

LAPORAN TEKNIS 2018

505/AIR 4/OT 02 02/01/2019

PROTOTIP BIOMATERIAL STERIL UNTUK APLIKASI KLINIS

Darmawan Darwis, Basril Abbas, Farah Nurlidar, Dian Pribadi, Erizal, Ermin Katrin H., Hendig W.,
Yessy Warastuti, Fajar Lukitawati, Paramita Pandansari, Tantin R.D., Susanto, Nani Suryani, Tita
Pusptasari,
Dewi Sekar Pengertini, Sri Susilawati



PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
2019

LAPORAN TEKNIS 2018

505/AIR 4/OT 02 02/07/2019

PROTOTIP BIOMATERIAL STERIL UNTUK APLIKASI KLINIS

Darmawan Darwis, Basril Abbas, Farah Nurlidar, Dian Pribadi, Erizal, Ermin Katrin H., Hendig W., Yessy Warastuti, Fajar Lukitawati, Paramita Pandansari, Tantin R.D., Susanto, Nani Suryani, Tita Puspitasari, Dewi Sekar Pengertini, Sri Susilawati

Mengetahui/Menyetujui

Kepala Bidang Proses Radiasi



Dr. Tita Puspitasari, M.Si
NIP. 19691023 199201 2 001

Kepala Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi



Totti Tjiptosumirat
NIP. 19630830 198803 1 002

Pada tahun 2018 Suboutput Prototip Biomaterial Steril untuk Aplikasi Klinis mempunyai beberapa kegiatan penelitian. Laporan teknis masing-masing penelitian akan disajikan dibawah.

1. EVALUASI KLINIS KOMPOSIT SCAFFOLD HA-KITOSAN-KOLAGEN PASCA PENCABUTAN GIGI

¹Basril Abbas, ²Tantin RD, ¹Yessy Warastuti, ¹Fajar Lukitowati,
¹Nani Suryani, ²Paramita Pandansari, ¹Darmawan Darwis

¹Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi, BATAN

²Pusat Teknologi Klimatologi Metrologi Radiasi, BATAN

ABSTRAK

Latar Belakang: Nano hidroksiapatit (nHA) adalah komponen anorganik utama tulang alami, namun nHA sendiri terbatas dalam penggunaannya dalam perbaikan tulang, karena sifatnya yang rapuh. Kitosan (KS) dan kolagen (KOL) digunakan dalam pembuatan komposit *scaffold* ini untuk mengurangi kerapuhan dan mempercepat degradasi. Dalam penelitian ini dipelajari kinerja biologis yang diperoleh pasca operasi dengan meneliti hasil klinis dengan mengetahui kesembuhan dan kepadatan tulang.

Metode: Komposit nano-hidroksiapatit / kitosan / kolagen (n-HA / KS / KOL) disiapkan melalui pembedaan gel kitosan-kolagen dan kemudian kedalam gel tersebut dicampurkan nHA. pencampuran. Selanjutnya, dilakukan pencetakan dan dikeringkan melalui metode liofilisasi. Sampel komposit ini, kemudian disterilkan dengan iradiasi sinar gamma dengan dosis 15 kGy. Bahan ini kemudian digunakan sebagai pengisi defek tulang rahang pasca pencabutan gigi dengan prosedur *Guided Bone Regeneration*.

Hasil: Foto-foto klinis menunjukkan bahwa defek tulang yang diimplan dengan komposit nHA/KS/KOL memberikan kesembuhan yang baik dan lebih cepat serta menunjukkan gusi yang normal. Dari gambaran X-ray, terlihat bahwa defek tulang yang diberi komposit scaffold nHA/KS/KOL lebih opak dibandingkan dengan tulang aslinya dan semakin padat sampai bulan ke-6.

Kesimpulan: Komposit scaffold n-HA/KS/KOL baik untuk pengisi defek tulang khususnya untuk defek tulang rahang

Kata kunci: biomaterial, kinerja biologis, nano-hidroksiapatit, kitosan, kolagen

PENDAHULUAN

Kerusakan tulang dapat disebabkan oleh beberapa kondisi seperti trauma, tumor, kista, dan penyakit tulang seperti osteotitis dan osteomilitis. Untuk mengembalikan struktur dan fungsi tulang kepada bentuk normal, banyak solusi telah digunakan dalam pemilihan bahan biomaterial berupa *bone substitute* seperti autograf, allograf, xenograf, dan biomaterial lainnya. Yang terbaru, biomaterial yang digunakan adalah berbentuk perancah berpori tiga dimensi tempat berkembangnya dan berdiferensiasi sel hidup (Qasim, 2018).

Hydroxyapatite (HA), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, adalah komponen anorganik utama tulang yang telah banyak digunakan untuk aplikasi implan biomedis dan regenerasi tulang. HA telah menunjukkan biokompatibilitas tinggi, osteokonduktivitas, tidak toksik dan kemampuan mengikat tulang (Kolmas, et.al; 2015). Karena tulang alami adalah komposit yang terutama terdiri dari kolagen dan HA, banyak upaya telah dilakukan untuk memodifikasi HA dengan polimer, seperti kolagen, gelatin, kitosan, kitin, dan asam polylactic acid (PLA), untuk memperbaiki tulang. Di antara polimer tersebut, biopolimer telah banyak menerima perhatian di bidang aplikasi medis, karena biokompatibilitas dan biodegradabilitas yang sangat baik. Keberhasilan klinis perancah untuk regenerasi tulang dapat dikaitkan dengan kombinasi biomaterial organik dan anorganik. Karena fakta ini, bidang regenerasi jaringan tulang telah membuat kemajuan dalam penelitian untuk biomaterial hibrida (Zugravu *et al.*, 2012).

Kitin adalah polisakarida alami kedua yang melimpah setelah selulosa. Kitosan (KS) adalah turunan kitin yang diekstraksi dari sumber alami, seperti cangkang krustasea, exoskeleton serangga, dan jamur, yang diperoleh dengan deasetilasi kitin. Kitosan adalah bahan yang menjanjikan untuk aplikasi medis karena sifat antibakteri, toksisitas rendah, biodegradabilitas, biokompatibilitas dengan jaringan manusia, dan kemampuan untuk memfasilitasi proses regeneratif dalam penyembuhan luka. Kemampuan kitosan untuk mendukung perlekatan dan proliferasi sel dikaitkan dengan sifat kimianya. Kitosan secara struktural mirip dengan glikosaminoglikan, komponen utama dari matriks tulang ekstraseluler. Keuntungan lain dari perancah kitosan untuk rekayasa jaringan tulang termasuk pembentukan perancah yang sangat berpori dengan pori-pori yang saling berhubungan, osteokonduktivitas, dan kemampuan untuk

meningkatkan pembentukan tulang baik secara *in vitro* dan *in vivo* (Escobar-sierra, Martins and Ossa-, 2015).

Kolagen, yang merupakan protein paling banyak pada mamalia, membentuk 25% hingga 35% dari protein seluruh tubuh, merupakan kandungan utama tulang rawan hewan dan jaringan ikat. Ini banyak digunakan sebagai perancah selama regenerasi tulang karena sifat adhesi sel, proliferasi dan diferensiasi yang luar biasa. Kolagen telah dilaporkan mempromosikan proliferasi sel MC3T3-E117, dan meningkatkan diferensiasi sel induk ke dalam osteoblas. Namun, sulit untuk digunakan sendiri sebagai biomaterial karena sifat mekaniknya yang rendah dan degradasi mudah selama rekayasa jaringan tulang (Wang *et al.*, 2016).

Komposit yang terdiri dari kalsium fosfat dan biopolimer alami sebagai kitosan banyak digunakan sebagai biomaterial untuk rekayasa jaringan tulang. Oleh karena itu, biomaterial komposit HA dan kitosan diharapkan untuk menunjukkan peningkatan osteokonduktivitas dan biodegradasi bersama dengan kekuatan mekanik yang memadai untuk penggunaan ortopedi. Dalam beberapa tahun terakhir, minat terhadap biomaterial seperti hidroksiapatit dan kitosan telah meningkat secara signifikan, dibuktikan dengan pertumbuhan yang signifikan dalam jumlah artikel ilmiah yang melaporkan karakterisasi dan evaluasi mereka (Bachtiar *et al.*, 2017).

Komposit HA / kolagen ketika ditanamkan dalam tubuh manusia menunjukkan sifat osteokonduktif lebih baik dibandingkan dengan hanya hidroksiapatit apatit saja. Kombinasi kitosan, hidroksiapatit, dan kolagen sebagai perancah berpotensi untuk terjadimengoptimalkan setiap sifat unggul dari bahan. Komposit seperti tulang pada awalnya dibuat berdasarkan inigagasan. Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa perancah komposit meningkatkan proliferasi osteoblaskarena kombinasi sifat dari hidroksiapatit, kolagen, dan kitosan (Chen *et al.*, 2012).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk aplikasi komposit HA/KS/KOL pada defek tulang rahang pasca pencabutan gigi dan mengetahui efeknya terhadap kesembuhan dan kepadatan tulang.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah scaffold HA-Kitosan-Kolagen steril radiasi dan membran pericardium steril radiasi produksi Bank Jaringan Riset Batan. Selain bahan uji digunakan bahan lain untuk keperluan operasi seperti yang tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Alat dan bahan yang digunakan untuk operasi pencabutan gigi

▪ Dental unit set	▪ Masker	▪ Celemek
▪ Instrumen set	▪ Tissue alas	▪ Jarum jahit jaringan
▪ Tang Ekstraksi set	▪ Handuk	▪ Cat gut dan silk
▪ Scaller Machine	▪ Tissue mulut	▪ Obat cairan anaestesi dalam siringe 2,5 cc
▪ Alat kuret set	▪ Pelumas hand piece	▪ Gel anaestesi
▪ Burr tulang	▪ Plastik limbah	▪ Gel Gingiva
▪ cytoject	▪ Metronidazol gel	▪ Obat kumur untuk pembekuan darah
▪ Blade	▪ H ₂ O ₂ 3%	▪ Obat Antibiotik
▪ Kapas steril	▪ Povidon Iodine	▪ Obat Analgesik
▪ Kassa steril	▪ Aquabidest	▪ Obat Anti inflamasi
▪ Cotton buds	▪ Alkohol 70%	▪ Obat kumur antiseptic
▪ Gloves	▪ Medipack	

Cara Kerja Pemilihan pasien

Pasien dalam penelitian ini adalah pasien yang akan ada indikasi pencabutan gigi, yang sebelumnya telah dilakukan pemeriksaan klinik dan dental x-ray. Setiap pasien menandatangani *informed consent*. Pasien dibagi kedalam dua kelompok, masing-masing sebanyak 20 orang. Kelompok I adalah kelompok dengan soket post ekstraksi diberi komposit scaffold HA-kitosan-kolagen dan membran pericardium, dan kelompok II adalah kontrol negatif dimana soket hanya diberi membran saja.

Ekstraksi gigi

Dokter mengidentifikasi gigi yang akan diekstraksi, dilakukan tindakan antiseptik yaitu dengan mengolesi area ekstraksi dengan gel topical menggunakan cotton bud, kemudian

dilakukan anestesi lokal, infiltrasi atau block. Setelah pasien merasa kebal dilakukan pencabutan gigi.

Preparasi soket

Soket dibersihkan dari jaringan yang tidak diinginkan, dilakukan curettage dan perlekatan gingiva dilepaskan, kemudian dilakukan irigasi dengan cairan antiseptik. Area pencabutan ditekan dengan tampon yang sudah diberi gel untuk menghentikan perdarahan. Soket dikeringkan, saliva pada area soket dikontrol dengan menggunakan penghisap saliva.

Aplikasi komposit scaffold HA-Kolagen-Kitosan steril radiasi

Sampel komposit scaffold HA-Kitosan-Kolagen direndam dalam larutan salin selama 3 menit, lalu ditiriskan menggunakan kassa steril. Scaffold selanjutnya digulung menggunakan instrument pinset sesuai dengan besarnya soket yang akan diisi, lalu kelebihan scaffold digunting. Sampel dimasukkan ke dalam soket, lalu ditutup dengan membran pericardium. Untuk kontrol negative hanya menggunakan membran pericardium saja. Soket di hacting (jahit).

Pasien diberikan obat kumur antiseptik, analgetik dan antibiotik yang sesuai selama 3 hari dan pasien tidak diperkenankan untuk menggunakan bagian gigi yang berdekatan dengan area ekstraksi untuk mengunyah makanan agar proses penyembuhan tidak terganggu.

Parameter pengamatan :

1. **Evaluasi klinis** : dilakukan pengamatan pada bulan ke 1, 3 dan 6 pasca perlakuan, dengan melihat kesembuhan dari luka dan ketebalan dari gingival secara morfologis.
2. **Evaluasi radiologik**

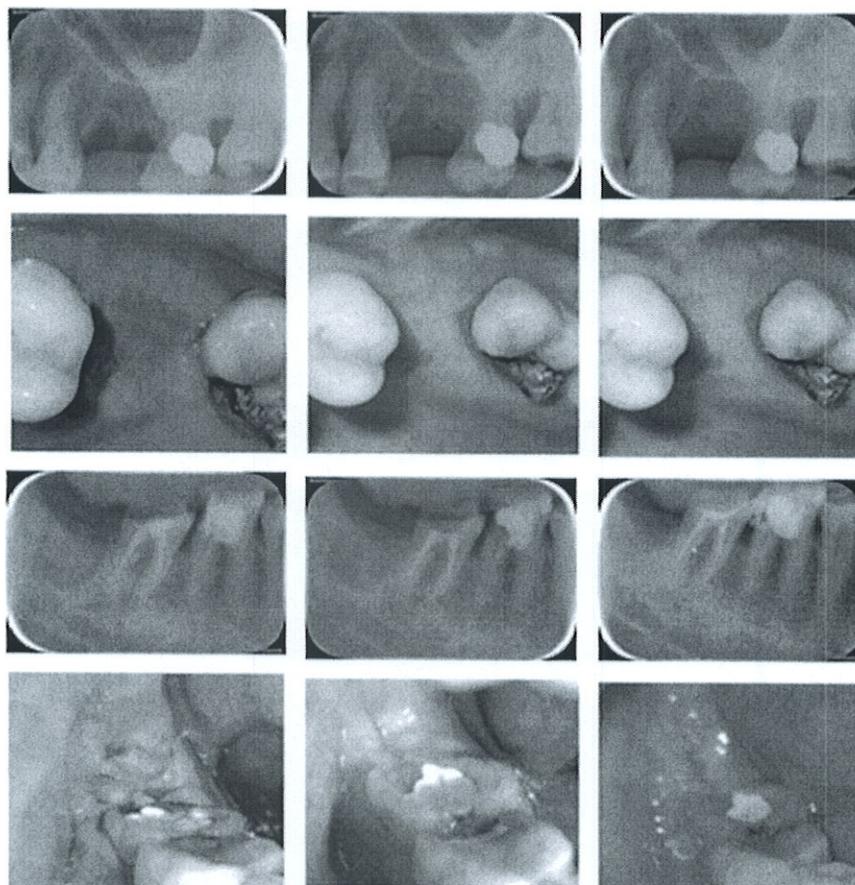
Dilakukan digital dental x-ray pada keesokan harinya, bulan 1, 3 dan 6 untuk menilai densitas tulang pada area defek.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Gambar 1 adalah foto klinis dan X-ray dari soket tanpa dan dengan pemberian komposit scaffold HA/Kitosan/Kolagen. Sampai bulan pertama terlihat bahwa jaringan alveolar dari pemakaian komposit scaffold HA-Kitosan-Kolagen dan kontrol sudah mulai menunjukkan kesembuhan, sedangkan pada bulan ketiga jaringan alveolar pada bekas cabut gigi sudah terlihat normal. Dilihat dari kepadatannya, alveolar pada soket gigi yang ditambah dengan komposit scaffold HA-Kitosan-Kolagen lebih besar dibandingkan dengan kontrol. Hal ini mungkin

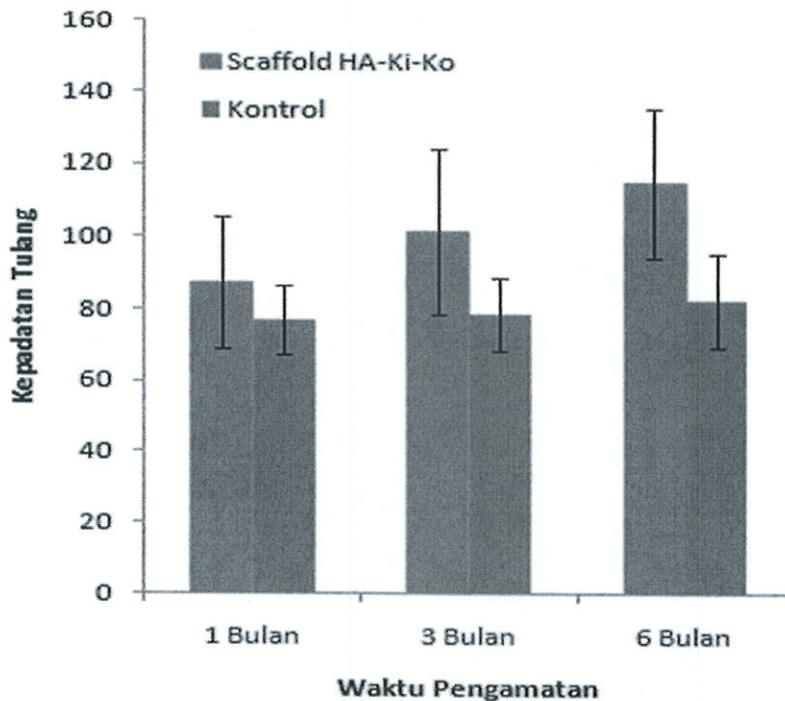
disebabkan karena terjadinya pertumbuhan tulang pada soket yang ditambah dengan komposit scaffold HA-Kitosan-Kolagen lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol seperti yang terlihat pada gambaran X-ray pada bulan keenam pasca operasi (Gambar 1).



Gambar 1. Foto X-ray dan klinis dari defek tulang yang tanpa (lajur 1 dan 2) dan yang diberi komposit *scaffold* HA-Kitosan-Kolagen (lajur 3 dan 4)

Dari foto X-ray terlihat bahwa tidak terdapat peningkatan ketebalan tulang rahang pada defek tulang rahang pasca pencabutan 1 bulan hingga 6 bulan pada perlakuan kontrol. Sedangkan, pada defek tulang rahang yang diberi komposit scaffold HA-Kitosan-Kolagen menunjukkan keopakannya meningkat sampai bulan keenam.

Gambar 2 adalah kepadatan tulang pada defek tulang yang diberi komposit scaffold HA-Kitosan-Kolagen dan kontrol. Baik yang diberi komposit maupun yang tanpa komposit menunjukkan peningkatan kepadatan tulang, Namun, defek yang tidak diberi komposit HA-Kitosan-Kolagen menunjukkan peningkatan yang rendah dibandingkan dengan yang diberi komposit scaffold HA-Kitosan-Kolagen. Setelah pengamatan penulangan bulan yang ke-6, defek yang diberi komposit meningkat signifikan bila dibandingkan dengan kontrol.



Gambar 2. Kepadatan tulang yang diberi scaffold dan kontrol

Pembahasan

Kesembuhan pada bagian tulang yang bekas cabut gigi atau bedah minor dapat dibagi ke dalam 4 periode. Pertama adalah periode gumpalan darah sampai pada hari ke 7 setelah pembedahan, dimana defek terisi dengan gumpalan darah. Fibrin dan neutrofil sangat banyak terdapat pada periode ini. Periode ini dilanjutkan oleh periode jaringan granulasi, selama proliferasi jaringan granulasi. Setelah 1-3 pekan, mulailah periode kalus dimana matriks tulang dikalsifikasi. Periode penyembuhan dicapai kira-kira setelah 3 bulan dengan pematangan tulang. Dengan demikian, diperlukan periode yang panjang untuk perbaikan alami dari defek tulang (Asami *et al.*, 2008).

Bahan perancah yang digunakan dalam penelitian ini adalah berasal dari polimer alami kitosan dan kolagen serta bahan anorganik berupa HA yang berasal dari tulang sapi. Kolagen dan kitosan membentuk suatu ikatan amida sedangkan kelompok hidroksil dari fase anorganik dan fosfat dari HA membentuk ikatan hydrogen. Selanjutnya, asam asetat yang mengandung karboksil yang dikombinasi dengan HA Ca^{2+} membentuk suatu kompleks. Kombinasi kitosan dan kolagen dapat menurunkan tingkat kristalisasi dari HA, sehingga mirip dengan tulang alami dan menghasilkan bioaktifitas yang baik (Verisqa, et.al; 2017). Kolagen dan kitosan yang berupa

matriks ekstraselular mudah untuk didegradasi, menyediakan pori-pori pada komposit, yang memberi keuntungan untuk transfer nutrient dan eliminasi metabolit (Liao *et al.*, 2018).

Kolagen dari bahan penelitian ini berasal dari tendon sapi, yang merupakan kolagen type-1. Kolagen type-1 merupakan bahan yang cocok untuk implan karena hanya sedikit sekali orang yang memiliki kekebalan hemoral terhadapnya dan tes serologis sederhana dapat memverifikasi jika pasien rentan terhadap reaksi alergi dari biomaterial berbasis kolagen. Kolagen juga dapat digunakan dalam aplikasi biomedis sebagai ECM yang dideselerisasi sebagai material scaffold untuk regenerasi jaringan. Sifat kolagen lainnya yang menyebabkan material ini baik digunakan sebagai *scaffold* adalah biodegradasi. Sifat biodegradasi biomaterial berbasis kolagen untuk aplikasi di bidang rekayasa jaringan berpotensi menyebabkan pemulihan struktur jaringan dan fungsionalitas. Tambahan pula, degradasi produk kolagen type I dan III juga telah terbukti menginduksi daya tarik kemoatksis dari fibroblast manusia (Parenteau-bareil, Gauvin and Berthod, 2010).

Kitosan sangat menarik sebagai bahan perancah tulang karena mendukung perlekatan dan proliferasi sel osteoblas serta pembentukan matriks tulang mineral. Perelengketan dan proliferasi sel osteoblas tersebut disebabkan sifat hidrofilisitas dari kitosan. Hal ini jelas terlihat pada penelitian in-vitro dari sel osteogenik yang dikultur pada *scaffold* kitosan menjadi terminelarisasi membentuk penulangan (Mathews *et al.*, 2011). Kitosan juga telah terbukti khasiatnya sebagai .

Matriks ekstraseluler berbasis perancah ini mempunyai kemiripan dengan jaringan tulang asli, yaitu menunjukkan sifat osteoinduktif. Kelompok perancah alami, juga dapat di digunakan sel untuk meregenerasi jaringan tulang baru atau di seeding untuk supporting matriks atau dapat langsung digunakan untuk jaringan tulang (Iu and Eter, 2004).

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapatsimpulkan bahwa komposit scaffold HA-Kitosan-Kolagen steril radiasi dapat digunakan sebagai pengganti tulang yang dapat meningkatkan penulangan pada kasus defek tulang pasca pencabutan gigi. Kesembuhan jaringan gusi dapat sembuh setelah satu bulan pasca operasi dan kepadatan tulang secara normal terjadi setelah 6 bulan pasca operasi.

Saran

Penelitian klinis lebih lanjut dapat dilakukan dengan sampel yang lebih banyak di beberapa rumah sakit atau klinik spesialis agar scaffold ini dapat dijadikan salah satu bahan pengganti tulang masa depan.

DAFTAR PUSTAKA

- Asami, A., Nakamura, M., Takeuchi, M., Nakayama, A. and Nakamura, H. (2008) 'Original Effects of Heat Treatment of Hydroxyapatite on Osteoblast Differentiation', *Journal of Hard Tissue Biology*, 17(2), pp. 37–46.
- Bachtiar, E. W., Suniarti, D. F., Fadhillah, N. D., Ulfiana, R. and Abbas, B. (2017) 'Potency of Injectable Hydroxyapatite Chitosan Scaffold for Bone Regeneration', *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(12), pp. 2015–2017. doi: 10.7860/JCDR/2017/29544.11003.
- Chen, Y., Huang, Z., Li, X., Li, S., Zhou, Z., Zhang, Y., Feng, Q. and Yu, B. (2012) 'In Vitro Biocompatibility and Osteoblast Differentiation of an Injectable Chitosan / Nano-Hydroxyapatite / Collagen Scaffold', *Journal of Nanomaterials*, 2012, pp. 1–7. doi: 10.1155/2012/401084.
- Escobar-sierra, D. M., Martins, J. and Ossa-, C. P. (2015) 'Chitosan / hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering manufacturing method effect comparison Comparación del efecto del método de fabricación en plataformas de quitosano / hidroxiapatita para ingeniería de tejidos', *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, June, pp. 24–35. doi: 10.17533/udea.redin.n75a04.
- Iu, X. I. L. and Eter, P. X. M. A. (2004) 'Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering', *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3), pp. 477–486.
- Liao, J., Li, Y., Li, H., Liu, J., Xie, Y., Wang, J. and Zhang, Y. (2018) 'Preparation, bioactivity and mechanism of nano-hydroxyapatite/sodium alginate/chitosan bone repair material', *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 16(1), pp. 28–35. doi: 10.5301/jabfm.5000372.
- Mathews, S., Gupta, P. K., Bhonde, R. and Totey, S. (2011) 'Chitosan enhances mineralization during osteoblast differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells , by upregulating the associated genes', *Cell Proliferation*, 44(9), pp. 537–549. doi: 10.1111/j.1365-2184.2011.00788.x.
- Parenteau-bareil, R., Gauvin, R. and Berthod, F. (2010) 'Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications', *Materials*, 3, pp. 1863–1887. doi: 10.3390/ma3031863.
- Periayah, M. H. (2014) 'Chitosan-derivatives as hemostatic agents: their role in tissue regeneration', *Journal of TESMA*, 1(1), pp. 39–46.
- Qasim, M. (2018) 'Effect of Scaffolds with Bone Growth Factors on New Bone Formation', in *Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine (2nd Edition)*, pp. 1114–1170. doi: 10.1201/9781315364698-38.

- Wang, X., Wang, G., Liu, L. and Zhang, D. (2016) 'The mechanism of a chitosan- collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, (December), pp. 1–8. doi: 10.1038/srep39322.
- Zugravu, M. V, Smith, R. A., Reves, B. T., Jennings, J. A., Cooper, J. O., Haggard, W. O. and Bumgardner, J. D. (2012) 'Physical properties and in vitro evaluation of collagen – chitosan – calcium phosphate microparticle-based scaffolds for bone tissue regeneration', *Journal of Biomaterials applications*, 28(4), pp. 566–579. doi: 10.1177/ 0885328212465662.

2. DAYA ANTI KANKER SERVIK DAN PARU KITOSAN IRADIASI SECARA INVITRO

Darmawan Darwis, Basril Abbas, Ermin K. H., Susanto, Tita Puspitasari, Dewi Sekar Pangerteni, Sri Susilawati, Fajar Lukitowati, Yessy Warastuti, Farah Nurlidar, Dian Pribadi Perkasa

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk mempelajari daya anti kanker kitosan iradiasi (kitosan dengan berbagai berat molekul) secara invitro menggunakan sel hella untuk kanker serviks dan sel A-59 untuk kanker paru. Aktifitas anti kanker kitosan ditentukan dari efek sitotoksiknya terhadap sel kanker secara invitro. Kitosan diiradiasi dengan dosis 25, 50, 75, 100 dan 150 kGy untuk mendapatkan berat molekul yang berbeda. Berat molekul kitosan ditentukan dengan alat *Gel Permeation Chromatography* (GPC) menggunakan pullulan sebagai standar. Daya anti kanker kitosan ditentukan dengan menghitung nilai IC_{50} . Hasil yang diperoleh bahwa iradiasi gamma sangat efektif untuk menurunkan berat molekul kitosan dan meningkatkan dispersitas (*dispersity*) berat molekul kitosan tanpa iradiasi (M_w) adalah 338194. Iradiasi dengan dosis 25, 50, 75, 100 dan 150 kGy menurunkan berat molekul kitosan menjadi berturut-turut adalah 245728, 99002, 68797, dan 39988. Polidispersitas bertambah dengan bertambahnya dosis iradiasi. Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa kitosan tanpa iradiasi maupun yang diiradiasi dengan dosis 25, 50, 75, 100 dan 150 kGy mempunyai daya anti kanker terhadap sel Hella untuk kanker serviks dan sel A-549 untuk kanker paru. Daya anti kanker kitosan iradiasi 75 kGy lebih besar dibandingkan dengan kitosan tanpa iradiasi terhadap sel Hella dan sel A-549

Kata kunci: kitosan, iradiasi gamma, IC_{50} , berat molekul

PENDAHULUAN

Kitin merupakan biopolimer polisakarida terbanyak kedua setelah selulosa [1]. Kitin dapat diperoleh dari berbagai organisme selain hewan vertebrata dan tanaman tingkat tinggi. Jaringan hewan yang kaya kitin terdapat pada insek, crustacea dan arachnid. Berbagai mikroba termasuk jamur juga menghasilkan kitin pada membran, spora dan dinding selnya [1,2]. Kitosan merupakan turunan dari kitin yang memiliki sifat fisiko-kimia (memiliki gugus OH dan NH₂ yang aktif) dan biologi (biokompatibel dan biodegradabel) yang baik sehingga banyak diaplikasikan pada berbagai bidang [3, 4]. Beberapa aplikasi Kitosan dibidang farmasi dan kedokteran antara lain anti-inflamasi, antibakteri, antijamur, dan antitumor.

Kitosan mempunyai berat molekul yang tinggi sehingga sukar larut dalam berbagai pelarut yang membatasi potensi aplikasinya. Kitosan hanya larut pada larutan asam organik encer seperti asam asetat, asam sitrat dan asam organik. Beberapa cara dapat dilakukan untuk menurunkan berat molekul kitosan yaitu dengan menggunakan enzim chitinase, asam mineral atau dengan teknologi radiasi. Kitosan dengan berat molekul rendah akan mudah larut dan meningkatkan fungsionalitas serta efektifitas penggunaannya.

Sejak 2 dekade lalu, penelitian untuk menghasilkan kitosan dengan berat molekul rendah menggunakan radiasi gamma telah dilakukan oleh PAIR BATAN. Penelitian kitosan untuk aplikasi dibidang pertanian dan peternakan juga telah dilakukan. Penelitian kitosan sebagai biomaterial untuk penanganan penyakit seperti kanker telah dilakukan oleh beberapa peneliti [5], namun penelitian kitosan iradiasi yang mempunyai berat molekul rendah sebagai anti kanker belum banyak dilakukan.

Penyakit kanker merupakan salah satu penyebab kematian utama di seluruh dunia. Pada tahun 2012, sekitar 8,2 juta kematian disebabkan oleh kanker. Kanker paru, hati, perut, kolorektal, dan kanker payudara adalah penyebab terbesar kematian akibat kanker setiap tahunnya. Penyakit kanker serviks dan payudara merupakan penyakit kanker dengan prevalensi tertinggi di Indonesia pada tahun 2013, yaitu kanker serviks sebesar 0,8‰ dan kanker payudara sebesar 0,5‰ diikuti dengan penyakit kanker prostat sebesar 0,2‰ atau diperkirakan sebanyak 25.012 penderita. Data dari RS kanker Dharmais selama tahun 2010 sampai tahun 2013 menyebutkan bahwa penyakit kanker terbesar berturut-turut adalah kanker payudara, serviks, paru, ovarium, rektum, tiroid,

usus besar, hepatoma, dan nasofaring [6]

Dari beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa kitosan memiliki sifat anti kanker baik secara vitro dan in vivo. Kitosan mempunyai sifat apoptosis yang bisa menghambat dan mematikan sel kanker, selain itu kitosan memiliki sifat dapat membantu penyerapan obat dan menstabilkan konstituen obat sehingga akan mempercepat dalam proses penyembuhan kanker[7]. Penelitian lain menyebutkan bahwa nano partikel dari kitosan sudah terbukti bisa meningkatkan aktivitas anti kanker dari beberapa sel kanker line dan membantu penyerapan dari obat kanker yang di ujikan pada tikus jantan[8,9]. Kemampuan anti kanker kitosan dipengaruhi oleh berat molekul dan derajat deasetilasi. Pada penelitian ini akan dipaparkan daya antikanker (sitotoksik) kitosan dengan berat molekul berbeda yang dihasilkan melalui iradiasi gamma terhadap sel Hella dan sel A-549.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian yang digunakan adalah sel hella untuk kanker serviks dan sel A-549 untuk kanker paru diperoleh dari lab patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor (IPB). Kitosan dengan berbagai berat molekul dioeroleh dari Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi (PAIR) BATAN. Media Dulbecco's Modified Eagle *Medium*, DMEM (Sigma Aldrich) digunakan sebagai media tumbuh sel kanker. Bahan kimia lainnya yaitu asam asetat, natrium asetat, natrium hidroksida, asam klorida, Fetal bovine serum, FBS (Sigma Aldrich), fungizone, gentamisin sulfat dan doxorubisin sebagai kontrol positif dan air suling

Pembuatan larutan kitosan iradiasi dan media pertumbuhan sel kanker

Kitosan diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 0, (tanpa iradiasi), 25, 50, 100 dan 150 kGy. Kitosan iradiasi dilarutkan dalam buffer asetat (natrium asetat/asam asetat) pH 7,0 hingga diperoleh larutan kitosan 8000 ppm. Larutan kitosan diencerkan dengan buffer hingga diperoleh konsentrasi 5, 10, 20, 40, dan 80 ppm. Kitosan ditentukan berat molekulnya menggunakan alat Gel Permeation Chromatography (GPC) menggunakan pupullan sebagai standar.

Media pertumbuhan sel dibuat dengan cara DMEM Sebanyak 10,4 gram dilarutkan dalam 1 liter air suling, lalu 2,2 gram NaHCO_3 ditambahkan ke dalam media dan diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer sampai larut sempurna. pH larutan di atur hingga pH 7 menggunakan NaOH dan HCl 1 N. Media DMEM yang diperoleh disaring

menggunakan filter dengan ukuran 0,2 mikro untuk mensterilkan media, kemudian dipindahkan kedalam botol steril ukuran 250 mL dan simpan pada kulkas suhu 4°C

Penentuan berat molekul kitosan

Berat molekul kitosan ditentukan dengan alat Gel Permeation Chromatography (GPC) menggunakan kolom Shodex column GS-520 HQ and GS-220 HQ 7.6 x 300 mm, temperature kolom 40°C, Flow Rate 0.6 mL/menit, fase mobil 50 mM acetic acid and 0.3 M sodium nitrate dan detector RID. Sebanyak 100 uL sampel kitosan diinjeksikan ke dalam sampel holder. Sebagai standar digunakan 9 macam pullulan yang mempunyai berat molekul berbeda yaitu 1,3 kDa sd 800 kDa

Uji Antikanker (Sitotoksis) kitosan iradiasi Terhadap Sel Hella dan Sel A-549

Uji anti kanker kitosan iradiasi dilakukan terhadap sel Hella untuk kanker serviks dan sel A-549 untuk kanker paru. Pengujian untuk masing2 sel dilakukan dengan metode yang sama.

Kitosan 0 kGy (tanpa iradiasi) dengan berbagai konsentrasi yaitu 5,10,20,40 dan 80 ppm digunakan untuk mengetahui sifat sitotoksiknya. Kedalam sumuran *microwell plate* ditambahkan 100 µl sel kanker Hella atau sel A-549 berisi 2×10^4 sel, lalu ditambahkan media kultur DMEM 1 mL, fungizon 10 uL, gentamisin sulfat 10 uL dan kitosan dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Selanjutnya sel dikultur dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C selama 72. Perhitungan sel dilakukan menggunakan hemasitometer dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali dimana sel telah diberi *tripan blue* sebanyak 10% sebagai pewarnaan, sel mati akan menyerap warna tripan blue, sedangkan sel yang hidup tidak akan menyerap warna biru. Tentukan nilai probit dari persen inhibisi sel hidup yang diperoleh dari penghitungan sel, lalu dibuat kurva hubungan antara nilai probit dan konsentrasi sampel untuk mendapatkan nilai IC₅₀. Jumlah sel yang hidup dalam setiap sampel uji dihitung di bawah mikroskop. Berdasarkan jumlah sel hidup akan diketahui persen penghambatan pertumbuhan sel kanker (% inhibisi sel). Selanjutnya dibuat kurva hubungan antara % inhibisi (nilai probit) sebagai sumbu y terhadap log konsentrasi sampel uji sebagai sumbu x. Persamaan garis linier yang diperoleh digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ (antilog pada nilai probit 5)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kitosan diiradiasi untuk memutuskan ikatan glikosidik pada rantai molekul utama sehingga dihasilkan kitosan dengan berat molekul yang lebih rendah dibandingkan dengan kitosan tanpa iradiasi. Kitosan diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 25, 50, 75, 100 dan 150 kGy pada kecepatan dosis 10 kGy/jam. Penentuan berat molekul dan polidispersitas kitosan dilakukan dengan GPC menggunakan pullulan sebagai standar. Tanpa iradiasi, kitosan mempunyai berat molekul (M_w) = 338194 Dalton (Da) dan M_n = 204968 Da dengan nilai Dispersity (M_w/M_n) = 1,65. Berat molekul kitosan mengalami penurunan dengan bertambahnya dosis radiasi 25, 50, 75, 100 dan 150 kg. Dispersity kitosan bertambah dengan meningkatnya dosis radiasi sampai 75 kGy menjadi 4,61 dan selanjutnya nilai dispersity turun dengan naiknya dosis sampai 150 kGy menjadi 3,48. Berat molekul dan dispersity kitosan ditunjukkan oleh Tabel 1. Dari Tabel 1 terlihat bahwa iradiasi gamma sangat efektif untuk menurunkan berat molekul kitosan dan meningkatkan dispersitas berat molekul

Tabel 1. Berat molekul kitosan dan dispersity sebagai fungsi dari dosis radiasi

Sample	0 kGy	25 kGy	75 kGy	100 kGy	150 kGy
Mn	204968	112221	21477	19762	8893
Mw	338194	245728	99002	68797	39988
Mz	446815	351869	263182	153586	102957
Mz+1	549.180	429265	432016	234709	169688
Dispersity (Mw/Mn)	1.65	2.19	4.61	4.56	3.48

Sitotoksitas kitosan iradiasi terhadap sel Hella dan sel A-548

Untuk mengetahui daya anti kanker suatu bahan dapat dilakukan secara invitro menggunakan cell line. Untuk merepresentasikan kanker serviks, digunakan sel Hella dan sel A-549 untuk kanker paru. Tabel 2 sd 8 dan Gambar 1 menunjukkan nilai IC_{50} kitosan iradiasi dengan dosis 25 sampai 150 kGy dan kitosan tanpa iradiasi terhadap sel Hella. *Inhibition Concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat yang membunuh 50% sel. IC_{50} yang rendah menunjukkan daya anti kanker yang tinggi, begitu pula sebaliknya. Dari Tabel tersebut kitosan tanpa iradiasi dan yang diiradiasi dengan dosis 25 dan 50 kGy mempunyai nilai IC_{50} 43,28 ppm sampai dengan 49,97 ppm. Sedangkan Kitosan yang diiradiasi dengan dosis 75 kGy sampai 150 kGy mempunyai IC_{50} 27,23 ppm sampai 31,34 ppm. Nilai IC_{50} terendah pada kitosan iradiasi 75 kGy yang berarti bahwa

kitosan yang diiradiasi dengan dosis 75 kGy mempunyai daya anti kanker tertinggi dibandingkan dengan kitosan tanpa iradiasi. Aktivitas anti kanker kitosan tertinggi pada dosis radiasi 75 kGy atau kitosan dengan berat molekul $M_n = 21477$ Da dan $M_w = 99002$ Da. Dari hasil yang diperoleh dapat dikatakan bahwa kemampuan membunuh sel hella bergantung pada berat molekul dan dispersity. Daya anti kanker kitosan tertinggi pada dispersity 4,61. Kitosan menghambat perkembangbiakan sel (antiproliferasi) melalui mekanisme apoptosis. Aktivitas antiproliferasi sampel kitosan yang tidak diiradiasi gamma, dan yang diiradiasi pada dosis 25, 50, 75, 100 dan 150 kGy masuk dalam kategori aktif (5) berpotensi sebagai anti kanker HeLa dengan range nilai IC_{50} antara 10 – 100 ug/mL (ppm).

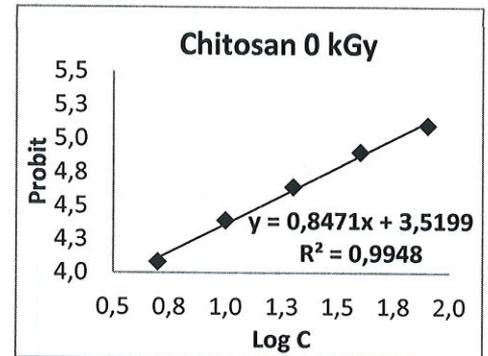
Tabel 9 sampai 15 dan gambar 2 menunjukkan nilai IC_{50} kitosan terhadap sel A-549. Dari table terlihat bahwa nilai IC_{50} kitosan menurun dengan bertambahnya dosis iradiasi sampai dosis 75 kGy kemudian IC_{50} meningkat dengan bertambahnya dosis radiasi dari 75 kGy sampai 150 kGy. Hal ini menunjukkan bahwa kitosan iradiasi mempunyai kemampuan anti kanker yang lebih tinggi dibandingkan dengan kitosan tanpa radiasi dan nilai anti kanker tertinggi pada kitosan iradiasi 75kGy dengan IC_{50} 5,31 ppm sedangkan IC_{50} kitosan tanpa iradiasi 23,67 ppm. Seperti halnya dengan sel Hella, kitosan yang tidak diiradiasi gamma, dan yang diiradiasi pada dosis 25, 50, 75, 100 dan 150 kGy masuk dalam kategori aktif (5) berpotensi sebagai anti kanker paru-paru A-549 dengan range nilai IC_{50} antara 10 – 100 ug/mL (ppm).

Tabel 2. Nilai IC_{50} kitosan 0 kGy terhadap sel Hella

Nilai IC_{50} Kitosan 0 kGy									
C (ppm)	Sel kanker HeLa					\sum Sel $\times 10^5$	\sum Sel rata-rata $\times 10^5$	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
	I	II	III	IV	V				
0	3	4	4	4	5	10,0			
	3	3	5	4	3	9,0	9,33	100	
5	4	3	5	3	3	9,0			
	3	2	3	2	3	6,5			
10	1	5	4	4	3	8,5	7,67	82,14	17,86
	4	3	3	2	4	8,0			
20	3	2	4	3	1	6,5			
	4	2	2	3	3	7,0	6,83	73,21	26,79
40	3	3	2	3	3	7,0			
	2	3	3	2	1	5,5			
80	2	3	2	3	2	6,0	6,00	64,29	35,71
	3	1	4	3	2	6,5			
160	1	3	4	0	2	5,0			

	2	1	3	2	2	5,0	5,00	53,57	46,43
	2	2	1	3	2	5,0			
80	1	3	2	0	3	4,5			
	2	1	1	2	1	3,5	4,33	46,43	53,57
	1	2	1	3	3	5,0			

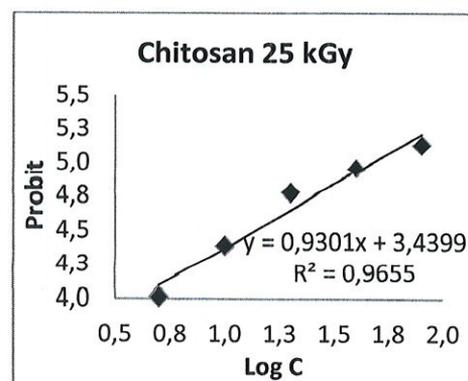
C (ppm)	Log C	Inh (%)	Probit
5	0,6990	17,86	4,08
10	1,0000	26,79	4,39
20	1,3010	35,71	4,64
40	1,6021	46,43	4,90
80	1,9031	53,57	5,10
Log C	1,7485		
Nilai IC ₅₀ (ppm)	43,2758		



Tabel 3. Nilai IC 50 kitosan iradiasi 25 kGy terhadap sel Hella

Nilai IC ₅₀ Kitosan 25 kGy									
C (ppm)	Sel kanker HeLa					Σ Sel x 10 ⁵	Σ Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
	I	II	III	IV	V				
0	3	4	4	4	5	10,0			
	3	3	5	4	3	9,0	9,33	100	
	4	3	5	3	3	9,0			
5	2	2	4	4	3	7,5			
	3	4	3	4	4	9,0	7,83	83,93	16,07
	4	2	2	3	3	7,0			
10	3	2	3	3	3	7,0			
	3	3	2	2	3	6,5	6,83	73,21	26,79
	4	3	2	2	3	7,0			
20	1	2	2	2	1	4,0			
	3	2	2	4	2	6,5	5,50	58,93	41,07
	4	2	1	2	3	6,0			
40	3	2	3	1	2	5,5			
	2	2	1	1	2	4,0	4,83	51,79	48,21
	2	2	1	2	3	5,0			
80	1	2	2	1	2	4,0			
	2	2	1	1	2	4,0	4,17	44,64	55,36
	2	0	3	2	1	4,0			

C (ppm)	Log C	Inh (%)	Probit
5	0,6990	16,07	4,01
10	1,0000	26,79	4,39
20	1,3010	41,07	4,77
40	1,6021	48,21	4,95
80	1,9031	55,36	5,13
Log C	1,6785		
Nilai IC ₅₀ (ppm)	47,6974		



Tabel 4. Nilai IC 50 kitosan iradiasi 50 kGy terhadap sel Hella

Nilai IC ₅₀ Kitosan 50 kGy									
C (ppm)	Sel kanker HeLa					Σ Sel x 10 ⁵	Σ Sel rata-rata x 10 ⁵	Sel hidup (%)	Inhibisi (%)
	I	II	III	IV	V				
0	3	4	4	4	5	10,0			
	3	3	5	4	3	9,0	9,33	100	
	4	3	5	3	3	9,0			
5	4	3	2	3	3	7,5			
	2	2	3	2	3	6,0	6,67	71,43	28,57
	3	2	1	3	4	6,5			
10	2	2	3	2	3	6,0			
	4	1	2	1	2	5,0	6,17	66,07	33,93
	2	4	3	4	2	7,5			
20	2	1	3	2	3	5,5			
	3	2	3	1	1	5,0	5,33	57,14	42,86
	3	1	3	2	2	5,5			
40	3	2	3	1	2	5,5			
	2	2	3	1	1	4,5	4,83	51,79	48,21
	2	2	1	2	2	4,5			
80	1	2	1	3	2	4,5			
	3	2	2	1	1	4,5	4,33	46,43	53,57
	2	0	3	2	1	4,0			

C (ppm)	Log C	Inh (%)	Probit
5	0,6990	28,57	4,45
10	1,0000	33,93	4,59
20	1,3010	42,86	4,82
40	1,6021	48,21	4,95
80	1,9031	53,57	5,10
Log C	1,6987		

