

TEKNOLOGI PEMBUATAN PRODUK KESEHATAN DARI JARINGAN BIOLOGI, BAHAN ALAM DAN SINTETIK DENGAN TEKNIK RADIASI

Basril Abbas, Darmawan Darwis dan Erizal

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi- BATAN
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Pasar Jumat, Jakarta Selatan
Telp.021-7690709; Fax: 021-7691607

ABSTRAK

TEKNOLOGI PEMBUATAN PRODUK KESEHATAN DARI JARINGAN BIOLOGI, BAHAN ALAM DAN SINTETIK DENGAN TEKNIK RADIASI. Kebutuhan produk bahan kesehatan yang berbasis pada biomaterial semakin meningkat dari tahun ke tahun. Dari data statistik terlihat bahwa industri biomaterial di dunia telah menjual sekitar US \$3 miliar setahunnya dengan perkiraan pertumbuhan sebesar 7-12% per tahun. Begitu pula di Indonesia, kebutuhan akan biomaterial tiap tahunnya juga meningkat walaupun secara statistika belum diketahui secara pasti. Batan sejak tahun 1986 telah mengembangkan biomaterial dari bahan biologi yaitu amnion dan tulang. Produk-produk tersebut telah dimanfaatkan untuk penanganan di bidang luka, mata, ortopedi, gigi dan mulut. Baik amnion maupun tulang, bahan bakunya berasal dari donor manusia yang sangat terbatas. Oleh karena itu pemilihan bahan baku yang mudah didapat dan dalam jumlah yang tidak terbatas perlu dikembangkan. Pada tahun 2010 akan dilakukan penelitian: a) karakterisasi membran periosteum dan pericardium untuk *Guided Bone Regeneration* (GBR), b) sintesis komposit PEO/Tri Calcium Phosphat/Kitosan, dan c) uji praklinis membran *microbial cellulose* (CM) sebagai GBR. Hasil menunjukkan bahwa penambahan larutan glutaraldehid pada membran perikardium dan periosteum dan mengurangi degradasi dan meningkatkan kekuatan tariknya. Sebaliknya, iradiasi meningkatkan degradasi dan mengurangi kekuatan tarik dari membran perikardium dan periosteum. Sintesis Tri Calcium Phosphat (TCP) dapat dibuat dengan reaksi natrium fosfat dengan kalsium klorida. Semakin tinggi suhu kalsinasi, semakin tinggi kristal TCP yang terbentuk. Berdasarkan uji toksisitas sistemik dan pirogen, membran CM iradiasi bersifat tidak toksik dan tidak mengandung pirogen.

Kata Kunci : produk kesehatan, jaringan biologi, perikardium, periosteum, membran *microbial cellulose*, radiasi, bahan alam, trikalsium fosfat, periosteum

PENDAHULUAN

Penelitian jaringan biologi sebagai bahan implan seperti amnion, tulang alograf dan xenograf untuk kegunaan di bidang bedah ortopedi, bedah mata, bedah plastik bedah mulut dan gigi telah dilakukan dengan hasil baik. Uji pra klinis *Bone Ocular Spherical Implant* Radiasi (BOSIR) dari tulang xenograf menunjukkan hasil yang baik, yaitu BOSIR tidak ditolak, dan terjadi mineralisasi pada BOSIR (ABBAS, dkk, 2007).

Pemakaian tulang alograf untuk kebutuhan di bidang gigi khususnya periodonti telah dilakukan. Tulang alograf hasil penelitian Batan, dapat menanggulangi kerusakan intraboni tulang alveolar (LENNY, 2009). Kesulitan donor manusia menjadi kendala dalam mengembangkan pemakaian tulang alograf. Oleh karena itu perlu dikembangkan penelitian pemakaian tulang xenograf dan tulang sintesis di bidang periodonti. Pada beberapa tahun belakangan ini telah dilakukan usaha penelitian tulang sintetik sebagai bahan substitusi tulang misalnya keramik kalsium fosfat yang merupakan basis dari hidroksi apatit ($\text{HAp} : \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dan TCP $\{\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\}$). Komposisi kimia dari senyawa-senyawa tersebut sangat erat hubungannya dengan kimia

tulang. Baik HAp maupun TCP telah lama diketahui bahwa kedua senyawa tersebut memiliki biokompatibilitas yang baik dengan tulang. Namun demikian, salah satu kelemahannya adalah tidak mempunyai daya rangsangan untuk pertumbuhan tulang atau dengan kata lain tidak bersifat osteoinduktif pada saat dimplankan. Oleh karena itu pada beberapa tahun belakangan ini sedang dilakukan penelitian secara intensif. Sintesis dan karakterisasi komposit Hap/PVA/PVP/Kitosan yang diiradiasi dengan dosis 5 – 30 kGy. telah dilakukan. Fraksi gel yang dihasilkan berkisar mulai dari 90% hingga 30% (DARWIS, dkk, 2009).

Karakterisasi TCP/Kitosan telah dilakukan. Hasilnya menunjukkan komposit dengan fraksi gel yang sangat rendah akibat radiasi. Kelemahan kitosan ini akan diperbaiki dengan menambahkan polietilen oksida (PEO). $-(-O-CH_2-CH_2-)_n$ yang merupakan salah satu jenis polimer kandidat bahan kesehatan, dikarenakan bersifat tidak toksis dan biokompatibel dengan tubuh. Penelitian-penelitian yang berkaitan dengan modifikasi PEO sedang dilakukan dengan intensif pada beberapa tahun belakangan ini a.l. sintesis hidrogel PEO secara enzimatik, freeze dried kitosan-PEO hidrogel, modifikasi PEO –karbohidrat hidrogel, immobilisasi molekul PEO untuk bioaplikasi dan hidrogel PEO untuk tissue engineering. Sintesis komposit PEO- TCP(senyawa anorganik) pada umumnya dilakukan dengan metode kimia yang relatif sukar dilakukan dikarenakan sifat dasar kimia yang berbeda dari kedua senyawa ini. Oleh karena itu, salah satu metode yang nampaknya memberikan harapan agar sintesis ini dapat dilakukan secara optimal adalah metode radiasi.

Graf tulang atau bahan pengganti tulang sangat dibutuhkan pada rekonstruksi defek tulang alveolar. Kasus-kasus ini terutama terdapat pada bidang periodontal dan bedah mulut. Penggunaan graf tulang sebagai pengisi tulang saja belum cukup efektif dalam menaikkan tulang alveolar tersebut, karena kemungkinan terjadinya migrasi jaringan lunak ke dalam graf tulang selama masa penyembuhan. Untuk mengantisipasi migrasi jaringan tersebut, teknik modern menggunakan membran *barier* agar tidak kontak langsung antara jaringan lunak dan jaringan tulang. Membran tersebut biasanya disebut dengan *Guided Bone Regeneration* (GBR) (NAKAHARA, 1992). GBR dipasaran pada umumnya terbuat dari bahan sintesis seperti *Polytetrafluoroethylene* (PTFE). Kelemahan dari bahan ini adalah tidak dapat diserap oleh tubuh sehingga membutuhkan operasi dua kali. Dengan demikian akan menambah biaya, waktu dan penyembuhan.

Untuk mendapatkan GBR yang diserap oleh tubuh, dapat diperoleh dari bahan biologi seperti dari manusia (alograf) atau dari hewan (xenograf) seperti pericardium dan periosteum. Bahan tersebut banyak mengandung kolagen dan tidak mempunyai pembuluh darah sehingga aman digunakan untuk implantasi. Berdasarkan kebaikan yang dimiliki membran tersebut, akan dilakukan efek radiasi terhadap sifat fisiko-kimia kedua jaringan tersebut. Disamping perikardium dan periosteum, GBR juga dapat diperoleh dari membran CM.

Tujuan penelitian adalah diketahuinya karakteristik dari membran perikardium dan periosteum, TCP/PEO/Kitosan dan membran CM sebagai material pengganti tulang dan GBR,

untuk prosedur dalam penanganan kerusakan jaringan penyangga dalam bidang periodontal dan bedah mulut

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah membran perikardium dan periosteum dari sapi berumur dua tahun, membran CM yang didapat dari proses mikrobial dari **air kelapa**, kalsium hidroksida kalsium klorida (Merck), natrium fosfat (Merck), poli etilen oksida (PEO) dari Merck, kitosan (PATIR-BATAN), amoniak, dan air suling. Semua bahan kimia yang digunakan berkualitas pro analisis (Pa).

Alat yang digunakan adalah: Iradiator Karet Alam (IRKA), mesin berkas elektron, FTIR, XRD, SEM, *hot plate*, *magnetic stirrer*, oven, otoklaf, pH meter, dan alat gelas lainnya.

Metode

Preparasi membran perikardium dan periosteum

Membran perikardium dipisahkan dari jantung sapi dibersihkan dari sisa darah. Membran dibagi menjadi dua bagian, sebagian direndam dalam larutan glutaraldehid 0,25% dan sebagian lagi digunakan sebagai kontrol. Ke dua bagian membran tersebut selanjutnya dikeringkan dengan cara liofilisasi hingga kadar air <5%. Sampel kemudian dibagi menjadi dua bagian, sebagian diiradiasi dengan sinar gamma dan sebagian lagi diiradiasi dengan berkas elektron. Radiasi dilakukan dengan dosis 0, 15 dan 30 kGy. Selanjutnya dilakukan pengukuran kekuatan tarik, degradasi, SEM. Pekerjaan yang sama juga dilakukan pada membran periosteum yang diambil dari permukaan tulang sapi.

Pembuatan Trikalsium Fosfat (TCP).

TCP dibuat dengan metode basah melalui prinsip reaksi antara natrium fosfat dan kalsium klorida. 38 gram $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ dan 27,5 gram CaCl_2 dilarutkan masing-masing ke dalam 100 ml air. Kedalam larutan kalsium klorida ditambahkan larutan natrium fosfat tetes demi tetes hingga habis sambil diaduk dengan magnetik stirrer. Endapan yang terbentuk dibiarkan selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan corong Buchner. Endapan dicuci dengan air suling sehingga bebas dari klorida (larutan hasil saringan diuji dengan Ag-nitrat, sehingga tidak didapatkan lagi endapan putih). Endapan dikeringkan dalam oven suhu 60°C selama 24 jam dan dihaluskan dengan mortar serta diayak menggunakan saringan stainless steel mesh berukuran 200 mesh. TCP yang didapat dikalsinasi pada suhu 120, 500, 700, dan 800 °C

Pembuatan komposit TCP-PEO-kitosan. Dibuat satu seri formula komposit TCP-PEO-kitosan dengan cara: Mula-mula dibuat larutan kitosan 2% dengan cara melarutkan kitosan dalam larutan asam asetat 2% sebanyak 100 ml. Ke dalam 100 ml larutan kitosan 2% ditambahkan PEO dan TCP. Selanjutnya campuran tersebut diaduk dengan magnetic stirrer selama 3 jam dan komposit dicetak pada cetakan plastik dan dikeringkan pada suhu kamar.

Uji pra-klinis/in-vivo Membran Selulosa

Uji Toksisitas Sistemik Membran CM.

Pada penelitian ini digunakan 3 sampel membran selulosa radiasi (0 KGy, 25 KGy, dan 50 KGy). Masing-masing sampel diekstrak dalam larutan NaCl (untuk penyuntikan secara intravena) dan *corn oil* (untuk penyuntikan secara intraperitoneal), sehingga terdapat 8 kelompok mencit yang diuji toksisitas sistemik dari sampel maupun blanko. Masing-masing kelompok uji baik sampel maupun blanko terdiri dari 5 ekor sehingga jumlah hewan uji dalam penelitian ini sebanyak 40 ekor.

Pengamatan dilakukan setelah penyuntikan 4, 24, 48, dan 72 jam. Penilaian yang dilakukan antara lain bila reaktivitas biologik hewan yang lebih besar secara signifikan dibanding hewan yang memperoleh blanko, maka sampel memenuhi persyaratan uji. Bila 2 ekor atau lebih mencit mati, atau bila terlihat perilaku abnormal seperti konvulsi atau prostrasi pada 2 ekor mencit atau lebih, atau bila terjadi penurunan bobot tubuh lebih dari 2 g pada 3 ekor mencit atau lebih, maka sampel tidak memenuhi persyaratan uji. Bila hewan yang diberi sampel ada yang memperlihatkan sedikit tanda-tanda reaktivitas biologik dan tidak lebih dari 1 ekor hewan memperlihatkan gejala reaktivitas biologik yang nyata atau mati, ulangi uji dengan menggunakan kelompok yang terdiri dari 10 ekor mencit. Pada uji ulang, ke 10 ekor hewan yang diberi sampel tidak boleh memperlihatkan reaktivitas biologik yang lebih besar secara signifikan dibanding hewan yang diberi blanko selama periode pengamatan.

Uji Pirogen.

3 ekor kelinci dewasa yang sehat ditempatkan satu ekor dalam satu kandang dalam ruangan dengan suhu yang seragam antara 20 – 23°C dan bebas dari gangguan yang menimbulkan kegelisahan. Sampel yang digunakan berbentuk lembaran berukuran 3 cm x 5 cm, dengan ketebalan <0,5 mm. Langkah-langkah penyiapan sampel untuk Uji Pirogen adalah sebagai berikut:

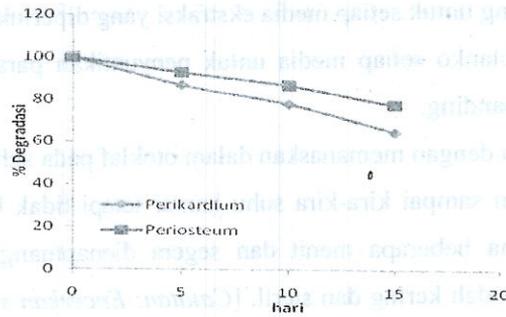
1. Dibuang partikel seperti serat dan partikel bebas dengan cara memasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan lebih kurang 70 ml aquabidest dan dikocok selama lebih kurang 30 detik dan dibuang airnya.
2. Sampel yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam wadah ekstraksi (tabung biakan bertutup ulir) dan ditambahkan 20 ml Polietilenglikol 400 (PEG).

3. Cara tersebut diulang untuk setiap media ekstraksi yang diperlukan untuk uji.
4. Disiapkan 20 ml blanko setiap media untuk penyuntikan paralel dan dengan cara yang sama sebagai pembanding.
5. Ekstraksi dilakukan dengan memanaskan dalam otoklaf pada suhu 121°C selama 60 menit.
6. Ekstrak didinginkan sampai kira-kira suhu kamar tetapi tidak kurang dari 20°C, dikocok dengan kuat selama beberapa menit dan segera dienaptungkan setiap ekstrak secara aseptik ke dalam wadah kering dan steril. [Catatan: Encerkan setiap gram ekstrak sampel yang dibuat dengan polietilen glikol 400, dan blanko, dengan 7,4 volume injeksi natrium klorida untuk memperoleh larutan dengan kadar lebih kurang 120 mg polietilen glikol per ml]. Dalam hal ini, baik sampel maupun blanko masing-masing ditambahkan 168 mL NaCl.

Tidak lebih dari 30 menit sebelum penyuntikan larutan uji, ditentukan suhu awal masing-masing kelinci yang merupakan dasar untuk menentukan kenaikan suhu. Beda suhu tiap kelinci dalam satu kelompok tidak boleh lebih dari 1° dan suhu awal setiap kelinci tidak boleh lebih dari 39,8°C. Ke tiga ekor kelinci disuntik 10 mL larutan uji per kg bobot badan, melalui vena tepi telinga 3 ekor kelinci dan penyuntikan dilakukan dalam waktu 10 menit. Suhu direkam berturut-turut antara jam ke-1 dan jam ke-3 setelah penyuntikan dengan selang waktu 30 menit.

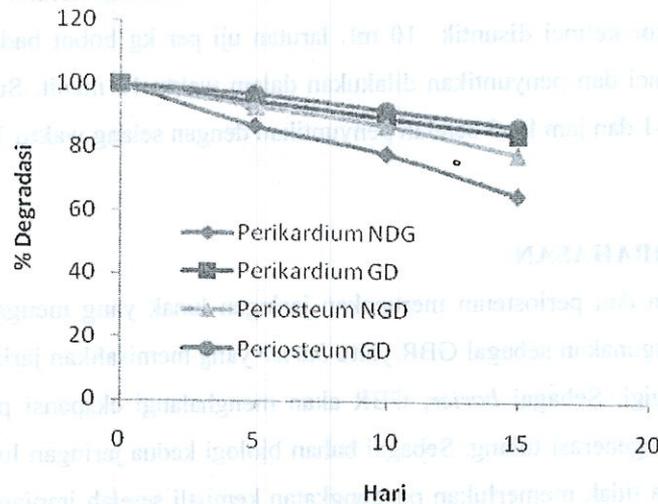
HASIL DAN PEMBAHASAN

Perikardium dan periosteum merupakan jaringan lunak yang mengandung kolagen yang diharapkan dapat digunakan sebagai GBR yaitu *barier* yang memisahkan jaringan konektif dengan gingiva dari akar gigi. Sebagai *barier*, GBR akan menghalangi ekspansi pertumbuhan jaringan lunak pada proses regenerasi tulang. Sebagai bahan biologi kedua jaringan lunak ini dapat diserap oleh tubuh sehingga tidak memerlukan pengangkatan kembali setelah implantasi. Lamanya waktu penyerapan GBR oleh tubuh memegang peranan penting dalam persiapan implan dan regenerasi tulang. Untuk itu perlu diketahui seberapa lama jaringan *barier* ini dapat terdegradasi. Secara *in-vitro*, degradasi kedua jaringan ini dilakukan menggunakan larutan *Simulated Body Fluid* (SBF), dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1. Dari Gambar 1 terlihat bahwa membran perikardium terdegradasi lebih cepat dibandingkan dengan membran periosteum. Dalam waktu 15 hari, membran perikardium terdegradasi sebesar 35% dan membran periosteum sebesar 22%. Walaupun kedua membran tersebut sama-sama mengandung kolagen, namun efek degradasinya berbeda. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan kandungan bahan lain pada masing-masing membran tersebut berbeda karena kedua membran ini didapat dari bagian yang berbeda dari tubuh sapi, dimana membran perikardium merupakan membran pembungkus jantung, sedangkan membran periosteum merupakan lapisan pembungkus tulang.



Gambar 1. Degradasi membran perikardium dan membran periosteum secara in-vitro

Untuk meningkatkan waktu degradasi dari membran, membran direndam dalam larutan glutaraldehida 0,25% selama 24 jam. Hasil degradasinya dapat dilihat seperti tertera pada Gambar 2.

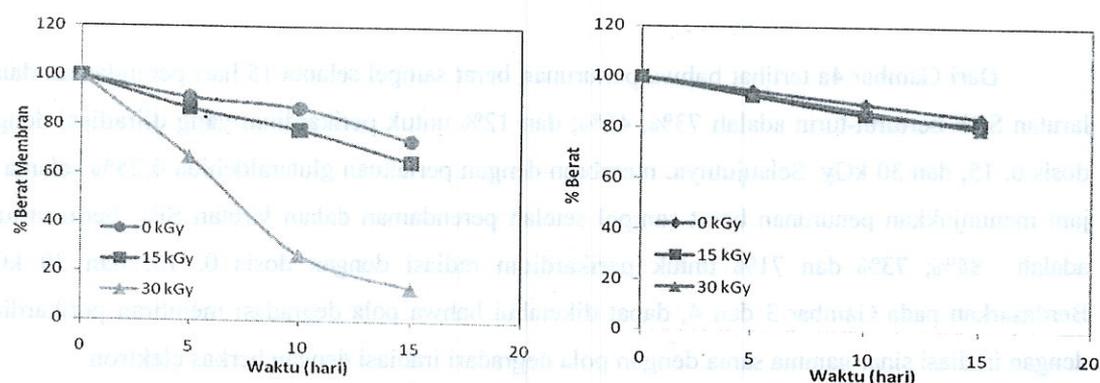


Gambar 2. Efek perlakuan glutaraldehid terhadap % degradasi membran perikardium dan periosteum

Perlakuan glutaraldehida terhadap membran perikardium maupun periosteum menunjukkan penurunan persen degradasi. Gambar 2 menunjukkan bahwa degradasi membran perikardium tanpa glutaraldehida selama 15 hari adalah sebesar 35%, turun menjadi 16% pada membran perikardium dengan perlakuan glutaraldehida. Selanjutnya, membran periosteum terdegradasi sebesar 22% dan turun menjadi 13% untuk periosteum dengan perlakuan glutaraldehida. Penurunan persen degradasi akibat perlakuan glutaraldehida mungkin disebabkan telah terjadinya ikatan silang (*crosslinking*) dalam kedua membran tersebut. Sebagaimana telah dijelaskan terdahulu bahwa baik membran perikardium maupun membran periosteum adalah bahan

biologis yang banyak mengandung senyawa kolagen. Glutaraldehida adalah metode kimia yang paling banyak digunakan dan dipelajari untuk ikatan silang kolagen berbasis pada biomaterial (HARRIGER et.al., 1997).

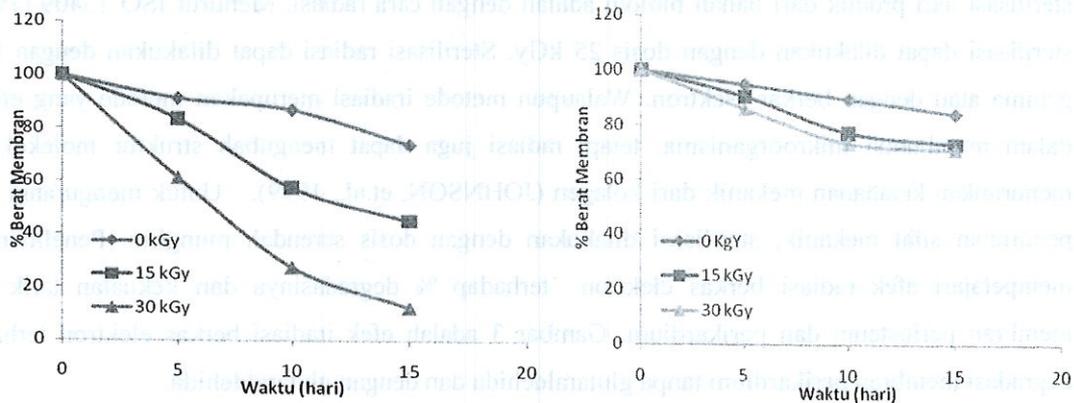
Dalam pemakaiannya sebagai GBR, membran harus dalam keadaan steril. Salah satu cara sterilisasi dari produk dari bahan biologis adalah dengan cara radiasi. Menurut ISO 13409 (1996), sterilisasi dapat dilakukan dengan dosis 25 kGy. Sterilisasi radiasi dapat dilakukan dengan sinar gamma atau dengan berkas elektron. Walaupun metode iradiasi merupakan metode yang efektif dalam membunuh mikroorganisma, tetapi radiasi juga dapat mengubah struktur molekul dan menurunkan ketahanan mekanik dari kolagen (JOHNSON, et.al., 1999). Untuk mengurangi efek penurunan sifat mekanik, sterilisasi dilakukan dengan dosis serendah mungkin. Penelitian ini mempelajari efek radiasi berkas elektron terhadap % degradasinya dan kekuatan tarik dari membran periosteum dan perikardium. Gambar 3 adalah efek iradiasi berkas elektron terhadap degradasi membran perikardium tanpa glutaraldehida dan dengan glutaraldehida.



Gambar 3. Efek iradiasi berkas elektron terhadap degradability membran perikardium
(a) Non Glutaraldehida (b) Dengan Glutaraldehida

Dosis iradiasi sangat mempengaruhi degradasi membran perikardium baik tanpa glutaraldehida maupun dengan glutaraldehida. Seperti terlihat pada Gambar 3a, Dosis iradiasi 15 kGy dan 30 kGy memberikan efek degradasi yang sangat signifikan. Pada 15 hari setelah perendaman dalam SBF, persen membran yang tersisa adalah 73%, 65% dan 13% untuk dosis 0, 15, dan 30 kGy. Berbeda dengan membran perikardium dengan perlakuan glutaraldehida, walaupun iradiasi dapat mendegradasi membran tersebut, tetapi bila dibandingkan dengan membran tanpa glutaraldehida menunjukkan degradasi yang lebih rendah. Selama 15 hari perendaman dalam larutan SBF, persen membran yang tersisa adalah 84%, 81% dan 80% berturut-turut untuk dosis radiasi 0, 15 dan 30 kGy.

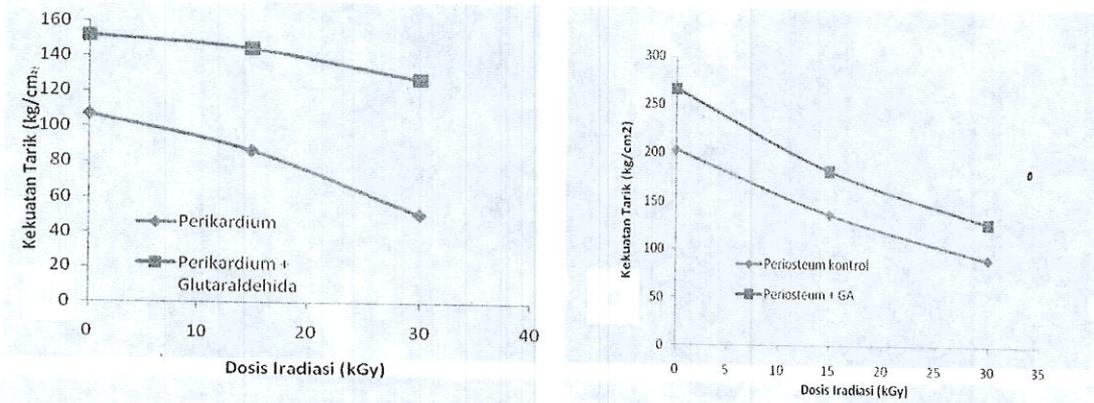
Efek iradiasi sinar gamma pada degradasi membran perikardium terhadap dalam larutan SBF selama 15 hari dapat dilihat pada Gambar 4. Sama seperti iradiasi dengan berkas elektron, degradabilitas dari membran semakin besar dengan dosis yang semakin besar pula.



Gambar 4. Efek iradiasi sinar gamma terhadap degradability membran perikardium (a) Non Glutaraldehida (b) Dengan Glutaraldehida

Dari Gambar 4a terlihat bahwa penurunan berat sampel selama 15 hari perendaman dalam larutan SBF berturut-turut adalah 73%; 45%; dan 12% untuk perikardium yang diiradiasi dengan dosis 0, 15, dan 30 kGy. Selanjutnya, membran dengan perlakuan glutaraldehida 0,25% selama 24 jam menunjukkan penurunan berat sampel setelah perendaman dalam larutan SBF berturut-turut adalah 84%; 73% dan 71% untuk perikardium radiasi dengan dosis 0, 15, dan 30 kGy. Berdasarkan pada Gambar 3 dan 4, dapat diketahui bahwa pola degradasi membran perikardium dengan iradiasi sinar gamma sama dengan pola degradasi iradiasi dengan berkas elektron.

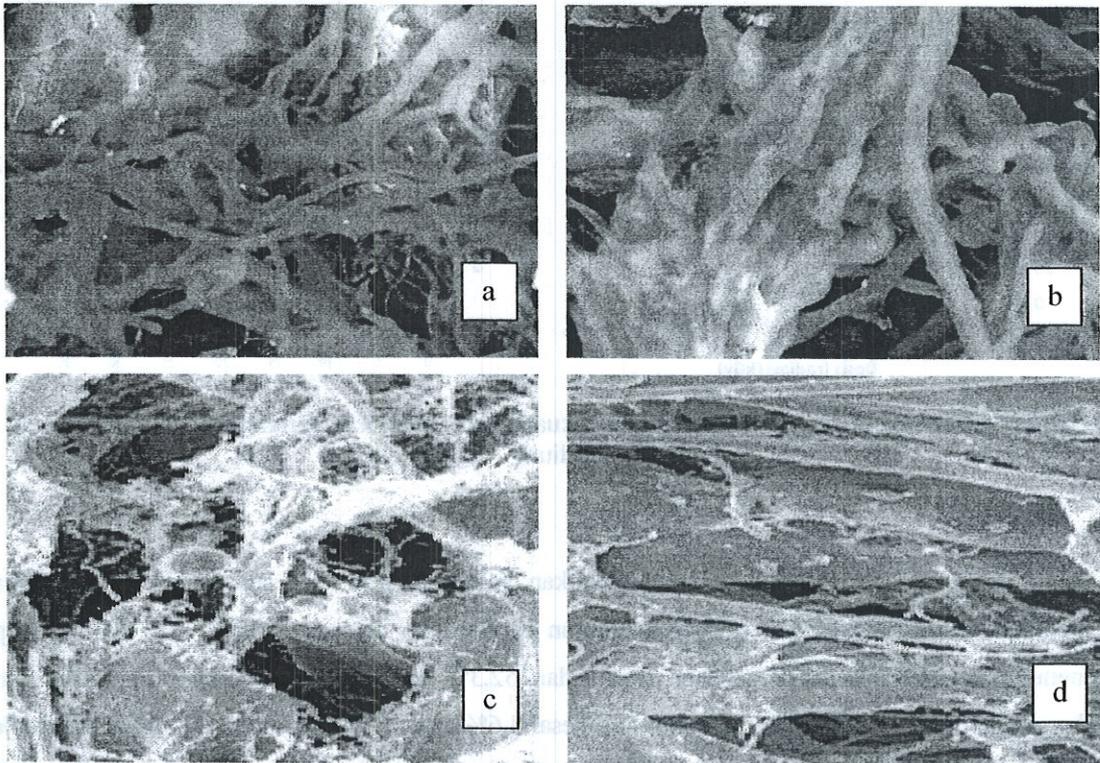
Gambar 5 adalah pengaruh glutaraldehida dan dosis iradiasi terhadap kekuatan tarik membran perikardium. Perlakuan glutaraldehida pada membran perikardium dan periosteum dapat meningkatkan kekuatannya. Kekuatan tarik membran perikardium meningkat sebesar 42 %, yaitu dari 107 kg/cm² menjadi 152 kg/cm², sedangkan membran periosteum meningkat sebesar 31% dari 203 kg/cm² menjadi 266 kg/cm². Pertambahan kekuatan tarik dari membran ini mungkin disebabkan karena terjadinya ikatan silang dari senyawa kolagen yang terkandung dalam membran perikardium dan periosteum (GENDLER and NIMMI, 1984). Ikatan silang dari senyawa kolagen untuk penggunaan biomaterial biasanya dilakukan dalam rangka meningkatkan sifat mekanik dari bahan tersebut (JUS, et.al, 2011).



Gambar 5. Hubungan dosis iradiasi dengan kekuatan tarik membran perikardium dan periosteum
 a. Perikardium b. Periosteum

Bila glutaraldehida dapat meningkatkan kekuatan tarik dari senyawa kolagen, radiasi mempunyai efek sebaliknya. Iradiasi membran perikardium dengan dosis 15 dan 30 kGy dapat menurunkan kekuatan tarik sebesar 18,6% dan 52,3%, sedangkan kekuatan tarik perikardium dengan perlakuan glutaraldehida menurun sebesar 4,6% dan 15,8%. Selanjutnya, efek dosis iradiasi 15 dan 30 kGy terhadap kekuatan tarik membran periosteum berturut-turut turun 32,5% dan 55,7% dan kekuatan tarik membran periosteum dengan perlakuan glutaraldehida berturut-turut 31,6% dan 51,9%. Sebuah studi oleh TRIANTAFYLLOU et. al (1975) melaporkan bahwa iradiasi tulang sapi yang mengandung kolagen dengan dosis 30 kGy terjadi penurunan kekuatan 20% sampai 50%. Penelitian lain melaporkan nilai yang sama untuk sampel tulang korteks manusia (CURREY et.al., 1997 dan HAMER et.al., 1996).

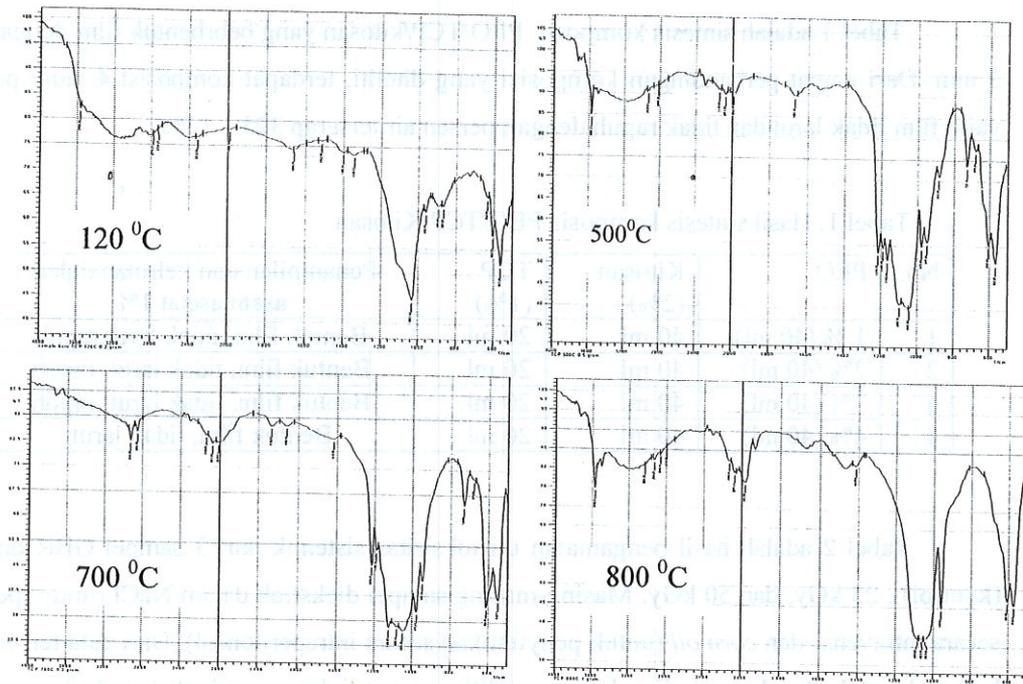
Gambar 6 adalah struktur permukaan dari membran perikardium dan periosteum tanpa glutaraldehida dan dengan glutaraldehida. Gambar tersebut menunjukkan bahwa glutaraldehida mempunyai efek yaitu terjadinya pepadatan dari jaringan pembentuk membran perikardium dan periosteum. Pepadatan ini diduga sebagai bentuk ikatan silang dari jaringan kolagen sebagai akibat dari perlakuan glutaraldehida.



Gambar 6. Struktur permukaan (SEM) membran perikardium dan periosteum

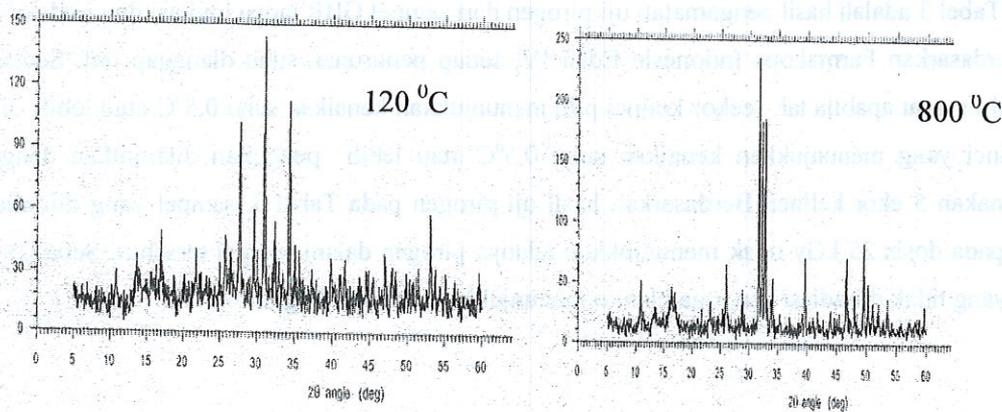
- a. Perikardium, b. Perikardium+Glutaraldehida,
- c. Periosteum, d. Periosteum+Glutaraldehida.

Gambar 7 adalah spektrum FTIR dari hasil sintesis TCP dari reaksi natrium fosfat dan kalsium klorida yang dipanaskan pada suhu 120 °C, 500 °C, 700 °C, dan 800 °C. Dari keempat perlakuan panas dari hasil sintesa TCP terlihat adanya gugus fungsi PO_4^{3-} pada daerah panjang gelombang antara 560-610 cm^{-1} . Selanjutnya gugus fungsi O-H pada daerah panjang gelombang 3000-3750 cm^{-1} terdapat pada sampel yang dipanaskan pada suhu 120 °C, kemudian terlihat menyempit/ menghilang pada suhu 500-800 °C. Menurut DEEPAK, et.al (2005) kalsinasi menyebabkan terjadinya kehilangan gugus fungsi O-H yang ditandai dengan hilang/menyempitnya peak pada daerah gelombang 3000-3750 cm^{-1} . Sebagai akibatnya semakin tinggi terbentuknya TCP.



Gambar 7. Spektrum IR dari pre-sintesis TCP hasil reaksi natrium fosfat dan kalsium klorida yang dipanaskan pada suhu 120 °C, 500 °C, 700 °C, dan 800 °C

Gambar 8 adalah pola difraksi dari TCP hasil sintesis dari natrium fosfat dan kalsium klorida yang dipanaskan pada suhu 120 °C dan 800 °C. TCP yang dipanaskan pada suhu 120 oC menunjukkan matriks yang berbentuk amorf yang ditandai dengan spektrum yang lebar. Namun setelah dikalsinasi pada suhu 800 °C terlihat kenaikan fasa kristalin yaitu terbentuknya peak yang semakin tajam.



Gambar 8. Pola difraksi dari pre-sintesis TCP hasil reaksi natrium fosfat dan kalsium klorida yang dipanaskan pada suhu 120 °C dan 800 °C

Tabel 1 adalah sintesis komposit PEO/TCP/kitosan yang bebrbentuk film dengan ketebaln 2 mm. Dari empat perbandingan komposisi yang diteliti, terdapat komposisi 4 yang paling baik, yaitu film tidak larut dan tidak rapuh dengan persen air terserap $325 \pm 15\%$.

Tabel 1. Hasil sintesis komposisi PEO/TCP/Kitosan

No.	PEO	Kitosan (2%)	TCP (1%)	Penampilan dan kelrutan dalam asam asetat 1%
1	1 % (40 ml)	40 ml	20 ml	Bentuk film, tidak larut,rapuh
2	2% (40 ml)	40 ml	20 ml	Bentuk film, tidak larut, rapuh
3	3% (40 ml)	40 ml	20 ml	Bentuk film, tidak larut, rapuh
4	4% (40 ml)	40 ml	20 ml	Bentuk film, tidak larut

Tabel 2 adalah hasil pengamatan uji toksisitas sistemik dari 3 sampel GBR dosis 0 kGy (kontrol) , 25 kGy, dan 50 kGy. Masing-masing sampel diekstrak dalam NaCl (untuk penyuntikan secara intravena) dan *corn oil* (untuk penyuntikan secara intraperitoneal). Dari data tersebut terlihat bahwa berat badan hewan uji selama penelitian menunjukkan peningkatan, baik yang disuntik dengan larutan blanko, maupun sampel GBR tanpa radiasi, dan radiasi dengan dosis 25 dan 50 kGy. Secara morfologi, sesaat setelah penyuntikan ekstrak (blanko, sampel GBR kontrol, 25 kGy dan 50 kGy) pada hewan uji, baik melalui intravena maupun intraperitoneal, tidak memberi reaksi abnormalitas seperti kejang-kejang, tremor, maupun diare. Di samping itu penyuntikan secara intraperitoneal menggunakan minyak nabati tidak menimbulkan reaksi iritasi di daerah sekitar perut. Selama pengamatan hewan uji tetap aktif dan juga tidak terjadi ptosis yaitu kondisi kelopak mata yang tidak dapat membuka dengan optimal seperti mata normal ketika memandang lurus ke depan (*Drooping eye lid*). Dari data ini dapat dikatakan bahwa bahan GBR ini baik, karena tidak toksik.

Tabel 3 adalah hasil pengamatan uji pirogen dari sampel GBR tanpa iradiasi dan iradiasi 25 kGy. Berdasarkan Farmakope Indonesia Edisi IV, setiap penurunan suhu dianggap nol. Sediaan memenuhi syarat apabila tak seekor kelinci pun menunjukkan kenaikan suhu $0,5^{\circ}\text{C}$ atau lebih. Jika ada kelinci yang menunjukkan kenaikan suhu $0,5^{\circ}\text{C}$ atau lebih pengujian dilanjutkan dengan menggunakan 5 ekor kelinci. Berdasarkan hasil uji pirogen pada Tabel 3, sampel yang diiradiasi dengan pada dosis 25 kGy tidak menunjukkan adanya pirogen dalam sampel tersebut. Sebaliknya sampel yang tidak diiradiasi dan juga blanko menunjukkan adanya pirogen.

Tabel 2. Hasil pengamatan uji toksisitas sistemik pada hewan uji (tikus)

		No	BB	Vol. sampel	Stlh penyntkn	4 j	24 j	48 j	72 j
Blanko	NaCl	1	22,9	1,14	-	-	-	mati	-
		2	23,35	1,16	-	-	-	23,27	25,94
		3	23,26	1,16	-	-	-	22,88	25,13
		4	23,22	1,16	-	-	-	23,76	25,45
		5	21,93	1,09	-	-	-	21,67	25,05
	Corn oil	6	22,20	1,10	-	-	-	23,18	23,68
		7	22,32	1,10	-	-	-	22,77	24,69
		8	21,90	1,09	-	-	-	23,10	26,23
		9	23,35	1,16	-	-	-	24,54	27,73
		10	22,79	1,13	-	-	-	24,81	27,55
0 KGy	NaCl	1	20,52	1,02	-	-	-		21,97
		2	22,65	1,13	-	-	-		22,29
		3	21,65	1,08	-	-	-	22,40	23,60
		4	17,48	0,87	-	-	-	20,84	22,37
		5	20,59	1,02	-	-	-	20,35	22,04
	Corn oil	6	19,93	0,99	-	-	-		19,59
		7	19,77	0,98	-	-	-	23,76	25,10
		8	21,15	1,05	-	-	-	21,66	23,72
		9	21,99	1,09	-	-	-	23,56	25,06
		10	22,19	1,14	-	-	-	23,13	24,42

Tabel 2. Hasil pengamatan uji toksisitas sistemik pada hewan uji (tikus) (lanjutan)

		No	BB	Vol. sampel	Stlh penyntkn	4 j	24 j	48 j	72 j
25 KGy	NaCl	1	22,50	1,12	-	-	24,79	26,53	28,59
		2	23,40	1,17	-	-	24,88	26,95	28,38
		3	19,35	0,97	-	-	22,74	25,38	26,94
		4	22,33	1,11	-	-	24,59	28,26	29,68
		5	22,31	1,11	-	-	24,04	27,66	28,49
	Corn oil	6	22,46	1,12	-	-	23,73	24,63	23,26
		7	22,14	1,10	-	-	24,20	25,68	25,74
		8	22,76	1,14	-	-	25,11	26,06	25,05
		9	22,30	1,11	-	-	21,84	22,42	22,38
		10	19,25	0,96	-	-	25,15	26,59	25,64
50 KGy	NaCl	1	21,67	1,08	-	-	23,33	24,96	24,21
		2	23,40	1,17	-	-	25,45	26,74	25,49
		3	21,71	1,08	-	-	25,44	26,37	25,90
		4	23,30	1,16	-	-	26,17	27,67	26,50
		5	19,39	0,97	-	-	22,58	24,78	24,07
	Corn oil	6	21,87	1,09	-	-	25,12	29,12	31,40
		7	20,70	1,03	-	-	23,66	26,48	27,29
		8	22,32	1,12	-	-	22,89	26,72	26,94
		9	19,50	0,97	-	-	22,84	25,42	27,62
		10	21,50	1,07	-	-	20,06	20,85	22,36

Tabel 3. Hasil uji pirogen sampel GBR iradiasi 25 kGy dan non iradiasi

Sampel/masing-masing untuk 3 ekor kelinci	Suhu sebelum penyuntikan (°C)	Suhu setelah penyuntikan (°C)	Selisih suhu (°C)
Blanko			
1	38,5	39,7	1,2
2	39,1	39,4	0,3
3	38,1	38,9	0,8
GBR 0 KGy			
1	38,3	39,6	1,3
2	39,1	40,3	1,2
3	39,8	40,3	0,5
GBR 25 kGy			
1	38,8	39,7	0
2	39,7	40,1	0,4
3	39,8 °C	40,2 °C	0,4

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa

1. Perlakuan dengan larutan glutaraldehida 0,25% dapat mengurangi degradasi dan meningkatkan kekuatan tarik membran perikardium dan periosteum,
2. Iradiasi dapat meningkatkan degradasi dan mengurangi kekuatan tarik dari membran perikardium dan periosteum
3. TCP dapat disintesis dari kalsium klorida dan natrium fosfat. Semakin tinggi suhu kalsinasi menghasilkan TCP yang semakin tinggi fase kristal.
4. Uji toksisitas sistemik dan pirogen dari membran CM iradiasi bersifat tidak toksik dan tidak mengandung pirogen.

DAFTAR PUSTAKA

1. ABBAS,B.,PARAMITA, P., FEBRIDA, A., SETIAWAN,A., RENALDI, D., ANGGA,K dan ETEN,M, Uji praklinis *Bone Ocular Spherical Impant* Radiasi (BOSIR) pada kelinci.(2007) (unpublished)
2. CURREY JD, FOREMAN J, LAKETIC I, MITCHELL J, PEGG DE, REILLY GC. Effects of Ionizing Radiation on the Mechanical Properties of Human Bone. *J Orthop Res* 1997;15:111-7.

3. DARWIS, D., YESSY, W dan FARAH, N. Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit (HA) sebagai Graf Tulang Sintetik. *J.Aplikasi Isotop dan Radiasi*, Desember 2008; Vol 4 (2): 143-153.
4. DEEPAK, K. P, DIVYA P, SUJAL U, PRASAD, R. C., RAO .,B. T AND RAMA, T. R. Synthesis and Evaluation of Hydroxyapatite Ceramics. *Trends Biomater. Artif. Organs*, January 2005; Vol 18 (2),: 87-92
5. GENDLER, E.S., GENDLER, M.E. AND NIMNI. Toxic Reactions Evoked by Glutaraldehyde Fixed Pericardium and Cardiac Valve Tissue Bioprosthesis. *J. Biomed. Mater. Res.* 18 (1984) 727-736.
6. HAMER AJ, STRACHAN JR, BLACK MM, IBBOTSON CJ, STOCKLEY I, ELSON RA. Biomechanical Properties of Cortical Allograft Bone Using a New Method of Bone Strength Measurement — a Comparison of Fresh, Fresh Frozen and Irradiated. *Bone. J Bone Joint Surg Br* 1996;78B:363–8.
7. HARRIGER, M.D.; SUPP, A.P.; WARDEN, G.D.; BOYCE, S.T. Glutaraldehyde Crosslinking of Collagen Substrates Inhibits Degradation in Skin Substitutes Grafted to Athymic Mice. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 35, 137–145.
8. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO), Sterilization of Health care products – Radiation sterilization – Substantiation of 25 kGy as a Sterilization Dose for Small or Infrequent Production Batches, ISO/TS 13409, First Edition, 2002.
9. JOHNSON, K.A.; ROGERS, G.J.; ROE, S.C.; HOWLETT, C.R.; CLAYTON, M.K.; MILTHORPE, B.K.; SCHINDHELM, K. Nitrous Acid Pretreatment of Tendon Xenografts Cross-linked with Glutaraldehyde and Sterilized with Gamma Irradiation. *Biomaterials* 1999, 20, 1003–1015.
10. JUS, S., STACHEL, I., SCHLOEGL, W., PRETZLER, M., FRIESS, W., MEYER, M., GRUENBERGER, R.B., AND BUEBITZ, G.M. Cross-linking of Collagen with Laccases and Tyrosinases. *Materials Science and Engineering C* 31 (2011) 1068–1077
11. LENNY INDRAWATI. Perbedaan Efektifitas antara Demineralized Freeze Dried Bone Allograft dan Freeze Dried Bone Allograft pada Perawatan Kerusakan Intraboni. Karya Tulis Ilmiah PPDGS-I, Program Studi Dokter Gigi Spesialis I, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gajah Mada, Yogyakarta (2009)
12. NAKAHARA H, GOLDBERG VM, CAPLAN AI. Culture-expanded Periosteal-derived Cells Exhibit Osteochondrogenic Potential in Porous Calcium Phosphate Ceramics In Vivo. *Clin Orthop Relat Res.* 1992; 276:291-298
13. TRIANTAFYLLOU E, SOTIROPOULOS E, TRIANTAFYLLOU I. The Mechanical Properties of the Lyophilized and Irradiated Bone Grafts. *Acta Orthop Belg* 1975;41:35–44.

DISKUSI

ERIZAL

Terkait produk jaringan biologi, yang say athu salah satunya untuk mempercepat penyembuhan luka bakar dan banyak di TV iklan untuk menghilangkan keloid?

Apa produk yang dihasilkan dari kegiatan ini ada terkait ke penyembuhan keloid?

BASRIL

Belum, usulan ini sangat menarik dan perlu dipertimbangkan ke depan.

PEMANFAATAN TEKNIK NUKLIR UNTUK DETEKSI HPV (*HUMAN PAPILLOMA VIRUS*) PENYEBAB KANKER SERVIKS SECARA MOLEKULER DAN PENGEMBANGAN SENYAWA *OCTADECATRIYNOIC ACID* SEBAGAI ANTIKANKER

Maria Lina R, Hendig Winarno, Ermin Katrin H dan Nanny Kartini

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi- BATAN
Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Pasar Jumat, Jakarta Selatan
Telp.021-7690709; Fax: 021-7691607

ABSTRAK

PEMANFAATAN TEKNIK NUKLIR UNTUK DETEKSI HPV (*HUMAN PAPILLOMA VIRUS*) PENYEBAB KANKER SERVIKS SECARA MOLEKULER DAN PENGEMBANGAN SENYAWA *OCTADECATRIYNOIC ACID* SEBAGAI ANTI KANKER. Kanker serviks adalah kanker yang menduduki peringkat kedua tersering ditemukan pada wanita di seluruh dunia. Di Indonesia, kanker serviks menempati peringkat pertama penyebab kematian tertinggi pada wanita. Lebih dari 95% penyebab kanker serviks adalah infeksi HPV tipe onkogenik/*high risk* terutama tipe 16 dan 18. Diagnosis molekuler seperti PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan hibridisasi menggunakan pelacak berlabel merupakan teknik yang sesuai untuk deteksi HPV. Dalam penelitian ini sampel yang digunakan untuk deteksi HPV *high risk* (HPV 16 & HPV 18), adalah 61 *swab* mulut rahim dan 23 sampel biopsi jaringan. Sampel diekstraksi DNA-nya dengan menggunakan QIAamp DNA mini kit dan metode Boom. Proses PCR untuk mengetahui adanya infeksi HPV dilakukan dengan menggunakan primer MY09 dan MY11 merupakan bagian yang *conserved* dari gen L1 HPV, sedangkan sebagai kontrol internal digunakan primer GH20 dan PCO4 untuk deteksi β -globin. Hasil PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis gel agarosa. Genotyping untuk menentukan tipe HPV 16 dan HPV 18 dilaksanakan dengan teknik hibridisasi dot blot menggunakan pelacak DNA berlabel biotin. Hasil PCR direkatkan pada membran selulosa kemudian dihibridisasi dengan pelacak DNA untuk HPV 16 dan 18 berlabel biotin kemudian dideteksi dengan ECL (*Enhance Chemiluminescens*) dengan dipaparkan pada hyperfilm. Hasil proses PCR dan elektroforesis gel agarosa untuk 61 sampel *swab* mulut rahim dan 23 biopsi yang menunjukkan hasil positif, masing-masing adalah 13 dan 4 sampel yaitu dinyatakan dengan adanya fragmen/pita DNA berukuran 450 bp (*base pair*). Berdasarkan hasil genotyping untuk penentuan tipe HPV menggunakan teknik PCR - hibridisasi dot blot dengan pelacak berlabel biotin, tipe HPV yang diperoleh dari 61 sampel *swab* serviks menunjukkan bahwa 11 sampel adalah HPV tipe 16 sedangkan 2 dari 13 sampel *swab* positif PCR menunjukkan hasil genotyping negatif. Demikian juga dari 23 sampel biopsi, 4 sampel positif PCR juga semuanya adalah HPV tipe 16. Penelitian dengan menggunakan teknik PCR dan hibridisasi dot blot dengan pelacak DNA berlabel biotin, dapat diterapkan sebagai tekbnik deteksi untuk HPV *high risk* khususnya HPV 16 dan 18 dari spesimen klinis sehingga sangat bermanfaat untuk deteksi dini kanker serviks. Selain itu juga dilakukan uji biodistribusi senyawa *octadeca-8,10,12 triynoic acid* yang merupakan senyawa berpotensi sebagai agen antikanker serviks secara *in vivo* pada mencit. Senyawa tersebut diperoleh dari isolasi benalu teh *Scurrula atropurpurea*