

FORMULATION AND CHARACTERIZATION MEMBRANE BASED POROUS HYDROGEL OF ETHYL CELLULOSE AND GELATIN BY USING ICE PARTICLE LEACHING METHOD AS SCAFFOLDING IN SOFT TISSUE ENGINEERING

Putri Normasari* Ingenida Hadning** Dian Purwita Sari***
Undergraduated, Muhammadiyah University of Yogyakarta* Lecturer,
Muhammadiyah University of Yogyakarta*
putrinormasari1@gmail.com

Tissues and organs had many functions for every mechanisms in the body. If its get damaged, body will automatically restore it. However body's recovery has its limit, especially with mild or severe damage in tissues and organs. Because of its important function, recovery of the damaged tissues and organs need be done as soon as possible. Recovery can be done with standard treatment, using drugs or pharmacological treatment. Tissue engineering therapy could became an alternative if standard treatment fails. The aims of tissue engineering is stimulate body to form new tissue at the damaged area and carried out by providing the right materials to trigger the cells to regenerate.

Porous hydrogel membranes produced using ice particle leaching method. Hydrogel formulation of porous membrane was conducted by varying the composition of ethyl cellulose and gelatin i.e F1 (1: 1), F2 (1: 1.5) and F3 (1: 2). Yields analysis will be conducted using physics characteristic such as organoleptic test, percent of age swelling, weight loss, UTS (Ultimate Tensile Strength) and the description of porous hydrogel membrane using SEM (Scanning Electron Microscope).

The results showed that the combination of ethyl cellulose and gelatin can be formulated into a porous hydrogel membranes with ice particle leaching method. Organoleptic test has the highest fineness in F3, and the most elastic in F1. Percentage of swelling age with highest value in the F1 is $23.73 \pm 9.20\%$. The smallest values of weight loss at $t=15$ minutes found the F2 is $0.45 \pm 0.01\%$ and at $t=30$ minutes the smallest value found in F1 is $0.82 \pm 0.05\%$. UTS in F1 has the smallest value i.e 0,8967 MPa. The result of the examination using SEM at F2 showed pores with a size of $2,830 \mu\text{m}$ at a magnification of 3.000 times. The physical-mechanical characteristics of the hydrogel membrane needs to be improved for the purpose of tissue engineering applications.

Keyword : Tissue Engineering, scaffold, ethyl cellulose, gelatin, ice particle leaching.

PENDAHULUAN

Salah satu masalah kesehatan adalah kerusakan jaringan dan organ. Organ yang mengalami kerusakan,

fungsi kerja tubuh menjadi berkurang sehingga membutuhkan pemulihan. Pemulihan atau pengobatan standar memiliki keterbatasan sehingga

diperlukan terapi lain. Upaya untuk mengatasi masalah dan keterbatasan terapi tersebut adalah dengan dikembangkan terapi baru seperti rekayasa jaringan. Rekayasa jaringan bertujuan untuk menstimulasi tubuh membentuk jaringan baru pada area yang rusak dan dilakukan dengan cara memberikan bahan-bahan yang tepat untuk memicu sel-sel agar dapat melakukan regenerasi (Abidin, 2007).

Perancah sebagai salah satu pendekatan rekayasa jaringan memiliki fungsi sebagai substrat pendukung pertumbuhan sel yang diformulasi dalam bentuk atau teknik gelasi pada *biohydrogel* (Fatimi *et al*, 2009). Salah satu teknik pembuatan rekayasa jaringan adalah *ice particle leaching*. Bahan atau polimer yang digunakan sebagai penyusun membran hidrogel yakni etil selulosa dan gelatin. Etil selulosa telah banyak digunakan dalam sistem penghantaran obat (Shokri dan Adibkia, 2013). Gelatin adalah polimer yang dibuat secara alami dari kolagen yang merupakan komponen utama pada matriks ekstrasel. Perancah berbahan gelatin dikenal memiliki karakteristik fisik-mekanik yang baik (Chang *et al*, 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk membuat membran hidrogel berpori menggunakan polimer etil selulosa dan gelatin dengan metode *ice particle leaching* serta penetapan karakteristik fisik – mekanik meliputi

analisis organoleptik, kekuatan tarik (*Ultimate Tensile Strength*), persen *age swelling*, *weight loss*, dan morfologi dengan SEM (*Scanning Electron Microscope*).

METODE PENDAHULUAN

Alat. Pipet ukur, pipet tetes, timbangan analitik, pengaduk, gelas beker (Iwaki pyrex®), gelas ukur (Iwaki pyrex®), cawan petri (Steriplan), gelas arloji (Iwaki pyrex®), *disposable petridish* (Iwaki pyrex®), *hot plate*, *water bath* (Memmert), *Universal Testing Machine (Traveling Microscope)*, SEM.

Bahan. Etil selulosa (*pharmaceutical grade*), gelatin (*pharmaceutical grade*), etanol 96% dan aquadest (CV. General Lab), gliserin (Brataco), metil paraben (Brataco), propil paraben (Brataco), NaCl fisiologis yang diperoleh dari PT. Otsuka.

Formulasi membran hidrogel berpori. Formulasi membran hidrogel dilakukan dengan beberapa komposisi yaitu etil selulosa, gelatin, etanol dan aquades terdapat pada Tabel 1 berikut.

F ^a	E ^b	G ^c	E ^d	Komponen		
				A ^e	M-P ^f	G ^g
F1	3	3	10	6	0,1	6
F2	2,4	3,6	7	6	0,1	6
F3	2	4	5	6	0,1	6

Keterangan: ^aformula, ^betil selulosa, ^cgelatin, ^detanol, ^eaquades, ^fmetil dan propil paraben, ^ggliserin

Etil selulosa dilarutkan dengan etanol 96% sedangkan gelatin dilarutkan dengan aquades panas. Gelatin yang telah dilarutkan kemudian diberikan penambahan antimikroba yaitu metil dan propil paraben 0,1% serta 6 tetes gliserin untuk menambah elastisitas membran. Bahan yang sudah homogen tersebut dicetak dalam cawan petri. Pembentukan pori dengan metode *ice particle leaching* dilakukan setelah membran hidrogel terbentuk sesuai cetakan yaitu dengan membekukan membran agar terbentuk membran solid selama 24 jam, kemudian komponen air yang membeku dilelehkan pada suhu ruang selama kurang lebih 6 hari.

Uji karakteristik fisik-mekanik membran hidrogel.

Analisis Organoleptik. Aspek yang dianalisis meliputi warna, kehalusan dan elastisitas dengan menggunakan panca indra manusia.

Uji persen *age swelling*. Langkah yang dilakukan adalah sampel sebagai berat kering ditambahkan 1 mL NaCl 0,9% kedalam masing – masing *test tube*. Sampel diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, NaCl fisiologis dihilangkan dengan kertas absorben kemudian sampel dibilas dengan aquades sebanyak tiga kali. Sampel diletakkan diatas kertas adsorben untuk menghilangkan air bekas bilasan dan dilakukan perhitungan berat basah dengan persamaan 1.

$$\% S = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

Dimana, W_s adalah berat sampel yang sudah mengembang dan W_d adalah berat sampel yang kering.

Uji *weight loss*. Langkah yang dilakukan adalah dengan menimbang berat kering membran pada waktu $t = 0$ kemudian direndam di dalam NaCl fisiologi dengan interval waktu 15 dan 30 menit. Sampel dikeringkan dan ditimbang untuk mengetahui berat kering setelah perendaman. Besar *weight loss* dihitung dengan persamaan 2.

$$\text{Weight loss} = \frac{W_{d,t=0} - W_{d,t=n}}{W_{d,t=0}}$$

Dimana, $W_{d,t=0}$ adalah berat sampel yang kering sebelum terdegradasi dan $W_{d,t=n}$ adalah berat sampel kering pada saat sudah mengalami degradasi.

Uji kekuatan tarik (*tensile strenght*).

Kekuatan tarik diperoleh dengan menggunakan pengukuran elastisitas dan gaya putus membran dan dikonversi menjadi nilai UTS (*Ultimate Tensile Strength*). UTS atau tegangan tarik maksimum didapat dengan persamaan 3.

$$UTS = \frac{F}{A}$$

dimana F adalah gaya atau beban yang diberikan hingga sampel mengalami deformasi (Newton), A adalah luas penampang bahan sebelum dibebani (m^2), dan tegangan

tarik maksimum yang didapat menggunakan satuan MPa atau Mega Pascal.

Pemeriksaan mikroskopis.

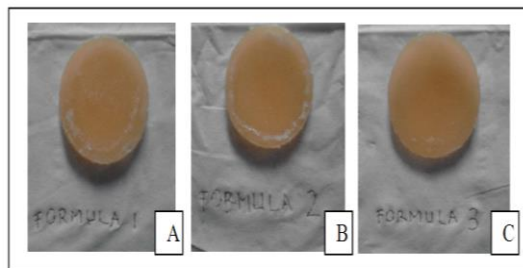
Morfologi permukaan membrane diamati dengan menggunakan alat Scanning Electrone Microscope dengan perbesaran hingga 10.000 kali dengan standar ASTM F2900-11.

ANALISIS DATA

Analisis data dilakukan secara kuantitatif dengan metode statistik uji analisis SPSS parametrik (*one way ANOVA*) dan non parametrik (*Kruskal Wallis Test*, *MannWhitney*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Membran hidrogel berpori dengan metode *ice particle leaching*. Membran hidrogel berbasis polimer etil selulosa dan gelatin dalam penelitian ini diformulasi dengan perbandingan 3 formula yaitu 1:1 ; 1:1,5 dan 1:2. Hasil pembuatan membran dapat dilihat pada Gambar 1.

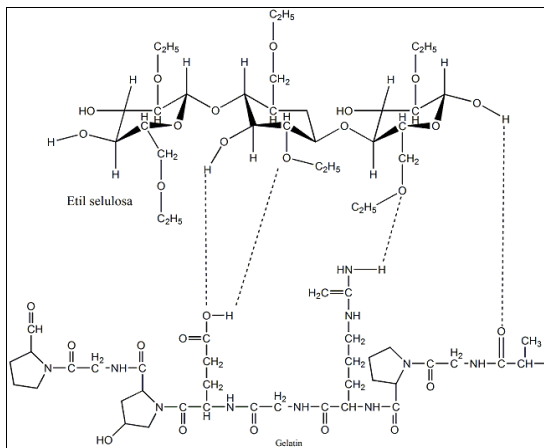


Polimer etil selulosa dan gelatin digunakan sebagai basis yang dapat membentuk membran hidrogel dengan ikatan *crosslink*, sedangkan

pori dibentuk dengan metode *ice particle leaching*. Pemilihan etil selulosa berdasarkan sifat serat selulosa yang memiliki fleksibilitas dan elastisitas yang baik (Murtaza, 2012). Gelatin digunakan sebagai polimer karena secara luas memiliki sifat biokompatibel yang baik (Young *et al*, 2005). Gelatin juga mampu menyerap air 5-10 kali bobotnya (Maddu *et al*, 2006).

Gugus fungsi primer pada gelatin yang diduga menjadi target *crosslink* adalah gugus amina (-NH₂), amida (-CONH) dan karboksilat (-COOH) pada gelatin yaitu pada gugus yang memiliki muatan positif (H) dalam strukturnya (Syed, 2011). Gelatin yang dicampurkan dengan air akan membentuk ikatan hidrogen. Ikatan ini terbentuk antara gugus amina (-NH₂) dan amida (-CONH) pada gelatin yaitu pada gugus yang memiliki muatan positif (H) dalam strukturnya. Atom H pada molekul H₂O memiliki muatan parsial positif, dan atom O memiliki muatan parsial negatif. Hal ini dikarenakan ikatan H₂O pada air bukan ikatan kovalen sempurna. Adanya penambahan suhu, mengakibatkan semakin reaktifnya atom O. Terbentuknya ikatan hidrogen akan memungkinkan gelatin untuk membentuk ikatan dengan gelatin maupun polimer lainnya dalam hal ini akan berikatan dengan gugus etoksi (-OC₂H₅) pada etil selulosa melalui proses *crosslink* sehingga akan terbentuk suatu membran hidrogel. Ikatan hidrogen

menunjukkan bahwa ikatan silang yang terjadi merupakan ikatan antara atom hidrogen dengan satu atom elektronegatif dan tertarik ke arah atom elektronegatif lainnya. Mekanisme ikatan secara molekuler yang dimungkinkan terjadi pada penelitian ini adalah terbentuknya ikatan hidrogen yang ditunjukkan dengan garis putus-putus pada Gambar 2.



Tingginya kandungan air dalam sediaan gel dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi mikrobial, yang secara efektif dapat dihindari dengan penambahan bahan pengawet. Penambahan gliserin pada formulasi berfungsi sebagai *plasticizer* yang dapat meningkatkan fleksibilitas membran dan menurunkan sifat *barrier* membran jika disimpan pada suhu rendah (Wahyuni, 2001). Bahan yang ditambahkan seperti antimikrobal dan gliserin tidak mempengaruhi membran secara molekuler, karena komposisinya yang jauh lebih sedikit.

Metode pembentukan membran hidrogel berpori pada penelitian ini

menggunakan metode *ice particle leaching*. Menurut Gilson *et al* (2006), kelebihan dari metode ini adalah pori dapat dikontrol dengan mudah. Hal yang mempengaruhi terbentuknya pori dalam proses *ice particle leaching* adalah pengadukan, volume polimer dan pelarut yang digunakan.

Analisis karakteristik fisik-mekanik membran hidrogel berpori.

Analisis persen *age swelling*. Kemampuan membran untuk mengembang dalam larutan NaCl seperti halnya cairan tubuh ditunjukkan dengan data hasil perhitungan uji persen *age swelling* dapat dilihat pada Tabel 2.

Formula	Avr ± SD (%)
FI (1:1)	23,73 ± 9,20
F2 (1:1,5)	19,59 ± 3,88
F3 (1:2)	5,22 ± 2,29

Pada Tabel 2 persen *age swelling* tertinggi terdapat pada F1 dengan perbandingan konsentrasi etil selulosa : gelatin (1:1) sebesar 23,73% ±9,20%. Ikatan silang dalam hidrogel mempunyai kemampuan menyimpan air di dalam struktur porinya dengan cara meregangkan rantainya. Adanya peregangan rantai tersebut menyebabkan membran hidrogel dapat mengembang dalam air (*swelling*). Banyaknya gugus hidrofilik, ikatan silang dan struktur pori mempengaruhi kemampuan *swelling* dari membran hidrogel berpori. Gelatin memiliki afinitas

tinggi terhadap air karena sifat hidrofiliknya (Maddu *et al*, 2006). Gelatin yang dicampur dengan air memiliki ikatan hidrogen pada strukturnya, yang memungkinkannya untuk melakukan ikatan silang dengan gelatin ataupun polimer lainnya. Ikatan hidrogen yang terbentuk disertai dengan penambahan suhu akan memberikan kesempatan kepada etil selulosa untuk membentuk ikatan silang dengan gelatin.

Dutta (2012), menyatakan bahwa semakin sedikit ikatan silang maka persen *age swelling* semakin tinggi, hal ini dibuktikan dengan hasil penelitiannya persen *age swelling* dari hidrogel berbasis PVA, PEG dan CaCl_2 dalam waktu 3 hari mencapai 350-375% pada jaringan kulit. Hal ini jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan.

Analisis *weight loss*. Karakteristik fisik membran hidrogel dapat diketahui melalui berat membran yang terdegradasi setelah berada pada cairan fisiologis.

Tabel 3. Data Uji *Weight Loss* t = 15 menit

Formula	Avr ± SD (%)
F1	0,54 ± 0,13
F2	0,45 ± 0,01
F3	0,71 ± 0,09

Tabel 4. Data Uji *Weight Loss* t = 30 menit

Formula	Avr ± SD (%)
F1	0,82 ± 0,05

F2	0,91 ± 0,06
F3	0,92 ± 0,05

Hasil analisis nilai *weight loss* pada interval 15 menit perbandingan komposisi pada F2 yaitu etil selulosa : gelatin (1:1,5) memiliki nilai rata-rata *weight loss* paling kecil yaitu $0,45\% \pm 0,01\%$ dibanding formula yang lain memungkinkan ikatan *crosslink* yang terbentuk antara etil selulosa dan gelatin lebih kuat sehingga membran lebih lama bertahan dalam proses degradasi. Hal tersebut disebabkan karena adanya pengaruh dari banyaknya ikatan hidrogen yang terbentuk, suhu yang dapat mempengaruhi kemampuan etil selulosa dan gelatin untuk membentuk ikatan silang sehingga dapat menyebabkan perbedaan kerapatan ikatan silang pada membran hidrogel. Hasil analisis interval waktu 30 menit pada F1 memiliki nilai *weight loss* paling kecil yaitu $0,82\% \pm 0,05\%$.

Menurut Dutta (2012), semakin tinggi nilai *weight loss* maka semakin cepat membran hidrogel mengalami degradasi hal ini karena adanya hidrasi yang tinggi sehingga rantai antar molekul tidak dapat menahan kekuatan dari luar dan mengakibatkan hilangnya fungsi *scaffold*. Penelitian ini menghasilkan nilai *weight loss* yang jauh lebih kecil dari penelitian sebelumnya. Dutta (2012) menyatakan bahwa agar hidrogel dapat diterima oleh jaringan yang luka, hidrogel berbasis PVA,

PEG dan CaCl_2 menghasilkan nilai *weight loss* kurang dari 19% selama 72 jam.

Analisis tensile strength.

Membran hidrogel harus memiliki sifat mekanik yang mendekati sifat mekanik jaringan atau organ tubuh yang dituju sehingga mampu bertahan selama proses regenerasi sel dan tidak mengalami perubahan struktur ketika dikenai gaya dari luar. *Ultimate Tensile Strength* (UTS) merupakan hasil konversi besarnya beban atau gaya yang diberikan terhadap luas penampang (A) membran yang akan diukur. Penelitian ini menghasilkan konstanta elastisitas (k) paling kecil pada F2 sehingga membran hidrogel pada F2 adalah yang paling elastis. Nilai konstanta elastisitas membran hidrogel jika semakin kecil nilai konstanta maka membran hidrogel akan bersifat elastis yang berarti membran hidrogel membutuhkan sejumlah gaya (N) yang kecil untuk menghasilkan setiap meter (m) pertambahan panjang. Berikut table nilai konstanta elastisitas. Tabel 5. Data Konstanta Elastisitas (k)

Formula	Avr ± SD (N/m)
F1	59,22 ± 15,68
F2	48,47 ± 20,58
F3	53,57 ± 19,40

Besarnya *Ultimate Tensile Strength* (UTS) yang didapatkan dalam membran hidrogel dengan berbagai perbandingan formulasi

menghasilkan nilai UTS terkecil pada F1. Nilai UTS pada formulasi membran hidrogel yang telah dianalisis tersebut jauh lebih kecil dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Jacquemoud *et al*, (2007) tentang sifat mekanik kulit menunjukkan bahwa kulit memiliki nilai UTS (*Ultimate tensile strength*) sebesar $3 \pm 1,5$ Mpa. Berdasarkan teori yang dikemukakan oleh Arvanitoyannis *et al* (1997), komposisi gelatin yang lebih banyak menghasilkan nilai UTS lebih besar dibanding formula lain ini disebabkan oleh sifat deformasi plastis, bentuk anyaman dan protein dalam kolagen yang dimiliki gelatin.

Struktur morfologi membran dengan SEM. Chiono *et al* (2009), mengatakan bahwa dalam penggunaannya sebagai *scaffold*, material harus memiliki bentuk morfologi yang sesuai dengan jaringan yang dituju untuk menghindari terbentuknya jaringan parut pada saat proses regenerasi.

Gambar 2 (A) menunjukkan hasil SEM pada perbesaran 3.000 kali dengan ukuran pori terbesar 2,830 μm , gambar (B) pada perbesaran 10.000 kali dengan ukuran pori terbesar 1,404 μm . Menurut Gilson (2006), pori yang terbentuk dengan menggunakan metode *ice particle leaching* pada membran memiliki ukuran 400 μm . Perbedaan ukuran pori disebabkan oleh adanya pengaruh dari luar seperti perubahan suhu secara drastis yang tidak

menghasilkan membran hidrogel berpori dengan karakteristik fisik-mekanik yang baik.

Perlu dilakukan kontrol dan evaluasi dalam teknik formulasi *ice particle leaching* yaitu evaluasi terhadap perbandingan jumlah pemberian butiran es untuk menghasilkan ukuran pori yang diinginkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Trimurni, 2007, Inovasi Perawatan Konservasi Gigi Melalui Teknologi Tissue Engineering, *Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap Bidang Ilmu Konservasi Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatera Utara*, Medan, 4-13
- Arvanitoyannis I.E, Psomiadou A, Nakayama S, Aiba dan N. Yamamoto. 1997. Edible film made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. *Int. J. Food Chem.* 60(4), p593-604.
- Chang, C.H., Liu, H.C., Lin, C.C., Chou, C.H., Lin, F.H., 2003, Gelatin chondroitin–hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* 24, p4853–4858.
- Chiono V, Tonda-Turo C, Ciardelli G., 2009, Chapter 9: Artificial scaffolds for peripheral nerve reconstruction, 87, p173-98.
- Dutta, J. 2012. Synthesis and Characterization of γ -irradiated PVA/PEG/CaCl₂ Hydrogel for Wound Dressing. Department of Chemistry, Disha Institute of Management and Technology, Satya Vihar, India
- Fatimi, A., Tassin, J-F., Turczyn, R., Axelos, M.AV., dan Weiss, P, 2 *Gelation Studies of a cellulose-based biohydrogel: the influence of pH, temperature and sterilization*, *Acta Biomater*, 5(9), p3423-3432
- Gilson K., M.S. Ktm., H.B. Lee, 2006, *A Manual for Biomaterials Scaffold Fabrication Technology*, vol 4
- Jacquemoud, C., Bruyere-Garnier, K. Dan Coret, M, 2007, Methodology to determine failure characteristics of planar soft tissues using a dynamic tensile test, *Journal of Biomechanics* 40(2), p468-475.
- Maddu A., Kun M., sar S., Hamdani Z., 2006, “Pengaruh Kelembaban Terhadap Sifat Optik Film Gelatin”, vol. 10, no. 1,: p30-34
- Murtaza, 2012, *Ethyl Cellulose Microparticles: A Review*, vol. 69, no.1, pp. 11-22
- Shokri, J., Adibkia, K. 2013. Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries. University of India.
- Syed K.H. Gulrez, Saphwan Al-Assaf and Gylm O Philips 2011, *Methods of Preparation, Characterisation and Applications*. Intech
- Wahyuni, S (2001), *Mempelajari Karakteristik Fisik dan Kimia Edible Film Gelatin Tulang Domba dengan Plasticizer Gliserol*”, Skripsi Jurusan Ilmu Produksi Ternak Fak.Peternakan,IPB
- Young, Wong M. Tabata Y. Mikos AG., 2005. Gelatin as a delivery

vehicle for the controlled release of
bioactive molecules. (1-3): 256-74