

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Kultur sel**

Kultur sel berhubungan dengan suatu cara pengembangbiakan dari sel yang didispersikan diambil dari jaringan asli menggunakan proses enzimatik, mekanik dan kimia (Freshney, 2005). Agar dapat mempelajari struktur dan fungsi sel hewan serta memproduksi banyak bahan-bahan biologi penting seperti vaksin, enzim, hormon, antibodi, maka teknologi kultur sel sangat dibutuhkan. Untuk produksi bahan-bahan biologi dalam skala besar maka dibutuhkan permukaan yang luas sebagai tempat tumbuhnya sel-sel. Hal ini disebabkan karena pada umumnya sel hewan adalah mampu menempel, hidup dan berkembang biak dengan baik di permukaan bahan sebuah *microcarrier*.

Teknologi Kultur sel menggunakan *microcarrier* dikembangkan pertama kali oleh Van Wezel pada tahun 1967 untuk memproduksi vaksin viral dan produk-produk sel biologi menggunakan sel hewan mamalia (Malda dan Frandoza, 2006). Setelah itu, *microcarrier* sudah dapat diperoleh secara komersial dan sukses digunakan untuk memproduksi macam-macam produk biologi baik dalam skala laboratorium maupun industri. Saat ini, kultur sel sudah dianggap teknologi yang sangat penting untuk menanggulangi penyebaran penyakit menular seperti HIV, influenza dan rabies.

#### **2.2 Microcarrier**

*Microcarrier* adalah bahan dengan luas permukaan yang besar untuk tempat menempelnya sel ke dalam sistem bioreaktor, sehingga sel mampu berkembang biak menjadi lebih

banyak jumlahnya (Souza dkk, 2007). Penggunaan *microcarrier* di dalam proses kultur sel telah memberikan peluang baru dan memproduksi sel dalam skala industri. Kultur sel terdiri dari sel hewan yang dikembangbiakan dan partikel *microcarrier* yang disuspensikan dengan media untuk tumbuhnya sel. Dibawa kondisi proses yang sesuai, maka sel akan melekat dan menyebar di permukaan *microcarrier* hingga membentuk jaringan sel yang optimum (Groot, 1995). Sel tumbuh sebagai satu lapisan di permukaan *microcarrier* atau lapisan yang lebih dari satu di dalam pori selama terjadi proses suspensi dengan media dibawa pengadukan dengan kecepatan tertentu. Keuntungan menggunakan *microcarrier* berpori adalah tersedianya tempat yang luas sehingga memungkinkan sel menempel dan berkembang biak menjadi lebih banyak tanpa gangguan dari aliran fluida dan kerusakan karena getaran selama pengadukan dibandingkan menggunakan *microcarrier* yang tidak berpori (Shiragami dkk, 1993).

Saat ini, *microcarrier* telah banyak tersedia di pasaran karena banyaknya jumlah penggunaan kultur sel. Jenis *microcarrier* yang tersedia di pasaran dapat dilihat pada tabel 1.

Pemilihan jenis *microcarrier* tergantung pada tujuan kultur dan juga morphology sel yang digunakan. Misalnya jenis *microcarrier* yang mempunyai lapisan surface charge di permukaan partikelnya lebih sesuai untuk menempelnya sel membentuk fibroblast dibandingkan dengan jenis lain selama proses kultur sel.

Bahan baku untuk membuat *microcarrier* sangat penting karena efek kimia, fisika dan geometri akan berdampak pada sifat-sifat carrier. Untuk contoh, mereka mempengaruhi toksisiti, hidropholisiti, hidrophoisiti, microporositi, kestabilan mekanik, difusi oksigen atau komponen media, permeabiliti, spesifik grafiti dan geometri (bentuk,

ukuran, ketebalan dll). Berbagai macam bahan sudah digunakan untuk memproduksi *microcarrier* antara lain plastik (polistyrene, poliethylene, poliprophylene), gelas, akrilamide, silika, karet silikon, sellulosa, dektran, collagen (gelatin) dan glycosaminoglycans). Bahan-bahan tersebut dapat dibuat *microcarrier* dengan yang berbeda-beda. Bentuk yang paling umum adalah bentuk bola, tetapi ada juga yang berbentuk fiber, flat dan mangkuk (GE Healthcare, 2005).

Table 2.1. *Microcarrier* yang dijual komersial

Jenis bahan	Merk	Company	Negara	Komposisi
1. Dextran	Cytodex-1	Pharmacia	Sweden	DEAE – dextran
	Cytodex-2	Pharmacia	Sweden	Quaternary amine coated dextran
	Superbeads	Flow Labs	USA	DEAE – dextran
	Microdex	Dextran Products	Canada	DEAE dextran
	Dormacell	Pfeifer and Langer	Germany	DEAE-dimers-dextran
2. Plastic	Biosilon	Nunc	Denmark	Polystyrene – charged
	Biocarriers	Biorad	USA	Polyacrylamide/ DMAP
	Cytospheres	Lux	USA	Polystyrene charged
3. Gelatin	Cytodex – 3	Pharmacia	Sweden	Gelatin - coated Dextran
	Gelibeads	KC Biologicals/ Hazelton Labs	USA	Gelatin
4. Glass	Bioglas	Solohil Engs	USA	Glass- coated plastic
	Ventreglas	Ventrea	USA	Glass- coated plastic
5. Cellulose	DE-52/53	Whatman	UK	DEAE – Cellulose

Keramik berpori dapat diaplikasikan untuk *microcarrier* (Eckert dkk, 2000).

*Microcarrier* berpori dikembangkan untuk memproduksi sel dalam jumlah yang besar.

Sel dapat dibiakkan didalam media dan melekat di permukaan luar *microcarrier* kemudian tumbuh di dalam pori-pori sehingga terlindung dari kerusakan mekanik yang disebabkan oleh benturan antar *microcarrier*, atau golakan fluida. Beberapa keuntungan menggunakan *microcarrier* berpori adalah (Warnock dan Al-Ribeai, 2003):

1. Sel yang tumbuh lebih banyak dibandingkan *microcarrier* tidak berpori
2. Dapat digunakan untuk macam-macam reaktor
3. Proses difusi yang singkat pada pori
4. Sel terlindungi dari golakan fluida dan getaran mekanik
5. Dapat digunakan untuk proses kontinyu\
6. Pertumbuhan sel di dalam konfigurasi 3 dimensi.

Kemampuan melekatnya sel ke permukaan bahan berhubungan dengan beberapa faktor misalnya luas area dan topographi. Banyak sel yang sudah sukses dibiakkan menggunakan keramik berpori antara lain Sel Vero (Costa dkk, 2008), Osteosarcoma (Bose dkk, 2002), Osteoblast (Kang dkk, 2005; Fischer dkk, 2005), ematopoietic (Berthold dkk, 2007) dan fibroblast (Eckert dkk, 2000).

Kami telah berhasil mengembangkan metode baru yang sederhana dengan biaya murah untuk membuat keramik berpori dengan menggunakan kuning telur sebagai agent pembentuk pori. Metode tersebut kami namakan *protein foaming-consolidation* (Fadli dan Sopyan, 2009). Di dalam metode tersebut, kuning telur berfungsi sebagai bahan pengembang dan pengkonsolidasi sekaligus. Keuntungan metode ini adalah pori dapat dibuat dengan temperatur yang rendah (110°C-180°C) dibandingkan dengan metode konvensional (500°C-600°C) seperti yang dilaporkan oleh Gregorova dan Pabst (2007); Wang dkk, (2006); Isobe dkk, (2007); Prabhakaran dkk (2007); Lyckfeldt dan Ferreira

(1998). Keuntungan lain metode ini yaitu porositi keramik dapat dikontrol dengan mengatur komposisi slurry dan kondisi proses, misalnya temperatur dan waktu pengeringan serta waktu pengadukan slurry (Fadli dan Sopyan, 2011; Fadli dan Sopyan, 2010). Selain itu, densiti keramik bisa dibuat rendah (lebih kecil dari  $1 \text{ g/cm}^3$ ) dengan menambahkan darvan 821 A sebagai dispersan (Fadli dkk, 2011). Keramik dengan densiti lebih kecil daripada densiti air telah membuka peluang membuat keramik berpori yang dapat digunakan sebagai mikrokarrier terapung di dalam bioreaktor. Microcarrier terapung sangat efektif digunakan untuk memproduksi vaksin melalui kultur sel. Teknologi microcarrier sudah dianggap salah satu cara mengatasi penyakit berbahaya yang disebabkan oleh virus, misalnya flu burung ataupun HIV.

### 2.3 Tri Kalsium Fosfat (TCP)

Tri kalsium fosfat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) merupakan keramik *bioresorbable* dengan rasio atom Ca/P 1,5. TCP memiliki 3 bentuk polimorfisme, yaitu  $\beta$ -TCP yang stabil pada temperatur  $1180^\circ\text{C}$ ,  $\alpha$ -TCP pada rentang  $1180$ - $1400^\circ\text{C}$  dan  $\alpha'$ -TCP yang stabil pada temperatur di atas  $1470^\circ\text{C}$  (Famery dkk, 1994). Keramik TCP merupakan keramik *biocompatible* dan *osteoconductive*.  $\beta$ -TCP adalah keramik turunan kalsium fosfat yang mempunyai similaritas kalsium dan fosfat dengan *cancellous bone* (Reynolds dkk, 2010). Meskipun TCP mempunyai kemiripan komposisi kimia dengan jaringan tulang, akan tetapi kekuatan mekanik TCP lebih lemah dibandingkan tulang manusia. Kekuatan mekanik tersebut dapat ditingkatkan dengan membuat pori pada TCP. Hal ini dikarenakan pori akan dilalui oleh jaringan tulang sehingga kekuatan mekanik implan dalam tubuh manusia akan meningkat (Swain, 2009).

## **2.4 Fabrikasi Keramik Berpori**

Pori keramik dapat dibentuk dengan beberapa metode. Perbedaan metode dalam fabrikasi keramik berpori akan mempengaruhi kuat tekan, derajat porositas dan ukuran pori yang dihasilkan. Ukuran pori keramik dapat diklasifikasikan menjadi mikro, meso dan makro pori. IUPAC merekomendasikan mikro pori mempunyai ukuran pori <2 nm, meso pori 2-50 nm dan makro pori berukuran >50 nm (Sing dkk, 1985). Keramik berpori dapat difabrikasi melalui konversi batu karang, *ceramic foaming technique*, *solvent casting*, *polymeric sponge method* dan *starch consolidation*.

### **2.4.1 Konversi Batu Karang**

Senyawa apatit dapat disintesis dari batu karang. Keramik berpori dapat diproduksi dikarenakan struktur morfologi batu karang yang memiliki pori. HA berpori yang dihasilkan mempunyai ukuran pori 200-500  $\mu\text{m}$  dengan 50-65% derajat porositas. Kelemahan metode ini adalah sulit mengontrol pori dan jumlah bahan baku yang terbatas (Abdurrahim dan Sopyan, 2008).

### **2.4.2 Ceramic Foaming Technique**

Teknik *foaming* ini dilakukan dengan penambahan zat *foamer*. *Foaming agent* yang umumnya digunakan adalah hidrogen peroksida, garam karbonat, *baking powder* dan kuning telur. Zat-zat tersebut dicampurkan ke dalam HA kemudian dikalsinasi (Woyansky dkk, 1992; Fadli & Sopyan, 2009). Ukuran pori HA yang dihasilkan bervariasi dari 30-600 mikron (Aoki dkk, 2004). Kelemahan metode ini terletak pada interkoneksi antar pori yang lemah dan ukuran pori yang tidak seragam. Tamai dkk.

(2002) mengembangkan teknik *ceramic foaming* dengan adanya ikatan silang polimerisasi yang disebut *gel-casting*. *Gel-casting* telah diterapkan oleh He dkk. (2009) dalam fabrikasi alumina berpori menggunakan protein. Protein yang dipakai adalah protein putih telur (EWP) dan protein *whey* yang terisolasi (WPI). Alumina yang dihasilkan mempunyai derajat porositas 86,5-87% dengan kuat tekan 6,36-7,87 MPa.

#### **2.4.3 Salt-Solvent Casting**

Metode ini menggunakan garam seperti natrium klorida dan pelarut polimer sebagai pembentuk pori. Campuran zat-zat tersebut ditambahkan ke dalam keramik dan dicetak (*pressing*), kemudian dilarutkan dalam air hingga kristal garam terlepas. Metode ini menghasilkan kalsium fosfat dengan diameter makro pori 100-500  $\mu\text{m}$ , interkoneksi antar pori yang baik dan derajat porositas berkisar 87-91% (Walsh dkk., 2008).

#### **2.4.4 Polymeric Sponge Method**

Penggunaan polimer berpori dapat menghasilkan keramik berpori dengan interkoneksi antar pori yang baik. Impregnasi polimer dan proses *sintering* pada keramik akan menghasilkan keramik berpori dengan porositas  $\pm 45\%$ . Ramay & Zhang (2003) telah mengkombinasikan *polymeric sponge method* dengan metode *gel-casting*. Penggabungan metode ini menghasilkan HA berpori dengan ukuran pori 200-400  $\mu\text{m}$ , *mechanical strength* yang meningkat, struktur mikro yang homogen dan seragam serta interkoneksi antar pori yang baik.

#### **2.4.5 Starch Consolidation Method**

*Starch* merupakan zat pati yang terdiri dari jagung, sorgum, kentang, ubi dan *wheat*. Umumnya *starch* berwarna putih, *dense* dan tidak larut dalam air pada temperatur ruang. *Starch consolidation* merupakan metode pembentukan pori dengan menambahkan pati pada keramik. Campuran tersebut lalu ditambahkan air hingga membentuk suspensi dan dimasukkan ke *furnace* untuk *sintering* (Lyckfeldt dan Ferreira, 1997). Metode ini menghasilkan porositas 45-70% dengan kuat tekan 2-15 MPa (Abdurrahim dan Sopyan, 2008).

#### **2.5 Drying dan Sintering**

Dua proses penting dalam fabrikasi keramik adalah *drying* dan *sintering*. *Drying* merupakan proses pemisahan air dari campuran. Dalam fabrikasi keramik, *drying* dibutuhkan untuk melepaskan air dari *slurry*. Selama proses berlangsung, molekul air berdifusi ke permukaan dimana proses evaporasi terjadi. Selama proses *drying*, material akan mengalami penyusutan. Penyusutan yang terjadi dikarenakan air telah terevaporasi keluar bahan sehingga ukuran material semakin kecil. Material yang telah melewati proses ini disebut *green bodies*.

*Sintering* merupakan proses pemanasan pada temperatur tinggi untuk meningkatkan kekuatan mekanik material. Proses ini juga dapat didefinisikan sebagai proses produksi suatu material dengan mikro struktur dan porositas yang terkontrol. *Sintering* dapat diklasifikasikan menjadi *sintering* fasa padat dan fasa cair. *Sintering* fasa padat terjadi jika material berada dalam fasa padat pada temperatur *sintering* sedangkan *sintering* fasa cair terjadi apabila terdapat cairan selama *sintering* berlangsung. Selama *sintering*



berlangsung, struktur partikel material akan tumbuh (*coarsening*) dan menyatu membentuk kesatuan massa (densifikasi) (Kang, 2005).

Selama *coarsening* dan densifikasi berlangsung, terjadi pergerakan partikel material. Pergerakan tersebut terjadi secara kompleks dan dikarenakan adanya difusi permukaan ( $D_s$ ), difusi gas ( $D_g$ ), difusi kisi ( $D_l$ ), difusi *boundary* ( $D_b$ ), perbedaan viskositas ( $\eta$ ) dan perbedaan tekanan uap ( $\Delta p$ ) partikel.

Pergerakan partikel material berkaitan erat dengan laju densifikasi (laju *sintering*). Pergerakan ini dipengaruhi oleh beberapa faktor. Laju densifikasi akan meningkat apabila temperatur semakin tinggi. Densifikasi merupakan proses termal dimana variabel proses seperti difusivitas dan viskositas diekspresikan sebagai fungsi eksponensial dari temperatur. Oleh karena itu, kenaikan temperatur akan meningkatkan nilai variabel tersebut serta laju densifikasi. Tekanan yang semakin besar menyebabkan ruang antar partikel yang semakin kecil. Menurut teori tumbukan, ruang antar partikel yang semakin kecil akan mempercepat reaksi dan meningkatkan laju densifikasi. Pengaruh ukuran partikel terhadap laju densifikasi dijelaskan melalui hukum Herring. Dua partikel dengan radius  $a_1$  dan  $a_2$ , dimana  $a_2 = \lambda a_1$ , waktu *sintering* dikorelasikan sebagai  $t_2 = (\lambda)^\alpha t_1$  dengan  $\alpha$  merupakan eksponen (tergantung mekanisme pergerakan partikel). Dari hukum Herring tersebut dapat dilihat bahwa partikel dengan ukuran yang lebih besar membutuhkan waktu yang lebih lama daripada partikel yang ukurannya lebih kecil untuk mencapai derajat *sintering* yang sama (Kang, 2005).