

# **Sintesis dan Karakterisasi Komposit Hidroksiapatit dari Tulang Sotong (*Sepia sp.*)-Kitosan untuk Kandidat Aplikasi *Bone Filler***

Istifarah<sup>1</sup>, Aminatun<sup>2</sup>, Prihartini Widiyanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mahasiswa Program Studi Teknobiomedik

<sup>2</sup> Staf Pengajar Program Studi Teknobiomedik

Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

Email : [istifarah.unair@gmail.com](mailto:istifarah.unair@gmail.com)

## **Abstract**

This study aimed to find out the potential of hydroxyapatite (HA) that was synthesized from cuttlefish (*Sepia sp.*) bone as well as HA-chitosan composite for bone filler applications. Hydroxyapatite was obtained by hydrothermal reaction between 1M aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) from cuttlefish bone lamellae and 0.6 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  at 200°C and variations in the duration of 12, 24 and 36 hours. Followed by a sintering process with a temperature of 1000°C for 1 hour. Sample with the highest content of HA was used as the matrix to synthesize the composite with chitosan as the fiber/filler. Synthesis of HA-chitosan composite was conducted by a simple mixing method with variations of chitosan from 20 to 35%. XRD, compressive strength and hardness test as well as MTT assay were performed to determine the best sample of all. The results showed that 100%  $\text{CaCO}_3$  was obtained from cuttlefish bone and was successfully processed into 100% amorphous HA. Sintering process resulted in changes in the percentage of HA with much better degree of crystallinity. The highest HA content was obtained in the hydrothermal duration of 36 hours after sintering, of which was 94%. The best sample was obtained from the composite containing 20% chitosan which indicates perfect mixing between HA and chitosan, with a compressive strength of  $(5.241 \pm 0.063)$  MPa. The addition of chitosan was found to increase the cell viability from 87.00% to 97.11%. HA-chitosan composite from cuttlefish bone has a potential for bone filler applications to cancellous bone.

**Keywords :** Hydroxyapatite, *Sepia sp.*, Hydrothermal, HA-chitosan composite, Bone filler.

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik hidroksiapatit (HA) yang disintesis dari tulang sotong (*Sepia sp.*) dan komposit HA-kitosan untuk aplikasi *bone filler*. HA diperoleh dengan reaksi hidrotermal antara 1M aragonit ( $\text{CaCO}_3$ ) dari *lamellae* tulang sotong dan 0,6M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  dengan suhu 200°C dan variasi durasi 12, 24 dan 36 jam. Kemudian dilakukan sintering dengan suhu 1000°C selama 1 jam. Sampel dengan kandungan HA tertinggi dijadikan matriks untuk mensintesis komposit, dengan kitosan sebagai serat/filler. Sintesis komposit HA-kitosan dilakukan dengan metode pencampuran sederhana dengan variasi kitosan dari 20 hingga 35%. Uji XRD, kekuatan tekan, dan MTT assay dilakukan untuk menentukan sampel terbaik. Hasil penelitian enunjukkan bahwa diperoleh 100%  $\text{CaCO}_3$  dari tulang sotong dan berhasil diproses menjadi 100% HA *amorf*. Proses sintering mengakibatkan perubahan prosentase HA dengan kristalinitas yang jauh lebih baik. Kandungan HA tertinggi diperoleh pada durasi hidrotermal 36 jam setelah disintering, yaitu 94%. Sampel terbaik diperoleh pada komposit dengan kitosan 20% yang mengindikasikan terjadinya penyatuan secara sempurna antara HA dan kitosan, dengan kekuatan tekan sebesar  $(5,241 \pm 0,063)$  MPa. Penambahan kitosan meningkatkan viabilitas sel dari 87,00% menjadi 97,11%. Komposit HA dari tulang sotong-kitosan berpotensi untuk aplikasi *bone filler* pada tulang *cancellous*.

Kata kunci : Hidroksiapatit, *Sepia sp.*, Hidrotermal, Komposit HA-kitosan, *Bone filler*.

## **PENDAHULUAN**

Berdasarkan data di Asia, Indonesia adalah negara dengan jumlah penderita patah tulang tertinggi. Diantaranya, ada sebanyak 300-400 kasus operasi bedah tulang per bulan di RS. Dr. Soetomo Surabaya (Gunawarman dkk, 2010). Setiap tahun kebutuhan substitusi tulang terus bertambah. Hal tersebut disebabkan meningkatnya kecelakaan yang mengakibatkan patah tulang, penyakit bawaan dan non-bawaan (Ficai *et al.*, 2011).

Klasifikasi material substitusi tulang meliputi *autograft*, *allograft*, dan *xenograft*. Setiap material tersebut memiliki kekurangan dan kelebihan sebagai material untuk memperbaiki tulang. Kelemahan *autograft* adalah sering menyebabkan komplikasi dalam penyembuhan luka, operasi tambahan, nyeri pada donor dan pasokan tulang tidak memadai untuk mengisi *gap*. Sedangkan *allograft* dan *xenograft* terkait dengan reaksi infeksi, inflamasi, dan penolakan. Teknik *allograft* yang menggunakan tulang mayat, memiliki masalah dalam reaksi imunogenik dan resiko penyakit menular (AIDS dan hepatitis). *Xenograft* juga membawa resiko penyakit menular antar spesies (Wahl dan Czernuszka, 2006 dan Venkatesan *et al.*, 2010). Keterbatasan tersebut memicu perkembangan riset di bidang biomaterial, yaitu dengan melakukan berbagai modifikasi pembuatan biomaterial sintetik. Dengan biomaterial sintetik diharapkan karakter bahan diketahui secara pasti dan terkontrol.

Hidroksiapatit (HA) telah dipelajari selama bertahun-tahun dan digunakan secara luas untuk pembuatan implan karena kesamaannya dengan fase mineral tulang dan terbukti biokompatibel dengan tulang dan gigi manusia (Ivankovic, 2010 dan Earl, 2006). HA dengan rumus kimia  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  adalah komponen anorganik utama dari jaringan keras tulang dan menyumbang 60-70% dari fase mineral dalam tulang manusia. HA mampu menjalani ikatan osteogenesis dan relatif tidak larut *in vivo*. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa HA tidak menunjukkan toksisitas, respon peradangan, respon pirogenetik (menimbulkan demam). Selain itu, pembentukan jaringan fibrosa antara implan dan tulang sangat baik, dan memiliki kemampuan menjalin

ikatan langsung dengan tulang *host*. HA menunjukkan sifat bioaktif dan osteokonduktif (Hui, 2010) yang sangat bermanfaat dalam proses mineralisasi tulang (Dewi, 2009).

HA yang disintesis dari bahan alam memiliki osteokonduktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan dari bahan sintetik (Saraswathy, dalam Dewi, 2008). Bahan alam yang dapat digunakan untuk sintesis HA adalah tulang sotong. Tulang sotong (*Sepia sp.*) merupakan residu budidaya perikanan yang biasanya dimanfaatkan sebagai pakan burung dan kura-kura sebagai asupan kalsium. Dengan harganya yang terjangkau, 85% kalsium karbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) yang terkandung dalam tulang sotong dapat dimanfaatkan sebagai sumber kalsium dalam sintesis HA yang ekonomis dan dapat dijangkau oleh masyarakat luas.

*Scaffolds* HA dari tulang sotong pertama kali disintesis pada tahun 2005 oleh Rocha *et al.* dengan metode hidrotermal pada suhu 200°C. Hasil uji *scaffolds* tersebut menunjukkan stabilitas termal yang tinggi. Selain itu, hasil uji *in vitro* bioaktivitas pada SBF dan biokompatibilitas dengan osteoblas, menunjukkan *scaffolds* HA dari tulang sotong cocok untuk aplikasi implan atau rekayasa jaringan.

Dalam pengaplikasiannya, biokeramik seperti HA dan trikalsium fosfat (TKF) bersifat rapuh. Untuk menyempurnakan sifat mekanik HA dapat dilakukan modifikasi dengan menambahkan polimer sebagai serat/*filler*.

Kitosan adalah salah satu polimer alami yang berpotensi untuk digunakan sebagai serat/*filler* dalam pembuatan komposit. Kitosan memiliki karakter bioresorbabel, biokompatibel, non-toksik, non-antigenik, biofungsional dan osteokonduktif. Karakter osteokonduktif yang dimiliki kitosan dapat mempercepat pertumbuhan osteoblas pada komposit HA-kitosan sehingga dapat mempercepat pembentukan mineral tulang.

Pramanik *et al.* (2009) mensintesis nano-komposit HA-kitosan dengan cara pelarutan sederhana berdasarkan metode kimia. Variasi HA yang dilakukan dari 10% hingga 60%. Hasil penelitian menunjukkan nano-komposit yang dihasilkan dapat digunakan untuk aplikasi *bone tissue engineering*. Namun,

sekitar 70% penyusun tulang manusia merupakan senyawa kalsium fosfat, sehingga pada penelitian ini akan dilakukan sintesis komposit HA dari tulang sotong (*Sepia sp.*)-kitosan dengan variasi HA : kitosan = (80 : 20), (75 : 25), (70 : 30), (65 : 35). Komposit diharapkan memiliki sifat mekanik yang baik untuk tujuan aplikasi *bone filler*. Selain itu, diharapkan penambahan kitosan dapat meningkatkan osteokonduktifitas HA, sehingga dapat mempercepat pembentukan mineral tulang.

## **METODE**

### **Ekstraksi $\text{CaCO}_3$ dari Tulang Sotong (*Sepia sp.*)**

Untuk mendapatkan  $\text{CaCO}_3$ , bagian *lamellae* tulang sotong (*Sepia sp.*) dijadikan bubuk dengan HEM-E3D, kemudian dipanaskan pada suhu  $350^\circ\text{C}$  selama 3 jam untuk menghilangkan komponen organik. Kemudian dilakukan karakterisasi XRD untuk memastikan kandungan  $\text{CaCO}_3$ .

### **Persiapan Bahan**

$\text{CaCO}_3$  ( $M_r = 100$ ) 1M diperoleh dengan menambahkan 100 gram  $\text{CaCO}_3$  ke dalam 1 liter aquades. Sedangkan larutan  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $M_r = 115$ ) 0,6 M dibuat dengan melarutkan 69 gram ke dalam 1 liter aquades.

### **Sintesis Hidroksiapatit dengan Metode Hidrotermal**

$\text{CaCO}_3$  1M dan larutan  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0,6M dicampur dengan magnetic stirrer selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke reaktor. Reaktor dimasukkan ke dalam oven elektrik untuk dipanaskan hingga suhu  $200^\circ\text{C}$  dengan variasi durasi, yaitu 12 jam, 24 jam, dan 36 jam, dengan nama sampel berurutan yaitu sampel A, B, dan C. Hasil yang diperoleh, didinginkan pada suhu kamar. Kemudian, sampel dicuci dengan aquades menggunakan magnetic stirrer. Pencucian dilakukan berulang kali hingga hasil reaksi terpisah dengan aquades, ditunjukkan oleh pH yang kembali menjadi 7. Hal tersebut dilakukan untuk menghilangkan hasil sampingan yang bersifat asam. Pencucian yang terakhir dilakukan dengan metanol untuk membatasi aglomerasi partikel HA selama pengeringan. Sampel dikeringkan dalam oven elektrik pada suhu  $50^\circ\text{C}$  selama 4 jam. Sampel A, B, dan C dikarakterisasi XRD untuk memastikan terbentuknya HA pada

masing-masing sampel.

### **Sintering**

Sintering sampel dengan suhu 1000 °C selama 1 jam untuk menghilangkan pengotor dan meningkatkan kristalinitas sampel. Nama sampel A, B, dan C yang telah disintering berurutan adalah D, E, dan F yang kemudian dikarakterisasi XRD untuk mengetahui kandungan masing-masing sampel.

### **Sintesis Komposit HA-Kitosan**

Hasil uji XRD menunjukkan sampel F merupakan sampel terbaik dari tahap sebelumnya. Sehingga, sampel F yang digunakan untuk mensintesis komposit HA-kitosan. Preparasi kitosan dilakukan dengan mencampurkan 2 gram kitosan dengan 100 ml asam asetat 3% dan 6 gram asam fosfat 85%, kemudian dipanaskan dengan suhu 70°C selama 1 jam dengan pengadukan konstan. Setelah didinginkan, larutan diendapkan dalam metanol berlebih untuk menghilangkan asam asetat dan asam fosfat yang tidak bereaksi. Gel yang diperoleh, dilarutkan dalam aquades, kemudian dalam metanol berlebih. Gel yang terbentuk dikumpulkan dan dikeringkan dengan suhu 70°C.

Sintesis komposit HA-kitosan dilakukan dengan metode pencampuran sederhana. Massa kitosan dan HA disesuaikan dengan perbandingan (20:80), (25:75), (30:70), (35:65) dengan nama sampel berurutan yaitu sampel F1, F2, F3, F4. Kitosan dilarutkan dalam 10 ml aquades bersuhu 70°C, kemudian ditambahkan bubuk HA secara perlahan. Campuran tersebut diaduk dengan magnetic stirrer selama 1 jam. Setelah semua bahan tercampur sempurna, bubur didiamkan selama semalam untuk gelembung udara. Bubur yang dihasilkan dari proses tersebut kemudian dikeringkan dengan suhu 70°C selama lebih dari semalam. Komposit yang dihasilkan kemudian dihaluskan dengan cara digerus dengan mortar.

### **Uji XRD**

Difraktometer sinar-X PANalytical X'Pert PRO digunakan untuk uji XRD. Hasil tersaji dalam bentuk grafik spektrum dan tabel. Analisis kualitatif dilakukan dengan mencocokkan dengan ICDD (International Centre for Diffraction Data). Analisis kualitatif dilakukan dengan metode rietveld.

### **Uji Kekuatan Tekan**

Sampel dicetak menjadi pellet dengan cara dikompaksi dengan beban 2 ton. Cetakan yang digunakan berdiameter 13 mm. Pengukuran dilakukan dengan cara diametral compression test menggunakan Autograph.

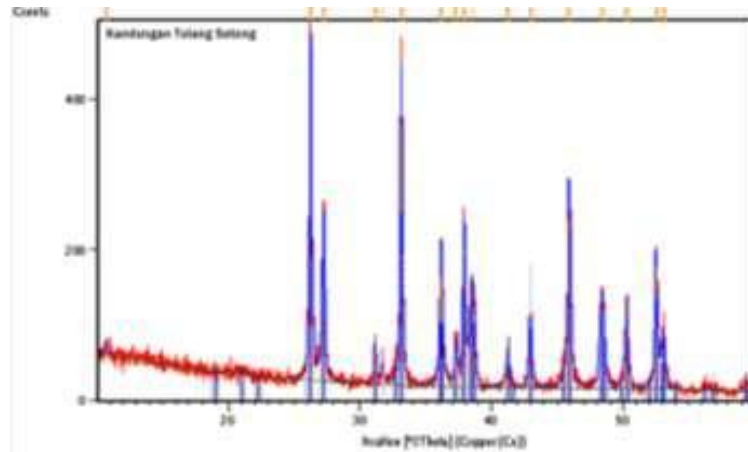
### **Uji MTT Assay**

Kultur sel fibroblas BHK-21 dalam bentuk monolayer dengan media Eagle's dan FBS 5% ditanam dalam botol kultur roux kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Kultur sel dicuci dengan PBS 5 kali yang untuk membuang sisa serum yang tersisa. Kemudian ditambahkan tripsin versene untuk melepaskan sel dari dinding botol dan memisahkan ikatan antar sel agar tidak menggerombol. Sel dengan kepadatan  $2 \times 10^5$  dimasukkan dalam 100  $\mu$ L media (media eagle's 86%, penicillin streptomycin 1%, fungizone 100 unit/mL), kemudian dipindahkan ke dalam 96-microwell plate sesuai dengan jumlah sampel dan control. Sampel yang telah disterilisasi sebanyak 0,05 gram dilarutkan dalam 1 ml etanol. Larutan sampel kemudian dimasukkan dalam 96-microwell plate sebanyak 50  $\mu$ L. Lalu diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C.

Pereaksi MTT 5 mg/mL yang telah dilarutkan dalam PBS ditambahkan ke media sebanyak 10  $\mu$ L untuk setiap well kemudian diinkubasi selama 4 jam dalam suhu 37° C. Pelarut DMSO ditambahkan ke setiap well sebanyak 50  $\mu$ L lalu disentrifuse 30 rpm selama 5 menit. Nilai densitas optik (OD) formazan dihitung dengan Elisa reader pada panjang gelombang 630 nm. Penghitungan persentase viabilitas sel dapat dihitung dengan membandingkan OD perlakuan dengan OD kontrol sel.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil uji XRD terhadap bubuk lamellae tulang sotong yang telah diberi perlakuan panas 350°C selama 3 jam menunjukkan kandungan 100% kalsium karbonat (aragonit, CaCO<sub>3</sub>) (Gambar 1). Spektrum XRD sampel menunjukkan kesesuaian dengan ICDD 01-71-4891. Hal tersebut seiring dengan hasil penelitian Paljar et al. (2009) yang menunjukkan bahwa perlakuan panas pada bagian lamellae tulang sotong tidak mengubah kandungan aragonit menjadi kalsit, tidak seperti bagian dorsal. Aragonit lebih mudah bertransformasi menjadi HA dibandingkan kalsit, sehingga pada penelitian ini digunakan aragonit dari bagian lamellae tulang sotong untuk mensintesis HA.

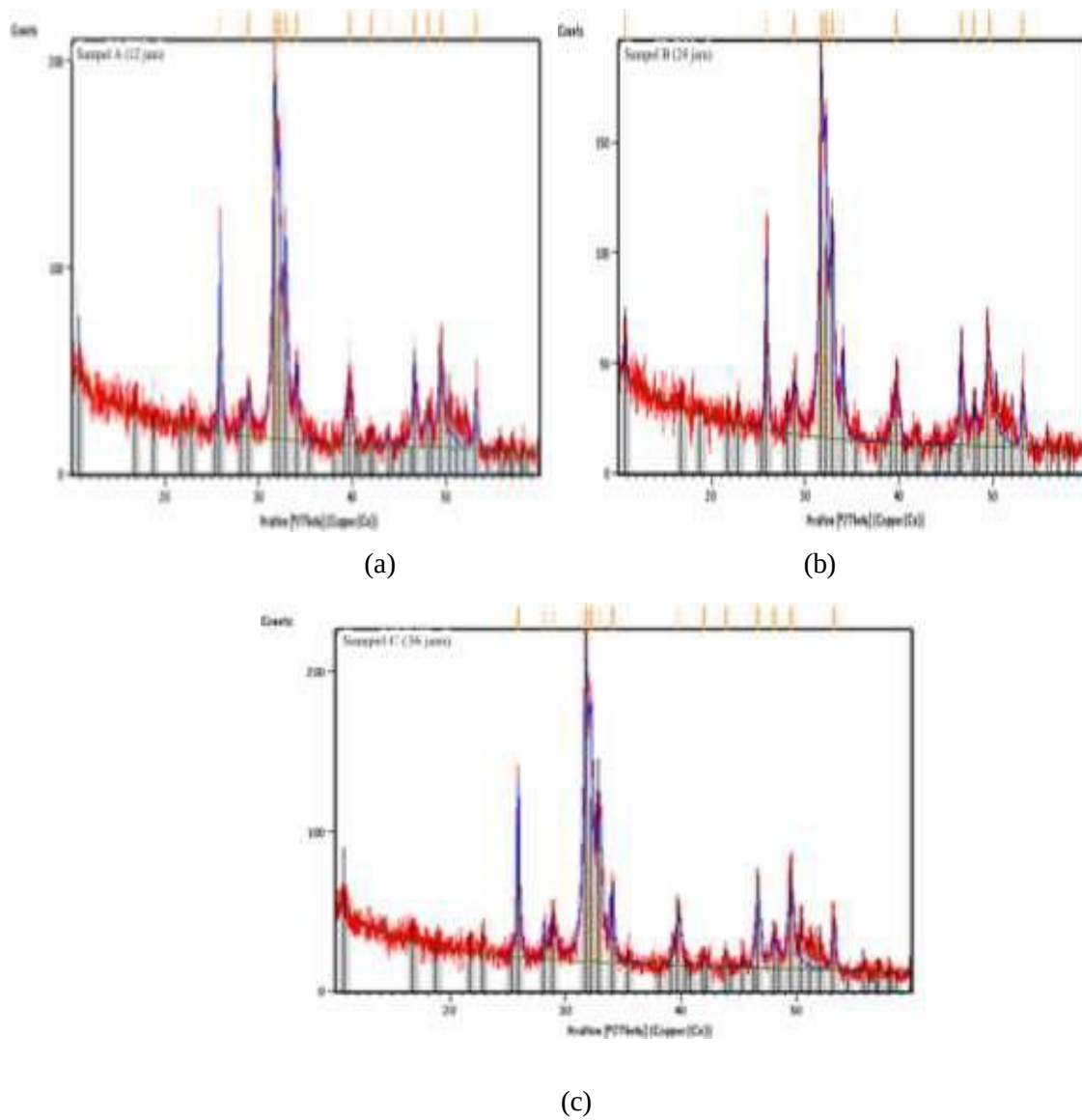


Gambar 1 Spektrum XRD bubuk *lamellae* tulang sotong

Hasil uji XRD terhadap Sampel A, B, dan C dengan durasi hidrotermal berturut-turut 12, 24, dan 36 jam menunjukkan bahwa kandungan dari ketiga sampel tersebut adalah 100% hidroksiapatit [HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]. Seluruh spektrum XRD yang terbentuk pada ketiga sampel tersebut bersesuaian dengan ICDD 01-72-1243. Intensitas puncak tertinggi Sampel A sebesar 110 (Gambar 2(a)), Sampel B sebesar 104 (Gambar 2(b)), dan Sampel C sebesar 115 (Gambar 2(c)).

Rendahnya intensitas difraksi puncak tertinggi pada Sampel A, B dan C menunjukkan bahwa derajat kristalinitas HA yang dihasilkan masih rendah (*amorf*). Selain itu, dimungkinkan Sampel A, B dan C masih mengandung pengotor. Hal tersebut didukung oleh warna bubuk dari ketiga sampel yang kecoklatan (Gambar 3). Diperkirakan pengotor merupakan ion karbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Ion karbonat dapat hilang pada pemanasan dengan suhu di atas  $600^\circ\text{C}$  (Septiarini, 2009). Dengan demikian, perlu ditambahkan proses sintering untuk menghilangkan pengotor dan meningkatkan derajat kristalinitas HA yang telah diperoleh dari proses hidrotermal.





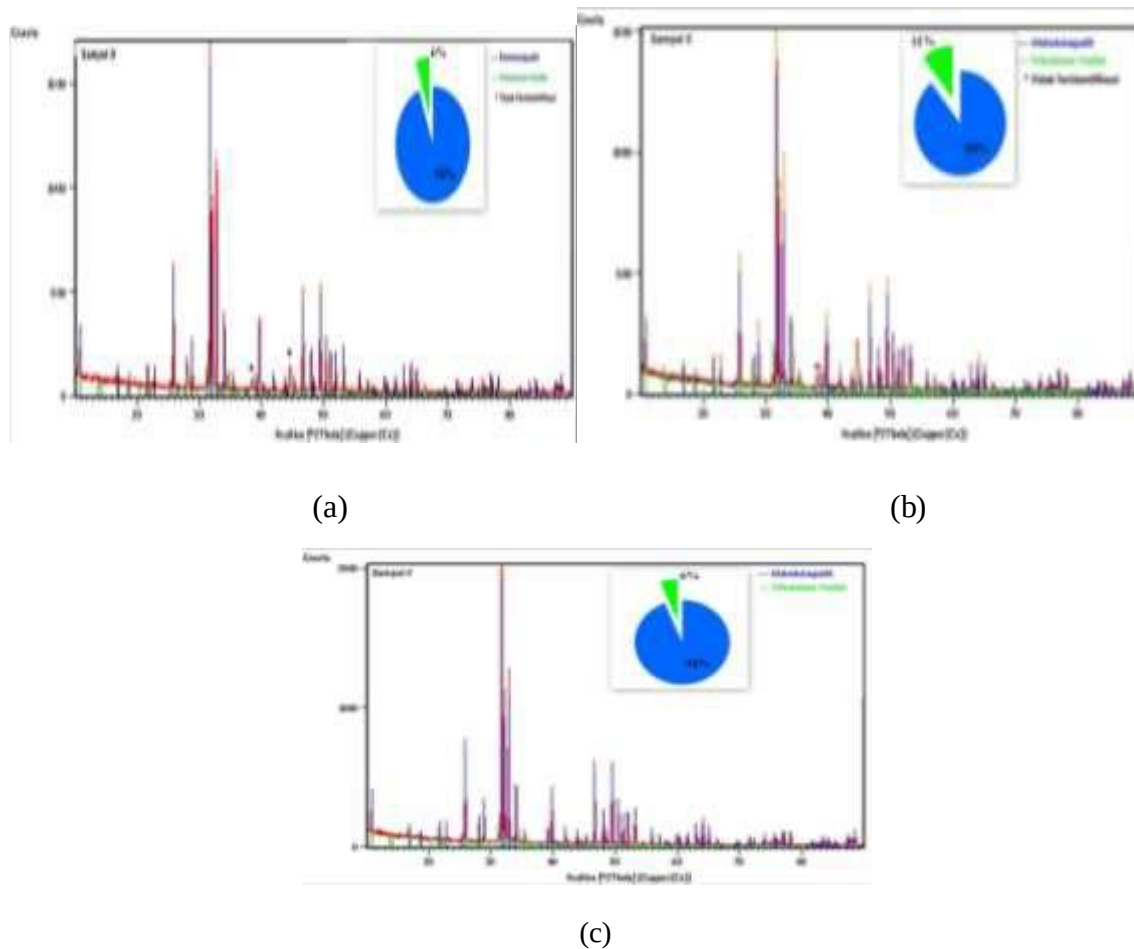
Gambar 2 Spektrum XRD (a) Sampel A, (b) Sampel B, (c) Sampel C



Gambar 3 Hidroksiapatit sebelum sintering

Sampel A, B, dan C yang telah disintering dengan suhu 1000°C selama 1 jam berturut- turut disebut sebagai Sampel D, E, dan F. Hasil uji XRD menunjukkan bahwa ketiga sampel tersebut mengandung hidroksiapatit [HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] dan trikalsium fosfat [TKF,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] sesuai dengan ICDD berturut-turut 01-72-1243 dan 01-073-4869. Selain itu, terdapat pula puncak yang tidak teridentifikasi pada sampel D dan E.

Hasil uji XRD menunjukkan peningkatan intensitas yang sangat drastis dibandingkan sampel sebelum disintering yang berkisar dari 104 – 115 saja. Intensitas puncak tertinggi Sampel D sebesar 1658,43 (Gambar 4(a)), Sampel E sebesar 1472,35 (Gambar 4(b)), dan Sampel F sebesar 1938,59 (Gambar 4(c)). Sintering juga menyebabkan perubahan warna dari yang semula kecoklatan menjadi putih (Gambar 5). Hal tersebut menunjukkan bahwa pengotor dalam sampel telah hilang.



Gambar 4. Spektrum XRD (a) Sampel D, (b) Sampel E, (c) Sampel F



Gambar 5 Sampel setelah disintering

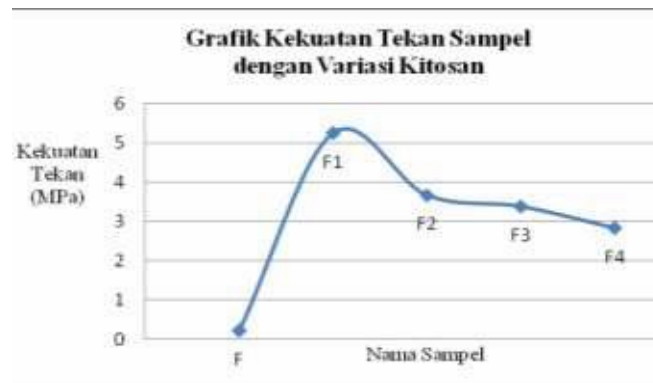
Berdasarkan analisis kuantitatif dengan metode *rietveld* terhadap hasil uji XRD, diperoleh kandungan masing-masing sampel yang ditunjukkan pada Tabel I. Terbentuknya senyawa TKF pada sampel diakibatkan hilangnya OH akibat perlakuan temperatur tinggi. Namun, kehadiran TKF dalam sampel sebenarnya bukanlah hal yang fatal. Hal tersebut dikarenakan TKF juga digunakan sebagai material implan tulang. TKF memiliki sifat biodegradabel, bioaktif dan memiliki kelarutan yang tinggi (Dewi, 2009).

Tabel I Kandungan Sampel Setelah Disintering

| Nama Sampel | HA (%) | TKF (%) |
|-------------|--------|---------|
| D           | 94     | 6       |
| E           | 89     | 11      |
| F           | 94     | 6       |

Berdasarkan Tabel I diketahui bahwa sampel D dan F yang kandungan HA tertinggi dengan jumlah yang sama, yaitu 94%. Namun, dengan mempertimbangkan adanya 2 puncak yang tidak teridentifikasi sebagai HA atau TKF pada spektrum XRD Sampel D, yaitu pada posisi  $2\theta$  38,4365 dan 44,6553, maka sampel F yang digunakan sebagai matriks dalam sintesis komposit dengan kitosan.

Telah dilakukan sintesis komposit antara sampel F dengan kandungan HA 94% sebagai matriks dan kitosan sebagai serat/*filler*. Hasil uji kekuatan tekan menunjukkan penambahan kitosan sebagai *filler* dalam komposit HA-kitosan meningkatkan kekuatan tekan HA. Hal tersebut menegaskan bahwa elastisitas kitosan mampu memperbaiki sifat HA yang rapuh (*brittle*). Kekuatan tekan tertinggi diperoleh pada sampel F1, dengan perbandingan HA : kitosan sebesar 80 : 20, yaitu  $(5,241 \pm 0,063)$  MPa.



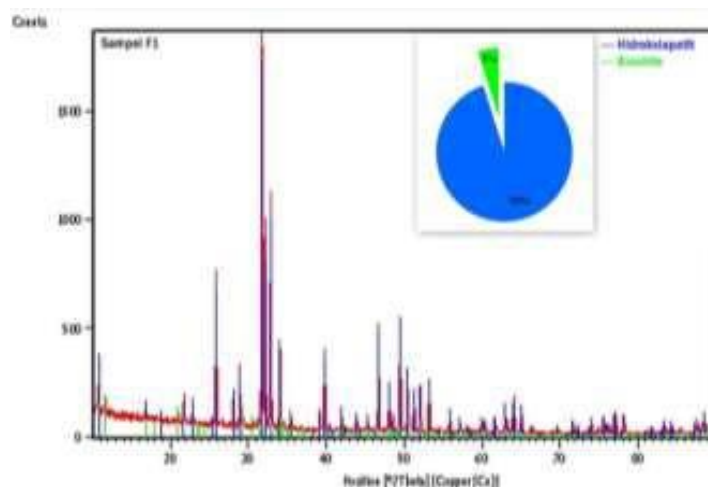
Gambar 7 Grafik kekuatan tekan sampel

Hasil uji kuat tekan menunjukkan pertambahan jumlah kitosan justru mengakibatkan penurunan kekuatan tekan pada sampel F2, F3, dan F4. Hal tersebut bisa saja terjadi karena sifat mekanik dipengaruhi banyak faktor. Di antaranya adalah bentuk partikel, ukuran partikel, serta distribusi ukuran partikel (Cai *et al.*, 2009). Mengingat sampel komposit F1-F4 digerus secara manual sebelum dicetak, sehingga besar kemungkinan bentuk dan ukuran partikel tidak sama antara sampel yang satu dengan yang lainnya.

Distribusi ukuran partikel komposit pun kemungkinan besar tidak homogen. Kekuatan tekan juga dipengaruhi oleh interaksi antarmuka antara matriks dan *filler*, yaitu HA dan kitosan (Cai *et al.*, 2009). Penurunan kekuatan tekan akibat peningkatan jumlah kitosan, kemungkinan diakibatkan adanya kitosan yang tidak berinteraksi dengan HA. Hal tersebut seiring dengan penelitian Dewi (2009) dimana komposit kalsium fosfat-kitosan terbaik diperoleh pada komposisi 80 : 20, dan komposisi 70 : 30 mengindikasikan adanya kitosan yang tidak berinteraksi dengan kristal apatit. Berdasarkan analisis hasil uji kekuatan, Sampel F1 dengan perbandingan HA : kitosan sebesar 80 : 20 dipilih sebagai sampel terbaik. Kekuatan tekan Sampel F1 sebesar  $(5,241 \pm 0,063)$  MPa termasuk dalam *range* nilai kekuatan tekan tulang *cancellous* dari literatur, yaitu 2-12 MPa (Ficai *et al.*, 2011). Sehingga, Sampel F1 berpotensi sebagai implan pada tulang *cancellous*.

Hasil uji XRD terhadap Sampel F1 ditunjukkan oleh Gambar 6. Apabila dibandingkan dengan hasil uji XRD Sampel F, dapat diketahui bahwa terjadi penurunan intensitas dan pergeseran posisi puncak pada komposit. Di antaranya pada puncak difraksi bidang (002), (211), dan (300). Pada bidang (002) terjadi penurunan intensitas dari 737,25 menjadi 702,44 dan pergeseran posisi puncak dari 25,8674 menjadi 25,8648.

Pada bidang (211) terjadi penurunan intensitas dari 1938,59 menjadi 1830,03 dan pergeseran posisi puncak dari 31,7576 menjadi 31,7554. Pada bidang (300) terjadi penurunan intensitas dari 1248,14 menjadi 1082,17 dan pergeseran posisi puncak dari 32,8924 menjadi 32,8873. Penurunan intensitas dan pergeseran puncak mengindikasikan terjadinya ikatan antara matriks dan *filler*, yaitu HA dan kitosan dari proses pembentukan komposit.



Gambar 6 Spektrum XRD komposit (Sampel F1)

Analisis kuantitatif terhadap hasil uji XRD menunjukkan bahwa Sampel F1 mengandung 95% HA dan 5% *brushite* [ $\text{CaHPO}_4(\text{H}_2\text{O})_2$ ]. Hal tersebut seiring dengan penelitian Sari (2012) yang menyatakan terbentuknya  $\text{CaHPO}_4$  pada komposit kemungkinan diakibatkan ketidakstabilan stoikiometri pada HA sehingga rasio molar  $\text{Ca/P} > 1,67$  yang membentuk  $\text{CaO}$ . Dimana, kandungan  $\text{CaO}$  diatas 55 % akan membentuk  $\text{CaHPO}_4$ . Ketidakstabilan stoikiometri tersebut juga dimungkinkan karena Sampel F yang digunakan untuk mensintesis komposit F1 mengandung TKF sebesar 6%. Selain itu, afinitas yang tinggi akibat penambahan asam fosfat pada kitosan juga dapat menyebabkan ketidakstabilan stoikiometri, karena ion fosfat pada kitosan dapat bertukar dengan ion fosfat pada HA (Pramanik *et al.*, 2009).

Hasil uji MTT *assay* menunjukkan bahwa Sampel F, yaitu HA yang disintesis dari tulang sotong (*Sepia sp.*) tidak bersifat toksik. Hal tersebut dikarenakan nilai viabilitas sel yang diperoleh sebesar 87,00%. Material tidak

bersifat toksik pada sel fibroblast (*cell lines*) apabila prosentase viabilitas sel masih di atas 60%, yaitu OD dari perlakuan masih mendekati OD dari kontrol (Wijayanti, 2010). Hasil uji MTT assay pada Sampel F1, yaitu komposit dengan HA : kitosan sebesar 80 : 20 menunjukkan jumlah viabilitas sel sebesar 97,11%. Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan kitosan mampu meningkatkan viabilitas sel dibandingkan dengan Sampel F.

## KESIMPULAN

Reaksi hidrotermal antara  $\text{CaCO}_3$  dari tulang sotong (*Sepia* sp.) dan  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  dengan variasi waktu 12, 24, dan 36 jam menghasilkan 100% HA pada ketiga sampel dengan kristalinitas yang rendah. Proses sintering mengakibatkan perubahan prosentase HA dengan derajat kristalinitas yang jauh lebih baik.

Komposit HA-kitosan disintesis dengan memanfaatkan sampel dengan kandungan HA tertinggi, yaitu sampel dengan durasi hidrotermal 36 jam setelah disintering. Hasil uji menunjukkan penambahan kitosan sebesar 20% berpotensi untuk aplikasi bone filler pada tulang cancellous.

## DAFTAR PUSTAKA

- Dewi, Setia Utami, 2009, Pembuatan Komposit Kalsium Fosfat-Kitosan dengan Metode Sonikasi, Tesis Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Cai, X., Tong, H., Shen, X., Chen, W., Yan, J., Hu, J., 2009, *Preparation and Characterization of Homogeneous Chitosan–Polylactic Acid/Hydroxyapatite Nanocomposite for Bone Tissue Engineering and Evaluation of Its Mechanical Properties*, Acta Biomaterialia 5 (2009) 2693-2703, China.
- Earl, JS., Wood, DJ., Milne, SJ., 2006, *Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite*, Journal of Physics: Conference Series 26 (2006) 268–271.
- Ficai, A., Andronescu, E., Voicu, G., Ficai, D., 2011, *Advances in Collagen/Hydroxyapatite Composite Materials*. Politehnica University

of Bucharest, Faculty of Applied Chemistry and Materials Science, Romania.

Gunawarman, M.A., Mulyadi S., Riana, H.A., 2010, Karakteristik Fisik dan Mekanik Tulang Sapi Variasi Berat Hidup sebagai Referensi Desain Material Implan. Seminar Nasional Tahunan Teknik Mesin (SNMTTM) ke-9.

Hui, P., Meena, S.L., Singh, G., Agarawal, R.D., Prakash, S., 2010, *Synthesis of Hydroxyapatite Bio-Ceramic Powder by Hydrothermal Method*, Journal of Minerals & Materials Characterization & Engineering, Vol. 9, No.8, pp.683-692, India.

Ivankovic, H., Orlic, S., Kranzelic, D., Tkalcec, E., 2010, *Highly Porous Hydroxyapatite Ceramics for Engineering Applications*, Advances in Science and Technology Vol.63 (2010) pp 408-413, Switzerland.

Paljar, K., Orlic, S., Tkalcec, E., Ivankovic, H., 2009, *Preparation of Silicon Doped Hydroxyapatite*. Croatia : Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb.

Pramanik, N., Mishra, D., Banerjee, I., Maiti, T.K., Bhargava, P., Pramanik, P., 2009, *Chemical Synthesis, Characterization, and Biocompatibility Study of Hydroxyapatite/Chitosan Phosphate Nanocomposite for Bone Tissue Engineering Applications*, International Journal of Biomaterials, doi : 10.1155/2009/512417, India.

Rocha, J.H.G., Lemos, A.F., Agathopoulos, S., Valério, P., Kannan, S., Oktar, F.N., Ferreira, J.M.F., 2005, *Scaffolds for Bone Restoration from Cuttlefish*, Elsevier : Bone 37 (2005) 850–857.

Sari, RA Irindah F, 2012, Sintesis dan Karakterisasi Mikroskopik Nano-Komposit Hidroksiapatit/Kitosan (n-HA/Cs) untuk Aplikasi Jaringan Tulang, Skripsi Fsaintek Unair Surabaya.

Septiarini, Savitri, 2009, Pelapisan Apatit pada Baja Tahan Karat Lokal dan Ternitridasi dengan Metode Sol-Gel, Skripsi FMIPA Institut Pertanian Bogor.

Venkatesan, J., Kim, S., 2010, *Chitosan Composites for Bone Tissue*

*Engineering—AnOverview*, Mar. Drugs 2010, 8, 2252-2266, Korea.

Wahl, D.A. dan Czernuszka, J.T., 2006, *Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair*, European Cells and Materials Vol. 11. (pages 43-56), University of Oxford, UK.

Wijayanti, Fitria, 2010, Variasi Komposisi Cobalt - Chromium Pada Komposit Co-Cr-HAP Sebagai Bahan Implan, Skripsi FSAINTEK Unair.