



UNIVERSITAS INDONESIA

**KOMPOSIT HIDROKSIAPATIT KALSINASI SUHU RENDAH DENGAN
ALGINAT *SARGASSUM DUPLICATUM* ATAU *SARGASSUM CRASSIFOLIUM*
SEBAGAI MATERIAL *SCAFFOLD*
UNTUK PERTUMBUHAN SEL PUNCA MESENKIMAL**

DISERTASI

DECKY JUSIANA INDRANI

NPM 0806400642

**PROGRAM DOKTOR BIDANG ILMU MATERIAL
FAKULTAS MATEMATIK DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS INDONESIA**

2012

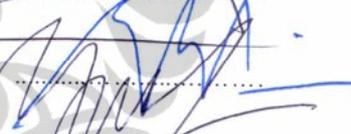
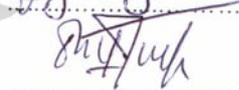
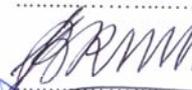
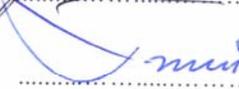
HALAMAN PENGESAHAN

Disertasi ini diajukan oleh

Nama : Decky Jusiana Indrani
 NPM : 0806400642
 Program Studi : Ilmu Material
 Judul Disertasi : Komposit Hidroksiapatit Kalsinasi Suhu Rendah dengan Alginat *Sargassum Duplicatum* atau *Sargassum Crassifolium* sebagai Material Scaffold untuk Pertumbuhan Sel Punca Mesenkimal

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Doktor pada Program Studi Ilmu Material, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

DEWAN PENGUJI

Ketua Sidang :	Dr. Adi Basukriadi	
Promotor :	Dr. Bambang Soegijono	
Ko-Promotor :	Dr. Emil Budianto	
	Dr.dr. Ismail H. Dilogo, Sp.OT	
Tim Penguji :	Dr. Muhammad Hikam	
	Prof. Dr. Sumi Hudiono PWS	
	Prof. drg. Bambang Irawan, PhD	
	Prof. Dr. Ir. Bambang Sunendar, M.Eng	
Ditetapkan di :	Jakarta	
Tanggal :	12-01-2012	

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Disertasi ini adalah hasil karya saya sendiri.

Semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk
telah saya nyatakan dengan benar

Nama : Decky Jusiana Indrani
NPM : 0806400642

Tanda Tangan :



Tanggal :

Jakarta, 12 - 01 - 2012

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Decky Jusiana Indrani
NPM : 0806400642
Program Studi : Ilmu Material
Departemen : Físika
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Disertasi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Komposit Hidroksiapatit Kalsinasi Suhu Rendah dengan Alginat
Sargassum Duplicatum atau *Sargassum Crassifolium* sebagai
Material Scaffold untuk Pertumbuhan Sel Punca Mesenkimal**

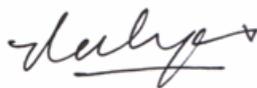
beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini, Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalih media/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta

Tanggal : 12-01-2012

Yang menyatakan,



Decky Jusiana Indrani

UNGKAPAN TERIMA KASIH

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Pertama dan terutama, puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, atas segala karunia, berkah dan rahmat yang dilimpahkanNya kepada kami sekeluarga sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Disertasi ini merupakan syarat untuk memperoleh gelar Doktor dalam bidang Ilmu Material di Universitas Indonesia. Penelitian dan penulisan disertasi ini dilengkapi oleh asupan, arahan, dukungan, dorongan, koreksi serta nasehat dari berbagai pihak. Oleh sebab itu, sepatutnyalah penulis menyampaikan rasa terima kasih yang tak terhingga serta penghargaan kepada mereka yang terukir dalam tulisan ini.

Kepada Rektor Universitas Indonesia, Prof. Dr. der. Soz. Gumilar Rusliwa Somantri, yang telah menerima penulis sebagai mahasiswa S3 di Universitas Indonesia, penulis sampaikan terima kasih.

Kepada Dekan FMIPA-UI, Dr. Adi Basukriadi, MSc, yang telah menerima penulis di Program Studi Ilmu Material, FMIPA-UI dan juga telah menjadi Ketua Pelaksana Sidang Promosi, penulis ucapkan terima kasih.

Penghargaan penulis haturkan kepada Dr. Bambang Soegijono, yang telah berkenan menjadi Promotor. Rasa hormat yang tak terhingga penulis sampaikan atas langkah-langkah yang berarti dari beliau bagi penulis selama penulis menjalani program studi S3. Tidak lupa penulis sampaikan terimakasih atas waktu yang diluangkan untuk mengoreksi disertasi ini, di tengah-tengah kesibukan beliau sebagai Ketua Program Studi Ilmu Material FMIPA-UI.

Ungkapan yang sama penulis haturkan kepada Dr. Emil Budianto, yang telah berkenan menjadi Ko-Promotor. Tuntunan beliau dalam setiap langkah penulis merupakan sesuatu yang amat berarti. Penghargaan juga penulis sampaikan untuk beliau yang telah memberi tambahan kepustakaan dan menyediakan waktu untuk

berdiskusi serta mengoreksi disertasi ini disela-sela kesibukan pekerjaan beliau yang padat.

Penghargaan penulis haturkan kepada Dr. dr. Ismail Hadisoebroto Dilogo, SpOT, yang juga telah berkenan menjadi Ko-promotor. Beliau telah meluangkan waktunya di tengah-tengah pekerjaannya yang padat untuk membimbing penulis dengan kesabaran, sejak pertama kali penulis menghadap beliau sampai selesainya penulisan disertasi ini. Terimakasih juga penulis sampai kepada beliau yang telah menambahkan wawasan rekayasa jaringan tulang kepada penulis

Terimakasih penulis tambahkan kepada Dr. dr. Ismail Hadisoebroto Dilogo, SpOT, yang telah memberi sel punca mesenkimal dari hasil riset beliau dan tim kepada penulis. Dengan sel punca mesenkimal pemberian beliau ini penulis dapat melanjutkan penelitian ke tahap kedua (akhir) dari penelitian ini. Dan terimakasih juga penulis sampaikan karena beliau telah memperkenalkan penulis kepada pihak Stem Cell and Cancer Institute, PT Bifarma-Jakarta.

Penghargaan, serta rasa hormat yang tak terhingga penulis haturkan kepada Tim Penguji yang diketuai oleh Dr. Muhammad Hikam serta anggota penguji Prof. Dr. Sumi Hudiono PWS, Prof. drg. Bambang Irawan, PhD dan Prof. Dr. Ir. Bambang Sunendar, MEng. Beliau semua telah meluangkan waktu yang banyak untuk mempelajari, menelaah, memberi asupan, memeriksa bahasa dan mengoreksi ejaan untuk dapat menjadikan disertasi ini lebih baik. Terima kasih juga penulis sampaikan kepada tim penguji atas arahan kepada penulis untuk mencari mutiara dari penelitian ini agar hasil penelitian ini dapat disumbangkan baik untuk kemajuan ilmu pengetahuan maupun masyarakat.

Penghargaan penulis tambahkan khusus kepada Prof. Dr. Ir. Bambang Sunendar, MEng, yang pada hari ujian harus menempuh perjalanan Bandung - Jakarta. Pada kesempatan ini, penulis juga mengungkapkan terimakasih atas kemudahan yang telah diberikan oleh beliau sehingga penulis dapat menggunakan *homogenizer* di Laboratorium *Advanced Material*, FTI-ITB. Tuntunan dan arahan yang diberikan

oleh beliau selama penulis berada di laboratorium tersebut sangat berharga bagi penulis dalam menyelesaikan sebagian dari penelitian. Penulis berterimakasih atas tambahan kepustakaan untuk melengkapi disertasi serta kesediaan beliau meluangkan waktu untuk arahan penyelesaian penulisan disertasi, kendati beliau sangat sibuk dengan pekerjaannya sehari-hari.

Kepada semua staf pengajar Program Pendidikan Doktor Ilmu Material, FMIPA-UI yang telah memberi bekal ilmu melalui pembelajaran yang penulis ikuti dalam rangka menempuh program Doktor, penulis sampaikan terimakasih. Khususnya kepada Dr. Bambang Soegijono, Dr. Muhammad Hikam, Dr. Azwar Manaf dan Dr. Soehardjo Poertadji yang memberikan wawasan ilmu material yang mana sangat bermanfaat dalam penyelesaian penulisan disertasi ini. Tak lupa penulis sampaikan penghargaan kepada Prof. Dr. Djarwani S. Soedjoko yang telah meluangkan waktu untuk bertukar pikiran dengan penulis dalam menambahkan wawasan ilmu hidroksiapatit pada awal pelaksanaan penelitian ini.

Penghargaan penulis sampaikan kepada Dr. Mirzan Thabrani Razzak, M.Eng, APU, selaku Ketua Pusat Laboratorium Terpadu, Universitas Islam Negeri – Syarif Hidayatullah, Jakarta, yang telah mengizinkan penulis menggunakan pesawat *freeze dryer*. Ungkapan sama penulis sampaikan kepada Sandra Hermanto, MSi, selaku Ketua Laboratorium Pangan, yang telah mengizinkan penulis untuk melakukan persiapan sampel di laboratorium tersebut. Terimakasih tidak lupa penulis sampaikan kepada Priyambodo, Ssi, Prita Wardhani, Amd, dan Fitria Hatiningsih, Ssi, yang juga membantu pelaksanaan persiapan tersebut.

Terimakasih sebesar-besarnya kepada saudari Rubiah yang telah bersedia membantu melakukan uji kekuatan kompresi, dengan *load cell* sangat rendah yang diperlukan dalam penelitian ini, di Laboratorium Rekayasa Proses Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian-IPB.

Ungkapan terimakasih penulis tujukan kepada Ir. Dipl TB Basril Abbas yang telah membantu penulis melakukan sterilisasi peralatan penelitian dengan radiasi sinar Gamma di Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN - Jakarta.

Terimalah ungkapan terimakasih dari penulis untuk dr. Mirawati, PhD, yang telah mengijinkan penulis untuk melakukan uji sterilitas dan uji toksisitas untuk sampel *scaffold* di Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Mikrobiologi, FK-UI. Terimakasih pula penulis sampaikan kepada beliau atas waktu yang disisihkan untuk bertukar pikiran, kendati beliau sangat sibuk sebagai ketua Laboratorium Kultur Jaringan. Kepada Dr. Ir Beti, yang telah menyediakan waktu untuk membimbing penulis melakukan uji toksisitas, penulis sampaikan terimakasih. Atas usaha beliau berdua akhirnya peneliti dapat melanjutkan kultur sel dengan menggunakan sampel *scaffold* yang awalnya tidak steril.

Terimakasih kepada Yuyus Kusnadi PhD, selaku *Principle Investigator* di Stem Cell and Cancer Institute - PT Bifarma-Jakarta, yang telah berkenan mempelajari proposal penelitian penulis untuk diajukan kepada Pimpinan PT Bifarma, Jakarta. Selanjutnya, penulis ucapkan terimakasih atas ijin yang akhirnya diberikan oleh Pimpinan PT Bifarma-Jakarta, sehingga memungkinkan penulis melakukan rangkaian penelitian tahap kedua di Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute. Tidak lupa penulis sampaikan terimakasih khusus kepada Lakshmi Shandouw, SSi, yang telah menyediakan waktu khusus setiap hari untuk membantu penulis dalam pelaksanaan kultur sel di laboratorium tersebut, di samping pekerjaan beliau.

Terimalah ungkapan terimakasih dari penulis untuk Dr. drg. Indang Trihandini, MKes, atas kesediaan meluangkan waktu untuk bertukar pikiran dan kesabaran beliau bersama penulis melakukan analisis statistik disela-sela kesibukan beliau sebagai Ketua Departemen Kependudukan dan Biostatistik, FKM-UI.

Terimalah ungkapan terimakasih penulis kepada seluruh Sejawat di Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi, FKG-UI. Kepada Prof. drg. Bambang Irawan, PhD, yang juga Dekan FKG-UI, atas ijin yang diberikan kepada penulis untuk

menjalani program Doktor, penulis haturkan terimakasih. Dorongan beliau yang terus-menerus kepada penulis menjadikan cambuk bagi penulis untuk tegar menjalani pendidikan Doktor. Penulis juga berterimakasih kepada Dr. drg. Yosi Kesuma Eriwati, MSi, yang juga selaku Ketua Departemen, yang telah menyarankan penulis untuk mendalami ilmu material di Program Studi Doktor Ilmu Material FMIPA-UI. Penulis juga tidak pernah lupa kepada para Sejawat di Departemen yang telah mengambil alih tugas penulis sebagai staf pengajar selama penulis menjalani program Doktor. Disamping itu, hiburan para Sejawat telah menjadi penglipur lara bagi penulis di masa-masa sulit pelaksanaan penelitian. Untuk semua ini penulis sampaikan terimakasih.

Terima kasih penulis haturkan kepada para Guru Besar di FKG-UI, walaupun tidak terlibat secara langsung, namun telah memberi perhatian dan menambah semangat kepada penulis agar penulis dapat menyelesaikan program Doktor ini dengan segera. Penghargaan khusus penulis tujukan kepada Prof. drg. Boy Bachtiar, MS, PhD, dan kepada Prof. drg. Endang Boy Bachtiar, MS, PhD atas asupan dan waktu untuk bertukar pikiran saat disertasi ini masih berupa pra-proposal penelitian.

Tidak lupa ungkapan terimakasih dari penulis kepada pihak-pihak yang turut berperan dalam disertasi ini. Para Sejawat di Departemen Biologi Oral yang telah menambah wawasan penulis mengenai sel dan rekayasa jaringan. Yoki Yulizar, PhD, telah meminjamkan meja penelitian beliau di Laboratorium Kimia, FMIPA-UI. Niki Prastomo, PhD yang telah memberi arahan teknis pelaksanaan penelitian selama penulis berada di Laboratorium Advanced Material-ITB.

Penulis juga menyampaikan terimakasih kepada beberapa pihak di Program Studi Doktor Ilmu Material, FMIPA-UI. Kepada teman-teman dan khususnya teman satu angkatan tahun 2008 yang telah menjadi teman bertukar pikiran dan telah menjadi penyemangat sehingga beban yang penulis tanggung terasa lebih ringan dan menyenangkan. Terimalah ungkapan terimakasih penulis kepada rekan-rekan yang telah membantu penulis saat berlangsungnya acara Sidang Terbuka Promosi

Doktor pada tanggal 12 Januari 2012, yaitu Wisnu A Adi, MSi yang telah berkenan membantu operasional tayangan presentasi serta kepada Meykel Manawan, MSi dan Jojor Manalu, MSi yang telah berkenan menjadi pendamping (paranim). Dan tidak lupa penulis berteimakasih kepada semua staf administrasi dan pegawai yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan hal-hal yang bersifat administratif.

Terima kasih penulis sampaikan kepada Kementerian Pendidikan Nasional atas bantuan dana penelitian 'Hibah Doktor' yang disalurkan melalui DRPM-UI sehingga penulis dapat menuntaskan penelitian disertasi ini.

Akhirnya, penulis mengungkapkan terima kasih kepada keluarga tercinta. Pertama sekali rasa cinta dan terima kasih yang tak terhingga penulis haturkan kepada kedua orang tua penulis, Bapak Joewono dan Ibu Sri Jusmini, yang telah membesarkan dan mendoakan terus-menerus untuk penulis. Selanjutnya, untuk suami, Sabar Cahyono dan anak-anak, Devanno Viere dan Kivano Navin, rasanya tidak henti-hentinya penulis bersyukur dan berterima kasih atas dukungan dan semangatnya, dari awal sampai akhir penulis menjalani program Doktor ini.

Masih banyak pihak yang telah membantu penulis namun tidak mungkin semuanya dapat disebut satu persatu. Untuk itu setulusnya penulis mohon maaf dan terima kasih. Hanya Allah yang dapat memberikan imbalan serta melimpahkan karuniaNya kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu terselesaikannya program Doktor dan terwujudnya disertasi ini. Selain itu, penulis juga menyampaikan mohon maaf kepada semua yang terlibat dalam penelitian ini apabila selama penelitian atau bimbingan berlangsung penulis telah berbuat kesalahan yang tak penulis sadari.

Penulis

DAFTAR TABEL

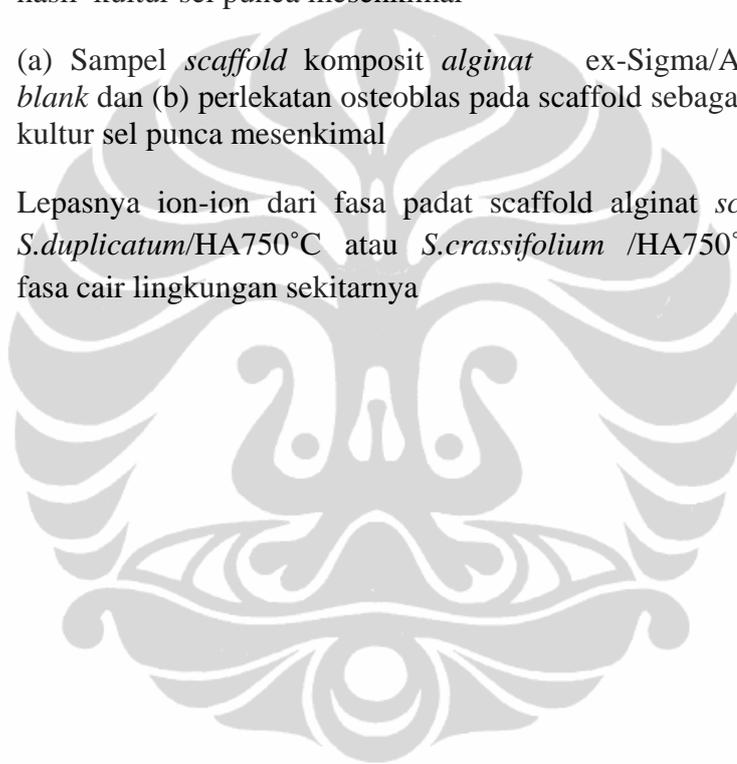
Tabel 2.1	Senyawa kalsium fosfat yang relevan dengan apatit tulang
Tabel 4.1	Komposisi unsur dari serbuk alginat dengan uji XRF
Tabel 4.2	Puncak-puncak absorbansi dari sampel serbuk alginat
Tabel 4.3	Nilai viskositas alginat pada konsentrasi larutan 0,5-3%
Tabel 4.4	Komposisi unsur dari sampel serbuk HA
Tabel 4.5	Puncak-puncak absorbansi pada spektra FTIR
Tabel 4.6	Parameter kisi dari kristal HA
Tabel 4.7	Derajat kristalinitas dan ukuran kristalit (D) dari HA
Tabel 4.8	Luas muka dari sampel serbuk HA
Tabel 4.9	Rentang ukuran partikel HA dengan peningkatan suhu kalsinasi
Tabel 4.10	Kekuatan kompresi dari <i>scaffold</i> alginat/HA
Tabel 4.11	Signifikansi nilai kekuatan kompresi grup alginat <i>S.crassifolium</i> dengan HA dari suhu kalsinasi berbeda
Tabel 4.12	Signifikansi nilai kekuatan kompresi grup alginat <i>S.duplicatum</i> dengan HA dari suhu kalsinasi berbeda
Tabel 4.13	Degradasi dari <i>scaffold</i> alginat/HA
Tabel 4.14	Signifikansi perbedaan nilai degradasi alginat berbasis <i>S.crassifolium</i> dan HA dari suhu kalsinasi berbeda
Tabel 4.15	Signifikansi nilai degradasi grup alginat <i>S.duplicatum</i> dengan HA dari suhu kalsinasi berbeda
Tabel 4.16	Persentase viabilitas sel punca mesenkimal tulang pada sampel <i>scaffold</i> komposit alginat / HA
Tabel 4.17	Kadar ALP dari kultur sel punca mesenkimal tulang pada sampel <i>scaffold</i> komposit alginat/HA750 °C

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 2.1 Skema tulang yang terdiri dari bagian spongi dan kompak. Bagian kompak merupakan matriks organik berupa serat kolagen
- Gambar 2.2 Sel punca mesenkimal mempunyai potensi berdiferensiasi menjadi berbagai sel, antara lain menjadi adiposit, kondroblas, atau osteoblas
- Gambar 2.3 Skema kaskade pembentukan tulang (krezwan@uni-bremen.de)
- Gambar 2.4 (a) Trias rekayasa jaringan. (b) Diagram skematik urutan dalam rekayasa jaringan (Moradianoldak, et al, 1991)
- Gambar 2.5 Ilustrasi scaffold dengan poros saling berhubungan dan aktifitas sel di dalam scaffold
- Gambar 2.6 Transfer ion dari fasa padat ke fasa cair pada proses perlekatan sel pada *scaffold*
- Gambar 2.7 Ilustrasi membran sel dengan saluran-saluran tempat masuknya komponen ke dalam sel (Alberts B, Johson A, Lewis J, 2002)
- Gambar 2.8 Protein yang memfasilitasi interaksi sel dan tulang (krezwan@uni-bremen.de)
- Gambar 2.9 (a) Interaksi sel-tulang. (b) Struktur protein yang memfasilitasi interaksi sel dan tulang (krezwan@uni-bremen.de)
- Gambar 2.10 Interaksi kalsium fosfat sel: (a) osteoprogenitor bermigrasi (b) osteoblas melekat pada permukaan kalsium fosfat (Nime R dan Kempf, 2000)
- Gambar 2.11 Pola XRD dari HA, tulang dewasa, dan tulang anak pada usia 26 dan 16 minggu. Perbedaan terlihat pada intensitas antara HA dan tulang (Meneghini C, et al., 2003)
- Gambar 2.12 Proses kristalisasi dari fasa larutan mengikuti *Rule of Sages by Ostwald*

- Gambar 2.13 HA dengan (a) Rumus bangun, (b) FTIR (Rossi, et al., 2007) (c) Struktur mikro dengan PO_4^{3-} (ungu-merah), Ca^{2+} (hijau), OH^- (merah-putih) dan (d) pola XRD Kimura I (2007)
- Gambar 2.14 (a) Asam alginat terdiri dari unit G dan M, (b) dengan penambahan NaOH dikonversi menjadi Na-alginat
- Gambar 2.15 Spektra FTIR dari alginat *S. duplicatum* yang diperoleh dari alga di perairan Banten-Indonesia
- Gambar 2.16 Model transisi sol-gel: (a) kation divalen menggantikan 1 pasang ion Na^+ membentuk struktur “*egg box junction*” melalui (b) ikatan dengan kation divalent (Fang Y, 2007)
- Gambar 2.17 Scaffold alginat/HA dengan (a) poros paralel dan (b) pertumbuhan sel punca mesenkimal di dalam dengan poros paralel (Benhardt, et al., 2008)
- Gambar 2.18 Scaffold alginat/HA dengan (a) poros saling berhubungan. Terlihat pertumbuhan sel pada dinding *scaffold* (Lin H-R dan Yeh Y-J 2004)
- Gambar 4.1 (a) Spektra FTIR dari sampel serbuk alginat *S. duplicatum*, (b) *S. crassifolium* dan (c) ex-Sigma
- Gambar 4.2 (a) Morfologi kristalit dari HA sintesis dan (b) HA ex-Aldrich. Terlihat kristalit HA merupakan aglomerasi dari kristalit berskala nano
- Gambar 4.3 (a) Spektroskopi FTIR dari sampel serbuk HA400°C, (b) HA750°C, (c) HA900°C dan (d) HA ex-Aldrich
- Gambar 4.4 Pola XRD sampel serbuk HA dengan rentang suhu kalsinasi 100°C -900°C
- Gambar 4.5 (a) Puncak-puncak XRD dari sampel serbuk HA900°C dan HA ex-Aldrich (b). Terlihat puncak XRD berhimpit dengan fasa $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dari File ICDD No. 09-0432
- Gambar 4.6 (a) Refinement pola XRD dari sampel serbuk HA900°C dan HA ex-Aldrich (b) dengan *normalized error distribution* dan *normal probability plot*
- Gambar 4.7 Sampel *scaffold* komposit 3-D *S. duplicatum*/ HA (kiri), *S. crassifolium*/HA (tengah) dan *scaffold* ex-Sigma/Aldrich (kanan)

- Gambar 4.8 Mikrograf SEM dari sampel *scaffold* komposit alginat *S.duplicatum*/ HA, (b) *S.crassifolium*/ HA dan (c) *scaffold* ex-Sigma/Aldrich
- Gambar 4.9 (a) Sampel *scaffold* komposit alginat *S.duplicatum*/ HA750°C *blank* dan (b) perlekatan osteoblas pada *scaffold* sebagai hasil kultur sel punca mesenkimal
- Gambar 4.10 (a) Sampel *scaffold* komposit alginat *S.crssifolium*/ HA750°C *blank* dan (b) perlekatan osteoblas pada *scaffold* sebagai hasil kultur sel punca mesenkimal
- Gambar 4.11 (a) Sampel *scaffold* komposit alginat ex-Sigma/Aldrich *blank* dan (b) perlekatan osteoblas pada *scaffold* sebagai hasil kultur sel punca mesenkimal
- Gambar 5 Lepasnya ion-ion dari fasa padat *scaffold* alginat *scaffold* *S.duplicatum*/HA750°C atau *S.crassifolium* /HA750°C ke fasa cair lingkungan sekitarnya



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1(a) Surat keterangan pernyataan alginat *S. duplicatum*
- Lampiran 1(b) Surat keterangan pernyataan alginat *S. crassifolium*
- Lampiran 2 Keterangan sertifikat alginat ex-Sigma® dan ex-Aldrich®
- Lampiran 3 Surat keterangan Lolos Uji Etik
- Lampiran 4 (a) Data hasil katekterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF) dari alginat *S. duplicatum*
- Lampiran 4 (b) Data hasil katekterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF) dari alginat *S. crassifolium*
- Lampiran 4 (c) Data hasil katekterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF) dari alginat ex Sigma®
- Lampiran 5 (a) Data hasil katekterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF) dari hidroksiapatit kalsinasi suhu 900°C
- Lampiran 5 (b) Data hasil katekterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF) dari hidroksiapatit ex Aldrich®
- Lampiran 6 JCPDS / ICDD No. 09-0432 untuk hidroksiapatit
- Lampiran 7 (a) Listview dari hidroksiapatit kalsinasi suhu 400°C
- Lampiran 7 (b) Listview dari hidroksiapatit kalsinasi suhu 750°C
- Lampiran 7 (c) Listview dari hidroksiapatit kalsinasi suhu 900°C
- Lampiran 7 (d) Listview dari hidroksiapatit ex-Aldrich
- Lampiran 8 (a) Data hasil katekterisasi dengan menggunakan *Particle Size Analyzer (PSA)* untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 400°C
- Lampiran 8 (b) Data hasil katekterisasi dengan menggunakan *Particle Size Analyzer (PSA)* untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 750°C
- Lampiran 8 (c) Data hasil katekterisasi dengan menggunakan *Particle Size Analyzer (PSA)* untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 750°C

- Lampiran 9 (a) Data hasil katakterisasi dengan menggunakan metode Branauer, Emmett dan Teler (BET) untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 400°C
- Lampiran 9 (b) Data hasil katakterisasi dengan menggunakan metode Branauer, Emmett dan Teler (BET) untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 750°C
- Lampiran 9 (c) Data hasil katakterisasi dengan menggunakan metode Branauer, Emmett dan Teler (BET) untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 900°C
- Lampiran 10 (a) Data hasil uji statistik *One-way Anova* untuk kekuatan kompresi dari *scaffold* komposit alginat *S.duplicatum*//hidroksiapatit
- Lampiran 10 (b) Data hasil uji statistik LSD-SPSS untuk kekuatan kompresi dari *scaffold* komposit alginat *S.duplicatum*//hidroksiapatit
- Lampiran 10 (c) Data hasil uji statistik *One-way Anova* untuk kekuatan kompresi dari *scaffold* komposit alginat *S.crassifolium*/hidroksiapatit
- Lampiran 10 (d) Data hasil uji statistik LSD- SPSS untuk kekuatan kompresi dari *scaffold* komposit alginat *S.crassifolium*/hidroksiapatit
- Lampiran 11 (a) Data hasil uji *One-way Anova* untuk degradasi dari *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum* / hidroksiapatit
- Lampiran 11 (b) Data hasil uji statistic LSD-SPSS untuk degradasi dari *scaffold* komposit *S. duplicatum* / hidroksiapatit
- Lampiran 11 (c) Data hasil uji statistik *One-way Anova* untuk degradasi dari *scaffold* komposit alginat *S.crassifolium* / hidroksiapatit
- Lampiran 11 (d) Data hasil uji statistik LSD-SPSS untuk degradasi dari *scaffold* komposit alginat *S.crassifolium*/ hidroksiapatit
- Lampiran 12 Gambar hasil uji sterilitas dari *scaffold* alginat/hidroksiapatit
- Lampiran 13 Gambar hasil uji diferensiasi osteoblas dengan menggunakan pewarnaan Alizarin Red

DAFTAR ISI

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Halaman Pernyataan Orisinalitas	iii
Halaman Pernyataan Persetujuan Publikasi	iv
Ungkapan Terimakasih	v
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Lampiran	xv
Daftar Isi	xvii
Abstrak	xxi
Abstract	xxii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Permasalahan	6
1.3 Tujuan penelitian	7
1.4 Hipotesa	7
1.5 Manfaat Penelitian	8
1.6 Sistematika Penulisan	10
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1 Komponen, Struktur dan Biologik dari Tulang	12
2.2 Pembentukan Tulang	14
2.3 Mekanisme Rekayasa Jaringan Tulang	16
2.3.1 Pertukaran Ion pada Permukaan Kalsium Fosfat	19
2.3.2 Interaksi dari Kalsium Fosfat - Sel	24
2.4 Komposit Hidroksiapatit/Alginat sebagai <i>scaffold</i> untuk Rekayasa Jaringan	25
2.4.1 Hidroksiapatit	26

2.4.1.1	Sintesis Hidroksiapatit	27
2.4.1.2	Struktur Mikro Hidroksiapatit	30
2.4.1.3	Degradasi Hidroksiapatit	32
2.4.2	Alginat	34
2.4.2.1	Struktur Mikro Alginat	35
2.4.2.2	Hidrogel Alginat	37
2.4.2.3	Alginat sebagai <i>scaffold</i>	40
2.4.3	<i>Scaffold</i> Komposit Alginat/Hidroksiapatit	41
2.4.4	Kultur Sel pada <i>Scaffold</i> Komposit Alginat/Hidroksiapatit	42
BAB 3.	METODOLOGI PENELITIAN	46
3.1	Metode Penelitian	46
3.2	Material Penelitian	46
3.3	Prosedur Penelitian	47
3.3.1	Ekstraksi Alginat	49
3.3.2	Sintesis Hidroksiapatit	50
3.3.3	Preparasi <i>Scaffold</i> Komposit Alginat/Hidroksiapatit	51
3.3.4	Karakterisasi <i>Transmission Electron Microscope</i> (TEM)	52
3.3.5	Karakterisasi <i>X-ray Fluorescence</i> (XRF)	52
3.3.6	Karakterisasi <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (FTIR)	52
3.3.7	Karakterisasi X-Ray Diffraction (XRD)	53
3.3.8	Karakterisasi Distribusi Ukuran Partikel	54
3.3.9	Karakterisasi Luas Muka	54
3.3.10	Uji Viskositas	54
3.3.11	Uji Kekuatan Kompresi	55
3.3.12	Uji Degradasi	55
3.3.13	Kultur Sel Punca Mesenkimal	56
3.3.14	Uji Sterilitas dan Uji Toksisitas	57
3.3.15	Perlekatan Sel pada <i>Scaffold</i>	58

3.3.16	Aktifitas Alkaline Phosphatase (ALP)	58
3.4	Analisis Statistik	59
BAB 4.	HASIL	60
4.1	<i>Scaffold</i> Alginat/Hidroksiapatit	60
4.1.1	Serbuk Alginat <i>Sargassum</i>	60
4.1.1.1	Analisis Unsur Alginat	60
4.1.1.2	Identifikasi Gugus Fungsi Alginat	61
4.1.1.3	Viskositas Alginat	62
4.1.2	Serbuk Hidroksiapatit	63
4.1.2.1	Morfologi Hidroksiapatit	63
4.1.2.2	Analisis Unsur Hidroksiapatit	64
4.1.2.3	Identifikasi Gugus Fungsi Hidroksiapatit	65
4.1.2.4	Identifikasi Fasa Hidroksiapatit	66
4.1.2.5	Analisis Luas Muka	71
4.1.2.6	Analisis Distribusi Ukuran Partikel	71
4.1.3	<i>Scaffold</i> Komposit Alginat/Hidroksiapatit untuk Kultur Sel	72
4.1.3.1	Struktur Mikro <i>Scaffold</i> Alginat/Hidroksiapatit	73
4.1.3.2	Kekuatan Kompresi <i>Scaffold</i> komposit Alginat/Hidroksiapatit	74
4.1.3.3	Degradasi <i>Scaffold</i> Alginat/ Hidroksiapatit	75
4.2	Kultur Sel Punca Mesenkim pada <i>Scaffold</i> Alginat/HA	77
4.2.1	Toksistasitas <i>Scaffold</i> Alginat/Hidroksiapatit	78
4.2.2	Aktifitas <i>Alkaline Phosphatase</i> (ALP)	79
4.2.3	Perlekatan sel punca mesenkimal pada <i>scaffold</i> komposit alginat/ Hidroksiapatit	79
BAB 5.	PEMBAHASAN	83
5.1	Alginat sebagai Material <i>Scaffold</i> untuk Rekayasa Jaringan	83
5.1.1	Identifikasi Alginat	83
5.1.2	Analisis Viskositas Alginat	85

5.2	Hidroksiapatit sebagai Material <i>Scaffold</i> untuk Rekayasa Jaringan	87
5.2.1	Identifikasi Hidroksiapatit	87
5.2.2	Hidroksiapatit Karbonasi	87
5.3	<i>Scaffold</i> Komposit Alginat/Hidroksiapatit	90
5.3.1	Pengaruh Suhu Kalsinasi Hidroksiapatit terhadap Derajat Kristalinitas, Ukuran Kristalit dan <i>Surface Area</i>	91
5.3.2	Pengaruh Suhu Kalsinasi Hidroksiapatit dan Viskositas Alginat terhadap Degradasi <i>Scaffold</i> Komposit Alginat/Hidroksiapatit	92
5.4	Penggunaan <i>Scaffold</i> Komposit Alginat / Hidroksiapatit untuk Kultur Sel Mesenkimal	94
5.4.1	Uji Sterilitas dan Uji Toksisitas	
5.4.2	Pertumbuhan Osteoblas pada <i>Scaffold</i> Alginat/Hidroksiapatit	
5.5	Implikasi Hasil Penelitian	102
BAB 6.	KESIMPULAN dan SARAN	105
	REFERENSI	108
	LAMPIRAN	115

ABSTRAK

Nama : Decky Jusiana Indrani
 Program studi : Ilmu Material
 Judul : Komposit Hidroksiapatit Kalsinasi Suhu Rendah dengan Alginat *Sargassum Duplicatum* atau *Sargassum Crassifolium* sebagai Material Scaffold untuk Pertumbuhan Sel Punca Mesenkimal

Pendahuluan. Hidroksiapatit sintesis dan hidroksiapatit (HA) yang diperoleh secara komersial menunjukkan derajat kristalinitas tinggi. Salah satu usaha untuk meningkatkan kemampuan degradasi scaffold alginat/HA adalah menggunakan HA amorf dan dalam struktur komposit biopolimer/HA. Alginat yang diperoleh dari alga coklat *Sargassum* di perairan Banten belum dimanfaatkan untuk kegunaan rekayasa jaringan. Selain itu, pengamatan pertumbuhan sel pada scaffold selalu dilakukan pada scaffold yang materialnya diperoleh secara komersial. **Tujuan.** Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memperoleh scaffold dari komposit hidroksiapatit kalsinasi rendah dengan alginat (*S.duplicatum* dan *S.crassifolium*) yang dapat digunakan sebagai kerangka pertumbuhan sel. **Material dan Metode.** Scaffold dipreparasi dari HA yang diperoleh secara sintesis dengan alginat yang ekstraksi dari alga *S.duplicatum* atau *S.crassifolium*. Karakterisasi dilakukan terhadap serbuk HA dengan kalsinasi suhu 400°-900°C, serbuk alginat dan scaffold alginat *S.duplicatum*/HA atau *S.crassifolium*/HA. Pemilihan dengan kemampuan degradasi tinggi selain berdasarkan berdasarkan derajat kristalinitas, ukuran kristalit dan luas mukaHA, juga berdasarkan uji degradasi dan uji mekanik dari scaffold. Selanjutnya, terhadap scaffold alginat *S.duplicatum* dan *S.crassifolium*/HA dilakukan kultur sel. Pertumbuhan sel diukur dari aktifitas ALP dan perlekatan sel pada scaffold. **Hasil.** Serbuk hidroksiapatit dengan kalsinasi suhu 400°C, 750°C atau 900°C telah diidentifikasi sebagai fasa hidroksiapatit karbonasi yang sesuai dengan tulang. Identifikasi terhadap alginat *S.duplicatum* atau *S.crassifolium* memperlihatkan terbentuknya alginat yang mengandung gugus yang sesuai dengan protein. Hidroksiapatit kalsinasi suhu 400°C menunjukkan degradasi terbesar. Namun, mempertimbangkan kekuatan mekanik, telah dipilih scaffold alginat *S.duplicatum*/HA750°C dan *S.crassifolium*/ HA750°C untuk dilakukan kultur sel punca mesenkimal. Pengamatan setelah lima minggu pada masing-masing scaffold diketahui bahwa sel punca mesenkimal telah berdiferensiasi ke osteoblas dan memperlihatkan perlekatan osteoblas pada masing-masing scaffold. **Pembahasan.** Pertumbuhan sel punca mesenkimal pada scaffold komposit alginat *S.duplicatum*/HA750°C dan *S.crassifolium*/ HA750°C dapat dijelaskan karena adanya degradasi dari material scaffold selama scaffold berada di dalam medium kultur. Degradasi memungkinkan terlepasnya ion-ion yang terkandung di dalam material scaffold dan masuk ke dalam sel serta mempengaruhi pertumbuhan sel punca mesenkimal.

ABSTRACT

Nama : Decky Jusiana Indrani
Course of Study : Materials Science
Title : Low Temperature Calcination Hydroxyapatite with *Sargassum Duplicatum* or *Sargassum Crassifolium* Composites Scaffolds for Mesenchymal Stem Cell Growth

Introduction. Synthesized and commercially available hydroxyapatites have shown high degree of crystallinity which were difficult to degrade. Efforts to increase the degradation have used amorphous hydroxyapatite and alginate/hydroxyapatite structure. As an addition, the abundant of *Sargassum* algae in Banten shore have not been applied for tissue engineering purposes. The use of mesenchymal stem cell have showed more proliferation in scaffold than that of osteoblasts. **Aim.** The aims of the present study, therefore, were to provide alginat / hydroxyapatites of low calcination temperatures compsite scaffolds available for mesenchymal stem cell growth. **Materials and Methods.** Alginate/hydroxyapatite composite scaffolds were developed using *S.duplicatum* or *S.crassifolium* with amorphous hydroxyapatites. Characterizations were conducted for *S.duplicatum* or *S.crassifolium* alginates, hydroxyapatites as well as alginate/hydroxyapatite composite scaffolds. Alginat/ hydroxyapatite composite showing high degradation and high compressive strength were considered for cell culture in the scaffolds. **Results.** Results showed that extractions of *S.duplicatum* and *S.crassifolium* algae were identified as alginates presenting the components similar to proteins. Synthesized hydroxyapatites calcinated at 400°C, 750°C or 900°C was identified as carbonated hydroxyapatite that simulate the human hard tissues. Hydroxyapatite of 400°C showed higher degradation. However, alginate *S.duplicatum*/hydroxyapatite of 750°C and *S.crassifolium*/ hydroxyapatite of 750°C composites scaffolds were chosen as scaffolds for the cell culture to secure the compression strength. Incubation of mesenchymal stem cells on both scaffolds for five weeks have showed differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts and cell attachment in each scaffolds. **Discussion.** The growth of osteoblast in alginate *S.duplicatum*/hydroxyapatite of 750°C and *S.crassifolium*/ hydroxyapatite of 750°C composites scaffolds may have been due to the degradation each scaffolds that would transfer ions from the scaffolds to mesenchymal stem cells.

Bab 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

1.1.1 Rekayasa Jaringan Sebagai Strategi Tindakan Alternatif

Perbaikan tulang sering dilakukan di dalam rahang oleh karena adanya defek pada tulang. Defek tersebut dapat merupakan abnormalitas sejak lahir, seperti tumbuh kembang langit-langit yang tidak sempurna. Defek juga dapat berupa fraktur tulang rahang akibat dari trauma. Beberapa tindakan kedokteran gigi memerlukan pengambilan tulang penyangga gigi yang lebih banyak, seperti pada pasca-ekstraksi gigi ataupun pasca-reseksi tumor, dapat menjadi defek. Selain itu, proses fisiologis, seperti menurunnya tulang periodontal (penyangga gigi) seiring dengan bertambahnya usia, juga merupakan suatu defek. Untuk mencegah masalah kesehatan yang dapat terjadi jika defek tidak diatasi, diperlukan perbaikan tulang.

Perbaikan tulang pada daerah defek selama ini dilakukan dengan cara konvensional. Beberapa *bone substitute* (pengganti tulang), dapat berupa *allograft*, yang berasal dari mamalia atau donor manusia, atau *xenograft*, tulang yang diawetkan, dapat menjadi alternatif. Namun, penggunaan graf sebagai pengganti tulang dapat menimbulkan risiko imunologik di pihak penerimanya. Penggunaan *autograf*, yang berasal dari tubuh sendiri, merupakan standar baku emas, namun jumlahnya terbatas untuk jumlah yang dibutuhkan (Finkemeier CG, 2002). Graf tulang sintetik juga dapat digunakan, namun, keefektifannya masih dipelajari. Dalam tiga dekade terakhir telah dikembangkan suatu tindakan alternatif yang menjanjikan, yaitu yang dikenal dengan sebutan *tissue engineering* (rekayasa jaringan; Vacanti CA, Bonassar LJ, Vacanti JP, 2000). Rekayasa jaringan tulang merekonstruksi tulang pada daerah defek melalui regenerasi jaringan. Tindakan meregenerasi tulang ini dimaksudkan agar tulang dapat

berfungsi kembali. Rekayasa jaringan tulang memerlukan *scaffold*, yaitu suatu *template*/kerangka untuk pertumbuhan sel menjadi jaringan tulang. Pertumbuhan sel di dalam scaffold dipengaruhi oleh material yang digunakan untuk scaffold. Oleh karena itu, pemilihan material scaffold merupakan langkah pertama.

1.1.2 Pengaruh Suhu Kalsinasi terhadap Hidroksiapatit

Perbaikan tulang sering menggunakan biokeramik berbasis kalsium fosfat. Untuk rekayasa jaringan tulang, *scaffold* HA merupakan pilihan karena beberapa kesamaan dengan tulang (Wang L, Li Y, Li C, 2009; Texeira S, et al., 2008; Fu Q, et al., 2008). Studi sintesis HA selalu disertai dengan pemanasan (kalsinasi) dengan suhu tinggi. Pada studi Fu Q, et al. (2008), kalsinasi yang menyertai sintesis HA adalah 1350°C. Pemberian kalsinasi dengan suhu di atas 1000°C juga dilakukan untuk sintesis HA pada beberapa studi (Monmaturapoj N, 2009; Pattanayak DK, 2005; Kong Y-M, King, H-E, Kim H-W, 2008). Dari pengamatan terhadap salah satu HA yang diperoleh secara komersial, dapat diketahui bahwa material tersebut telah dikalsinasi dengan suhu yang berkisar antara 900°C-1300°C (Nazarpak HN, Solati-Hasjin, Moztafzadeh, 2009). Pada studi tersebut ditunjukkan pula bahwa suhu kalsinasi HA di atas 1000°C telah meningkatkan derajat kristalinitas material secara signifikan. Perolehan HA kristalin ditujukan untuk mendapatkan material yang kaku dan stabil (Kong Y-M, King, H-E, Kim H-W, 2009; Zhang F, et al, 2006; Wang C-W, et al, 2003; Lu J, et al, 2002). Hal ini dilakukan untuk memperoleh material dengan kekuatan mekanik tinggi dalam hubungannya sebagai pengganti tulang.

HA dengan derajat kristalinitas tinggi yang kaku dan stabil kurang sesuai untuk digunakan sebagai material scaffold. Studi-studi LeGeros RZ (2002), Fulmer MT, et al. (2002), dan Pollick, et al. (1995) memperlihatkan bahwa peningkatan derajat kristalinitas HA menyebabkan menurunnya nilai degradasi material. Hasil serupa juga ditemukan pada studi Sanosh KP, et al. (2009) yang melakukan peningkatan suhu kalsinasi HA dari 200°C sampai 800°C. Hasil tersebut didukung oleh studi Vaz Quez, et al. (2005) yang meningkatkan suhu

kalsinasi HA sampai dengan suhu 850°C. Pengamatan menunjukkan bahwa HA dengan kalsinasi suhu yang semakin tinggi menghasilkan nilai degradasi yang semakin rendah.

Studi HA juga mempelajari penggunaan *scaffold* HA untuk rekayasa jaringan. Kultur sel pada *scaffold* HA menunjukkan penyembuhan tulang dengan oseointegrasi (Damien E, et al., 2002). Kultur osteoblas pada *scaffold* HA dengan menggunakan HA juga telah menunjukkan perlekatan sel pada *scaffold* (Smith IO, Mc Cabe LR, Baumann M, 2006). Sekali pun penggunaan HA sebagai *scaffold* menunjukkan keberhasilan, studi Duda M dan Pajak J (2004) memperlihatkan adanya sisa-sisa *scaffold* HA di sekitar lokasi defek walaupun implantasi *scaffold* telah dilakukan lama sebelumnya. Oleh karena itu, HA kristalin kurang sesuai jika digunakan sebagai material *scaffold* rekayasa jaringan.

Hidroksiapatit yang digunakan sebagai *scaffold* untuk rekayasa jaringan pada umumnya diperoleh secara komersial. Sebagai contoh, HA pada studi Marra KG, et al. (2005) atau Lin H-R, Yeh Y-J (2004) dari Sigma, sedangkan pada studi Despang F, et al (2006), Dittrich R, et al., (2006); Dittrich R, et al, 2007) diperoleh dari Merck, dan pada studi pada studi Turco G, et al, 2009 dari Fluka. Masalah dengan digunakannya HA komersial adalah bahwa material tersebut telah memiliki derajat kristalinitas yang relatif tinggi. Sebagai *scaffold* untuk rekayasa jaringan tulang diperlukan *scaffold* HA amorf, yang mirip dengan HA biologik.

1.1.3 Scaffold Berbasis Hidroksiapatit yang Degradabel untuk Rekayasa Jaringan

Beberapa usaha telah dilakukan untuk memperoleh *scaffold* HA yang degradabel. Salah satunya dengan mempreparasi HA dalam dua fasa (bifasa). *Tricalcium phosphate* (TCP) sering digabungkan bersama dengan HA untuk meningkatkan degradabilitas, seperti pada studi Komlev VS, et al. (2010), *scaffold* bifasa HA/(TCP). Hasil membuktikan bahwa degradasi tertinggi berasal dari *scaffold* TCP dan selanjutnya *scaffold* bifasa HA/TCP, sedangkan terendah pada

scaffold HA. Studi Lu J, et al. (2002) mengaplikasi biokeramik pada tulang femur kelinci dan kondil tibia. *Scaffold* berpori (100-300 μm) dari HA atau β -TCP dengan sinter berturut-turut 1100°C dan 1270°C menunjukkan bahwa degradasi *scaffold* β -TCP berpori makro mencapai 55-60%, sedangkan degradasi HA hanya 2-5% dalam 12-24 minggu. Hasil serupa diperoleh Kong Y-M, King, H-E, Kim H-W, (2009) dan John A, et al. (2008). Nilai degradasi yang diperoleh mengartikan bahwa degradasi *scaffold* bifasa berbasis HA masih menunjukkan bahwa HA tidak sepenuhnya degradasi.

Usaha lain yang dilakukan untuk memperoleh *scaffold* HA yang degradabel adalah meniru karakteristik HA biologik. HA biologik ditandai dengan derajat kristalinitas rendah, ukuran kristalit kecil dan luas muka besar. Dari pengamatan perilaku HA pada kalsinasi 400°-1200°C diperoleh bahwa pada suhu kalsinasi 400°C memperlihatkan adanya fasa amorf (Pattanayak DK, et al (2005). HA dalam fasa amorf memiliki ukuran kristalit lebih kecil, dan luas muka kecil sehingga lebih mudah mengalami degradasi. HA biologik juga ditandai oleh substitusi ion karbonat (CO_3^{2-}). Dengan adanya inkorporasi ion tersebut, HA karbonasi telah dilaporkan menunjukkan perubahan di dalam morfologi kristal yang mengakibatkan terjadi penurunan kristalinitas.

Penggabungan kekakuan material inorganik biokeramik dan kelenturan material organik biopolimer, mengikuti *bone-analogue concept*, untuk memperoleh *scaffold* yang fleksibel telah menarik perhatian (Turco G, et al., 2009; Lin H-R dan Yeh Y-J, 2004). Polimer sintetik bersifat autokatalitik sehingga dapat menurunkan pH yang dapat mengganggu pertumbuhan jaringan. Oleh karenanya, polimer alam (natural) seperti agarose, hialuronat, fibrin, kolagen ataupun gelatin dipelajari karena kesamaan dalam *natural macromolecular environment of cells*. Penggabungan HA dengan polimer, disamping untuk memperoleh material yang fleksibel, juga dimaksudkan untuk menghasilkan *scaffold* yang degradabel.

Pada dua dekade terakhir ini, terlihat minat dalam mengaplikasi biopolimer polisakarida. Akhir-akhir ini sitosan telah mulai banyak dimanfaatkan dalam *scaffold* komposit (Maachou H, 2008; Li Z, Zhang M, 2005).

Diantara studi biopolimer sebagai material *scaffold* yang dilaporkan, kegunaan alginat cukup menarik perhatian. Scaffold alginat/HA dapat menghasilkan material *scaffold* yang lebih degradabel. Nilai degradasi scaffold komposit alginat/HA semakin besar dengan semakin tingginya rasio alginat di dalam komposit (Turco G, et al., 2009; Benhardt A, et al., 2009; Despang F, et al., 2006; Lin H-R dan Yeh Y-J, 2004; Texeira S, et al., 2008). Dibandingkan dengan *scaffold* yang dipreparasi dari HA saja, *scaffold* komposit alginat/HA menunjukkan kemampuan degradasi lebih besar.

Alginat dari manca negara telah banyak digunakan sebagai material *scaffold* untuk studi rekayasa jaringan. Di Indonesia, pemanfaatan alginat dari alga coklat masih terbatas. Namun, ilmuwan memanfaatkan alginat sebagai obyek penelitian. Studi alginat telah dilakukan antara lain dalam metode ekstraksi (Yulianto K., 2007; Zatnika A., 2003; Satari R., 1998; Karsini 1993), rendemen dan viskositas (Yulianto K., 1997, Satari 1998, Wikanta, et al., 1998, Karsini, 1993, Murtini dkk, 2000; Basmal, et al., 2000), fraksinasi G/M (Tazwir, Hak N., *unpublished*), serta budidaya alga coklat (Sulistiyo, 2002). Selain itu survei potensi alga coklat *Sargassum* di perairan pantai selatan Pameungpeuk, Jawa Barat, menunjukkan bahwa Indonesia yang terdiri dari kepulauan dengan dasar batu karang yang cukup luas, kaya akan persediaan alga coklat *Sargassum*, antara lain *Sargassum duplicatum* (*S. duplicatum*) dan *Sargassum crassifolium* (*S. crassifolium*). Kegunaan alginat mulai dikembangkan, namun pemanfaatan alga coklat yang berasal dari perairan Indonesia sebagai material alginat untuk aplikasi rekayasa jaringan belum pernah dilakukan.

Rekayasa jaringan pada *scaffold* alginat/HA dapat menggunakan sel yang sesuai dengan jaringan yang akan direkayasa. Studi Lin H-R dan Yeh Y-J (2004) menggunakan sel osteosarkoma mencit, studi Turco G, et al. (2009) mengaplikasikan galur sel osteosarkoma manusia, sedangkan Bernhardt, et al. (2008) menggunakan sel punca mesenkimal yang disemai pada *scaffold* alginat/HA. Kultur sel pada *scaffold* komposit alginat/HA tersebut telah menunjukkan pertumbuhan jaringan.

1.2 Permasalahan

Dari beberapa penelitian di atas, dapat dirangkum beberapa hal. *Scaffold* komposit alginat/HA untuk regenerasi jaringan tulang dengan menggunakan *scaffold* 3-D ditandai dengan degradasi material. Namun, baik HA yang tersedia secara komersial maupun HA sintesis yang banyak dipelajari adalah HA yang ditujukan sebagai pengganti tulang. HA sebagai pengganti tulang bersifat kristalin sehingga material kurang sesuai untuk digunakan sebagai material *scaffold*; hal ini karena material menunjukkan degradabilitas rendah. Sebagai *scaffold* rekayasa jaringan, diperlukan HA amorf agar material dapat memberikan degradabilitas tinggi, sebagaimana HA biologik yang memiliki derajat kristalinitas rendah, ukuran kristalit kecil, dan luas muka besar. Dari berbagai studi yang menitik beratkan pada pengamatan pemberian suhu kalsinasi tinggi terhadap HA, dapat diketahui bahwa pada HA kalsinasi suhu rendah dapat diperoleh HA amorf. Dan dari pengamatan perilaku HA pada kalsinasi 400°C-1200°C diperoleh bahwa pada suhu kalsinasi 400°C memperlihatkan adanya fasa amorf. Degradasi juga terjadi pada alginat; alginat merupakan material yang memiliki degradabilitas tinggi. Namun, alginat yang dapat diperoleh dari alga coklat *Sargassum* (*S.duplicatum* dan *S.crassifolium*) yang dibudidayakan di perairan Banten belum dimanfaatkan sebagai *scaffold* rekayasa jaringan. Penggunaan HA amorf dan alginat dari alga yang berasal dari perairan Banten sebagai material *scaffold* alginat/HA belum banyak ditemukan di publikasi.

Studi ekstraksi alginat dan sintesis HA telah mempelajari material untuk *scaffold* alginat/HA. Namun, *scaffold* yang dihasilkan tersebut belum disertai dengan pengamatan pertumbuhan jaringan. Pengamatan pertumbuhan osteoblas ataupun sel punca mesenkimal pada *scaffold* komposit alginat/HA selalu menggunakan alginat dan HA yang diperoleh secara komersial, dan diketahui telah dikalsinasi dengan suhu antara 900°C-1300°C. Penggunaan *scaffold* alginat/HA yang kedua material diperoleh secara sintesis untuk pertumbuhan sel belum banyak dipublikasi. Oleh karena itu, preparasi *scaffold* komposit alginat yang diperoleh dari alga coklat di perairan Banten dengan HA kalsinasi suhu

rendah dan selanjutnya digunakan untuk pertumbuhan sel menjadi bidang kajian pada penelitian disertasi ini.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan masalah di atas, maka penelitian disertasi ini bertujuan sebagai berikut:

Tujuan Umum

Memperoleh *scaffold* dari komposit alginat *S. duplicatum*/hidroksiapatit atau *S. crassifolium*/hidroksiapatit serta dapat digunakan untuk pertumbuhan sel punca mesenkimal.

Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengekstraksi alginat dari alga coklat *S. duplicatum* dan *S. crassifolium*
2. Menyintesis hidroksiapatit dengan menggunakan material prekursor dan dikalsinasi dengan suhu 900°C dan lebih rendah
3. Mempreparasi *scaffold* komposit *S. duplicatum*/hidroksiapatit atau *S. crassifolium*/hidroksiapatit
4. Menganalisis pengaruh suhu kalsinasi hidroksiapatit terhadap derajat kristalinitas material
5. Menganalisis pengaruh kultur sel punca mesenkimal pada *scaffold* komposit *S. duplicatum*/hidroksiapatit atau *S. crassifolium*/hidroksiapatit terhadap pertumbuhan osteoblas

1.4 Hipotesis

Hipotesa dari penelitian disertasi ini adalah:

1. Alginat dapat diekstraksi dari alga *S.duplicatum* atau *S.crassifolium*

2. Hidroksiapatit dapat disintesis dari material prekursor dan diberi kalsinasi suhu 900°C dan lebih rendah
3. Hidroksiapatit kalsinasi suhu lebih rendah dari 900°C dengan *S.duplicatum* atau *S.crassifolium* dapat dikomposit menjadi *scaffold*
4. Terdapat pengaruh suhu kalsinasi dari hidroksiapatit terhadap derajat kristalinitas HA
5. Terdapat pengaruh kultur sel punca mesenkimal pada *scaffold* komposit alginat/hidroksiapatit terhadap pertumbuhan osteoblas

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan bermanfaat bagi beberapa bidang ilmu dan pihak terkait:

a. Bagi Perguruan Tinggi

Penelitian ini dilakukan dalam melaksanakan salah satu realisasi Tridarma Perguruan Tinggi sebagai lembaga pendidikan, penelitian, dan pengabdian masyarakat. Penelitian ini juga dapat dimunculkan sebagai salah satu penelitian unggulan dalam usaha untuk mewujudkan Universitas Indonesia sebagai universitas riset.

b. Bidang Ilmu dalam Lingkup Kedokteran Gigi dan Bidang Lain yang Terkait

Penelitian biomaterial dengan aplikasi rekayasa jaringan ini memungkinkan dilakukannya penelitian bersama. Penelitian ini dapat membuka jalan kerjasama penelitian antara Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi dan Departemen Biologi Oral di FKG-UI yang selama ini belum banyak melakukan penelitian dengan tujuan yang disusun bersama. Selain itu, hasil penelitian *scaffold* rekayasa jaringan ini juga dapat dimanfaatkan dalam penelitian uji klinis, yaitu pada Departemen Bedah Mulut, Departemen Ortodonti, Departemen Periodontologi, dan Departemen Prostodonsia. Misalnya untuk memperbaiki tulang periodontal yang mengalami resesi akibat

ekstraksi gigi ataupun proses fisiologis. Defek akibat infeksi yang meluas di rahang, akibat tumor rahang, akibat fraktur rahang, dan sebagainya. *Scaffold* ini dapat meregenerasi tulang di bagian defek sehingga tulang dapat berfungsi kembali. Disamping itu, *scaffold* juga dapat digunakan pada proses implan dental. Studi ini juga diharapkan dapat menjadi jembatan menuju penelitian yang mengamati biomaterial—rekayasa jaringan dari berbagai sudut ilmu melalui penelitian multidisiplin. Untuk pihak-pihak yang akan memanfaatkan hasil penelitian ini, dapat dilakukan kerjasama penelitian lanjutan untuk mengamati efikasi *scaffold* alginat/hidroksiapatit pada manusia. Hasil penelitian ini menyiapkan pedoman preparasi *scaffold* alginat/hidroksiapatit sehingga diharapkan dapat digunakan untuk perancangan teknologi *scaffold* tepat guna dan selanjutnya sebagai kandidat *scaffold* hidroksiapatit/alginat produk dalam negeri komersial

c. Bidang Ilmu Material Kedokteran Gigi

Penelitian ini dapat berkontribusi dalam pengembangan ilmu material di Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi, FKGUI. Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi pengembangan pohon ilmu kedokteran gigi pada umumnya, dan ilmu material kedokteran gigi, khususnya. Sebagai sebuah departemen yang lebih difokuskan pada kegiatan penelitian dibandingkan dengan kegiatan klinis, penelitian ini dapat membuka jalan ke penelitian lanjutan secara bertingkat. Walaupun *scaffold* *S. duplicatum*/hidroksiapatit atau *S. crassifolium*/hidroksiapatit yang dihasilkan pada penelitian ini belum dapat langsung diaplikasikan secara klinis, namun dari penelitian awal jangka pendek ini telah diperoleh metode preparasi *scaffold*, karakteristik, dan respons sel punca mesenkimal yang dapat dijadikan pedoman penelitian-penelitian lanjutan menuju uji coba *scaffold* in-vivo pada hewan coba dan mengamati efikasi *scaffold* tersebut pada manusia.

d. Pihak Masyarakat

Di masa mendatang, hasil penelitian ini dapat memberi keuntungan kepada berbagai pihak terkait. Hasil penelitian bertingkat dapat dimunculkan sebagai

perancangan teknologi *scaffold* tepat guna dan selanjutnya dapat diajukan sebagai kandidat *scaffold* alginat/hidroksiapatit produk dalam negeri komersial. Dalam usaha menuju produk komersial, secara tidak langsung usaha ini dapat memberi keuntungan kepada berbagai lapisan masyarakat terkait. *Scaffold* telah memanfaatkan alga yang diperoleh dari sumber daya alam salah satu perairan di Indonesia, yang memungkinkan pemanfaatan alga di perairan lain di Indonesia. Disamping itu, preparasi *scaffold* dapat dilakukan dalam lingkup *home-industry*. Dengan demikian, berbagai pihak masyarakat diharapkan dapat memanfaatkan *scaffold* produk dalam negeri yang ekonomis, yang diawali dari hasil penelitian hari ini.

e. Pihak Peneliti

Studi ini merupakan salah satu kesempatan untuk mengembangkan kemampuan dalam bidang penelitian, termasuk pengembangan daya nalar dan minat. Hal ini telah membuka wawasan peneliti untuk melanjutkan penelitian lanjutan. Diharapkan juga penelitian ini dapat membuka minat peneliti lain dalam mengembangkan *scaffold* rekayasa jaringan di bidang kedokteran gigi dan menjadi penghubung antara peneliti seprofesi, yaitu Ikatan Peminat Material Kedokteran Gigi, ataupun dengan peneliti dari disiplin ilmu lain.

1.5 Sistematika Penulisan

Di penelitian ini, Bab 1 memperkenalkan perlunya dilakukan rekayasa jaringan sebagai alternatif dari tindakan konvensional yang selama ini dilakukan untuk mengatasi defek tulang. Sehubungan dengan rekayasa jaringan dijelaskan kekurangan penggunaan hidroksiapatit yang digunakan sebagai pengganti tulang. Selanjutnya diuraikan usaha memperoleh *scaffold* berbasis hidroksiapatit yang degradabel. Selain itu, ditinjau kemungkinan penggunaan alginat yang berasal dari alga yang diperoleh dari perairan Banten. Bab 1 diakhiri dengan tujuan, hipotesis, dan manfaat penelitian.

Bab 2 diawali dengan tinjauan mengenai struktur mikrotulang dan hal-hal yang berhubungan dengan rekayasa jaringan tulang. Tinjauan juga dilakukan pada struktur mikro dan sifat-sifat dari alginat, hidroksiapatit, dan komposit antara alginat dengan hidroksiapatit. Selain itu, dilakukan tinjauan mengenai alginat dan komposit alginat/hidroksiapatit sebagai material *scaffold* khususnya dalam hal degradasi.

Bab 3 menjelaskan material dan sumber material yang digunakan dalam penelitian ini. Selain itu, dijelaskan juga prosedur kerja sesuai dengan diagram alir, yaitu dilakukan dalam dua tahap. Bab 4 menunjukkan hasil yang diperoleh dari kedua tahap penelitian. Selain itu, di bagian ini juga disertakan hasil karakterisasi dari setiap material yang diperoleh.

Bab 5 membahas hasil dan karakterisasi yang diperoleh dari penelitian ini. Selanjutnya dijelaskan juga hubungan antara hasil dan karakterisasi yang diperoleh. Terakhir, Bab 6 memberikan kesimpulan yang ditarik dari hasil pembahasan. Selain itu, diuraikan pula beberapa saran yang dapat dilakukan untuk penelitian lanjutan.

Bab 2

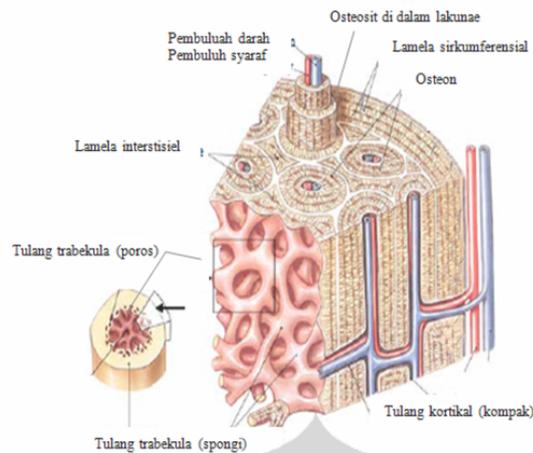
TINJAUAN PUSTAKA

Bidang rekayasa jaringan yang awalnya merupakan subbidang biomaterial, kini merupakan ilmu pengetahuan multidisiplin yang mencakup regenerasi jaringan tubuh. Subbidang tersebut mengaplikasikan prinsip-prinsip biologi sel dan faktor-faktor fisikokemikal yang berhubungan dengan fungsi biologik. Dalam praktiknya, lingkup bidang rekayasa jaringan tulang memanfaatkan ilmu pengetahuan multidisiplin tersebut untuk aplikasi perbaikan fungsi tulang.

2.1 Komponen, Struktur, dan Biologik dari Tulang

Jaringan tulang merupakan komponen dari sistem skeletal tubuh yang berfungsi sebagai penyangga tubuh. Secara makroskopis, tulang terdiri dari dua bagian, yaitu bagian kompak yang disebut tulang kortikal dan bagian sponsi yang disebut tulang trabekula. Berbeda dalam densitasnya, tulang kompak dan tulang spongiosa menunjukkan kekuatan mekanik berbeda, yaitu secara berurutan 200 MPa dan 1,5-38 MPa (Guo, XE, 2001).

Tulang kortikal merupakan jaringan ikat kompleks yang termineralisasi sehingga secara mikroskopis bagian tulang kompak ini dipandang sebagai material biokomposit. Biokomposit tulang terdiri dari matriks organik, yaitu protein kolagen (95%), dan substansi inorganik, yaitu protein nonkolagen (5%) (Gambar 2.1). Kolagen membentuk lapisan-lapisan lamella yang mengelilingi osteon. Di sepanjang sumbunya terdapat kanal yang berisi pembuluh darah dan pembuluh syaraf. Kolagen dalam bentuk lamela-lamela ini membentuk tulang kompak. Di antara matriks lamela, terdapat osteosit yang menerima dan mentransmit nutrien. Selain kolagen, matriks organik tulang juga berupa protein nonkolagen. Protein nonkolagen ini berperan di dalam *remodelling* (pembentukan tulang).



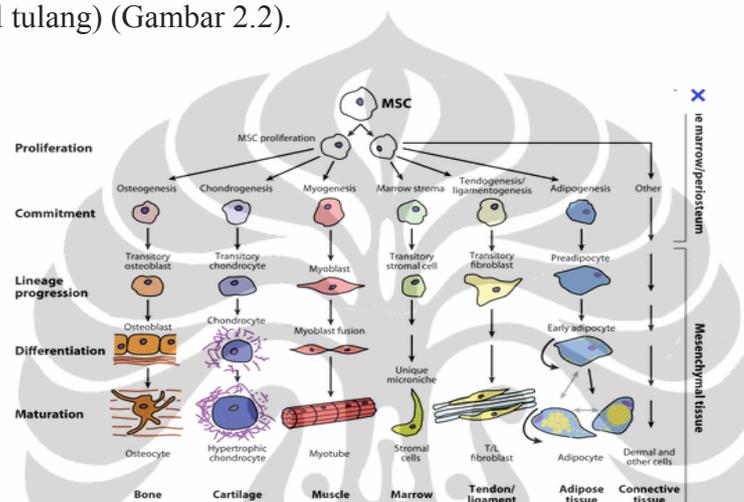
Gambar 2.1 Skema tulang yang terdiri dari bagian spongi dan kompak. Bagian kompak merupakan matriks organik berupa serat kolagen (www.bioceramics.uni-bremen.de)

Substansi inorganik tulang membentuk struktur yang mendekati struktur apatit kalsium fosfat karbonasi (Rey, 1990). Unsur inorganik dominan pada tulang adalah Ca^{2+} (24,5 %) dan P^{3-} (11,5%). Di samping itu, tulang mengandung unsur minor (*trace element*), yang tidak termasuk di dalam struktur tulang (Rey, 1990). Elemen-elemen minor di dalam tulang adalah Na^+ (0,7%), Mg^{2+} (0,55%), Cl^- (0,1%), K^+ (0,03%), F^- (0,02%), dan impuritas CO_3^{2-} (5,8%; Weiner S, Wolfie, T dan Wagner HD, 1999; Hench dan Wilson, 1993). Secara keseluruhan, komponen inorganik berjumlah 65%, H_2O absorpsi 9,8%, sedangkan komponen organik 25%.

Semua unsur-unsur di atas mengalami biomineralisasi. Pada proses biomineralisasi, mineral tulang mengalami nukleasi dan masuk ke dalam pori yang terdapat di dalam serat-serat kolagen. Nukleasi dikatalisasi oleh adanya grup ester fosfat (Glimcher et al., 1984) dan grup karboksilat (Rhee et al., 2000). Pertumbuhan atau mineralisasi terjadi sepanjang serat kolagen dan menghubungkan serat-serat kolagen satu sama lain serta membentuk apatit tulang; apatit tulang ini dikenal dengan hidroksiapatit biologik. Disamping gugus karbonat (CO_3^{2+}), terdapat gugus fosfat (PO_4^{3-}) yang merupakan impuritas tulang. Gugus-gugus tersebut secara struktur dan fisik bersifat tidak stabil dan sangat reaktif. Sifat reaktif tersebut memberikan sifat-sifat fisikokemikal, biologik,

fungsional, dan kemikal yang penting dalam pembentukan dan disolusi kristal di dalam jaringan biologik.

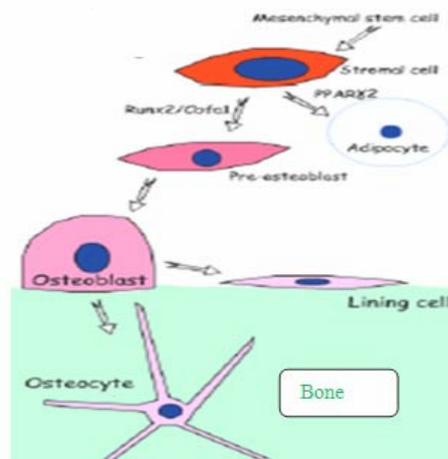
Bagian tulang sponsi terdiri dari trabekula dengan latis saling berhubungan, lazim disebut dengan sumsum tulang (Gambar 2.1). Sumsum tulang merupakan sumber *mesenchymal stem cell* (sel punca mesenkimal). Sel punca mesenkimal merupakan sel pluripoten yang mampu berdiferensiasi menjadi berbagai *lineage*, seperti adiposit (sel lemak), kondroblas (sel tulang rawan), atau osteoblas (sel tulang) (Gambar 2.2).



Gambar 2.2. Potensi diferensiasi sel punca mesenkimal, antara lain menjadi adiposit, kondroblas, atau osteoblas (Singer NG dan Caplan AI, 2011)

2.2 Pembentukan Tulang

Osteoblas berperan dalam pembentukan tulang. Pembentukan tulang merupakan suatu kaskade diferensiasi osteogenik (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Skema kaskade pembentukan tulang (www.bioceramics.uni-bremen.de)

Tahap pembentukan tulang dimulai dari perkembangan sel punca mesenkimal, yaitu sel punca mesenkimal → pre-osteoblas → osteoblas → osteoblas aktif → osteoblas dewasa → osteosit → *bone lining cell* seperti terlihat pada skema

Diferensiasi osteogenik terdiri dari tiga periode biologik, yaitu proliferasi selular, maturasi selular, dan mineralisasi matriks. Secara umum, osteoblas merupakan sel tulang yang imatur dan menyekresi matriks osteoid yang akan mengkalsifikasi matriks ekstraselular. Matriks ini terdiri dari kolagen dan glikoprotein. Sel ini mempunyai juluran sitoplasmik yang memungkinkan osteoblas berkontak dengan osteoblas lain ataupun dengan osteosit.

Osteoblas aktif, yaitu sel mononukleus berbentuk sferikal. Sel ini menyintesis dan menyekresi molekul makro matriks tulang, yang terbanyak adalah kolagen. Selain kolagen, osteoblas juga menyekresi enzim *alkaline phosphatase* (ALP) yang berfungsi sebagai katalisator. Osteoblas juga menyekresi protein-protein nonkolagen, seperti fibronektin, vitronektin, osteonektin, osteopontin, bone sialoproteins, dan lain-lain ke dalam regio matriks yang belum termineralisasi, yaitu yang terletak di antara sel dan matriks termineralisasi (Kartsogiannis, Ng, 2004).

- Osteoblas dewasa berbentuk kuboid dan kaya akan sitoplasma organel (Gambar 2.2). Sistem organel ini tipikal untuk sel yang mempunyai fungsi sekresi. Pada tahap ini sekresi osteoblas berupa ALP dan protein nonkolagen, seperti fibronektin, fibrokalsin, osteokalsin, osteopontin, dan lain-lain. Sel ini berpartisipasi pada periode mineralisasi dengan memproduksi mineral kalsium fosfat ekstra dan intraselular di dalam vesikel (Annaz et al., 2004; Sodek, Cheifetz, 2001). Pada periode mineralisasi matriks, produk kalsium fosfat di dalam vesikel, praktiknya tidak dapat di-*assay* karena kesamaan komposisi antara substrat dan ekstraselular mineral.
- Osteosit adalah sel tulang yang matur. Osteosit merupakan osteoblas yang telah tertanam di dalam matriks tulang yang terkalsifikasi. Sel tersebut menempati lakuna di dalam matriks tulang

- *Bone-lining cells*, terdapat di sepanjang permukaan tulang, yang akan melakukan pembentukan tulang ataupun resorpsi tulang. Protein berperan penting dalam semua proses biologik, yaitu sebagai enzim katalisator, transport ion dan molekul, serta penyimpanannya (Gambar 2.3). Protein ini dibangun dari 20 macam asam amino. Sekuensi asam amino menentukan properti kimia dan fisik serta struktur *folding*.

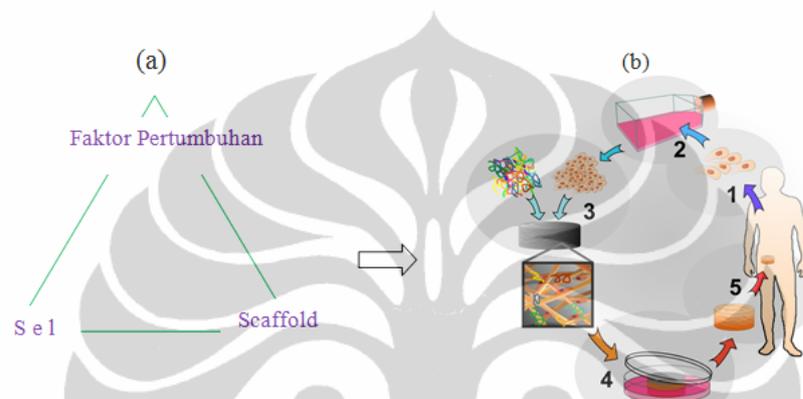
Tulang merupakan jaringan kompleks dengan berbagai fenotip sel dan berbagai tipe jaringan dengan vaskularisasi diantaranya yang menunjukkan kemampuan regenerasi. Apabila patah, tulang beregenerasi melalui tahap perbaikan dan pembaruan (Hulth A, 1989). Dengan kemampuan regeneratif ini, tulang merupakan kandidat utama untuk strategi rekonstruksi dalam mengatasi defek melalui rekayasa jaringan.

2.3 Mekanisme Rekayasa Jaringan Tulang

Trias rekayasa jaringan adalah sel sebagai *building block*, *scaffold* sebagai kerangka, dan *growth factor* (faktor pertumbuhan) sebagai signal biokimia yang menandakan telah terjadinya pertumbuhan jaringan. Sel digunakan sebagai faktor utama dengan konsep bahwa sel dibangun pada jaringan yang dapat tumbuh. Prinsip yang melibatkan keberhasilan rekayasa jaringan meliputi *osteoconduction*, *osteoinduction*, dan *osteogenesis*. *Osteoconduction* mengaplikasikan proses tiga dimensi (3D) yang diamati dari suatu struktur poros yang diimplan ke dalam tulang. Dalam proses ini, vaskularisasi dan sel-sel osteoprogenitor bermigrasi ke dalam struktur poros dan menempati struktur tersebut. Proses yang dapat diamati adalah *initial ingrowth* dari jaringan yang menginvasi struktur poros, diikuti dengan pengembangan lanjutan dari jaringan yang baru terbentuk. *Osteoinduction* meliputi stimulasi sel yang belum berdiferensiasi menjadi osteoblas aktif, dan *osteogenesis* meliputi kontribusi sel dalam *bone remodeling* (pembentukan tulang).

Penyemaian sel pada *scaffold* dapat dilakukan langsung pada lokasi defek di dalam tubuh (*in vivo*) atau dapat juga dengan kondisi kultur (*in vitro*) sebelum

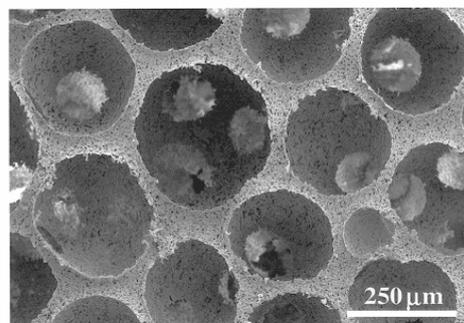
diimplantasi di dalam tubuh. Rekayasa jaringan meliputi pemindahan sel dari jaringan tubuh yang diikuti penempatannya di dalam lingkungan artifisial yang kondusif. Lingkungan tersebut harus mengandung medium yang menyuplai nutrisi esensial, oksigen, pH, suhu, kelembaban, dan tekanan osmotik yang sesuai untuk kehidupan sel. Rekayasa jaringan meliputi beberapa tahap, yaitu isolasi sel dari jaringan tubuh (1), ekspansi sel melalui kultur (2), penyemaian sel di atas *scaffold* (3), inkubasi sel, dan (4) sel implantasi di dalam tubuh (Gambar 2.4).



Gambar 2.4 (a) Trias rekayasa jaringan. (b) Urutan diagram skematik urutan dalam rekayasa jaringan (Moradianoldak, et al., 1991)

Jika jumlah sel jaringan tulang dari kultur primer telah tumbuh memenuhi substrat kultur, selanjutnya dilakukan penyemaian sel pada *scaffold*. Namun, jika jumlah sel dari kultur primer tidak mencukupi, maka perlu dilakukan subkultur.

Scaffold rekayasa jaringan tulang ditujukan untuk disemai dengan sel; oleh karena itu, *scaffold* harus dapat berfungsi sebagai *support* (kerangka) selama proses regenerasi jaringan pada lokasi defek. Dibanding *scaffold* geometri dua dimensi, rekayasa jaringan tulang dengan geometri 3D lebih baik (Gambar 2.5).



Gambar 2.5. *Scaffold* poros saling berhubungan dan aktivitas sel (US Patent 6673285)

Geometri *scaffold* 3D dengan arsitektur poros saling berhubungan memungkinkan vaskularisasi pembuluh darah ke segala arah. Khususnya untuk rekayasa jaringan tulang, diameter poros yang diperlukan untuk pertumbuhan osteoblas adalah 100-300 μm . Selain itu, struktur makroskopik dan mikroskopik *scaffold* 3D ini harus menunjukkan rasio permukaan/volume 70-80% (Barralet JE, et al., 2005). Porositas yang lebih besar dari 80% akan menurunkan properti mekanik *scaffold*.

Scaffold harus memiliki properti mekanik yang adekuat. Hal ini dimaksudkan agar *scaffold* tahan terhadap lingkungan biomekanikal kompleks berupa perubahan *stress* dan *strain* dari tekanan dan aliran cairan tubuh, serta deformasi selular yang dapat memberi konsekuensi pada aktivitas biologik (Babensee JE, Anderson JM, 1998).

Pada akhir fungsinya, *scaffold* harus mampu biodegradasi. Kecepatan biodegradasi *scaffold* harus sesuai dengan regenerasi jaringan. Hasil biodegradasi tidak bersifat toksik terhadap jaringan di sekitar *scaffold* (den Hollander et al., 1991). Untuk menghindari efek negatif yang dapat diakibatkan oleh *scaffold*, maka *scaffold* harus bersifat biokompatibel. *Scaffold* yang berkontak langsung dengan jaringan tubuh tidak boleh mengakibatkan reaksi negatif jaringan tubuh, seperti sakit, nekrosis, dan lebih jauh berpotensi ke arah keganasan. Dengan berbagai persyaratan *scaffold* tersebut, maka diperlukan material yang biokompatibel dengan jaringan yang akan direkayasa. Bersamaan dengan proses ini, *scaffold* harus tetap memiliki integritas struktur sampai jaringan tulang yang baru tumbuh menggantikan fungsi pendukung dari *scaffold* (Vacanti CA, Bonnassar LJ, Vacanti JP, 2000).

Scaffold untuk rekayasa jaringan tulang memerlukan material yang menyertakan unsur-unsur penyusun tulang. *Scaffold* yang mengandung unsur-unsur Ca^{2+} dan P^{3-} dapat memberikan afinitas kuat terhadap jaringan tulang (Luo P, Liu N, Thelen M, 1998). Material bioaktif yang memungkinkan pembentukan tulang baru (osteokonduktif) dan mendorong pembentukan tulang baru (osteoinduktif) adalah biokeramik berbasis Ca^{2+} dan PO_4^{3-} (Black J, 1986). Material ini dibedakan menjadi material bioaktif Klas A yang menunjukkan

perlekatan terhadap jaringan keras tulang dan jaringan lunak, sedangkan material bioaktif yang hanya menunjukkan perlekatan terhadap jaringan keras digolongkan dalam Klas B, yaitu biokeramik berbasis kalsium fosfat. Biokeramik berbasis kalsium fosfat yang relevan dengan apatit tulang adalah senyawa kalsium ortofosfat, yaitu senyawa dari asam ortofosfat (H_3PO_4) yang dapat membentuk kompon mengandung H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} atau PO_4^{3-} (Tabel 2.1). Penyemaian sel pada *scaffold* kalsium fosfat berlanjut dengan aktivitas biologik pada *scaffold*. Aktivitas biologik meliputi pertukaran ion yang berlangsung pada permukaan kalsium fosfat dan interaksi antara permukaan kalsium dan sel.

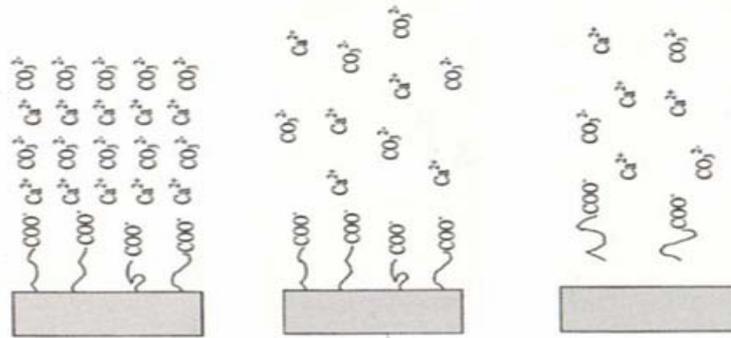
Tabel 2.1. Senyawa kalsium fosfat (Ca PO_4) yang relevan dengan apatit tulang

Kalsium fosfat	Formula
Dikalsium fosfat/monetit	CaHPO_4
Dikalsium fosfat dihidrat / brushite	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Oktakalsium fosfat	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
Trikalsium fosfat (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Kalsium fosfat dihidrat / HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

2.3.1 Pertukaran Ion pada Permukaan Kalsium Fosfat

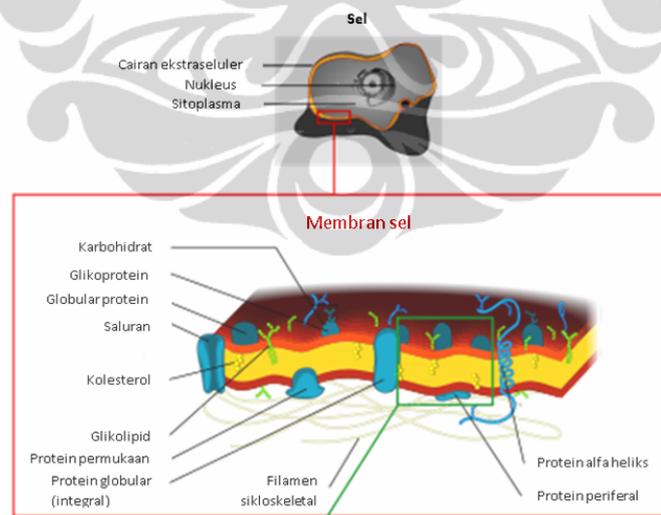
Secara fisikokemikal, permukaan kalsium fosfat mempertahankan proses disolusi-represipitasi berkesinambungan sebagai hasil pertukaran *solid-liquid interface* dalam kondisi supersturasi. Di dalam sistem biologik, fenomena fisikokemikal ini adalah hasil dari proses dinamik komponen multi yang melibatkan ion dan protein.

Ditinjau dari reaktivitas permukaan, transfer ion berlangsung dari permukaan senyawa kalsium fosfat (fasa padat) ke cairan di sekitarnya (fasa cair). Transfer ion ini terjadi melalui hidrasi permukaan-permukaan Ca^{2+} , PO_4^{3-} , dan impuritas yang ada, seperti karbonat (CO_3^{2-}), Cl^- atau F^- (Barrere et al., 2003) Gambar 2.6.



Gambar 2.6. Transfer ion dari fasa padat ke fasa cair pada proses perlekatan sel pada *scaffold* (www.bioceramics.uni-bremen.de)

Transfer ion juga berlangsung dari cairan di sekitarnya (fasa cair) ke substrat kalsium fosfat (fasa padat). Ion memasuki sel melalui *ion channels* (saluran ion) yang terdapat pada lapisan/membran sel (Gambar 2.7).



Gambar 2.7 Ilustrasi membran sel dengan saluran-saluran tempat masuknya komponen ke dalam sel (Alberts B, Johson A, Lewis J, 2002)

Sebuah sel memiliki 300 tipe saluran ion, pada membran sel, yang diklasifikasikan secara alami berdasarkan ion yang melintasi salurannya masing-masing. Ion melintasi membran dengan dua cara:

- *Gating*

Ion melintasi saluran ion dengan cara buka-tutup saluran ion yang bergantung pada *voltage gradient*.

- Saluran Ion

- Saluran klorida. Saluran klorida berperan secara fisiologik dan selular. Beberapa fungsinya adalah mengatur pH, homeostatis, sebagai transport (mengantarkan) larutan organik, migrasi sel, proliferasi sel, dan diferensiasi sel.

Terdapat 13 jenis saluran ion yang tergabung dalam keluarga besar saluran klorida. Melalui saluran tersebut, berbagai macam anion melintas, tetapi yang paling banyak adalah klorida. Oleh karena itu, saluran ini dikenal sebagai saluran klorida.

- Saluran kation *non selective* dilintasi terutama oleh ion-ion Na^+ , K^+ , Ca^{2+}
- Saluran senyawa potasium
- Saluran senyawa natrium
- Saluran senyawa kalsium
- Saluran proton

Membran sel bersifat permeabel selektif dan memfasilitasi transport substansi yang dibutuhkan untuk kehidupan sel. Pergerakan dari substans melintasi membran dapat secara pasif, tidak membutuhkan energi dari sel, ataupun secara aktif, yang memerlukan ekspan energi untuk transportasi tersebut (Alberts B, Johson A, Lewis J, 2002). Permeabilitas membran bergantung pada *charge electric* dari molekul. Membran sel bersifat hidrofobik, maka molekul-molekul kecil yang bersifat elektrik netral melintasi membran sel dengan lebih mudah. Membran juga mempertahankan potensial sel dengan menyeleksi substan yang keluar-masuk sel. Untuk fungsi ini, membran memberlakukan mekanisme transport, yaitu:

- Difusi: substansi kecil seperti CO_3^{2-} , O_2 dan H_2O dapat melintasi membran dengan proses transport pasif
- Osmosis: proses transport untuk transport air, molekul, dan ion
- Mediated Transport: proses transport untuk memasukkan nutrisi, seperti gula dan asam amino serta menyaring substansi yang harus ditinggalkan.
- Endostosis: Proses transport dengan membentuk deformasi ke arah dalam sel. Deformasi ini melepas dari membran di bagian dalam sel membentuk vesikel sebagai wadah substansi yang dibawa. Endostosis merupakan cara transport untuk partikel solid (sel pemakan), makromolekul (protein, karbohidrat) dan mikromolekul atau ion.

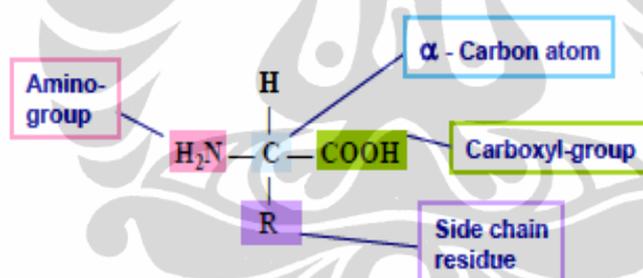
Selain berfungsi sebagai pelindung melalui lapisan lipida dengan protein, membran sel berperan dalam berbagai proses, seperti adhesi sel, konduktivitas ion, dan *cell signaling* serta merupakan tempat perlekatan struktur ekstraselular, termasuk dinding sel, dan *cytoskeleton intrasel*. Dalam hal ini, membran sel dilapisi oleh skeleton di dalam sitoplasma. Membran skeleton ini menyediakan wadah perlekatan protein serta perlekatan organel yang berekstensi dari sel (Doherty GJ, MacMahon HT, 2008). Skeleton ini mampu membuat organel berupa juluran, seperti silia atau filipodia untuk memperluas *surface area* sel agar dapat meningkatkan absorpsi nutrisi bagi sel.

Keberadaan unsur CO_3^{2-} dan gugus Mg^{2+} berkontribusi dalam terbentuknya apatit karbonasi kristalinitas rendah yang sama dengan fasa mineral tulang (Elliot 1994). Transformasi fasa dapat terjadi pada semua senyawa kalsium fosfat karena memiliki kemampuan kuat untuk beradaptasi terhadap lingkungannya dengan menggunakan ion-ion lain sebagai *host* untuk kemudian melakukan *atomic rearrangement* (rekristalisasi) (Cazalbou, et al., 2004).

Di bawah kondisi fisiologik (cairan tubuh), proses disolusi sangat bergantung pada karakteristik permukaan kalsium fosfat (Radin Ducheyne 1993). Derajat kristalinitas, yang berhubungan dengan tidak murninya material, dan/atau ukuran kristalit kecil mengakselerasi disolusi material (de Bruijn et al., 1992).

Dalam hal ini, material yang lebih amorf mengalami disolusi lebih cepat daripada yang bersifat kristalin. Selain itu, mikro ataupun makroporos berperan juga di dalam proses disolusi dari material. Makin besar permukaan yang terekspos oleh lingkungan, makin cepat terjadi disolusi karena makin banyak pertukaran ion yang dapat terjadi.

Dengan adanya protein, fasa mineral yang baru terbentuk disertai komponen organik (Barrere, et al., 2003; Elliot, 1994). Interaksi ini juga bergantung pada karakteristik protein, apakah beraktivitas pada larutan atau pada substrat (Ofir et al., 2004). Di dalam larutan, protein dapat menghambat terjadinya nukleasi dan pertumbuhan kristal kalsium fosfat (Boskey, Paschalis, 2001). Namun, protein yang mengandung karboksilat ataupun asam amino, seperti protein-protein nonkolagen, telah menunjukkan kemampuannya untuk memungkinkan nukleasi dan pertumbuhan kristal kalsium fosfat (Boskey, Paschalis, 2001) (Gambar 2.8).

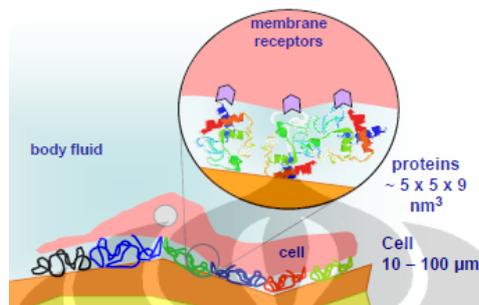


Gambar 2.8. Protein yang memfasilitasi interaksi sel dan tulang
(www.bioceramics.uni-bremen.de)

Pada saat protein beradsorpsi pada substrat kalsium fosfat, maka keberadaan Ca^{2+} , dalam hal ini konsentrasi dan *charge* di dalam cairan sekitarnya, merangsang *surface-coveragekinetic* yang dapat berevolusi dengan waktu (Kawasaki et al., 2003). Interaksi sel-protein-substrat terjadi melalui *charge* elektrostatik, efek hidrofobik, dan ikatan van der Waals (Bray DD, et al., 1984) (Gambar 2.9).

Protein yang beradsorpsi ini dapat merangsang pembentukan kristal kalsium fosfat baru (Ofir et al., 2004). Hasil yang diperoleh secara *in vitro* ini

sangat berbeda dengan yang sebenarnya dihasilkan secara in vivo karena berbagai protein terdapat di dalam cairan biologik. Namun, efek yang dihasilkan terhadap aktivitas biologik baik secara in vitro ataupun in vivo menggunakan prinsip pertukaran ion yang sama

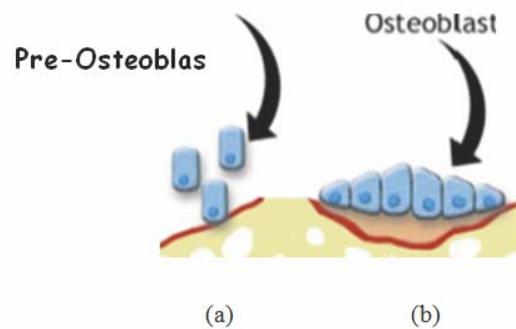


Gambar 2.9. (a) Interaksi sel tulang. (b) Struktur protein yang memfasilitasi interaksi sel dan tulang (www.bioceramics.uni-bremen.de)

2.3.2 Interaksi dari Kalsium Fosfat - Sel

Karakteristik permukaan tidak hanya menentukan dinamika pertukaran ion serta absorpsi protein, namun juga aktivitas seluler. Aktivitas seluler berupa *attachment* (perlekatan), proliferasi dan diferensiasi. Aktivitas seluler ini merupakan interaksi permukaan kalsium fosfat dan sel yang terjadi pada awal pembentukan tulang (Devlin, Sloan, 2002). Berbeda dengan osteoblas, pada awalnya osteoprogenitor bermigrasi dan berproliferasi dengan pergerakan cepat pada kondisi yang berpotensi untuk diferensiasi. Migrasi di atas substrat dilakukan hanya dengan membentuk pergerakan yang tidak melekat, yaitu adhesi lemah dan traksi (Gambar 2.10).

Pada akhir fase migrasi, sama halnya dengan osteoblas, osteoprogenitor beradhesi kuat terhadap substrat untuk selanjutnya masuk ke dalam tahap diferensiasi. Migrasi dan adhesi dari sel dimediasi melalui integrin yang merupakan protein transmembran (Anselme, 2000). Dengan adanya interaksi dengan kalsium fosfat, terjadi perlekatan osteoblas dengan permukaan kalsium fosfat. Secara in vitro, interaksi biomaterial-sel dapat di-*assay* oleh sel osteoblas.



Gambar 2.10. Interaksi kalsium fosfat–sel : (a) preosteoblas bermigrasi, (b) osteoblas melekat pada permukaan kalsium fosfat (Nime R, Kempf, 2000)

Kimiawi permukaan *scaffold* harus dapat menstimuli perlekatan dan pertumbuhan sel, serta mendeposisi matriks dari sel pada permukaan *scaffold*.

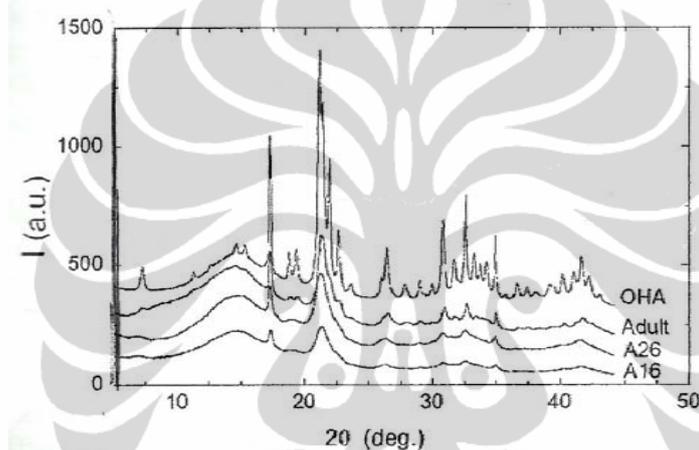
2.4 Komposit Alginat/Hidroksiapatit sebagai *Scaffold* untuk Rekayasa Jaringan

Dalam dua dekade terakhir, untuk aplikasi dalam rekayasa jaringan tulang, telah dikembangkan *scaffold* dengan *bone analogue concept*. Pencapaian konsep ini dilakukan dengan menggunakan material inorganik dan organik yang mereplikasi struktur tulang (Charles-Harris M, et al., 2008; Valle S del, et al., 2007; LeGeros RZ, 2002; DeGroot, 1986). Pengembangan ini ditujukan untuk memperoleh material yang *ductile*. Hal ini dimaksudkan untuk meningkatkan kekuatan mekanik dalam mengatasi stress yang akan diterima pada aplikasi *in vivo*.

Material *scaffold* juga dikembangkan ke material yang biodegradabel (*3rd Generation*) dan bahkan akan menuju ke material yang dapat beradaptasi dengan fungsi sel (*Next Generation*). Dalam memperoleh material yang biodegradabel, biopolimer, seperti alginat ataupun sitosan, banyak dimanfaatkan sebagai material *scaffold*. Oleh karena itu, dalam mempersiapkan *scaffold*, HA sering dikomposit baik dengan alginat ataupun sitosan.

2.4.1 Hidroksiapatit

Di antara senyawa kalsium fosfat, HA adalah senyawa yang paling banyak diapikasi sebagai sebagai *scaffold*. HA memperlihatkan kristalografi yang paling menyerupai kristalografi tulang (Meneghini C, et al., 2003). Secara umum, pola difraksi sinar X (X-ray diffraction / XRD) apatit tulang terlihat mendekati pola XRD HA sintetik, oleh karena itu, apatit tulang disebut sebagai HA biologik. Kedua kristalografi tersebut berbeda dalam intensitas pada pola XRD (Gambar 2.11). Hal ini menunjukkan bahwa HA biologik adalah amorf.



Gambar 2.11. Pola XRD dari HA, tulang dewasa, dan tulang anak pada usia 26 dan 16 minggu. Perbedaan terlihat pada intensitas antara HA dan tulang (Meneghini C, et al., 2003)

HA stoikiometri termasuk dalam grup apatit umum yang dipresentasikan dalam formula sebagai berikut:



dimana Me adalah metal divalen (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Pb^{2+} , dll), XO_4 adalah anion trivalen (PO_4^{3-} , AsO_4^{3-} , dll) dan Y adalah anion monovalen (OH^- , F^- , Cl^- , Br^- , dll). Berbeda dengan HA stoikiometrik, pada HA biologik substitusi dapat terjadi (i) pada grup XO_4 oleh hidrogenfosfat (HPO_4^{2-}) dan (ii) pada grup XO_4 dan/atau grup Y_2 oleh karbonat (CO_3^{2-}). Substitusi demikian terdapat pada HA biologik; oleh karena itu, hidroksiapatit biologik jarang ditemukan dalam keadaan stoikiometri.

2.4.1.1 Sintesis Hidroksiapatit

Hidroksiapatit sintetik dapat diperoleh secara alami atau secara sintesis. Secara alami, HA dapat bersumber dari koral (Gravel M, et al., 2006). Selain itu, HA juga dapat bersumber dari cangkang telur (Sari YW, et al., 2004; Dasgupta P, et al., 2004). Selain bersumber dari alam, HA dapat disintesis dari prekursor kimia. Dengan menggunakan prekursor kimia, HA disintesis dengan cara presipitasi yang dilakukan dengan salah satu cara dari berbagai rute. HA sintetik dapat pula diperoleh secara komersial. Namun, daya tarik HA sebagai material pengganti tulang ataupun sebagai *scaffold* telah mengembangkan studi sintesis HA.

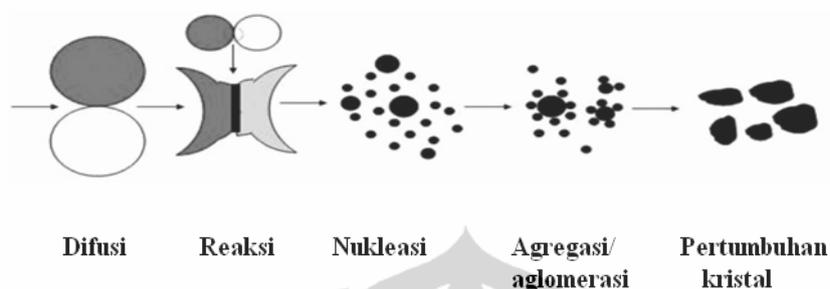
Sintesis HA dengan cara elektrokristalisasi diperoleh dari endapan elektrolit Ca^{2+} dan PO_4^{3-} . Elektrolit yang digunakan untuk elektrodposisi dari kalsium fosfat berasal dari kalsium nitrat dan diamonium hidrogen fosfat yang dilarutkan di dalam air (Shirkanzadeh M.,1998). *Synthetic body fluid* (SBF) dengan garam anorganik yang menyerupai plasma darah, memfasilitasi nukleasi spontan dan pertumbuhan HA pada pH fisiologis dan suhu tubuh (Tas AC, 2000). Pada sintesis HA yang menggunakan metode sol-gel digunakan kalsium nitrat dan *organo-metallic* dari tipe alkoksida, seperti metoksietanol eter dengan peningkatan suhu untuk memulai gelasi dan pengeringan gel untuk memperoleh serbuk HA (Vazquez CG, Barba CP, Munguia, 2005). Pada metode ini dapat juga digunakan prekursor kalsium nitrat dan asam fosfat (Sanosh KP, et al., 2009). HA juga dapat diperoleh dengan cara *self-assembly*. Pada studi Shi X (2008), *template* dari *dodecylamin* dilarutkan di dalam etOH/akuademineral yang mengandung kalsium nitrat dan diamonium hidrogen fosfat. Setelah dilakukan pengeringan, dilakukan pelepasan *template* melalui ekstraksi etOH. Metode lain untuk menyintesis HA adalah secara hidrotermal, yang melibatkan transformasi larutan atau gel menjadi fasa kristalin. Pada studi Earl JS, Oeed DJ, Milne SJ (2006), HA hasil presipitasi dari prekursor, misalnya kalsium nitrat dan diamonium hidrogen fosfat, memerlukan pemanasan di dalam reaktor hidrotermal dengan suhu 200°C selama 24-72 jam.

Metode sintesis HA yang paling sering dilakukan adalah metode presipitasi. Sintesis HA dengan menggunakan metode sol-gel dengan prekursor $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dan $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (Monmaturapoj N, 2009; Pattanayak DK, et al., 2005; Santos KP, 2000), dari sintesis HA dengan menggunakan metode *self-assembly* dengan prekursor $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ dan $(\text{NH}_3)_2\text{PO}_4$ (Shi Xuetao, et al., 2008; Rossi AM, et al., 2006), bahkan dari sintesis HA yang menggunakan metode hidrotermal dengan prekursor $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ dan NaOH (Manafi S, Badiee SH, 2008) ataupun dari studi yang menggunakan prekursor alam (Sari YW, et al., 2008). Sebagai sumber kalsium dan fosfor lain adalah $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dan H_3PO_4 (Yoruc ABH, Koca Y, 2009; Santos MH, et al., 2004). Setelah membandingkan beberapa metode, Vazquez CG, Barba CP, Munguia (2005) menilai bahwa proses sintesis dengan ko-presipitasi adalah yang paling sederhana, efektif, relatif tidak mahal, dan dapat mempersiapkan sejumlah hasil yang lebih banyak dibandingkan dengan metode-metode lainnya.

Sintesis HA yang dilakukan melalui presipitasi dihasilkan dari larutan yang mengandung kalsium fosfat melalui proses kristalisasi. Proses kristalisasi terjadi dari fasa lebur, fasa uap, atau fasa larutan. Berbeda dengan proses kristalisasi dari fasa lebur dan fasa uap, proses kristalisasi dari fasa larutan berlangsung dalam larutan supersaturasi yang kemurniannya dapat dikontrol oleh kemurnian larutan. Mengingat mineral jaringan keras berasal dari larutan dalam kondisi fisiologi, maka pertumbuhan kristal dari fasa larutan akan digunakan dalam sintesis HA.

Proses kristalisasi dari fasa larutan berlangsung mengikuti *rule of stages by Ostwald* melalui tiga tahap, yaitu nukleasi-agregasi/aglomerasi-pertumbuhan (Mostafa NY, 2005; Kemenade MJJM van, Bruyn PL de, 1978 ; Gambar 2.12). Tahap awal adalah periode nukleasi; ion dan/atau kumpulan ion bertumbukan sehingga membentuk inti kritis. Inti kritis merupakan kombinasi ion terkecil dengan struktur kristal yang tidak larut dalam medium. Tahap kedua adalah proses pertumbuhan kristal, yaitu penambahan ion dan/atau kumpulan ion pada inti kritis sehingga ukuran kristal bertambah besar. Proses nukleasi dan pertumbuhan kristal bergantung pada kondisi kadar supersaturasi larutan. Misalnya, pengadukan dapat

menambah gerak ion, yang akan mempercepat laju proses nukleasi maupun pertumbuhan kristal.



Gambar 2.12 Proses kristalisasi dari fasa larutan mengikuti *rule of stages by Ostwald* (Sanosh KP, et a, 2007)

Tahap ketiga adalah pematapan kristal. Tahap ini merupakan penambahan ukuran kristal yang berlangsung setelah tahap pertumbuhan kristal selesai. Oleh karena ion mineral dalam larutan telah dipakai dalam proses nukleasi dan pertumbuhan kristal, maka penambahan ukuran kristal berlangsung melalui proses konsolidasi yang bersamaan dengan menurunnya jumlah kristal. Kristal berukuran kecil larut menjadi ion bebas dan kemudian secara epitaksi mengalami deposisi pada kristal yang lebih besar. Proses ini berlangsung terus sampai semua material mengalami konsolidasi dan membentuk kristal HA, dan akhirnya membentuk partikel HA.

Proses presipitasi HA, secara kimiawi diinisiasi oleh pembentukan fasa kalsium fosfat intermediet yang amorf. Kemampuan kalsium fosfat amorf untuk mengabsorpsi ion-ion Ca^{2+} dan HPO_4^{2-} mengarah ke pembentukan defektif apatit (Tabel 2.1). Evolusi berlanjut terus dengan bertambahnya kandungan ion OH^- yang diantaranya terjadi pembentukan fasa intermediet dikalsium fosfat anhidrat/monetite dengan $\text{Ca/P}=1,00$ meningkat terus sampai terbentuk HA dengan $\text{Ca/P}=1,67$ (Blumenthal NC, Betts F, Posner AS, 1981; Brown, et al., 1979). Fasa kalsium fosfat berbeda dalam hal komposisi dan struktur kristal yang menentukan properti fisikokemikal. Berdasarkan komposisi dan struktur senyawa kalsium fosfat, HA bersifat paling stabil.

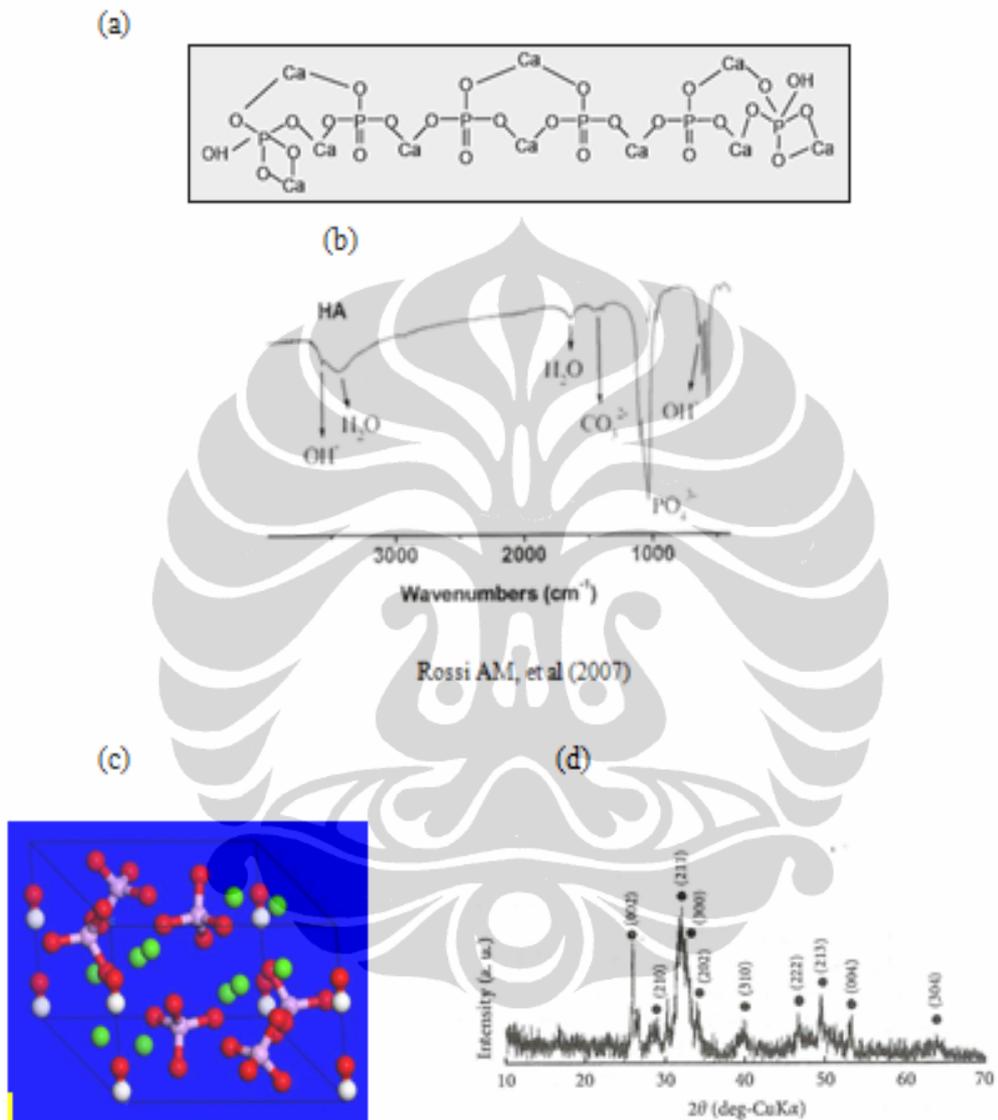
2.4.1.2 Struktur Mikro Hidroksiapatit

HA memiliki formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Gambar 2.13.a). Spektra *Fourier Transform InfraRed Spectroscopy/FTIR* dari HA mencerminkan rumus bangun yang menunjukkan terdapatnya gugus-gugus fungsi hidroksil (O-H), karbonil (C=O), dan C-O (karboksil) (Gambar 2.13 b), sedangkan kristal HA stoikiometri dipandang sebagai struktur heksagonal dengan grup ruang $\text{P6}_3/\text{m}$ yang memiliki parameter kisi $a=b= 9,432 \text{ \AA}$, $c= 6,881 \text{ \AA}$ sebagaimana terdapat pada *file* standar no. 09-0432 dari ICDD untuk fasa $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Pada *file* standar tersebut ditunjukkan bidang-bidang pada HA (002), (210), (211), (202), (310), (222), (213), dan (004). Bidang-bidang tersebut didemonstrasikan pada studi-studi Yoruc ABH, Koca Y (2009), da Cruz, et al., (2006), dan Santos MH, et al., (2004). Posner AS, Diorio AF (1985) dan McConnell D, Foreman DW (1966) menjelaskan bahwa struktur heksagonal ini terdiri dari *quasi-compact packing* dari ion-ion Ca^{2+} yang dikelilingi oleh gugus PO_4^{3-} dan OH^- (Gambar 2.13c). Studi Kimura I (2007) memperlihatkan pola XRD dari hidroksiapatit (Gambar 2.13 d).

Pada HA dimungkinkan terjadinya berbagai substitusi, namun struktur kristalografinya tidak mengalami perubahan (Legeros, 1980; Young, 1975). Di dalam struktur HA, ion OH^- dan/atau ion PO_4^{3-} dapat disubstitusi, yaitu oleh ion CO_3^{2-} (karbonat). *Substitution* OH^- oleh ion CO_3^{2-} menghasilkan HA karbonasi tipe A, sedangkan substitusi ion PO_4^{3-} menghasilkan HA karbonasi tipe B (de Campos DDP, Bertran CA, 2009; Doi et al., 1982). Kedua tipe substitusi dapat juga terjadi bersamaan, menghasilkan HA karbonasi tipe A/B (Lafon P, Champione E, Bernache Assollant, 2008). Pada studi sintesis HA, HA karbonasi tipe B dihasilkan dari metode presipitasi pada udara terbuka (Wang L, Li C, 2009; Yoruc ABG, Koca Y, 2009; van der Houwen et al, 2003). Dengan kemungkinan substitusi tersebut, maka HA dikatakan memiliki impuritas.

HA telah diaplikasi sebagai material pengganti tulang dalam bidang ortopedi sejak seratus tahun yang lalu. Dalam fungsinya sebagai pengganti tulang, HA diberi perlakuan panas untuk memperoleh kekuatan mekanik tinggi. Pada studi Nazarpak MH, Salati-Hashjin M, Moztarzadeh F (2009), penggunaan suhu

sinter yang dilakukan pada akhir proses sintetisnya memberikan peningkatan kekuatan kompresi, fleksural, ataupun *bending* dari HA sebanyak 3-4 kali.



Gambar 2.13. HA dengan (a) Rumus bangun, (b) FTIR (Rossi, et al., 2007), (c) Struktur mikro dengan PO₄³⁻ (ungu-merah), Ca²⁺ (hijau), OH⁻ (merah-putih) dan (d) pola XRD (Kimura I, 2007)

2.4.1.3 Degradasi Hidroksiapatit

Di dalam tubuh, degradasi *scaffold* biokeramik berbasis kalsium fosfat pada studi Rumpel, et al., (2006) dan Lu J, et al., (2002) terjadi karena adanya fagositosis oleh makrofag atau osteoklas; namun, Tadjoeidin, et al. (2000) dan Suba, et al. (2000) menunjukkan peran tersebut minimal karena degradasi dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor lain. Menurut Kurashima K (2002), degradasi juga terjadi karena proses kelarutan material di dalam cairan tubuh dan darah. Berbagai penelitian pada material biokeramik berbasis kalsium fosfat menunjukkan bahwa kelarutan material tersebut dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, antara lain kristalinitas, porositas, ataupun komposisi kimiawi. Oleh karena itu, studi telah ditujukan pada berbagai usaha untuk meningkatkan degradabilitas dengan mengatur faktor-faktor tersebut.

Berbagai studi telah menunjukkan lambatnya degradasi *scaffold* berbasis kalsium fosfat. Degradasi merupakan kelarutan material yang pada umumnya ditandai oleh adanya perubahan berat serta terdeteksinya ion-ion kalsium dan fosfor setelah dilakukan perendaman sampel. Accorsi-Mendonca T, et al. (2005) telah menurunkan temperatur deproteinasi pada tulang medulla sapi untuk mencegah kehilangan komponen organik yang terkandung di dalamnya. Dari material komersial yang deproteinasi 300°C, diperoleh degradasi HA komersial yang lebih besar jika dibandingkan dengan yang dideproteinasi pada 1000°C dengan penurunan berat sampel 4,7%. Namun, studi Lu J, et al. (2004) telah menunjukkan bahwa ketidakcukupan kalsinasi pada HA dapat memicu terlepasnya partikel mikro dari *scaffold* ke dalam kultur jaringan yang dapat merusak selular implantasi. Penambahan *polivinil alcohol* (PVA) ke dalam monokalsium fosfat monohidrat komersial ditujukan untuk meninggalkan pori makro pada *scaffold* saat perlakuan panas (Wang C-W, et al., 2003; Zhang F, et al., 2006). Usaha ini telah memberikan nilai degradasi *scaffold* yang lebih besar (Wang C-W, et al., 2003).

Disamping itu, banyak studi mengamati adanya degradasi pada perubahan kekuatan mekanik. Setelah perendaman sampel selama 90 hari, degradasi diamati dari perubahan kekuatan mekanik yang berangsur-angsur menurun. Degradasi

juga diukur dari penurunan kekuatan kompresi dan modulus elastik. Material yang berukuran submikron menunjukkan nilai kekuatan mekanik yang lebih besar dibandingkan dengan yang berukuran nano.

Beberapa faktor yang berpengaruh pada degradasi. Degradasi meningkat jika:

- *Surface area* meningkat
- Derajat kristalinitas menurun
- Keperfekan kristal menurun
- Ukuran kristalit menurun
- Substitusi CO₂

Sebaliknya, degradasi menurun jika:

- substusi ion F
- adanya Mg pada TCP
- rasio TCP/HA menurun

Untuk meningkatkan degradasinya, pengaturan suhu kalsinasi dari material dilakukan untuk memperkecil ukuran butir. Pada studi Zhang F, et al. (2006), perendaman Wollastonite/*tricalcium phosphate* (TCP) selama tiga minggu menghasilkan degradasi lebih besar pada material yang berukuran submikron (2 μ m) dibandingkan dengan yang nanosinter (200 nm). HA dengan ukuran kristalit lebih kecil memiliki *surface area* yang lebih luas dibandingkan dengan HA stoikiometrik, yang memiliki ukuran kristalit lebih besar sehingga memiliki *surface area* yang lebih kecil (LeGeros, et al., 2001).

Pada studi Sanosh KP, et al. (2009) HA sintesis dengan rute sol-gel disinter dari 65°C sampai dengan 800°C dengan peningkatan 100°C. Hasil menunjukkan bahwa HA dengan suhu sinter 400°C, 700°C, dan 900°C menghasilkan derajat kristalinitas secara berurutan 40%, 78%, dan 88% .

HA dengan derajat kristalinitas yang lebih tinggi menunjukkan ukuran kristalit lebih besar daripada HA dengan kristalinitas rendah (Zhang F, et al., 2006; LeGeroz RZ, 2002). Pada studi LeGeroz RZ (2002) dan Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J (2002), peningkatan kristalinitas

memberikan ukuran kristalit lebih tinggi, yaitu berskala mikron atau submikron. Pemberian suhu sinter 800°C menghasilkan diameter partikel 30 nm dengan panjang 100 nm, sedangkan dengan meningkatkan suhu sinter menjadi 1050°C, diameter partikel menjadi 200 nm dengan panjang 500 nm, disamping kristalinitas yang juga meningkat (Zhang F, et al., 2007). Distribusi ukuran partikel perlu diperhatikan dalam aplikasi rekayasa jaringan. HA dengan distribusi ukuran partikel besar dapat menyebabkan partikel-partikel berukuran lebih kecil mengobstruksi ruang di antara partikel-partikel besar. Akibatnya adalah berkurangnya vaskularisasi pembuluh darah di lokasi tersebut (LeGeroz RZ, 2002, Ducheyne P, Qiu Q, 1999).

Selanjutnya, HA yang memiliki ukuran kristal relatif lebih besar memberikan *surface area* lebih kecil sehingga degradasinya relatif lebih kecil. Berbagai studi menunjukkan bahwa degradasi lebih cepat terjadi pada material dengan *surface area* yang lebih besar (Komlev VS, et al., 2010; John A, et al., 2008).

2.4.2 Alginat

Makroalga (alga) adalah ganggang yang berbentuk poliseluler. Terdapat empat kelas, yaitu alga hijau (Chlorophyceae), alga biru (Cyanophyceae), alga merah (Rhodophyceae), dan alga coklat (Phaeophyceae). Alga hijau dan biru menggunakan air tawar sebagai habitatnya, sedangkan alga merah dan coklat hampir secara eksklusif tumbuh di laut. Alga merah dan coklat lebih dikenal sebagai *seaweed* (rumput laut) dan diantara keduanya, alga coklat, termasuk juga *kelp* atau *rockweed*, banyak mengandung alginat. Di dalam alga coklat, alginat terakumulasi setelah bercampur dengan mineral dari laut, seperti Na, Cl, Fe, K, Mg, Si, P, Ca, Y, dan/atau Br dan pada umumnya bersenyawa dengan mineral-mineral tersebut (McHugh DJ, 1987). Disamping mineral (*trace element*), di dalam alga coklat terdapat pula pigmen. Dari berbagai macam pigmen yang terkandung di dalam alga coklat, terdapat pigmen fukosantin yang menutupi pigmen lainnya. Di luar komponen-komponen tersebut, terdapat alginat yang merupakan komponen terbanyak.

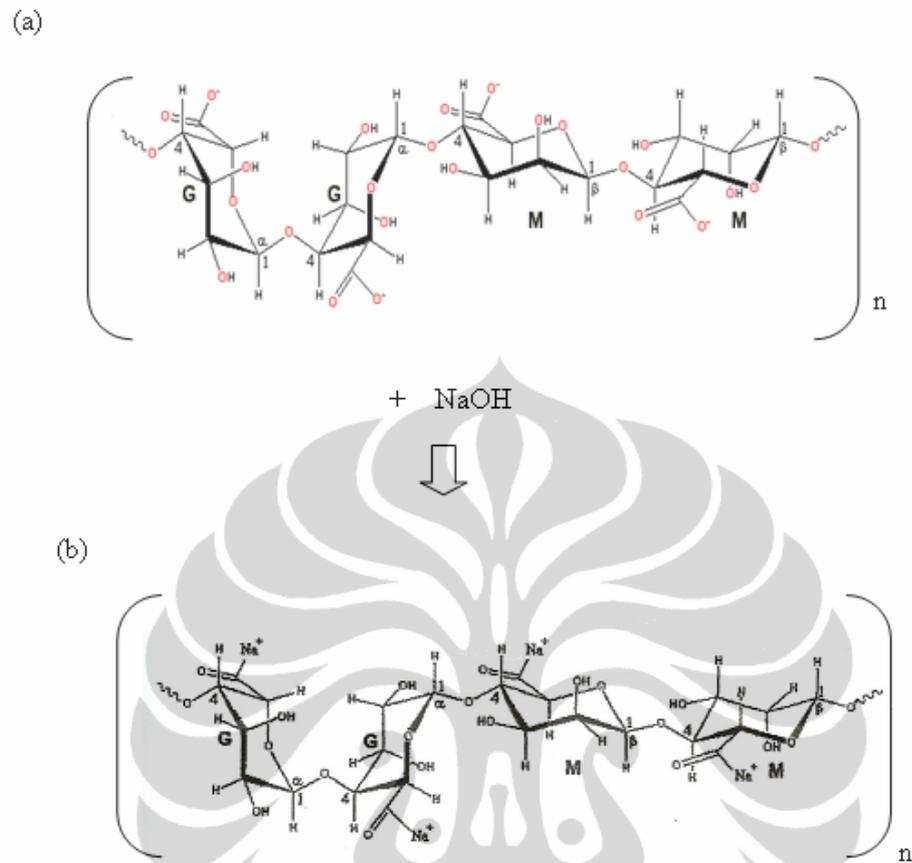
2.4.2.1 Struktur Mikro Alginat

Alga coklat juga mengandung berbagai komponen dengan komposisi yang bergantung pada jenis, masa perkembangan, dan kondisi tempat tumbuhnya. Komponen tersebut adalah asam alginat, karbohidrat, protein, lemak, serat kasar, vitamin, dan pigmen. Jenis karbohidrat di dalam alga coklat adalah laminarin ($C_5H_{10}O_5$)_n yang merupakan 25% berat alga coklat kering. Fukoidin merupakan senyawa garam kalsium dari karbohidrat yang secara umum mengandung ± 56% fukosa dan 38% sulfat. Senyawa lain adalah manitol yang merupakan senyawa gula alkohol dan fenol.

Proses ekstraksi alga coklat dapat dilakukan melalui berbagai cara. Pada dasarnya, teknik ekstraksi dilakukan melalui tahap demineralisasi, netralisasi, ekstraksi, filtrasi, presipitasi, dan pemucatan (Yulianto K, 2007; Yunizal, 1999; King HA, 1982). Proses ini memungkinkan konversi asam alginat menjadi berbagai produk yang fungsional, seperti kalsium alginat, potasium alginat, atau natrium alginat.

Alginat adalah istilah untuk senyawa dalam bentuk garam dari asam alginat (Glicksman M, 1983). Koloid alginat pertama kali diekstraksi dari alga coklat genus *Laminaria* oleh seorang ahli kimia Inggris, yang diberi nama asam alginat ($C_6H_7O_6H$)_n dan dipatenkan tahun 1881. Asam alginat merupakan polisakarida linier berbasis asam uronat (Chou, HN & YM, Chiang, 1976). Setiap monosakarida memiliki dua isomer yang terdiri dari sistem cincin dan sistem rantai (Gambar 2.14). Pada saat pembentukan alginat, asam uronat membentuk susunan variasi unit β-D asam guluronat (G), α-L asam mannuronat (M).

Bentuk polimer asam poliguluronat digambarkan sebagai pita bengkok, lebih kaku dari asam polimanuronat (Atkins et al., 1971 dalam Anonim, 1976). Alginat mengandung kopolimer berganti yang selang-seling keduanya. Alginat dengan proporsi poliguluronat tinggi cenderung membentuk gel yang lebih kaku, regas dan bersineresis (Glickman, 1979). Secara keseluruhan, polimer alginat membentuk rantai panjang (100-3000 unit) yang fleksibel (Truss, et al., 2001; Soares, et al., 2004).



Gambar 2.14. (a) Asam alginat terdiri dari unit G dan M, (b) dengan penambahan NaOH dikonversi menjadi Na-alginat (Atkins et al., 1971 dalam Anonim, 1976)

Rendemen alginat yang dihasilkan bergantung pada beberapa faktor. Selain jenis dan umur, rendemen alga dipengaruhi juga oleh kondisi habitat, seperti intensitas cahaya, besar kecilnya ombak/ arus, nutrisi perairan, dan iklim (King AH, 1982). Ditambahkan oleh Yulianto K (2007) dan Budiyanto dan Djazuli (1997), rendemen alginat juga dipengaruhi oleh teknik penanganan setelah dipanen, praperlakuan, dan proses ekstraksi yang digunakan. Dalam kemasan, kualitas alginat dibagi menjadi tiga kelompok mutu, yaitu *industrial grade*, *food grade*, dan *farmaceutical grade*, yang dalam proses ekstraksinya memerlukan kualitas bahan baku dan proses yang berbeda, sesuai dengan mutu alginat yang diinginkan (Chou HN, Chiang YM, 1977).

Alginat alam (natural) mengandung berbagai impuritas yang dapat memberi tingkat sitotoksitas relatif. Purifikasi alginat dengan menggunakan kloroform/butanol dan *activated charcoal* efektif untuk mengurangi polifenol sampai konsentrasi rendah. Kandungan polifenol dapat menjadi 0,4% dari konsentrasi awal (Lu Lu YQ, Zhou C, Luo B, 2009). Metode lain untuk menurunkan derajat kontaminasi adalah proses *multiple step separation*. Metode ini dapat menghilangkan endotoksin lipopolisakarida, polifenol, protein, dan impuritas lain dari alginat.

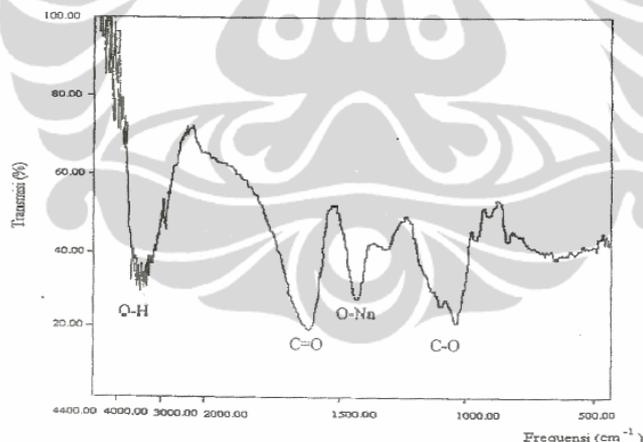
2.4.2.2 Hidrogel Alginat

Alginat adalah molekul rantai panjang dengan banyak ion negatif (anion). Pada proses penambahan air, molekul-molekul alginat terhidrasi (pengikatan air; King AH, 1982). Asam alginat tidak larut dalam air, hanya *swelling* (mengembang). Alginat yang mengandung kation Na^+ , Ca^{2+} , atau K^+ dapat larut dalam air panas maupun dingin dan membentuk larutan stabil. Kation, pelarut ataupun polimer lain akan memengaruhi kelarutan, viskositas, gelasi, ataupun pengendapan alginat. Kation/senyawa tersebut akan berkompetisi dengan gugus hidroksil dari air. Kation sangat kuat mengikat air karena kandungan karboksilatnya. Larutan alginat mengental, dengan kata lain memperoleh viskositasnya.

Viskositas larutan alginat dapat menurun maupun meningkat yang disebabkan oleh berbagai faktor. Viskositas alginat dipengaruhi oleh konsentrasi, bobot molekul, suhu, pH, dan keberadaan garam. Semakin tinggi konsentrasi atau bobot molekul, maka semakin tinggi viskositasnya. Sebagaimana larutan polisakarida lainnya, dengan adanya peningkatan suhu, maka terjadi penurunan pada viskositas larutan alginat. Viskositas akan meningkat kembali pada pengembalian suhu larutan alginat semula (McHugh DJ, 1987). Selain itu, viskositas alginat sangat bergantung pada susunan molekul manuronat dan guluronat. Semakin banyak jumlah molekul unit M di dalam alginat, maka semakin rendah viskositasnya, dan semakin tinggi jumlah molekul unit G semakin tinggi viskositas alginat (Saphiro L, Cohne S, 1999).

Pada studi Yulianto K (2007), dalam mengekstraksi alginat *S. duplicatum* dengan konsentrasi larutan NaOH yang berbeda-beda, yaitu 2%, 5%, dan 10%, ditunjukkan adanya penurunan viskositas secara berurutan, 13.558 cPs, 5.262 cPs, dan 3.756 cPs. Viskositas menurun karena masih terdapatnya zat pengotor di dalam produk yang dapat mempercepat proses depolimerisasi senyawa alginat (Shjak-Break et al., 1989). Penggunaan alkalin pada proses ekstraksi juga dapat menurunkan viskositas alginat (Vauchel P, et al., 2008). Disamping faktor pH atau suhu, viskositas alginat juga dipengaruhi oleh adanya ion metal. Pada penyimpanan, alginat mudah terkontaminasi oleh mikrobial, yang juga dapat berpengaruh pada viskositas larutan. Di sisi lain, peningkatan viskositas sukar diduga penyebabnya, kecuali karena adanya ion divalent atau panjangnya rantai molekul alginat, yaitu jumlah unit monomer.

Alginat hasil ekstraksi dari *S. duplicatum* menunjukkan spektra FTIR seperti pada Gambar 2.15



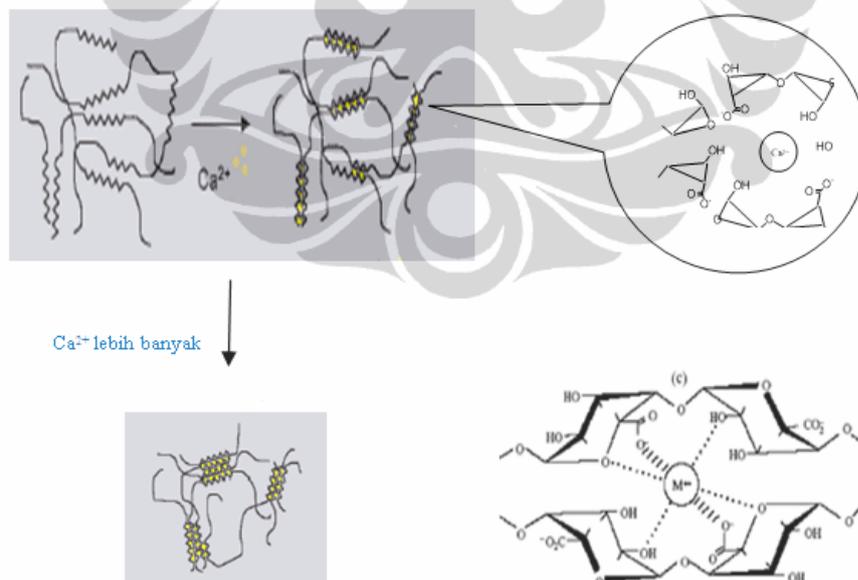
Gambar 2.15 Spektra FTIR dari alginat *S. duplicatum* yang diperoleh dari alga di perairan Banten-Indonesia (Yulianto K, 2007)

Menurut standar Sigma (Sigma-Aldrich, 2004), nilai viskositas dibagi dalam tiga tingkatan, yaitu tingkatan tertinggi sebesar 14.000 cP, tingkatan sedang 3.500 cP, dan tingkatan rendah 250 cP yang diukur pada suhu 25°C dengan konsentrasi larutan 2% (b/v).

Pada penambahan metal divalen, alginat dapat bertransformasi melalui reaksi pertukaran ion yang terlihat dari perubahan sol menjadi gel. Kation bergabung dengan gugus karboksil pada alginat membentuk garam yang tidak larut



Pada penambahan kation divalent tunggal, terjadi penggantian dua ion Na^+ dari alginat. Struktur heliks pada unit G menjadi lebih rapat dan terkunci. Kation divalent berada di antaranya dengan ikatan ion (Gambar 2.16). Selama proses ini, air keluar dari celah molekul-molekul alginat hidrogel (gel). Penambahan kation ini menghasilkan perubahan signifikan terhadap properti alginat, menjadikan alginat sebagai material fungsional. Gel alginat banyak dimanfaatkan dalam bidang industri makanan, kosmetik, biomedis, dan akhir-akhir ini banyak dikembangkan untuk aplikasi bidang rekayasa jaringan.



Gambar 2.16. Model transisi sol-gel: (a) kation divalen menggantikan satu pasang ion Na^+ membentuk struktur “egg box junction” melalui (b) ikatan dengan kation divalent (Fang Y, 2007).

2.4.2.3 Alginat sebagai Scaffold

Rekayasa jaringan banyak dilakukan pada *scaffold* alginat karena sifat biodegradasinya yang tinggi. Konstrak dapat berbentuk *bulk*, yaitu tanpa poros (Kuo CK, Ma PX, 2001). Kuo CK, Ma PX (2001) mempreparasi *scaffold* hidrogel alginat dalam berbagai bentuk. Namun, *scaffold* hidrogel tanpa pori kurang disenangi karena tidak memungkinkan pertumbuhan sel secara 3D serta vaskularisasinya yang diperlukan sebagai fasilitas untuk nutrien jaringan. Namun, *scaffold* dari biomaterial ini mudah berdegradasi sehingga memiliki kekuatan mekanik rendah, serta tidak dapat mempertahankan bentuk.

Scaffold alginat dapat pula diperoleh dalam bentuk poros melalui berbagai metode. Metode *particulate leaching* dihasilkan dari penggunaan *porogen*, seperti partikel-partikel garam atau butiran parafin (Mikos AG et al., 1994). Namun, metode ini kurang sesuai untuk digunakan pada *scaffold* dengan solven organik. *Scaffold* poros juga dapat dipreparasi dengan metode *gas foaming*, melibatkan saturasi campuran polimer dengan gas pada temperatur dan tekanan tinggi sehingga menghasilkan ukuran pori 20-300 μm (Mohan N, Nair PD, 2005; Mooney DJ, et al., 1996). Porositas yang hasilkan mendekati 100% justru akan menurunkan kekuatan mekanik. *Scaffold* alginat poros dengan struktur pori anisotropik dengan gelasi ionotropik, yang telah dikenal sejak 30 tahun yang lalu (Despang F, et al., 2005; Dittrich R, et al., 2006; Dittrich R, et al., 2007).

Scaffold poros dengan metode pengeringan *freeze-drying* (pengeringan beku) diinisiasi oleh Shapiro L, Cohen S (1997). Preparasi *scaffold* poros dengan menggunakan metode *freeze-drying* ini melibatkan tiga tahap, yaitu gelasi, pembekuan, dan pengeringan. Pada tahap gelasi, terjadi *crosslink* pada alginat dengan menggunakan sumber kation divalen, khususnya Ca. Proses gelasi alginat dengan menggunakan CaCl_2 dapat memberikan gradien konsentrasi polimer di dalam, sedangkan dengan menggunakan *D-Glucono- δ -Lactone* (GDL) gelasi dapat terjadi dengan lebih merata (Kuo CK dan Ma PX, 2001).

Dijelaskan bahwa *scaffold* poros alginat terdiri dari fasa *polymer-rich* and *polymer-poor*. Pada proses pembekuan sampel *scaffold* alginat/HA750°C sampai

dengan suhu -40°C , pelarut air mengalami *supercool* jauh di bawah titik beku dan membentuk kristal es. Selanjutnya, pada saat pengeringan beku fasa *polymer-poor* yang pada dasarnya merupakan pelarut-air mengalami sublimasi sehingga meninggalkan poros pada sampel *scaffold*. Pada saat yang sama, fasa *polymer-rich*, yang mengandung larutan polimer alginat, membentuk dinding-dinding *scaffold* poros. Keuntungan menggunakan metode *freeze-dry* pada penelitian ini adalah hanya menggunakan pelarut air yang tidak mengkhawatirkan sebagaimana jika menggunakan pelarut organik yang dapat memengaruhi sampel *scaffold*. Selain itu, metode pengeringan beku dapat menghasilkan poros tanpa memerlukan aplikasi suhu tinggi, seperti pada metode *solven-casting* ataupun *particulate leaching*.

Integritas struktur alginat bergantung pada ikatan silangnya, yaitu ikatan kimia dan ikatan fisik. Ikatan silang ini dapat terlepas dengan larutnya kation divalen di dalam air. Hal inilah yang menyebabkan degradasi *scaffold*. Sebagai akibatnya, *scaffold* alginat sering menunjukkan modulus kompresi menurun setelah perendaman di dalam larutan medium kultur (inkubasi). *Scaffold* yang disemai dengan sel punca manusia terlihat menurun elastik modulusnya pada inkubasi hari ke-14 (Awad et al.). Untuk aplikasi rekayasa jaringan, sifat-sifat tersebut membatasi aplikasinya. Oleh karena itu, *scaffold* alginat hanya digunakan untuk aplikasi jaringan lunak. Kultur fibroblas pada *scaffold* alginat memperlihatkan sel fibroblast tetap sferikal pada seluruh permukaan kultur sekali pun waktu kultur lebih lama (Mohan N dan Nair PD, 2005; Shapira L dan Cohen S, 1995).

Dengan keterbatasan sifat-sifatnya, alginat kurang sesuai untuk diaplikasikan pada jaringan keras, seperti tulang rahang. Modulus elastik tinggi dan biodegradasi rendah merupakan hal penting untuk penggabungan alginat dengan material penguat membentuk suatu komposit.

2.4.3 Scaffold Komposit Alginat/Hidroksiapatit

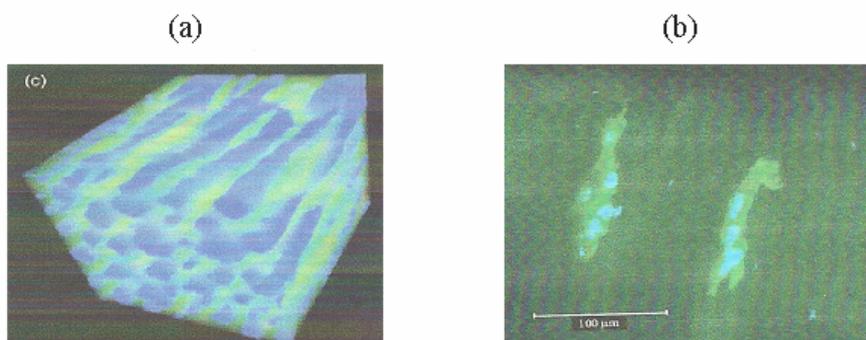
Scaffold komposit alginat/HA banyak mengacu pada konsep *scaffold* dari studi Shapiro L, Cohen S (1997), yaitu dengan menggunakan metode *phase*

separation. Pada studi Bernhardt et al. (2009), dengan metode *phase separation* yang didahului dengan *diffusion-controlled ionotropic gelation* pada alginat, menghasilkan *scaffold* alginat/HA poros paralel (Gambar 2.17).

Scaffold rekayasa jaringan bersifat sementara, oleh karena itu, ia harus memiliki kemampuan degradasi. Pada *scaffold* berbasis alginat dengan inkorporasi HA sebagai penguat, ditunjukkan bahwa degradasi *scaffold* makin besar seiring semakin kecilnya rasio HA. Hal ini ditunjukkan dengan berkurangnya berat *scaffold* tersebut sampai hari ke-21 (Marra KG, et al., 1999; Turco G, et al., 2009; Teixeira S, et al., 2008; Lin H-R, Yeh Y-J, 2004). Degradasi juga dapat terlihat dengan terdeteksinya ion-ion kalsium dan fosfor setelah dilakukan perendaman sampel. Degradasi pada *scaffold* alginat/HA terjadi pada material HA ataupun alginat.

2.4.4 Kultur Sel pada *Scaffold* Komposit Alginat/Hidroksiapatit

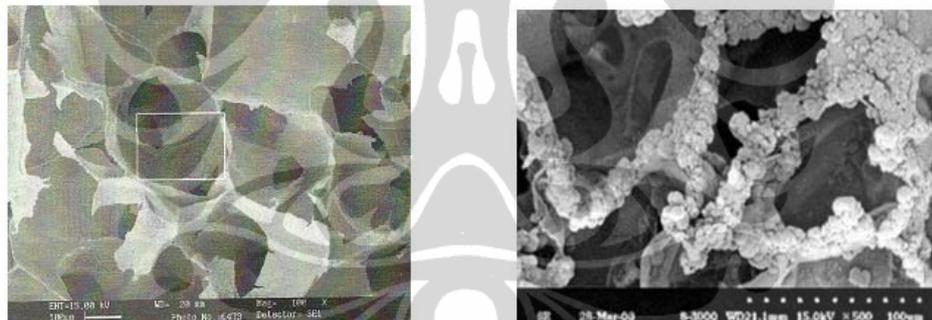
Pada studi Bernhardt, et al. (2008) *scaffold* alginat/HA disemai dengan BMSC serta diinduksi medium osteogenik. Setelah dilakukan kultur selama 21 hari terlihat adanya pertumbuhan yang ditandai dengan peningkatan ALP dan kandungan DNA yang menandakan bahwa *bone marrow stromal cells* telah berdiferensiasi menjadi osteoblas. Dari pengamatan dengan CLSM terlihat adanya sel di dalam poros paralel dari *scaffold* (Gambar 2.17). Namun, pertumbuhan osteoblas tampak sejajar dan tidak saling berhubungan.



Gambar 2.17. *Scaffold* alginat/HA dengan (a) poros paralel dan (b) pertumbuhan sel punca mesenkimal di dalam dengan poros paralel (Bernhardt, et al., 2008)

Scaffold dengan poros paralel demikian kurang efektif sebagai *template* pertumbuhan sel. Walaupun menunjukkan adanya pertumbuhan sel, *scaffold* paralel ini kurang disukai karena kurang dapat mengakomodasi sel dan vaskularisasi secara 3D.

Scaffold poros saling berhubungan dipelajari pada studi Lin H-R dan Yeh Y-J (2004) serta pada studi Turco G, et al. (2009). Kultur osteoblas pada *scaffold* komposit alginat/HA telah menunjukkan pertumbuhan jaringan. Proliferasi dari osteosarkoma mencit pada studi Turco G, et al. (2009) memperlihatkan pertumbuhan sel ke segala arah setelah dilakukan kultur sampai hari ke-21, sedangkan kultur sel osteosarkoma manusia pada studi Lin H-R dan Yeh Y-J (2004) sampai hari kelima menunjukkan terdapatnya pertumbuhan sel pada dinding-dinding *scaffold* (Gambar 2.18). Pada kedua studi terlihat sel berbentuk sferikal dan bergerombol.



Gambar 2.18. *Scaffold* alginat/HA dengan (a) poros saling berhubungan. Terlihat pertumbuhan sel pada dinding *scaffold* (Lin H-R, Yeh Y-J2004)

Lin H-R dan Yeh Y-J (2004) melakukan pengamatan suhu pembekuan terhadap ukuran poros *scaffold*. Dari pengamatan tersebut, ditemukan bahwa penggunaan nitrogen cair menghasilkan diameter poros $\pm 10 \mu\text{m}$, sedangkan dengan menggunakan suhu pembekuan -40°C , diameter poros yang dihasilkan adalah $\pm 150 \mu\text{m}$. Pengamatan efek rasio alginat/HA terhadap kekuatan kompresi ditunjukkan dari seri rasio alginat/HA 100/0, 72/25, dan 50/50 yang menunjukkan peningkatan kekuatan kompresi karena adanya penguatan matriks polimer oleh

peningkatan kandungan HA. Namun, penambahan HA sampai dengan 75% untuk meniru komposisi tulang menghasilkan properti mekanik yang bervariasi (Lin H-R, Yeh Y-J, 2004). Semakin tinggi kandungan HA pada studi ini juga menunjukkan menurunnya degradasi *scaffold*, tetapi dapat meningkatkan pertumbuhan osteoblas

Turco G, et al. (2009) menginvestigasi ukuran poros dan kekuatan kompresi dari *scaffold* dengan menggunakan kandungan HA yang lebih rendah daripada yang dipreparasi pada studi Lin H-R, Yeh Y-J, (2004) serta gelifikasi *crosslink* GDL. Pada penggunaan suhu antara 20°C sampai -20°C dengan laju penurunan suhu 5°C dengan interval 30 menit menghasilkan diameter poros 100-300 µm. Kekuatan kompresi yang ditunjukkan dari *scaffold* ini adalah 6,3 Mpa.

Kerangka Teori

Dari teori di atas dapat dirangkum sebagai berikut :

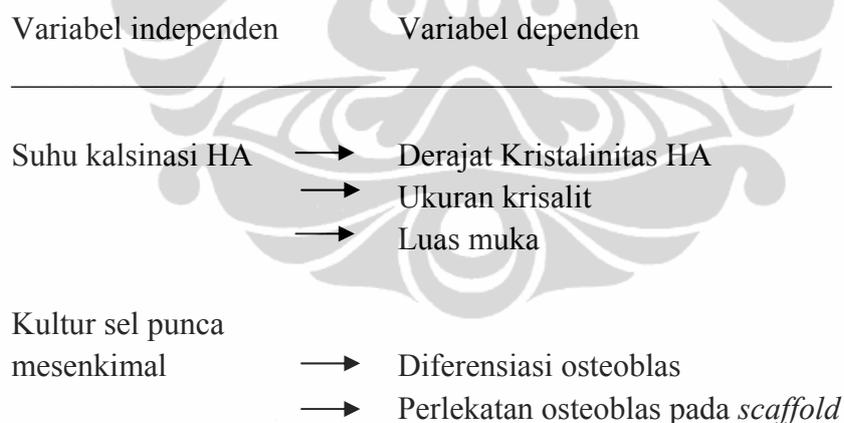
Rekayasa jaringan dengan menggunakan *scaffold* untuk pertumbuhan sel

<i>Scaffold</i>	Sel	F. Pertumbuhan
Macam material :	<u>Sel punca</u>	BMP
Alginat	osteoblas	
Hidroksiapatit	kondroblas	
<u>Komposit alginat/HA</u>	lipoblas	
Persyaratan :		
Poros		
Kekuatan Mekanik		
Degradasi		
<u>Usaha meningkatkan degradabilitas</u>		
Bifasa		
Komposit biopolimer / HA		
Pengaruh suhu sinter HA		

Sebagaimana telah diuraikan bahwa faktor-faktor dalam rekayasa jaringan adalah sel dan *scaffold*, serta faktor pertumbuhan. Untuk rekayasa jaringan tulang, material yang sering digunakan adalah hidroksiapatit atau yang dimodifikasi dalam bentuk struktur bifasa ataupun struktur komposit. Pada rekayasa jaringan diperlukan sel yang pluripoten, yaitu berasal dari sel punca mesenkimal dan dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas, kondroblas, dan adiposit. Dengan penyemaian sel ke dalam *scaffold*, maka keduanya harus biokompatibel. Untuk itu terdapat persyaratan *scaffold* yang merupakan kebutuhan sel. Persyaratan utama *scaffold* adalah poros dan degradabel.

Kerangka Konsep

Dari kerangka teori di atas, kerangka konsep penelitian ini adalah ;



Variabel independen yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu kalsinasi HA dan pengamatan yang dilakukan pada derajat kristalinitas HA, ukuran kristalit HA, dan luas muka HA. Variabel independen lain adalah kultur sel punca mesenkimal dan bentuk pengamatannya adalah diferensiasi osteoblas dan perlekatan osteoblas pada *scaffold*.

Bab 3

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan eksperimen laboratorik

Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional Variabel

1. Suhu kalsinasi HA adalah panas yang digunakan untuk meningkatkan suhu HA dengan menggunakan oven khusus dan dilakukan dalam waktu yang ditentukan; satuannya adalah °C dan skalanya adalah nominal
2. Derajat kristalinitas HA adalah tingkat kekristalan HA yang diperoleh dengan penghitungan data yang bersumber dari karakterisasi XRD; satuannya adalah % dan skalanya adalah nominal
3. Kultur sel punca mesenkimal adalah sebuah proses yang dimulai dari penyemaian sel tersebut pada *scaffold* dan diinkubasi selama lima minggu. Pengukurannya dilakukan dengan menggunakan substrat ALP; satuannya adalah IU/L dan skalanya adalah nominal
4. Diferensiasi osteoblas adalah perubahan sel punca mesenkimal menjadi osteoblas setelah diinkubasi selama lima minggu yang pengamatannya dilakukan dengan menggunakan SEM

3.2 Material Penelitian

Material dan sel yang digunakan dalam penelitian ini adalah alginat, HA, dan sel punca mesenkimal tulang. Alginat bersumber dari dua jenis alga, yaitu *Sargassum duplicatum* (*S. duplicatum*; Lampiran 1a) dan alga *Sargassum crassifolium* (*S. crassifolium*; Lampiran 1b) yang keduanya diperoleh dari Puslit Bioteknologi, Kementerian Kelautan dan Perikanan RI, Jakarta. HA bersumber

dari material prekursor kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) dan asam (orto) fosfat (H_3PO_4) kemurnian 96% (Merck®). Material yang diperoleh secara komersial, yaitu *alginate sodium salt from brown algae* dan *hydroxyapatite pro tissue culture*, diperoleh dari PT Sigma-Aldrich® (Lampiran 2).

Sel punca mesenkimal (Lampiran 3) diperoleh dari hasil studi Dr. dr. Ismail, Sp OT. Sel diisolasi dari tulang medula femur manusia di RSCM, Jakarta. Selanjutnya, sel diproses di Laboratorium Regenic dan disimpan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute, PT Bifarma, Jakarta, sampai saat penggunaan.

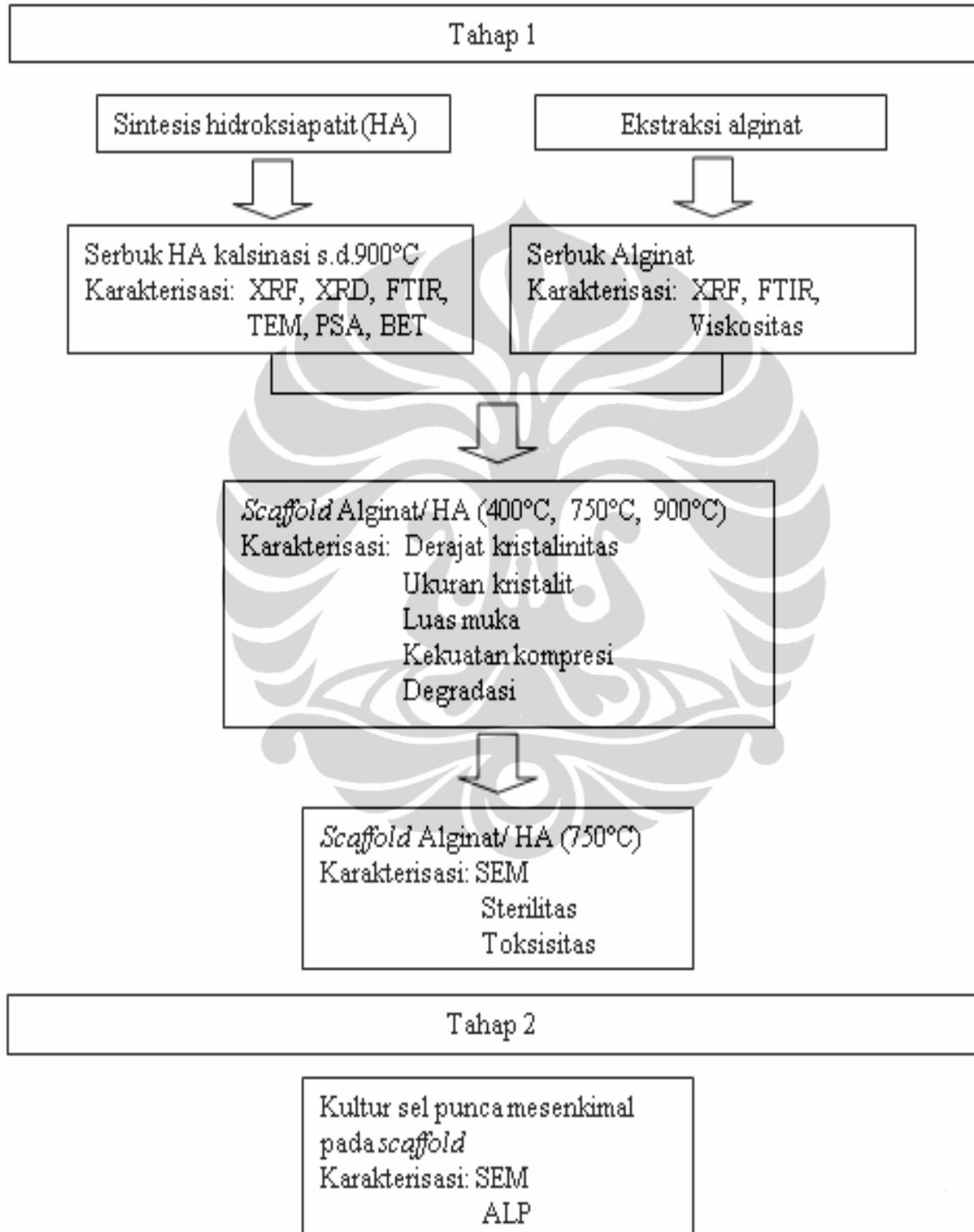
Reagen-reagen dan substrat yang digunakan untuk kultur sel adalah *Low glucose Dulbecco's modified eagles medium* (DMEM; Gibco, Grand Island, New York), *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Phosphate Bovine Serum* (PBS), *trypsin 0.25%-EDTA* (Gibco, Grand Island, New York), *Penisilin-Streptomisin*, *Gentamisin*, *D-glucose*, *L-glutamin*, *sodium piruvat*, *glycerophosphate*, *Alizarin Red*, *MTS Assay* (CellTiter®, Promega, USA), dan *ALP buffer*.

Sampel berupa serbuk alginat hasil ekstraksi, serbuk HA hasil sintesis pada suatu rentang suhu, *scaffold* komposit alginat/HA 3D, dan *scaffold* komposit alginat/HA 3D yang telah dikultur dengan sel punca mesenkimal tulang. Sampel yang digunakan sebagai pembanding dipersiapkan dari material-material yang diperoleh secara komersial.

3.3 Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dengan mengikuti diagram alir di bawah ini. Penelitian dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama adalah perolehan *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA dan alginat *S. crassifolium*/HA. Pada tahap ini, dilakukan ekstraksi alginat dari dua jenis alginat dan dilakukan pula sintesis serbuk HA dari material prekursor yang kemudian dikalsinasi sampai dengan suhu 900°C. Karakterisasi terhadap serbuk alginat dilakukan dengan menggunakan XRF, FTIR, dan uji viskositas, sedangkan terhadap serbuk HA dilakukan dengan menggunakan TEM, XRF, XRD, BET, dan FTIR. Berdasarkan hasil karakterisasi, dipilih HA yang digunakan untuk mempersiapkan *scaffold* komposit alginat/HA.

Diagram Alir



Karakterisasi terhadap *scaffold* komposit alginat/HA dilakukan dengan menggunakan SEM, uji kekuatan kompresi, dan uji degradasi. Berdasarkan hasil karakterisasi ini, dipilih *scaffold* komposit alginat/HA yang digunakan untuk kultur sel punca mesenkimal pada tahap kedua. Hasil karakterisasi yang diperoleh dari tahap pertama dibandingkan dengan hasil karakterisasi yang diperoleh dari alginat ex-Sigma dan HA ex-Aldrich.

Pada tahap kedua, dilakukan kultur sel punca mesenkimal pada *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA dan alginat *S. crassifolium*/HA yang diperoleh pada tahap pertama. Sebelumnya, dilakukan sterilitas dan uji toksisitas terhadap *scaffold* komposit alginat/HA serta identifikasi osteoblas. Hasil kultur sel pada *scaffold* komposit alginat/HA dikarakterisasi dengan menggunakan SEM dan aktivitas ALP. Sebagai pembanding, dilakukan kultur sel punca mesenkimal pada *scaffold* ex-Sigma/Aldrich. Hasil karakterisasi yang diperoleh dari tahap kedua dibandingkan dengan hasil karakterisasi dari *scaffold* komposit alginat/HA ex-Sigma/Aldrich.

Diagram alir, material, dan prosedur penelitian dijelaskan secara detil di bawah ini.

3.3.1 Ekstraksi Alginat

Ekstraksi alginat *S. duplicatum* dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Bioteknologi, Kementerian Kelautan dan Perikanan RI, sedangkan ekstraksi alginat *S. crassifolium* dilakukan di Pusat Penelitian Rekayasa BATAN, Jakarta. Kedua proses ekstraksi dilakukan dengan prinsip kerja yang sama, yaitu sebagai berikut:

1. Persiapan.

Bahan baku alga coklat *S. duplicatum* dipersiapkan dengan dibersihkan dari kotoran seperti pasir, garam, tanah, kulit kerang, dan sebagainya dengan air dan NaOH, lalu dijemur di bawah terik matahari (± 3 hari). Alga kering direndam dalam air sampai mengembang (± 1 jam), direndam di dalam larutan HCl 0,3% (± 1 jam), dan dibilas air. Tahap ekstraksi

dilakukan dengan merendam bahan di dalam larutan Na_2CO_3 , dengan pemanasan selama 2 jam.

2. Pemisahan filtrat.

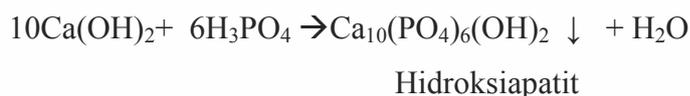
Pemisahan filtrat dari limbah dilakukan dengan penyaringan dan *vibrating screen*. Terhadap filtrat hasil penyaringan dilakukan pengasaman dengan penambahan larutan HCl 10% (sampai pH=3) sambil diaduk secara perlahan sampai terbentuk asam alginat (serat) yang berupa busa kental dan terapung ke permukaan. Busa diambil dan dipisahkan dengan penyerokan, kemudian dicuci di atas *filter screen* dengan aliran air kecil untuk mengurangi asam (pH=7), dan dimasukkan ke dalam wadah saringan. Selanjutnya, ditambahkan NaOH 10% dan diaduk dengan *hand mixer*.

3. Pemurnian.

Pemurnian dilakukan dengan penambahan IPA, diperas, dan dibiarkan selama satu malam sebelum diangkat dari larutannya. Padatan alginat yang diperoleh dikeringkan dengan penjemuran di bawah terik matahari. Setelah serat alginat kering diperoleh, dilakukan pengilingan sampai memperoleh serbuk halus yang disebut serbuk alginat *S. duplicatum* dan alginat *S. crassifolium*.

3.3.2 Sintesis Hidroksiapatit

Sintesis HA dilakukan dengan menggunakan metode presipitasi, mengikuti cara yang dilakukan pada studi-studi sebelumnya (Yoruc ABH, Koca Yeliz, 2009; Vazquez CG, Barba CP, Munguia N, 2005). Pencampuran serbuk $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dan cairan H_3PO_4 dengan perbandingan mol sebesar 10:6, didasarkan pada persamaan reaksi



Serbuk $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dilarutkan di dalam 100 ml akuademineral dengan menggunakan *magnetic stirrer* (pengaduk magnetik; Heidolph MR 3001, Germany) pada kecepatan ± 900 rpm pada suhu kamar selama satu jam. Larutan

H₃PO₄ diteteskan ke dalam suspensi Ca(OH)₂, yang dihabiskan dalam waktu satu jam, dengan pengadukan sampai 24 jam. Pada akhir pengadukan, dilakukan kontrol pH dengan penambahan larutan H₃PO₄ sampai diperoleh pH=7. Setelah dilakukan *ageing* (penuaan) selama 24 jam, larutan HA dibuang dan presipitat basah yang terbentuk di dasar gelas *beaker* disaring dengan kertas hisap yang diletakkan pada corong Büchner selama 12 jam. Padatan (serbuk) HA yang diperoleh dicuci dengan akuademineral dan dilanjutkan dengan pengeringan kembali pada suhu kamar selama 12 jam, dan dilanjutkan dengan pengeringan di dalam oven 100°C selama 12 jam. Serbuk HA diperoleh dikalsinasi dengan suhu rentang 100°-900°C dengan laju pemanasan 5°C/menit selama 3 jam.

3.3.3 Preparasi *Scaffold* Komposit Alginat/HA

Preparasi *scaffold* alginat/HA yang dilakukan dengan menggunakan metode *phase separation*, mengikuti cara yang dilakukan pada studi sebelumnya (Lin H-R, Yeh Y-J, 2005). *Scaffold* komposit alginat/HA dipreparasi dengan mencampur serbuk alginat 3% ke dalam larutan HA dengan rasio 50/50. Pencampuran dilakukan dengan menggunakan pemutar magnetik kecepatan 900 rpm pada suhu kamar dan dihomogenisasi kecepatan putar 7.000 rpm selama 30 menit dengan menggunakan *homogenizer* (Ultra Turrax, Jepang), di Laboratorium Advanced Materials Processing, Program Studi Teknik Fisika FTI-ITB, Bandung. Selanjutnya, larutan *crosslink* CaCl₂ 0,03M ditambahkan ke dalam campuran alginat/HA dan larutan dihomogenisasi kembali. Gel alginat yang terbentuk dicetak di dalam plat kultur 24-well (Ø=16 mm, tinggi=5 mm) dan didiamkan selama satu jam (agar terjadi polimerisasi sempurna). Pembekuan (*quenching*) gel alginat/HA dilakukan pada suhu -40°C selama 24 jam dan dilanjutkan dengan pengeringan beku pada tekanan 0.1–0.2 torr dan suhu -40°C dengan menggunakan pengering beku (Biotron CleanVac[®], Korea) di Laboratorium Terpadu, Fakultas Sains Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta. Jenis sampel *scaffold* yang dipreparasi adalah *scaffold* komposit alginat/HA, yaitu *S. duplicatum*/HA400°C, *S. duplicatum* /HA750°C, *S. duplicatum*/HA900°C, *S. crassifolium*/HA400°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan *scaffold S. crassifolium*/HA900°C.

3.3.4 Karakterisasi *Transmission Electrone Microscope* (TEM)

Karakterisasi dengan menggunakan TEM dilakukan untuk mengamati struktur mikro bagian dalam dari sampel-sampel serbuk HA900°C. Karakterisasi dilakukan dengan menggunakan instrumen TEM (EMAC) di UGM. Karakterisasi ini dilakukan terhadap sampel-sampel serbuk HA900°C dan ex-Aldrich

3.3.5 Karakterisasi *X-ray Fluorescence* (XRF)

Karakterisasi dengan menggunakan XRF dilakukan untuk menganalisis unsur yang terkandung di dalam sampel. Sampel serbuk yang dilekatkan pada pemegang yang terbuat dari potongan paralon PVC dengan diameter dalam $\pm 2,5$ cm dan tebal 0,5 mm. Pengujian dilakukan dengan menggunakan spektrometer sinar-X (JEOL JSX-3211, Japan) di Program Studi Ilmu Material, FMIPA UI. Karakterisasi ini dilakukan terhadap sampel-sampel serbuk alginat (*S. duplicatum*, *S. Crassifolium* dan ex-Sigma) serta serbuk HA (dengan 900°C dan ex-Aldrich)

3.3.6 Karakterisasi *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR)

Karakterisasi dengan menggunakan FTIR dilakukan untuk mengetahui gugus fungsi yang terkandung di dalam sampel. Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer FTIR (Spectrum One, Perkin Elmer, AS) di Laboratorium Terpadu, Fakultas Sains Teknologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta. Sampel serbuk (± 2 mg) dicampur dengan KBr (± 250 mg) menjadi bentuk pelet. Sampel di-scan dengan jangkauan energi inframerah dalam pengukuran bilangan gelombang antara 4000-450 cm^{-1} (pada spektroskopi sinar merah, energi gelombang elektromagnetik dinyatakan dalam bilangan gelombang). Karakterisasi ini dilakukan terhadap sampel-sampel serbuk alginat (*S. duplicatum*, *S. Crassifolium* dan kontrol), serbuk HA (dengan 400°C, 750°C, 900°C dan kontrol), dan *scaffold* komposit alginat/HA (*S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C dan kontrol).

3.3.7 Karakterisasi X-ray Diffraction (XRD)

Karakterisasi dengan menggunakan XRD dilakukan untuk identifikasi fasa, struktur kristal, derajat kristalinitas, dan ukuran kristalit dari sampel. Sampel serbuk dipreparasi pada sebuah pemegang sampel yang terbuat dari potongan paralon PVC dengan diameter dalam $\pm 2,5$ cm dan tebal 0,5 mm. Serbuk di dalam *sample holder* dikompaksi dengan tekanan ± 200 kgf/cm². Pengujian dilakukan dengan menggunakan spektrometer sinar X (Phillips PW-2213/20) di BATAN, Tangerang. Sinar X Cu-K α dengan panjang gelombang 1.5404Å diproduksi dengan kondisi 40 kV dan 30 mA. Sampel dipersiapkan dalam bentuk pelet dan kemudian di-*scan* antara 20°C and 100°C dengan kenaikan suhu 0.02°/0.6 *sec*. Identifikasi fasa HA dilakukan dengan merujuk pada *database Powder Diffraction File* (PDF) yang diperoleh dari ICDD (*International Committee Diffraction Data*). Analisis struktur kristal dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak GSAS (*General Structure Analysis System*) dan metode analisis Rietveld. Identifikasi fasa dilakukan terhadap sampel-sampel serbuk HA dengan rentang suhu 100°C - 900°C.

Ukuran kristalit (D) dihitung dengan menggunakan *XRD line-broadening measurement* dan dihitung dengan persamaan Scherrer (Azaroff 1968)

$$D = (0,89 \lambda) / \beta \cos \theta$$

Dimana λ adalah panjang gelombang (CuK α = 1,5405), β adalah *full width at half maximum*, dan θ adalah sudut XRD.

Derajat kristalinitas dihitung dengan menggunakan program perangkat lunak IGOR Pro (Jepang). Pertama-tama dilakukan *fitting* puncak-puncak kristal yang muncul, kemudian diambil luasan areanya. Selanjutnya, dilakukan *fitting background profile* amorfnya dan dihitung luasannya. Derajat kristalinitas adalah luasan puncak kristalin dibagi dengan luasan total kristalin dan amorf. Penghitungan ukuran kristalit dan derajat kristalinitas dilakukan pada serbuk HA (dengan 400°C, 750°C, 900°C dan ex-Aldrich).

3.3.8 Karakterisasi Distribusi Ukuran Partikel

Karakterisasi dengan menggunakan PSA dilakukan untuk mengetahui distribusi ukuran partikel dari sampel. Larutan sampel dengan konsentrasi sangat rendah dimasukkan ke dalam botol yang disediakan pada instrumen uji. Pengukuran distribusi ukuran partikel ini dilakukan dengan cara fotoanalisis dan diolah dengan program yang tersedia pada instrumen *particle size analyzer* (Beckman Coulter) di LIPI, Jakarta. Karakterisasi ini dilakukan terhadap sampel-sampel HA400°C, HA 750°C, HA 900°C dan ex-Aldrich

3.3.9 Karakterisasi Luas Muka

Karakterisasi dengan menggunakan metode BET (Brunau, Teller dan Emmett) dilakukan untuk menghitung luas permukaan spesifik dari sampel. Prosedur dilakukan dengan eksperimen adsorpsi gas volumetrik yang ditampilkan dengan menggunakan *Surface Area Analyzer System* (Sorptic 1800 Carlo Erba Instruments) di BATAN, Tangerang. Plot yang diperoleh digunakan untuk menghitung area permukaan spesifik dengan menggunakan teori BET. Karakterisasi ini dilakukan terhadap sampel-sampel serbuk HA400°C, HA 750°C, HA 900°C, dan ex-Aldrich.

3.3.10 Uji Viskositas

Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan viskometer (Viskonic EMD-R, Keikico, Tokyo), di BATAN, Jakarta. Larutan standar NaCl 0,1 M (1,471 g NaCl dalam 250 g H₂O) dipersiapkan untuk melarutkan alginat 0,1%-0,4% dan dibiarkan selama 24 jam. Larutan alginat (10 ml) dipindahkan pada bejana Oswald (Oswald, Cannon 150, P863) dan diukur waktu alirnya. Viskositas Jenis dan Viskositas Intrinsik dihitung dengan menggunakan rumus:

Viskositas Jenis (η_{sp})

$$\eta_{sp} = \frac{t_2 - t_1}{t_1}$$

dimana t_1 = waktu alir standar (detik)

t_2 = waktu alir alginat

Viskositas Intrinsik (η)

$$\eta = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

dimana η_{sp} = viskositas jenis
 C = konsentrasi larutan

Pengukuran viskositas dilakukan terhadap larutan alginat *S. Duplicatum* dan *S. crassifolium* konsentrasi 1% - 3% (w/v) pada suhu ruang.

3.3.11 Uji Kekuatan Kompresi

Uji kekuatan kompresi dilakukan untuk mengamati kemampuan sampel. Sampel diberi gaya kompresi sampai mencapai 50% strain. Sampel yang dipilih adalah yang memiliki $\varnothing = (15 \pm 0,5)$ mm dan tinggi = $(5 \pm 0,5)$ mm. Uji kompresi dilakukan dengan menggunakan *probe* berbentuk silinder ($\varnothing = 20$ mm) pada instrumen uji *stable micro system* (Texture Analyzer TA-XT2i, Korea) dengan *load cell* 250N dan kecepatan deformasi 0,1 mm/sekon, di Laboratorium Rekayasa Proses Pangan-Fateta, IPB. Kekuatan kompresi merupakan gaya per luas sampel yang menghadap indenter dengan kecepatan 3 mm/menit. Karakterisasi ini dilakukan terhadap sampel *scaffold* komposit alginat/HA (*S. duplicatum*/HA400°C, *S. duplicatum* /HA750°C, *S. duplicatum* /HA900°C, *S. crassifolium*/HA400°C, *S. crassifolium*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA900°C dan ex-Sigma/Aldrich).

3.3.12 Uji Degradasi

Uji degradasi dilakukan untuk mengobservasi kehilangan berat sampel sebelum dan sesudah dilakukan perendaman di dalam larutan fisiologis Ringer (NaCl 8.6g/L, KCl 0.3g/L, CaCl₂ 0.33g/L) pada inkubator (37C, 5% CO₂, kelembaban 99%) dengan penggantian larutan setiap 2-3 hari. Setelah lima minggu sampel dikeringkan dengan *freeze-dryer* (Biotron CleanVac[®], Korea) di Laboratorium Terpadu, Fakultas Sains Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta. Berat awal dan akhir sampel diukur dengan menggunakan alat ukur berat digital yang memiliki ketelitian 10⁻⁴. Nilai degradasi merupakan persentase selisih

antara berat awal dan berat akhir sampel per berat awalnya. Karakterisasi ini dilakukan terhadap sampel *scaffold* komposit alginat/HA (*S. duplicatum*/HA400°C, *S. duplicatum* /HA750°C, *S. duplicatum* /HA900°C, *S. crassifolium*/HA400°C, *S. crassifolium*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA900°C dan ex-Sigma/Aldrich).

3.3.13 Kultur Sel Punca Mesenkimal

Sel punca mesenkimal diambil dari *cryofile*, yang disimpan di dalam *freezer* -80°C, untuk dilakukan penyesuaian suhu ruang dengan teknik *thawing* (di dalam es selama 20 menit). Sel dipindahkan ke dalam tabung 15 mL dan *cell lysis* dilakukan dengan larutan PBS (10 mL) dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm (10 menit). Supernatan dibuang dan endapan di bawah tabung diberi 5 mL medium kultur DMFA, yaitu DMEM 10% dengan suplementasi 10% FBS, 1000 mg/L D-glucose, L-glutamin, dan 110 mg/L sodium piruvat, penisilin-streptomisin, gentamisin, dan fungizone. Setelah dihomogenisasi kembali, suspensi sel punca mesenkimal tulang dibagi secara merata (~ 3 mL) ke dalam *tissue culture flask* (botol kultur) baru dan ditandai tanggal subkultur dan nomor *passage* kulturnya. Karena menggunakan botol kultur 75 cm², jumlah total volume adalah 10-13 mL medium per botol. Hitung sel dilakukan terhadap suspensi sel punca mesenkimal tulang dengan menggunakan hemositometer di bawah mikroskop cahaya inversi dengan pembesaran 40x.

Untuk memperoleh jumlah sel punca mesenkimal tulang akhir yang diperlukan, dilakukan terlebih dahulu subkultur sel untuk mengekspansi sel punca mesenkimal tulang, yaitu dengan cara inkubasi. Suspensi sel punca mesenkimal tulang disimpan di dalam inkubator (37⁰, pCO₂ 5% dan aliran oksigen 20%); sebagai asupan nutrisi yang adekuat untuk sel, dilakukan penggantian medium kultur baru (8-12 mL) setiap 2-3 hari sampai kultur sel mencapai *confluent* (±80% kepadatan). Setelah padat, sel dilepas penempelannya dari dasar botol kultur dengan menggunakan *trypsin* 0.25%-EDTA 1 mMol. Botol kultur diobservasi untuk mengevaluasi adanya penempelan sel-sel yang bernukleus dengan cara *cell*

counting (hitung sel) menggunakan hemositometer di bawah mikroskop optik inversi di Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute, PT Bifarma, Jakarta

Kultur sel punca mesenkimal pada sampel dilakukan di dalam plat kultur 24-well. Sampel steril di dalam 24-well diberi DMFA dan diinkubasi selama 24 jam. Setiap sampel disemai dengan sel punca mesenkimal tulang sebanyak 200 μL suspensi sel (1×10^6 sel/mL) dan kemudian diinkubasi di dalam inkubator (suhu 37°C , pCO_2 5% dan aliran oksigen 20%) dengan penggantian medium DMFA baru setiap 2-3 hari. Kultur sel punca mesenkimal tulang dilakukan pada sampel *scaffold* komposit alginat/HA (*S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich). Kultur sel punca mesenkimal tulang dilakukan di Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute, PT Bifarma, Jakarta

3.3.14 Uji Sterilitas dan Uji Toksisitas

Sebelum uji toksisitas, sampel *scaffold* alginat/HA disterilisasi terlebih dahulu. Proses sterilisasi dilakukan untuk memastikan tidak terdapatnya kontaminasi mikroba dan/atau fungi pada sampel. Sampel disterilisasi dengan direndam di dalam larutan etanol 75% selama 30 menit. Selanjutnya sampel direndam di dalam medium DMFA selama tiga hari. Uji sterilitas dilakukan dengan menggoreskan rendaman medium kultur di atas plat agar darah dengan menggunakan sengkeli steril. Setelah 24 jam, diamati ada/tidaknya penumbuhan mikroba pada plat agar darah. Sampel tidak steril ditandai adanya pertumbuhan mikroba pada bagian goresan sengkeli, sebaliknya sampel steril ditunjukkan dengan terlihatnya goresan bersih. Uji sterilitas dilakukan terhadap sampel *scaffold* komposit alginat/HA (*S. duplicatum* /HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan kontrol)

Uji toksisitas dilakukan untuk mengamati pengaruh sampel terhadap persentase viabilitas sel. Sel punca mesenkimal tulang sebanyak 100 μL (2×10^6 sel/mL) dipreparasi pada plat kultur 96-well dan diinkubasi di dalam inkubator (suhu 37°C , pCO_2 5% dan aliran oksigen 20%) selama 24 jam. Sel punca mesenkimal tulang yang sudah diinkubasi dipaparkan dengan larutan ekstrak

sampel dipersiapkan dari rendaman *scaffold* di dalam DMFA pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Ekstrak *scaffold* disaring dengan filter berukuran 0,2 µm (Corning, German) lalu didilusi dengan konsentrasi 100%, 10%, 0,1%, 0,001%. hMSC (yang telah diinkubasi) dipapar dengan ekstrak *scaffold* (DMFA yang telah didilusi) selama 24 jam. MTS assay sebanyak 15 mL (campuran 1 mL aliquot MTS/PMS dan 5 mL DMEM) diteteskan pada setiap well dan diinkubasi di dalam inkubator (suhu 37°C, pCO₂ 5% dan aliran oksigen 20%). Setelah tiga jam inkubasi, nilai absorbansi dibaca dengan *microplate reader* (ELISA (Elx-800, Bio-Tek Instruments, USA) pada $\lambda = 490$ nm. Nilai OD dipersentasekan terhadap OD kontrol untuk menentukan persentase viabilitas sel. Uji toksisitas dilakukan terhadap sampel-sampel *scaffold* komposit alginat/HA (*S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich). Uji sterilitas dan toksisitas dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Departemen Mikrobiologi FKUI.

3.3.15 Perlekatan Sel pada Scaffold

Pada akhir minggu kelima kultur, sampel *scaffold* yang telah disemai dengan osteoblas dicuci dengan larutan PBS sebanyak tiga kali, difiksasi dengan 50 mL larutan paraformaldehid 3,7%, dan dicuci dengan akuabides. Pengeringan dilakukan secara gradasi berseri dengan menggunakan larutan etanol/akuabides yang dilanjut di dalam lemari asam selama tiga jam. Preparasi sampel untuk karakterisasi dengan menggunakan SEM dilakukan pada sampel *scaffold* komposit alginat/HA (*S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich) di Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute, PT Bifarma, Jakarta, sedangkan karakterisasi dengan menggunakan SEM dilakukan di Program Studi Ilmu Material, FMIPA UI.

3.3.16 Aktivitas Alkaline Phosphatase (ALP)

Identifikasi Osteoblas

Diferensiasi osteoblas dilakukan di dalam cawan kultur sel punca mesenkimal tulang. Kultur diberi medium osteogenik, yang terdiri dari DMFA,

0.1 μ M *dexamethasone*, 50 μ M *ascorbate-2-phosphate*, 10mM β -*glycerophosphate*. Inkubasi di dalam inkubator (suhu37°, pCO₂ 5%, aliran oksigen 20%) dilakukan dengan penggantian medium kultur baru (8-12 mL) setiap dua sampai dengan tiga hari. Diferensiasi sel osteoblas *monolayer* dilakukan dengan pewarnaan *Alizarin Red*. Preparat sel osteoblas *monolayer* dicuci dengan larutan PBS, difiksasi dengan larutan formaldehid 1,5 mL selama 30 menit, dicuci lagi dengan larutan PBS sebanyak tiga kali, diberi larutan *Alizarin Red* 750 μ L, dan dicuci dengan akuabides beberapa kali. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop optik invers di Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute, PT Bifarma, Jakarta.

Pengukuran Aktivitas Alkaline Phosphatase (ALP)

Pengukuran aktivitas ALP dilakukan dengan teknik kolorimetri. Lapis sel punca mesenkim tulang yang telah terbentuk dicuci terlebih dahulu dengan PBS. Suspensi sel sebanyak 100x10³ sel disemai di atas sampel *scaffold*, dikultur di dalam DMFA dan diinkubasi di dalam inkubator (suhu37°, pCO₂ 5%, aliran oksigen 20%). Sampel *scaffold* dikeluarkan dari inkubator, dihancurkan sampai lembut, dicuci dengan larutan 1% w/w TritoneX-100 di dalam PBS (pH 9,8), dan diinkubasi di dalam es selama 50 menit. Selanjutnya disonikasi (37°C) selama 10 menit dan disentrifus (5000xg) selama 20 menit untuk mengumpulkan sel. *Optical Density*(OD) dibaca pada densitas optiknya pada 410nm dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Pengukuran aktivitas enzim ALP dilakukan pada sampel *scaffold* komposit alginat/HA (*S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich) di Laboratorium Stem Cell and Cancer Institute, PT Bifarma, Jakarta.

3.4 Analisis Statistik

Penelitian ini menggunakan analisis univarian dan bivarian berupa one-Way Anova dengan program SPSS versi 15.0 (SPSS Inc) terhadap semua sampel dalam kelompok. Terhadap hasil data yang diperoleh dilakukan uji homogenitas. Jika di dalam kelompok terdapat perbedaan signifikan, selanjutnya dilakukan uji Post Hoc metode LSD.

Bab 4

HASIL

[Tahap 1]

4.1 *Scaffold* Alginat/Hidroksiapatit

Pada penelitian tahap pertama telah diperoleh serbuk alginat *S. duplicatum*, serbuk alginat *S. crassifolium*, dan serbuk HA yang dikalsinasi pada rentang suhu 100°-900°C. *Scaffold* komposit alginat/HA telah dipreparasi dari serbuk alginat dan HA yang diperoleh. Hasil karakteristik dari serbuk alginat, serbuk HA, dan *scaffold* komposit alginat/HA dilakukan untuk pemilihan jenis *scaffold* komposit alginat/HA yang akan digunakan untuk aplikasi kultur sel punca mesenkimal. Hasil analisis yang diperoleh dari penelitian ini dibandingkan dengan hasil analisis dari serbuk alginat ex-Sigma, ex-Aldrich, dan *scaffold* ex-Sigma/Aldrich

4.1.1 Serbuk Alginat *Sargassum*

Hasil ekstraksi alga *S. duplicatum* dan *S. crassifolium* menghasilkan, secara berurutan, alginat *S. duplicatum* dan *S. Crassifolium* berupa padatan serbuk. Serbuk alginat *S. duplicatum* berwarna coklat muda dan serbuk alginat *S. crassifolium* berwarna coklat tua, sedangkan serbuk alginat ex-Aldrich, yang digunakan sebagai pembanding, berwarna putih.

4.1.1.1 Analisis Unsur Alginat

Karakterisasi dengan menggunakan XRF menunjukkan unsur-unsur yang terkandung di dalam sampel serbuk alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, dan ex-Sigma (Tabel 4.1/Lampiran 4a, 4b, 4c). Dari ketiga sampel serbuk tersebut, dapat diketahui bahwa unsur Na merupakan unsur dominan. Fraksi berat Na yang terkandung di dalam sampel serbuk alginat *S. duplicatum* (50,5%) dan *S. crassifolium* (49,3%) lebih rendah daripada yang terkandung di dalam alginat ex-Sigma (73,2%). *Trace element*, seperti Ca, S, Fe, Si, dan Zn terkandung di dalam

Bab 4

HASIL

[Tahap 1]

4.1 *Scaffold* Alginat/Hidroksiapatit

Pada penelitian tahap pertama telah diperoleh serbuk alginat *S. duplicatum*, serbuk alginat *S. crassifolium*, dan serbuk HA yang dikalsinasi pada rentang suhu 100°-900°C. *Scaffold* komposit alginat/HA telah dipreparasi dari serbuk alginat dan HA yang diperoleh. Hasil karakteristik dari serbuk alginat, serbuk HA, dan *scaffold* komposit alginat/HA dilakukan untuk pemilihan jenis *scaffold* komposit alginat/HA yang akan digunakan untuk aplikasi kultur sel punca mesenkimal. Hasil analisis yang diperoleh dari penelitian ini dibandingkan dengan hasil analisis dari serbuk alginat ex-Sigma, ex-Aldrich, dan *scaffold* ex-Sigma/Aldrich

4.1.1 Serbuk Alginat *Sargassum*

Hasil ekstraksi alga *S. duplicatum* dan *S. crassifolium* menghasilkan, secara berurutan, alginat *S. duplicatum* dan *S. Crassifolium* berupa padatan serbuk. Serbuk alginat *S. duplicatum* berwarna coklat muda dan serbuk alginat *S. crassifolium* berwarna coklat tua, sedangkan serbuk alginat ex-Aldrich, yang digunakan sebagai pembanding, berwarna putih.

4.1.1.1 Analisis Unsur Alginat

Karakterisasi dengan menggunakan XRF menunjukkan unsur-unsur yang terkandung di dalam sampel serbuk alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, dan ex-Sigma (Tabel 4.1/Lampiran 4a, 4b, 4c). Dari ketiga sampel serbuk tersebut, dapat diketahui bahwa unsur Na merupakan unsur dominan. Fraksi berat Na yang terkandung di dalam sampel serbuk alginat *S. duplicatum* (50,5%) dan *S. crassifolium* (49,3%) lebih rendah daripada yang terkandung di dalam alginat ex-Sigma (73,2%). *Trace element*, seperti Ca, S, Fe, Si, dan Zn terkandung di dalam

ketiga sampel alginat dan Cl yang jumlahnya relatif tinggi (30%) hanya dijumpai pada sampel serbuk alginat *S. crassifolium*, merupakan mineral-mineral yang berasal dari lingkungan dalam laut yang terakumulasi saat pembentukan alga, sedangkan unsur-unsur yang jumlahnya sangat rendah dapat dianggap sebagai pengotor sehingga dapat diabaikan di dalam sampel

Tabel 4.1 Komposisi unsur dari sampel serbuk alginat dari uji XRF

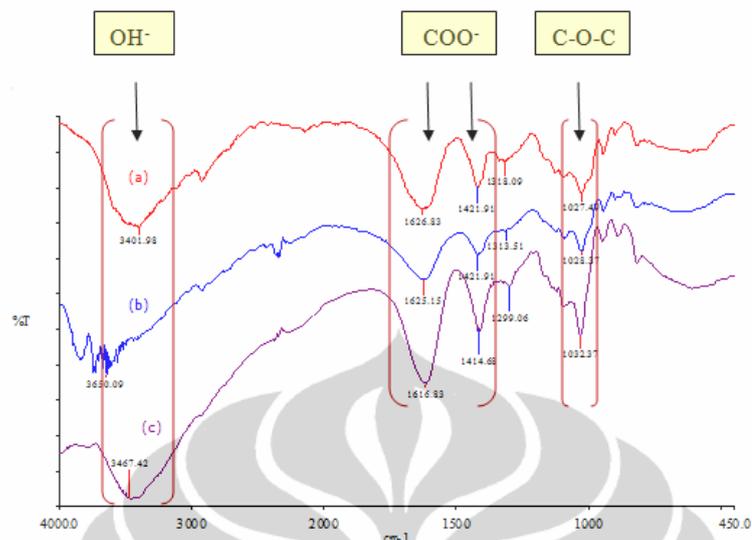
Sampel serbuk	Unsur	wt (%)
Alginat <i>S. duplicatum</i>	Na	50,5
	Ca	12,1
Alginat <i>S. crassifolium</i>	Na	49,3
	Ca	10,2
	Cl	30,8
Alginat kontrol (Sigma)	Na	73,2
	Ca	6,7

4.1.1.2 Identifikasi Gugus Fungsi Alginat

Hasil uji FTIR terhadap sampel serbuk alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, dan ex-Sigma menghasilkan pola spektra yang dipetakan dalam bentuk hubungan antara absorbansi sinar inframerah dan nilai bilangan gelombang pada rentang $4000-4500\text{cm}^{-1}$ seperti yang disajikan dalam Tabel 4.2 sebagai rangkuman dari Gambar 4.1.

Tabel 4.2 Puncak-puncak absorbansi dari sampel serbuk alginat

Gugus	OH	COO ⁻	C-O-C
Alginat		(cm^{-1})	
<i>S. duplicatum</i>	3401	1626; 1421	1027
<i>S. crassifolium</i>	3420	1623; 1421	1028
ex-Aldrich	3467	1616; 1416	1032



Gambar 4.1 Spektra FTIR dari sampel serbuk alginat (a) *S.duplicatum* (b), *S. crassifolium* (c), dan ex-Sigma

Dari hasil uji FTIR pada Gambar 4.1, ditunjukkan adanya gugus-gugus fungsi pada sampel serbuk alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, dan ex-Sigma.

1. Hidroksil (OH⁻). Gugus ini memiliki daerah absorbansi sinar inframerah pada bilangan gelombang sekitar 3000-3400 cm⁻¹. Pada Gambar 4.4, puncak absorbansi gugus -OH terlihat di sekitar bilangan gelombang 3400 cm⁻¹
2. Karboksilat (COO⁻). Gugus ini memiliki daerah absorbansi sinar inframerah pada panjang gelombang sekitar 1670-1400 cm⁻¹. Pada Gambar 4.4, yang diakibatkan oleh aluran gugus ini tampak di sekitar bilangan gelombang 1614-1621cm⁻¹ dan 1421-1414 cm⁻¹
3. Eter (C-O-C). Gugus ini memiliki daerah absorbansi sinar inframerah pada panjang gelombang sekitar 1150-1020 cm⁻¹. Pada Gambar 4.4 tampak di sekitar 1028 cm⁻¹

Hampir semua senyawa organik mengandung ikatan C-H. Absorbansi ini memiliki daerah absorbansi sinar inframerah pada panjang gelombang sekitar 2850-3000 cm^{-1} . Pada Gambar 4.1 aluran gugus ini terlihat di sekitar bilangan gelombang 2900 cm^{-1} . Ikatan tunggal C-C merupakan absorbansi yang lemah dalam spektrum sinar inframerah. Dengan ditemukannya gugus-gugus karboksilat (COO^-) dan eter (C-O-C) yang terdeteksi pada regio sidik jari dapat dipastikan bahwa koloid yang diekstraksi baik dari alga *S. duplicatum* ataupun *S. crassifolium* adalah alginat.

4.1.1.3 Viskositas Alginat

Hasil pengukuran viskositas dari sampel alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, dan ex-Sigma pada konsentrasi larutan 0,5–3% ditampilkan pada Tabel 4.3. Secara umum, terlihat viskositas alginat *S. duplicatum* memiliki viskositas lebih tinggi dibandingkan kedua jenis alginat lainnya. Dari Tabel 4.3, tertera bahwa pada konsentrasi larutan alginat 0,5%, viskositas dari kedua sampel alginat *Sargassum* adalah sebanding ($\pm 60\text{cP}$). Dengan ditingkatkannya konsentrasi larutan menjadi 1%, terlihat sedikit peningkatan viskositas pada sampel alginat *Sargassum* (103-105 cP) yang lebih tinggi daripada alginat ex-Sigma (77 cP). Dengan semakin ditingkatkannya konsentrasi larutan, yaitu sampai 2%, terjadi peningkatan viskositas larutan alginat *S.duplicatum* (1045 cP) jauh di atas viskositas alginat *S. crassifolium* (535 cP) dan alginat ex-Sigma (235 cP). Pada konsentrasi larutan 3%, viskositas alginat *S. duplicatum* meningkat sangat drastis sampai 8844 cP, sedangkan viskositas alginat *S. crassifolium* (1044 cP) sebanding dengan alginat ex-Sigma (1085 cP).

Tabel 4.3 Nilai viskositas sampel alginat pada konsentrasi dari larutan 0,5-3%

Sampel larutan alginat	Viskositas (cP)			
	0,5%	1%	2%	3%
<i>S. duplicatum</i>	60	103	1045	8844
<i>S. crassifolium</i>	64	108	535	1044
Ex-Sigma	56	77	235	1085

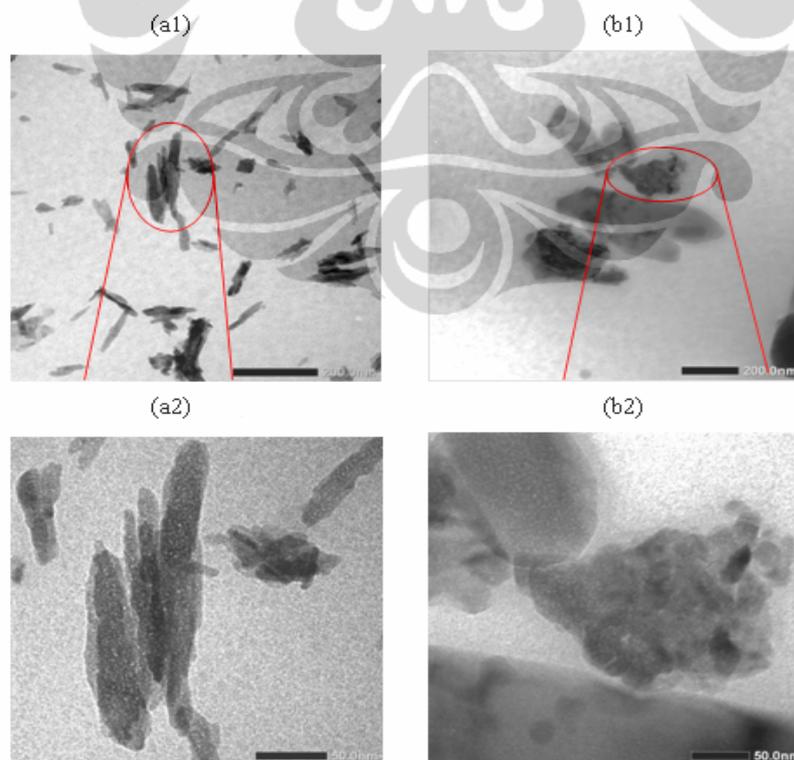
Berat molekul dihitung dari viskositas larutan alginat. Berat molekul sampel serbuk *S. crassifolium* (224 cP) dan ex-Sigma (235 cP) adalah sebanding. Saat alginat *S. duplicatum* memperoleh viskositas yang tinggi, transisi dari sol (bentuk viskos) menjadi gel (bentuk elastik), larutan alginat menjadi kaku dan perlahan-lahan kehilangan kemampuan mengalir sehingga berat molekul dari alginat *S. duplicatum* tidak terdeteksi.

4.1.2 Hidroksiapatit

Sintesis (pencampuran) antara serbuk Ca(OH)_2 dan cairan H_3PO_4 dengan perbandingan mol sebesar 10:6 menghasilkan padatan serbuk HA.

4.1.2.1 Morfologi Hidroksiapatit

Secara mikroskopis, dari karakterisasi yang menggunakan TEM, diperlihatkan morfologi kristalit HA sintesis dan HA ex-Aldrich (Gambar 4.2).



Gambar 4.2 (a) Morfologi kristalit dari HA sintesis dan (b) HA ex-Aldrich. Terlihat kristalit HA merupakan aglomerasi dari kristalit berskala nano

Kristalit HA sintesis mayoritas memanjang menyerupai jarum yang beragregat dalam kluster dan hanya sebagian kecil terisolasi. Pada pembesaran, terlihat kristalit HA sintesis dan HA ex-Sigma merupakan aglomerasi dari kristalit-kristalit berskala nano ataupun subnano. Kristalit HA sintesis berukuran panjang 20-100 nm dan lebar 20 nm, tersusun paralel atau quasi-paralel (Gambar 4.16.a2).

Kristalit HA ex-Aldrich berukuran 1 μm (Gambar 4.2.a2) yang beraglomerasi dengan batas kristal tidak jelas. Kristalit HA sintesis mayoritas memanjang menyerupai jarum yang beragregat dalam kluster dan hanya sebagian kecil terisolasi. Pada pembesaran terlihat kristalit HA sintesis merupakan aglomerasi dari kristalit-kristalit berskala nano ataupun subnano berukuran panjang 20-100 nm dan lebar 20 nm dan tersusun paralel atau quasi-paralel (Gambar 4.2.a2). Berbeda dengan kristalita HA sintesis, kristalit HA ex-Aldrich berbentuk kristalit sferikal berukuran 1 μm (Gambar 4.2.a1) yang beraglomerasi dengan batas kristal tidak jelas. Pada pembesaran tampak kristalit lebih kecil yang juga merupakan aglomerasi dari kristalit-kristalit berskala nano.

4.1.2.2 Analisis Unsur Hidroksiapatit

Karakterisasi dengan menggunakan XRF menunjukkan unsur-unsur yang terkandung di dalam sampel serbuk HA900°C dan HA ex-Aldrich (Tabel 4.4/Lampiran 5a, 5b, 5c). Pada Tabel 4.4 ditunjukkan bahwa dua unsur dominan yang terkandung di dalam sampel-sampel HA900°C dan HA ex-Aldrich adalah unsur Ca dan selanjutnya unsur P. Selain itu, ditemukan *trace element*, yaitu unsur-unsur Fe, Mn, dan Zn pada kedua sampel serbuk yang jumlahnya sangat sedikit. Oleh karena itu, keberadaan *trace element* sangat diragukan sehingga dipandang sebagai impuritas (pengotor) yang dapat diabaikan.

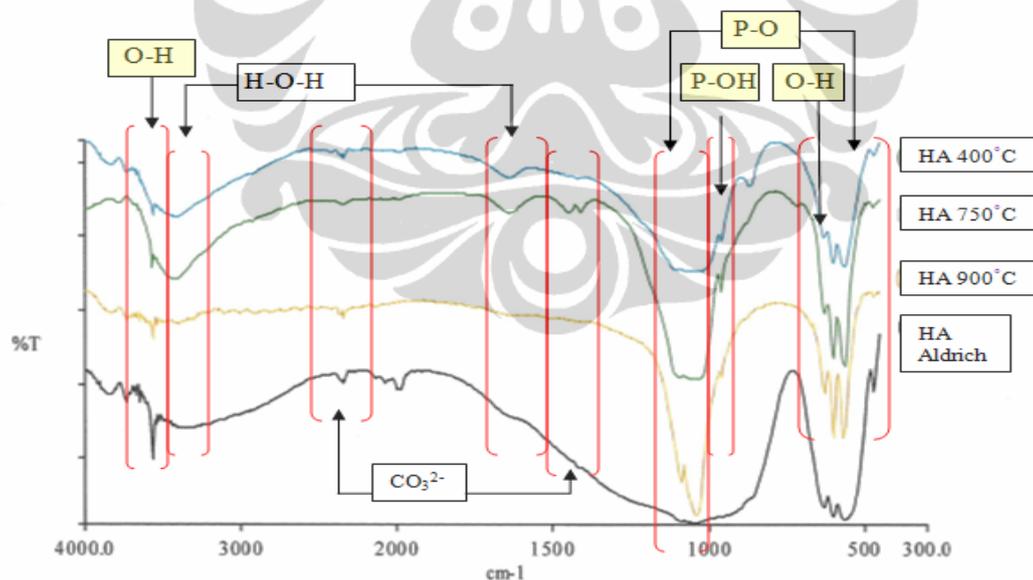
Tabel 4.4 Komposisi unsur dari sampel serbuk HA

Sampel serbuk	Unsur	wt (%)
HA 900°C	Ca	68,12
	P	27,33
HA ex-Aldrich	Ca	62,67
	P	32,28

Namun, kedua unsur utama Ca dan P tidak dapat digunakan untuk memastikan terbentuknya fasa HA. Hal ini karena unsur-unsur atom ringan seperti C, H, O, N, dan lain-lain tidak terdeteksi oleh uji XRF. Namun, dari hasil uji XRF didapatkan informasi bahwa unsur dominan yang terkandung di dalam sampel serbuk merupakan kombinasi oksida dari kedua unsur dominan Ca dan P. Oleh karena itu, dilakukan karakterisasi dengan menggunakan XRD dan FTIR.

4.1.2.3 Identifikasi Gugus Fungsi Hidroksiapatit

Hasil FTIR dari sampel-sampel serbuk HA400°C, HA750°C, dan HA900°C dipetakan dalam bentuk hubungan antara absorbansi sinar inframerah dan nilai bilangan gelombang antara 4000-450 cm⁻¹ (Gambar 4.3). Secara rinci puncak-puncak absorbansi tersebut dirangkum dalam Tabel 4.5.



Gambar 4.3. (a) Spektroskopi FTIR dari sampel serbuk HA400°C, (b) HA750°C, (c) HA900°C dan (d) HA ex-Aldrich

Tabel 4.5. Puncak-puncak absorbansi pada spektra FTIR

Sampel serbuk HA	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		
	OH ⁻	PO ₄ ³⁻	CO ₃ ²⁻
HA 400°C	3429, 1639, 631	1046, 602, 564	1449, 2366
HA 750°C	3400, 1650, 633	1054, 602, 564	1449, 2366
HA 900°C	3404, 632	1045, 601, 561	1450, 2370
HA kontrol	3400, 633	1300-800, 601,567	1449, 2373

Dari uji FTIR (Tabel ditunjukkan adanya gugus-gugus fungsi berikut):

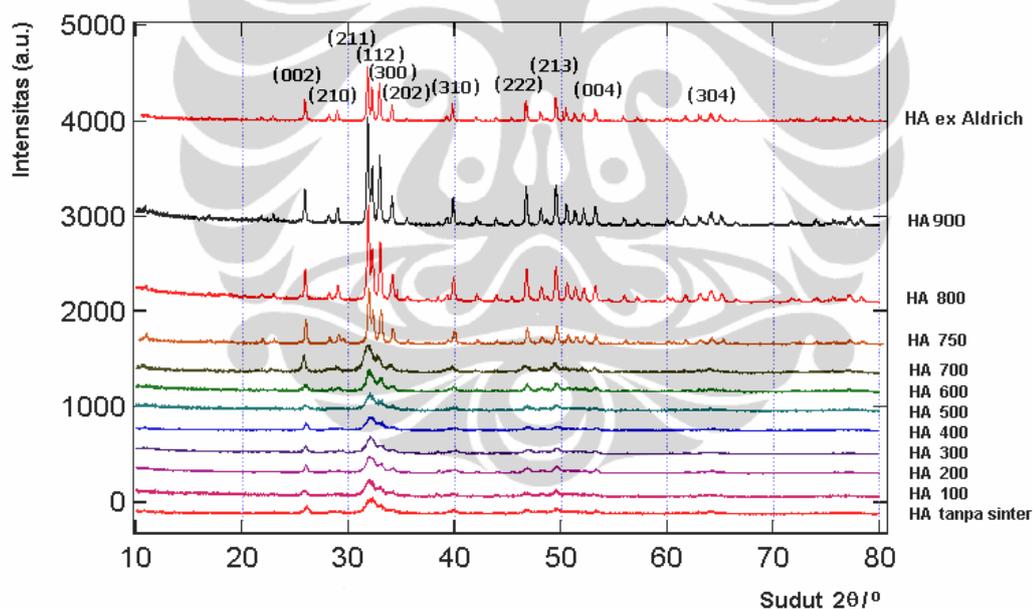
1. Hidroksil (-OH⁻). Gugus ini memiliki daerah absorbansi sinar inframerah pada gelombang 3700-3000 cm⁻¹, 1205-885 cm⁻¹, dan 660-600 cm⁻¹. Pada Gambar 4.3 puncak absorbansi gugus OH⁻ adsorpsi terlihat di sekitar bilangan gelombang 3400 cm⁻¹ pada keempat sampel HA, sedangkan gugus OH⁻ adsorpsi terdeteksi di sekitar 630 cm⁻¹.
2. Fosfat (-PO₄³⁻). Gugus ini memiliki daerah absorbansi sinar inframerah pada bilangan gelombang 1100-950 cm⁻¹ dan 660-600 cm⁻¹. Pada Gambar 4.3 vibrasi P=O dari gugus -PO₄³⁻ tampak di sekitar 1045 cm⁻¹, sedangkan vibrasi P-O dari gugus -PO₄³⁻ pada 600 cm⁻¹-560 cm⁻¹ pada keempat sampel HA. Pada HA ex-Aldrich puncak gugus melebar dari 1300-800 cm⁻¹.
3. Karbonat (-CO₃²⁻). Gugus ini memiliki daerah absorbansi sinar inframerah pada panjang gelombang 2500-2300 cm⁻¹ dan 1400-1300 cm⁻¹. Pada Gambar 4.13, puncak absorbansi gugus-CO₃ tampak di sekitar bilangan gelombang 2370 cm⁻¹ dan 1449 cm⁻¹.

4.1.2.4 Identifikasi Fasa Hidroksiapatit

Karakterisasi dengan menggunakan XRD terhadap sampel serbuk HA yang dikalsinasi pada rentang suhu 100°C sampai dengan 900°C, memperlihatkan pola XRD dari HA100°-900°C seperti yang disajikan sebagai posisi garis difraksi (2θ) dan intensitas relatif (I). Dari difraktogram Gambar 4.4, pola XRD serbuk HA100°C memperlihatkan puncak-puncak yang sangat lebar, intensitas rendah,

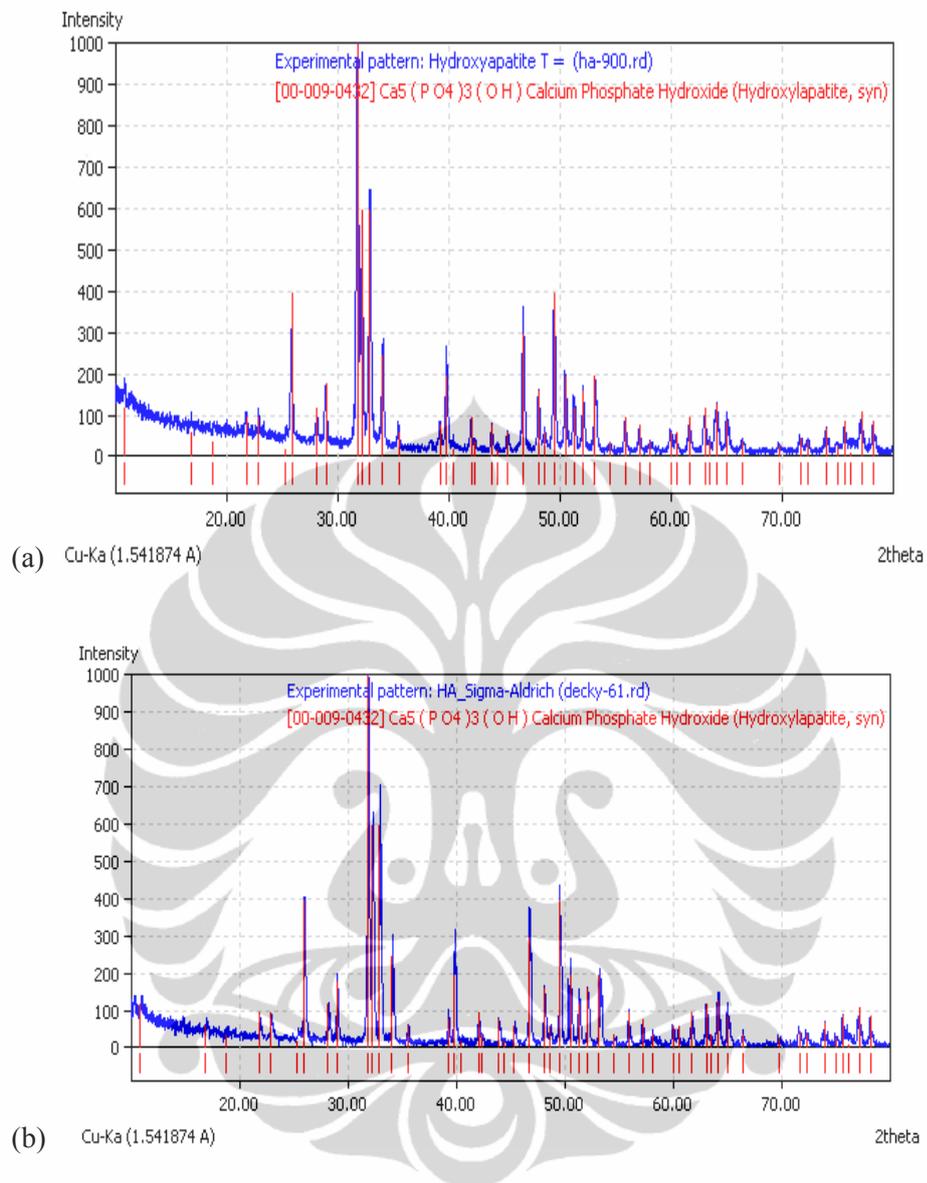
serta resolusi yang tidak tajam. Seiring dengan peningkatan suhu kalsinasi, terjadi perubahan puncak-puncak XRD, namun perubahan relatif kecil pada HA100°C sampai dengan HA700°C. Perubahan terlihat jelas mulai dari HA750°C, ketika puncak-puncak XRD mulai menyempit, intensitas meninggi, serta resolusi menajam, dan akhirnya pada suhu kalsinasi 900°C puncak-puncak XRD sampel serbuk HA900°C sangat mendekati puncak-puncak XRD dari sampel serbuk HA ex-Aldrich.

Identifikasi fasa terhadap pola XRD dilakukan dengan menggunakan Tabel Hanawalt. Puncak-puncak XRD yang tampak sampel serbuk HA900°C adalah bidang-bidang dengan index Miller (002), (210), (211), (112), (300), (202),(310), (222), (213), (004), dan (304).



Gambar 4.4. Pola XRD sampel serbuk HA dengan rentang suhu kalsinasi 100°-900°C

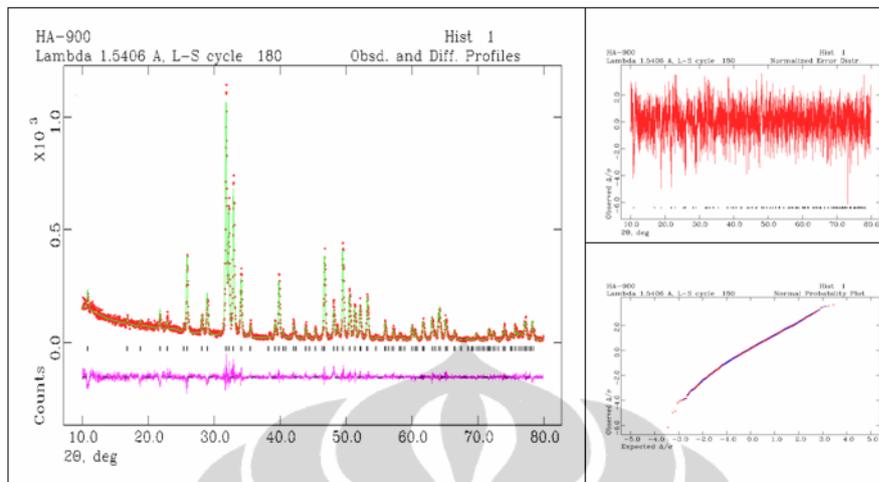
Puncak-puncak XRD tersebut terlihat berimpitan dengan puncak-puncak XRD dari fasa $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Gambar 4.5), yang dirujuk dari *file* JCPDS/ICDD No. 09-0432 (Lampiran 6). Hasil identifikasi menunjukkan bahwa sampel serbuk HA900°C adalah fasa HA.



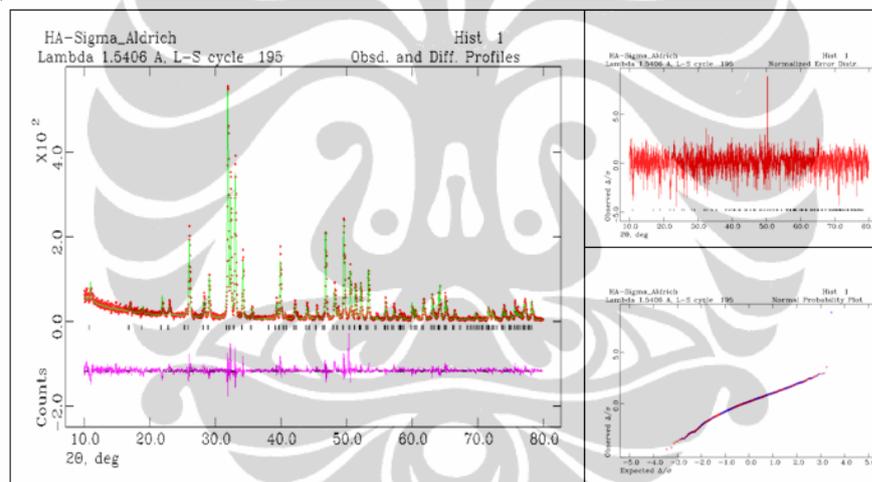
Gambar 4.5. (a) Puncak-puncak XRD dari sampel serbuk HA900°C dan HA ex-Aldrich
(b) Terlihat puncak XRD berimpitan dengan fasa $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ dari file ICDD (09-0432)

Aplikasi perangkat lunak GSAS dengan menggunakan metode analisis Rietveld menunjukkan bahwa selain fasa dominan HA, ditemukan bidang yang terletak di luar puncak-puncak bidang dominan dari sampel serbuk HA dengan suhu kalsinasi 100°-300°C dibidang (200) di sekitar $2\theta=35-39^\circ$. Puncak XRD ini telah berimpitan dengan fasa CaO yang dirujuk dari ICDD no. 43-100, namun jumlahnya sangat sedikit.

(a)



(b)



Gambar 4.6. (a) *Refinement* pola XRD dari sampel serbuk HA900°C dan HA ex-Aldrich (b) dengan *normalized error distribution* dan *normal probability plot*

Aplikasi perangkat lunak GSAS terhadap pola XRD sampel serbuk HA900°C menunjukkan hasil *refinement* dari struktur kristal seperti terlihat pada Gambar 4.6 (Lampiran 7a-d). Dari hasil *refinement*, pada Gambar 4.6 tampak bahwa kurva observasi (kurva hasil pengukuran) dan kurva kalkulasi (kurva dari referensi) sangat berimpit sehingga selisih kedua kurva, yang ditunjukkan dengan *normalized error distribution*, hanya meninggalkan puncak-puncak *background* yang berasal dari pengukuran sampel. Ditunjukkan pula

kualitas *fitting*, dengan *criteria of fit* (faktor R) yang sangat baik dan *goodness of fit* (faktor χ^2) sangat kecil. Kualitas *fitting* yang ditunjukkan dengan *normal probability plot*, yang idealnya merupakan garis lurus, memperlihatkan tingkat kesesuaiannya mendekati 90%. Menurut Izumi, nilai maksimum χ^2 yang diperkenankan adalah 1,3.

Analisis dengan menggunakan GSAS juga memberi informasi mengenai sistem kristal. Jenis kristal dari sampel serbuk HA900°C adalah heksagonal dan grup ruang P6₃/m, sedang parameter kisi tertera pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Parameter kisi dari kristal HA

Sampel serbuk	a = b (Å)	c (Å)	$\alpha = \beta$	γ
HA900°C	9,422	6,885	90°	120°
HA ex-Aldrich	9.440	6.889	90°	120°
File ICDD (09-0432)	9,432	6,881	90°	120°

Sistem kristal dan parameter kisi yang dimiliki oleh HA900°C sama dengan yang dimiliki oleh HA ex-Aldrich, yang keduanya sesuai dengan file ICDD (09-0432). Derajat kristalinitas dan ukuran kristalit dari sampel-sampel serbuk HA900°C, HA750°C, dan HA400°C ditampilkan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 Derajat kristalinitas dan ukuran kristalit (D) dari HA

Sampel serbuk	Derajat Kristalinitas (%)	D (nm)
HA ex-Aldrich	84	37,84
HA900°C	72	36,27
HA750°C	62	23,84
HA400°C	57	19,80

Pada Tabel 4.7 ditunjukkan bahwa HA dengan suhu kalsinasi semakin rendah menghasilkan derajat kristalinitas yang semakin rendah. Derajat kristalinitas HA900°C (72%) mendekati derajat kristalinitas yang dimiliki HA ex-Aldrich (84%), sedangkan derajat kristalinitas HA750°C lebih tinggi daripada derajat kristalinitas HA400°C. Berdasarkan derajat kristalinitas HA, HA400°C (57%) dipilih untuk penelitian ini.

Selain itu, Tabel 4.7 juga memperlihatkan bahwa pada HA dengan suhu kalsinasi yang lebih rendah daripada HA900°C, terdapat ukuran kristalit lebih kecil. Pada penggunaan suhu kalsinasi dari HA900°C, HA750°C, sampai HA400°C, ukuran kristalit HA paling kecil ditunjukkan oleh HA400°C, yaitu 19,8 nm.

4.1.2.5 Analisis Luas Muka

Luas muka dari sampel serbuk HA yang diperoleh dengan menggunakan metode BET disajikan pada Tabel 4.8/Lampiran 9 a-c).

Tabel 4.8 Luas muka dari sampel serbuk HA

Sampel serbuk	Luas muka (m ² /g)
Alginat ex-Aldrich	8,9
HA900°C	42,2
HA750°C	75,9
HA400°C	80,9

Luas muka berbanding terbalik dengan ukuran kristalit. Pada Tabel 4.8 tertera bahwa luas muka HA900°C (42,2 m²/g) jauh lebih luas daripada luas muka dari HA ex-Aldrich (8,9 m²/g). Pada HA dengan suhu kalsinasi lebih rendah daripada 900°C ditunjukkan luas muka meningkat menjadi 75,9 m²/g pada HA750°C dan 80,9 m²/g pada HA400°C. Oleh karena itu, berdasarkan luas muka, dipilih HA400°C.

4.1.2.6 Analisis Distribusi Ukuran Partikel

Karakterisasi dengan menggunakan Particle Size Analyzer (PSA) dari sampel serbuk HA menghasilkan distribusi ukuran partikel yang tersusun pada Tabel 4.9 berdasarkan pada hasil uji PSA (Lampiran 8 a-c).

Tabel 4.9 menunjukkan bahwa ukuran partikel HA900°C terdistribusi di sekitar 331,5 nm yang mendekati nilai distribusi ukuran partikel dari HA ex-

Sigma. Pada HA750°C dan 400°C terlihat ukuran partikel HA terdistribusi di sekitar daerah yang lebih pendek lagi, yaitu 86,1nm dan 54,4 nm.

Tabel 4.9. Rentang ukuran partikel HA dengan peningkatan suhu kalsinasi

Sampel Serbuk	Ukuran Partikel (nm)
	Rerata
HA ex-Aldrich	454,9
HA900°C	331,5
HA750°C	86,1
HA400°C	54,4

Hasil PSA ini memperlihatkan bahwa dengan makin rendahnya suhu kalsinasi HA, maka diperoleh ukuran-ukuran partikel HA yang lebih kecil yang sesuai dengan hasil PSA pada suhu kalsinasi HA lebih rendah.

4.1.3 Scaffold Komposit Alginat/Hidroksiapatit untuk Kultur Sel

Pencampuran sampel serbuk alginat (*S. duplicatum* atau *S. crassifolium*) dan sampel serbuk HA yang dikalsinasi dengan suhu 400°C, 750°C, dan 900°C menghasilkan sampel-sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA400°C, *S. duplicatum*/HA750°C, *S. duplicatum*/HA900°C, *S. crassifolium*/HA400°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan *S. crassifolium*/HA900°C.

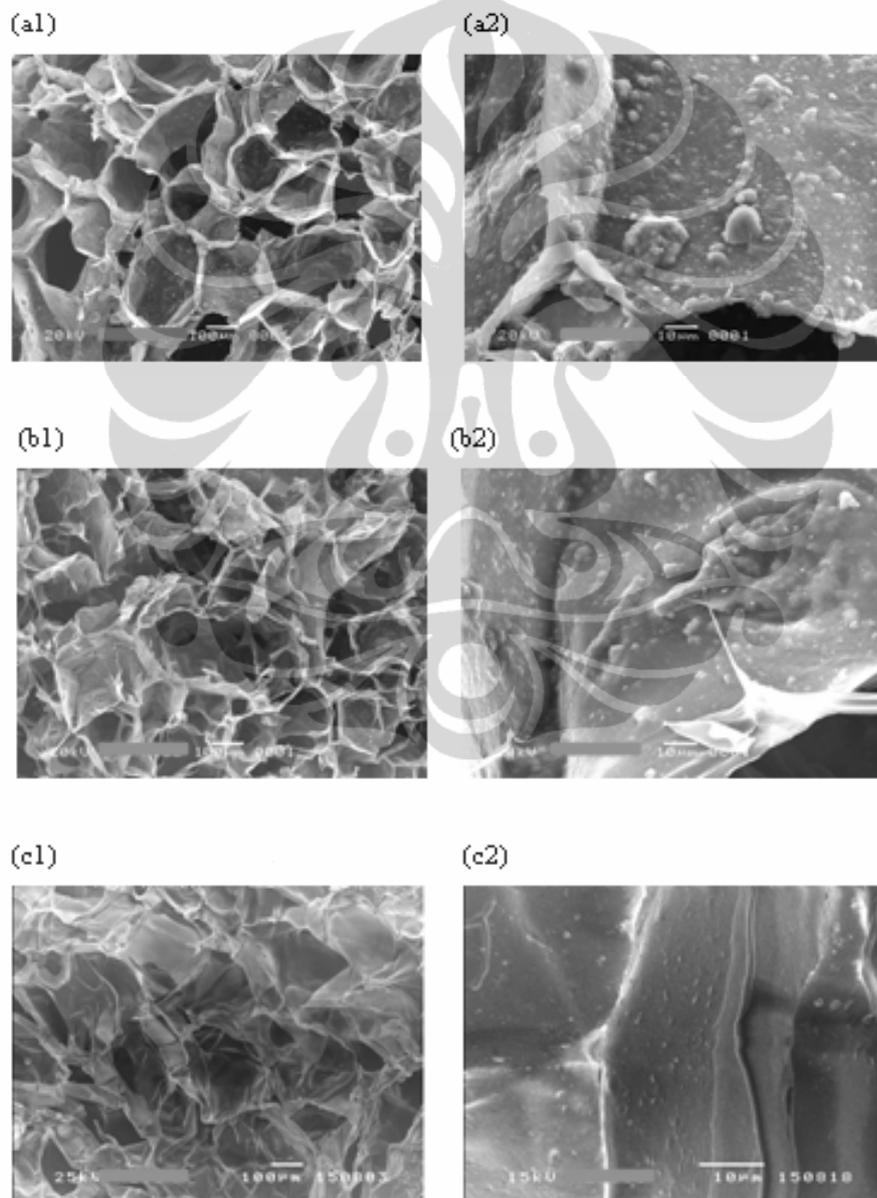
Preparasi *scaffold* dengan menggunakan *mold* berupa plat kultur 24-well menghasilkan sampel *scaffold* konstruksi 3D berdiameter $10 \pm 0,5$ mm dan tinggi 4 ± 1 mm seperti yang disajikan Gambar 4.7. Dimensi sampel *scaffold* berbasis *S. duplicatum* (Gambar 4.7, kiri) lebih tinggi daripada kedua dimensi *scaffold* berbasis *S. crassifolium*.



Gambar 4.7 Sampel scaffold komposit 3D *S. duplicatum*/HA (kiri), *S. crassifolium*/HA (tengah), dan scaffold ex-Sigma/Aldrich (kanan)

4.1.3.1 Struktur Mikro *Scaffold* Alginat/Hidroksiapatit

Secara mikroskopis, morfologi dari *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA dan alginat *S. duplicatum*/HA ex-Sigma pada potongan lintang bagian tengah disajikan pada Gambar 4.8. Pada Gambar 4.8 tampak *scaffold* terdiri dari poros yang saling berhubungan dengan diameter poros 100-200 μm . Pada pembesaran, ditunjukkan dinding poros dari ketiga jenis *scaffold* merupakan struktur komposit tempat partikel HA tertanam di dalam matriks alginat; partikel HA terdistribusi merata pada matriks alginat (Gambar 4.8.b1/b2/b3).



Gambar 4.8. (a) Mikrograf SEM dari sampel *scaffold* komposit alginat *S.duplicatum*/HA, (b) *S.crassifolium*/HA dan (c) *scaffold* Sigma/Aldrich

4.1.3.2 Kekuatan Kompresi *Scaffold* Alginat/Hidroksiapatit

Nilai kekuatan kompresi dari enam jenis *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA dan alginat *S. crassifolium*/HA dengan suhu kalsinasi masing-masing 400°C, 750°C, dan 900°C, serta alginat/HA ex-Sigma/Aldrich disajikan dalam Tabel 4.10.

Tabel 4.10 Kekuatan kompresi dari *scaffold* alginat/HA

Jenis <i>scaffold</i> komposit	Kekuatan Kompresi (MPa)
Alginat <i>S. duplicatum</i> /HA 400°C	2,47 (12)
Alginat <i>S. duplicatum</i> /HA 750°C	2,59 (23)
Alginat <i>S. duplicatum</i> /HA 900°C	2,67 (17)
Alginat <i>S. crassifolium</i> /HA 400°C	1,58 (14)
Alginat <i>S. crassifolium</i> /HA 750°C	1,97 (19)
Alginat <i>S. crassifolium</i> /HA 900°C	2,19 (11)
Alginat/HA ex-Sigma/Aldrich	2,21 (17)

Secara umum, grup sampel *scaffold* alginat/HA berbasis *S. duplicatum* memiliki kekuatan kompresi yang lebih tinggi daripada kekuatan kompresi grup sampel *scaffold* alginat/HA berbasis *S. crassifolium*. Meninjau kekuatan kompresi di dalam grup *S. duplicatum* yang menggunakan sampel *scaffold* dengan HA900°C memberikan nilai kekuatan kompresi lebih tinggi dibandingkan dengan yang menggunakan HA750°C dan HA400°C. Demikian juga halnya dengan kekuatan kompresi yang ditunjukkan di dalam grup *scaffold* berbasis *S. crassifolium*, sampel *scaffold* dengan HA900°C memberikan nilai kekuatan kompresi lebih tinggi dibandingkan dengan yang menggunakan HA750°C dan HA400°C. Dibandingkan dengan kekuatan kompresi dari sampel *scaffold* alginat/HA ex-Sigma/Aldrich, maka kekuatan kompresi sampel *scaffold* berbasis *S. crassifolium* mendekati kekuatan kompresi sampel *scaffold* alginat/HA ex-Sigma/Aldrich.

Dari analisis statistik uji homogenitas terhadap data yang diperoleh, ditunjukkan bahwa penurunan nilai kekuatan kompresi antarkelompok *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA ataupun antarkelompok *scaffold* komposit

alginat *S. crassifolium*/HA dengan masing-masing $n=8$ mempunyai nilai signifikansi $p<0,01$. Hal ini berarti sebaran di dalam masing-masing kelompok sampel tersebut normal. Hasil analisis uji One-Way Anova memperlihatkan bahwa diantara nilai kekuatan kompresi sampel *scaffold S. duplicatum*/HA ataupun *S. crassifolium*/HA terdapat kelompok yang berbeda signifikan. Dengan menggunakan uji PostHoc metode LSD, dapat diketahui bahwa perbedaan signifikan kekuatan kompresi terdapat di antara setiap jenis *scaffold S. crassifolium*/HA (Tabel 4.11/ Lampiran 10c dan 10d). Perbedaan signifikan kekuatan kompresi juga terdapat di antara setiap jenis *scaffold S. duplicatum*/HA, kecuali antara *scaffold alginat S. duplicatum*/HA900°C dan *S. duplicatum*/HA750°C yang menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan (Tabel 4.12 / Lampiran 10 a dan 10b).

Tabel 4.11. Signifikansi nilai kekuatan kompresi grup alginat *S. crassifolium* dengan HA dari suhu kalsinasi berbeda

<i>S.crassifolium</i>	HA400°C	HA750°C	HA900°C	Kontrol
HA400°C	-	-	-	-
HA750°C	0,001	-	-	-
HA900°C	0,001	0,001	-	-
ex-Sigma	0,001	0,001	0,001	-

Tabel 4.12. Signifikansi nilai kekuatan kompresi grup alginat *S. duplicatum* dengan HA dari suhu kalsinasi berbeda

<i>S.duplicatum</i>	HA400°C	HA750°C	HA900°C	Kontrol
HA400°C	HA750°C	HA900°C	Kontrol	-
HA400°C	HA750°C	HA900°C	Kontrol	-
HA400°C	HA750°C	HA900°C	Kontrol	-
ex-Sigma	0,921	0,001	0,001	-

4.1.3.3 Degradasi Scaffold Alginat/Hidroksiapatit

Nilai degradasi dari sampel-sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA, alginat *S. crassifolium*/HA, masing-masing dengan suhu kalsinasi

400°C, 750°C, dan 900°C, serta alginat/HA ex-Sigma/Aldrich disajikan dalam Tabel 4.13. Grup sampel *scaffold* yang menggunakan alginat *S. duplicatum* memiliki nilai degradasi, secara umum, lebih rendah daripada grup sampel *scaffold* yang menggunakan alginat *S. crassifolium*.

Tabel 4.13. Degradasi dari *scaffold* alginat/HA

Material <i>scaffold</i> komposit	Degradasi (%)
Alginat <i>S. duplicatum</i> /HA 400°C	19,96
Alginat <i>S. duplicatum</i> /HA 750°C	11,13
Alginat <i>S. duplicatum</i> /HA 900°C	8,92
Alginat <i>S. crassifolium</i> /HA 400°C	27,46
Alginat <i>S. crassifolium</i> /HA 750°C	20,49
Alginat <i>S. crassifolium</i> /HA 900°C	15,53
HA ex-Aldrich	24,45

Di dalam sampel *scaffold* berbasis *S. duplicatum*, dengan digunakannya HA900°C, menghasilkan nilai degradasi lebih rendah dibandingkan dengan yang menggunakan HA750°C dan HA400°C (Tabel 4.13). Demikian juga pada grup *scaffold* berbasis *S. crassifolium*, penggunaan HA900°C menghasilkan nilai degradasi lebih rendah daripada dengan penggunaan HA750°C dan HA400°C

Dari analisis statistik, uji homogenitas terhadap data yang diperoleh, menunjukkan bahwa antarkelompok *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA ataupun antarkelompok *scaffold* komposit alginat *S. crassifolium*/HA dengan masing-masing n=8, mempunyai nilai signifikansi $p < 0,01$. Hal ini berarti sebaran di dalam masing-masing kelompok sampel tersebut normal. Hasil analisis uji One-Way Anova memperlihatkan bahwa diantara nilai degradasi dari *scaffold* *S. duplicatum*/HA ataupun *S. crassifolium*/HA terdapat kelompok yang berbeda signifikan ($\alpha < 0,01$). Uji PostHoc metode LSD menunjukkan perbedaan signifikan antara *scaffold* *S. crassifolium*/HA dengan perbedaan suhu kalsinasi (Tabel 4.14 / Lampiran 11c dan 11d). Perbedaan signifikan dari kekuatan kompresi juga terjadi diantara setiap jenis *scaffold* *S. duplicatum*/HA (Tabel 4.15 / Lampiran 11a dan 11b).

Tabel 4.14. Signifikansi perbedaan nilai degradasi alginat berbasis *S. crassifolium* dan HA dari suhu kalsinasi berbeda

<i>S. crassifolium</i>	HA400°C	HA750°C	HA900°C	Kontrol
HA400	-	-	-	-
HA750	0,001	-	-	-
HA900	0,001	0,01	-	-
ex-Sigma	0,001	0,006	0,009	-

Tabel 4.15. Signifikansi nilai degradasi grup alginat *S. duplicatum* dengan HA dari suhu kalsinasi berbeda

<i>S. duplicatum</i>	HA400°C	HA750°C	HA900°C	Kontrol
HA400°C	-	-	-	-
HA750°C	0,001	-	-	-
HA900°C	0,001	0,001	-	-
ex-Sigma	0,001	0,001	0,001	-

[Tahap 2]

4.2 Kultur Sel Punca Mesenkimal pada Scaffold Alginat/Hidroksiapatit

4.2.1 Toksisitas Scaffold Alginat/Hidroksiapatit

Pada awalnya sampel *scaffold* alginat/HA yang dihasilkan pada penelitian ini tidak steril sehingga tidak dapat dilakukan uji toksisitas. Uji toksisitas menunjukkan viabilitas sel punca mesenkimal pada *scaffold*. Dari uji EPI 20 diketahui bahwa *scaffold* telah terkontaminasi oleh bakteri Gram positif *Brucella spp* (Lampiran 12a, 12b, 12c). Sterilisasi terhadap sampel-sampel *scaffold* alginat/HA dapat menghilangkan kontaminasi bakteri. Uji sterilitas yang dilakukan pada plat agar darah tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri (Lampiran 12a, 12b, 12c).

Hasil uji toksisitas pada sampel *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan *scaffold* ex-Sigma/Aldrich yang telah steril ditunjukkan dengan persentase viabilitas sel punca mesenkimal (Tabel 4.16). Dengan digunakannya konsentrasi ekstrak *scaffold* alginat/HA dengan kepekatan

100% terlihat persentase viabilitas rendah. Hal ini menandakan bahwa paparan ekstrak *scaffold* alginat/HA bersifat menghambat pertumbuhan sel punca mesenkimal. Dari Tabel 4.16 dapat dinilai bahwa ekstrak dari *scaffold* Alginat *S. duplicatum*/HA750°C paling bersifat menghambat pertumbuhan sel punca mesenkimal dibandingkan dengan ketiga jenis *scaffold* lainnya, sedangkan sifat penghambatan pertumbuhan sel akibat ekstrak dari Alginat *S. crassifolium*/HA750°C dan ex-Sigma/Aldrich sebanding.

Tabel 4.16 Persentase viabilitas sel punca mesenkimal tulang pada sampel *scaffold* komposit

Sampel <i>scaffold</i> Komposit	% Viabilitas			
	100%	10%	10 ⁻¹ %	10 ⁻³ %
Alginat <i>S. duplicatum</i> /HA750°C	35	105	109	117
Alginat <i>S. crassifolium</i> /HA750°C	74	128	138	146
ex-Sigma/Aldrich	85	111	151	167

4.2.2 Aktivitas *Alkaline Phosphatase* (ALP)

Kultur sel punca mesenkimal pada sampel *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich selama lima minggu telah berdiferensiasi ke osteoblas. Diferensiasi osteoblas dari sel punca mesenkimal ditunjukkan dengan menggunakan uji *Alizarin Red* selama lima minggu pada hasil kultur 2-D yang memperlihatkan perubahan warna merah pada kultur sel punca mesenkimal (Lampiran 13).

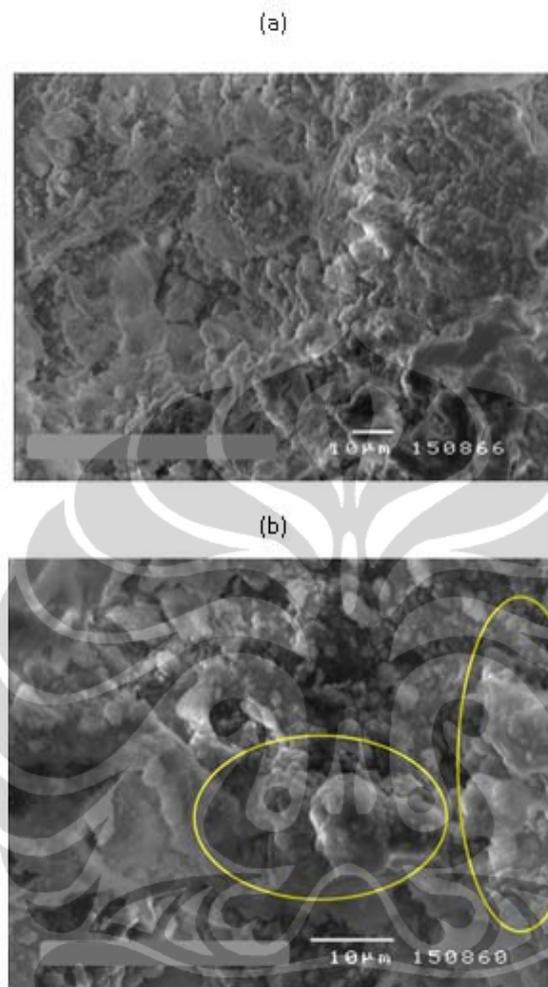
Diferensiasi osteoblas di dalam sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich diamati dari kadar ALP (Tabel 4.17). Kadar ALP yang diperoleh dari *scaffold* komposit alginat secara umum memperlihatkan peningkatan aktivitas ALP. Pertumbuhan sel punca mesenkimal pada sampel *scaffold* komposit alginat *S. crassifolium*/HA750°C sangat drastis dibandingkan dengan yang terjadi pada *scaffold* *S. duplicatum*/HA750°C maupun pada *scaffold* ex-Sigma/Aldrich. Hal ini menunjukkan bahwa diferensiasi osteoblas dapat terjadi di dalam *scaffold* alginat *Sargassum*.

Tabel 4.17 Kadar ALP dari kultur sel punca mesenkimal tulang pada sampel scaffold komposit alginat/HA750°C

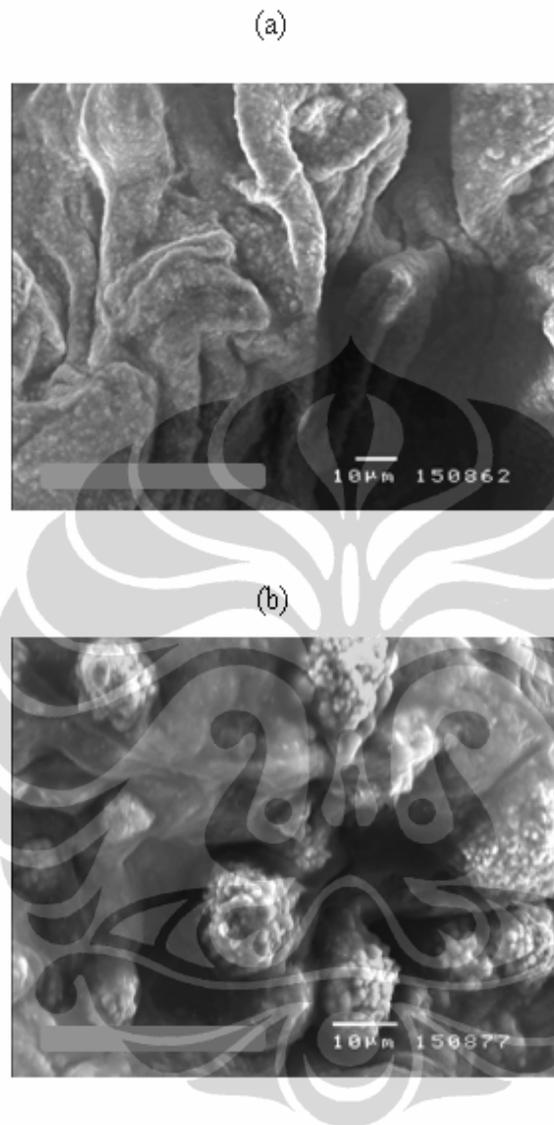
Sampel <i>scaffold</i> komposit	Kadar ALP (IU/L)	
	<i>Blank</i>	Dengan kultur sel
Alginat <i>S. duplicatum</i> /HA750°C	2,62	3,05
Alginat <i>S. crassifolium</i> /HA750°C	2,65	6,07
ex-Sigma/Aldrich	2,69	4,25

4.2.3 Perlekatan Sel Punca Mesenkimal pada *Scaffold-scaffold* Komposit Alginat/Hidroksiapatit

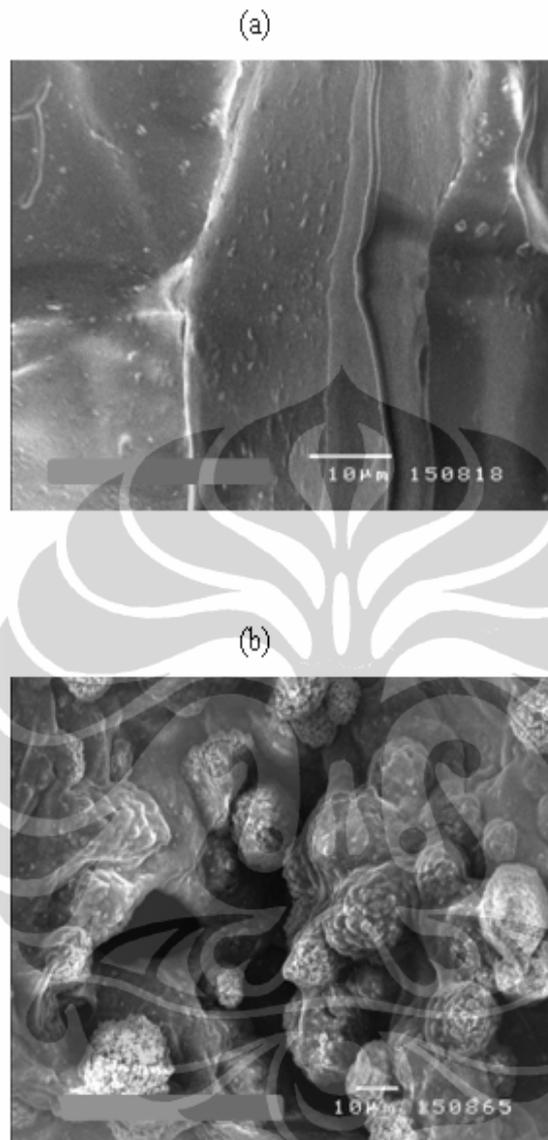
Terdapatnya osteoblas di dalam sampel *scaffold S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich sebagai hasil kultur sel punca mesenkimal yang dilakukan selama lima minggu dengan induksi medium osteogenik. Gambar 4.9a menunjukkan mikrograf sampel *scaffold S. duplicatum*/HA750°C tanpa diberi kultur sel. Setelah dilakukan kultur sel pada sampel *scaffold* walaupun pertumbuhan osteoblas pada sampel *scaffold S. duplicatum*/HA750°C sangat sedikit, dapat diamati adanya perlekatan osteoblas (Gambar 4.9b). Gambar 4.10 menyajikan perlekatan osteoblas pada sampel *scaffold S. crassifolium*/HA750°C. Pada Gambar 4.10a tampak struktur komposit dengan partikel HA tertanam secara menyeluruh pada matriks alginat. Pada mikrograf SEM Gambar 4.10b tampak osteoblas berbentuk sferikal dengan gambaran sekresi di dalam vesikal. Perlekatan osteoblas pada sampel *scaffold S. crassifolium*/HA750°C lebih banyak dibandingkan dengan perlekatan pada sampel *scaffold S. duplicatum*/HA750°C. Perlekatan osteoblas pada sampel *scaffold S. crassifolium*/HA750°C sebanding dengan perlekatan osteoblas pada sampel *scaffold ex-Sigma/Aldrich*, (Gambar 11b).



Gambar 4.9. (a) Sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C blank dan (b) perlekatan osteoblas pada *scaffold* sebagai hasil kultur sel punca mesenkimal



Gambar 4.10. (a) Sampel *scaffold* komposit alginat *S. crassifolium*/HA750°C *blank* dan (b) perlekatan osteoblas pada *scaffold* sebagai hasil kultur sel punca mesenkimal



Gambar 4.11. (a) Sampel *scaffold* komposit *alginat*/HA ex-Sigma Aldrich *blank* dan (b) perlekatan osteoblas pada *scaffold* sebagai hasil kultur sel punca mesenkimal

Bab 5

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini serbuk alginat *S.duplicatum* dan *S.crassifolium* memperlihatkan karakteristik berbeda dan demikian juga dengan serbuk HA, yang dikalsinasi dalam rentang suhu 100°- 900°C. Perbedaan karakteristik yang ditunjukkan oleh kedua serbuk alginat dan perbedaan karakteristik yang diperlihatkan oleh serbuk hidroksiapatit dengan beberapa suhu kalsinasi mengakibatkan beberapa perbedaan karakteristik dari *scaffold-scaffold* alginat *S.duplicatum*/HA atau *S.crassifolium*/HA yang dihasilkan. Dalam beberapa hal juga terdapat perbedaan karakteristik antara *scaffold-scaffold* tersebut jika dibandingkan dengan karakteristik *scaffold* alginat/HA ex-Sigma/Aldrich.

5.1 Alginat sebagai Material *Scaffold* untuk Rekayasa Jaringan

5.1.1 Identifikasi Alginat

Identifikasi yang dilakukan dengan menggunakan karakterisasi FTIR terhadap alginat *S. duplicatum* ataupun *S. crassifolium* menyatakan bahwa serbuk tersebut adalah alginat. Identifikasi ini didasari oleh terdapatnya gugus-gugus –OH dan terutama COO⁻ dan C-O-C pada regio sidik jari (Gambar 4.1/Tabel 4.2). Gugus-gugus COO⁻ dan C-O-C merupakan gugus fungsi yang menyusun alginat, seperti yang ditunjukkan pada rumus bangun alginat pada Gambar 2.15.

Spektrum yang dihasilkan pada penelitian ini sesuai dengan yang diperlihatkan dari sampel serbuk alginat ex-Sigma yang digunakan sebagai pembanding pada penelitian ini. Pada spektrum yang dihasilkan dari sampel serbuk alginat ex-Sigma juga terlihat adanya gugus-gugus COO⁻ dan C-O-C, disamping gugus OH pada bilangan gelombang yang sesuai dengan yang ditunjukkan pada spektrum alginat *S. duplicatum* ataupun *S. crassifolium*. Gugus-gugus COO⁻ dan C-O-C ini sesuai dengan gugus-gugus yang terkandung di dalam protein. Oleh karena itu, keberadaan gugus-gugus tersebut mendukung alginat *S.*

duplicatum ataupun *S. crassifolium* dalam penggunaannya sebagai material *scaffold* rekayasa jaringan.

Spektrum yang dihasilkan pada penelitian ini juga identik dengan yang dihasilkan pada studi Zhang J, et al. (2008), Yulianto K (2007), Mohan N dan Nair PD (2005) serta Soares, et al. (2004). Studi Yulianto K (2007) dan Soares, et al. (2004) berpendapat puncak absorpsi gugus Na-O terdapat di sekitar 1400 cm^{-1} . Hal ini dapat dijelaskan bahwa inti-inti atom yang terikat oleh ikatan kovalen mengalami getaran (vibrasi) atau osilasi, yang biasa dimodelkan dengan dua buah bola yang terikat dengan sebuah pegas. Bila molekul menyerap radiasi inframerah, energi yang diserap menyebabkan kenaikan amplitudo getaran atom-atom yang terikat itu. Hasilnya, molekul ini berada dalam keadaan vibrasi tereksitasi (*excited vibration state*; energi yang terserap ini akan dibuang dalam bentuk panas bila molekul tersebut kembali ke keadaan dasar). Suatu ikatan dalam sebuah molekul dapat menjalani berbagai osilasi. Oleh karena itu, suatu ikatan tertentu dapat menyerap energi pada lebih dari satu panjang gelombang.

Banyaknya energi yang diserap oleh suatu ikatan bergantung pada perubahan dalam momen ikatan. Ikatan nonpolar tidak mengabsorpsi radiasi inframerah karena tidak ada perubahan momen ikatan apabila atom-atom saling berosilasi. Ikatan nonpolar relatif (ikatan C-C dan C-H dalam molekul organik) menyebabkan absorpsi yang lemah. Gugus karboksil (COO^-) merupakan gugus polar yang kuat (Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC, 1981). Berdasarkan hal tersebut, maka keberadaan kondisi atom Na yang berikatan dengan senyawa organik, mungkin saja terdeteksi karena mengakibatkan terjadi perubahan bilangan gelombang pada senyawa organik yang bersangkutan. Sebagai contoh, sebuah studi O-Na (kemungkinan terdeteksi perubahan momen dipol karena adanya peregangan pada molekul Na dan oksigennya) mengidentifikasi adanya vibrasi akibat O-Na pada spektrum FTIR.

Unsur dominan Na yang terdapat pada alginat *S. duplicatum* ataupun *S. crassifolium* berasal dari penambahan NaOH dalam proses ekstraksi alginat. Unsur dominan selanjutnya, yaitu Ca, dapat merupakan akumulasi elemen yang berasal dari lingkungan di dalam laut. Selain unsur dominan, pada kedua jenis

alginat *Sargassum* tersebut terdeteksi adanya *trace element*. Menurut McHugh DJ (1987), *trace element* di dalam serbuk alginat dapat merupakan elemen-elemen dari dalam laut yang terakumulasi di dalam alga saat pembentukan koloid alginat.

Sebagai tambahan, perbedaan warna antara antara alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium* dan ex-Sigma dari penelitian ini mungkin disebabkan oleh pemucat. Warna dari serbuk alginat tersebut merupakan cerminan warna pemucat yang diberikan saat proses ekstraksi alginat. Pada proses ekstraksi alginat dari alga coklat *S. duplicatum*, telah ditambahkan bahan pemucat yang tidak diberikan saat proses ekstraksi alginat dari alga coklat *S. crassifolium*. Oleh karena itu, serbuk alginat *S. duplicatum* berwarna kekuningan dan serbuk alginat *S. crassifolium* berwarna kecoklatan yang dapat merupakan cerminan pigmen fikosantin yang umumnya terkandung di dalam alga.

5.1.2 Analisis Viskositas Alginat

Perbedaan viskositas antara alginat *S. duplicatum* dan *S. crassifolium* dapat ditinjau dari unit G dan M yang terkandung di dalam alginat. Viskositas alginat dapat dihubungkan dengan daerah tumbuh dan jenis alga coklat. Daerah tumbuh dan jenis alga coklat dapat memengaruhi rasio G/M pada alga sehingga secara tidak langsung juga memengaruhi rasio G/M di dalam serbuk alginat. Dari studi Saphiro L dan Cohen S (1999) dihasilkan bahwa rasio G/M yang tinggi mengakibatkan peningkatan viskositas alginat yang digunakan pada studi tersebut. Pada penelitian ini, kemungkinan rasio G/M yang terkandung di dalam serbuk alginat *S. duplicatum* jauh lebih tinggi dibandingkan dengan yang terkandung di dalam serbuk alginat *S. crassifolium* dan alginat ex-Sigma. Akibat dari rasio G/M yang jauh lebih tinggi terdapat pembentukan *egg-box junction* yang jauh lebih banyak, dan menyebabkan larutan menjadi jauh lebih mengental. Oleh karena itu, pada pengukuran viskositas, alginat *S. duplicatum* menunjukkan nilai yang jauh lebih tinggi daripada nilai viskositas kedua jenis alginat lain pada penelitian ini.

Perbedaan viskositas antara alginat *S. duplicatum* dan *S. crassifolium* juga dapat dihubungkan dengan teknik ekstraksi alginat. Serbuk alginat *S. duplicatum*

yang proses ekstraksinya mengikuti metode yang biasa dilakukan di Laboratorium Biotek Kementerian Kelautan Perikanan, menghasilkan serbuk alginat dengan viskositas tinggi. Hal ini mungkin ditujukan untuk produksi makanan agar/*jelly* yang sesuai dengan kategori mutu *food grade*, sedangkan ekstraksi alginat *S. crassifolium* yang proses ekstraksinya mengikuti metode yang biasa dilakukan di Laboratorium Riset BATAN menghasilkan serbuk alginat yang ditujukan untuk kategori *farmaceutical grade*. Perbedaan perolehan kualitas mutu ini berhubungan dengan proses ekstraksi sehingga memengaruhi viskositas alginat.

Nilai viskositas alginat *S. duplicatum* yang dihasilkan dari penelitian ini dapat dibandingkan dengan viskositas dari hasil studi lain yang menggunakan alginat *S. duplicatum*. Nilai-nilai viskositas yang diperoleh dari kedua jenis alginat *Sargassum* (2% w/v) pada penelitian ini (Tabel 4.2) lebih tinggi daripada yang dihasilkan pada studi Chou dan Chiang (1980) di Taiwan, yaitu 111 cP. Namun, nilai viskositas dari penelitian (8844 cP) ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan nilai viskositas (13.500 cP) yang diperoleh pada studi Yulianto K (2003), yang menggunakan alginat *S. duplicatum* yang diperoleh dari Banten juga.

Perbedaan antara alginat *S. duplicatum* dan *S. crassifolium* dapat mengakibatkan perbedaan pertumbuhan sel pada *scaffold* komposit alginat *S.duplicatum*/HA750°C dan *S.crassifolium* /HA750°C. Perbedaan kedua alginat terletak pada unsur yang terkandung di dalam alginat dan viskositas kedua alginat. Alginat *S.duplicatum* mengandung unsur yang dibutuhkan untuk kehidupan sel, yaitu Na dan Ca, yang sebanding dengan yang dimiliki oleh alginat *S.crassifolium*. Sedangkan, *S.crassifolium* mengandung satu unsur lagi yang juga diperlukan oleh sel, yaitu Cl, namun tidak dimiliki oleh alginat *S.duplicatum* ataupun alginat ex-Sigma. Perbedaan viskositas antara kedua alginat mungkin mematasi transfer ion, dalam hal ini ion-ion Na^+ , Ca^{2+} dan Cl^- dari alginat ke dalam sel. Hasil ekstrak dari alga *S. duplicatum* dan *S. crassifolium* telah diidentifikasi sebagai algainat, namun perbedaan unsur dan viskositas yang mungkin membedakan pertumbuhan sel pada *scaffold* yang mengandung alginat *S. duplicatum* dan *S. crassifolium* pada penelitian ini.

5.2 Hidroksiapatit sebagai Material *Scaffold* untuk Rekayasa Jaringan

5.2.1 Identifikasi Hidroksiapatit

Sintesis HA yang menggunakan serbuk Ca(OH)_2 dan H_3PO_4 dengan metode kopresipitasi menghasilkan serbuk HA. Pemilihan H_3PO_4 dan Ca(OH)_2 sebagai prekursor adalah karena reaksi sintesis tidak menghasilkan *by-product* selain H_2O dari hasil reaksinya. Sebagai contoh, pada studi Santos KP, et al. (2009), sintesis HA dengan menggunakan prekursor $\text{Ca(NO}_3)_2$ dan $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ dengan metode sol-gel menemukan $(\text{NH}_4)_3\text{NO}_3$ sebagai *by-product*.

Unsur-unsur dominan Ca dan P yang dihasilkan dari karakterisasi dengan menggunakan XRF tidak dapat menunjukkan fasa yang terdapat di dalam HA (Tabel 4.4). Untuk itu dilakukan analisis dengan XRD. Analisis XRD yang dilakukan terhadap serbuk HA dengan rentang suhu kalsinasi 100°C - 900°C yang dihasilkan dari penelitian ini adalah fasa HA. Hasil tersebut sama dengan yang ditunjukkan pada sampel serbuk HA ex-Aldrich. Hal ini diketahui dari puncak-puncak XRD yang terbentuk, telah berimpit dengan puncak-puncak XRD dari fasa $(\text{Ca}_{10}\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ yang dirujuk dari ICDD no. 09-0432.

Pola XRD yang dihasilkan pada penelitian ini sesuai dengan pola XRD yang dihasilkan dari studi sintesis HA lain. Yoruc ABH dan Koca Y (2009) dan Conz MB (2006) menunjukkan bidang-bidang (002), (210), (211), (202), (310), (222), (213), (004) studi sintesis HA yang menggunakan metoda dan prekursor yang sama dengan penelitian ini, sedangkan studi da Cruz, et al. (2006) atau studi Santos MH, et al. (2004) memperlihatkan bidang-bidang dominan (002), (300), dan (211).

Aplikasi GSAS dengan Rietveld *refinement* menunjukkan bahwa tidak ada fasa kristalin selain fasa HA. Fasa CaO pada serbuk HA 100°C , HA 200°C , dan 300°C yang hanya ditemukan pada bidang (200) dengan fraksi massa 2,14% merupakan sisa dari reaksi pencampuran serbuk Ca(OH)_2 dan H_3PO_4 yang menguap karena suhu kalsinasi mencapai 300°C . Pada reaksi sintesis HA, anion dari larutan fosfat (PO_4^{3-}) berpresipitasi perlahan di dalam suspensi ion metal kalsium (Ca^{2+}). Asam bereaksi dengan suspensi alkali, dimana ion OH^- dari

suspensi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ bereaksi dengan larutan H_3PO_4 . Pada reaksi ini, mungkin tidak semua ion Ca^{2+} bereaksi sehingga sisa yang ada diantara presipitat HA muncul pada HA kalsinasi suhu 100°C , 200°C , dan 300°C .

Pada studi Vazquez CG, Barba CP, dan Munguia N (2005) fasa sekunder CaO masih tetap terdeteksi pada suhu kalsinasi 180°C sampai dengan 800°C , sedangkan pada studi sintesis HA lain, fasa sekunder CaO yang terdeteksi dikatakan merupakan hasil degradasi termal HA. Pada studi Sanosh KP, et al. (2008), fasa sekunder CaO merupakan eksres dengan digunakannya metode sol-gel dengan suhu kalsinasi 700°C .

Seiring dengan meningkatnya suhu kalsinasi HA pada rentang $100^\circ\text{-}900^\circ\text{C}$ terlihat intensitas puncak HA yang terbentuk pada suhu kalsinasi $750^\circ\text{-}900^\circ\text{C}$ lebih tinggi dengan lebar puncak yang sempit jika dibandingkan dengan intensitas puncak perlakuan panas pada suhu kalsinasi $100^\circ\text{-}700^\circ\text{C}$ yang rendah dan cukup lebar. Suhu kalsinasi yang diberikan pada sampel serbuk HA menyebabkan proses difusi partikel-partikel kecil HA menjadi partikel yang lebih besar pada suhu kalsinasi HA yang lebih tinggi. Pada keadaan ini terjadi *grain growth* (pertumbuhan kristal) fasa kristalin dari amorf yang diawali pada suhu kalsinasi 100°C , seiring dengan naiknya suhu kalsinasi menuju 900°C . Pada pertumbuhan kristal ini, partikel-partikel jauh lebih mengkristal dan lebih perfek sehingga pada XRD tampak sebagai puncak-puncak yang lebih tajam dibandingkan dengan puncak-puncak lebar pada suhu kalsinasi lebih rendah karena pertumbuhan kristal yang sangat sedikit.

Pertumbuhan kristal yang terjadi pada HA 900°C dapat dilihat dari hasil karakterisasi TEM. Terlihat bahwa kristalit besar merupakan aglomerasi dari kristalit-kristalit skala nano (Gambar 4.2). Morfologi kristal dari HA yang dihasilkan penelitian ini menyerupai morfologi kristal HA biologik, yaitu merupakan agregat dengan bentuk kristal bervariasi, seperti silinder panjang atau pendek, plat tebal ataupun jarum. Kristal HA yang dihasilkan oleh mayoritas penelitian adalah jarum dan batang karena struktur kristal HA adalah heksagonal dimana $a=b\neq c$.

Karakterisasi dengan FTIR memperlihatkan gugus-gugus $-\text{PO}_4^{3-}$ dan $-\text{CO}_3^{2-}$ pada regio sidik jari. Keberadaan gugus $-\text{PO}_4^{3-}$ menyatakan terbentuknya fasa apatit di dalam sampel-sampel serbuk HA400°C, HA750°C, HA900°C (Gambar 4.3 / Tabel 4.5), sedangkan adanya puncak yang melebar pada daerah sekitar 3400 cm^{-1} merupakan gugus OH. Hal ini dapat terjadi karena serbuk HA bersifat higroskopis sehingga memungkinkan terjadinya hidrasi dari udara. Gugus OH pada regio 3400 cm^{-1} ini disebut air absorpsi, sedangkan gugus OH yang terdeteksi di sekitar bilangan gelombang 633 cm^{-1} merupakan ilustrasi dari air absorpsi (*absorbed water*). Dengan demikian, dinyatakan bahwa apatit yang terbentuk adalah HA. Terdeteksinya gugus $-\text{CO}_3^{2-}$ menandakan bahwa HA di dalam sampel serbuk tersebut adalah HA karbonasi.

Hasil spektroskopi FTIR penelitian ini juga identik dengan studi sintesis HA lain yang menyertakan analisis FTIR, seperti studi-studi Yoruc ABH, Koca Y (2009), Manafi S, Badiee SH (2008); Rossi AM, et al. (2006), Pattanayak DK, et al. (2005), ataupun Sanosh KP, et al. (2000). Puncak absorpsi yang melebar pada gugus PO_4^{3-} , yang ditunjukkan dari sampel serbuk HA ex-Aldrich di sekitar regio $1700\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ dapat dihubungkan dengan tipe HA ex-Aldrich yang digunakan pada penelitian ini, yaitu menggunakan HA tipe khusus untuk aplikasi rekayasa jaringan.

5.2.2 Hidroksiapatit Karbonasi

Sintesis HA pada penelitian ini tidak menggunakan prekursor CaCO_3 , namun terdapat gugus karbonat di dalam fasa HA. Menurut van der Houwen et al., (2003), kemungkinan terdapatnya gugus $-\text{CO}_3^{2-}$ di dalam HA dapat terjadi dengan masuknya gas CO_2 ke dalam larutan HA saat proses sintesis HA yang dilakukan di dalam wadah pada atmosfer terbuka dan kristalisasi terjadi pada suasana alkalin ($\text{pH}=10.5$). Masuknya CO_2 terjadi dengan mekanisme substitusi gugus $-\text{CO}_3^{2-}$ pada gugus OH dan/atau PO_4^{3-} di dalam larutan (van der Houwen et al., 2003). Gas CO_2 dapat masuk kedalam sampel saat dilakukan preparasi sampel dan bereaksi dengan gugus H-O-H yang selanjutnya membentuk gugus $-\text{CO}_3^{2-}$:



Gugus $-\text{CO}_3^{2-}$ ini bertindak sebagai ion substitusi menggantikan posisi ion OH^- dan/atau PO_4^{3-} , membentuk ikatan kimia antara karbonat dengan OH^- ataupun PO_4^{3-} .

Substitusi gugus CO_3^{2-} di dalam struktur kristal HA membentuk HA karbonasi tipe A, B, ataupun tipe A/B (deCampos DDP, Bertran CA, 2009). Munculnya gugus CO_3^{2-} pada sampel terjadi dengan substitusi gugus PO_4^{3-} oleh gugus CO_3^{2-} . Substitusi terjadi pada keseluruhan, yaitu HA400°C, HA750°C, dan HA900°C dan sebagaimana yang terjadi pada HA ex-Aldrich. Dengan adanya substitusi gugus PO_4^{3-} oleh gugus CO_3^{2-} ini, maka HA yang dihasilkan dari penelitian ini adalah HA karbonasi tipe B.

Di dalam tubuh manusia, ion CO_3^{2-} terdapat pada tulang dan enamel sebesar 5-6% yang dapat mempengaruhi kelarutan dan dekomposisi termal dari mineral apatite. Pengantian ion PO_4^{3-} oleh ion CO_3^{2-} pada HA lebih mirip dengan komposisi yang terdapat pada tulang manusia. Dengan terdapatnya ion CO_3^{2-} , dapat dinyatakan bahwa sampel hasil sintesis HA pada penelitian ini mempunyai komposisi yang hampir sama dengan tulang manusia.

5.3 Scaffold Komposit Alginat/Hidroksiapatit

Pada penelitian ini dihasilkan *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich 3D. Dimensi dari *scaffold* tersebut adalah tebal 5 ($\pm 0,5$) mm dan diameter 14 (± 1) mm. Ketebalan sampel 5 ($\pm 0,5$) mm tersebut dipilih untuk memperkecil efek *temperature gradient* saat pembekuan yang memungkinkan perbedaan hasil *scaffold* (Zmora S, Glicklis R, Cohen S, 2002). *Temperature gradient* dapat menyebabkan hasil pembekuan berbeda pada bagian tengah dibandingkan dengan bagian tepi *scaffold*. Selain itu, *temperature gradient* juga dapat mengakibatkan morfologi poros yang terbentuk pada sampel *scaffold* menjadi tidak konsisten. Dimensi sampel *scaffold* ini sama dengan dimensi yang digunakan pada studi Lin H-R, Yeh Y-J (2005).

5.3.1 Pengaruh Suhu Kalsinasi Hidroksiapatit terhadap Derajat Kristalinitas, Ukuran Kristalit, dan Luas muka

Peningkatan suhu kalsinasi menyebabkan perubahan puncak-puncak XRD menjadi semakin tajam. Hal ini disebabkan oleh semakin banyaknya susunan atom dalam keteraturan sehingga struktur HA semakin perfek. Pada Gambar 4.4 terlihat puncak XRD yang makin tajam seiring dengan peningkatan suhu kalsinasi HA dari 100°C menjadi 900°C. Hal demikian menandakan adanya pertumbuhan dari fasa amorf menjadi fasa kristalin. Akibatnya fasa amorf menurun dan fasa kristalin meningkat sehingga hasil pengukuran menunjukkan bahwa seiring dengan peningkatan suhu kalsinasi HA dari 400°C menjadi 900°C, terjadi peningkatan derajat kristalinitas HA dari 57% menjadi 84% (Tabel 4.7).

Dengan suhu kalsinasi HA yang semakin tinggi, diperoleh ukuran kristalit yang semakin besar. Hal ini menandakan adanya pertumbuhan kristal. Pada *rules of stages of Ostwald*, energi Gibbs digunakan untuk kristalisasi melalui proses nukleasi-agregasi/aglomerasi-pertumbuhan (Gambar 2.12). Pada penelitian ini, energi diperoleh dari suhu kalsinasi. Oleh karena itu, terlihat bahwa peningkatan suhu kalsinasi HA dari 400°C sampai dengan 900°C menghasilkan peningkatan ukuran kristalit, yaitu dari 19,8 nm menjadi 37,8 nm (Tabel 4.7). Pengamatan terhadap peningkatan ukuran partikel ini juga terlihat dengan terjadinya pergeseran distribusi ukuran partikel dari ukuran yang lebih kecil menjadi lebih besar (Tabel 4.9).

Seiring dengan peningkatan suhu kalsinasi HA, terjadi penurunan luas muka. Hal ini disebabkan pada suhu kalsinasi lebih tinggi terdapat kristal berukuran besar. Ukuran kristalit besar memberikan luas muka lebih kecil. Oleh karena itu, peningkatan suhu kalsinasi HA dari 400°C menjadi 900°C menghasilkan penurunan luas muka dari 80,9 menjadi 42,2 m²/g (Tabel 4.8). HA400°C yang diperoleh ini telah meniru HA biologik yang memiliki derajat kristalinitas rendah, ukuran kristalit kecil, dan luas muka yang sangat luas. Jika dibandingkan dengan hasil studi Sanosh KP, et al. (2008), derajat kristalinitas yang diperoleh dari penelitian ini lebih rendah. Selain itu, ukuran kristalit yang diperoleh dari HA dengan suhu kalsinasi rendah juga lebih kecil (Tabel 5.1).

Untuk rekayasa jaringan, *scaffold* harus mampu terdegradasi seiring dengan pertumbuhan sel di dalamnya. Degradasi material lebih mudah terjadi pada bahan dengan derajat kristalinitas rendah, ukuran kristalit yang kecil, dan luas muka yang besar.

Tabel 5.1 Derajat kristalinitas dan ukuran kristalit dari sampel serbuk HA

Penelitian ini		Sanosh K, et al. (2008)		
Serbuk HA	Derajat Kristalinitas (%)	D (nm)	Derajat Kristalinitas (%)	
HA400°C	57,16	19,80	44	31
HA750°C	62,70	23,84	78	88
HA900°C	71,99	36,27	88	61
HA ex-Aldrich	84,06	37,84	-	-

Dari hasil penelitian ini, terlihat bahwa HA400°C memiliki derajat kristalinitas paling rendah, ukuran kristalit paling kecil, dan luas muka paling besar diantara HA yang digunakan. Hal ini disebabkan pada HA400°C, energi panas belum mengakibatkan terjadinya kristalisasi sepenuhnya sehingga pertumbuhan kristal belum terjadi sepenuhnya pula. Pada tahap ini, HA400°C masih menunjukkan ukuran kristalit yang kecil dengan luas muka lebih besar dibandingkan dengan ukuran kristalit yang lebih besar dan luas muka lebih kecil pada HA750°C dan HA900°C (Tabel 4.7). Pada HA dengan luas muka lebih besar, terbuka kemungkinan daerah yang terekspos oleh larutan perendam menjadi semakin luas sehingga terjadi degradasi yang lebih besar.

5.3.2 Pengaruh Suhu Kalsinasi Hidroksiapatit dan Viskositas Alginat terhadap Degradasi *Scaffold* Komposit Alginat/Hidroksiapatit

Di dalam sebuah struktur komposit, degradasi terjadi pada semua fasa yang menyusun struktur tersebut. Fasa alginat dan fasa HA berpengaruh terhadap degradasi *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C dan ex-Sigma/Aldrich. Biopolymer adalah material yang mudah mengalami biodegradasi. Sebagaimana dijelaskan dalam studi Shapiro L, Cohen S (1997)

bahwa saat perendaman, sampel alginat yang digunakan pada penelitian tersebut telah mengalami pelepasan kation divalen. Pada penelitian ini, degradasi *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan alginat ex-Sigma/Aldrich terjadi pada alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, dan alginat ex-Sigma.

Degradasi *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan alginat ex-Sigma/Aldrich terjadi saat perendaman *scaffold* di dalam cairan fisiologis Ringer selama lima minggu. Saat perendaman terjadi pelepasan *crosslink* yang telah terbentuk di dalam Ca-alginat, sebagai hasil penambahan larutan *crosslinker* CaCl₂ pada proses pembentukan gel alginat. Dengan lepasnya Ca²⁺ dari Ca-alginat, maka terbentuk Na-alginat kembali (Gambar 2.16). Struktur Na-alginat dalam struktur *crosslink* tidak menunjukkan penurunan integritas material sehingga alginat tidak mudah larut dalam air.

Di dalam sistem komposit, HA berperan sebagai filler yang berfungsi sebagai *reinforcement* (penguat). Penggunaan HA dengan suhu kalsinasi lebih rendah memberikan kekuatan kompresi yang lebih rendah. Pada suhu kalsinasi HA400°C belum terjadi difusi sehingga jarak antaratom relatif lebih jauh. Hal ini dapat dijelaskan dengan hukum Debye yang menyatakan bahwa jarak berbanding terbalik dengan energi ikat. Dalam hal ini, energi ikat pada kristal HA400°C yang memiliki jarak atom lebih jauh menunjukkan kekuatan ikat yang lebih rendah jika dibandingkan dengan HA750°C dan HA900°C.

Peran HA400°C di dalam *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA400°C dalam menahan beban kompresi lebih rendah daripada peran HA750°C ataupun peran HA900°C di dalam masing-masing *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA; demikian pula halnya dengan *scaffold* yang menggunakan alginat *S. crassifolium*. Hal ini disebabkan oleh dua hal yang terdapat di dalam HA400°C. Pertama adalah HA400°C memiliki luas muka paling besar. Dengan luas muka yang lebih luas, maka permukaan yang terekspos oleh cairan fisiologis lebih banyak. Hal kedua adalah HA400°C paling rendah dalam menahan kekuatan kompresi. Secara keseluruhan, komposit *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA400°C, *S. crassifolium*/HA400°C, dan alginat ex-Sigma/Aldrich yang direndam di dalam

larutan fisiologis Ringer selama lima minggu mengalami penurunan berat *scaffold* lebih besar jika dibandingkan dengan *scaffold* sama yang menggunakan suhu kalsinasi 750°C dan HA900°C.

Penggunaan *scaffold* di dalam tubuh perlu mempertimbangkan faktor degradasi dan faktor kekuatan mekanik. *Scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA400°C dan *S. crassifolium*/HA400°C telah menunjukkan degradasi terbesar diantara *scaffold* yang digunakan dalam penelitian ini. Namun, kultur sel yang dilakukan pada penelitian ini telah menggunakan *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C dan *S. crassifolium*/HA750°C. Pemilihan ini didasari oleh pertimbangan bahwa *scaffold* *S. duplicatum*/HA900°C memiliki nilai kekuatan kompresi tidak berbeda signifikan dengan *scaffold* *S. duplicatum*/HA750°C. Sama halnya dengan *scaffold* *S. crassifolium*/HA900°C yang kekuatan kompresinya tidak berbeda signifikan dengan *scaffold* *S. crassifolium*/HA750°C.

Dibandingkan dengan studi lain, nilai kekuatan kompresi sampel-sampel *scaffold* *S. duplicatum*/HA atau *S. crassifolium*/HA, yaitu 2,67 Mpa dan 2,19 Mpa (Tabel 4.11), lebih rendah daripada nilai kekuatan kompresi *scaffold* alginat/HA pada studi Turco G, et al. (2008), yaitu 6,3 Mpa. Hal ini mungkin karena gelasi penelitian ini menggunakan *crosslinker* CaCl₂, sedangkan pada studi Turco G, et al. (2008) menggunakan *crosslinker* GDL. Penggunaan GDL sebagai sumber Ca²⁺ memungkinkan terjadinya gelasi yang lebih homogen dibandingkan jika menggunakan CaCl₂. Disamping itu, kecepatan pengadukan dengan *homogenizer* pada penelitian ini ± 7.000 rpm, sedangkan pada studi G, et al. (2008) adalah 26.000 rpm. Dengan kecepatan putar yang tinggi, yaitu 20.000 rpm dibandingkan dengan 7.000 rpm, distribusi Ca menambah homogenitas gel dengan merata. Namun, nilai kompresi yang diperoleh pada penelitian ini mayoritas berada pada kisaran nilai kompresi tulang spongiosa manusia, yaitu 1,5-38 MPa (Guo, XE, 2001).

5.4 Penggunaan *Scaffold* Komposit Alginat/Hidroksiapatit untuk Kultur Sel Mesenkimal

Preparasi *scaffold S. duplicatum/HA750°C* atau *S.crassifolium/HA750°C* dengan menggunakan metode pengeringan beku menghasilkan *scaffold* dengan arsitektur struktur mikroporos yang saling berhubungan, sebagaimana terlihat dari mikrograf SEM (Gambar 4.8). Pengeringan beku pada *rich polymer phase* menghasilkan dinding poros dengan struktur komposit, sedangkan pengeringan pada *scaffold* beku mengakibatkan sublimasi sehingga terjadi penguapan dari *poor polymer phase*, yang pada dasarnya adalah solven air, dan meninggalkan poros pada struktur alginate/HA. Oleh karena itu, poros yang dihasilkan *scaffold* adalah poros yang saling berhubungan.

Untuk pertumbuhan osteoblas di dalam *scaffold*, ukuran minimal diameter poros adalah 100-300µm. Sampel *scaffold* yang dihasilkan dari penelitian ini memiliki poros dengan diameter 100-200 µm (Gambar 4.8). Poros saling berhubungan dengan diameter 100-200 µm yang terbentuk pada *scaffold* alginat *S. duplicatum/HA750°C*, *S. crassifolium/HA750°C*, dan *scaffold* ex-Sigma/Aldrich memungkinkan terjadinya vaskularisasi dan pertumbuhan osteoblas ke segala arah dan membentuk jaringan 3D.

Dibandingkan dengan hasil studi lain, diameter tersebut berada dalam kisaran ukuran diameter poros pada *scaffold* 3D dari studi Turco G, et al. (2008), yaitu 100-300 µm, dan studi Lin, Yeh (2005), yaitu 150 µm. Ukuran poros ini dibentuk dengan rasio alginat/HA 50/50. *Scaffold* yang dipreparasi dengan rasio HA lebih besar cenderung menghasilkan ukuran poros yang lebih kecil, bahkan menghasilkan penutupan poros.

Morfologi ini serupa dengan morfologi poros pada *scaffold* hasil studi Turco G, et al. (2008) dan, Lin H-R, Yeh Y-J (2005), yang menggunakan metode preparasi *scaffold* yang sama. Morfologi poros ini berbeda dengan yang dihasilkan pada studi Bernhardt A, et al., 2009; Dittrich R, et al. (2007) dengan metode *diffusion controlled ionotropic gelation* yang menghasilkan poros paralel (*pararely orientated tube-like pores*). Dari studi Zamora S, Glicklis R, Cohen S (2002) ditemukan bahwa arsitektur poros yang saling berhubungan pada *scaffold* penting karena alginat dapat memengaruhi pertumbuhan sel yang disemai pada *scaffold*.

Pada penelitian ini, digunakan sel punca mesenkimal yang berasal dari sumsum tulang (femur) manusia. Sel punca mesenkimal dipilih karena dapat berdiferensiasi menjadi osteoblas. Kemampuan sel tersebut dibuktikan dari hasil uji *Alizarin Red* kultur sel punca mesenkimal pada plat kultur 2D. Selain itu, dipilihnya sel punca mesenkimal adalah karena pada praktiknya osteoblas dapat digunakan untuk merekonstruksi defek pada tulang rahang.

Sampel-sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich pada awalnya tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan sel. Oleh karena itu, dilakukan sterilisasi dan uji toksisitas terhadap sampel-sampel *scaffold*. Sterilisasi terhadap sampel-sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich dilakukan untuk membebaskan kontaminasi bakteri dan jamur dari sampel-sampel *scaffold* tersebut.

5.4.1 Uji Sterilitas dan Uji Toksisitas

Sterilisasi dengan menggunakan larutan etanol absolut dipilih karena mampu menghindari kontaminasi bakteri Gram (+) *Brucella spp* yang ditemukan pada uji EPI20 terhadap sampel-sampel *scaffold*. Sterilisasi dengan menggunakan etanol absolut juga telah dilakukan pada studi Lin H-R, Yeh Y-J (2004) dan studi Turco G, et al. (2009). Sterilisasi dengan menggunakan radiasi sinar Gamma yang banyak dilakukan pada *scaffold* HA tidak dilakukan pada penelitian ini karena sampel *scaffold* pada penelitian mengandung alginat. Pada studi Bernhardt A, et al. 2009; Dittrich R, et al.,2007) sterilisasi dengan menggunakan radiasi sinar Gamma terhadap *scaffold* alginat/HA telah memengaruhi properti mekanik dari material tersebut.

Uji toksisitas dengan menggunakan konsentrasi larutan uji (medium kultur) 100% memperlihatkan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan hasil kultur sel pada sampel-sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan ex-Sigma/Aldrich (Gambar 4.18). Studi Lu J, et al. (2004) menjelaskan bahwa kultur jaringan dapat terganggu karena adanya

degradasi partikel dari *scaffold* dan mengenai sel. Pada penelitian ini ditunjukkan adanya degradasi pada sampel *scaffold* *S. duplicatum*/750°C ataupun *S. crassifolium*/750°C. Dapat dikatakan bahwa material yang terdegradasi menghambat pertumbuhan hasil kultur sel. Jika dihubungkan dengan kemungkinan adanya kandungan polifenol di dalam alginat, maka polifenol dapat merupakan salah satu bagian yang terdegradasi. Pada penelitian ini tidak dilakukan purifikasi terhadap sampel serbuk alginat. Studi Lu Lu YQ, Zhou C, Luo B (2009), memperlihatkan purifikasi alginat dapat menurunkan kandungan polifenol menjadi 0,4% dari konsentrasi awal.

Dengan konsentrasi pengenceran 10% terlihat persentase viabilitas meningkat menjadi 90% pada studi Theiszova M, et al. (2005), sedangkan pada penelitian ini adalah 109% dan 138%, berurutan untuk sampel-sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C dan *S. crassifolium*/HA750°C. Dibandingkan dengan hasil studi lain, pada studi Theiszova M, et al. (2005), persentase viabilitas dari ekstrak HA 100% adalah 40-50%. Sementara, pada penelitian ini, persentase viabilitas dari ekstrak HA 100% berkisar pada 35% dan 74%, berurutan untuk sampel-sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C dan *S. crassifolium*/HA750°C.

Di dalam tubuh, diferensiasi osteoblas terjadi secara alami dengan adanya unsur-unsur pertumbuhan yang berasal dari tubuh sendiri. Pada penelitian ini, digunakan medium osteogenik yang ditambahkan pada kultur sel punca mesenkimal pada sampel *scaffold* untuk menginduksi sel tersebut berdiferensiasi menjadi osteoblas. Penambahan antibiotik pada larutan DMEM dilakukan untuk menghambat pertumbuhan jamur dan bakteri yang mungkin terjadi selama proses kultur sel pada sampel-sampel *scaffold* walaupun telah dilakukan sterilisasi sebelumnya. Pemilihan jenis antibiotik sesuai dengan adanya kontaminasi bakteri jenis Gram (+).

5.4.2 Pertumbuhan Osteoblas pada Scaffold Alginat/Hidroksiapatit

Scaffold alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan alginat/HA ex-Sigma/Aldrich yang dihasilkan dari penelitian ini, secara umum,

dapat digunakan untuk kultur sel punca mesenkimal. Hasil kultur sel punca mesenkimal pada *scaffold* menunjukkan aktivitas ALP dan perlekatan sel pada masing-masing *scaffold*. Pada penelitian ini, aktivitas ALP menunjukkan bahwa sel punca mesenkimal tulang telah berdiferensiasi menjadi osteoblas. Diferensiasi osteoblas ini terjadi di dalam sampel-sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan alginat/HA ex-Sigma/Aldrich yang ditunjukkan dari peningkatan kadar ALP (Tabel 4.17).

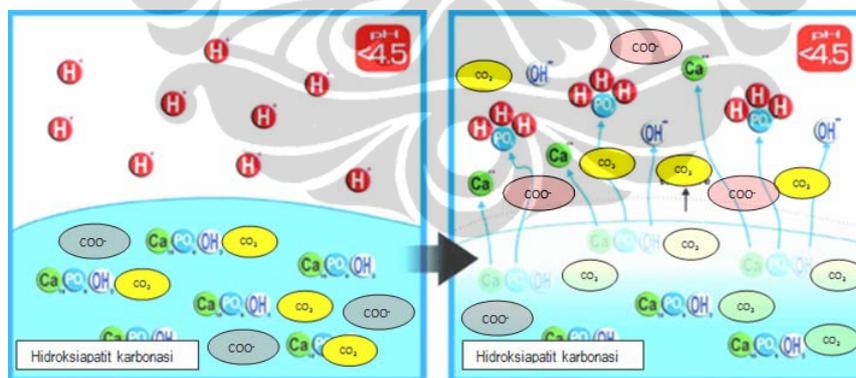
Hal ini juga didukung dari hasil kultur 2D selama lima minggu dengan pewarnaan *Alizarin Red*. Warna merah dan pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa sel punca mesenkimal tulang telah berdiferensiasi menjadi osteoblas.

Kadar ALP dari hasil kultur sel pada sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C yang lebih rendah daripada kadar ALP *S. crassifolium*/HA750°C atau alginat/HA ex-Sigma/Aldrich dapat dihubungkan dengan hasil uji toksisitas. Dibuktikan bahwa persentase viabilitas sel punca mesenkimal dari hasil kultur pada sampel *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C lebih rendah daripada kadar ALP *S. crassifolium*/HA750°C atau alginat/HA ex-Sigma/Aldrich (Tabel 4.16).

Hasil kultur sel punca mesenkimal juga telah diperlihatkan dengan adanya perlekatan osteoblas pada *S. duplicatum*/HA750°C yang lebih rendah daripada kadar ALP *S. crassifolium*/HA750°C atau alginat/HA ex-Sigma/Aldrich. Perlekatan osteoblas pada *S. duplicatum*/HA750°C lebih rendah daripada yang terlihat pada *S. crassifolium*/HA750°C. Dari mikrograf SEM terlihat partikel HA750°C terbuka sehingga *scaffold* *S. crassifolium*/HA400°C tidak lagi merupakan suatu komposit. Gambaran ini menandakan kemungkinan alginat telah terlepas dari perlekatannya dengan partikel HA. Terlepasnya alginat dari HA merupakan pertanda kurang baiknya adhesi antara alginat dan HA. Ditinjau dari nilai viskositas alginat yang sangat tinggi, kemungkinan alginat terlepas dari partikel HA adalah dalam bentuk *bulk*. Bentuk tersebut tidak larut di dalam medium kultur DMEM. Oleh karena alginat yang terlepas masih dalam bentuk

bulk, maka nilai kekuatan mekanik dari *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA400°C tetap tinggi.

Perlekatan osteoblas pada *scaffold* HA dapat dijelaskan dengan interaksi antara osteoblas dan komponen yang terkandung di dalam *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C dan alginat/HA ex-Sigma/Aldrich. Menurut Barrere et al. (2003), interaksi antara permukaan *scaffold* dan sel terjadi melalui transfer ion yang berlangsung dari fasa padat ke fasa cair. Terlepasnya komponen dari dalam *scaffold* dipengaruhi oleh kemampuan material mengalami degradasi. Pada penelitian ini, digunakan *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C dan *S. crassifolium* /HA750°C yang memiliki nilai degradasi lebih besar daripada yang ditunjukkan oleh *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA900°C dan *S. crassifolium*/HA900°C. Komponen-komponen yang terlepas dari sampel-sampel *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan alginat/HA ex-Sigma/Aldrich ke dalam larutan/medium DMEM adalah ion-ion Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , OH^- , COO^- dan impuritas CO_3^{2-} (Gambar 5).



Gambar 5. Lepasnya ion-ion dari fasa padat *scaffold* alginat *S.duplicatum*/HA750°C atau *S.crassifolium* /HA750°C ke fasa cair di lingkungannya

Transfer ionik juga berlangsung dari fasa cair ke fasa padat. Dalam hal ini, ion-ion yang terlepas dari *scaffold* masuk ke dalam sel. Ion OH^- dapat memasuki sel secara difusi, sedangkan ion-ion memasuki sel melalui *ion channels* (saluran ion), yang terdapat di dalam membran sel (Gambar 2.4). Ion Na^+ memasuki sel

melalui saluran natrium, sedangkan ion-ion Ca^{2+} dan Cl^- memasuki sel melalui saluran-saluran ion yang jumlahnya banyak, yang disebut saluran klorida. Di dalam sel, terdapat vesikel yang terletak di bawah membran sel. Vesikel ini merupakan wadah dari sekresi osteoblas yang telah melekat pada *scaffold*.

Pertumbuhan osteoblas di dalam *scaffold-scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA750°C, *S. crassifolium*/HA750°C, dan alginat/HA ex-Sigma/Aldrich dapat dikaitkan dengan komponen yang dilepas dari material *scaffold*. Pada penelitian ini, pertumbuhan osteoblas di dalam sampel *scaffold* alginat *S. crassifolium*/HA lebih banyak dibandingkan dengan pertumbuhan di dalam *S. duplicatum*/HA750°C. Hal ini dapat dihubungkan dengan kandungan unsur Cl^- di dalam alginat *S. crassifolium* yang cukup tinggi (30%), seperti yang ditunjukkan dari hasil uji XRF. Unsur Cl^- merupakan salah satu komponen yang diperlukan oleh sel untuk terjadinya proliferasi dan diferensiasi suatu sel. Perbedaan unsur Cl^- ini memungkinkan perbedaan dalam pertumbuhan osteoblas pada sampel-sampel *scaffold* *S. duplicatum*/HA750°C dan *S. crassifolium*/HA750°C.

Menurut Barrere et al. (2003), adanya protein memungkinkan fasa mineral yang baru terbentuk juga disertai oleh komponen organik. Komponen tersebut dapat menstimulir terjadinya nukleasi dan pertumbuhan kristal kalsium fosfat. Pada penelitian ini, alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, dan alginat ex-Sigma mengandung gugus COO^- dan rantai C (Gambar 1). Komponen-komponen tersebut merupakan bagian dari gugus protein, yang merupakan unsur utama dari sel. Gugus-gugus tersebut dapat memasuki sel melalui saluran protein yang terdapat pada membran sel. Dengan adanya gugus-gugus yang merupakan penyusun protein, maka pertumbuhan osteoblas di dalam *scaffold* alginat *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, dan alginat ex-Sigma telah disertai oleh bahan organik.

Pertumbuhan osteoblas di dalam *scaffold* juga dapat dikaitkan dengan komponen yang dilepas dari material *scaffold*. Pada penelitian ini, pertumbuhan osteoblas di dalam sampel *scaffold* alginat *S. crassifolium*/HA lebih banyak dibandingkan dengan pertumbuhan di dalam *S. duplicatum*/HA750°C. Hal ini

dapat dihubungkan dengan sampel alginat *S. crassifolium* yang mengandung unsur Cl dalam konsentrasi cukup tinggi (30%) seperti yang ditunjukkan dari hasil uji XRF. Unsur Cl merupakan salah satu komponen yang diperlukan dalam terjadinya proliferasi dan diferensiasi sel. Perbedaan kandungan komponen ini memungkinkan adanya perbedaan besar dalam pertumbuhan osteoblas pada sampel-sampel *scaffold S. duplicatum/HA750°C* dan *S. crassifolium/HA750°C*, sedangkan pertumbuhan osteoblas di dalam sampel-sampel *scaffold S. crassifolium/HA* dan alginat/HA ex-Sigma/Aldrich sebanding karena sampel serbuk HA ex-Aldrich yang digunakan pada penelitian ini khusus untuk aplikasi rekayasa jaringan. Hal ini dapat dihubungkan dengan hasil karakterisasi dengan menggunakan FTIR yang menunjukkan gugus fosfat memiliki puncak absorpsi melebar pada bilangan gelombang di sekitar 1050 cm^{-1} .

Banyaknya komponen-komponen yang dilepas oleh *scaffold* didukung oleh disolusi dari material *scaffold*. Pada penelitian ini, digunakan HA750°C karena menunjukkan derajat kristalinitas yang lebih rendah, ukuran kristalit lebih kecil, dan luas muka lebih besar daripada yang ditunjukkan oleh HA900°C. Sifat-sifat tersebut telah menunjukkan peningkatan degradasi pada sampel-sampel *scaffold S.duplicatum/HA750°C*, *S. crassifolium/HA750°C*, dan alginat/HA ex-Sigma/Aldrich. Nilai degradasi yang lebih tinggi ini menandakan nilai disolusi.

Hasil penelitian penggunaan *scaffold* alginat/HA ex-Sigma/Aldrich pada penelitian ini dapat dibandingkan dengan hasil studi lain. Melalui mikroskop SEM, perlekatan osteoblas yang dihasilkan penelitian ini, secara umum terlihat identik dengan hasil studi Lin H-R, Yeh Y-J (2004) (Gambar 2.15). Jika dilakukan pengamatan yang lebih teliti, perlekatan osteoblas pada sampel-sampel *S. crassifolium/HA750°C* dan alginat/HA ex-Sigma/Aldrich tampak lebih jelas dibandingkan dengan yang dihasilkan pada studi lain tersebut di atas. Hal ini disebabkan oleh penggunaan sel punca mesenkimal pada penelitian ini, sedangkan pada penelitian lain menggunakan osteoblas. Pada kultur sel punca mesenkimal perlekatan terjadi pada akhir stadium proliferasi dan awal stadium diferensiasi yang memungkinkan interaksi *scaffold*-sel lebih banyak dibandingkan dengan kultur yang menggunakan osteoblas.

5.5 Implikasi Hasil Penelitian

Penelitian ini telah menghasilkan *scaffold* *S. duplicatum*/HA750°C dan *S. crassifolium*/HA750°C yang dapat memperlihatkan diferensiasi osteoblas. Namun, dari hasil karakterisasi BET, luas muka lebih besar ditunjukkan pada HA400°C dibandingkan dengan HA750°C. Disamping itu, ditinjau dari degradasi *scaffold*, terlihat bahwa *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA400°C dan *S. crassifolium*/HA400°C juga memiliki degradasi lebih besar jika dibandingkan dengan kedua *scaffold* lain pada penelitian ini. Oleh karena itu, untuk memanfaatkan HA400°C sebagai material *scaffold*, beberapa usaha dapat dilakukan.

Pada penggunaan HA400°C dengan alginat *S. duplicatum*, perlu dilakukan usaha memperoleh adhesi antaralginat *S. duplicatum* dan HA400°C yang baik. Dengan adanya adhesi antara *S. duplicatum* dan HA400°C yang baik, maka dapat dihasilkan *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA400°C yang baik pula. Dengan menggunakan *scaffold* komposit *S. duplicatum*/HA400°C ini diharapkan aplikasi kultur sel mesenkimal dapat menghasilkan perlekatan osteoblas yang lebih banyak.

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa alginat *S. duplicatum* menunjukkan aktivitas ALP dan perlekatan sel pada *scaffold* yang lebih rendah jika dibandingkan dengan yang diperlihatkan oleh *scaffold* alginat *S. crassifolium*/HA750°C. Hal ini dapat disebabkan oleh peningkatan drastis viskositas larutan alginat *S. duplicatum* dari 2% ke 3%. Untuk itu dapat dilakukan preparasi *scaffold* menggunakan alginat *S. duplicatum* dengan konsentrasi yang lebih rendah dari 3%. Oleh karena itu, perlu dilakukan studi pendahuluan penggunaan alginat *S. duplicatum*/hidroksiapatit dengan konsentrasi larutan alginat, misalnya 1,5%, 2%, atau 2,5%.

Pada penggunaan HA400°C dengan alginat *S. crassifolium* perlu dilakukan usaha meningkatkan kekuatan kompresi dari *scaffold* alginat *S. crassifolium*/HA400°C. Usaha yang dapat dilakukan adalah memodifikasi alginat *S. crassifolium* sehingga dapat meningkatkan kekuatan kompresinya.

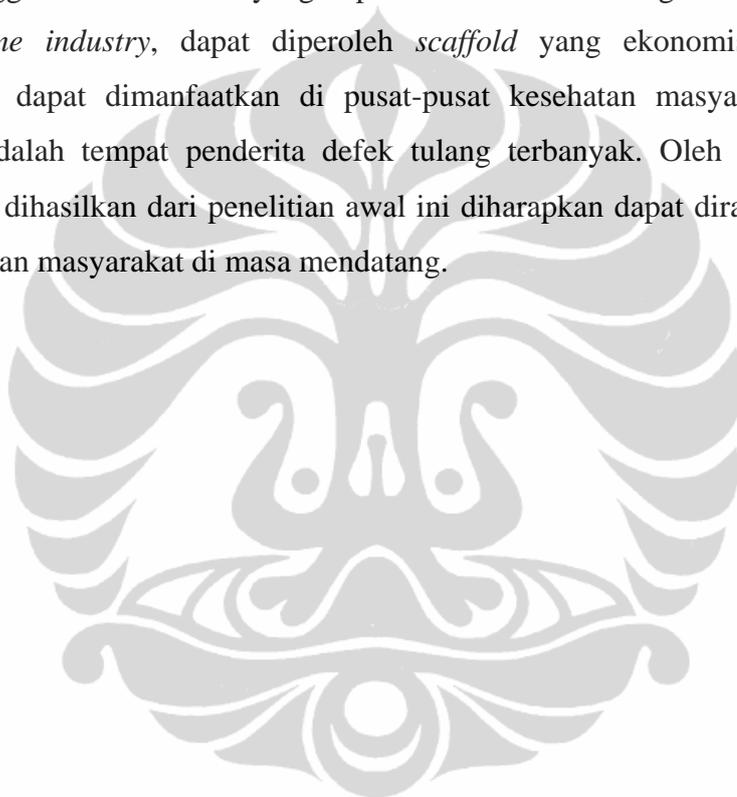
Meningkatkan rasio alginat *S. crassifolium*/HA lebih dari 50/50 dapat memperkecil diameter poros. Usaha lain yang dapat dilakukan adalah dengan menambahkan biopolimer sejenis ke dalam alginat *S. crassifolium*. Dengan menggunakan formula sitosan/alginat *S. crassifolium* yang dikomposit dengan HA400°C, diharapkan dapat diperoleh *scaffold* sitosan/alginat *S. crassifolium*/HA400°C dengan kekuatan kompresi yang lebih baik.

Hasil dari penelitian awal ini selanjutnya dapat dikembangkan. Hidroksiapatit dalam bidang kedokteran gigi sudah cukup lama dikenal. Hidroksiapatit ini banyak diaplikasikan untuk rekayasa jaringan pada resesi gingiva, pascaekstraksi gigi atau pascaoperasi minor rahang. Namun, penggunaan hidroksiapatit tersebut dalam bentuk serbuk. Untuk defek-defek lebih luas, diperlukan hidroksiapatit dalam bentuk 3D sehingga pertumbuhan tulang dapat terjadi secara 3D pula. Pada penelitian ini telah dihasilkan *scaffold* dengan bentuk 3D agar dapat diaplikasikan pada defek yang lebih luas. Desain *scaffold* juga dapat dirancang sesuai dengan bentuk rahang yang mengalami defek. Namun, *scaffold* komposit alginat/HA yang diperoleh dari penelitian ini belum dapat langsung diaplikasikan secara klinis karena masih merupakan penelitian awal.

Pada penelitian awal ini, pengamatan terhadap degradasi *scaffold* alginat/hidroksiapatit dilakukan dalam jangka pendek, sedangkan kinetik degradasi merupakan pengamatan jangka panjang. Sekalipun telah memperlihatkan keberhasilan kultur sel punca mesenkimal yang menghasilkan diferensiasi osteoblas di dalam *scaffold S. duplicatum*/HA750°C dan *S. crassifolium*/HA750°C, bahkan salah satunya dapat dibandingkan dengan hasil dari *scaffold* alginat/HA ex-Sigma/Aldrich, *scaffold* yang merupakan hasil penelitian jangka pendek belum mencakup pengamatan *scaffold* dari berbagai sudut. Namun, hasil penelitian *scaffold* alginat/HA jangka pendek ini secara umum dapat dijadikan pedoman dalam penelitian lanjutan.

Pedoman *scaffold* yang dihasilkan penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan pada penelitian-penelitian lanjutan yang dilakukan secara bertingkat. Penelitian bertingkat dapat diawali dari studi laboratorium dan in vitro untuk mengamati karakteristik *scaffold* dalam hubungannya dengan pertumbuhan

sel di dalam *scaffold*, karakteristik pertumbuhan sel itu sendiri di dalam *scaffold*, serta interaksi antara *scaffold* dan sel. Penelitian tingkat berikutnya adalah dalam bentuk uji coba secara *in vivo* pada hewan coba dan akhirnya uji efikasi *scaffold* pada manusia. Melalui hasil penelitian bertingkat, diharapkan juga *scaffold* alginat/hidroksiapatit dapat dilanjutkan ke studi perancangan teknologi *scaffold* tepat guna yang nantinya dapat diajukan sebagai kandidat *scaffold* alginat/hidroksiapatit produk dalam negeri komersial dengan perolehan HAKI. Dengan menggunakan material yang diperoleh dari dalam negeri serta proses produksi *home industry*, dapat diperoleh *scaffold* yang ekonomis. *Scaffold* ekonomis ini dapat dimanfaatkan di pusat-pusat kesehatan masyarakat yang sebenarnya adalah tempat penderita defek tulang terbanyak. Oleh karena itu, *scaffold* yang dihasilkan dari penelitian awal ini diharapkan dapat dirasakan oleh berbagai lapisan masyarakat di masa mendatang.



Bab 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Serbuk alginat telah berhasil diekstraksi dari alga *S.duplicatum* dan *S.crassifolium* dan menunjukkan gugus-gugus yang menunjang pertumbuhan sel punca mesenkimal.
2. Serbuk hidroksiapatit telah berhasil disintesis dari prekursor Ca(OH)_2 dan H_3PO_4 dengan menggunakan metode presipitasi dan menunjukkan gugus-gugus yang menunjang pertumbuhan sel punca mesenkimal.
3. *Scaffold* 3-D poros dengan struktur komposit telah berhasil dipreparasi dengan menggunakan serbuk alginat *S. duplicatum* atau alginat *S. crassifolium* dengan serbuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 400°C , 750°C , dan 900°C yang diperoleh dari penelitian ini.
4. Penurunan suhu kalsinasi hidroksiapatit dari 900°C sampai dengan 400°C menghasilkan hidroksiapatit dengan derajat kristalinitas yang semakin rendah, ukuran kristalit yang semakin kecil, dan luas muka yang semakin besar
5. *Scaffold* alginat *S.duplicatum/HA400^\circ\text{C}* atau alginat *S.crassifolium/HA400^\circ\text{C}* telah menunjukkan nilai degradasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan *scaffold* yang menggunakan hidroksiapatit kalsinasi suhu 750°C atau 900°C .
6. *Scaffold* dari komposit alginat *S. duplicatum/HA750^\circ\text{C}* dan alginat *S. crassifolium/HA750^\circ\text{C}* dipilih untuk penggunaan kultur sel punca mesenkimal berdasarkan nilai degradasi dengan mempertimbangkan kekuatan kompresi.
7. Kultur sel punca mesenkimal pada *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum/HA750^\circ\text{C}* dan alginat *S. crassifolium/HA750^\circ\text{C}* menunjukkan terdapatnya pertumbuhan sel punca mesenkimal, yaitu bahwa sel punca

mesenkimal telah berdiferensiasi menjadi osteoblas dan punca mesenkimal melekat pada *scaffold* masing-masing

8. Perendaman *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C dan alginat *S. crassifolium*/HA750°C di dalam medium kultur telah menyebabkan terjadinya degradasi material yang memungkinkan terlepasnya ion-ion yang terkandung di dalam *scaffold* dan memasuki sel punca mesenkimal sehingga mempengaruhi diferensiasi osteoblas dan perlekatan sel punca mesenkimal pada *scaffold- scaffold* tersebut.
9. Perbedaan diferensiasi osteoblas dan perlekatan sel punca mesenkimal pada *scaffold* komposit alginat *S. duplicatum*/HA750°C dan alginat *S. crassifolium*/HA750°C mungkin sebagai akibat dari perbedaan ion-ion yang ditransfer dari masing-masing *scaffold*, dalam hal jenis dan jumlah, ke dalam sel punca mesenkimal.

6.2 Saran

Sebagaimana telah dibahas sebelumnya, bahwa HA400°C memperlihatkan luas muka yang lebih tinggi daripada luas muka dari HA750°C dan HA900°C. Kemampuan degradasi dari *scaffold* alginat *S.duplicatum*/HA400°C atau *S.crassifolium*/HA400°C juga lebih tinggi jika dibandingkan dengan kemampuan degradasi dari *scaffold* yang menggunakan HA750°C dan HA900°C. Namun, penelitian ini telah menggunakan HA750°C untuk mempersiapkan *scaffold* komposit dengan alginat *S.duplicatum* atau *S.crassifolium* untuk pertimbangan kekuatan kompresi.

Penggunaan HA400°C dengan *S. crassifolium* untuk preparasi *scaffold* dapat dilakukan, namun perlu disertai dengan usaha untuk mempertahankan kekuatan kompresi dari *scaffold*. Usaha ini dapat dilakukan dengan meningkatkan rasio *S.duplicatum*/HA400°C atau *S.crassifolium*/HA400°C menjadi lebih besar dari 50/50. Dalam menggunakan rasio yang lebih tinggi perlu diperhatikan ukuran diameter poros yang akan terbentuk. Hal ini disebabkan oleh temuan studi Lin H-R, Yeh Y-J (2005) yang menunjukkan bahwa *scaffold* alginat/HA dengan rasio 25/75 mengakibatkan penutupan poros.

Usaha lain untuk meningkatkan kekuatan kompresi dari *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA400°C atau *S. crassifolium*/HA400°C dapat dilakukan dengan memodifikasi alginat *S. crassifolium*, yaitu dengan menambahkan biopolimer, misalnya sitosan ke dalam alginat *S. crassifolium*. Dengan kedua usaha di atas ini, *scaffold* alginat *S. crassifolium*/HA400°C diharapkan dapat memperoleh kenaikan degradasi dan kekuatan kompresi.

Scaffold alginat *S. duplicatum*/HA750°C telah menunjukkan kekuatan kompresi tinggi. Namun, pada mikroskop SEM tampak partikel HA tidak tertutup oleh alginat. Hal ini mungkin disebabkan oleh adhesi antara partikel HA dan alginat *S. duplicatum* yang kurang baik. Usaha memperoleh adhesi yang lebih baik dapat menggunakan bahan adhesi, seperti *coulingagent* yang fungsinya merekatkan *filler* dan matriks. Dalam hal ini, diharapkan matriks alginat dapat beradhesi dengan baik ke *filler* HA.

Usaha lain dapat dilakukan dengan menggunakan alginat *S. duplicatum* yang konsentrasinya lebih rendah dari 3%. Misalnya 2% atau 2,5%, untuk mempreparasi *scaffold* alginat *S. duplicatum*/HA400°C. Dengan menggunakan konsentrasi yang lebih rendah dari 3% diharapkan matriks alginat dapat membasahi *filler* HA dan dapat diperoleh adhesi yang baik antara *filler* HA dan matriks alginat. Dalam hal ini, diperlukan studi pendahuluan untuk menentukan konsentrasi alginat *S. duplicatum*.

REFERENSI

- Accorsi-Mendanca, Conz MB, BarrosTC, de Sena LA, Soares GA, Granjeiro JM, (2005). Physical characterization of two deproteinized bovine xenografts. *Braz Oral Res* 22(1): 5-10
- Al Ruhaimi KA (2001). Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J. Oral MaxillofacImplants* 16: 105-114
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al.* (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science.
- Azzarof LA (1968). *Elements of X-ray crystallography*. McGraw Hill, New York.
- Barralet JE, Wang L, Lawson M, Triffitt JT, Cooper PR, Shelton RM (2005). Comparison of bone marrow cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels. *J.Mater Sci Mater Med* 16(6): 515-519
- Brown WEL, Schroeder LQ, Ferris JS (1979). Interlayering of crystalline octacalcium phosphate and hydroxyapatite, *J. Phys, Chem* 83: 1385-1388.
- Barrale JE, Wang L, Lawson M, Triffitt JT, Cooper PR, Shelton RM (2005). *Comparison of bone marrow cell growth on 2D and 3D alginate hydrogels*
- Charles-Harris M, Koch MA, Navarro M, Lacroix D, Engel E, Planell JA (2008). A PLA/calcium phosphate degradable composite material for bone tissue engineering: an in vitro study. *J Material Science Materials in Medicine* 19(4): 1503-1513
- Chapman VJ, Chapman DJ (1980). *Seaweed and Their Uses. Edisi ke 3*. London: Chapman and Hall. 194-225.
- Conz MB, Granjeiro JM, Soares GA (2005). Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatites for medical-dental applications as bone graft. *Journal of Applied Oral Science* 13(2); 68-72
- De Campos DDP, Bertran CA (2009). Synthesis of carbonated hydroxyapatite nanorods in liquid crystals. *Mat Res* 12(3)
- Despang F, Borner A, Dittrich R, Tomandi G, Pompe W, Gelinsky M (2005). Alginate/calcium phosphate scaffolds with oriented, tube-like pores. *Mat-wiss u. Werkstofftech* 36(12) : 761-767

- Duda M, Pajak F (2004). The issue of bioresorption of the Bio-Oss xenogeneic bone substitute in bone defects. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* 59: 269-277
- DeGroot K (1986). Macroporous tissue ingrowth: a quantitative and qualitative study on hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials* 7: 137-143
- Ducheyne P, Qiu Q (1999). Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 20: 2287-2303.
- Dhoot NO, Tobias CA, Fischer I (2004). Peptide-modified alginate surfaces as a growth permissive substrate for neurite outgrowth. *J. Biomat Mater Res A* 71: 191-200.
- HT (2008). "Mediation, Modulation and Consequences of Membrane Cytoskeleton Interactions". *Annual Review of Biophysics* 37: 65–95.
- Earl JA, Wood DJ, Milne SJ (2006). Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite. *Journal of Physics: Conference Series* 20: 268-271
- Fang Y., Al-Assaf S, Phillips GO, Nishinari K, Funami T, Williams PA, Li L (2007). Multiple steps and critical behaviors of the binding of calcium to alginate. *J Phys Chem B* 111 (10) : 2456-2462
- Fresney RI (2000). *Cytotoxicity. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique 4th ed*: WILEY-LISS: 329-344
- Fu Q, Rahaman MN, Dogan F, Bal BS (2008). Freeze-cast hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering applications. *Biomed Mater* 3: 1-7
- Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J (2002). Measurements of the solubilities rates of several hydroxyapatite. *Biomaterials* 23: 751-755
- Guedes d Silve CC, HigaOZ, Bressiani JC (2004). Cytotoxic evaluation of silicon nitride-based ceramics. *Material Science and Engineering : C* 24(5): 643-646
- Corry AH, et al (1991). The use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm* 3: 207217.
- Gomes-Morales J, Torrent-Burgues J, Boix T, Fraile J, Rodrigues-Clemente R, (2001). Precipitation of Stoichiometric Hydroxyapatite by Continuous Method. *Cryst. Res. Technol* 36(1):15-26.

- Irawan B (2007). Viscosity and Microparticles of Alginate from Sargassum species. *Proc AICBET.* : 130 – 132.
- King HA (1982). Brown Seaweeds Extract (Alginat). Dalam Glicksman M (Ed). *Food Hydrocolloids 11*. CRC Press, Inc, Florida p.118-130
- Koerten HK, van der Meulen J (1999). Degradation of calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 44: 78-86
- Komlev VS, Mastrogiancomo M, Perceir RC, Peyrin F, Rustichelli F, Cancedda R (2010). Biodegradation of porous calcium phosphate scaffolds in an ectopic bone formation models studied by X-ray computed microtomography. *European Cells and Materials* 19: 136-146 (2010)
- Kong Y-M, Kim H-E, Kim H-W (2008). Phase conversion of Tricalcium phosphate into Ca-Deficient apatite during sintering of hydroxyapatite-tricalcium phosphate biphasic ceramics. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 84B: 334-339
- Krylova EA, et al (2004). Process of preparing Hydroxyapatite-Polysaccharide granules for drug delivery. *J of Materials Science: Materials in Medicine*: 1387-1390
- Kurashima K, Kurita H, Wu Q, Ohtsuka A, Kobayashi H (2002). Ectopic osteogenesis with biphasic ceramics of hydroxyapatite and tricalcium phosphate in rabbits. *Biomaterials* 23: 407-412
- Lafon JP, Champion E, Bernache-Assollant D (2008). Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$ ceramics with controlled composition. *Journal of the European Ceramic Society* 28(1): 139-147. Abstract
- LeGeros RZ (2002). Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Prthop Rel Res* 395: 81-95
- Lin HR, Yeh YJ (2004). Porous Alginate/ Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering : Preparation, Characterization, and In Vitro Studies. *J Biomed Mater Res Part B:nnApplBiomater* 71B : 52-65
- Li Z, Zhang M (2005). Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res: Appl Biomater* 75A : 485-493
- Lu J, Blary M-C, Vavasseur S, Descamps M, Anselme K, Hardouin P (2004). Relationship between bioceramics sintering and micro-particles-induced cellular damages. *J of Materials Science: Mateirals in Medicine* 15(4): 361-365

- Marra KG, Swem JW, Kumta PN, DiMilla PA, Weiss SE (1999). In Vitro Analysis of Biodegradable Polymer Blend/hydroxyapatite Composites for Bone Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res* 47; 324-335.
- Manafi S, Badiie SH (2008). Effect of Ultrasonic on Crystallinity of Nano-Hydroxyapatite via Wet Chemical Method. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(2): 163-168
- Markovic M, Fowler BO, Tung MS (2004). Preparation and comprehensive characterization of a calcium hydroxyapatite reference material. *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*
- Mastrogiancomo M, Muraglia A, Peyrin F, Rustichelli F, Croface A, Cancedda R (2005). Tissue engineering of bone: search for a better scaffold, *Orthod Craniofac Res* 2: 277-84
- Mataeus AYP, Ferraz MP, Monteiro (2007). Microspheres based on hydroxyapatite nanoparticles aggregates for bone regeneration. *Key Engineering Materials* 330-332: 243-246
- Mathieu LM, Mueller TL, Bourbon PE, Pioletti DP, Muller R, Manson JA, *Biomaterials* 27(6) 905-916.
- Meneghini C, Dalconi MC, Nuzzo S, Mobilio S, Wnk RH (2003). Rietveld Refinement on X-Ray Diffraction Patterns of Bioapatite in Human Fetal Bones. *Biophysical Journal* 84: 2021-2029
- Monmaturapoj N (2008). Nano-size hydroxyapatite powders preparation by wet-chemical precipitation route. *Journal of metals, materials and minerals* 18(1): 15-20
- Navaro M, Ginebra MP, Planell JA, Barrias CC, Barbosa MA (2005). In Vitro Degradation Behavior of a Novel Bioresorbable Composite Material Based on PLA and a Soluble CaP glass. *ACTA Biomaterials* 1 : 411-419.
- Nazir NM, Mohamad D, Mohamad MAS, P,ar NS, Othman R (2010). In-vitro cytotoxicity and genotoxic evaluation of in-house Tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterial* 2010
- Pattanayak DK, Divya P, Upadhyay, Prasad RC, Rao BT, Mohan TRR (2005). Synthesis and Evaluation of Hydroxyapatite Ceramics. *Trends Biomater Artif Organ* 8(2).
- Pramanik S, Agarwal AK, Rai KN (2005). Development of High Strength Hydroxyapatite for Hard Tissue Replacement. *Trends Biomater Artif Organs* 19(1): 46-51.

- Porter NL, Pilliar RM, Grynblas MD (2001). Fabrication of porous calcium polyphosphate implants by solid freeform fabrication : A study of processing parameters and in vitro degradation characteristics. *J Biomed Mater Res* 56 : 504-515
- Pollock S, Shors EC, Holmes RE, Kraut RA (1995). Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites. *J Oral Maxillofac Surg* 53: 915-922
- Xiu Z, Zazha CW (2006). Third-Generation biomedical material and Regenerative Medicine. *J of Reparative and Reconstructive Surgery* 20(2): 189-193
- Riss TL, Moraver RA (1992). Comparison of MTT, XTT and a novel tetrazolium compound MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell (Suppl)* 3: 184a
- Rumpel E, Wolf E, Kauschke E, Bienengraber V, Bayerlein T, Gedrange T, Proff P. The Biodegradation of Hydroxyapatite Bone Graft Substitute In Vivo. *Folia Morphology* 65: 65(1): 43-48.
- Satari, R. (1998). *Ekstraksi dan Karakteristik Polisakarida Alga dari Sargassum sp.* Prosiding Seminar Nasional Kelautan LIPI-UNHAS II, Ujung Pandang 24-27 Juni : 446-449
- Sari YW, Maddu A, Dahlan K, Fajriyah HI, Dewi SU, Soejoko DS (2008). In Situ Synthesis of Composite of Calcium Phosphate Carbonate-Polyglycolide. *Jurnal Nanosains & Nanoteknologi* 1(2): 63-66.
- Singer NG dan Caplan AI, 2011. Mechanism of Inflammation. *Annu.Rev. Pathol. Mech. Div* 6: 457-78
- Suh J-KF, Mathew HWT (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering : A review, *Biomaterials* 21: 2589-2598.
- Tadjoedin ES, de Lange GL, Holzmann PJ, Kulper L, Burger Eh (2000). Histological observations on biopsies harvested following sinus floor elevation using a bioactive glass material of narrow size range. *Clin Oral Implants Res* 11: 334-344
- Texeira S, Oliveira S, Ferraz MP, Monteiro FJ (2008). Three Dimensional Macroporous Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Key Engineering Materials* 361-363: 947-950.
- Turco G, Eleonora M, Bellomo F, Semeraro S, Donati I, Brun F, Grandolfo M, Sccardo A, Paoletti S (2009). Alginate/Hydroxyapatite Biocomposite for

- Bone Ingrowth : A Trabecular Structure with High and Isotropic Connectivity. *Biomacromolecules* 10: 1575-1583.
- Vacanti CA, Bonnassar LJ, Vacanti JP (2000). Structural Tissue Engineering. In: Lanza RP, Langer R, Vacan JP, editors, *Principles of Tissue Engineering*. San Diego Academic Press : 671-682.
- Vauchel P, Arhaliass A, Legrand J, Kaas R, Baron R (2008), Decrease in Dynamic Viscosity and Average Molecular Weight of Alginat from *Laminaria digitata* during Alkaline Extraction.
- Victoria EC, Gnanam FD (2002). Synthesis and Characterisation of Biphasic Calcium Phosphate. *Trends Biomater Artif Organs* 16(1): 12-14.
- Wang L, Li Y, Li C (2009). In Situ Processing and Properties of Nanostructured Hydroxyapatite/alginate Composite. *J Nanopart Res* 11: 691-699.
- Weiner S, Wolfie, T, Wagner HD (1999). Lamellar Bone: Structure-function Relations. *Journal of Structural Biology* 126: 241-255.
- Wenish S, Sahl JP, Horas U, Heis C, Kilian O, Trinkaus K, Hild A, Schnettler R (2003). In Vivo Mechanisms of Hydroxyapatite Ceramic Degradation by Osteoblasts :Fine Structural Microscopy. *J Biomed Res S* 67: 713-718.
- Wang C-W, Yan M, Chang H-C, Ding S-J (2003). Degradation behaviour of porous calcium phosphates. *Journal of Medical and Biological Engineering* 23(3): 159-164
- Weiner S, Wolfie, T, Wagner HD (1999). Lamellar bone: structure-function relations. *Journal of Structural Biology* 126: 241-255
- Wenish S, Sahl JP, Horas U, Heis C, Kilian O, Trinkaus K, HildA, Schnettler R (2003). In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts : fine structural microscopy. *J Biomed Res S* 67: 713-718.
- Xiu Z, Zazha CW (2006). Third-Generation Biomedical Material and Regenerative Medicine. *J. of Reparative and Reconstructive Surgery* 20(2): 189-193.
- Yin X et al (2003). Biological calcium phosphate and Posner's cluster. *J. of Chemical Physics* 118: 3717 – 372.
- Yoruc ABH, Koca Y (2009). Double Step Stirring: A Novel Method for Precipitation of Nano-Sized Hydroxyapatite Powder. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 4(1): 73-8.

- Yulianto K (1999). Ekstraksi Alginat Makroalga Coklat *Turbinaria Ornate* (Turner) J. Agardh asal Pulau Bunaken dan Pulau Ambon, melalui Proses Kalsium Alginat dan Asam Alginat. *Prosiding Seminar Nasional Kimia Bahan Alam*. Universitas Indonesia –UNESCO, 113-118.
- Yusufoglu Y, Akinc Mufit (2009). Deposition of Carbonated HA on Poly(Methylmethacrylate) Surfaces by Decomposition of Calcium-EDTA Chelate. *Journal of American Ceramic Society* 91(10) : 3147-316.
- Zatnika A (2003). Proses Ekstraksi dan Manfaat Alginat di Bidang Farmasi. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*; 5 (5) : 143 – 150
- Zhang F, Chang J, Lin K, L J (2007). *Preparation, mechanical properties and in vitro degradability of wollastonite/tricalcium phosphate macroporous scaffolds* *Tas AC (2000)*. *Synthetic of biomimetic Ca-hydroxyapatit powders at 37C in synthetic body fluids*. *Biomaterials* 2000; 21: 1429-38 .
- Zmora S, Glicklis R, Cohen S (2002). Tailoring the pore architecture in 3-D alginat scaffolds by controlling the freezing regime during fabrication. *Biomaterials* 23: 4087-4094

LAMPIRAN



Lampiran 1 (a)

Surat keterangan pernyataan alginat *S. duplicatum*

LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES
 PUSAT PENELITIAN OSEANOGRAFI
 RESEARCH CENTRE FOR OCEANOGRAPHY

Jl. Pasir Putih I, Ancol Timur, Jakarta 14430, PO. Box : 4801/JKTF Jakarta 11048
 Telepon : (021) 64713850, Fax. : (021) 64711948
 Homepage : <http://www oseanografi.lipi.go.id>, E-mail : p2o@oseanografi.lipi.go.id

SURAT KETERANGAN

Nomor : 595 /IPK.2/KS/III/2010

Pusat Penelitian Oseanografi LIPI Jakarta, menerangkan bahwa material tanaman rumput laut yang dibawa ke kantor kami pada tanggal 1 Maret 2010 Oleh :

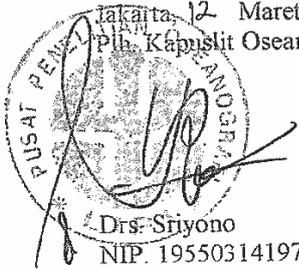
Nama : Lili Oknawati
 NPM : 2005210118
 Fakultas : Fakultas Farmasi
 Universitas : Universitas Pancasila

Telah selesai melakukan identifikasi rumput laut dalam rangka Penulisan Tugas Akhir (Skripsi) di Pusat Penelitian Oseanografi LIPI, dengan judul "Pengaruh Cara Ekstraksi Makroalga Coklat (*Sargassum filipendula*) dan Konsentrasi Bahan Pemucat Natrium Hipoklorit Serta Iradiasi Terhadap Mutu Natrium Alginan". Algae tersebut adalah sebagai berikut :

Filum/Divisio : Phaeophyta
 Kelas/Class : Phaeophyceae
 Bangsa/Order : Fucales
 Suku/Family : Sargassaceae
 Marga/Genus : *Sargassum*
 Jenis/Species : *Sargassum duplicatum* J.G. AGARDH

Demikian surat keterangan dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jakarta, 12 Maret 2010
 Pih. Kapuslit Oseanografi LIPI



Drs. Sriyono
 NIP. 19550314197603001

Lampiran 1 (b)

Surat keterangan pernyataan alginat *S. crassifolium*

**LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES
PUSAT PENELITIAN OSEANOGRAFI
RESEARCH CENTRE FOR OCEANOGRAPHY**

Jl. Pasir Putih I, Ancol Timur, Jakarta 14430, PO. Box : 4801/JKTF Jakarta 11048
Telepon : (021) 64713850, Fax. : (021) 64711948
Homepage : <http://www oseanografi.lipi.go.id>, E-mail : p2o@oseanografi.lipi.go.id

Nomor : 3034 /IPK.2/KS/X/2010
Lamp. : ----
Perihal : Identifikasi Sampel Penelitian

Jakarta, 18 Oktober 2010

Kepada Yth.

Kepala Pusat Aplikasi
Teknologi Isotop dan Radiasi
Badan Tenaga Nuklir Nasional
Jl. Lebak Bulus Raya
Jakarta 12070

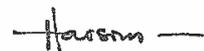
Dengan hormat,

Merindaklanjuti surat Saudara Nomor : 1785/RR0402/IX/2010 tertanggal 20 September 2010 perihal pokok surat tersebut diatas, pada prinsipnya kami dapat membantu untuk melakukan identifikasi makro alga coklat jenis sargasum dalam kegiatan penelitian yang dilakukan oleh Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN.

Setelah dilakukan identifikasi oleh laboratorium kami, alga coklat yang dikirim berjenis *Sargassum crassifolium* J. G. Agardh.

Demikian informasi yang dapat kami berikan, atas perhatian dan kerjasama Saudara kami mengucapkan terima kasih.

Kepala Puslit Oseanografi LIPI



Prof. Dr. Suharsono
NIP. 195407201980031003_x

Lampiran 2

Keterangan sertifikat alginat ex-Sigma® dan ex-Aldrich®

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Hydroxyapatite, reagent grade, powder, synthetic	
Product Number	289396	
Product Brand	ALDRICH	
CAS Number	12167-74-7	
Molecular Formula	[Ca ₅ (OH)(PO ₄) ₃] _x	
Molecular Weight	502.31	

TEST	SPECIFICATION	LOT MKBC4763 RESULTS
Appearance (Color)	White	White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Infrared spectrum	Conforms to Structure	Conforms
Compleximetric EDTA: % Ca	%	38,1 %
Specification Date:		AUG 2010
Date of QC Release:		NOV 2009
Print Date:		AUG 26 2010



Barbara Rejzer, Supervisor
Quality Control
Milwaukee, Wisconsin USA

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Alginate sodium salt from brown algae, low viscosity	
Product Number	A2158	
Product Brand	SIGMA	
CAS Number	9005-38-3	

TEST	SPECIFICATION	LOT 030M0126V RESULTS
APPEARANCE	OFF-WHITE TO LIGHT TAN POWDER	OFF-WHITE POWDER
SOLUBILITY	HAZY FAINT YELLOW SOLUTION AT 100 MG PLUS 10 ML OF WATER	CONFORMS
BROOKFIELD VISCOSITY	APPROX. 250 CPS (2% IN WATER AT 25 DEG CENTRIGRADE)	226 CPS
RECOMMENDED RETEST	2 YEARS	AUG 2011
QC RELEASE DATE		23 MAR 2010



Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA

Lampiran 3

Surat keterangan Lolos Uji Etik



UNIVERSITAS INDONESIA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Sekeloa Utara No. 4, Jakarta Pusat
Pos Box 6250 Jakarta 10430
Kampus Sekeloa (Telp. 021-5197111, 021-5197112, 021-5197113, 021-5197114, 021-5197115, 021-5197116, 021-5197117, 021-5197118, 021-5197119, 021-5197120, 021-5197121, 021-5197122, 021-5197123, 021-5197124, 021-5197125, 021-5197126, 021-5197127, 021-5197128, 021-5197129, 021-5197130, 021-5197131, 021-5197132, 021-5197133, 021-5197134, 021-5197135, 021-5197136, 021-5197137, 021-5197138, 021-5197139, 021-5197140, 021-5197141, 021-5197142, 021-5197143, 021-5197144, 021-5197145, 021-5197146, 021-5197147, 021-5197148, 021-5197149, 021-5197150, 021-5197151, 021-5197152, 021-5197153, 021-5197154, 021-5197155, 021-5197156, 021-5197157, 021-5197158, 021-5197159, 021-5197160, 021-5197161, 021-5197162, 021-5197163, 021-5197164, 021-5197165, 021-5197166, 021-5197167, 021-5197168, 021-5197169, 021-5197170, 021-5197171, 021-5197172, 021-5197173, 021-5197174, 021-5197175, 021-5197176, 021-5197177, 021-5197178, 021-5197179, 021-5197180, 021-5197181, 021-5197182, 021-5197183, 021-5197184, 021-5197185, 021-5197186, 021-5197187, 021-5197188, 021-5197189, 021-5197190, 021-5197191, 021-5197192, 021-5197193, 021-5197194, 021-5197195, 021-5197196, 021-5197197, 021-5197198, 021-5197199, 021-5197200)

NOMOR (13) /PT02.FK/ETIK/2010

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL — CLEARANCE

Panitia Tetap Penelaah Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul

The Committee of The Medical research Ethics of the Faculty of Medicine University of Indonesia with regards of the Protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled

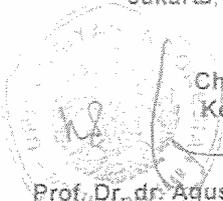
"Donor Sel Punca Mesenkimal dan Peran Sel Punca Mesenkimal Dalam Terapi Pada Fraktur Dengan Non-Union dan Rekonstruksi Fraktur".

Peneliti Utama : Dr.dr.Ismail.SpOT
Name of the Principal Investigator

Nama Institusi : Ilmu Bedah FKUI-RSCM

dan telah menyetujui protocol tersebut di atas.
and approved the above mentioned proposal.

Jakarta, ...7 April 2010...



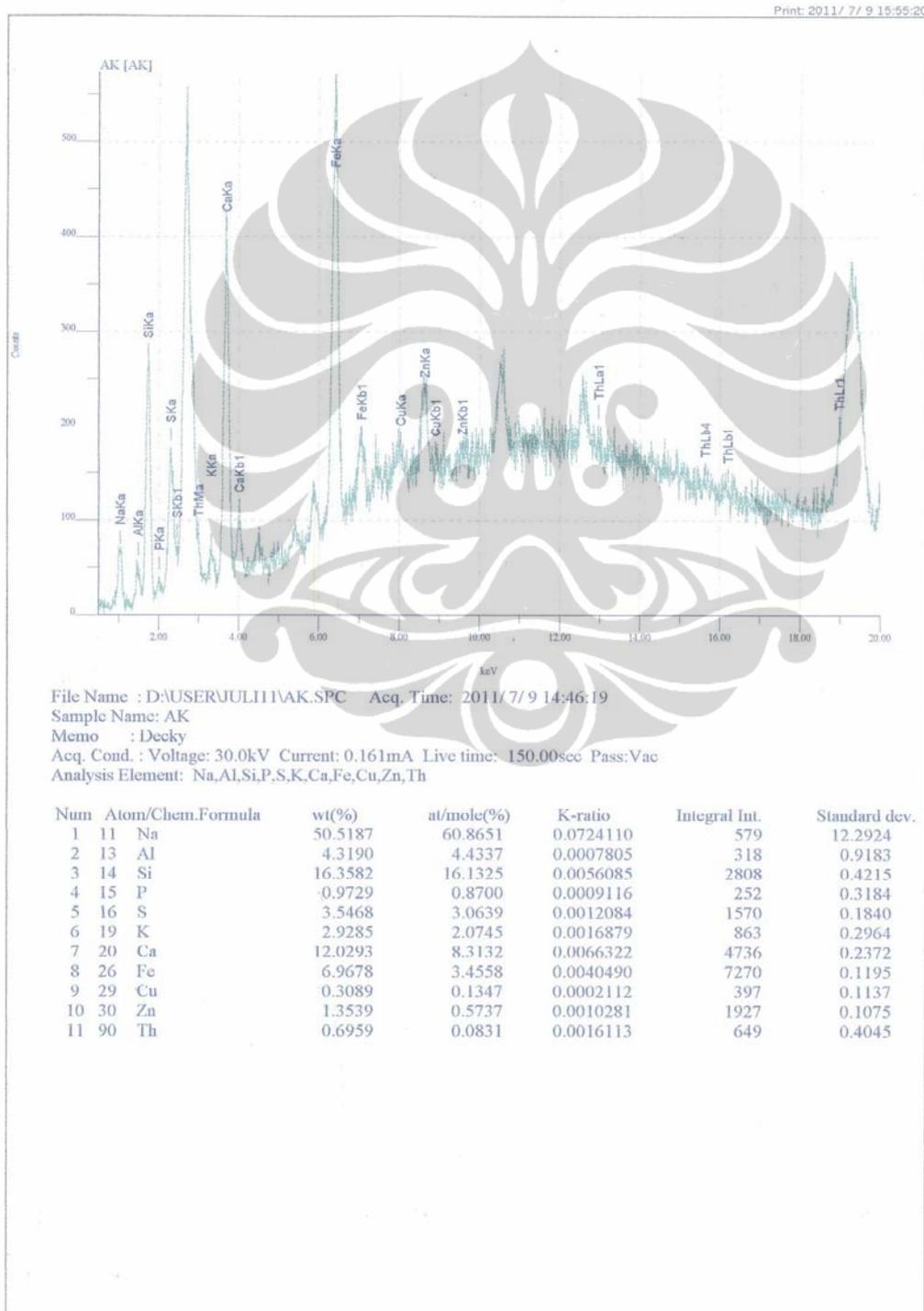
Chairman
Ketua

Prof. Dr. dr. Agus Firmansyah, SpA(K)

-Peneliti wajib menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian.

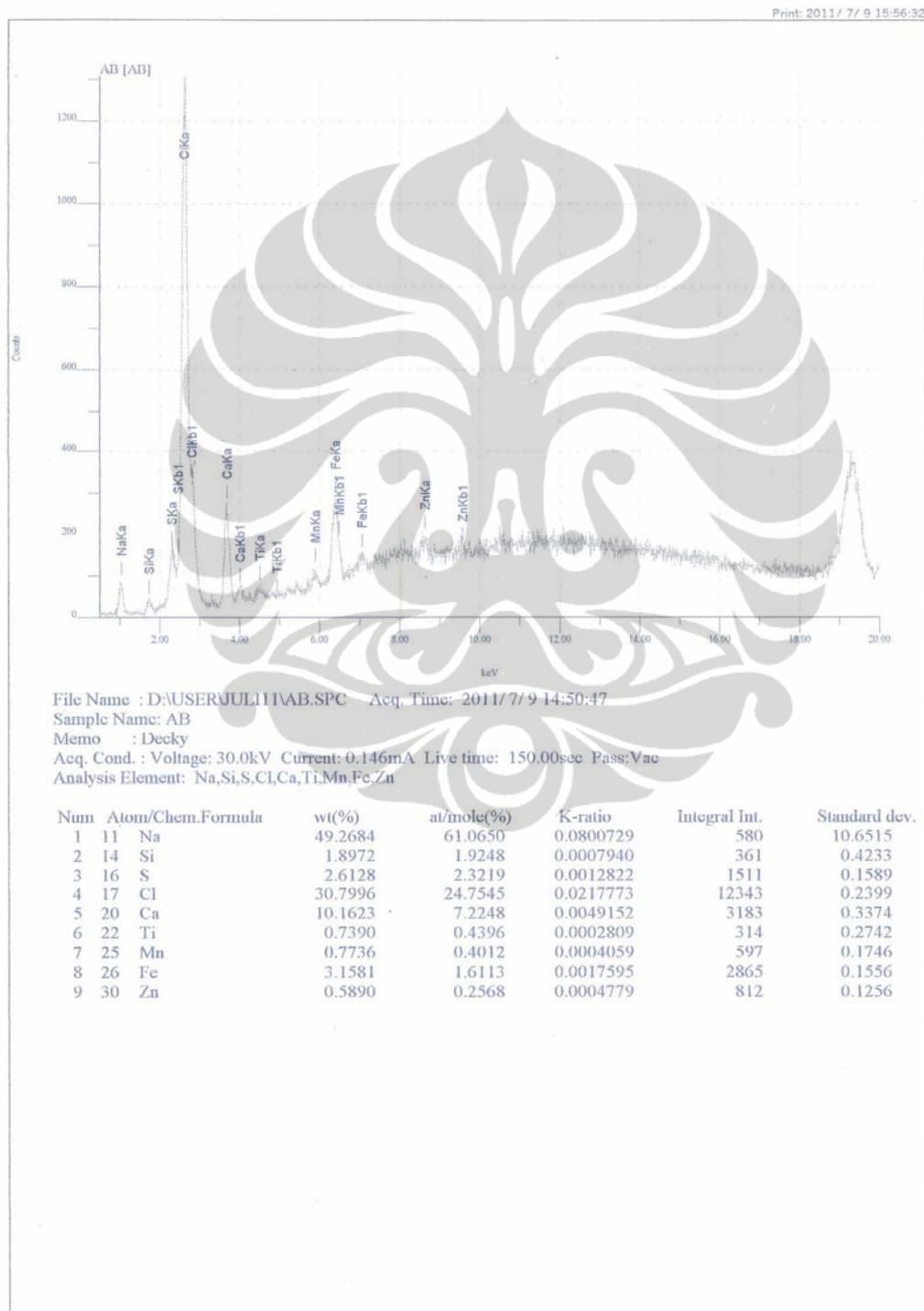
Lampiran 4 (a)

Hasil katakterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF)
dari alginat *S. duplicatum*



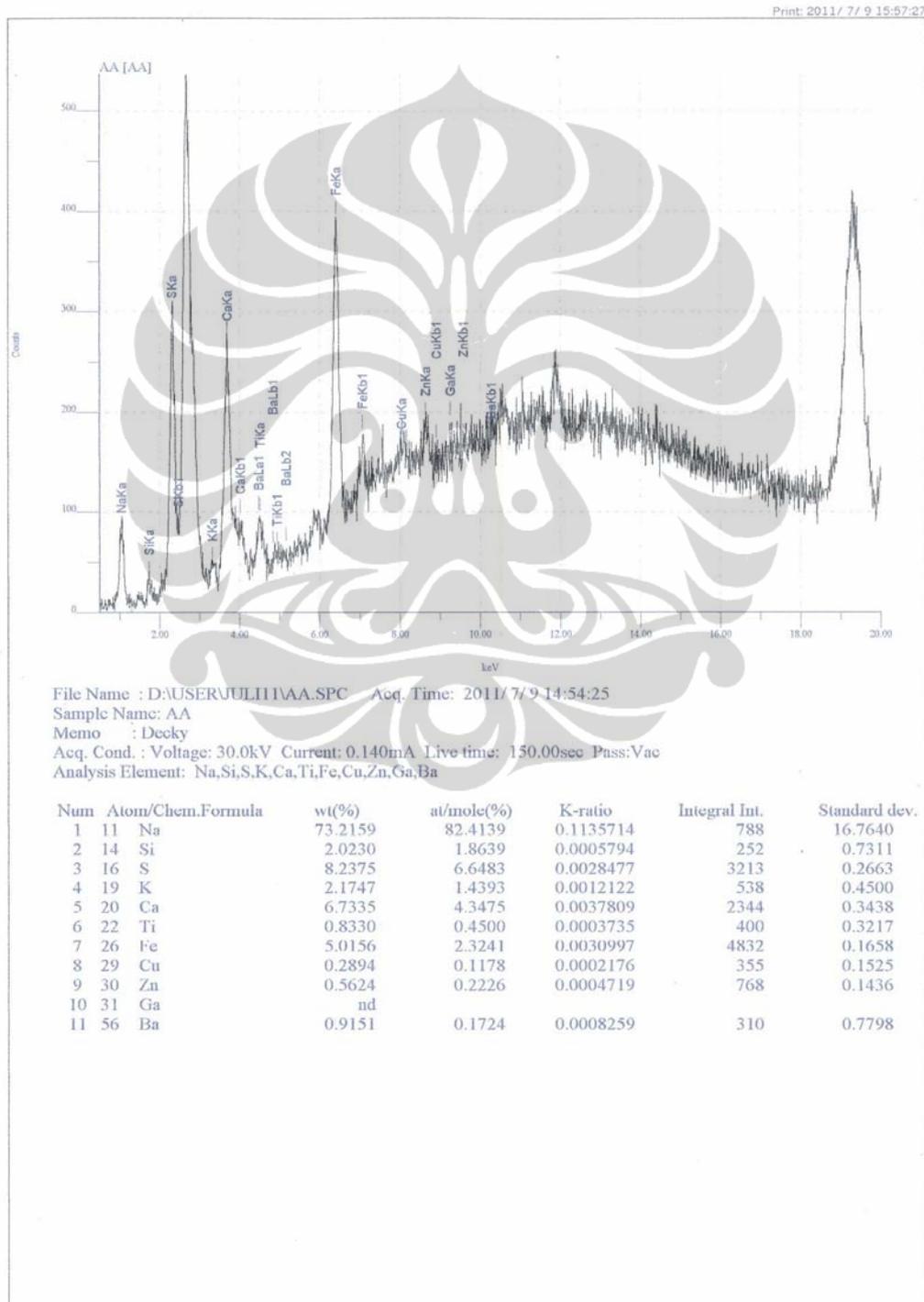
Lampiran 4 (b)

Hasil katarakterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF)
dari alginat *S. crassifolium*



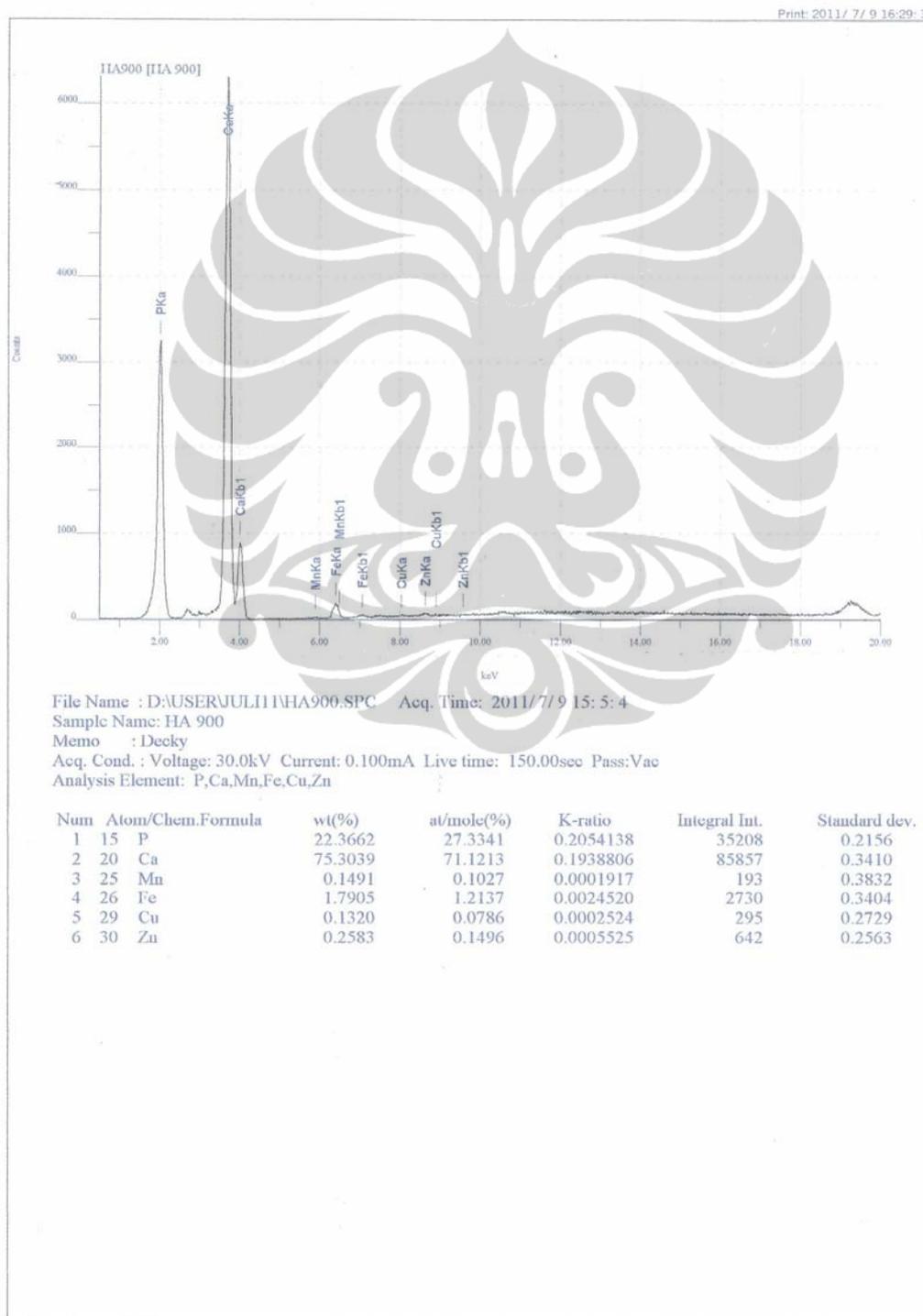
Lampiran 4 (c)

Hasil katarakterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF)
dari alginat ex Sigma®



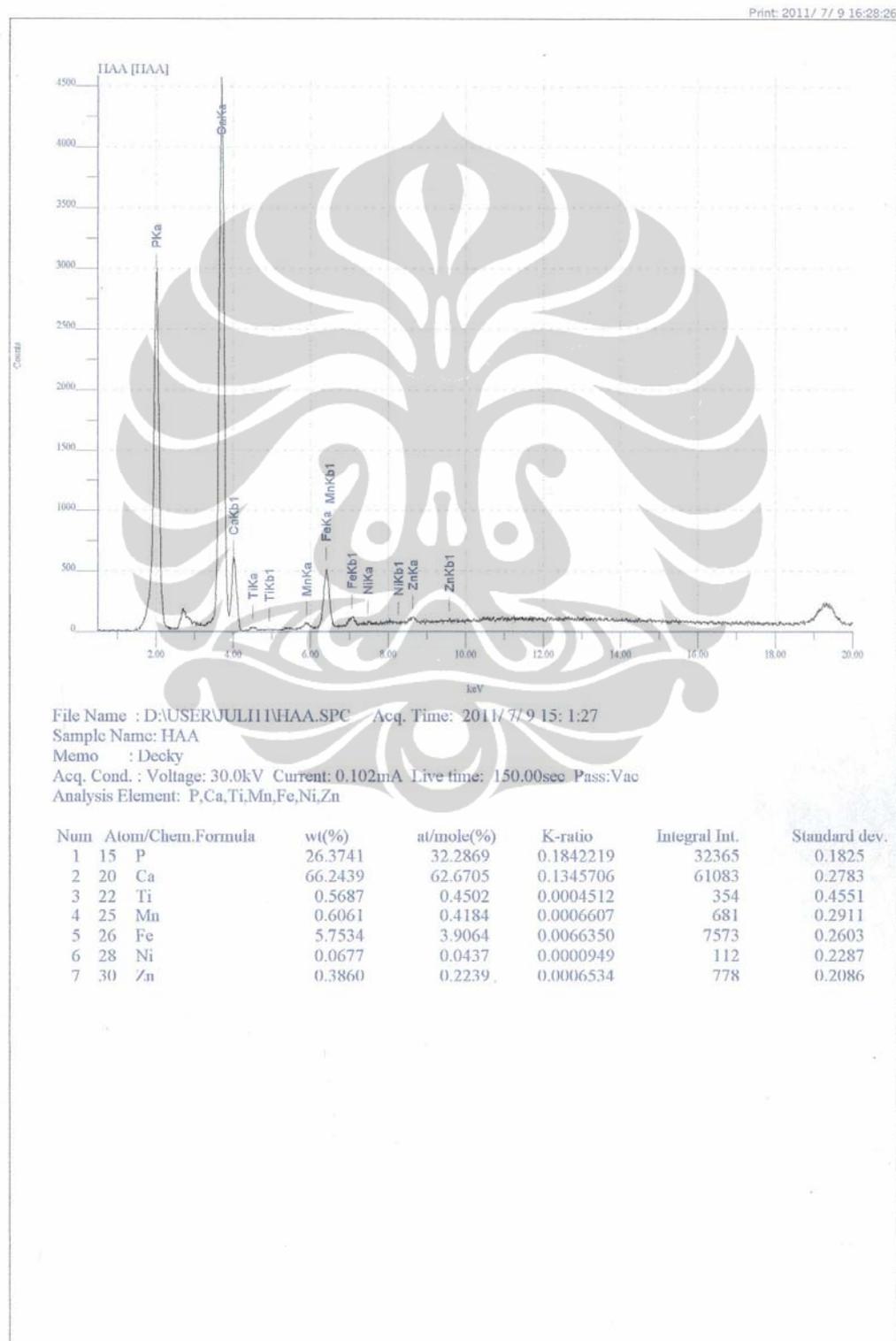
Lampiran 5 (a)

Data hasil katakterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF) dari hidroksiapatit kalsinasi suhu 900°C



Lampiran 5 (b)

Data hasil katakterisasi dengan menggunakan X-Ray Fluorescence (XRF) dari hidroksiapatit ex Aldrich®



Lampiran 6

JCPDS / ICDD No. 09-0432 untuk hidroksiapatit

09-0432		Wavelength= 1.54056									
Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)		2 θ	Int	h	k	l	2 θ	Int	h	k	l
Calcium Phosphate Hydroxide		10.820	12	1	0	0	58.073	4	5	0	1
Hydroxylapatite, syn		16.841	6	1	0	1	59.938	6	4	2	0
Rad.: CuK α λ : 1.54056 Filter: d-sp: Guinier 114.6		18.785	4	1	1	0	60.457	6	3	3	1
Cut off: Int.: I/lor.:		21.819	10	2	0	0	61.660	10	2	1	4
Ref: de Wolff, P., Technisch Physische Dienst, Delft, The Netherlands, ICDD Grant-in-Aid		22.902	10	1	1	1	63.011	12	5	0	2
Sys: Hexagonal S.G.: P6 ₃ /m (176)		25.354	2	2	0	1	63.443	4	5	1	0
a: 9.418 b: c: 6.884 A: C: 0.7309		25.879	40	0	0	2	64.078	13	3	0	4
α : β : γ : %: 2 mp:		26.126	12	1	0	2	64.078	3	2	3	
Ref: Ibid.		28.966	18	2	1	0	65.031	9	5	1	1
Dx: 3.155 Dm: 3.080 SS/FOM: F ₃₀ = 54(-0158, 35)		31.773	100	2	1	1	66.386	4	4	2	2
$\epsilon\alpha$: $\eta\omega\beta$: 1.651 $\epsilon\gamma$: 1.644 Sign: - 2V.		32.196	60	1	1	2	66.386	4	1	3	
Ref: Dana's System of Mineralogy, 7th Ed., II, 879		32.902	60	3	0	0	69.699	3	5	1	2
Color: Green, bluish green, yellow-green, grayish green, violet.		34.048	25	2	0	2	71.651	5	4	3	1
Sample obtained following the procedure indicated by Hodge et al.,		35.480	6	3	0	1	71.651	4	0	4	
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed., 10 156 (1938), CAS #: 1306-06-5.		39.204	8	2	1	2	72.286	4	5	2	0
I/11 are peak values from a pattern which shows slight broadening		39.818	20	3	1	0	72.286	2	0	5	
of prism reflections. Validated by calculated data 24-33. Apatite		40.452	2	2	2	1	73.995	7	4	2	3
Group, phosphate Subgroup, PSC: hP44, To replace 34-10. See		42.029	10	3	1	1	75.022	3	3	2	4
ICSD 22059, 22060, 24240, 26204, 26205 and 34457 (PDF 73-293,		42.318	4	3	0	2	75.022	6	0	2	
73-294, 73-1731, 74-565, 74-566 and 76-694). Mwt: 502.32.		43.804	8	1	1	3	75.583	9	2	1	5
Volume[CD]: 528.80.		44.369	2	4	0	0	76.154	1	4	3	2
		45.305	6	2	0	3	77.175	11	5	1	3
		46.711	80	2	2	2	78.227	9	5	2	2
		48.103	16	3	1	2					
		48.623	6	3	2	0					
		49.468	40	2	1	3					
		50.493	20	3	2	1					
		51.283	12	4	1	0					
		52.100	16	4	0	2					
		53.143	20	0	0	4					
		54.440	4	1	0	4					
		55.879	10	3	2	2					
		57.128	8	3	1	3					

Lampiran 7 (a)

Listview dari hidroksiapatit kalsinasi suhu 400°C

```

listview-HA400
Restraint data statistics:
No restraints used

Powder data statistics
Bank Ndata Sum(w*d**2) Fitted -Bknd pFree Average
Hstgm 1 PXC 1 3495 2616.4 0.2174 0.1602 0.2386 0.1549 0.0000 0.0000 0 1.381 0.847
Powder totals 3495 2616.4 0.2174 0.1602 0.2386 0.1549 0.0000 0.0000 0 1.381

No serial correlation in fit at 90% confidence for 1.903 < Dwd < 2.097
Cycle 297 There were 3495 observations.
Total before-cycle CHI**2 (offset/sig) = 2.6164E+03 (-1.0352E+01)
Reduced CHI**2 = 0.7518 for 15 variables

Reflection data statistics
Histogram 1 Type PXC Nobs = 283 R(F**2) = 0.1804
After matrix normalization and Marquardt modification:
Full matrix recip. condition value & -log10 = 0.1981E-01 1.70

The value of the determinant is 2.7060*10.0**(-2)

Atom parameters for phase no. 1
frac x y z 100*Uiso 100*U11 100*U22 100*U33 100*U12 100*U13
100*U23
Calculated unit cell formula weight: 989.207, density: 3.103gm/cm**3

Phase/element fractions for phase no. 1
Hist Elem: 1 1 PXC
Fraction : 3.02447
Sigmas : 0.266714E-01
Shift/esd: -0.01
Wt. Frac.: 1.0000
Sigmas : -0.217670E-10
Phase/element fraction sum(shift/error)**2 : 0.00

Lattice parameters for powder data:
Phase 1
a b c alpha beta gamma volume
Value : 9.422866 9.422866 6.885195 90.000 90.000 120.000 529.435
Sigmas : 0.002214 0.002214 0.001766 0.000 0.000 0.000 0.308
Reciprocal metric tensor shift factor = 100%
Reciprocal metric tensor sum(shift/error)**2 : 0.00

Profile coefficients for histogram no. 1 and for phase no. 1:
Coeff. : GU GV GW GP LX ptac trns shft sfec S/L
Value : 2.203E+02 -2.745E+02 1.026E+03 0.000E+00 8.605E+00 0.000E+00 0.000E+00 -1.324E+01 0.000E+00
5.000E-04
Sigmas : 2.161E+01 9.682E-01
Shift/esd: -0.03 0.00

Coeff. : H/L eta S1 S2 S3
Value : 5.000E-04 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00 -6.639E-03
Sigmas :
Shift/esd:
Profile coef. sum(shift/error)**2 : 0.00
1 HA-400 GENLES Version Win32 Jun 04 17:48:27 2011 Page
5

Background coefficients for histogram no. 1:
Param. : 1 2 3 4 5 6
Coeff. : 2.163648E+01 1.089843E+01 6.894590E+00 1.064609E+01 5.252159E+00 7.241968E+00
Sigmas : 3.746525E-01 2.152583E-01 2.248872E-01 2.895297E-01 1.954947E-01 2.868895E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.01 0.01 0.00 0.01
Param. : 7 8 9 10
Coeff. : 3.783890E+00 4.357262E+00 3.128947E+00 3.667793E+00
Sigmas : 1.611067E-01 1.745480E-01 1.481650E-01 2.008935E-01
Shift/esd: 0.01 0.02 0.00 0.00
Background coef. sum(shift/error)**2 : 0.00

CPU times for matrix build 2.48 sec; matrix inversion 0.00 sec
Final variable sum((shift/esd)**2) for cycle 297: 0.00 Time: 2.48 sec

Convergence was achieved

```

Lampiran 7 (b)

Listview dari Hidroksiapatit kalsinasi suhu 750°C

```

listview-HA750
The constraint matrix has 43 terms
1 HA-750
GENLES Version Win32 Jun 04 16:08:06 2011 Page 5

Restraint data statistics:
No restraints used

Powder data statistics
Bank Ndata Sum(w*d**2) Fitted -Bknd pFree Average
Hstgm 1 PXC 1 3495 4599.5 0.2017 0.1449 0.2086 0.1361 0.0000 0.0000 0 1.601 0.904
Powder totals 3495 4599.5 0.2017 0.1449 0.2086 0.1361 0.0000 0.0000 0 1.601

No serial correlation in fit at 90% confidence for 1.918 < Dwd < 2.002
Cycle 240 There were 3495 observations.
Total before-cycle CHI**2 (offset/sig) = 4.5995E+03 ( 1.3782E+01)
Reduced CHI**2 = 1.332 for 41 variables

Reflection data statistics
Histogram 1 Type PXC Nobs = 264 R(F**2) = 0.2204
After matrix normalization and Marquardt modification:
Full matrix recip. condition value & -log10 = 0.1450E-01 1.84

The value of the determinant is 3.2675*10.0**(-3)

Atom parameters for phase no. 1
frac x y z 100*U10 100*U11 100*U22 100*U33 100*U12 100*U13 100*U23
Calculated unit cell formula weight: 989.207, density: 3.100gm/cm**3

Phase/element fractions for phase no. 1
Hist Elem: 1 1 PXC
Fraction: 6.44879
Sigmas: 0.475350E-01
Shift/esd: 0.00
Wt. Frac.: 1.0000
Sigmas: -0.257618E-11
Phase/element fraction sum(shift/error)**2: 0.00

Lattice parameters for powder data:
Phase 1
a b c alpha beta gamma volume
Value: 9.421413 9.421413 6.892691 90.000 90.000 120.000 529.848
Sigmas: 0.000590 0.000590 0.000508 0.000 0.000 0.000 0.001
Reciprocal metric tensor shift factor = 100%
Reciprocal metric tensor sum(shift/error)**2: 0.00

Profile coefficients for histogram no. 1 and for phase no. 1:
Coeff.: GU GV GW GP LX ptec trns shift sfec S/L
Value: 2.203E+02 -2.745E+02 1.460E+02 0.000E+00 8.605E+00 0.000E+00 0.000E+00 1.772E+01 0.000E+00 5.000E-04
Sigmas: 2.127E+00
Shift/esd: 0.00
Coeff.: H/L eta S1 S2 S3
Value: 5.000E-04 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00 -6.639E-03
Sigmas:
Shift/esd:
Profile coef. sum(shift/error)**2: 0.00
1 HA-750
GENLES Version Win32 Jun 04 16:08:07 2011 Page 6

Background coefficients for histogram no. 1:
Param.: 1 2 3 4 5 6
Coeff.: 5.278067E+01 4.429979E+01 3.292257E+01 2.838216E+01 2.667617E+01 1.930870E+01
Sigmas: 1.653452E+00 1.041491E+00 8.918527E-01 8.452266E-01 8.113615E-01 7.018021E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param.: 7 8 9 10 11 12
Coeff.: 1.812877E+01 1.540852E+01 1.216445E+01 1.876501E+01 1.550068E+01 2.715345E+01
Sigmas: 7.411970E-01 6.192117E-01 8.057548E-01 8.152288E-01 7.221354E-01 1.705698E+00
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param.: 13 14 15 16 17 18
Coeff.: 1.663989E+01 1.131312E+01 9.978119E+00 1.343047E+01 7.847619E+00 1.086115E+01
Sigmas: 8.795853E-01 5.663769E-01 5.249931E-01 7.523448E-01 6.121005E-01 6.225476E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param.: 19 20 21 22 23 24
Coeff.: 1.029349E+01 1.660188E+01 1.519998E+01 1.319575E+01 8.193848E+00 7.061412E+00
Sigmas: 6.493210E-01 8.587507E-01 9.193655E-01 8.306292E-01 5.352145E-01 5.489842E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param.: 25 26 27 28 29 30
Coeff.: 8.086869E+00 6.630160E+00 8.193014E+00 1.151006E+01 5.975459E+00 5.798352E+00
Sigmas: 5.426310E-01 5.813663E-01 5.612638E-01 7.735494E-01 4.789058E-01 3.882964E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param.: 31 32 33 34 35 36
Coeff.: 4.868986E+00 6.800339E+00 6.474590E+00 5.832978E+00 7.643609E+00 4.080848E+00
Sigmas: 4.399904E-01 5.643494E-01 5.441256E-01 6.473326E-01 6.014338E-01 4.945279E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Background coef. sum(shift/error)**2: 0.00

CPU times for matrix build 1.06 sec; matrix inversion 0.02 sec
Final variable sum((shift/esd)**2) for cycle 240: 0.00 Time: 1.08 sec

Convergence was achieved

```

Lampiran 7 (c)

Listview dari Hidroksiapatit kalsinasi suhu 900°C

```

listview-HA900
The constraint matrix has 43 terms
LHA-900 GENLES Version Win32 Jun 04 18:21:15 2011 Page

Restraint data statistics:
No restraints used

Powder data statistics
Bank Ndata Sum(w*d**2) Fitted -Bknd pFree Average
Hstgm 1 PXC 1 3495 4686.4 0.1435 0.1061 0.1348 0.0993 0.0000 0.0000 0 1.572 0.938
Powder totals 3495 4686.4 0.1435 0.1061 0.1348 0.0993 0.0000 0.0000 0 1.572

No serial correlation in fit at 90% confidence for 1.918 < Dwd < 2.082
Cycle 180 There were 3495 observations.
Total before-cycle CHI**2 (offset/sig) = 4.6864E+03 ( 1.4828E+01)
Reduced CHI**2 = 1.357 for 41 variables

Reflection data statistics
Histogram 1 Type PXC Nobs = 254 R(F**2) = 0.1441
After matrix normalization and Marquadt modification:
Full matrix recip. condition value & -log10 = 0.1676E-01 1.78

The value of the determinant is 3.9004*10.0**(-3)

Atom parameters for phase no. 1
Frac x y z 100*U10 100*U11 100*U22 100*U33 100*U12 100*U13 100*U23
Calculated unit cell formula weight: 990.544, density: 3.109gm/cm**3

Phase/element fractions for phase no. 1
Hist Elem: 1 1 PXC
Fraction: 10.4428
Sigmas: 0.549801E-01
Shift/esd: 0.00
Wt. Frac.: 1.0000
Sigmas: -0.131856E-09
Phase/element fraction sum(shift/error)**2 : 0.00

Lattice parameters for powder data:
Phase 1
a b c alpha beta gamma volume
Value: 9.420910 9.420910 6.882074 90.000 90.000 120.000 528.977
Sigmas: 0.000312 0.000312 0.000279 0.000 0.000 0.000 0.043
Reciprocal metric tensor shift factor = 100%
Reciprocal metric tensor sum(shift/error)**2 : 0.00

Profile coefficients for histogram no. 1 and for phase no. 1:
Coeff. : GV GV GV GP LX ptec trns shift svec S/L
Value : 2.233E+02 -2.745E+02 1.043E+02 0.000E+00 8.605E+00 0.000E+00 0.000E+00 -4.029E-01 0.000E+00 5.000E-00
Sigmas : 0.000E+00 0.000E+00 9.595E-01 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00 1.561E-01 0.000E+00 0.000E+00
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Coeff. : H/L eta S1 S2 S3
Value : 5.000E-04 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00 -6.639E-03
Sigmas : 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Profile coef. sum(shift/error)**2 : 0.00
LHA-900 GENLES Version Win32 Jun 04 18:21:16 2011 Page

Background coefficients for histogram no. 1:
Param. : 1 2 3 4 5 6
Coeff. : 1.573666E+02 1.335725E+02 1.040367E+02 3.888866E+01 7.512749E+01 7.209550E+01
Sigmas : 2.740200E+00 1.835720E+00 1.582660E+00 1.458955E+00 1.376493E+00 1.313305E+00
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 7 8 9 10 11 12
Coeff. : 5.861355E+01 5.946460E+01 3.997547E+01 4.180103E+01 3.324521E+01 2.892022E+01
Sigmas : 1.319030E+00 1.108534E+00 1.338149E+00 1.167920E+00 1.046645E+00 1.099696E+00
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 13 14 15 16 17 18
Coeff. : 3.544542E+01 2.184011E+01 2.172680E+01 1.859383E+01 2.038493E+01 1.650872E+01
Sigmas : 1.231731E+00 8.221556E-01 7.511725E-01 1.042578E+00 8.456571E-01 7.93168E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 19 20 21 22 23 24
Coeff. : 1.448396E+01 2.121346E+01 2.182256E+01 2.095152E+01 1.522452E+01 1.429082E+01
Sigmas : 7.854980E-01 9.595643E-01 1.137527E+00 1.047545E+00 7.437939E-01 7.421620E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 25 26 27 28 29 30
Coeff. : 1.571587E+01 1.034694E+01 1.423330E+01 1.483947E+01 1.503009E+01 1.193537E+01
Sigmas : 7.258630E-01 7.621853E-01 7.906817E-01 1.018677E+00 7.166145E-01 5.779130E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 31 32 33 34 35 36
Coeff. : 1.384702E+01 1.175437E+01 1.001850E+01 1.612298E+01 1.257226E+01 1.297387E+01
Sigmas : 6.498938E-01 7.609139E-01 7.444191E-01 9.200579E-01 9.012672E-01 8.330418E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Background coef. sum(shift/error)**2 : 0.00

CPU times for matrix build 0.81 sec; matrix inversion 0.02 sec
Final variable sum(shift/esd)**2 for cycle 180: 0.00 Time: 0.83 sec

Convergence was achieved

```

Lampiran 7 (d)

Listview dari Hidroksiapatit ex-Aldrich

```

listview-HA-Aldrich
The constraint matrix has 43 terms
1 HA-Sigma_Aldrich
CENLES Version Win32 Jun 13 17:21:17 2011 Page 5

Constraint data statistics:
No restraints used

Powder data statistics
Bank Ndata Sum(w*d**2) WRp Rp WRp Rp WRp Rp Npfree Dwd Average
Estgm 1 PXC 1 3493 3418.2 0.2010 0.1404 0.2077 0.1428 0.0000 0.0000 0 1.204 0.942
Powder totals 3493 3418.2 0.2010 0.1404 0.2077 0.1428 0.0000 0.0000 0 1.204

No serial correlation in fit at 90% confidence for 1.918 < Dwd < 2.002
Cycle 233 There were 3493 observations.
Total before-cycle CHI**2 (offset/sig) = 3.4102E+03 (-4.0604E-01)
Reduced CHI**2 = 0.9902 for 41 variables

Reflection data statistics
Histogram 1 Type PXC Nobs = 252 R(F**2) = 0.1059
After matrix normalization and Marquardt modification:
Full matrix recip. condition value & -log10 = 0.1789E-01 1.75

The value of the determinant is 4.5325*10.0**(-3)

Atom parameters for phase no. 1
Calculated unit cell formula weight: 992.122, density: 3.0980gm/cm**3

Phase/element fractions for phase no. 1
Hist Elem: 1 1 PXC
Fraction : 4.97418
Sigmas : 0.293456E-01
Shift/esd: 0.00
Wt. Frac.: 1.0000
Sigmas : -0.182205E-09
Phase/element fraction sum(shift/error)**2 : 0.00

Lattice parameters for powder data:
Phase 1
Value : a b c alpha beta gamma volume
Value : 9.440725 9.440725 6.889263 90.000 90.000 120.000 531.158
Sigmas : 0.000267 0.000267 0.000245 0.000 0.000 0.000 0.037
Reciprocal metric tensor shift factor = 100%
Reciprocal metric tensor sum(shift/error)**2 : 0.00

Profile coefficients for histogram no. 1 and for phase no. 1:
Coeff. : GU GV GW GP LX ptec trns shift sfec S/L
Value : 2.203E+02 -2.745E+02 8.337E+01 0.000E+00 8.605E+00 0.000E+00 0.000E+00 -1.908E+01 0.000E+00 5.300E-04
Sigmas : 4.687E-01
Shift/esd: 0.04
Coeff. : H/L eta S1 S2 S3
Value : 5.900E-04 0.000E+00 0.300E+00 0.000E+00 -2.261E-04
Sigmas :
Shift/esd:
Profile coef. sum(shift/error)**2 : 0.00
1 HA-Sigma_Aldrich
GENIES Version Win32 Jun 13 17:21:16 2011 Page 6

Background coefficients for histogram no. 1:
Param. : 1 2 3 4 5 6
Coeff. : 5.718018E+01 4.151221E+01 3.118984E+01 2.675522E+01 2.045440E+01 1.771222E+01
Sigmas : 1.332460E+00 8.850990E-01 7.423514E-01 6.809229E-01 6.201024E-01 5.663370E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 7 8 9 10 11 12
Coeff. : 1.332679E+01 1.406360E+01 1.110051E+01 1.027133E+01 9.301206E+00 1.405476E+00
Sigmas : 5.840159E-01 5.130590E-01 6.245326E-01 5.173029E-01 4.626470E-01 8.077966E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 -0.01 0.00 0.00 -0.02
Param. : 13 14 15 16 17 18
Coeff. : 5.073189E+00 7.018075E+00 7.353254E+00 4.130569E+00 6.646817E+00 4.771768E+00
Sigmas : 5.563839E-01 3.996446E-01 3.700313E-01 5.282432E-01 4.111380E-01 3.004514E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 19 20 21 22 23 24
Coeff. : 4.958056E+00 6.303144E+00 4.017993E+00 4.652394E+00 5.095937E+00 3.786814E+00
Sigmas : 4.017660E-01 4.759098E-01 5.480923E-01 4.882446E-01 3.691556E-01 3.523949E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 25 26 27 28 29 30
Coeff. : 5.410667E+00 2.260776E+00 4.917475E+00 3.058164E+00 4.061120E+00 3.667359E+00
Sigmas : 3.691391E-01 3.541729E-01 3.977354E-01 4.975525E-01 3.345545E-01 2.680065E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Param. : 31 32 33 34 35 36
Coeff. : 2.903041E+00 3.857350E+00 2.255042E+00 5.131089E+00 2.022829E+00 4.386915E+00
Sigmas : 3.220280E-01 3.900371E-01 3.585669E-01 4.691581E-01 4.209891E-01 3.827367E-01
Shift/esd: 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00
Background coef. sum(shift/error)**2 : 0.00

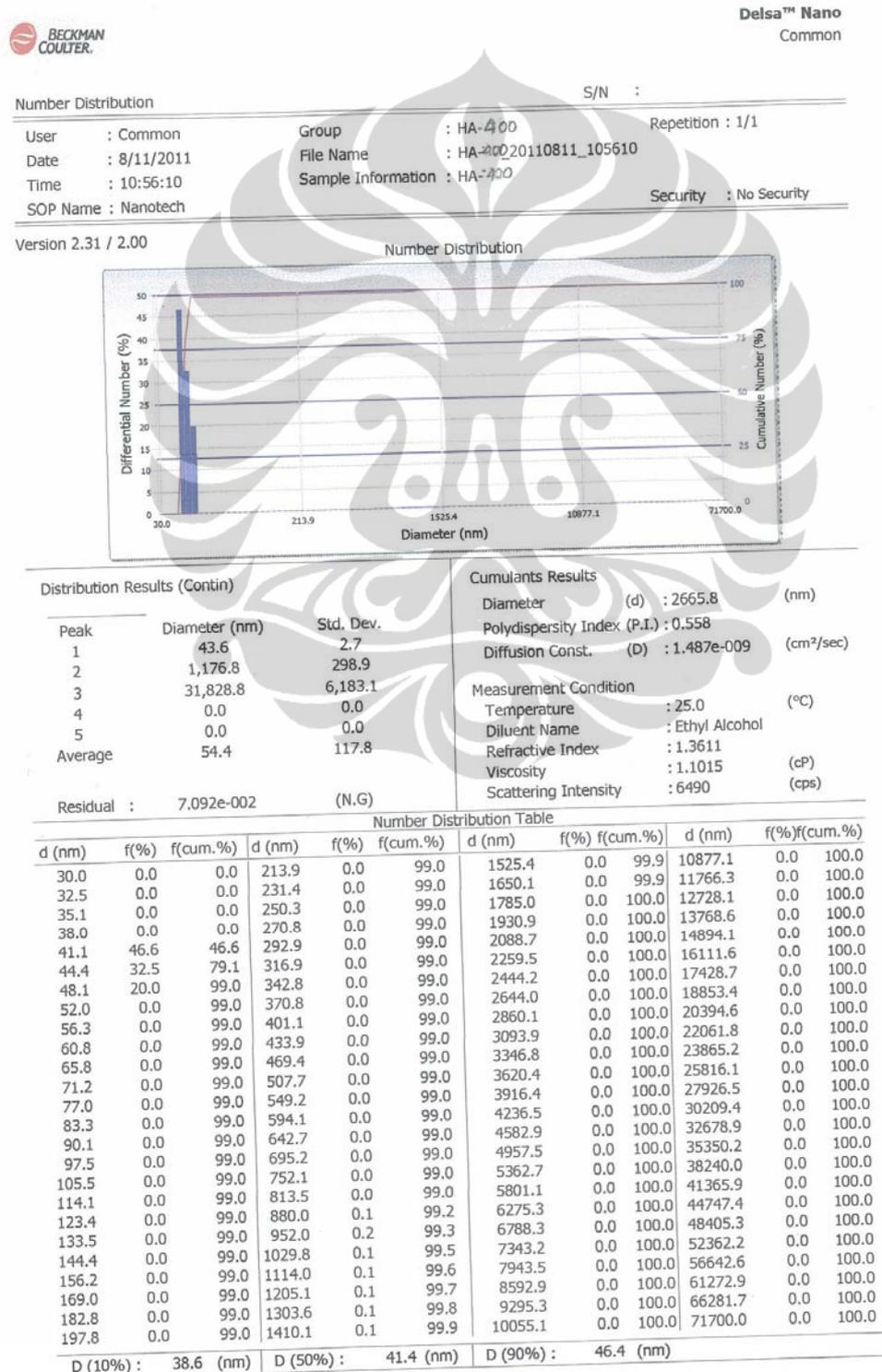
CPU times for matrix build 0.76 sec; matrix inversion 0.00 sec
Final variable sum((shift/esd)**2) for cycle 233: 0.00 Time: 0.79 sec

Convergence was achieved

```

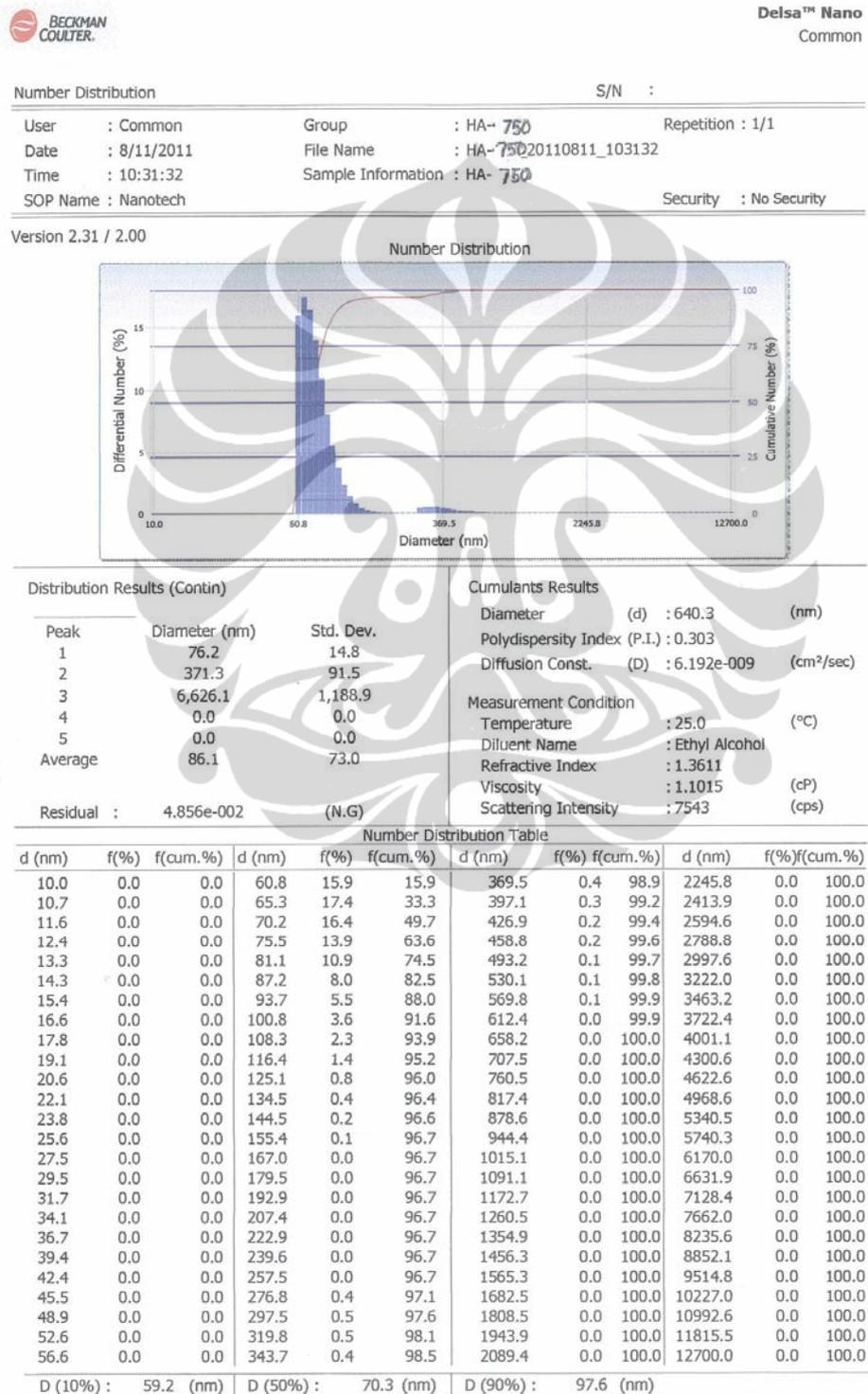
Lampiran 8 (a)

Data hasil katakterisasi dengan menggunakan *Particle Size Analyzer (PSA)* untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 400°C



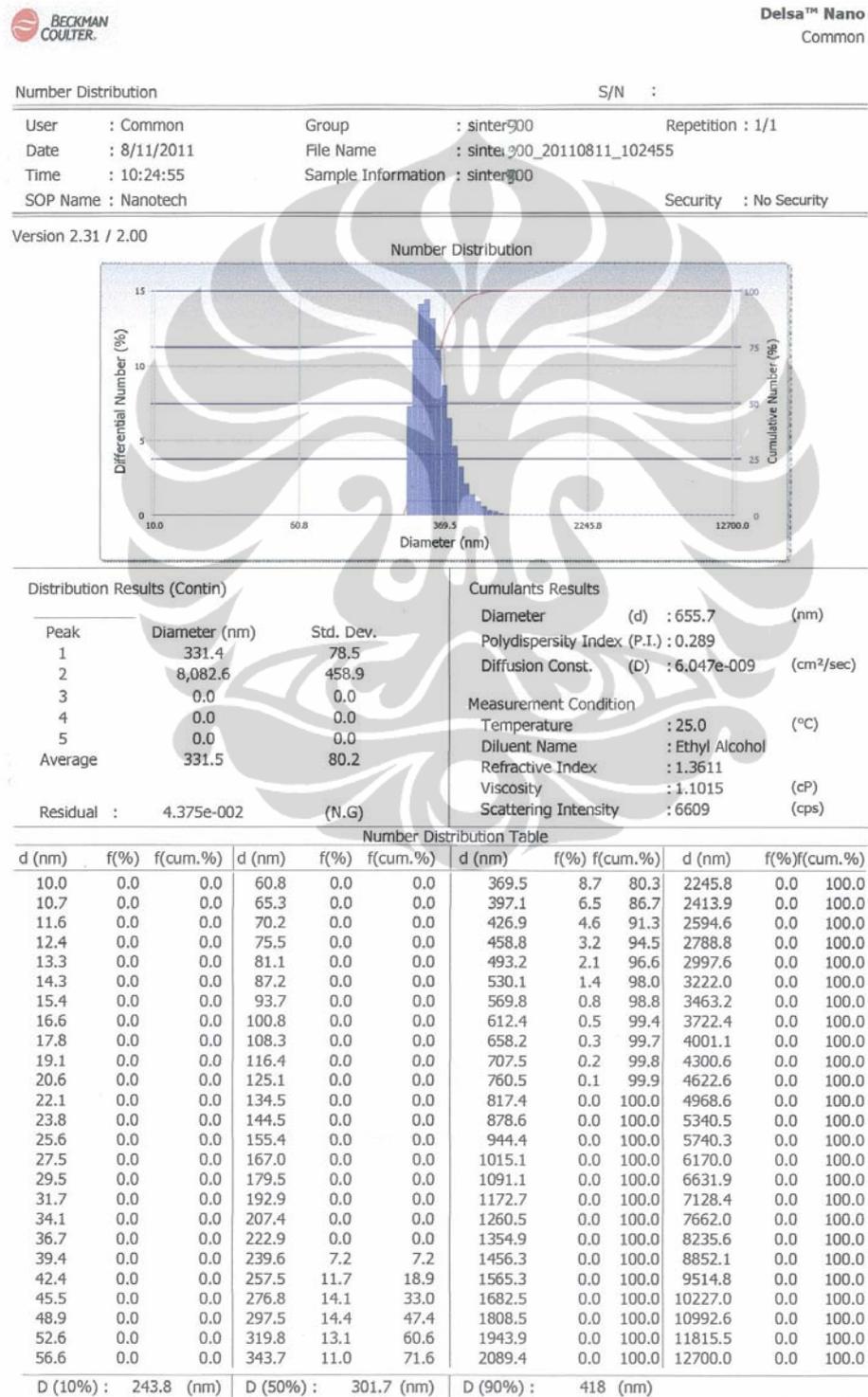
Lampiran 8 (b)

Data hasil katekterisasi dengan menggunakan *Particle Size Analyzer (PSA)* untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 750°C



Lampiran 8 (c)

Data hasil katakterisasi dengan menggunakan *Particle Size Analyzer (PSA)* untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 900°C

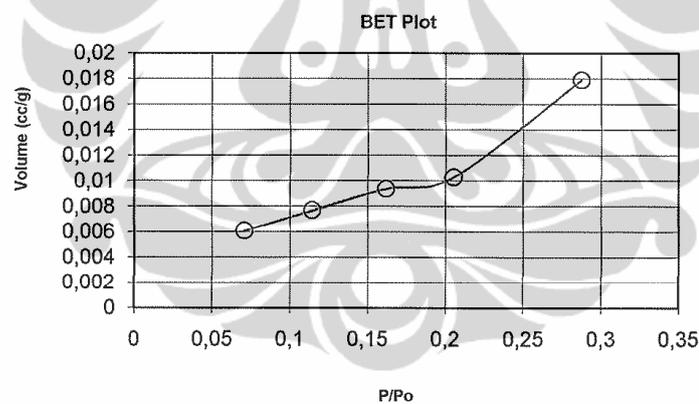


Lampiran 9 (a)

Data hasil katarakterisasi dengan menggunakan metode Branauer, Emmett dan Teler (BET) untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 400°C

Sorptomatic 1800 Carlo Erba Instruments Surface Area Analysis System Report

User ID	= Decky	User Setup	= 5
Sample ID	= HA 400	Sample Cell Number	= 2
Sample Weight	= 0.2657 g	Sample Volume	=
Sample Density	= 1.0000 g/cc		
Po Type	= User	Po	= 700.2333 mm Hg
Adsorbate	= N2	Bath Temperature	= 77.40 deg K
Adsorption Tolerance	= 0.1000 mm Hg	Desorption Tolerance	= 0.0000 mm Hg
Adsorption Equil Time	= 6 min	Desorption Equil Time	= 0 sec
Adsorption Dwell Time	= 180 sec	Desorption Dwell Time	= 0 sec
Analysis Start Time	= Rabu, 24 Nov 2010	Analysis End Time	= Kamis, 25 Nov 2010



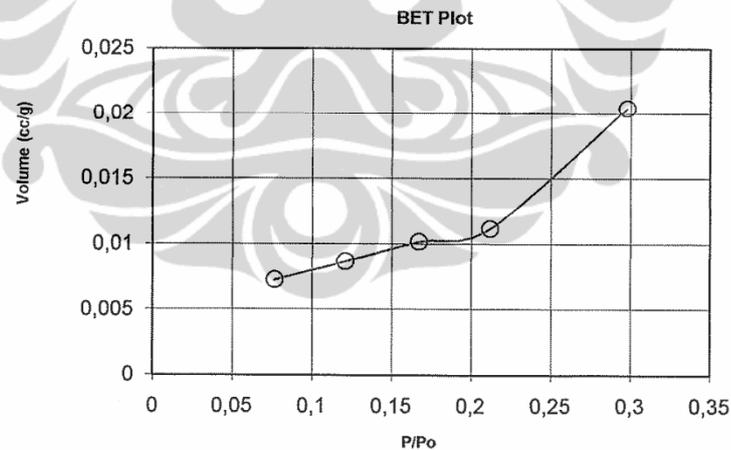
P/Po	Volume (cc/g)	BET summary	
0,0707	0,0061	Slope	: 0,05220
0,1143	0,0077	C constant	: 0,00154
0,1616	0,0094	Correlation coefficient, r	: 0,95828
0,2051	0,0103	Vm	: 18,59980
0,2874	0,0179	S	: 29,10820
		Surface Area	: 80.9685 m²/g

Lampiran 9 (b)

Data hasil katarakterisasi dengan menggunakan metode Branauer, Emmett dan Teler (BET) untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 750°C

Sorptomatic 1800 Carlo Erba Instruments Surface Area Analysis System Report

User ID	= Decky	User Setup	= 5
Sample ID	= HA 750	Sample Cell Number	= 2
Sample Weight	= 0.3572 g	Sample Volume	=
Sample Density	= 1.0000 g/cc		
Po Type	= User	Po	= 700.2333 mm Hg
Adsorbate	= N ₂	Bath Temperature	= 77.40 deg K
Adsorption Tolerance	= 0.1000 mm Hg	Desorption Tolerance	= 0.0000 mm Hg
Adsorption Equil Time	= 6 min	Desorption Equil Time	= 0 sec
Adsorption Dwell Time	= 180 sec	Desorption Dwell Time	= 0 sec
Analysis Start Time	= Rabu, 24 Nov 2010	Analysis End Time	= Kamis, 25 Nov 2010



ISOTHERM (Adsorption)

BET summary

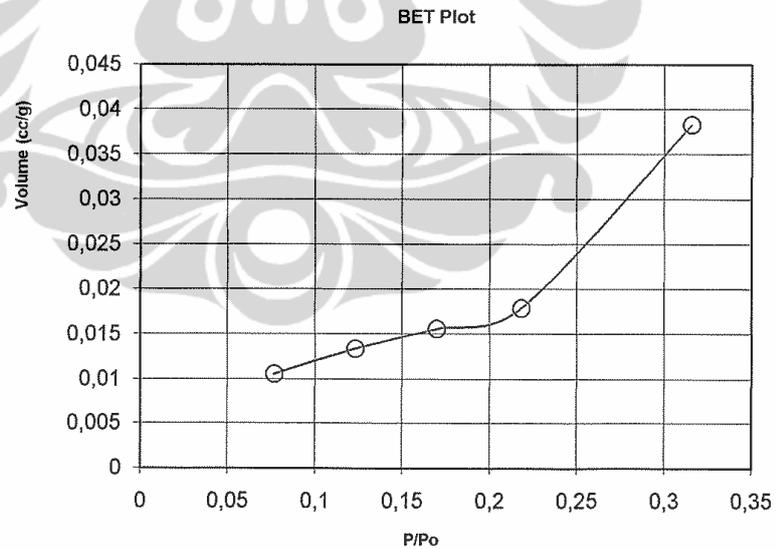
P/Po	Volume (cc/g)			
0,0766	0,0073	Slope	:	0,05700
0,1208	0,0087	C constant	:	0,00161
0,1669	0,0102	Correlation coeff, r	:	0,94142
0,2116	0,0112	V _m	:	17,45450
0,2977	0,0204	S	:	27,14110
		Surface Area	:	75.9829 m²/g

Lampiran 9 (c)

Data hasil katarakterisasi dengan menggunakan metode Branauer, Emmett dan Teler (BET) untuk hidroksiapatit kalsinasi suhu 900°C

Sorptomatic 1800 Carlo Erba Instruments Surface Area Analysis System Report

User ID	= Decky	User Setup	= 5
Sample ID	= HA900	Sample Cell Number	= 2
Sample Weight	= 0.4677 g	Sample Volume	=
Sample Density	= 1.0000 g/cc		
Po Type	= User	Po	= 700.2333 mm Hg
Adsorbate	= N2	Bath Temperature	= 77.40 deg K
Adsorption Tolerance	= 0.1000 mm Hg	Desorption Tolerance	= 0.0000 mm Hg
Adsorption Equil Time	= 6 min	Desorption Equil Time	= 0 sec
Adsorption Dwell Time	= 180 sec	Desorption Dwell Time	= 0 sec
Analysis Start Time	= Rabu, 25 Nov 2010	Analysis End Time	= Kamis, 25 Nov 2010



ISOTHERM (Adsorption)

BET summary

P/Po	Volume (cc/g)			
0,0766	0,0106	Slope	:	0,11190
0,123	0,0134	C constant	:	-0,00106
0,1697	0,0156	Correlation coefficient, r	:	0,93416
0,2181	0,0179	Vm	:	9,68970
0,3155	0,0383	S	:	22,00160
		Surface Area	:	42.1811 m²/g

Lampiran 10 (a)

Data hasil uji statistik *One-way* Anova untuk kekuatan kompresi dari scaffold komposit alginat *S.duplicatum*//hidroksiapatit

Descriptives								
Nilai_Kompresi S.duplicatum	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Kompresi H4 00	8	2.2675	0.1191	0.0421	2.1679	2.3671	2.0043	2.3691
Kompresi H 750	8	2.5909	0.2335	0.0826	2.3956	2.7861	2.3019	2.9377
Kompresi H 900	8	2.6704	0.1692	0.0598	2.5290	2.8118	2.4603	2.9608
Kontrol	8	2.2093	0.1700	0.0601	2.0672	2.3515	1.9810	2.4119
Total	32	2.4345	0.2636	0.0466	2.3395	2.5295	1.9810	2.9608

Test of Homogeneity of Variances			
Nilai_Kompresi	df1	df2	Sig.
Levene Statistic	3	28	0.05

ANOVA					
Nilai_Kompresi	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.27	3	0.423	13.408	0.0001
Within Groups	0.884	28	0.032		
Total	2.153	31			

Lampiran 10 (b)

Data hasil uji statistik LSD-SPSS untuk kekuatan kompresi dari scaffold komposit alginat *S.duplicatum*//hidroksiapatit

Post Hoc Tests
Dependent Variable: Nilai_Kompresi

Multiple Comparisons

	(I) Kompresi	(J) Kompresi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	HA 400	HA 750	-.32337500*	0,089	0,001	-0,505	-0,141
		HA 900	-.40292500*	0,089	0,000	-0,585	-0,221
		HA Aldrich	0,058175	0,089	0,518	-0,124	0,240
	HA 750	HA 400	.32337500*	0,089	0,001	0,141	0,505
		HA 900	-.07955	0,089	0,378	-0,262	0,102
		HA Aldrich	.38155000*	0,089	0,000	0,200	0,564
	HA 900	HA 400	.40292500*	0,089	0,000	0,221	0,585
		HA 750	0,07955	0,089	0,378	-0,102	0,262
		HA Aldrich	.46110000*	0,089	0,000	0,279	0,643
	HA Aldrich	HA 400	-.058175	0,089	0,518	-0,240	0,124
		HA 750	-.38155000*	0,089	0,000	-0,564	-0,200
		HA 900	-.46110000*	0,089	0,000	-0,643	-0,279
Bonferroni	HA 400	HA 750	-.32337500*	0,089	0,007	-0,576	-0,071
		HA 900	-.40292500*	0,089	0,001	-0,655	-0,151
		HA Aldrich	0,058175	0,089	1,000	-0,194	0,310
	HA 750	HA 400	.32337500*	0,089	0,007	0,071	0,576
		HA 900	-.07955	0,089	1,000	-0,332	0,173
		HA Aldrich	.38155000*	0,089	0,001	0,129	0,634
	HA 900	HA 400	.40292500*	0,089	0,001	0,151	0,655
		HA 750	0,07955	0,089	1,000	-0,173	0,332
		HA Aldrich	.46110000*	0,089	0,000	0,209	0,713
	HA Aldrich	HA 400	-.058175	0,089	1,000	-0,310	0,194
		HA 750	-.38155000*	0,089	0,001	-0,634	-0,129
		HA 900	-.46110000*	0,089	0,000	-0,713	-0,209

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 10 (c)

Data hasil uji statistik *One-way Anova* untuk kekuatan kompresi dari scaffold komposit alginat *S.crassifolium*/hidroksiapatit

Descriptives									
Nilai_Kompresi S.crassifolium	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
H4 00	8	1.5834	0.1367	0.0483	1.4691	1.6977	1.4451	1.8859	
H 750	8	1.9722	0.0954	0.0337	1.8925	2.0520	1.8671	2.1581	
H 900	8	2.1908	0.1072	0.0379	2.1012	2.2805	2.0806	2.3744	
Ex Aldrich	8	2.2093	0.1700	0.0601	2.0672	2.3515	1.9810	2.4119	
Total	32	1.9889	0.2845	0.0503	1.8864	2.0915	1.4451	2.4119	

Test of Homogeneity of Variances				
Nilai_Kompresi	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	1.795	3	28	0.171

ANOVA					
Nilai_Kompresi	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.033	3	0.678	39.737	0.0001
Within Groups	0.477	28	0.017		
Total	2.51	31			

Lampiran 10 (d)

Data hasil uji statistik LSD- SPSS untuk kekuatan kompresi dari scaffold komposit alginat *S.crassifolium*/hidroksiapatit

Post Hoc Tests Multiple Comparisons
Dependent Variable: Nilai_Kompresi

	(I) Kompresi	(J) Kompresi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	HA 400	HA 750	-.38883750*	0,065	0,000	-.523	-.255
		HA 900	-.60742500*	0,065	0,000	-.741	-.474
		HA Aldrich	-.62591250*	0,065	0,000	-.760	-.492
	HA 750	HA 400	.38883750*	0,065	0,000	0,255	0,523
		HA 900	-.21858750*	0,065	0,002	-.352	-.085
		HA Aldrich	-.23707500*	0,065	0,001	-.371	-.103
	HA 900	HA 400	.60742500*	0,065	0,000	0,474	0,741
		HA 750	.21858750*	0,065	0,002	0,085	0,352
		HA Aldrich	-.0184875	0,065	0,779	-.152	0,115
	HA Aldrich	HA 400	.62591250*	0,065	0,000	0,492	0,760
		HA 750	.23707500*	0,065	0,001	0,103	0,371
		HA 900	0,0184875	0,065	0,779	-.115	0,152
Bonferroni	HA 400	HA 750	-.38883750*	0,065	0,000	-.574	-.203
		HA 900	-.60742500*	0,065	0,000	-.793	-.422
		HA Aldrich	-.62591250*	0,065	0,000	-.811	-.441
	HA 750	HA 400	.38883750*	0,065	0,000	0,203	0,574
		HA 900	-.21858750*	0,065	0,014	-.404	-.033
		HA Aldrich	-.23707500*	0,065	0,007	-.422	-.052
	HA 900	HA 400	.60742500*	0,065	0,000	0,422	0,793
		HA 750	.21858750*	0,065	0,014	0,033	0,404
		HA Aldrich	-.0184875	0,065	1,000	-.204	0,167
	HA Aldrich	HA 400	.62591250*	0,065	0,000	0,441	0,811
		HA 750	.23707500*	0,065	0,007	0,052	0,422
		HA 900	0,0184875	0,065	1,000	-.167	0,204

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 11 (a)

Data hasil uji *One-way Anova* untuk degradasi dari scaffold komposit alginat *S. duplicatum* / hidroksiapatit

Nilai_Degradasi		S. duplicatum						
Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
H 400	8	19,957	1,548	0,547	18,663	21,251	17,033	22,158
H 750	8	11,133	1,131	0,400	10,188	12,078	9,709	12,582
H 900	8	8,921	0,874	0,309	8,191	9,652	7,236	9,866
Kontrol	8	24,449	2,090	0,739	22,702	26,196	20,912	27,320
Total	32	16,115	6,594	1,166	13,738	18,492	7,236	27,320

Test of Homogeneity of Variances			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,188	3	28	0,332

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1286,333	3	428,778	194,745	0,001
Within Groups	61,649	28	2,202		
Total	1347,981	31			

Lampiran 11 (b)

Data hasil uji statistic LSD-SPSS untuk degradasi dari scaffold komposit

S. duplicatum / hidroksiapatit

Post Hoc Tests

		Multiple Comparisons				
Dependent Variable: Nilai_Degradasi						
	(I) Degradasi	(J) Degradasi	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD	H 400	H 750	8.82428750*	0,000	7,305	10,344
		H 900	11.03612500*	0,000	9,516	12,556
		Kontrol	-4.49178750*	0,000	-6,012	-2,972
	H 750	H 400	-8.82428750*	0,000	-10,344	-7,305
		H 900	2.21183750*	0,006	0,692	3,732
		Kontrol	-1.33160750E1*	0,000	-14,836	-11,796
	H 900	H 400	-1.10361250E1*	0,000	-12,556	-9,516
		H 750	-2.21183750*	0,006	-3,732	-0,692
		Kontrol	-1.55279125E1*	0,000	-17,048	-14,008
	Kontrol	H 400	4.49178750*	0,000	2,972	6,012
		H 750	13.31607500*	0,000	11,796	14,836
		H 900	15.52791250*	0,000	14,008	17,048
Bonferroni	H 400	H 750	8.82428750*	0,000	6,718	10,931
		H 900	11.03612500*	0,000	8,930	13,142
		Kontrol	-4.49178750*	0,000	-6,598	-2,386
	H 750	H 400	-8.82428750*	0,000	-10,931	-6,718
		H 900	2.21183750*	0,035	0,106	4,318
		Kontrol	-1.33160750E1*	0,000	-15,422	-11,210
	H 900	H 400	-1.10361250E1*	0,000	-13,142	-8,930
		H 750	-2.21183750*	0,035	-4,318	-0,106
		Kontrol	-1.55279125E1*	0,000	-17,634	-13,422
	Kontrol	H 400	4.49178750*	0,000	2,386	6,598
		H 750	13.31607500*	0,000	11,210	15,422
		H 900	15.52791250*	0,000	13,422	17,634

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 11 (c)

Data hasil uji statistik *One-way Anova* untuk degradasi dari scaffold komposit alginat *S.crassifolium* / hidroksiapatit

Oneway <i>S.crassifolium</i>									
Nilai_Degradasi	Descriptives								Between-Component Variance
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
HA 400	8	27.46	1.25	0.44	26.41	28.51	25.30	28.81	
HA 750	8	20.49	1.83	0.65	18.96	22.02	18.28	22.69	
HA 900	8	15.53	1.06	0.37	14.65	16.41	13.85	17.02	
HA Aldrich	8	24.45	2.09	0.74	22.70	26.20	20.91	27.32	
Total	32	21.98	4.80	0.85	20.25	23.71	13.85	28.81	
Model			Fixed Effects	1.61	0.29	21.40	22.57		
			Random Effects		2.58	13.76	30.20		26.337

Test of Homogeneity of Variances			
Degradasi			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.406	3	28	0.262

ANOVA					
Degradasi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	639.898	3	213.299	81.975	0
Within Groups	72.856	28	2.602		
Total	712.755	31			

Lampiran 11 (d)

Data hasil uji statistik LSD-SPSS untuk degradasi dari scaffold komposit alginat *S.crassifolium*/HA

Post Hoc Tests

Dependent Variable:Nilai_Degradasi

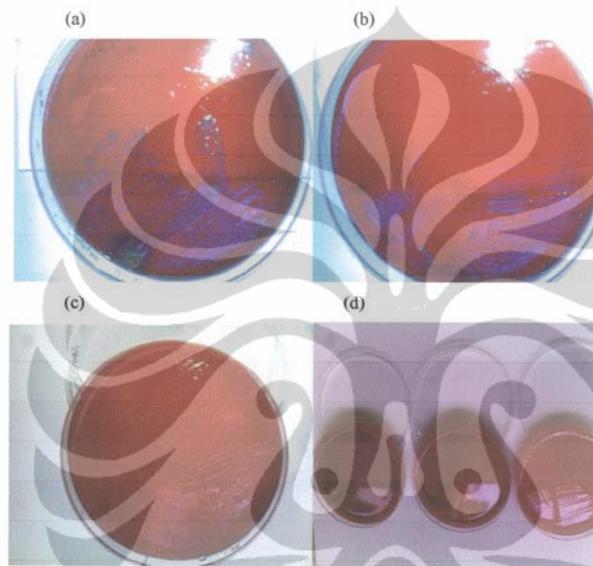
Multiple Comparisons

	(I) Degradasi	(J) Degradasi	Mean Difference (I-J)	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
LSD	HA 400	HA 750	6.97147500*	0.000	5.319	8.624
		HA 900	11.93256250*	0.000	10.280	13.585
		Kontrol	3.01082500*	0.001	1.359	4.663
	HA 750	HA 400	-6.97147500*	0.000	-8.624	-5.319
		HA 900	4.96108750*	0.000	3.309	6.613
		HA Aldrich	-3.96065000*	0.000	-5.613	-2.309
	HA 900	HA 400	-1.19325625E1*	0.000	-13.585	-10.280
		HA 750	-4.96108750*	0.000	-6.613	-3.309
		HA Aldrich	-8.92173750*	0.000	-10.574	-7.270
	HA Aldrich	HA 400	-3.01082500*	0.001	-4.663	-1.359
		HA 750	3.96065000*	0.000	2.309	5.613
		HA 900	8.92173750*	0.000	7.270	10.574
Bonferroni	HA 400	HA 750	6.97147500*	0.000	4.682	9.261
		HA 900	11.93256250*	0.000	9.643	14.222
		Kontrol	3.01082500*	0.005	0.721	5.301
	HA 750	HA 400	-6.97147500*	0.000	-9.261	-4.682
		HA 900	4.96108750*	0.000	2.671	7.251
		HA Aldrich	-3.96065000*	0.000	-6.250	-1.671
	HA 900	HA 400	-1.19325625E1*	0.000	-14.222	-9.643
		HA 750	-4.96108750*	0.000	-7.251	-2.671
		HA Aldrich	-8.92173750*	0.000	-11.211	-6.632
	HA Aldrich	HA 400	-3.01082500*	0.005	-5.301	-0.721
		HA 750	3.96065000*	0.000	1.671	6.250
		HA 900	8.92173750*	0.000	6.632	11.211

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 12

Gambar hasil uji sterilitas dari *scaffold* alginat/hidroksiapatit

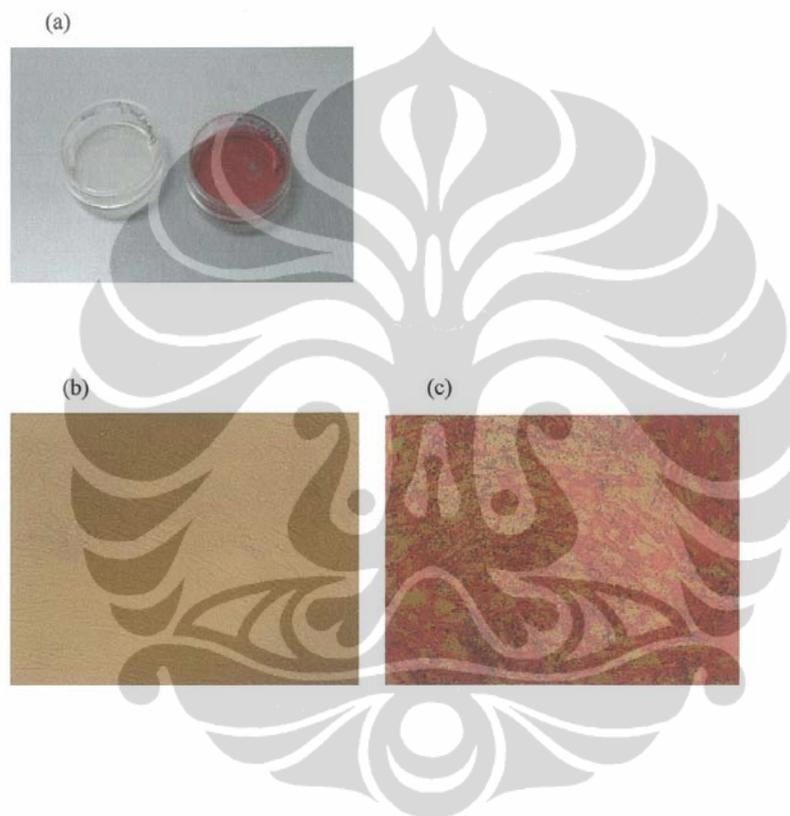


Keterangan :

(a) alginat *S.duplicatum* / hidroksiapatit 750°C, (b) alginat *S.crassifolium* / hidroksiapatit 750°C, (c) alginat ex-Sigma/ hidroksiapatit 750°C sebelum dilakukan sterilisasi dan (d) ketiga *scaffold* setelah dilakukan sterilisasi

Lampiran 13

Gambar hasil uji diferensiasi osteoblas dengan menggunakan pewarnaan Alizarin Red



Keterangan :

(a) makroskopis : kiri : medium kultur tanpa sel punca mesenkim dan kanan : kultur sel punca mesenkim; (b) medium kultur tanpa sel punca mesenkim, dan (c) kultur sel punca mesenkim