

SINTESIS KOMPOSIT KOLAGEN-HIDROKSIAPATIT SEBAGAI KANDIDAT *BONE GRAFT*

Miranda Zawazi Ichsan¹, Siswanto², Dyah Hikmawati³

¹ Program Studi Teknobiomedik Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

^{2,3} Staf Pengajar Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

Email : miranda_zi@yahoo.com

ABSTRAK

Telah dilakukan sintesis makroporus komposit kolagen-hidroksiapatit sebagai kandidat *bone graft*. Kolagen disintesis dari cakar ayam. Metode yang dilakukan adalah dengan teknik *freeze dry* dengan variasi lama pembekuan 2, 4, dan 6 jam pada suhu -80°C . Proses selanjutnya dengan pengeringan dalam *lyophilizer*. Hasilnya dikarakterisasi dengan menggunakan FTIR, SEM, dan diuji kekuatan tekan dengan *Autograf* serta uji sitotoksitas dengan *MTT assay*. Hasil FTIR membuktikan serapan kolagen dan hidroksiapatit tergabung secara kimia ditunjukkan dengan serapan gugus fungsi yang tidak berhimpit antara gugus fungsi kolagen dan hidroksiapatit dengan komposit. Ukuran pori terbesar diperoleh pada waktu pembekuan selama 2 jam yaitu sebesar $774\ \mu\text{m}$ dan yang terkecil pada pembekuan selama 6 jam yaitu sebesar $640\ \mu\text{m}$. Hasil uji kekuatan tekan komposit untuk pembekuan selama 2, 4, dan 6 jam masing-masing 737 KPa, 842 KPa dan 707.7 KPa. Hasil uji sitotoksitas dengan *MTT assay* menunjukkan komposit tidak toksik dengan persentase sel hidup di atas 100%.

Kata kunci : Komposit Kolagen-Hidroksiapatit, Makroporus, *Bone Graft*

PENDAHULUAN

Setiap tahun kebutuhan *bone graft* terus bertambah. Hal ini disebabkan oleh meningkatnya jumlah kecelakaan yang mengakibatkan patah tulang, penyakit bawaan, dan non bawaan. 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).

Bagian tubuh yang paling sering terjadi patah tulang adalah bagian panggul, pergelangan kaki, tibia, dan fibula (Ficai *et al.*, 2011). *Bone graft* yang biasanya digunakan adalah *autograft* dan *allograft*. Namun, *autograft* dan *allograft* tidak dapat memenuhi keseluruhan kebutuhan *bone graft* yang terus meningkat. Upaya untuk mengatasi masalah ini adalah penggunaan *bone graft* sintesis.

Syarat yang harus dipenuhi oleh *bone graft* sintesis adalah dapat diterima tubuh atau biokompatibel dan menguntungkan bagi proses osteokonduksi, osteoinduksi, dan osteogenesis tulang. Osteokonduktif dan osteoinduktif adalah hal terpenting untuk biomaterial *resorbable* guna mengarahkan dan mendorong formasi pertumbuhan jaringan (Wahl dan Czernuszka, 2006). Osteokonduktif dan osteointegrasi dari *bone graft* berhubungan dengan tingkat porositas dan ukuran pori (Develioglu *et al.* 2005).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, persyaratan minimum untuk ukuran pori dianggap $\sim 100\mu\text{m}$ karena ukuran sel, persyaratan migrasi dan transport sel. Namun, dianjurkan ukuran pori $>300\ \mu\text{m}$ karena meningkatkan pembentukan tulang baru dan pembentukan kapiler (Karageorgiou, 2005). Makroporositas yang tinggi dapat meningkatkan pembentukan tulang, akan tetapi nilai yang lebih tinggi dari 50% dapat mengakibatkan hilangnya sifat mekanik biomaterial (Lu JX *et al.*, 1999).

Bone graft sintesis yang baik adalah *bone graft* yang secara struktur dan komposisi mirip dengan tulang alami. Komposit kolagen-hidroksiapatit adalah *bone graft* sintesis yang sangat mirip dengan tulang dari banyak sudut pandang. Tulang terdiri dari kolagen dan hidroksiapatit sebagai komponen utama dan beberapa persen dari komponen lainnya (Vaccaro, 2002). Komposit kolagen-hidroksiapatit saat ditanamkan dalam tubuh manusia menunjukkan sifat osteokonduktif yang lebih baik dibandingkan dengan hidroksiapatit monolitik dan menghasilkan kalsifikasi matriks tulang yang persis sama (Serre *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995). Selain itu, komposit kolagen-hidroksiapatit terbukti biokompatibel baik pada manusia maupun hewan (Serre *et al.*, 1993; Scabbia dan Trombelli., 2004).

Upaya untuk mendapatkan komposit dengan struktur dan komposisi yang sama dengan tulang alami adalah mengolaborasi beberapa metode sintesis. Kunci dalam sintesis makroporus salah satunya adalah dengan variasi laju pembekuan (Wahl dan Czernuszka, 2006). Metode sintesis yang paling berguna untuk fabrikasi material porous adalah metode *freeze-drying*. Pada metode *freeze-drying*, pengendalian pertumbuhan kristal es sangat penting untuk mendapatkan diameter dan bentuk pori yang sesuai, karena struktur pori adalah replikasi dari jeratan dendrite kristal es. Pada prinsipnya metode *freeze-drying* terdiri atas dua urutan proses, yaitu pembekuan yang dilanjutkan dengan pengeringan. Diameter pori dapat dikontrol pada tahap pembekuan. Pada penelitian ini, kontrol ukuran makroporus komposit dilakukan dengan beberapa variasi waktu pembekuan.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan untuk membuat komposit kolagen-hidroksiapatit berporus dengan teknik *freeze-drying* adalah hidroksiapatit bubuk dengan ukuran butir 150-355 μm , HCL, NaOH, Na_2HPO_4 , CH_3COOH , NH_3 , asam fosfat dan aquades. Hidroksiapatit yang digunakan berasal dari tulang sapi dan kolagen diekstraksi dari cakar ayam.

Kolagen diekstraksi dari cakar ayam broiler. Ekstraksi kolagen dari cakar ayam digunakan metode Prayitno (2007) dimodifikasi. Cakar ayam yang digunakan berasal dari penjual daging ayam di pasar Manukan Kulon Surabaya.

Cakar ayam yang telah terkumpul dicuci bersih dan disimpan dalam *freezer*. Penyimpanan dalam *freezer* dimaksudkan supaya cakar ayam tidak membusuk. Cakar ayam dikeluarkan dari *freezer* kemudian dipisahkan dari tulangnya dengan dipotong-potong menggunakan pisau untuk memudahkan proses penghancuran. Potongan cakar selanjutnya dihancurkan dengan blender. Reduksi ukuran ini untuk mempermudah proses peregang kolagen oleh larutan asam. Cakar yang telah hancur ditimbang sebanyak 100 gram kemudian direndam selama 24 jam dengan larutan HCL 5% dengan volume 8 kali berat sampel. Selama perendaman, sampel disimpan dalam kulkas.

Setelah mencapai waktu perendaman, cairan dipisahkan melalui penyaringan dengan kain mori. Filtrat (cairan hasil penyaringan) ditambah larutan NaOH 1 N sampai mencapai pH netral dan didiamkan sampai kolagen menggumpal. Saat mendekati pH netral, terlihat gumpalan sedikit demi sedikit mulai teramati. Begitu mencapai pH netral, serabut-serabut kolagen mulai terbentuk dan menyatu sehingga terlihat gumpalan yang nyata. Gumpalan kolagen terbentuk sempurna pada pH netral (pH 7). Selanjutnya

gumpalan kolagen disaring dengan kertas saring. Kolagen yang dihasilkan dikeringkan dengan metode *freeze-dry*.

Sintesis Komposit Kolagen-Hidroksiapatit

Sintesis komposit kolagen-hidroksiapatit dengan metode *freeze-drying* dimulai dengan pencampuran kolagen dan hidroksiapatit dengan rasio 20:80. Sebelum dua bahan dicampur, kolagen dan hidroksiapatit dilarutkan terlebih dahulu untuk mendapatkan campuran yang homogen.

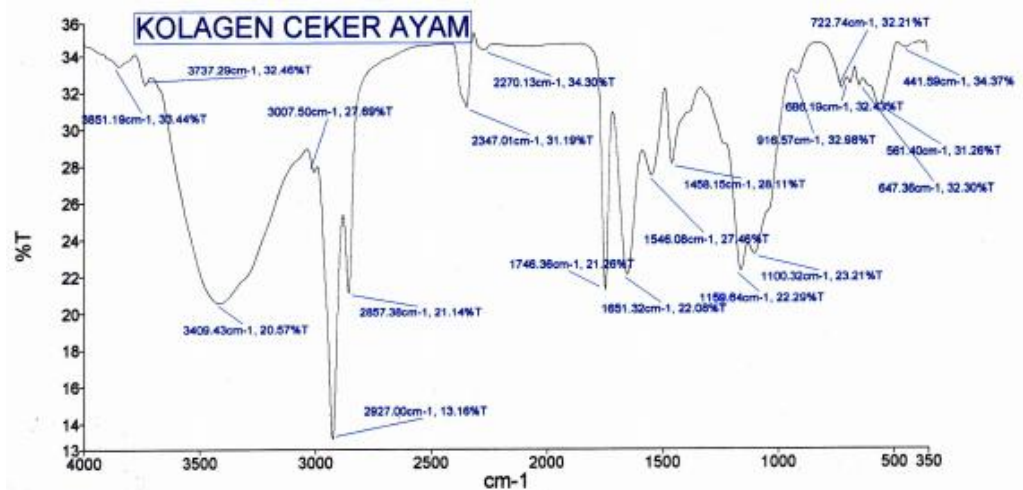
Kolagen dilarutkan dengan asam asetat dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya ditambahkan dengan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dengan rasio 1:1. Campuran dinetralkan dengan NaOH 1M. Adapun hidroksiapatit dilarutkan dengan asam fosfat. Perbandingan hidroksiapatit asam fosfat yaitu 1:4. Larutan hidroksiapatit selanjutnya dinetralkan dengan NH_3 tetes demi tetes dengan pipet gelas. pH netral diukur dengan menggunakan kertas lakmus asam basa. Larutan hidroksiapatit dan larutan kolagen yang telah netral dicampur sambil diaduk perlahan-lahan. Campuran kolagen hidroksiapatit dimasukkan ke dalam wadah tabung silinder setinggi 2 cm dan dilabeli. Selanjutnya dibekukan dengan suhu -80°C dengan waktu pembekuan 2 jam, 4 jam, dan 6 jam. Komposit kolagen-hidroksiapatit yang telah kering dikeluarkan dari cetakan untuk dikarakterisasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil sintesis kolagen berbentuk serbuk berwarna putih kekuningan yang tampak pada Gambar 1. Kolagen hasil sintesis diuji dengan FTIR diperoleh grafik transmisi (%) terhadap bilangan gelombang (cm^{-1}) pada Gambar 2.



Gambar 1 Kolagen hasil sintesis



Gambar 2 Hasil Uji FTIR Serbuk Kolagen Cakar ayam

Grafik hasil uji FTIR pada Gambar 2 dianalisis dengan membandingkan pita absorpsi yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi dan menggunakan spektrum senyawa pembanding yang sudah diketahui.. Hasil perbandingan spektrum inframerah kolagen dengan tabel korelasi disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Karakteristik absorpsi kolagen hasil ekstraksi dari cakar ayam

No	Rentang frekuensi (cm ⁻¹)	Peak (cm ⁻¹)	Ikatan
1	3500-3300	3409	N-H
2	3000-2500	2927	O-H
3	3000-2500	2857	O-H
4	1760-1670	1746	C=O
5	1640-1660	1651	N-H
6	1500-1600	1546	N-H
7	1470-1350	1458	C-H
8	1340-1020	1160	C-N
9	1340-1020	1100	C-N
10	1000-675	917	C-H
11	870-675	723	C-H
12	870-675	686	C-H
13	700-610	647	C-H

Spektrum utama dari kolagen adalah adanya amida I banding yang muncul dari stretching vibration C=O (karbonil) grup amida dari protein. Amida I ditemukan pada 1651 cm⁻¹, amida II ditemukan pada 1546 cm⁻¹ dan amina C-N ditemukan pada 1100cm⁻¹ dan 1159 cm⁻¹. Amina N-H ditemukan pada 3409 cm⁻¹. Hasil perbandingan grafik FTIR

kolagen dari cakar ayam dengan kolagen murni pada Kirubanandan, 2010 menunjukkan pita serapan yang mirip dan gugus yang sama. Hasil perbandingan pita absorbs dengan tabel korelasi ataupun dengan senyawa pembanding yang telah diketahui menunjukkan bahwa kolagen cocok sebagai bahan untuk sintesis komposit.

Komposit kolagen-hidroksiapatit hasil sintesis menggunakan metode *freeze-dry* dengan variasi pembekuan 2, 4 dan 6 jam tampak pada Gambar.3. Komposit dengan 2 jam pembekuan diuji dengan FTIR. diperoleh grafik pada Gambar 4.

Grafik hasil uji FTIR dianalisis dengan membandingkan pita absorbs yang terbentuk pada spektrum inframerah menggunakan tabel korelasi. Hasil perbandingan pita absorbs disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 Karakteristik absorpsi komposit kolagen-hidroksiapatit

No	Rentang frekuensi (cm ⁻¹)	Peak (cm ⁻¹)	Ikatan
1	3640-3160	3232	O-H
2	3000-2500	3081	O-H
3	2960-2850	2873	C-H
4	2260-2100	2202	C≡C
5	1760-1670	1716	C=O
6	1600-1700	1672	N-H
7	1500-1600	1519	N-H
8	1470-1350	1460	C-H
9	1470-1350	1405	C-H
10	1340-1020	1200	C-N
11	1340-1020	1074	C-N
12	900-1200	1018	PO ₄ ³⁻
13	900-1200	966	PO ₄ ³⁻
14	500-600	553	C-X

Puncak karakteristik HA adalah pada panjang gelombang 500 cm⁻¹-600 cm⁻¹. Pada hasil FTIR komposit kolagen-hidroksiapatit, ditemukan pada panjang gelombang 553 cm⁻¹. Puncak karakteristik kolagen ditemukan pada 2873 untuk CH stretching, 1716 cm⁻¹ untuk C=O grup, dan di atas 3000 cm⁻¹ untuk N-H. Amida I banding antara panjang gelombang 1600 cm⁻¹-1700 cm⁻¹ dan PO₄³⁻ banding antara 900 cm⁻¹-1200 cm⁻¹.

Data serapan gugus fungsi pada spektrum FTIR digunakan untuk mengetahui jenis reaksi yang terjadi. Jika data berimpit dengan data spektrum FTIR bahan yang digunakan, maka proses yang terjadi merupakan proses fisika. Sedangkan jika data tidak

berimpit maka proses yang terjadi adalah reaksi kimia. Berdasarkan perbandingan hasil FTIR kolagen, hidroksiapatit, dan komposit diperoleh reaksi yang terjadi pada proses sintesis komposit kolagen-hidroksiapatit adalah reaksi kimia.



(a)



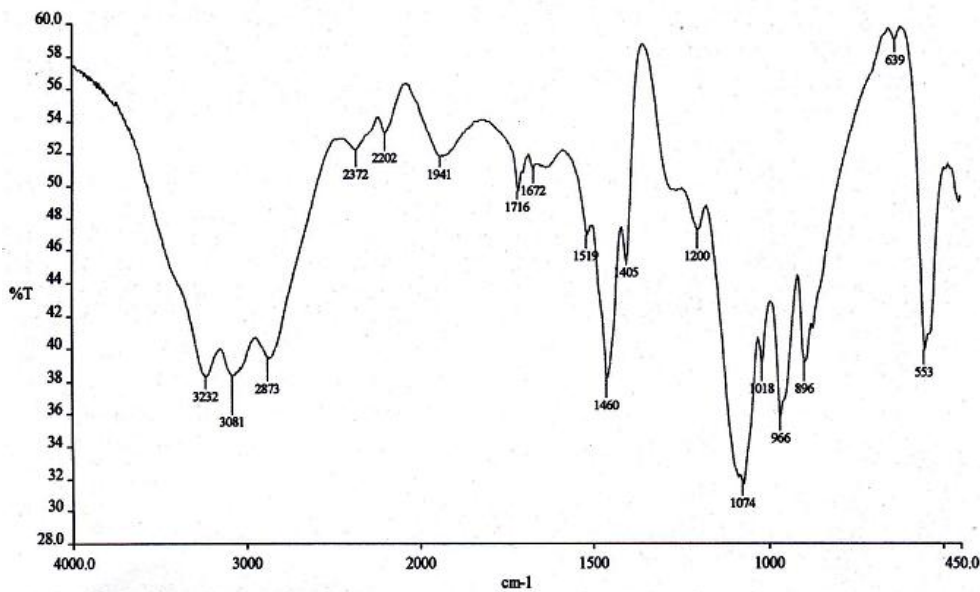
(b)



(c)

Gambar 3 Komposit Kolagen-Hidroksiapatit dengan:

(a) 2 jam pembekuan, (b) 4 jam pembekuan dan (c) 6 jam pembekuan



Gambar 4 Hasil FTIR komposit kolagen-hidroksiapatit

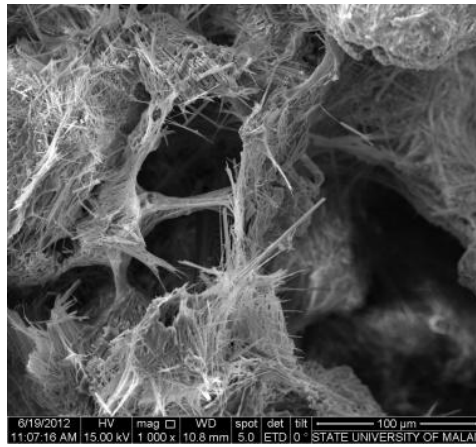
Bentuk Makroporus

Makroporus yang terbentuk dengan metode *freeze-drying* pada penelitian ini menghasilkan ukuran pori yang tidak merata. Pada metode *freeze-drying*, pengendalian pertumbuhan kristal es sangat penting untuk mendapatkan diameter dan bentuk pori yang sesuai. Diameter pori dikontrol pada tahap pembekuan. Pembekuan dilakukan pada temperatur -80°C dengan tiga variasi waktu pembekuan yaitu 2,4, dan 6 jam. Hasil citra SEM dengan perbesaran 1000x menunjukkan perbedaan yang signifikan. Perbedaan yang dapat diamati adalah bentuk makroporus, kekasaran permukaan, dan pola penggabungan kolagen dengan hidroksiapatit pada komposit.

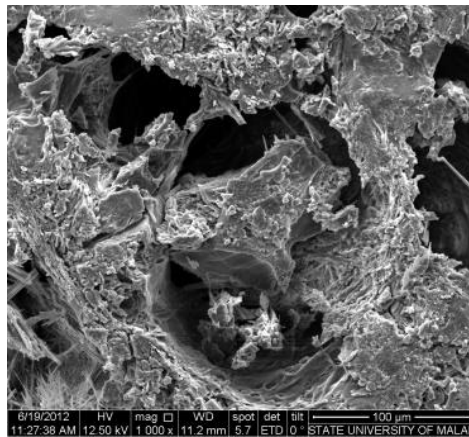
Pada Gambar 5 terlihat bentuk makroporus komposit tidak merata. Pembekuan pada suhu -80°C selama dua jam membentuk dendrite kristal es yang tidak teratur sehingga ukuran makroporus tidak seragam dan tidak ada *cross link*. Kolagen tampak berbentuk jarum panjang yang menjulang. Serabut kolagen bergabung dalam ikatan lapisan hidroksiapatit yang tipis. Serabut kolagen berperan sebagai serat komposit dan hidroksiapatit berperan sebagai matriks komposit. Secara makro, permukaan komposit terlihat kasar.

Komposit yang dibekukan selama empat jam pada gambar 6 tampak lebih padat dibandingkan komposit yang dibekukan selama dua jam. Serabut kolagen tidak dapat dibedakan dengan jelas seperti pada Gambar 4.5. Gabungan kolagen dan hidroksiapatit pada komposit menyatu dengan baik sehingga tidak terlihat batas antara keduanya.

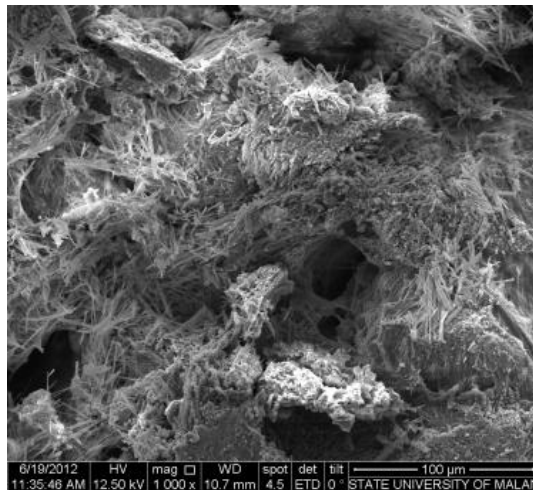
Secara makro, komposit terlihat lebih halus dibandingkan dengan komposit yang dibekukan selama dua jam.



Gambar 5. Permukaan mikroskopis komposit dengan 2 jam pembekuan



Gambar 6. Permukaan mikroskopis komposit dengan 4 jam pembekuan



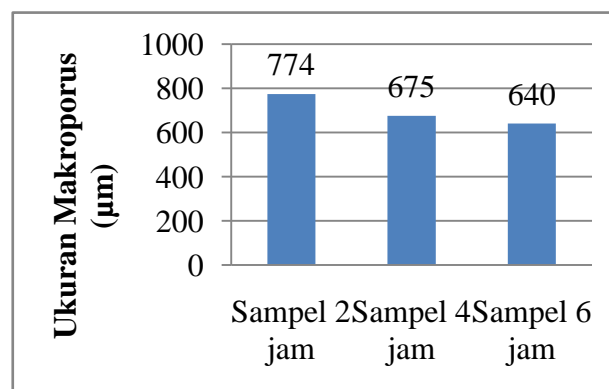
Gambar 4.7 Permukaan mikroskopis komposit dengan 6 jam pembekuan

Komposit kolagen-hidroksiapatit dengan pembekuan selama enam jam tidak sepadat komposit dengan pembekuan selama empat jam. Secara makro, permukaan komposit terlihat kasar. Serabut kolagen tampak lebih pendek jika dibandingkan dengan kolagen pada komposit yang dibekukan selama dua jam. Kolagen bergabung dengan hidroksiapatit dan masih terlihat batas antara kolagen dengan hidroksiapatit.

Komposit yang diberi waktu pembekuan berbeda menghasilkan kekasaran yang berbeda dan pola gabungan yang berbeda. Ditinjau dari batas antara kolagen dengan hidroksiapatit dalam komposit, komposit yang dibekukan selama dua jam bergabung dengan baik sehingga membentuk kerapatan yang besar. Kontrol lama waktu pembekuan dengan variasi waktu pembekuan pada suhu -80°C dapat membentuk makroporus dengan topografi permukaan yang berbeda-beda. Namun, metode ini tidak dapat membentuk makroporus dengan bentuk dan ukuran yang seragam dan teratur sehingga tidak ada *cross link* antar pori. Hal ini terjadi karena struktur pori adalah replikasi dari jeratan dendrit kristal es. Kristal es yang terbentuk selain bergantung pada suhu pembekuan dan lama pembekuan, juga bergantung pada konsentrasi zat terlarut dalam komposit.

Ukuran Makroporus

Hasil analisis topografi komposit menunjukkan perbedaan dalam bentuk dan pola persenyawaan kolagen dengan hidroksiapatit. Selain bentuk dan model persenyawaan, ukuran makroporus yang dihasilkan juga berbeda-beda dan tidak merata. Gambar 8 menunjukkan rata-rata ukuran pori yang terbentuk pada komposit kolagen-hidroksiapatit dengan beberapa variasi pembekuan.



Gambar 8 Rata-rata Ukuran makroporus yang terukur

Rata-rata ukuran pori terbesar yang terbentuk pada komposit kolagen-hidroksiapatit adalah pada pembekuan selama dua jam yaitu sebesar 774 μm . Sedangkan rata-rata ukuran pori yang terkecil yaitu 640 terbentuk pada waktu pembekuan selama

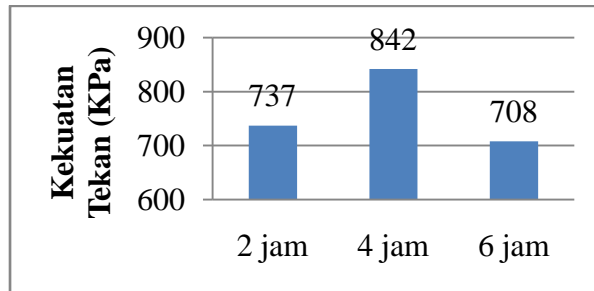
enam jam. Berdasarkan penelitian sebelumnya, persyaratan minimum untuk ukuran pori dianggap $\sim 100\mu\text{m}$ karena ukuran sel, persyaratan migrasi dan transport sel. Namun, dianjurkan ukuran pori lebih besar dari $300\mu\text{m}$ karena meningkatkan pembentukan tulang baru dan pembentukan kapiler (Karageorgiou, 2005). Komposit kolagen-hidroksiapatit yang disintesis dengan ketiga variasi waktu pembekuan dapat memenuhi standar ukuran pori yang dianjurkan.

O'Brien *et al.* tahun 2004 telah melakukan sintesis *scaffold* kolagen-GAG dengan variasi laju pembekuan 0.6°C , 0.7°C , 0.9°C , dan 4.1°C per menit. Hasilnya menunjukkan bahwa ukuran pori *scaffold* kolagen-GAG terbesar yaitu $\pm 130\mu\text{m}$ didapatkan pada laju pembekuan 0.6°C per menit. Hal ini membuktikan bahwa laju pembekuan yang semakin rendah menghasilkan ukuran pori yang semakin besar. Dalam penelitian ini, diperoleh hasil bahwa dengan waktu pembekuan yang paling cepat yaitu 2 jam menghasilkan ukuran pori yang paling besar.

Yunoki *et al.* tahun 2006 yang telah melakukan sintesis komposit kolagen-hidroksiapatit dengan suhu pembekuan -20°C dengan metode *freeze-drying*, menghasilkan komposit dengan ukuran pori sebesar $200-500\mu\text{m}$. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian ini, maka pembekuan dengan suhu -80°C dapat menghasilkan ukuran pori yang lebih besar. Hal ini terjadi karena semakin rendah suhu pembekuan, semakin cepat komposit membeku, sehingga semakin cepat pula terbentuknya dendrite kristal es.

Hasil Uji Kekuatan Tekan

Pengujian sifat mekanik kekuatan tekan pada Gambar 9 menunjukkan bahwa komposit yang dibekukan selama 2 jam dengan porositas sebesar 52% memiliki kekuatan tekan yang lebih rendah dibandingkan komposit yang dibekukan selama 4 jam. Komposit dengan 4 jam pembekuan memiliki densitas yang paling tinggi sehingga mempengaruhi sifat biomekanik.

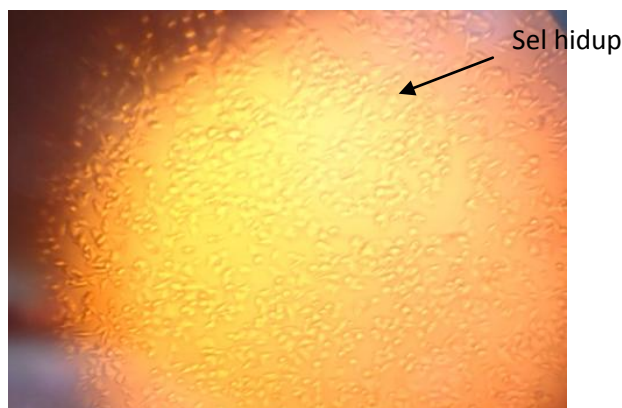


Gambar 9 Diagram pengaruh waktu pembekuan terhadap kekuatan tekan

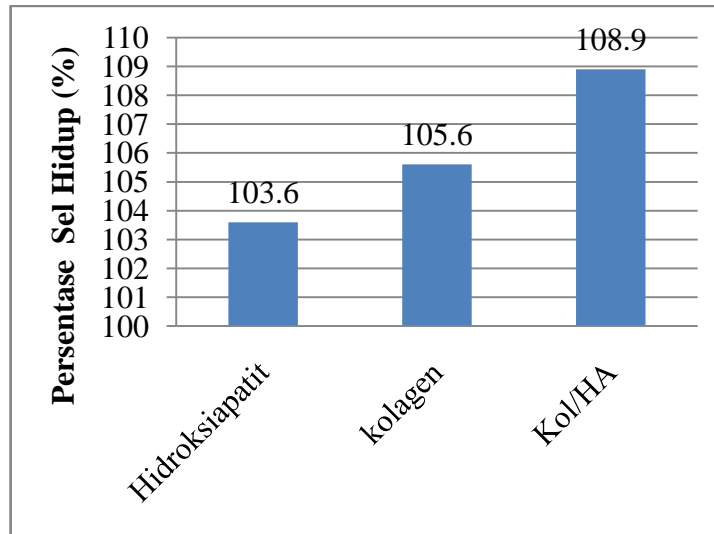
Komposit yang dibekukan selama 4 jam memiliki kekuatan tekan yang paling tinggi yaitu sebesar 842 KPa dibandingkan dengan sampel yang lain. Sedangkan yang paling rendah adalah yang dibekukan selama 6 jam yaitu 708 KPa. Dibandingkan dengan sifat biomekanik tulang sehat, nilai kekuatan tekan komposit yang dihasilkan masih belum memenuhi standar yaitu 2-12 MPa,

Hasil Uji Sitotoksitas

Selain bentuk pori yang terbentuk dan struktur jalinan kolagen dengan hidroksiapatit, biokompatibilitas adalah salah satu hal terpenting dalam aplikasi. Sitotoksitas suatu material adalah tahap awal dalam penentuan biokompatibilitas material implant. Uji MTT adalah salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksik. Hasil Pengamatan sel hidup dengan mikroskop ditunjukkan pada Gambar 10.



Gambar 10 Sel Hidup Hasil Uji MTT



Gambar 11. Hasil Uji Sitotoksitas dengan Metode MTT

Persentase sel hidup yang di dapatkan dari uji MTT pada Gambar 11 membuktikan ketoksikan senyawa bahan dan komposit. Grafik hasil uji MTT menunjukkan kolagen dan hidroksiapatit tidak toksik karena persentase sel hidup di atas 100%. Komposit kolagen–hidroksiapatit meningkatkan persentase sel hidup. Hal ini membuktikan bahwa penggunaan kolagen dan hidroksiapatit secara bersama-sama menguntungkan dalam hal pertumbuhan sel. Kolagen dan hidroksiapatit dibuktikan dapat meningkatkan diferensiasi osteoblas (Xie *et al.*, 2004), tapi dikombinasikan bersama-sama terbukti mempercepat osteogenesis. Komposit kolagen-hidroksiapatit saat ditanamkan dalam tubuh manusia menunjukkan sifat osteokonduktif yang lebih baik dibandingkan dengan hidroksiapatit monolitik dan menghasilkan kalsifikasi matriks tulang yang persis sama (Serre *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1995).

Potensi sebagai Kandidat *Bone Graft*

Bentuk pori yang terbentuk dan struktur jalinan kolagen dengan hidroksiapatit dalam komposit adalah dua hal penting yang berpengaruh pada proses regenerasi tulang. Persenyawaan antara kolagen dan kristal hidroksiapatit bertanggung jawab atas daya tekan dan daya regang tulang yang besar. Cara penyusunan tulang serupa dengan pembuatan palang beton. Serat-serat kolagen seperti batang-batang baja pada beton dan hidroksiapatit serta garam-garam tulang yang lain sama seperti semen, pasir dan batu pada beton tersebut. Analisis topografi komposit dengan SEM menunjukkan pola gabungan kolagen dengan hidroksiapatit yang sesuai dengan analogi beton di atas.

Selain bentuk pori yang terbentuk dan struktur jalinan kolagen dengan hidroksiapatit, biokompatibilitas adalah salah satu hal terpenting dalam aplikasi. Syarat

yang harus dipenuhi oleh *bone graft* sintesis adalah dapat diterima tubuh atau biokompatibel dan menguntungkan bagi proses osteokonduksi, osteoinduksi, dan osteogenesis tulang. Berdasarkan tinjauan sitotoksik, komposit kolagen-hidroksiapatit terbukti tidak toksik bahkan meningkatkan persentase sel hidup dibandingkan dengan kolagen atau hidroksiapatit monolitik. Secara fisik, bentuk permukaan komposit cocok sebagai media perlekatan sel. Ukuran makroporus komposit yang besar dengan rata-rata berukuran antara 640-774 μm mendorong proses osteokonduksi tulang. Ditinjau dari pola persenyawaan kolagen dengan hidroksiapatit, kerapatan, ukuran makroporus, dan kekuatan tekan, komposit yang dibekukan selama 4 jam lebih cocok sebagai kandidat *bone graft* dibandingkan dengan komposit 2 dan 6 jam pembekuan.

KESIMPULAN

Kontrol waktu pembekuan mempengaruhi ukuran makroporus dan sifat mekaniknya. Komposit dengan ukuran pori terbesar diperoleh dengan 2 jam pembekuan yaitu 774 μm dan yang terkecil pada pembekuan selama 6 jam yaitu 640 μm . Komposit dengan pembekuan 4 jam memiliki rata-rata ukuran makroporus 675 μm dengan kekuatan tekan paling besar yaitu 842 KPa. Komposit kolagen-hidroksiapatit terbukti *non*-toksik dengan persentase sel hidup di atas 100%.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih kepada Dr. Prihartini Widiyanti, drg., M.Kes dan Dr. Ferdiansyah, dr., SPOT atas saran dan kritik dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Anselme, K. 2000. *Osteoblast adhesion on biomaterials*. *Biomaterials* 21, 667.
- Attaf, Brahim .2011..*Advances in Composite Materials for Medicine and Nanotechnology*. Tech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia
- Chang, M. C. and Tanaka, J. 2002. *FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde*. *Biomaterials* 23:4811–818.
- Develioglu, H., Koptagel, E., Gedik, R. and Dupoirieux, L. 2005. *The effect of a biphasic ceramic on calvarial bone regeneration in rats*. *Journal of Oral Implantology* 31(6):309-312.

- Ficai, A., Andronescu, E., Voicu, G., Ficai, D. 2011. *Advances in Collagen/Hidroxyapatite Composite Material*. InTech
- Gunawarman, Malik, A., Mulyadi S., Riana, Hayani, A. 2010. *Karakteristik Fisik dan Mekanik Tulang Sapi Variasi Berat Hidup sebagai Referensi Desain Material Implan*. Seminar Nasional Tahunan Teknik Mesin (SNMTTM) ke-9
- Karageorgiou V, Kaplan D .2005. *Porosity of 3D biornaterial scaffolds and osteogenesis*. *Biomaterials* 26:5474-5491.
- Kirubanandan, S dan Sehgal, P.K, 2010. *Regeneration of Soft Tissue Using Porous Bovine Collagen Scaffold*. *Journal of Optoelectronics and Biomedical Materials*. Vol. 2.
- Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF (2006) *Bone graft substitutes*. *Expert Rev Med Dev* 3: 49-57.
- Lu JX, Flautre B et al. 1999. *Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and vivo*. *J Mater Sci Mater Med* 10:111–120.
- Meiyanto, E., Sugiyanto, Murwanti, R., 2003, *Efek Antikarsinogenesis Ekstrak Etanolik Daun Gynura procumbens (Lourr) Merr pada Kanker Payudara Tikus yang Diinduksi dengan DMBA*, Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI/1 Perguruan Tinggi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Melannisa, R., 2004, *Pengaruh PGV-1 Pada Sel Kanker Payudara T47D Yang Diinduksi 17 β -estradiol: Kajian Antiproliferasi, Pemacuan Apoptosis, dan Antiangiogenesis*, Tesis, Sekolah Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada.
- Moran, Michael J. dan Shapiro, Howard N. 2004. *Termodinamika Teknik*. Jakarta: Erlangga.
- O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson L. 2004. *Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds*. *Biomaterials* 25: 1077-1086.
- Prayitno, 2007. *Ekastraksi Kolagen Cakar Ayam dengan Berbagai Jenis Larutan Asam dan Lama Perendamannya*. *Jurnal Animal Production* Vol. 9. No. 2.
- Ratner, Buddy D., dkk. 1996. *Biomaterial Science, An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press.:1-8.

- Scabbia A, Trombelli L (2004) *A comparative study on the use of a HA/collagen/chondroitin sulphate biomaterial (Biostite®) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-Oss®) in the treatment of deep intra-osseous defects.* J Clin Periodontol 31: 348-355.
- Schoof H, Bruns L, Fischer A, Heschel I, Rau G. 2000. *Dendritic ice morphology in unidirectionally solidified collagen suspensions.* J Crystal Growth 209: 122-129.
- Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G. 1993. *In vitro induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials.* Biomaterials 14: 97-106.
- Sloane, Ethel. 1995. *Anatomi dan Fisiologi untuk Pemula.* EGC: Jakarta.
- Vaccaro, Alexander R. 2002. *The Role of the Osteoconductive Scaffold in Synthetic Bone Graft.* Orthobluejournal vol 22 no 5/ Supplement
- Wahl, DA dan Czernuszka .2006. *Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair.* European Cells and Material Vol.11 pages 43-56
- Wang RZ, Cui FZ, Lu HB, Wen HB, Ma CL, Li HD. 1995. *Synthesis of Nanophase Hydroxyapatite Collagen Composite.* J Mater Sci Lett 14: 490-492.
- Wang, X., Nyman, J.S., Dong X., Leng,H., and Reyes, M. 2010. *Fundamental Biomechanics in Bone Tissue Engineering.* Morgan and Claypool.
- Yunoki, Shunji et al. 2006. *Fabrication and Mechanical and Tissue Ingrowth Properties of Unidirectionally Porous Hydroxyapatite/Collagen Composite.* Journal of Biomedical Materials Part B:166-173