

Optimasi *Scaffolds* Kitosan-Gelatin dengan Penambahan Ekstrak Bioaktif *Piper betle L.* untuk Implan Pasien Kanker Tulang

1st Andi Agun Pangeran Amjan
Fakultas Teknik Elektro
Universitas Telkom
Purwokerto, Indonesia
agunpangeran@student.telkomuniversity.ac.id

2nd Adanti Wido Paramadini
Fakultas Teknik Elektro
Universitas Telkom
Purwokerto, Indonesia
adanti@telkomuniversity.ac.id

3rd Ajeng Dyah Kurniawati,
Fakultas Rekayasa Industri
Universita Telkom
Purwokerto, Indonesia
ajengk@telkomuniversity.ac.id

Abstrak — Kanker tulang merupakan penyakit langka dengan tingkat kelangsungan hidup global sekitar 68%. Pengobatan konvensional memiliki keterbatasan, termasuk risiko kekambuhan dan efek samping. Oleh karena itu, dikembangkan implan berbasis *scaffolds* yang berpotensi meningkatkan regenerasi tulang dan mencegah kekambuhan sel kanker. Kitosan dan gelatin, sebagai bahan utama *scaffolds*, memiliki biokompatibilitas dan biodegradabilitas, namun risiko inflamasi dan infeksi bakteri masih menjadi tantangan. Ekstrak daun sirih (*Piper betle L.*) kaya antioksidan ditambahkan ke *scaffolds* kitosan-gelatin untuk mengurangi inflamasi dan meningkatkan aktivitas antitumor. Ekstrak diperoleh melalui maserasi etanol 90% (10% w/v) dan diuji kandungan fenol (64,36 mg GAE/g) serta flavonoid (37,15 mg QE/g). *Scaffolds* difabrikasi menggunakan metode *freeze-drying* dengan variasi kitosan (2%, 4%, 6%, 8% w/v), gelatin 2% w/v, *glutaraldehyde* 0,1% v/v, dan ekstrak *Piper betle L.* 9% w/v. Analisis FTIR menunjukkan peningkatan ikatan hidrogen pada 3500–3200 cm^{-1} seiring peningkatan kitosan. *Scaffolds* K8G-PB9 (kitosan 8%) memiliki stabilitas struktural terbaik dengan laju degradasi 5%, *swelling ratio* 101%, serta zona hambatan antibakteri tertinggi terhadap *S. aureus* (12,28 mm) dan *E. coli* (11,24 mm). K2G-PB9 & K8G-PB9 menunjukkan pori heterogen berkisar 100–200 μm . Hasil ini menunjukkan *scaffolds* K8G-PB9 memiliki karakteristik optimal sebagai kandidat implan untuk terapi kanker tulang.

Kata kunci—gelatin, inflamasi, kanker tulang, kitosan, *Piper betle L.*, *scaffolds*

I. PENDAHULUAN

Kanker kini menjadi penyebab utama kematian secara global, melampaui penyakit lainnya dalam jumlah kasus kematian yang terjadi [1]. Menurut *World Health Organization* (WHO), kanker menyebabkan 10 juta kematian pada tahun 2020 dengan 19,3 juta kasus baru terdeteksi pada tahun yang sama [2]. Kanker tulang, sebagai salah satu jenis kanker, menyumbang sebagian dari masalah kesehatan global ini dan membawa beban klinis serta ekonomi yang besar yang terus meningkat. Kanker tulang merupakan salah satu jenis kanker yang meskipun relatif jarang terjadi dibandingkan jenis kanker lainnya, namun memiliki dampak yang signifikan terhadap kualitas hidup pasien. Di Indonesia,

kanker tulang mengalami prevalensi sekitar 5% dari semua jenis kanker yang terjadi, sementara secara global, hanya 1% dari semua jenis kanker adalah kanker tulang. Karena insiden kanker tulang yang rendah, diagnosis dan pengobatannya sering tertunda, mengakibatkan tingkat kematian yang tinggi. Dari 700.000 kasus, lebih dari 220.000 pasien meninggal, sehingga tingkat kelangsungan hidup global sekitar 68% [3].

Pendekatan klinis seperti kemoterapi, radioterapi, dan pembedahan saat ini digunakan untuk mengobati kanker tulang, tetapi sering kali menimbulkan efek samping sistemik, risiko inflamasi, serta kerusakan pada jaringan sehat [2]. Sebagai alternatif, implan klinis berbasis *scaffolds* yang dimuat dengan obat dan senyawa bioaktif dikembangkan untuk meningkatkan penyembuhan tulang, mencegah kekambuhan sel kanker, dan meningkatkan kualitas hidup pasien. Hou et al. (2022) melaporkan bahwa *scaffolds* yang dikembangkan mampu menghambat viabilitas sel *osteosarcoma* hingga 93%, menunjukkan potensinya dalam terapi kanker tulang. Strategi ini tidak hanya mempercepat pemulihan tetapi juga mengurangi kebutuhan akan operasi lanjutan [2].

Kitosan, turunan dari kitin, memiliki sifat unggul seperti biokompatibilitas, biodegradabilitas, aktivitas antimikroba, serta kemampuannya merangsang makrofag dan osteogenesis [4]. Jana et al. (2012) melaporkan bahwa *scaffolds* kitosan dengan konsentrasi 12 wt% memiliki stabilitas bentuk tinggi setelah dua minggu perendaman dalam PBS, dengan kekuatan tekan maksimum 1,74 MPa dan modulus elastisitas 17,99 MPa [5]. Sementara itu, gelatin, protein hasil hidrolisis kolagen dari tulang dan jaringan ikat hewan, digunakan sebagai komponen utama dalam fabrikasi *scaffolds* karena biokompatibilitas dan biodegradabilitasnya yang tinggi. Gelatin juga terbukti efektif dalam meningkatkan proliferasi dan viabilitas osteoblas, sel yang berperan penting dalam regenerasi tulang, sebagaimana dilaporkan oleh Kadi et al. (2024) [6].

Namun, inflamasi tetap menjadi tantangan utama pasca pemasangan implan klinis berbasis *scaffolds*, terutama setelah operasi. Proses resorpsi gelatin dapat memicu perubahan pH dan konsentrasi ion lokal, yang berpotensi mengganggu penyembuhan luka. Menurut Cao et al. (2024),

meskipun gelatin bermanfaat sebagai biomaterial, dampaknya terhadap lingkungan mikro pasca-implantasi perlu diperhatikan untuk mengurangi risiko komplikasi [7]. Selain itu, gelatin dapat menjadi substrat bagi pertumbuhan bakteri seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, yang meningkatkan risiko inflamasi dan infeksi. Ereth et al. (2009) menunjukkan bahwa keberadaan gelatin sebagai matriks dalam lingkungan biologis dapat memicu risiko infeksi jika tidak disertai strategi antimikroba yang memadai [8]. Oleh karena itu, meskipun gelatin memiliki potensi besar dalam regenerasi tulang dan kitosan bersifat antimikroba serta antiinflamasi, efektivitas *scaffolds* berbasis kitosan-gelatin masih perlu ditingkatkan. Penambahan senyawa bioaktif dengan kemampuan antiinflamasi dan antimikroba dapat menjadi solusi untuk mengurangi risiko peradangan dan infeksi pasca-operasi.

Ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) diketahui mengandung antioksidan tinggi, terutama senyawa fenol dan flavonoid, yang berpotensi mencegah inflamasi pascaoperasi [9]. Fenol berfungsi sebagai antioksidan yang melawan radikal bebas, melindungi sel dari kerusakan oksidatif, serta menghambat terjadinya inflamasi. Sementara itu, flavonoid memiliki sifat multifungsi, termasuk antiinflamasi, antimikroba, dan stimulasi regenerasi sel [9], [10]. Lestari et al. (2023) mengevaluasi beberapa ekstrak tumbuhan Indonesia yang dimurnikan, termasuk *Piper betle* L., dalam regenerasi jaringan dan perbaikan tulang pada model periodontitis tikus. *Piper betle* L. dipilih karena memiliki kandungan flavonoid dan fenolik tertinggi dibandingkan dengan *α-Mangostin*, *Ursolic Acid*, dan *Daemnorops draco*, yang juga dikenal kaya senyawa bioaktif [9]. Kandungan bioaktif ini berperan sebagai antioksidan yang dapat mempercepat penyembuhan tulang dan mengurangi inflamasi pascaoperasi.

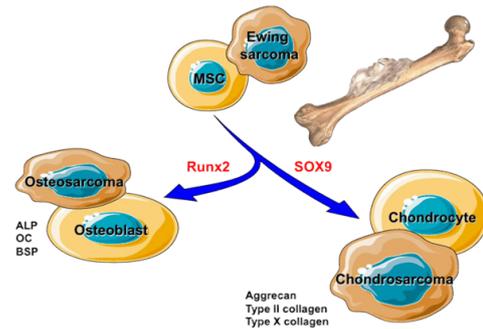
Penelitian ini bertujuan mengoptimalkan *scaffolds* kitosan-gelatin dengan penambahan ekstrak *Piper betle* L. melalui variasi konsentrasi kitosan. Formulasi *scaffolds* dievaluasi berdasarkan sifat fisik, kimia, dan biologisnya, termasuk efektivitas antibakteri dan antiinflamasi. *Scaffolds* yang dihasilkan diharapkan dapat digunakan sebagai implan untuk pasien kanker tulang, mendukung regenerasi tulang, serta mengurangi risiko infeksi dan peradangan pascaoperasi.

II. KAJIAN TEORI

A. Kanker Tulang

Kanker tulang adalah neoplasma ganas yang menyerang jaringan tulang, ditandai oleh proliferasi sel-sel abnormal yang dapat merusak struktur tulang normal. Kanker tulang disebabkan oleh sel kanker yang berasal dari jaringan tulang (kanker tulang primer) atau bermetastasis dari area tumor primer lainnya ke jaringan tulang (kanker tulang metastatik) [11]. Jenis kanker tulang primer yang umum meliputi *osteosarcoma*, *chondrosarcoma*, dan *Ewing's sarcoma*. Sedangkan, kanker payudara, prostat, tiroid, dan paru-paru adalah empat wilayah asal kanker dengan risiko metastasis tulang tertinggi. Pada Gambar 1, menggambarkan jalur diferensiasi MSC menjadi *osteoblasts* atau kondrosit melalui ekspresi gen kunci seperti *Runx2* dan *SOX9*. Pada kondisi normal, *Runx2* mengatur pembentukan tulang melalui *osteoblastogenesis*, sedangkan *SOX9* berperan dalam

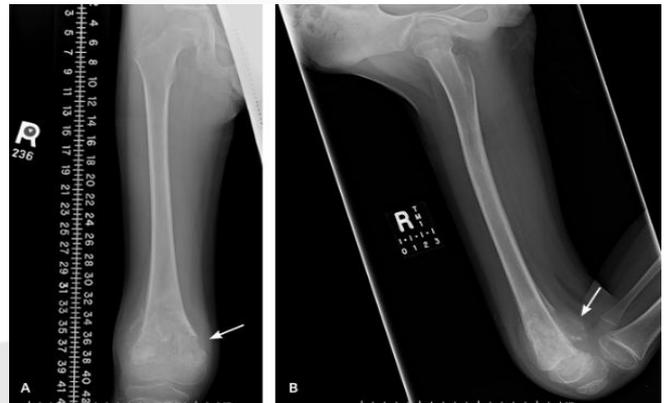
chondrogenesis melalui produksi *aggrecan* dan kolagen tipe II serta X [12].



GAMBAR 1
Asal usul Kanker Tulang Primer [12]

B. Osteosarcoma

Osteosarcoma merupakan jenis kanker tulang yang paling sering terjadi, mencakup hampir dua pertiga dari seluruh kasus. Di Amerika Serikat, sekitar 1.200 pasien didiagnosis dengan *osteosarcoma* setiap tahunnya. *Osteosarcoma* umumnya terjadi pada masa kanak-kanak, dengan peningkatan kejadian sedikit pada individu berusia lebih dari 60 tahun. *Osteosarcoma* diduga berasal dari sel mesenkimal primitif ganas yang berdiferensiasi menjadi *osteoblasts*, yang kemudian menghasilkan matriks osteoid ganas. *Osteosarcoma* dapat muncul di tulang manapun, tetapi biasanya berkembang di *metaphyses* tulang panjang. Hampir 60% terjadi di distal femur, proximal tibia, dan proximal humerus.



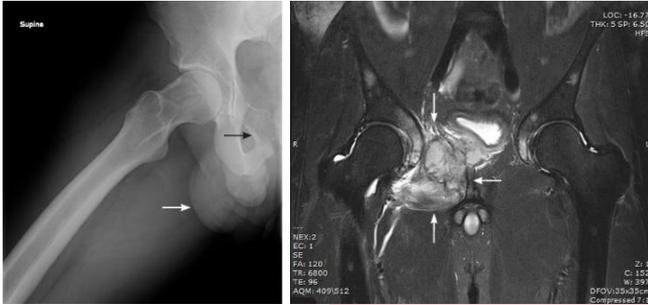
GAMBAR 2
Metastasis osteosarkoma pada tulang panjang [13]

Gambar 2 menunjukkan bahwa *osteosarcoma* dapat bermetastasis secara regional maupun sistemik. Metastasis regional terjadi melalui penyebaran intraosseus, di mana tumor menyebar dalam tulang yang sama tanpa melibatkan jaringan lain, atau secara transartikular, yaitu melalui sendi yang menghubungkan dua tulang, seperti antara tibia dan femur di sendi lutut [13], [14]. Sementara itu, metastasis sistemik *osteosarcoma* paling sering terjadi di paru-paru melalui peredaran darah. Selain itu, tulang ekstremitas lainnya, seperti lengan atau kaki yang berbeda, merupakan lokasi metastasis kedua yang paling umum [14].

C. Ewing Sarcoma

Ewing sarcoma adalah jenis kanker tulang kedua yang paling umum. Perkiraan insidennya adalah satu dalam 100.000 di antara orang berusia 10 hingga 19 tahun. Asal usul

sel tumor *Ewing sarcoma* hingga kini belum sepenuhnya diketahui [13]. Hipotesis yang ada menyatakan bahwa tumor ini kemungkinan berasal dari sel-sel neuroektodermal primitif yang belum berdiferensiasi atau dari sel-sel puncak saraf (*neural crest*). Ada teori yang menyebutkan bahwa *Ewing sarcoma* mungkin berasal dari sel-sel induk primitif. Secara histologis, *Ewing sarcoma* termasuk dalam kelompok tumor yang dikenal sebagai *small blue round cell tumors* (tumor sel bulat kecil berwarna biru), yang dinamakan berdasarkan karakteristik mikroskopisnya [13].



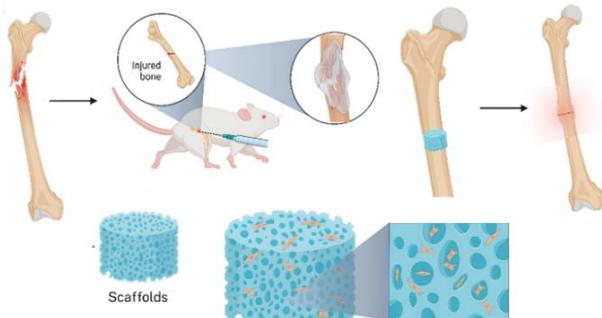
GAMBAR 3
Ewing sarcoma pada tulang panggul kanan [13]

D. *Chondrosarcoma*

Chondrosarcoma adalah tumor ganas pembentuk tulang rawan yang jarang ditemukan pada kanker tulang. Berbeda dengan *osteosarcoma* dan *Ewing sarcoma*, *chondrosarcoma* lebih sering terjadi pada kerangka sentral tubuh, seperti pada sabuk panggul, tulang belakang, dan tulang panjang proksimal. Secara histologis, *chondrosarcoma* dapat menunjukkan berbagai pola pembentukan tulang rawan yang abnormal, dengan adanya proliferasi sel-sel *chondroblast* yang tidak terkendali. Secara anatomi, lokasi utama *chondrosarcoma* sering ditemukan pada bagian tubuh yang mengandung tulang rawan, seperti pelvis, vertebra, dan tulang panjang proksimal, yang menjadi area dengan prevalensi lebih tinggi.

E. *Scaffolds*

Scaffolds adalah struktur tiga dimensi yang digunakan dalam rekayasa jaringan (*tissue engineering*) untuk mendukung pertumbuhan dan proliferasi sel. *Scaffolds* berfungsi sebagai kerangka yang memungkinkan sel untuk menempel, bermigrasi, dan berkembang biak, serta mendukung difusi nutrisi dan pembuangan limbah. *Scaffolds*, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4, *Scaffolds* dirancang untuk mendukung regenerasi jaringan dengan menyediakan kerangka sementara untuk pertumbuhan sel dan pembentukan jaringan baru [15].

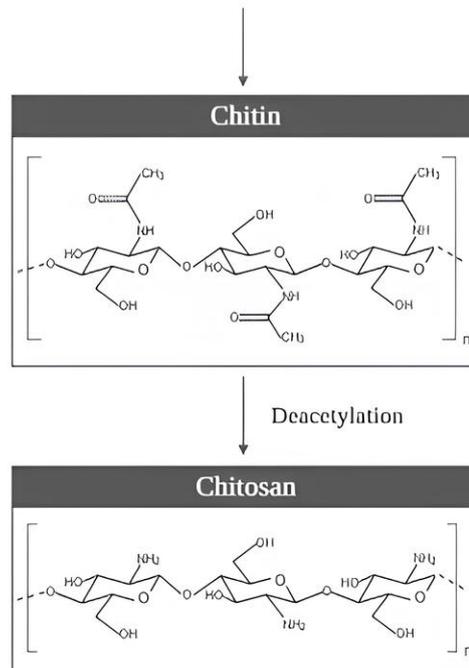


GAMBAR 4
Kerusakan tulang yang memerlukan *scaffolds* untuk perbaikan [16]

Salah satu faktor penting dalam desain *scaffolds* untuk perbaikan tulang adalah porositas, yang berperan dalam mendukung pertumbuhan jaringan tulang, serta memastikan difusi nutrisi dan suplai oksigen yang optimal [16]. *Scaffolds* yang digunakan memungkinkan pertumbuhan *osteoblasts* pada pori-pori dengan ukuran optimal, yaitu sekitar 100–300 μm , yang diperlukan untuk regenerasi tulang. Porositas yang tinggi memungkinkan penetrasi sel osteogenik, pembentukan pembuluh darah (vaskularisasi), dan transportasi nutrisi serta limbah metabolik [5]. Namun, peningkatan porositas yang melebihi 80% dapat menurunkan kekuatan mekanis *scaffolds*, sehingga perlu dilakukan optimasi berdasarkan aplikasi spesifik. Untuk tulang kortikal, *scaffolds* memerlukan modulus elastisitas yang tinggi dengan porositas rendah ($\leq 30\text{-}50\%$) untuk meniru kekuatan mekanis tulang tersebut. Sebaliknya, *scaffolds* untuk tulang trabekular memerlukan porositas tinggi ($\leq 50\text{-}90\%$) guna mendukung difusi nutrisi dan vaskularisasi [17].

F. *Chitosan*

Chitosan biopolimer alami dengan kelimpahan terbesar kedua setelah selulosa, yang diperoleh melalui proses deasetilasi kitin baik secara kimiawi maupun enzimatis. Senyawa ini dapat ditemukan dalam cangkang udang, kepiting, moluska, serangga, annelida, serta pada beberapa jenis dinding sel jamur [18], [19]. Kopolimer glukosamin dan N-asetilglukosamin yang terdiri dari monomer $\beta\text{-(1,4)-2-amino-2-deoksi-D-glukopiranos}$ [20]. *Chitosan* banyak digunakan dalam bidang medis karena sifatnya yang biokompatibel, *biodegradable*, dan tidak beracun [18].



GAMBAR 5
Struktur Kimia dari Kitin dan Chitosan

Gambar 5 memperlihatkan struktur kimia dari kitin dan kitosan. Kitosan memiliki sifat antibakteri yang berasal dari gugus amina bebas ($-NH_2$) yang terprotonasi menjadi $-NH_3^+$ dalam larutan asam, memberikan muatan *positive* yang memungkinkan interaksi dengan membran sel bakteri bermuatan *negative*. Interaksi ini merusak membran sel, meningkatkan permeabilitas, dan mengganggu fungsi biologis bakteri, seperti metabolisme dan sintesis protein, yang dapat menyebabkan lisis sel. Efek ini lebih optimal terhadap bakteri Gram-positif karena dinding selnya lebih tipis dan lebih mudah mengalami kerusakan [21].

G. Gelatin

Gelatin adalah protein alami hasil denaturasi kolagen, komponen utama jaringan ikat yang ditemukan pada kulit, tulang, dan jaringan hewan lainnya. Proses ini menghasilkan gelatin yang *biodegradable* dan non-antigenik [17]. Selain mendukung hemostasis, gelatin juga memfasilitasi adhesi dan proliferasi sel selama regenerasi jaringan. Namun, gelatin memiliki kelemahan, seperti kekuatan mekanik yang rendah, elastisitas yang terbatas, serta stabilitas bentuk dan ketahanan termal yang kurang baik. Untuk mengatasinya, gelatin perlu dimodifikasi melalui *crosslinking* guna meningkatkan kekuatan mekanik, stabilitas termal, dan ketahanan degradasi. Selain itu, gelatin sering dikombinasikan dengan biopolimer lain, seperti kitosan, untuk meningkatkan performanya [22].

H. Daun Sirih (*Piper betle* L.)

Daun sirih (*Piper betle* L.) telah dikenal sebagai tanaman obat karena kandungan senyawa bioaktifnya, termasuk saponin, flavonoid, tanin, dan minyak atsiri, yang memiliki beragam aktivitas farmakologis. Ekstraknya diketahui bersifat antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, dan antikanker, sehingga potensial untuk terapi medis berbasis bahan alami, termasuk dalam aktivitas antitumor [23].

Selain itu, flavonoid dan senyawa fenolik dalam *Piper betle* L. berperan dalam regenerasi tulang. Flavonoid dapat merangsang osteoblas untuk mempercepat perbaikan jaringan tulang, sementara senyawa fenolik bertindak sebagai antioksidan yang melindungi jaringan tulang dari stres oksidatif yang dapat menghambat pertumbuhan dan pemulihannya [9].

I. Metode *Freeze-Drying*

Freeze-drying, atau liofilisasi, adalah metode pengeringan di mana pelarut dikristalkan pada suhu rendah dan kemudian disublimasikan langsung dari fase padat ke uap. Proses ini terdiri dari dua tahap: pembekuan (*freezing*), di mana larutan polimer didinginkan hingga suhu tertentu, dan pengeringan (*drying*), di mana pelarut dihilangkan dengan menurunkan tekanan [24]. Metode ini umum digunakan dalam fabrikasi *scaffolds* untuk menjaga struktur pori yang diinginkan.

III. METODE

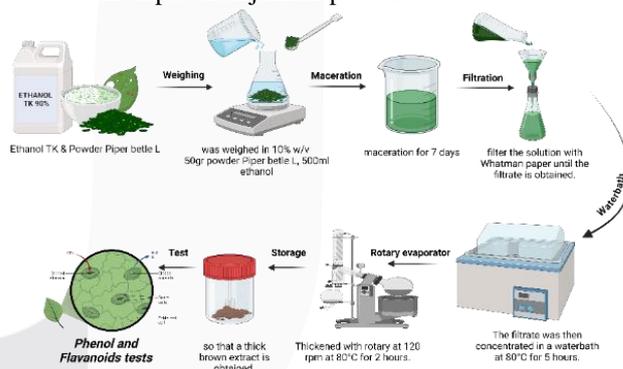
A. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan meliputi *chitosan*, gelatin, ekstrak *Piper betle* L., *aluminium chloride* ($AlCl_3$), *aquades*, asam asetat, asam galat, etanol 90%, *Folin-Ciocalteu*, *glutaraldehyde*, nutrient agar (NA), natrium karbonat

(Na_2CO_3), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *quercetin*, natrium nitrat ($NaNO_2$), natrium hidroksida (NaOH), serta bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Alat yang digunakan mencakup aluminium foil, autoklaf, *beaker glass*, cawan petri, *cabinet dryer*, cawan porselen, corong, *digital caliper*, erlenmeyer, *Freeze Dryer* (BUCHI Lyovapor L-300), *freezer*, gelas ukur, *grinder*, inkubator, kertas saring, *laminar air flow*, *magnetic bar*, *magnetic stirrer*, mikropipet, neraca analitik, *paraformaldehyde*, pipet ukur, *rotary evaporator*, sendok spatula, tabung reaksi, toples kaca, *centrifuge tube*, dan *waterbath shaker*. Karakterisasi material dilakukan menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) (Agilent Cary 630) dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) (JEOL JSM-6390 LV).

B. Ekstraksi *Piper betle* L. menggunakan Metode Maserasi

Daun sirih dicincang kecil, lalu dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* pada suhu $50^\circ C$ selama 24 jam hingga mencapai kondisi kering [25]. Setelah itu, daun yang telah kering digiling menggunakan *grinder* hingga menjadi serbuk halus. Serbuk daun ditimbang dengan neraca analitik, kemudian dimaserasi dalam etanol 90% dengan konsentrasi 10% w/v selama 7 hari. [26]. Setelah proses maserasi selesai, filtrat disaring menggunakan kertas saring. Selanjutnya, dikentalkan melalui evaporasi menggunakan *water bath shaker* pada suhu $80^\circ C$ dengan kecepatan 40 rpm, kemudian diproses dengan *rotary evaporator* pada suhu $80^\circ C$ dengan kecepatan 120 rpm selama 2 jam hingga menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat. Alur lengkap dari proses ekstraksi ini dapat ditunjukkan pada Gambar 6



GAMBAR 6

Proses ekstraksi *Piper betle* L. dan uji fenol serta flavonoid.

C. Uji Fenol dan Flavonoid

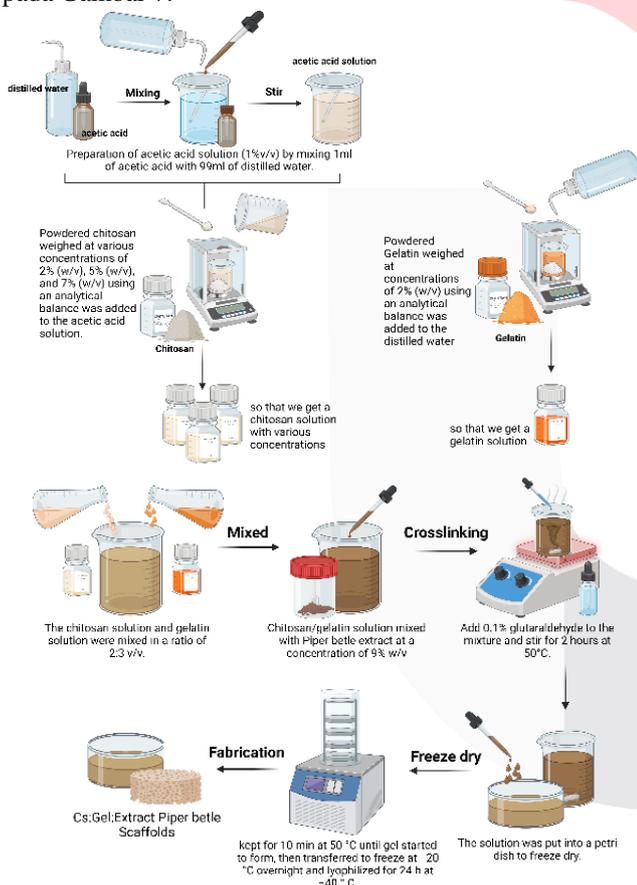
Kadar fenol total dianalisis menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*, dengan larutan standar asam galat (0, 10, 30, 60, 90, 110 mg/L) dan natrium karbonat (Na_2CO_3) 7,5% w/v. Sebanyak 0,2 mL sampel atau larutan standar dicampur dengan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, diinkubasi selama 3 menit, lalu ditambahkan 0,8 mL Na_2CO_3 . Campuran dihomogenkan menggunakan *vortex mixer* [11]. Diinkubasi selama 30 menit dalam kondisi gelap, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 765 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis [27].

Kadar flavonoid total dianalisis menggunakan metode kolorimetri dengan reagen *aluminium chloride* ($AlCl_3$), menggunakan larutan standar *quercetin* (0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L). Sebanyak 0,5 mL sampel atau larutan standar dicampur dengan 1,5 mL etanol 95%, 0,1 mL $AlCl_3$ 10% w/v, 0,1 mL natrium asetat 1 M, dan 2,8 mL *aquades* [9].

Campuran dihomogenkan, diinkubasi dalam kondisi gelap selama 30 menit pada suhu kamar, dan absorbansinya diukur pada 415 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis [28].

D. Fabrikasi *Scaffolds* Kitosan-Gelatin-*Piper betle L*

Larutan kitosan dengan konsentrasi bervariasi, yaitu 2%, 4%, 6%, dan 8% (w/v), disiapkan dalam asam asetat 1% v/v dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* dengan *hot plate*. Larutan gelatin 2% w/v dibuat dengan melarutkan gelatin dalam akuades pada 50 °C hingga homogen. Kedua larutan dicampurkan dengan rasio 2:3 v/v (kitosan/gelatin) dan diaduk selama 2 jam pada 50 °C [29]. Setelah itu, ditambahkan ekstrak *Piper betle L* 9% w/v hingga larutan kembali homogen, diikuti dengan penambahan glutaraldehyde 0,1% v/v sebagai *crosslinker*. Larutan yang telah tercampur dimasukkan ke dalam *centrifuge tube* dan diinkubasi selama 10 menit pada 50 °C hingga terbentuk gel. Selanjutnya, larutan dibekukan pada -80 °C selama 24 jam, lalu mengalami liofilisasi menggunakan *Freeze Dryer* BUCHI Lyovapor L-300 selama 48 jam pada -100 °C dengan tekanan 5 atm [5]. Proses fabrikasi *scaffolds* ditunjukkan pada Gambar 7.



GAMBAR 7

Proses fabrikasi *scaffolds* Kitosan-Gelatin-Ekstrak *Piper betle*

E. Uji Degradasi dan *Swelling* pada *Scaffolds*

Scaffolds direndam dalam larutan PBS (pH 7.4, 10 mL) dalam tabung reaksi tertutup aluminium foil, lalu disimpan dalam inkubator pada 37°C selama 21 hari. Setelah perendaman, *scaffolds* dibilas dengan air deionisasi, dikeringkan dalam oven pada 35°C selama 12 jam, lalu ditimbang menggunakan timbangan digital (ketelitian 10⁻⁴).

Nilai degradasi dihitung sebagai persentase selisih berat awal dan akhir terhadap berat awal yang dapat ditentukan menggunakan Persamaan (1) [29].

F. Uji Degradasi dan *Swelling* pada *Scaffolds*

Scaffolds direndam dalam larutan PBS (pH 7.4, 10 mL) dalam tabung reaksi tertutup aluminium foil, lalu disimpan dalam inkubator pada 37°C selama 21 hari. Setelah perendaman, *scaffolds* dibilas dengan air deionisasi, dikeringkan dalam oven pada 35°C selama 12 jam, lalu ditimbang menggunakan timbangan digital (ketelitian 10⁻⁴). Nilai degradasi dihitung sebagai persentase selisih berat awal dan akhir terhadap berat awal yang dapat ditentukan menggunakan Persamaan (1) [29].

$$\text{Degradasi (\%)} = \frac{W_0 - W_1}{W_1} \times 100\% \quad (1)$$

Scaffolds yang telah diliofilisasi dan dikrosslink dengan *glutaraldehyde* direndam dalam larutan PBS (pH 7.4, 10 mL) dalam tabung reaksi tertutup aluminium foil pada suhu ruang selama 60 menit. Setelah perendaman, kelebihan air dihilangkan menggunakan kertas saring sebelum penimbangan sampel basah dengan timbangan digital (ketelitian 10⁻⁴) [29]. Nilai *swelling* dihitung sebagai persentase selisih antarberat basah setelah perendaman dan berat awal terhadap berat awal sampel, yang dapat ditentukan menggunakan Persamaan (2).

$$\text{Swelling (\%)} = \frac{W_w - W_0}{W_0} \times 100\% \quad (2)$$

G. Analisis Fourier Transform Infrared (FTIR)

Analisis FTIR dilakukan menggunakan spektrometer Agilent Cary 630 dalam rentang 4000–400 cm⁻¹, dengan resolusi 4 cm⁻¹ dan 32 kali pemindaian untuk akurasi data [29]. Sampel dengan ketebalan <2 mm ditempatkan pada kristal ATR berbahan diamond dengan tekanan 5–10 N. Sinar inframerah pada sudut insidensi 45° menghasilkan gelombang evanescent yang menembus sampel hingga 0,5–2 μm, Memungkinkan identifikasi gugus fungsi seperti hidroksil (-OH), karbonil (C=O), dan amina (-NH₂) [30]. Spektrum yang diperoleh dianalisis menggunakan *software* Origin untuk representasi grafis.

H. Uji Antibakteri

Pengujian antibakteri *scaffolds* dilakukan dengan metode *inhibition zone* menggunakan *Escherichia coli* (Gram-negatif) dan *Staphylococcus aureus* (Gram-positif). Sampel berbentuk bulat (Ø 0,5 cm) terdiri dari kontrol negatif (K2G-Control: kitosan 2% w/v dan gelatin 2% w/v tanpa ekstrak *Piper betle L.*) serta variasi dengan 9% w/v ekstrak *Piper betle L.* dan kitosan (2%, 4%, 6%, 8% w/v).

Cawan petri disterilkan pada suhu 200°C selama 2 jam, sementara media Nutrient Agar (NA) disiapkan dengan melarutkan 4 g NA dalam 200 mL akuades, lalu disterilisasi menggunakan autoklaf pada 121°C selama 15–20 menit sebelum dituangkan secara steril dalam *Laminar Air Flow*. Bakteri uji disuspensikan dalam NaCl 0,9% dan disesuaikan dengan standar McFarland 0,5, kemudian sebanyak 100 μL suspensi diinokulasikan ke dalam cawan petri (Ø 90 mm), dicampur dengan 12,5 mL NA cair, dihomogenkan, dan dibiarkan memadat [31].

Silinder cup steril ditancapkan ke dalam media, kemudian sampel *scaffolds* dimasukkan. Setelah itu, dibiarkan selama 30 menit sebelum diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekitar *scaffolds* diukur menggunakan *digital caliper* [31].

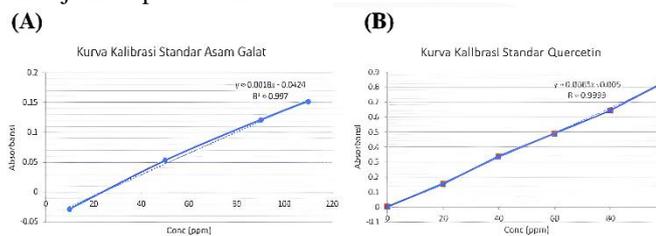
I. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Morfologi pori *scaffolds* diamati menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) (JEOL JSM-6390 LV). Sampel dibilas tiga kali dengan PBS, kemudian difiksasi dalam larutan 2% v/v *paraformaldehyde* dan 2% v/v *glutaraldehyde* selama 15 menit. Dehidrasi dilakukan bertahap dalam etanol (30%–100% v/v), lalu dikeringkan menggunakan *critical point drier* (Baltec CPD 030) untuk mencegah kerusakan struktur pori. Sampel kemudian dilapisi emas setebal 20 nm melalui *sputter coating* (Baltec SCD 050) agar konduktif sebelum diamati dengan SEM pada tegangan akselerasi 15 kV.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Evaluasi Konsentrasi Fenol dan Flavonoid

Absorbansi kompleks fenol total diukur menggunakan kurva standar asam galat dan dinyatakan dalam mg GAE/g (*Gallic Acid Equivalent*) [9]. Sedangkan flavonoid total dihitung berdasarkan kurva standar quercetin dan dinyatakan dalam mg QE/g (*Quercetin Equivalent*) [9]. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 8.



GAMBAR 8

Kurva Kalibrasi Standar dalam Pengujian Fenol dan Flavonoid: (A) Asam Galat Standar Fenol; (B) Quercetin Standar Flavonoid

Perbedaan antara conc terukur (mg/L) dan conc akhir (mg/g) terletak pada satuan dan perhitungannya. Conc terukur (mg/L) diperoleh langsung dari absorbansi larutan sampel menggunakan kurva standar, sedangkan conc akhir (mg/g) dinormalisasi terhadap berat sampel kering yang digunakan dalam ekstraksi.

TABEL 1
Fenol dan Flavonoid total Ekstrak *Piper betle* L.

N	Absorbansi		Conc Terukur (mg/L)		Conc Akhir (mg/g)	
	Fenol	Flavonoid	Fenol	Flavonoid	Fenol	Flavonoid
1	0,172	0,141	111,6	17,60	62,00	36,49
2	0,189	0,144	120,1	17,96	66,72	37,71
			Rerata		64,36	37,15

Berdasarkan hasil pada Tabel 1, rerata konsentrasi fenol yang diperoleh sebesar 64,36 mg GAE/g, lebih tinggi dibandingkan flavonoid sebesar 37,15 mg QE/g. Fenol memiliki stabilitas lebih tinggi terhadap kondisi ekstraksi, sehingga lebih sedikit mengalami degradasi dibandingkan flavonoid [32]. Kandungan fenol yang tinggi menunjukkan

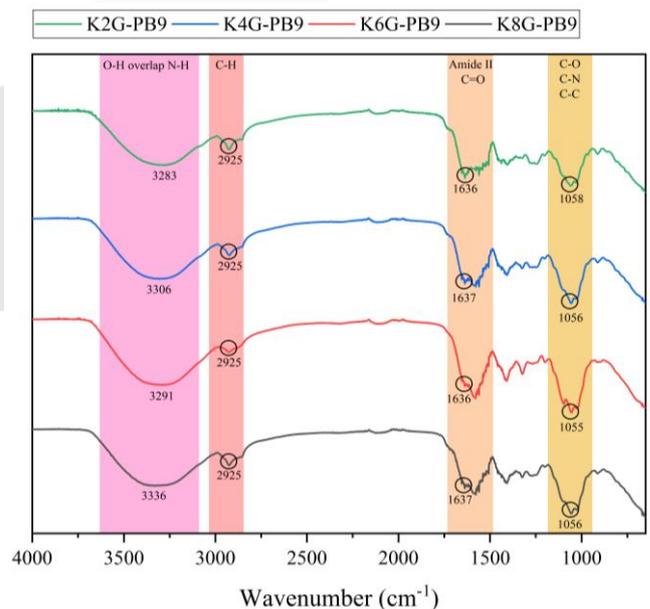
aktivitas antioksidan kuat yang dapat mengurangi stress oksidatif di sekitar implan dan mempercepat regenerasi jaringan tulang [33].

Kandungan flavonoid sebesar 37,15 mg QE/g berfungsi sebagai agen anti-inflamasi yang efektif dalam mencegah peradangan berlebihan di area implantasi serta memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen, seperti *Staphylococcus aureus*, yang merupakan penyebab utama infeksi pasca-operasi. Efek ini memberikan perlindungan tambahan terhadap komplikasi akibat infeksi, menjadikan ekstrak daun sirih berperan penting dalam mendukung penyembuhan luka dan mencegah inflamasi pada *scaffolds* [34].

Integrasi ekstrak daun sirih dalam *scaffolds* berbasis gelatin dan kitosan memengaruhi karakteristik fisik dan mekaniknya. Fenol dengan konsentrasi 64,36 mg GAE/g berperan dalam pembentukan ikatan silang antara kitosan dan gelatin, menghasilkan struktur matriks yang lebih padat dan stabil secara mekanik. Struktur ini mengurangi kapasitas penyerapan air dan *swelling ratio scaffolds* akibat berkurangnya situs hidrofilik bebas pada permukaan, sehingga meningkatkan ketahanan terhadap degradasi dalam cairan tubuh selama implantasi [35].

B. Analisis spektroskopi FTIR

Rentang bilangan gelombang 3200–3600 cm^{-1} menunjukkan serapan dari gugus –OH dan –NH yang berasal dari gelatin dan kitosan [36], sementara puncak sekitar 1650 cm^{-1} mengindikasikan vibrasi C=O dari gugus amida dalam gelatin. Selain itu, vibrasi N–H bending pada sekitar 1550 cm^{-1} juga berkaitan dengan struktur gelatin dan kitosan [37]. Adanya puncak di rentang 1000–1200 cm^{-1} menunjukkan keberadaan gugus C–O–C dan C–O yang tidak hanya berasal dari kitosan tetapi juga berasal dari komponen aktif dalam ekstrak *Piper betle* [38]. Variasi konsentrasi kitosan dalam sampel K2G-PB9, K4G-PB9, K6G-PB9, dan K8G-PB9 menyebabkan perubahan kecil pada intensitas dan pergeseran puncak [5]. Sebagaimana ditampilkan pada Gambar 9.

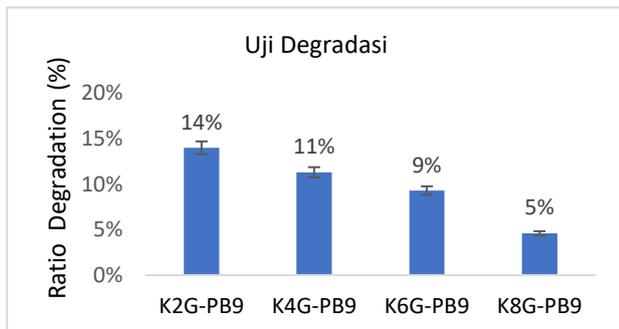


GAMBAR 9

Perbandingan Hasil Grafik FTIR K2G-PB9, K4G-PB9, K6G-PB9, dan K8G-PB9 yang Digabungkan

C. Stabilitas *Scaffolds* terhadap Degradasi

Uji degradasi mengevaluasi stabilitas *scaffolds* dalam cairan fisiologis. Stabilitas degradasi yang terkendali penting untuk mendukung regenerasi jaringan, memungkinkan material terurai seiring dengan pertumbuhan jaringan baru. Degradasi yang optimal juga memastikan integrasi *scaffolds* dengan jaringan sekitarnya, meningkatkan efektivitas penyembuhan [39].



GAMBAR 10
Hasil Uji Degradasi

Gambar 10 menunjukkan bahwa *scaffolds* K2G-PB9 memiliki rasio degradasi tertinggi (14%), diikuti oleh K4G-PB9 (11,3%), K6G-PB9 (9,3%), dan K8G-PB9 (4,6%). Perbedaan ini mencerminkan pengaruh komposisi material terhadap stabilitas *scaffolds*. Uji degradasi dilakukan dalam larutan PBS pH 7,4 untuk mensimulasikan kondisi *in vivo* [37].

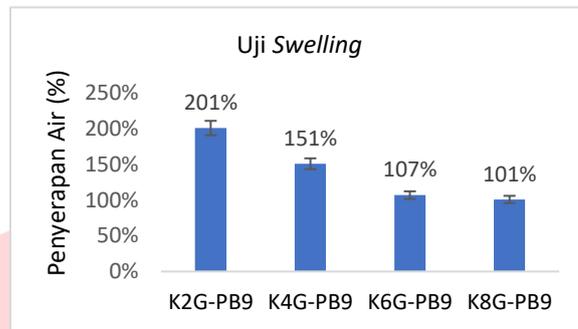
Material berporositas tinggi, seperti K2G-PB9, lebih rentan terhadap degradasi karena luas permukaan yang besar memungkinkan penetrasi PBS lebih dalam. Jana et al. (2018) menyatakan bahwa material dengan pori besar dan merata cenderung mengalami degradasi lebih cepat [6]. Sebaliknya, K8G-PB9, dengan struktur lebih padat, lebih tahan degradasi karena cairan sulit menembus bagian dalam material.

Scaffolds dengan konsentrasi kitosan lebih tinggi, seperti K6G-PB9 dan K8G-PB9, menunjukkan degradasi lebih lambat karena kitosan memiliki sifat mekanik baik dan membentuk struktur stabil melalui *cross-linking* [39], [40]. Dinding pori yang lebih tebal membatasi penetrasi PBS, memperlambat degradasi. Sebaliknya, K2G-PB9, dengan kandungan gelatin lebih dominan, lebih mudah terdegradasi karena sifat gelatin yang lebih hidrofilik dan kurang stabil dalam lingkungan cair.

Scaffolds K6G-PB9 (rasio degradasi 9%) dan K8G-PB9 (rasio degradasi 5%) menunjukkan stabilitas tinggi, menjadikannya cocok untuk implan tulang beban berat seperti femur, tibia, dan vertebra. Hasil ini sejalan dengan penelitian Lam et al. (2009), yang melaporkan bahwa rasio degradasi sebesar 6% setelah 21 hari mendukung laju pertumbuhan jaringan tulang yang berperan dalam regenerasi jaringan yang seimbang dan berkelanjutan. Degradasi yang lambat memungkinkan *scaffolds* mempertahankan kekuatan mekaniknya selama osteointegrasi, memberikan dukungan optimal hingga mineralisasi tulang tercapai. Oleh karena itu, material ini ideal untuk rekonstruksi tulang pasca-operasi tumor yang memerlukan stabilitas mekanik jangka panjang. Sebaliknya, *scaffolds* K2G-PB9 (rasio degradasi 14%) lebih cocok untuk regenerasi cepat, seperti perbaikan fraktur kompleks pada wajah atau koreksi deformitas kecil [41].

D. Karakterisasi *Swelling Scaffolds*

Uji *swelling* dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan *scaffolds* dalam menyerap cairan, yang berperan dalam menentukan efektivitasnya dalam mendukung difusi nutrisi dan faktor pertumbuhan ke dalam jaringan, yang penting untuk proses penyembuhan tulang. *Swelling* yang optimal membantu menciptakan lingkungan mikro yang sesuai bagi proliferasi sel dan mineralisasi matriks ekstraseluler [42].



GAMBAR 11
Hasil Uji *Swelling*

Hasil uji *swelling* pada Gambar 11 menunjukkan bahwa K2G-PB9 memiliki *swelling* ratio tertinggi (201%), diikuti oleh K4G-PB9 (151%), K6G-PB9 (107%), dan K8G-PB9 (101%). Sesuai dengan penelitian Jana et al. (2018), material dengan porositas tinggi cenderung memiliki *swelling* ratio lebih besar. Penurunan *swelling* ratio pada K6G-PB9 dan K8G-PB9 disebabkan oleh konsentrasi kitosan yang lebih tinggi dan struktur *scaffolds* yang lebih padat.

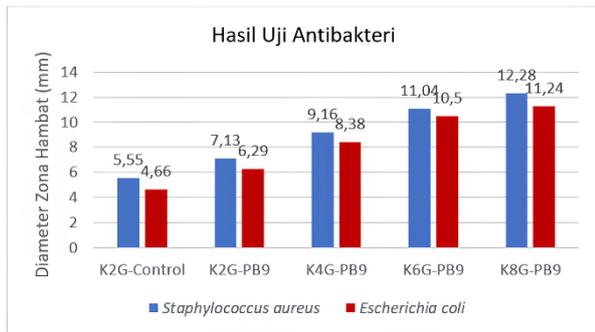
Uji *swelling* menggunakan PBS pH 7,4 bertujuan mensimulasikan kondisi fisiologis tubuh. K2G-PB9 memiliki dinding pori lebih tipis yang memungkinkan penyerapan cairan lebih besar, sementara K6G-PB9 dan K8G-PB9 memiliki dinding lebih tebal yang membatasi kapasitas *swelling* [6]. Selain itu, interaksi fenolik dari ekstrak *Piper betle L.* dengan gugus hidrofilik kitosan berkontribusi dalam menurunkan hidrofilisitas *scaffolds* meskipun porositas tinggi.

Swelling ratio yang lebih rendah pada K6G-PB9 dan K8G-PB9 juga dipengaruhi oleh kandungan senyawa hidrofobik dalam ekstrak *Piper betle L.*, seperti flavonoid dan fenol, yang mengurangi kemampuan material menyerap air [43]. Peningkatan *cross-linking* akibat tingginya konsentrasi kitosan memperkuat struktur matriks, membatasi penetrasi air ke dalam *scaffolds* [35]. *Glutaraldehyde* sebagai agen *cross-linking* juga mengurangi *swelling* ratio dengan membentuk ikatan kovalen dengan gugus amina (-NH₂) pada kitosan, sehingga memperkuat jaringan polimer dan mengurangi fleksibilitas matriks *scaffolds* [29].

Swelling ratio ideal untuk *scaffolds* tulang berkisar antara 100–300%, tergantung aplikasi dan lokasi implan, guna mendukung regenerasi jaringan dan mempercepat penyembuhan [44]. Zhang et al. (2019) melaporkan bahwa *swelling* ratio sekitar 100% optimal untuk stabilisasi implan. *Swelling* ratio yang terlalu tinggi dapat menyebabkan ketidakstabilan struktural, degradasi cepat, dan meningkatkan risiko inflamasi, yang menghambat osteointegrasi. Sebaliknya, *swelling* ratio terlalu rendah membatasi difusi nutrisi dan pertumbuhan sel dalam *scaffolds*, sehingga mengurangi efektivitas regenerasi jaringan.

E. Hasil Uji Antibakteri

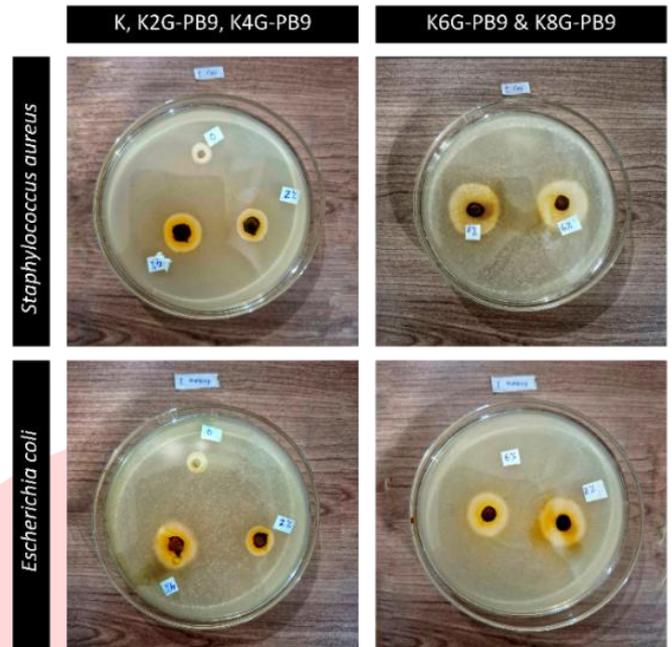
Uji antibakteri dilakukan untuk menilai efektivitas *scaffolds* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (Gram-negatif) dan *Staphylococcus aureus* (Gram-positif). Selain itu, uji ini juga mengevaluasi pengaruh variasi konsentrasi kitosan terhadap peningkatan aktivitas antibakteri *scaffolds*.



GAMBAR 12
Hasil Uji Antibakteri

Berdasarkan Hasil Uji Antibakteri pada Gambar 12, *scaffolds* K2G-Control menunjukkan zona hambat sebesar 5,55 mm. Dengan penambahan ekstrak daun sirih 9%, zona hambat meningkat signifikan menjadi 7,13 mm pada K2G-PB9. Variasi K4G-PB9 menghasilkan zona hambat sebesar 9,16 mm, sementara K6G-PB9 mencapai 11,04 mm. Zona hambat terbesar diamati pada K8G-PB9 dengan ukuran 12,28 mm. Peningkatan konsentrasi kitosan jelas meningkatkan efektivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Pada *Escherichia coli*, K2G-Control menghasilkan zona hambat sebesar 4,66 mm, yang meningkat menjadi 6,29 mm pada K2G-PB9. K4G-PB9 menghasilkan zona hambat 8,38 mm, sedangkan K6G-PB9 mencatatkan 10,50 mm. Zona hambat terbesar dicapai oleh K8G-PB9 dengan ukuran 11,24 mm. Meskipun *Escherichia coli* lebih resisten dibandingkan *Staphylococcus aureus*, hasil menunjukkan tren peningkatan efektivitas antibakteri seiring dengan peningkatan konsentrasi kitosan [45].

Peningkatan konsentrasi kitosan dari 2% hingga 8% menunjukkan peningkatan zona hambat yang signifikan pada kedua jenis bakteri. Kitosan memiliki sifat antibakteri yang berasal dari gugus amina bebas ($-NH_2$), yang dalam kondisi asam terprotonasi menjadi $-NH_3^+$, sehingga memiliki muatan positif dan dapat berinteraksi dengan membran sel bakteri yang bermuatan negatif [39]. Interaksi ini menyebabkan gangguan struktur membran sel, meningkatkan permeabilitasnya, serta menghambat fungsi biologis bakteri seperti metabolisme dan sintesis protein, yang pada akhirnya dapat menyebabkan lisis sel. Efek ini lebih optimal terhadap bakteri Gram-positif karena dinding selnya didominasi oleh lapisan peptidoglikan yang tebal, memungkinkan interaksi lebih kuat dengan kitosan dibandingkan dengan membran luar bakteri Gram-negatif yang mengandung lipopolisakarida, yang dapat menghambat penetrasi kitosan [21], [45]. Selain itu, derajat deasetilasi kitosan yang lebih tinggi meningkatkan jumlah gugus amina bebas yang terprotonasi, sehingga meningkatkan aktivitas antibakterinya [46].



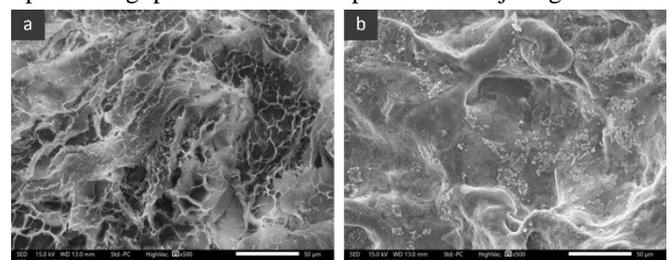
GAMBAR 13
Zona hambat *E. coli* dan *S. aureus* oleh variasi *scaffolds* Antibakteri

Pada Gambar 13 menunjukkan zona hambat *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* oleh variasi *scaffolds*. Diameter *scaffolds* tidak berpengaruh signifikan terhadap ukuran zona hambat, terbukti dari K6G-PB9 dan K8G-PB9 yang memiliki diameter sama (0,50 mm) namun menghasilkan zona hambat berbeda terhadap *S. aureus* (11,04 mm dan 12,28 mm). Hal ini menegaskan bahwa komposisi bahan aktif lebih berpengaruh dibandingkan ukuran *scaffolds*.

Senyawa aktif dalam ekstrak *Piper betle L.* menghambat pertumbuhan bakteri melalui mekanisme perusakan membran sel dan penghambatan enzim metabolik. *S. aureus* lebih rentan terhadap agen antibakteri dibandingkan bakteri Gram-negatif karena tidak memiliki membran luar, meskipun dinding selnya yang kaya peptidoglikan tetap memberikan perlindungan parsial. Akibatnya, *S. aureus* lebih rentan terhadap efek antimikroba dibandingkan *E. coli* [47], [48].

F. Analisis Morfologi dengan SEM

Dalam rekayasa jaringan, *scaffolds* harus memiliki struktur berpori dan interkoneksi yang baik untuk mendukung aliran nutrisi serta pertukaran metabolik yang optimal bagi proliferasi sel dan pertumbuhan jaringan.



GAMBAR 14
Morfologi *scaffolds* (a) K2G-PB9 menunjukkan pori lebih besar, sementara (b) K8G-PB9 lebih padat dengan pori lebih kecil. Perbesaran 500×, skala 50 µm.

Analisis SEM pada Gambar 14 menunjukkan *scaffolds* K2G-PB9 memiliki pori lebih besar dengan struktur lebih terbuka, sedangkan K8G-PB9 tampak lebih padat dengan pori lebih kecil. Peningkatan konsentrasi kitosan meningkatkan densitas material, sehingga mengurangi ukuran dan konektivitas pori dalam *scaffolds* [5]. K2G-PB9 dan K8G-PB9 memiliki ukuran pori berkisar antara 100–200 μm , yang berada dalam rentang optimal untuk rekayasa jaringan tulang. Menurut Abbasi et al. (2020), pori-pori heterogen dalam kisaran ini dapat meningkatkan viabilitas sel *osteoblasts* dan mendukung regenerasi jaringan setelah implantasi [49].

Struktur pori ini berkorelasi dengan hasil uji *swelling* pada Gambar 11, di mana K2G-PB9 memiliki *swelling ratio* tertinggi (201%) akibat porositas yang lebih besar dan dinding pori yang lebih tipis, sehingga memungkinkan absorpsi cairan lebih tinggi. Sebaliknya, K8G-PB9 menunjukkan *swelling ratio* terendah (101%) karena peningkatan densitas *scaffolds* membatasi kapasitas penyerapan cairan. Selain itu, konsentrasi kitosan yang lebih tinggi memperkuat interaksi antar rantai polimer dan efek *cross-linking* dengan *glutaraldehyde*, yang mengurangi ruang antar molekul dan menurunkan hidrofilisitas material [29].

Berdasarkan hasil ini, variasi konsentrasi kitosan tidak hanya memengaruhi morfologi *scaffolds* tetapi juga sifat *swelling*-nya. *Scaffolds* dengan kitosan lebih rendah (K2G-PB9) lebih cocok untuk aplikasi yang memerlukan porositas tinggi dan absorpsi cairan optimal, sedangkan *scaffolds* dengan kitosan lebih tinggi (K8G-PB9) lebih sesuai untuk aplikasi yang membutuhkan stabilitas mekanis lebih tinggi.

V. KESIMPULAN

Variasi konsentrasi kitosan dalam *scaffolds* kitosan-gelatin dengan ekstrak *Piper betle L.* memengaruhi karakteristik fisik dan biologisnya. Analisis FTIR menunjukkan stabilitas interaksi molekuler dengan penguatan ikatan hidrogen seiring peningkatan kitosan. *Scaffolds* dengan porositas tinggi, seperti K2G-PB9 dan K4G-PB9, mengalami degradasi lebih cepat, sementara K6G-PB9 dan K8G-PB9 memiliki stabilitas mekanis lebih baik dan laju degradasi lebih rendah. *Swelling ratio* lebih tinggi pada *scaffolds* berporositas tinggi dibandingkan dengan struktur yang lebih padat pada K6G-PB9 dan K8G-PB9. Efektivitas antibakteri meningkat dengan konsentrasi kitosan, dengan zona hambat tertinggi pada K8G-PB9 terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Peningkatan kitosan mengurangi ukuran pori tetapi tetap dalam rentang optimal untuk regenerasi tulang. Dengan efektivitas antibakteri dan sifat anti-inflamasi yang baik, *scaffolds* kitosan-gelatin dengan ekstrak *Piper betle L.* berpotensi sebagai implan kanker tulang yang mampu mencegah infeksi serta mendukung penyembuhan di area implan.

REFERENSI

- [1] H. Sung and J. Ferlay, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] Y. Hou, W. Wang, and P. Bartolo, "Application of additively manufactured 3D scaffolds for bone cancer treatment: a review," *Biodes Manuf*, vol. 5, no. 3, pp. 556–579, Jul. 2022, doi: 10.1007/s42242-022-00182-7.
- [3] N. Kumar and B. Gupta, "Global incidence of primary malignant bone tumors," *Curr Orthop Pract*, vol. 27, no. 5, pp. 530–534, Oct. 2016, doi: 10.1089/ten.TEA.2022.0177.
- [4] S. D. Kozusko, C. Riccio, M. Goulart, J. Bumgardner, and X. L. Jing, "Chitosan as a bone scaffold biomaterial," *Journal of Craniofacial Surgery*, vol. 29, no. 7, pp. 1788–1793, Jul. 2018, doi: 10.1097/SCS.0000000000004909.
- [5] S. Jana, S. J. Florczyk, M. Leung, and M. Zhang, "High-strength pristine porous chitosan scaffolds for tissue engineering," *J Mater Chem*, vol. 22, no. 13, pp. 6291–6299, Apr. 2012, doi: 10.1039/c2jm16676c.
- [6] F. Kadi, G. Dini, S. A. Poursamar, and F. Ejeian, "Fabrication and characterization of 3D-printed composite scaffolds of coral-derived hydroxyapatite nanoparticles/polycaprolactone/gelatin carrying doxorubicin for bone tissue engineering," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 35, no. 1, pp. 1–15, Dec. 2024, doi: 10.1007/s10856-024-06779-x.
- [7] H. Cao, J. Wang, Z. Hao, and D. Zhao, "Gelatin-based biomaterials and gelatin as an additive for chronic wound repair," *Front Pharmacol*, vol. 15, no. 1, pp. 01–15, May 2024, doi: 10.3389/fphar.2024.1398939.
- [8] M. H. Ereth, Y. Dong, L. M. Schrader, N. A. Henderson, and S. Agarwal, "Microporous Polysaccharide Hemospheres Do Not Enhance Abdominal Infection in a Rat Model Compared with Gelatin Matrix," *Surg Infect (Larchmt)*, vol. 10, no. 3, pp. 273–276, Jul. 2009, doi: 10.1089=sur.2007.033.
- [9] C. Lestari, E. Darwin, D. P. Putra, N. Suharti, and B. A. Gani, "The Role of Plant Extracts in The Repair of Rattus Norvegicus Mandibular Alveolar Bone in a Periodontitis Model," *Rasayan Journal of Chemistry*, vol. 16, no. 3, pp. 1342–1350, Jul. 2023, doi: 10.31788/RJC.2023.1638159.
- [10] A. Hanga-Farcaş, F. Miere, and G. A. Filip, "Phytochemical Compounds Involved in the Bone Regeneration Process and Their Innovative Administration: A Systematic Review," *Plants*, vol. 12, no. 10, pp. 1–32, May 2023, doi: 10.3390/plants12102055.
- [11] M. Van Driel and J. P. T. M. Van Leeuwen, "Cancer and bone: A complex complex," *Arch Biochem Biophys*, vol. 561, pp. 159–166, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.abb.2014.07.013.
- [12] H. K. Brown, K. Schiavone, F. Gouin, M. F. Heymann, and D. Heymann, "Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments," *Calcif Tissue Int*, vol. 102, no. 2, pp. 174–195, Feb. 2018, doi: 10.1007/s00223-017-0372-2.

- [13] D. M. Jason L. Ferguson, "Bone Cancer: Diagnosis and Treatment Principles," *Am Fam Physician*, vol. 98, no. 4, pp. 206–213, Aug. 2018, Accessed: Jun. 11, 2024. [Online]. Available: www.aafp.org/afp
- [14] S. D. Berman *et al.*, "Metastatic osteosarcoma induced by inactivation of Rb and p53 in the osteoblast lineage," 2008. [Online]. Available: www.pnas.org/cgi/content/full/
- [15] H. Park, B. Choi, J. Nguyen, J. Fan, and S. Shafi, "Anionic carbohydrate-containing chitosan scaffolds for bone regeneration," *Carbohydr Polym*, vol. 97, no. 2, pp. 587–596, Sep. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.05.023.
- [16] K. Guillén-Carvajal, B. Valdez-Salas, E. Beltrán-Partida, J. Salomón-Carlos, and N. Cheng, "Chitosan, Gelatin, and Collagen Hydrogels for Bone Regeneration," *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 13, pp. 1–27, Jul. 2023, doi: 10.3390/polym15132762.
- [17] M. Nivedhitha Sundaram, S. Deepthi, and R. Jayakumar, "Chitosan-Gelatin composite scaffolds in bone tissue engineering," *Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine*, vol. 7, no. 1, pp. 99–121, Sep. 2015, doi: 10.1007/978-81-322-2511-9_5.
- [18] S. K. L. Levengood and M. Zhang, "Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering," *J Mater Chem B*, vol. 2, no. 21, pp. 3161–3184, Jun. 2014, doi: 10.1039/c4tb00027g.
- [19] Hasri, "Prospek Kitosan dan Kitosan Termodifikasi Sebagai Biopolimer Alami yang Menjanjikan," *Jurnal Chemica*, vol. 11, no. 2, pp. 1–10, Dec. 2010, doi: <https://doi.org/10.35580/chemica.v11i2.490>.
- [20] P. T. Hardani, D. Perwito, and N. A. Mayzika, "Isolasi Kitin dan Kitosan dari Berbagai Sumber Bahan Alam," *Seminar Nasional Hasil Riset dan Pengabdian*, vol. 21, no. 3, pp. 469–475, Feb. 2021, doi: 10.21111/PHARMASIPHA.V4I1.4963.
- [21] Yessy Warastuti and Nani Suryani, "Karakteristik Degradasi dari Biomaterial Poli-(kaprolakton-kitosan-hidroksiapatit) Iradiasi Dalam Larutan Simulated Body Fluid Degradation Characteristics of Irradiated Poly-(caprolactone-chitosan-hydroxyapatite) Biomaterial in Simulated Body Fluid Solution," *A Scientific Journal for The Applications of Isotopes and Radiation*, vol. 9, no. 1, pp. 11–22, May 2013.
- [22] T. Agarwal, R. Narayan, S. Maji, and S. Behera, "Gelatin/Carboxymethyl chitosan based scaffolds for dermal tissue engineering applications," *Int J Biol Macromol*, vol. 93, pp. 1499–1506, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.028.
- [23] B. Alam, R. Majumder, S. Akter, and S. H. Lee, "Piper betle extracts exhibit antitumor activity by augmenting antioxidant potential," *Oncol Lett*, vol. 9, no. 2, p. 863, Feb. 2015, doi: 10.3892/ol.2014.2738.
- [24] C. M. Brougham, T. J. Levingstone, N. Shen, G. M. Cooney, and S. Jockenhoevel, "Freeze-Drying as a Novel Biofabrication Method for Achieving a Controlled Microarchitecture within Large, Complex Natural Biomaterial Scaffolds," *Adv Healthc Mater*, vol. 6, no. 21, pp. 1–15, Nov. 2017, doi: 10.1002/adhm.201700598.
- [25] S. Balasubramanian, R. Sharma, R. K. Gupta, and R. T. Patil, "Validation of drying models and rehydration characteristics of betel (Piper betel L.) leaves," *J Food Sci Technol*, vol. 48, no. 6, pp. 685–691, Dec. 2011, doi: 10.1007/s13197-010-0188-9.
- [26] L. Anggraita Mustika, E. Susanti, and R. Indriatie, "Pengaruh Waktu Maserasi Daun Sirih Merah menggunakan Etanol 90% terhadap Karakteristik Kimiawi dan Aktivitas Antioksidannya," *Live and Applied Science*, vol. 1, no. 2, pp. 72–79, Sep. 2022, doi: 10.24843/itepa.2019.v08.i03.p06.
- [27] A. Saputra, S. Andayani, and H. Nursyam, "Total Quantity of Phenol and Isolation Methanol Tannin Extract of Red Betel Leaf (Piper crocatum)," *Int J Pharmtech Res*, vol. 9, no. 7, pp. 146–153, Sep. 2016.
- [28] D. Mammen and M. Daniel, "A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids," *Food Chem*, vol. 135, no. 3, pp. 1365–1368, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.05.109.
- [29] A. Georgopoulou, F. Papadogiannis, A. Batsali, J. Marakis, and K. Alpantaki, "Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 29, no. 59, pp. 1–13, May 2018, doi: 10.1007/s10856-018-6064-2.
- [30] D. Kumar, S. Manik, P. Arnulf, and M. Editors, "Progress in Optical Science and Photonics Modern Techniques of Spectroscopy Basics, Instrumentation, and Applications," *Springer*, vol. 13, no. 6, pp. 1–660, Aug. 2021, doi: 10.1007/978-981-33-6084-6_1.
- [31] P. Handrianto, "Uji Antibakteri Ekestrak Jahe Merah Zingiber officinale var. Rubrum Terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli," *Journal of Research and Technology*, vol. 2, no. 1, pp. 1–4, Jun. 2016, doi: UjiAntibakteriEkestrakJaheMerahZingiberofficinale var.RubrumTerhadapStaphylococcusaureusdanEscherichiacoli.
- [32] M. Biesaga and K. Pyrzyńska, "Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods," *Food Chem*, vol. 136, no. 1, pp. 46–54, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.095.
- [33] C. H. Ché Thi, H. Đ. Nguyễn, and D. M. Lê Hoàng, "Influence of Piper betle L. extract on umbilical cord cells in vitro and potential treating cutaneous wound," *Heliyon*, vol. 7, no. 3, pp. 1–8, Mar. 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06248.
- [34] M. S. Do Socorro Chagas, M. D. Behrens, and C. J. Moragas-Tellis, "Flavonols and Flavones as Potential anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antibacterial Compounds," *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2022, no. 1, pp. 1–21, Sep. 2022, doi: 10.1155/2022/9966750.
- [35] I. Y. Kim, S. J. Seo, H. S. Moon, M. K. Yoo, and I. Y. Park, "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications," *Biotechnol Adv*, vol. 26, no. 1, pp. 1–21, Jan. 2008, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.009.
- [36] I. R. Serra, R. Fradique, M. C. S. Vallejo, T. R. Correia, S. P. Miguel, and I. J. Correia, "Production and characterization of chitosan/gelatin/ β -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration,"

- Materials Science and Engineering C*, vol. 55, no. 1, pp. 592–604, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.msec.2015.05.072.
- [37] B. Dhandayuthapani, U. M. Krishnan, and S. Sethuraman, “Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 94, no. 1, pp. 264–272, Jul. 2010, doi: 10.1002/jbm.b.31651.
- [38] G. Kaur, H. Kaur, S. Kumar, V. Verma, and H. S. Jhinjer, “Blooming Approach: One-Pot Biogenic Synthesis of TiO₂ Nanoparticles Using Piper Betle for the Degradation of Industrial Reactive Yellow 86 Dye,” *J Inorg Organomet Polym Mater*, vol. 31, no. 3, pp. 1111–1119, Mar. 2021, doi: 10.1007/s10904-020-01797-y.
- [39] A. Soriente, I. Fasolino, A. Gomez-Sánchez, E. Prokhorov, and G. G. Buonocore, “Chitosan/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds to modulate osteogenic and inflammatory response,” *J Biomed Mater Res A*, vol. 110, no. 2, pp. 266–272, Feb. 2022, doi: 10.1002/jbm.a.37283.
- [40] F. Ghorbani, M. Pourhaghgouy, T. Mohammadi-Hafshehiani, and A. Zamanian, “Effect of Silane-Coupling Modification on the Performance of chitosan-poly vinyl Alcohol-Hybrid Scaffolds in Bone Tissue Engineering,” *Karisruher Institut Fur Technologie*, vol. 12, no. 12, pp. 3015–3026, Dec. 2020, doi: 10.554/IR/1000126224.
- [41] Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid, V. Verma, H. Rashid, and M. Glogauer, “Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications,” *Materials*, vol. 8, no. 9, pp. 5744–5794, Aug. 2015, doi: 10.3390/ma8095273.
- [42] M. Dachyar Effendi and N. Suhendar, “Pengaruh Rasio Ha/TCP terhadap Karakteristik Komposit BCP-Gelatin-CMC sebagai Bahan Injectable Bone Substitute,” *Jurnal Inovasi dan Teknologi Material*, vol. 1, no. 2, pp. 15–20, Dec. 2019, doi: 10.29122/jitm.v1i2.3837.
- [43] H. H. Al Mamari, “Phenolic Compounds: Classification, Chemistry, and Updated Techniques of Analysis and Synthesis,” *IntechOpen*, vol. 1, no. 1, pp. 1–22, Apr. 2024, doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.98958>.
- [44] K. Maji, S. Dasgupta, K. Pramanik, and A. Bissoyi, “Preparation and Evaluation of Gelatin-Chitosan-Nanobioglass 3D Porous Scaffold for Bone Tissue Engineering,” *Int J Biomater*, vol. 2016, pp. 1–13, Oct. 2016, doi: 10.1155/2016/9825659.
- [45] R. Teixeira-Santos, M. Lima, L. C. Gomes, and F. J. Mergulhã, “Antimicrobial coatings based on chitosan to prevent implant-associated infections: A systematic review,” *iScience CelPress*, vol. 6, no. 24, pp. 1–23, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.isci.
- [46] Z. Y. Chen, S. Gao, Y. W. Zhang, R. B. Zhou, and F. Zhou, “Antibacterial biomaterials in bone tissue engineering,” *J Mater Chem B*, vol. 9, no. 11, pp. 2594–2612, Mar. 2021, doi: 10.1039/d0tb02983a.
- [47] H. Simanjuntak, S. Maimunah, and T. S. Situmorang, “Diameter Zona Hambat Antibiotik Amoxicillin dan Tetracycline terhadap Escherichia coli,” *Herbal Medicine Journal*, vol. 5, no. 2, pp. 19–24, Aug. 2022, doi: 10.58996/hmj.v5i2.52.
- [48] L. W. Riley, “Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: Escherichia coli,” *Microbiol Spectr*, vol. 8, no. 4, pp. 1–23, Dec. 2020, doi: 10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020.
- [49] N. Abbasi, S. Hamlet, R. M. Love, and N. T. Nguyen, “Porous scaffolds for bone regeneration,” *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, vol. 5, no. 1, pp. 1–9, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.jsamd.2020.01.007.