

Preparasi dan Karakterisasi Kitosan-Karboksi Metil Selulosa Iradiasi untuk *Scaffold*

Preparation and Characterization of Irradiated Chitosan-Carboxy Methyl Cellulose for Scaffold

Basril Abbas dan Yessy Warastuti

Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN
Jalan Lebak Bulus Raya No. 49, Jakarta Selatan 12440
E-mail : baskara@batan.go.id

ABSTRAK

Scaffold umumnya digunakan sebagai matrik pelepasan obat, penelitian perilaku sel dan material dalam bidang rekayasa jaringan. *Scaffold* berdimensi tiga (3D) biasanya berupa material berpori, biokompatibel, biodegradable dan berfungsi untuk memberikan lingkungan mikro yang cocok, yaitu dukungan mekanik, fisik, dan rangsangan biokimia untuk pertumbuhan sel optimal. Pada penelitian ini *scaffold* dibuat dari kitosan dan karboksimetil selulosa (KMS) dengan teknik liofilisasi. Selanjutnya, *scaffold* diiradiasi dengan sinar gamma dan dikarakterisasi dengan *Fourier-Transform- Infrared*, *Scanning Electron Microscope* (SEM), serapan air dan porositas. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada spektrum FTIR diperoleh kedua bahan tersebut tanpa terjadi reaksi, ukuran pori berkisar 130-467 μm , serapan air 803-1722%, dan porositas berkisar 70-74%. Iradiasi mempengaruhi ukuran pori, porositas, dan serapan air. Berdasarkan besaran porinya, komposit ini layak menjadi *scaffold*.

Kata Kunci : komposit, *scaffold*, kitosan, karboksi metil selulosa, karakterisasi.

ABSTRACT

Scaffolds are generally used for drug delivery, investigation of cell behavior and material studies in the field of tissue engineering. Three dimensional (3D) scaffolds are typically porous, biocompatible and biodegradable materials that serve to provide suitable microenvironments, that is, mechanical support, physical, and biochemical stimuli for optimal cell growth and function. In this study, the scaffold was prepared from chitosan and carboxy methyl cellulose (CMC) with lyophilization techniques. Furthermore, the scaffold was irradiated with gamma rays and characterized by using *Fourier-Transform- Infrared* (FTIR) and *Scanning Electron Microscope* (SEM). It is also determined water absorption and porosity. The results showed that based on the FTIR spectrum both materials were obtained without reaction, pore size around 130-467, water absorption 803-1722% and porosity around 70-74%. Based on these results, this composite deserves to be a scaffold.

Key Words : composite, scaffold, chitosan, carboxy methyl cellulose, characterization

PENDAHULUAN

Polimer seperti protein, karbohidrat, dan lemak telah memainkan peranan yang besar dalam kehidupan manusia. Salah satu dari polimer alam yang banyak dimodifikasi dalam bidang polimer adalah polisakarida. Pencampuran dua atau lebih polimer untuk memperoleh bahan dengan sifat yang baru dan unik telah menjadi penting pula dalam topik penelitian di bidang biomaterial. Tujuan utama dari pencampuran polimer tersebut adalah untuk mendapatkan bahan dengan sifat yang lebih baik dari sifat masing-masing komponen penyusun campuran tersebut

Keberhasilan dari bahan polimer untuk biomaterial ditujukan untuk perbaikan sifat mekanik yang dihasilkan. Pencampuran bahan polimer tersebut banyak dilakukan dengan metode blending karena prosesnya lebih cepat dan lebih ekonomis dalam membuat bahan material baru [1].

Scaffold atau perancah adalah material penyangga baik dari bahan alam atau buatan yang dapat mempertahankan konfigurasi permukaan jaringan. Untuk fungsi yang efisien, *scaffold* harus memenuhi persyaratan tertentu. Diantara persyaratan itu adalah arsitektur yang tepat dan geometri dari *scaffold* yang diperlukan untuk

penggantian jaringan atau organ. Disamping itu, ukuran pori-pori yang memadai dan porositas yang tinggi akan memungkinkan pemerataan pertumbuhan sel melalui struktur 3D, difusi nutrisi yang cukup untuk sel dan produk transportasi metabolit. Struktur rangka tiga dimensi seperti halnya pada *scaffold* efektif pada penelitian rekayasa jaringan [2,3].

Pencampuran bahan polimer dapat meningkatkan sifat mekanik dan termal dari material yang dihasilkan. Dalam penelitian ini digunakan dua macam material yaitu kitosan dan KMS yang dicampur dengan metode *blending* dan diliofilisasi untuk mendapatkan *scaffold* yang ideal. Kitosan merupakan bio-polimer yang mengandung kation dan memiliki sifat yang unik. Sifat kitosan yang paling penting untuk aplikasi *scaffold* adalah, bahwa kitosan tidak toksik, biodegradable dan biokompatibel [4]. KMS adalah polisakarida yang penting untuk modifikasi berbagai bio-polimer. Polimer alam ini banyak dipelajari karena mudah diolah untuk dijadikan suatu produk. Salah satu jenis KMS yang penting dan banyak digunakan adalah Natrium Karboksimetil Selulosa (Na-KMS), seperti untuk industri (detergen dan lem wall paper). Na-KMS dengan kemurnian tinggi digunakan dalam obat-obatan, pasta gigi dan makanan [5].

Kitosan dan KMS keduanya merupakan golongan polisakarida, sehingga struktur dari kedua bio-polimer ini sangat mirip. Perbedaan kitosan dan KMS terletak pada gugus amino pada kitosan diganti dengan gugus hidroksil pada KMS.

Tujuan penelitian ini adalah untuk memperoleh *scaffold* iradiasi dengan karakteristik sifat fisiko kimianya seperti *Fourier-Transform-Infrared* (FTIR), pori, porositas, dan serapan air. Sebagai biomaterial, *scaffold* banyak digunakan dalam bidang kesehatan sebagai bahan implan. Salah satu persyaratan bahan implan adalah harus bebas dari kontaminasi mikroba. Untuk sterilisasi produk alat kesehatan radiasi merupakan pilihan yang banyak digunakan. Teknik sterilisasi radiasi mempunyai keunggulan dibandingkan dengan metode sterilisasi lain, diantaranya: kenaikan suhu selama proses sterilisasi tidak signifikan sehingga tidak terjadi perubahan fisika dan kimia yang berarti; radiasi dapat dilakukan pada produk yang telah dikemas dalam kontainer/ box karena penetrasi sinar gamma yang tinggi; tidak meninggalkan residu seperti sterilisasi dengan etilen oksida; dan proses kontrol yang sederhana [6].

BAHAN DAN METODE

Bahan

Kitosan diperoleh dari PT Biotek Surindo dengan spesifikasi *medical grade*. Kitosan berasal dari cangkang kepiting berbentuk bubuk putih 200 Mesh dengan derajat deasetilasi 94.5%, viskositas 34,4 cps, kandungan air 8.68%, dan kadar abu 0.85%.

Karboksi Metil Selulosa diperoleh dari Dai-Chi Kogyo Seiyaku Co. Ltd, kadar air 6.5%, viskositas (1% dalam Air) 365, pH (1% dalam air) 6.7

Metode

Scaffold kitosan-KMS dibuat dengan metode *blending* dan liofilisasi. Sebanyak 2% kitosan dan KMS masing-masing ditimbang dan dicampur dengan air. Campuran tersebut diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 1 jam. Ke dalam campuran tersebut ditambahkan 0,5 gram natrium bikarbonat dan pengadukan dilanjutkan 1 jam lagi, sehingga campuran tersebut bercampur dengan sempurna. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam cetakan yang telah diisi dengan larutan asam asetat. *Scaffold* yang terbentuk dibekukan dalam *deep freezer* suhu -80°C selama 3 jam. *Scaffold* beku direndam dalam larutan natrium hidroksida 1 M selama 2 jam, selanjutnya pH dinetralkan dengan mencuci *scaffold* dalam air. Pengeringan dilakukan dalam liofilizer hingga kadar air $< 7\%$. Sampel diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 15 dan 25 kGy.

Karakterisasi

Pengukuran gugus fungsi dilakukan dengan *Fourier-Transform-Infrared* (FTIR) Shimadzu IR Prestige 21. Sejumlah sampel dimasukkan ke dalam tempat sampel (pan) yang telah berisi kalium bromida (KBr). Sampel diukur pada daerah bilangan gelombang sedang $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ dengan resolusi 4 cm^{-1} .

Sampel *scaffold* KS-KMS disiapkan dengan teknik pembekuan fraktur dimana sampel dibekukan kemudian dipatahkan. Struktur morfologi permukaan dari potongan tersebut dilapisi dengan carbon dan dikarakterisasi dengan *Scanning Electron Microscope* (SEM) Zeiss, EVO MA 10.

Serapan air *scaffold* KS-KMS dilakukan dengan metode perendaman sampel di dalam air pada suhu ruang. Sampel yang digunakan berbentuk kubus dengan volume 2 cm^3 . Sebelum

direndam, sampel awal ditimbang sebagai W_0 . Perendaman dilakukan selama 30 menit dengan interval 5 menit kemudian sampel ditimbang kembali sebagai W_1 . Serapan air dihitung berdasarkan rumus:

$$\text{Serapan air} = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \times 100\% \quad \dots(1)$$

Keterangan:

W_0 = berat kering sampel *scaffold*

W_1 = berat sampel *scaffold* setelah perendaman dalam air.

Porositas didefinisikan sebagai rasio volume ruang kosong dengan volume massa dari material solid. Porositas *scaffold* KS-KMS ditentukan dengan merendam sampel dalam etanol absolut. *Scaffold* berukuran 2 cm^3 ditimbang sebagai W_0 . Selanjutnya *scaffold* direndam dengan etanol absolut selama 30 menit, ditimbang sebagai (W_1). Persen porositas dihitung dengan rumus [3]:

$$\text{Porositas (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{\rho \times V_0} \times 100\% \quad \dots(2)$$

Keterangan :

W_1 = berat sampel *scaffold* setelah di rendam etanol absolut

W_0 = berat sampel *scaffold* sebelum direndam etanol absolut

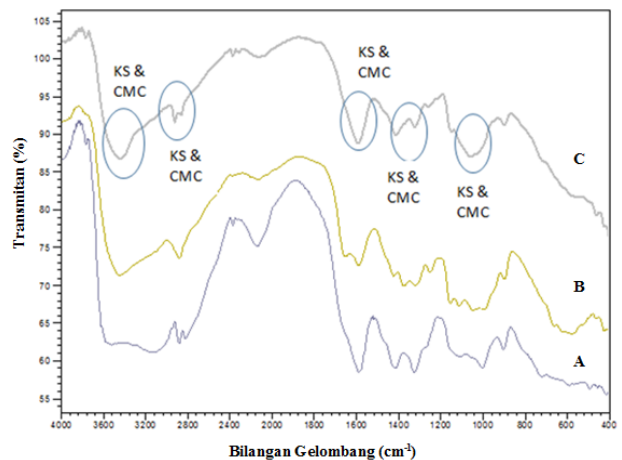
ρ (etanol absolut) = $0,790 \text{ g/cm}^3$

$V_0 \text{ scaffold} = 2 \text{ cm}^3$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Spektrum FTIR dari kitosan (KS), KMS dan *scaffold* komposit KS-KMS ditampilkan pada Gambar 1. Karakteristika dari kitosan (Gambar 1B) ditunjukkan dengan adanya bilangan gelombang pada 3450 cm^{-1} yang berkaitan dengan peregangan getaran -NH_2 dan OH dan bilangan gelombang 1651 cm^{-1} yang merupakan karakteristik dari kelompok amida [7]. Pada spektrum tersebut juga muncul C-H alifatik dengan bilangan gelombang 2879 cm^{-1} dan peregangan N-H pada 1589 cm^{-1} (amida II). Di samping itu, terdapat pula C-H asimetri dan CH_2 tekuk pada bilangan gelombang 1410 cm^{-1} dan 1310 cm^{-1} (amida III) [4].

Spektrum FTIR dari KMS (Gambar 1A) menunjukkan adanya ion karboksilat (-COO^-) yang muncul pada bilangan gelombang 1587 cm^{-1} , peregangan C-O simetri pada bilangan gelombang 1111 cm^{-1} dan C-O-C pada bilangan gelombang 1630 cm^{-1} (Hsiao, et.al, 2012). Disamping itu, juga terdapat N-H pada bilangan gelombang 3375 cm^{-1} dan C=C pada bilangan gelombang 1587 cm^{-1} . Bilangan gelombang 1423 dan 1325 cm^{-1} pada KMS masing-masing merupakan gugus C-H dan gugus hidroksil (O-H) tekuk [8].

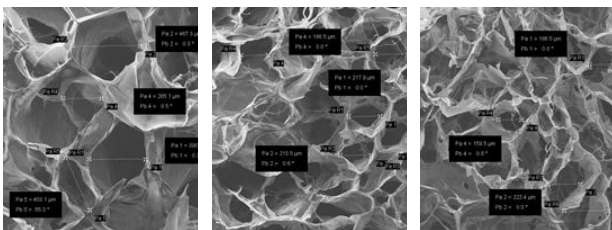


Gambar 1. Spektrum CMC (KMS) (A), Kitosan (B), dan komposit CMC (KMS)-KS (C).

Scaffold komposit kitosan dan KMS (Gambar 1C) memperlihatkan adanya serapan yang muncul pada bilangan gelombang 3429 cm^{-1} yaitu peregangan N-H (amida II dan amina primer) dan peregangan OH. Selanjutnya, terdapat serapan pada bilangan gelombang 2924 cm^{-1} yang merupakan peregangan C-H dari kelompok metil ($\text{H}_3\text{C}-$) berdimensi tiga dan pita bilangan gelombang 1092 cm^{-1} serta 1265 cm^{-1} yang merupakan C-O-C sebagai cincin polisakarida. Selanjutnya, pada *scaffold* ini juga muncul pita pada bilangan gelombang 1597 cm^{-1} (N-H) dan 1740 cm^{-1} (C=O) yang memverifikasi bahwa komposit KS-KMS terdiri atas KS dan KMS.

Salah satu ciri dari *scaffold* adalah bahwa produk tersebut berupa material tiga dimensi yang berpori. Dari hasil pengamatan morfologinya dengan SEM (Gambar 2), *scaffold* KS-KMS menunjukkan *scaffold* berpori yang berbentuk poligonal dan memiliki struktur seperti lembaran kecil tiga dimensi. Pori yang berbentuk poligonal dan adanya struktur lembaran kecil tersebut dapat

mempertahankan air lebih banyak dibandingkan dengan bentuk pori yang memanjang [9]. Diameter pori makro dari *scaffold* non-iradiasi dan iradiasi (dosis 15 dan 25 kGy) masing-masing adalah 265-467 μm , 130-400 μm dan 159-355 μm . Di samping pori-pori makro, terdapat pori-pori mikro (<100 μm) di dalam maupun pada permukaan *scaffold*. Iradiasi memberikan pengaruh terhadap besaran pori *scaffold*, yaitu dosis iradiasi semakin tinggi menghasilkan pori semakin kecil. Hal ini mungkin disebabkan karena proses iradiasi menyebabkan terjadinya ikatan silang antara kitosan dan KMS, sehingga ukuran pori *scaffold* menjadi mengecil.

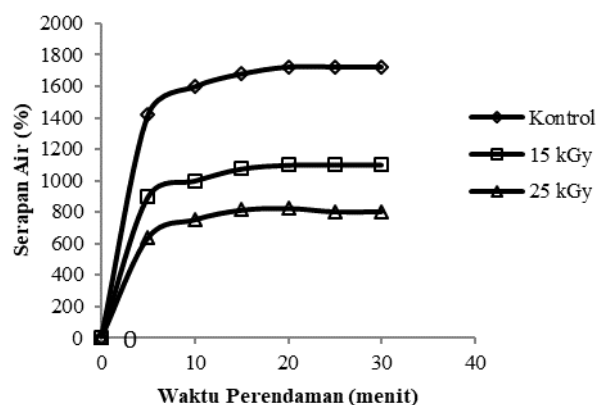


Gambar 2. Morfologi *scaffold* dengan SEM

Berdasarkan Karageorgiou dan Kaplan (2005) [10], persyaratan minimum ukuran pori *scaffold* adalah sekitar 100 μm . Persyaratan tersebut sesuai untuk kebutuhan migrasi dan transportasi dari sel. Namun demikian, yang diharapkan dari *scaffold* tersebut bukan saja untuk kebutuhan sel, tetapi lebih jauh lagi yaitu pembentukan tulang baru dan kapiler. Untuk kebutuhan tersebut, diperlukan *scaffold* dengan besaran pori lebih dari 300 μm . Menurut Chen, et.al (2014) [11] pada pori-pori mikro, baik yang terdapat di dalam maupun di permukaan *scaffold* dapat mempercepat jebakan dan perlengketan sel. Pori-pori tersebut berfungsi sebagai kantong untuk memberi ruang bagi sel-sel untuk menyusup, menempel dan berkembang biak. Zhang et al. (2010) [12], telah pula mengamati diferensiasi osteogenik dari *Bone Morphogenetic Protein-7* (BMP-7), dimana diferensiasi osteogenik lebih baik terjadi pada pori berukuran antara 100-300 μm dibandingkan dengan 50-100 μm di dalam *scaffold* fibroin sutra. Han et al. (2015) [13] menambahkan pula bahwa ukuran pori *scaffold* fibroin sutra 90-250 μm memberi lingkungan terbaik untuk adhesi dan proliferasi kondrosit. Hal tersebut sejalan dengan hasil yang diperoleh pada penelitian ini yaitu ukuran pori sampel

scaffold iradiasi 15 kGy dan 25 kGy berkisar antara 130-467 μm .

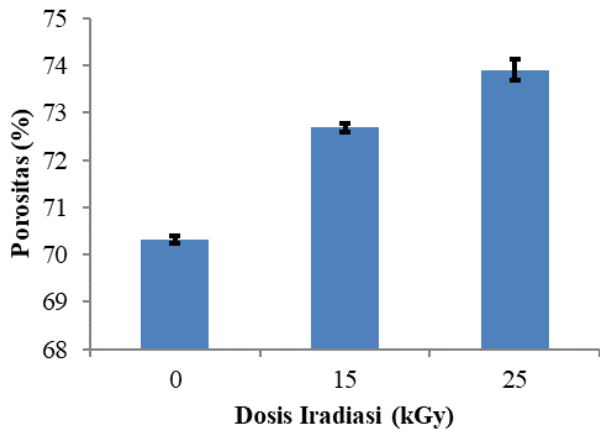
Parameter penting lainnya dari *scaffold* adalah kemampuannya untuk menyerap air. Pola penyerapan air *scaffold* KS-KMS dapat dilihat pada Gambar 3. Persen serapan air dari *scaffold* meningkat dengan bertambahnya waktu perendaman. Serapan maksimum dari *scaffold* KS-KMS terjadi setelah direndam dalam air selama 15 menit. Dosis iradiasi yang semakin tinggi memberi serapan air yang semakin rendah dari *scaffold*. Penyerapan air dari *scaffold* KS-KMS berhubungan dengan besar porinya, dan besaran pori berhubungan dengan dosis iradiasi. Semakin besar pori *scaffold*, semakin besar serapan airnya. Pori dari *scaffold* kontrol lebih besar daripada *scaffold* iradiasi 15 kGy dan *scaffold* iradiasi 15 kGy lebih besar porinya dari pada *scaffold* iradiasi 25 kGy dengan serapan air berturut-turut 1.722%, 1.101%, dan 803%. Oksidasi radiasi pada polimer padatan dipengaruhi oleh dosis iradiasi. Hal ini akan mempengaruhi difusi oksigen ke dalam jejerang polimer [14]. Oleh karenanya semakin kecil pori *scaffold* KS-KMS semakin menurun kemampuan swelling akibat terjadinya degradasi oksidatif oleh radiasi.



Gambar 3. Pola serapan air dari *scaffold* komposit KS-KMS

Persentase porositas *scaffold* KS-CMC non-iradiasi dan iradiasi dapat dilihat pada Gambar 4. Porositas *scaffold* non-iradiasi, iradiasi 15 dan 25 kGy, berturut-turut adalah 70,3%, 72,7% dan 73,9%. *Scaffold* dengan dosis iradiasi yang semakin tinggi diperoleh persen porositas yang tinggi pula. Hal ini dapat dimaklumi karena sesuai dengan definisi porositas yaitu rasio antara volume ruang kosong dengan volume massa dari material solid, maka semakin tinggi persen

porositas dari suatu *scaffold*, semakin kecil ukuran porinya. Porositas dari *scaffold* juga berhubungan dengan struktur 3D dari *scaffold*. Struktur 3D ini sangat berperan dalam memfasilitasi sel untuk bermigrasi ke dalam *scaffold* [15].



Gambar 4. Porositas *Scaffold* KS-KMS Non-Iradiasi dan Iradiasi.

Porositas dari *scaffold* KS-KMS ini telah memenuhi persyaratan dari porositas dasar untuk rekayasa jaringan yaitu sebesar 60% [16]. Dengan demikian *scaffold* yang disiapkan dari KS-KMS ini mempunyai cukup ruang untuk meningkatkan proliferasi dan pertumbuhan sel.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa komposit KS-KMS iradiasi memiliki ukuran pori berkisar 130-467 μm dan porositas berkisar antara 70,3%, sampai 73,9% yang memenuhi persyaratan sebagai *scaffold*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Bapak Yasin dari Balai Iradiasi, Elektromekanik dan Instrumentasi PAIR-BATAN yang telah membantu dalam mengiradiasi sampel *scaffold* KS-KMS.

DAFTAR PUSTAKA

[1] Cai Q., Yang J., Wang S., A novel porous cells scaffold made of polylactide

dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques. *Biomaterials*, **23**, 4483-4492, 2002.

- [2] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W.E., Lim T.C., Ma Z., An introduction to electrospinning and nanofibers. World Scientific, 341-349, 2005.
- [3] Chen Huangqin and Fan Mingwen, Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Polyelectrolyte Complex Scaffolds for Pulp Cells Regeneration. *Journal of Bioactive and Compatible Polymer*, **22**, 475-491, 2007.
- [4] Llanos J.H.R., Vercik L.C.O., Vercik A., Physical properties of chitosan films obtained after neutralization of polycation by slow drip method, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, **6**, 276-291, 2015.
- [5] Adel A.M., Abou-Youssef H, El-Gendy A.A., Nada A.M., Carboxymethylated cellulose hydrogel: Sorption behavior and characterization. *Nature and Science*, **8** (8), 244-256, 2010.
- [6] Yusof N., Validation of radiation dose distribution in boxes for frozen and nonfrozen tissue grafts. In: Nather A., Yusof N., and Hilmy N (eds) *Radiation in Tissue Banking*, World Sci, Singapore, pp. 187-199, 2007.
- [7] Liu, C., Bai, R., Adsorptive Removal of Copper Ions with Highly Porous Chitosan/Cellulose Acetate Blend Hollow Fiber Membranes. *Journal of Membrane Science*. **284**, 313-322, 2006.
- [8] Heydarzadeh H.D., Najafpour G.D., Nazari-Moghaddam A.A., Catalyst-free conversion of alkali cellulose to fine carboxymethyl cellulose at Mild conditions. *World Applied Sciences Journal*, **6** (4), 564-569, 2009.
- [9] Nwe N., Furuike T., Tamura H., The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration

- templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*, *Materials*, **2**, 374-398, 2009. doi: 10.3390/ma2020374.
- [10] Karageorgiou, V., Kaplan D., Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*, **26**, 5474–5491, 2005.
- [11] Chen C.H., Liu J.M.J., Chua C.K., Chou S.M., Shyu V.B.H., Chen J.P., Cartilage tissue engineering with silk fibroin scaffolds fabricated by indirect additive manufacturing technology, *Materials*, **7**, 2104-2119, 2014. doi: 10.3390/ma7032104.
- [12] Zhang Y., Fan W., Ma Z., Wu C., Fang W., Liu G., Xiao Y., The effects of pore architecture in silk fibroin scaffolds on the growth and differentiation of mesenchymal stem cells expressing BMP7. *Acta Biomater.* **6**, 3021–3028, 2010. doi: 10.1016/j.actbio.2010.02.030.
- [13] Han K.S., Song J.E., Tripathy N., Kim H., Moon B.M., Park C.H., Khang G., Effect of pore sizes of silk scaffolds for cartilage tissue engineering. *Macromolecular Research.*; **23**, (12), 1091–1097, 2015. doi: 10.1007/s13233-015-3156-4.
- [14] Desai K.G., Park H.J., Study of gamma-irradiation Effects on Chitosan Microparticles, *Drug Delivery*, **13**, 39–50, 2006.
- [15] Amaral I.F., Sampaio P., Barbosa M.A., Three-dimensional culture of human osteoblastic cells in chitosan sponges: The effect of the degree of acetylation, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* • February, 335-346, 2006. doi: 10.1002/jbm.a.30522.
- [16] Zhang J., Yan D.X., Lei J., Xu J.Z., Hsiao B.S., Li Z.M., Ultraporous poly(lactic acid) scaffolds with improved mechanical performance using high-pressure molding and salt leaching. *J. Appl. Polym. Sci.*, **130**, 3509–3520, 2013.