan fisika dengan mineral penyusun tulang dan gigi dengan elemen utama berupa kalsium dan fosfor^{7,8}. Namun, hidroksiapatit memiliki sifat biomekanik yang lemah yaitu kuat tarik yang rendah dan bersifat *brittle* serta porositas yang rendah⁹. Oleh karena itu saat ini hidroksiapatit banyak dikombinasikan dengan bahan biopolimer untuk membentuk *scaffold*

*Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi, Fak.Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya, **Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi, Fak.Kedokteran Gigi Universitas Indonesia
Korespondensi: lalita.el.milla@gmail.com

komposit.

Biopolimer dari alam lebih banyak dipilih sebagai material *scaffold* karena memiliki sifat biokompatibel, biodegradabel, non toksik dan lebih banyak ketersediaannya dibanding polimer sintetik¹⁰. Biopolimer tersebut di antaranya adalah alginat. Alginat merupakan polisakarida asidik yang diekstrak dari alga cokelat (*Phaeophyceae*), termasuk di antaranya *Sargassum sp* yang banyak ditemukan di perairan Indonesia¹¹.

Beberapa peneliti diketahui telah berhasil mempreparasi *scaffold* hidroksiapatit/alginat dengan porositas yang berbeda-beda^{12,13,14}. Untuk memperoleh porositas *scaffold* yang besar dapat dilakukan dengan mengatur konsentrasi biopolimer yang digunakan^{15,16}. Lin (2004) membuat *scaffold* hidroksiapatit/alginat 3% dengan porositas 82%. Sedangkan Marsich (2013) menghasilkan *scaffold* hidroksiapatit/alginat 1% porositas 80%. Szparaga et al. (2015) menunjukkan bahwa konsentrasi alginat sebesar 8% memiliki viskositas sebesar 69,69 Pa.s sementara konsentrasi alginat 5 % memiliki nilai viskositas sebesar 4,12 Pa.s sehingga menunjukkan bahwa semakin rendah konsentrasi alginat maka akan semakin rendah viskositas larutan alginat. Alginat dengan viskositas rendah lebih banyak mengandung air sehingga pada saat proses *freeze drying* butir-butir air yang menguap diperkirakan akan dapat meninggalkan pori-pori lebih besar.

Dari uraian di atas, porositas diketahui dapat dipengaruhi oleh konsentrasi alginat. Oleh karena itu dengan menggunakan konsentrasi alginat yang rendah, diharapkan dapat menghasilkan *scaffold* hidroksiapatit/alginat dengan porositas yang tinggi. Penelitian sebelumnya menggunakan konsentrasi alginat 1% dan 3 %^{12,13,14}. Namun belum banyak penelitian yang membandingkan pengaruh kedua konsentrasi tersebut terhadap porositas

scaffold hidroksiapatit/alginat.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan utama penelitian ini berupa hidroksiapatit diperoleh dari penelitian sebelumnya¹², yaitu hidroksiapatit yang diperoleh dari pencampuran serbuk Ca(OH)_2 dan cairan H_3PO_4 dengan metode presipitasi dan dikalsinasi dengan suhu 900°C dan alginat yang diekstrak dari *Sargassum crassifolium* perairan Banten (Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia). Jumlah spesimen masing-masing kelompok pada penelitian ini adalah 12, sehingga total sampel berjumlah 24.

Pembuatan Scaffold Hidroksiapatit/Alginat

Untuk mendapatkan alginat dengan konsentrasi 1 %, 1 gram serbuk sodium alginat ditambahkan 99 gram (DDW), sedangkan untuk memperoleh alginat 3%, 3 gram serbuk sodium alginat ditambah 97 gram DDW. Untuk membuat *scaffold* hidroksiapatit/alginat 1%, hidroksiapatit seberat 0,428 gram ditambahkan pada larutan alginat 1 %. Sedang untuk membuat *scaffold* hidroksiapatit/alginat 3% hidroksiapatit seberat 1,285 gram ditambahkan pada larutan alginat 3%. Rasio berat hidroksiapatit/alginat adalah sebesar 30/70. Penambahan hidroksiapatit dilakukan dengan cara *dropwise* selama satu jam sambil terus diaduk dengan *magnetic stirrer* (500-100 rpm). Kemudian pengadukan dilanjutkan hingga satu jam pada suhu kamar, lalu dihomogenisasi dengan kecepatan putar 3400 rpm selama 5 menit menggunakan *homogenizer* dan dilanjutkan sonikasi (20 Hz) selama 2 jam.

Tahapan selanjutnya, dilakukan pencetakan pada 24 *well-plate* dan dibekukan pada suhu

-400C selama 2x24 jam. Selanjutnya dilakukan *lyofilisasi* selama 3x24 jam dengan alat *freeze dryer* (*Christ Beta-1 Freeze Dryer*, Jerman) pada tekanan 0.1–0.2 torr dengan pengaturan temperatur -400C untuk mensublimasi es dari *scaffold* komposit. Kemudian pada masing-masing *scaffold* dilakukan proses *crosslinking* dengan merendam *scaffold* pada larutan 0,2M CaCl_2 selama 15 menit kemudian dibilas sebanyak 3 kali dan direndam pada DDW selama 24 jam untuk menghilangkan sisa CaCl_2 yang tidak terikat. *Scaffold* yang basah kemudian dibekukan dan dilakukan *lyofilisasi* kembali sebagaimana prosedur sebelumnya.

Pengukuran Porositas

Pengukuran porositas dilakukan dengan metode *liquid displacement*. Prosedur tersebut adalah sebagai berikut ; volume (V_0) dan berat (W_0) dari sampel diukur. Kemudian sampel direndam dalam ethanol hingga sampel jenuh. Sampel diukur kembali beratnya (W_1). Porositas *scaffold* dihitung dengan rumus :

$$\text{porositas (\%)} = \frac{(W_1 - W_0)}{\rho \times V_0} \times 100\%$$

ρ adalah massa jenis etanol ^{19,20}. Proses ini dilakukan di Laboratorium biomaterial Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi BATAN

HASIL

Porositas keempat *scaffold* sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 1

Tabel 1 Hasil perhitungan porositas beberapa jenis *scaffold*

No.	Jenis <i>Scaffold</i>	Porositas \pm SD (%)
1.	Hidroksiapatit/alginate 1%	93.37 \pm 2.36
2.	Hidroksiapatit/alginate 3%	82.39 \pm 1.35

Ket : SD = Standar Deviasi

Berdasarkan uji normalitas *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varian *Levene's Test* diperoleh hasil distribusi data normal ($p > 0,05$ pada semua kelompok *scaffold*) dan varians homogen ($p > 0,05$). Hasil uji T-test menunjukkan bahwa nilai porositas kedua *scaffold* berbeda bermakna dengan nilai kemaknaan 0,000 ($p < 0,05$).

DISKUSI

Scaffold yang dibentuk pada penelitian ini merupakan komposit dari hidroksiapatit dan alginat. Pada masing-masing *scaffold*, partikel hidroksiapatit yang merupakan fasa anorganik terbenam dalam alginat yang merupakan fasa organik. *Scaffold* hidroksiapatit/alginate terbentuk melalui beberapa interaksi dari bahan yang digunakan. Pembentukan *scaffold* diperoleh dari mencampur hidroksiapatit dan alginat menghasilkan larutan komposit hidroksiapatit/alginate. Dengan melakukan proses *freeze drying* maka dihasilkan *scaffold* berpori. Pada proses perendaman *scaffold* hidroksiapatit/alginate di dalam larutan *kation divalen* CaCl_2 terjadi interaksi dalam alginat. Dalam hal ini gugus COO^- pada alginat saling berinteraksi menyebabkan rantai polimer alginat berikatan satu sama lain dengan Ca^{2+} yg terenkapsulasi di dalamnya, sehingga membentuk struktur *egg-box*. Dengan demikian, *scaffold* berpori terbentuk disertai *crosslinking* yang mungkin hanya terjadi di permukaan *scaffold* tersebut.

Scaffold hidroksiapatit/alginate 3% memiliki porositas yang tidak jauh berbeda dengan porositas *scaffold* hidroksiapatit/alginate 3% yang dihasilkan oleh Lin (2004), yaitu sebesar $82 + 1,35\%$ ¹⁷. Sedangkan porositas

pada *scaffold* hidroksiapatit/alginate 1% pada penelitian ini memiliki nilai yang lebih besar dari Lin (2004) yaitu 93 + 2,36 %. Porositas yang lebih besar tersebut mungkin disebabkan oleh perbedaan konsentrasi alginate. Semakin tinggi konsentrasi polimer yang digunakan akan menghasilkan porositas yang semakin kecil, sebaliknya semakin rendah konsentrasi yang digunakan maka porositas akan semakin besar¹⁶.

Porositas *scaffold* hidroksiapatit/alginate 1% lebih besar dari porositas *scaffold* dengan konsentrasi alginate 3%. Hal ini disebabkan pada larutan alginate 1% memiliki viskositas yang lebih rendah dibanding larutan alginate 3%. Pada larutan dengan viskositas rendah, terkandung lebih banyak pelarut (DDW), sehingga ketika dilakukan proses *freeze drying* terjadi sublimasi sehingga meninggalkan pori-pori yang berukuran besar dan jumlah lebih banyak pada *scaffold*. Porositas *scaffold* hidroksiapatit/alginate 1% dan *scaffold* hidroksiapatit/alginate 3% yang dihasilkan oleh penelitian ini masih dalam rentang nilai porositas yang menjadi syarat pada *scaffold* untuk rekayasa jaringan tulang yaitu adalah 80-90%⁵. Porositas yang besar meningkatkan adanya perlekatan sel yang lebih banyak karena menghasilkan area permukaan *scaffold* yang lebih luas.

Interaksi antar rantai polimer alginate berupa struktur *egg-box* yang kemungkinan hanya terjadi di permukaan *scaffold* dapat berpengaruh pada sifat yang lain yaitu sifat mekanis dan biodegradasi. Hal ini karena *scaffold* dengan tingkat *crosslink* yang tinggi atau terdapat lebih banyak struktur *egg-box* memiliki integritas mekanis *scaffold* yang lebih baik dibanding *scaffold* dengan tingkat *crosslink* yang rendah.^{21,22} Oleh karena itu dibutuhkan studi lebih lanjut mengenai pengaruh perendaman *scaffold* pada larutan CaCl_2 yang

dilakukan pada penelitian ini terhadap sifat-sifat *scaffold* hidroksiapatit/alginate seperti sifat mekanis dan biodegradasi.

Penggunaan alginate yang diekstrak dari spesies *Sargassum sp* menjadi perhatian tersendiri karena spesies tersebut merupakan spesies alga coklat yang banyak terdapat di perairan Indonesia.¹¹ Hal tersebut dapat menekan biaya produksi dari persiapan material alginate dan meningkatkan pemanfaatan bahan alam dari dalam negeri.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa *scaffold* hidroksiapatit/alginate 1% dan *scaffold* hidroksiapatit/alginate 3% telah berhasil disintesis. Penggunaan konsentrasi alginate 1% dapat memperbesar porositas pada *scaffold* hidroksiapatit/alginate.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tobita M, Mizuno H. Oral and Maxillofacial Tissue Engineering with Adipose-Derived Stem Cells. In: Regenerative Medicine and Tissue Engineering. 2013. p. 141–53.
2. Kane RJ, Weiss-bilka HE, Meagher MJ, Liu Y, Gargac JA, Niebur GL, et al. Acta Biomaterialia Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties q. Acta Biomater. 2015;10–3.
3. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: State of the union. Drug Discov Today [Internet]. 2014;19(6):781–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.04.010>
4. Wu S, Liu X, Yeung KWK, Liu C, Yang X. Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering. Mater Sci Eng R Reports [Internet]. 2014;80:1–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927796X14000503>
5. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. Trends Biotechnol [Internet]. 2012;30(10):546–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>
6. Murphy CM, Haugh MG. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen glycosaminoglycan

- scaffolds for tissue engineering . 2010;31(3).
7. Krishnamurthy G, Science M, Medicine CC. A review on hydroxyapatite-based scaffolds as a potential bone graft substitute for bone tissue engineering applications. *JUMMEC*. 2013;16(2):1–6.
 8. Sibte S, Abidi A, Murtaza Q. Synthesis and Characterization of Nano-hydroxyapatite Powder Using Wet Chemical Precipitation Reaction. *J Mater Sci Technol*. 2014;30(4):307–10.
 9. Tripathi G, Basu B. A porous hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering : Physico-mechanical and biological evaluations. *Ceram Int*. 2012;38(1):341–9.
 10. Venkatesan J, Bhatnagar I, Manivasagan P, Kang K, Kim S. Alginate composites for bone tissue engineering : A review. *Int J Biol Macromol*. 2015;72:269–81.
 11. Aufan MR, Daulay AH, Indriani D, Nuruddin A. Sintesis scaffold alginat-kitosan-karbonat apatit sebagai bone graft. *J Biofisika*. 2012;8(1):16–24.
 12. Indrani DJ, Doktor P, Ilmu B, Matematik F, Ilmu D a N, Alam P, et al. Universitas Indonesia Komposit Hidroksiapatit Kalsinasi Suhu Rendah Dengan Sebagai Material Scaffold. Disertasi Progr Dr Bid Ilmu Mater Fak MIPA Univ Indones. 2012;1–169.
 13. Nazarpak MH, Pourasgari F. Fabrication of Tissue Engineering Scaffold from Hydroxyapatite / Alginate Composite. *Int J Biosci Biochem Bioinforma*. 2014;4(3):142–5.
 14. Marsich E, Bellomo F, Paoletti S. Nano-composite scaffolds for bone tissue engineering containing silver nanoparticles : preparation , characterization and biological properties. 2013;1799–807.
 15. Karageorgiou V, Å DK. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. 2005;26:5474–91.
 16. Loh QL, Choong C, Oxon D, Hons M, Mimmm C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications : *Tissue Eng Part B*. 2013;19(6):485–502.
 17. Hong-Ru Lin1 Y-JY. Porous alginate/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: preparation, characterization, and in vitro studies. *J Biomed Mater Res*. 2004;52–66.
 18. Szparaga G, Sciences C, Metrology T. The Effect of Sodium Alginate Concentration on The Rheological Parameters of Spinning Solution. *AUTEX Reseaarch J*. 2015;15(2):123–6.
 19. Han J, Zhou Z, Yin R, Yang D, Nie J. International Journal of Biological Macromolecules Alginate – chitosan / hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds : Preparation and characterization. *Int J Biol Macromol*. 2010;46:199–205.
 20. Kim H, Jung G, Yoon J, Han J, Park Y, Kim D, et al. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite / alginate / chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C*. 2015;54:20–5.
 21. Mane S, Ponrathnam S, Chavan N. Synthesis and characterization of hypercrosslinked hydroxyl functionalized co-polymer beads. *Eur Polym J [Internet]*. 2014;59:46–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.07.001>
 22. Lee S, Jo AR, Choi GP, Woo CH, Lee SJ, Kim B, et al. Fabrication of 3D Alginate Scaffold with Interconnected Pores using Wire-Network Molding Technique. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;10(2):53–9.