

STUDI IN VITRO BIODEGRADASI MICROSPHERE POLILAKTAT

Sudaryanto¹, Wahyudianingsih¹, Ari Handayani¹ dan
Muhammad Nazri Robani²

¹Pusat Teknologi Bahan Industri Nuklir (PTBIN) – BATAN
Kawasan Puspiptek Serpong 15314, Banten

²Departemen Kimia FMIPA - IPB
Jl. Raya Pajajaran, Bogor

ABSTRAK

STUDI IN VITRO BIOBIODEGRADASI MICROSPHERE POLILAKTAT. Biodegradasi polimer *microsphere* berbasis polilaktat (PLA) telah dilakukan secara *in vitro* pada lingkungan yang mendekati kondisi dalam tubuh manusia (pH 7,4 dan suhu 37°C). Proses degradasi *microsphere* PLA diamati berdasarkan perubahan morfologi permukaan *microsphere*, entalpi pelelehan, dan berat molekul, yang masing-masing diuji menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM), *Differential Scanning Calorimetry* (DSC), dan *Gel Permeation Chromatography* (GPC). Proses biodegradasi *microsphere* PLA tampak nyata setelah inkubasi selama 4 minggu. Tetapi, secara keseluruhan proses biodegradasi PLA berjalan lambat, hal itu dikarenakan munculnya sejumlah *microsphere* baru dari *microsphere* besar yang telah terbiodegradasi.

Kata kunci : *Microsphere*, polilaktat, biodegradasi, *invitro*

ABSTRACT

IN VITRO STUDY ON BIODEGRADATION OF POLYLACTIC ACID MICROSPHERE. Biodegradation study of polymer *microsphere* based on polylactic acid (PLA) was done *in vitro* at an environment enclosed to human body condition (pH 7.4 and 37°C). The degradation process was observed based on alteration of surface morphology of the *microsphere*, melting enthalpy, and molecular weight, which measured by meaning of scanning electron microscope (SEM), differential scanning calorimetry (DSC), and gel permeation chromatography (GPC). It was found that a significant degradation process occurred after 4 weeks of incubation. However, a slow degradation of *microsphere* was happen due to the existence of numerous smaller *microspheres* within the original *microspheres*

Key words : *Microsphere*, polylactic acid, degradation, *invitro*

PENDAHULUAN

Microsphere adalah partikel berbentuk bola (*sphere*) berskala mikron, terbuat dari bahan keramik, gelas, atau polimer sebagai pengungkung gas, larutan, atau padatan dalam bentuk senyawa organik maupun anorganik. Tergantung pada jenis bahan pengungkung dan yang dikungkung, *microsphere* memiliki bidang aplikasi yang luas seperti kedokteran, pertanian, industri dan lain-lain. Pengembangan berbagai *microsphere* baru juga masih banyak dilakukan baik dalam skala industri maupun laboratorium [1].

Dalam bidang kedokteran nuklir misalnya, *microsphere* yang mengandung partikel radioaktif pemancar sinar- β telah digunakan untuk bahan terapi kanker hati [2,3]. *Microsphere* radioaktif untuk terapi kanker hati yang digunakan sampai saat ini, terbuat dari gelas sehingga tidak terabsorpsi tubuh dan akan tetap tertinggal dalam jaringan tubuh dalam waktu yang lama, meskipun proses radioterapi telah selesai. Untuk itu,

polimer yang mudah terbiodegradasi (biodegradabel) merupakan salah satu bahan alternatif.

Polimer *biodegradable* seperti polilaktat (*polylactic acid*, PLA), poliglikolat (*poly glycolic acid*, PGA) dan derivatnya dapat terdegradasi dengan proses hidrolisis dalam tubuh dan terabsorpsi dalam waktu sekitar 1 bulan [4,5]. Karena dapat terabsorpsi dan tidak meracuni tubuh (*biocompatible*), PLA, PGA dan kopolimernya telah banyak digunakan dalam bidang kedokteran, seperti untuk sistem penyampaian obat (*drug delivery system*, DDS) [5], benang bedah operasi [6,7] dan lain-lain. Oleh karena itu, pengembangan *microsphere* berbasis polimer *biodegradable* untuk bahan radiofarmaka sangat menarik dan penting untuk dilakukan.

Sifat biodegradabelitas merupakan hal yang penting pada bahan *microsphere* berbasis polimer biodegradabel seperti PLA. Biodegradasi PLA dalam

bentuk lembaran dan benang telah banyak dipelajari, tetapi sejauh penelusuran literatur belum banyak yang mempelajarinya dalam bentuk *microsphere*, terutama dalam kaitannya sebagai pengungkung bahan radioaktif. Kestabilan *microsphere* PLA sebagai pengungkung bahan radioaktif telah dilaporkan oleh Hafeli dkk [8] maupun Nijsen dkk. [9], tetapi keduanya lebih menfokuskan pada pengaruh proses iradiasi bukan pada karakteristik biodegradabilitas *microsphere* PLA. Park telah melaporkan tentang biodegradasi *microsphere* berbasis polimer biodegradabel poli(laktat-ko-glikolat), tetapi pembahasannya terfokus pada pengaruh komposisi kopolimer [4]. Di sisi lain, banyak faktor yang mempengaruhi proses atau mekanisme degradasi polimer dalam bentuk *microsphere* seperti bentuk dan ukuran yang berhubungan dengan luas permukaan, disamping kristalinitas, berat molekul, dan lingkungan seperti pH, dan suhu. Oleh karena itu studi lebih lanjut tentang biodegradasi *microsphere* PLA masih perlu dilakukan.

Studi *in vitro* adalah pengujian di luar tubuh makhluk hidup dalam suatu lingkungan yang menyerupai kondisi dalam tubuh. Studi *in vitro* merupakan cara yang aman dan mudah untuk mempelajari sifat suatu bahan dan perlu dilakukan lebih dahulu sebelum memasukkan suatu bahan ke dalam tubuh.

Penelitian ini bertujuan mengamati proses biodegradasi *microsphere* PLA secara *in vitro* dengan mengamati pola perubahan struktur, morfologi, dan berat molekul PLA, seiring dengan waktu inkubasi dalam air yang pH dan suhunya dikontrol sesuai dengan kondisi dalam tubuh manusia, yakni pH 7,4 dan suhu 37 °C.

METODE PERCOBAAN

Pembuatan *Microsphere* PLA

Pembuatan *microsphere* dilakukan dengan metode evaporasi larutan dalam air dari suatu emulsi sebagaimana telah dilaporkan di tempat terpisah [10].

PLA (berat molekul 39.000) dilarutkan ke dalam kloroform dengan konsentrasi 10 % w/w. Polivinil alkohol (PVA, berat molekul 72.000) sebagai *emulsifier* dilarutkan ke dalam aquades dengan konsentrasi 5 % w/w. Emulsifikasi dilakukan dengan mencampurkan larutan PLA ke dalam larutan PVA diikuti dengan pengadukan. Emulsi yang terbentuk selanjutnya dievaporasi dalam air dengan cara menuangkan ke dalam air sambil diaduk dengan kecepatan dan waktu tertentu. Dalam proses ini, kloroform menguap dan membentuk *microsphere* berupa butiran padat berwarna putih. *Microsphere* yang terbentuk selanjutnya disaring dan dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 1 jam.

Pengontrolan pH Media Inkubasi

Pengontrol pH air sebagai media inkubasi dilakukan dengan larutan penyangga fosfat. Larutan penyangga dibuat dengan melarutkan 50 mL kalium

hidroksi fosfat (KH_2PO_4) 0,2 M dan 12,60 mL natrium hidroksida (NaOH) 0,2 M dalam 200 mL aquades. Larutan diukur pH-nya, bila $\text{pH} > 7,4$ maka ditambah asam fosfat (H_3PO_4), dan bila $\text{pH} < 7,4$ maka ditambah NaOH hingga pH mencapai 7,4.

Uji Biodegradabilitas

Sejumlah tabung *vial* yang berisi 7,5 mL larutan penyangga fosfat pH 7.4 diberi label M1, M2, M3, M4, M5, M6, M8, M10, dan M12. M1 adalah untuk pembuatan sampel dengan lama inkubasi 1 minggu, M2 untuk sampel 2 minggu dan seterusnya hingga M12 untuk sampel 12 minggu. Ke dalam masing-masing tabung *vial* dimasukkan 250 mg *microsphere* PLA, selanjutnya dimasukkan inkubator yang disetting pada suhu 37°C dalam rentang waktu 1 minggu sampai dengan 12 minggu. Sampel yang telah diinkubasi dalam rentang waktu tertentu, diambil dan disentrifugasi selama 15 menit, kemudian filtrat dipisahkan untuk pengujian kadar asam laktat menggunakan HPLC, sedangkan endapannya dikeringkan dalam oven dengan suhu 40°C selama 1 hari. Sampel kering disimpan dalam desikator sampai waktu pengujian.

Pengamatan dengan SEM

Beberapa miligram *microsphere* PLA yang telah dikeringkan, diletakkan pada sampel *holder* kemudian *dicoating* dengan emas, dan diamati dengan SEM.

Analisis Termal dengan DSC

Analisis termal terhadap sampel *microsphere* PLA sebelum dan sesudah inkubasi dilakukan dengan perangkat DSC. 10 mg sampel dipanaskan dari suhu 40 °C sampai 200 °C dengan laju pemanasan 10 °C/menit.

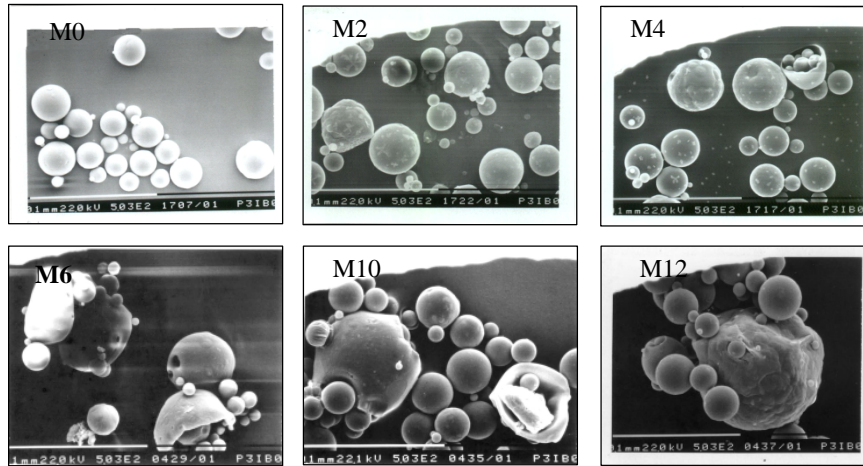
Pengukuran Berat Molekul dengan GPC

100 mg sampel *microsphere* PLA yang telah diinkubasi dilarutkan dalam 10 mL kloroform, setelah disaring diambil 20 µL sebagai sampel GPC, dan diukur dengan kecepatan alir = 1 mL/menit, waktu alir = 15 menit, dan detektor UV dengan panjang gelombang = 254 nm. Berat molekul (BM) didapat dengan membandingkan kurva yang didapat dengan kurva standar polistirena dengan berat molekul 10^3 sampai dengan 10^6 .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perubahan Morfologi Permukaan *Microsphere* PLA

Gambar 1 adalah foto SEM dari *microsphere* PLA sebelum dan sesudah inkubasi dalam larutan penyangga pH 7,4 hingga 12 minggu. Gambar 1 menunjukkan



Gambar 1. Foto SEM *microsphere* PLA dengan perbesaran 500 X , sebelum inkubasi (M0) dan sesudah inkubasi selama 2 minggu, 4 minggu, 6 minggu, 10 minggu dan 12 minggu. (M2, M4, M6, M10, dan M12)

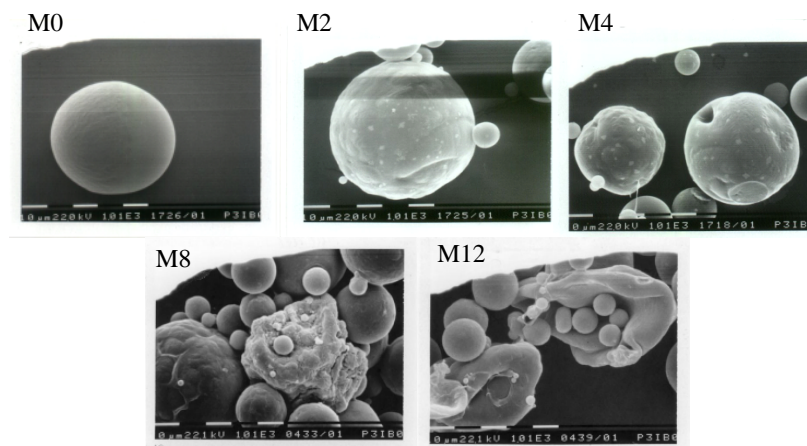
terjadinya perubahan morfologi permukaan dan ukuran *microsphere* PLA seiring dengan waktu inkubasi. Permukaan *microsphere* yang awalnya halus menjadi tidak halus lagi. Selain itu, ukurannya semakin membesar seiring dengan semakin lamanya waktu inkubasi. Pada minggu ke-2 (M2) dan ke-4 (M4) inkubasi, belum tampak perubahan yang nyata pada permukaan *microsphere*. Perubahan lebih nyata tampak pada perbedaan ukuran *microsphere* yang semakin membesar. Perubahan permukaan baru terlihat nyata pada minggu ke-6 (M6) inkubasi, yang mana permukaan *microsphere* tampak rusak, timbulnya pori pada permukaan *microsphere*, dan timbulnya sejumlah *microsphere* baru yang ukurannya lebih kecil dibandingkan *microsphere* asal dan permukaannya lebih halus.

Proses degradasi lebih jelas terlihat dengan pembesaran 1000X (Gambar 2). Permukaan *microsphere* sebelum diinkubasi (M0) yang semula halus, berangsur-angsur menjadi rusak. Kerusakan paling jelas terlihat pada Gambar 2, M8, yang menunjukkan rusaknya

permukaan *microsphere* di seluruh bagian, sedangkan Gambar 2, M12, memperlihatkan proses pecahnya *microsphere* dan menghasilkan *microsphere* baru.

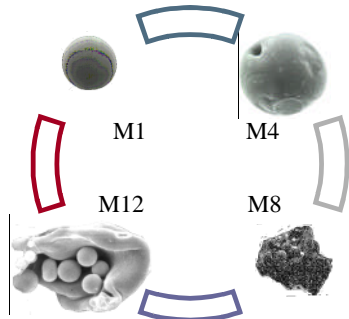
Mekanisme Degradasi *Microsphere*

Dari Gambar 1 dan Gambar 2 dapat diketahui bahwa mekanisme degradasi permukaan *microsphere* terjadi melalui 2 proses, yaitu perusakan langsung pada permukaan *microsphere* dan pecahnya *microsphere* awal membentuk *microsphere-microsphere* baru. Dalam penelitian ini, proses pecahnya *microsphere* awal lebih dominan dibandingkan dengan proses perusakan langsung pada permukaan *microsphere*. Gambar 1 juga menunjukkan bahwa proses pecahnya *microsphere* diawali dengan penyerapan air sehingga ukurannya membesar, kemudian seiring dengan semakin banyaknya air yang diserap ikatan antarmolekul PLA menjadi melemah hingga akhirnya pecah dan menghasilkan *microsphere-microsphere* baru dengan permukaan yang



Gambar 2. Foto SEM *microsphere* PLA dengan perbesaran 1000 X, sebelum inkubasi (M0) dan sesudah perendaman selama 2 minggu, 4 minggu, 8 minggu dan 12 minggu. (M2, M4, M8, dan M12).

halus (Gambar 2, M12), sebagaimana kondisi *microsphere* awal sebelum diinkubasi. *Microsphere* baru ini, akan mengalami degradasi seiring dengan waktu inkubasi dengan pola yang sama seperti *microsphere* sebelumnya



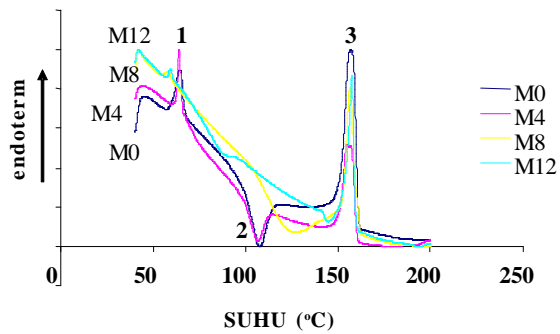
Gambar 3. Skema mekanisme degradasi *microsphere* PLA

Bila digambarkan dengan skema seperti pada Gambar 3, tampak bahwa pada 4 minggu pertama inkubasi *microsphere* PLA hanya memperlihatkan proses pembesaran ukuran *microsphere* tanpa memperlihatkan adanya degradasi yang berarti. Proses degradasi baru terlihat nyata setelah 4 minggu masa inkubasi. Setelah masa itu, *microsphere-microsphere* pecah dan menghasilkan banyak *microsphere* baru. *Microsphere* baru ini akan mengalami degradasi dengan pola yang sama seperti *microsphere* sebelumnya. Fenomena munculnya *microsphere* baru ini dapat memperlambat laju degradasi *microsphere* PLA. Munculnya *microsphere-microsphere* baru dengan ukuran lebih kecil seiring dengan proses degradasi, menunjukkan bahwa di dalam satu *microsphere* terkandung banyak *microsphere* atau dengan kata lain terdapat struktur *microsphere* dalam *microsphere*.

Kristalinitas *Microsphere* PLA

Hasil analisis *microsphere* PLA menggunakan DSC menunjukkan bahwa ada keterkaitan antara degradasi dengan kristalinitas *microsphere* PLA. Sampel M0, M4, M8, dan M12 yang diukur menggunakan DSC menghasilkan termogram seperti yang terlihat pada Gambar 4. Secara umum keempat sampel memberikan pola termogram yang sama, yaitu adanya puncak endotermik pada suhu sekitar 65 °C (puncak 1) dilanjutkan dengan adanya puncak eksotermik pada suhu di atas 100 °C (puncak 2) yang diikuti dengan kemunculan puncak endotermik yang tajam pada suhu sekitar 158°C (puncak 3). Sangat sulit untuk memastikan sumber puncak 1, tetapi kemunculan puncak endotermik dapat diinterpretasikan sebagai pelelehan kristal yang tidak sempurna atau kemungkinan lain adalah kristal yang terbentuk dari rantai polimer berberat molekul rendah. Adapun puncak 2 dan puncak 3 dapat

diinterpretasikan sebagai puncak rekristalisasi dan pelelehan (T_m).

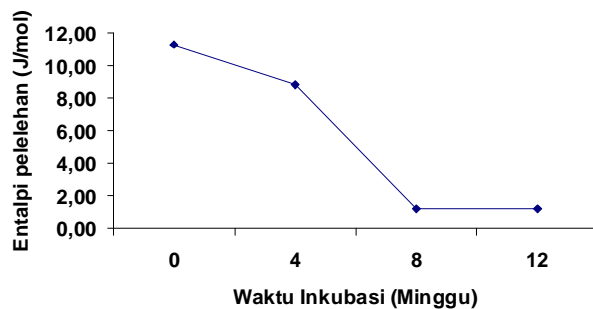


Gambar 4. Kurva termogram DSC dari *microsphere* PLA sebelum perendaman (M0) dan sesudah inkubasi selama 4, 8 dan 12 minggu (M4, M8, M12).

Perubahan morfologi yang ditunjukkan dari hasil pengamatan dengan SEM tidak tampak nyata pada profil termogram DSC, hal ini karena SEM hanya menunjukkan fenomena pada bagian permukaan, sedangkan DSC menunjukkan fenomena secara keseluruhan termasuk *microsphere* dalam *microsphere* yang kemudian muncul sebagai *microsphere* baru.

Hubungan hasil SEM dan DSC akan terlihat bila dilakukan pengamatan terhadap perubahan masing-masing puncak, seiring dengan waktu inkubasi sebagaimana ditunjukkan pada pada Gambar 5, Gambar 6 dan Gambar 7.

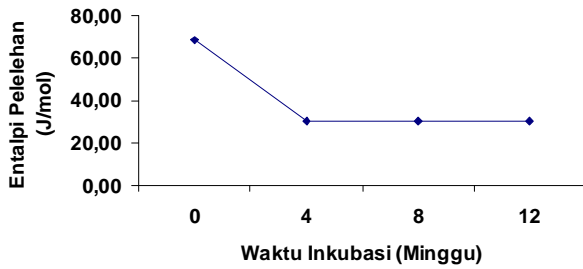
Gambar 5 menunjukkan perubahan entalpi pada puncak 1. Dari gambar ini terlihat bahwa pada minggu ke-4 inkubasi kristal ini belum mengalami perubahan yang berarti. Hal ini menunjukkan bahwa kristal belum terdegradasi hingga minggu ke-4 inkubasi. Perubahan nyata terjadi pada sampel yang diinkubasi selama 8 minggu dan 12 minggu, yang artinya proses degradasi terjadi setelah inkubasi berlangsung lebih dari 4 minggu.



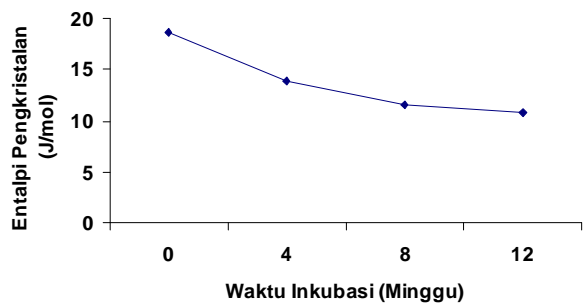
Gambar 5. Penurunan entalpi pelelehan pada puncak 1

Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh Gambar 6, yaitu kurva perubahan entalpi pada pelelehan atau puncak 3. Dari kurva ini terlihat nilai entalpi pelelehan menurun tajam pada 4 minggu inkubasi dan cenderung tidak mengalami perubahan pada minggu-minggu selanjutnya. Hasil ini sangat bertentangan dengan hasil pada puncak 1, namun gejala ini dapat dijelaskan

menggunakan Gambar 7 yang menunjukkan menurunnya entalpi rekristalisasi. Rekristalisasi terjadi karena adanya kristal PLA yang meleleh pada awal pemanasan. Seiring dengan waktu inkubasi ukuran *microsphere* membesar, hal ini mempengaruhi berkurangnya kerapatan kristal dalam *microsphere* (Gambar 7), sehingga ikatan kimia antar-kristal melemah dan energi yang diperlukan untuk proses rekristalisasi menurun. Gambar 7 juga menunjukkan bahwa pada minggu ke-8 dan 12 sebagian kristal sudah terdegradasi sehingga entalpinya menurun.



Gambar 6. Penurunan entalpi pelelehan pada puncak 3.



Gambar 7. Penurunan entalpi kristalisasi (puncak 2).

Perubahan Berat Molekul PLA

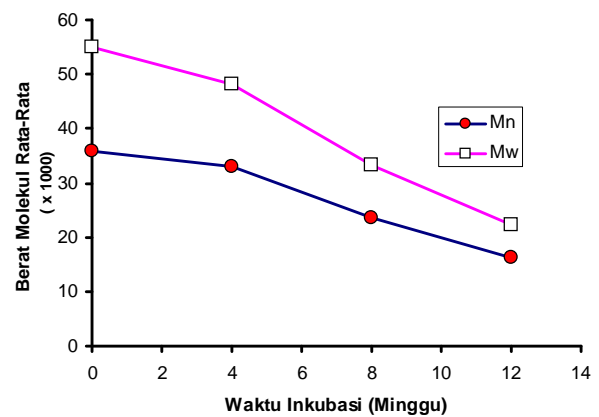
Bukti terkuat dari proses degradasi *microsphere* PLA ialah adanya penurunan berat molekul PLA selama masa degradasi. Untuk itu telah dilakukan pengukuran berat molekul dengan GPC terhadap sampel *microsphere*, sebelum dan sesudah inkubasi dalam air, seperti ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Berat molekul rata-rata dari hasil pengukuran GPC terhadap sampel *microsphere* sebelum dan sesudah inkubasi dalam air.

Sampel	Mn	Mw	Mw/Mn
M0	36.000	55.000	1,53
M4	32.900	48.300	1,49
M8	23.600	33.300	1,41
M12	16.300	22.400	1,37

Tabel 1 menunjukkan adanya penurunan rata-rata berat molekul (Mn, dan Mw) yang diikuti pula dengan penurunan polidispersitas (Mw/Mn) seiring dengan waktu inkubasi dalam air. Penurunan berat molekul dari

36.000 (M0) menjadi 16.300 (M12) menunjukkan terjadinya pemutusan rantai polimer yang merupakan inti proses degradasi. Adapun penurunan polidispersitas dari 1,53 (M0) menjadi 1,37 (M12) menunjukkan ukuran berat molekul semakin seragam. Penurunan berat molekul terlihat lebih nyata setelah masa inkubasi lebih dari 4 minggu bila ditunjukkan dalam bentuk grafik seperti tampak pada Gambar 8. Pada Gambar 8 terlihat bahwa pada 4 minggu pertama inkubasi *microsphere* PLA belum menunjukkan degradasi yang berarti. Degradasi baru terlihat nyata setelah *microsphere* diinkubasi lebih dari 4 minggu. Hal ini sesuai dengan hasil pengamatan dengan SEM dan analisis termal dengan DSC, yakni proses degradasi PLA terjadi dengan nyata setelah diinkubasi lebih dari 4 minggu.



Gambar 8. Kurva perubahan rata-rata berat molekul *microsphere* PLA seiring dengan waktu inkubasi.

KESIMPULAN

Hasil pengujian secara *in vitro* dalam penelitian ini menunjukkan, bahwa *microsphere* PLA terdegradasi seiring dengan waktu inkubasi dalam larutan penyangga dengan pH 7,4 dan suhu 37 °C. Hasil pengujian dengan peralatan SEM, DSC dan GPC menunjukkan bahwa proses degradasi *microsphere* PLA tampak nyata setelah masa inkubasi lebih dari 4 minggu. Dengan kata lain selama 4 minggu inkubasi sifat dan struktur *microsphere* masih stabil. Degradasi *microsphere* PLA yang dihasilkan dari penelitian ini relatif berjalan lambat, disebabkan oleh munculnya *microsphere* baru. Kemunculan *microsphere-microsphere* baru dengan ukuran lebih kecil seiring dengan proses degradasi menunjukkan, bahwa di dalam satu *microsphere* terkandung banyak *microsphere* atau dengan kata lain *microsphere* yang dibuat dalam penelitian ini memiliki struktur *microsphere* dalam *microsphere*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada Kementerian Riset dan Teknologi, dan Lembaga Ilmu Pengetahuan

Indonesia, atas bantuan dana melalui program Riset Unggulan Terpadu ke X (RUT-X).

DAFTARACUAN

- [1]. DAGANI, R.; *C & EN*, **19** (1994) 33-35
- [2]. ORDER, S.E. SIEGEL, J.A. LUSTIG, R.A. PRINCIPATO, T.E., ZEIGER, L.S., JOHNSON, E., ZHANG, H., LANG, P., PILCHIK, N.B., METSZ, J., DENITTIS, A., BOERNER, P., BEUERLEIN, G., WALLNER, P.E., *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **30** (1994) 715-720
- [3]. US PATEN 4,789,501
- [4]. PARK, T.G.; *Biomaterials*, **16** (1995) 1123-1130
- [5]. OGAWA, Y., YAMAMOTO, M., OKADA, H., YASHIKI, T., SHIMAMOTO, T, *Chem. Pharm. Bull.*, **36** (1988) 1095-1103.
- [6]. CHU, C.C.; *J. Biomed. Mater. Res.*, **16** (1982) 117-124
- [7]. US Paten 3,297,033
- [8]. HAFELI, U.O., ROBETS, W.K., PAUER G. J., KRAEFT, A. K., MACKLIS, R. M.; *Appl. Radiat. Isot.*, **54** (2002) 869-879
- [9]. NIJSEN, F., ROOK, D., BRANDT, C. , MEIJER, R., DULLENS, H., ZONNEBERG, B., KLERK, J.D., RICJK, P.V. , HENNINK, W., SCHIP, F.V.H., *Eur. J. Nucl. Med.*, **28** (2001) 743-749
- [10]. SUDARYANTO, SUDIRMAN, ALOMA KARO KARO, INDRA GUNAWAN, TRI DARWINTO, DAN WAHYUDIANINGSIH; *Prosiding Simposium Nasional Polimer IV*, HPI, Jakarta (2003) 181-187