

## ***Scaffold 3D kitosan dan kolagen sebagai graft pada kasus kerusakan tulang (Study Pustaka)***

**Fitria Rahmitasari**

Departemen Ilmu Material Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah  
Surabaya - Indonesia

### **Abstrak**

**Latar belakang:** kerusakan tulang alveolar dalam kasus kedokteran gigi dapat disebabkan oleh penyakit periodontal, trauma pasca pencabutan gigi, post enukleasi kista, dan post operasi tumor. Kitosan merupakan bahan yang sering digunakan sebagai bahan *graft* namun penggunaannya sendiri kurang osteokonduktif apabila tidak dikombinasikan dengan bahan lain. Kitosan dapat dikombinasikan dengan kolagen dalam bentuk sediaan *scaffold* 3D untuk penyembuhan kasus kerusakan tulang. **Tujuan:** Untuk mengetahui sifat osteokonduktifitas bahan kitosan dan kolagen berupa sediaan *scaffold* 3D. **Telaah Pustaka:** *Scaffold* 3D kitosan dan kolagen dapat menirukan struktur dan fungsi alami dari protein ekstraseluler matriks, membentuk struktur unik yang dapat meningkatkan kekuatan mekanik, menurunkan tingkat biodegradasi, dan kombinasi keduanya dapat menghasilkan ion kompleks yang berperan untuk merangsang proliferasi dan diferensiasi sel sehingga dapat mempercepat proses penyembuhan tulang. **Simpulan:** *Scaffold* 3D kitosan dan kolagen berperan dalam proses penyembuhan tulang karena kedua bahan tersebut membentuk senyawa ion kompleks yang dapat meningkatkan sifat osteokonduktifitas.

**Kata kunci:** *Scaffold* 3D, kitosan, kolagen

### **Korespondensi:**

.Fitria Rahmitasari.  
Departemen Ilmu Material  
Kedokteran Gigi Universitas Hang  
Tuah. Jl. Arief Rachman Hakim  
No. 150 Surabaya, Indonesia.  
Email: fitri.rahmitasari@gmail.  
com

## Pendahuluan

Kerusakan tulang alveolar dalam kasus kedokteran gigi dapat disebabkan oleh penyakit periodontal, trauma besar pasca pencabutan gigi, post enukleasi kista, dan post operasi.<sup>1</sup> Penyakit periodontal di Indonesia menduduki urutan kedua setelah kasus gigi berlubang yang sampai saat ini masih merupakan masalah di kalangan masyarakat. Menurut hasil survei kesehatan gigi dan mulut tahun 2007, kejadian periodontitis di Indonesia mencapai 83.531 kasus dan di Jawa Timur penyakit periodontal terjadi pada 459 orang diantara 1000 penduduk.<sup>2</sup> Apabila penyakit periodontal tidak segera ditangani akan timbul kerusakan jaringan tulang sehingga menyebabkan kehilangan gigi.<sup>3</sup>

Suatu upaya untuk meregenerasi tulang dibutuhkan bahan *bone graft*. *Bone graft* terdiri dari tiga jenis, yaitu *autograft*, *allograft*, dan *xenograft*. Selama ini, *autograft* dikenal sebagai *gold standard* perawatan defek tulang, namun *graft* ini membutuhkan tindakan bedah tambahan sehingga diperlukan waktu yang lebih panjang, menyebabkan tingginya tingkat morbiditas, dan menimbulkan resiko infeksi. *Allograft* juga banyak digunakan dalam bidang regenerasi tulang, tetapi dapat menimbulkan resiko transmisi penyakit dari donor ke penerima donor.<sup>4</sup> Perkembangan bioteknologi mulai banyak mengenalkan konsep *tissue engineering* dengan cara pemberian *xenograft* untuk membantu regenerasi tulang karena tidak membutuhkan tindakan bedah tambahan, rendahnya tingkat morbiditas, dan mengurangi resiko transmisi penyakit.<sup>5</sup> *Xenograft* saat ini mulai banyak diaplikasikan dalam bidang rekayasa jaringan tulang.<sup>6</sup>

Beberapa tahun terakhir ini dengan adanya inovasi rekayasa jaringan tulang, biomaterial difokuskan pada desain *scaffold* yang cocok secara *physicochemical* untuk perlekatan sel, proliferasi, diferensiasi, dan pembentukan jaringan organ yang spesifik.<sup>6</sup> Syarat pembuatan *scaffold* yang ideal antara lain memiliki sifat osteokonduktif,

osteoinduktif, osteogenik<sup>7</sup>, *biodegradable*, mikrostruktur yang baik dan sifat mekanik yang tepat. Selain itu, syarat paling penting adalah kemampuan dalam merangsang adhesi sel dan dapat mempertahankan fungsi jaringan.<sup>8</sup> Material polimer yang banyak dikembangkan dalam rekayasa jaringan diantaranya adalah *poly glycolic acid* (PGA), *poly lactic acid* (PLA), *poly lactic-co-glycolic acid* (PLGA), kitosan, dan kolagen.<sup>9</sup> Kitosan merupakan *amino polysaccharide* (*poly-1,4-D-glucosamine*) yang banyak digunakan sebagai polimer dalam rekayasa jaringan.<sup>10</sup> Polimer ini telah dianggap sebagai material yang memiliki banyak kelebihan secara fungsional karena memiliki biokompatibilitas tinggi, *biodegradable*, dan toksisitas yang rendah.<sup>4,11</sup> Polimer lain yang juga memiliki potensi untuk rekayasa jaringan yaitu kolagen. Kolagen merupakan salah satu protein berserat yang paling banyak ditemukan pada vertebrata yaitu sekitar 25-35% dari total protein tubuh.<sup>12</sup> Kolagen dapat ditemukan di kartilago, tulang, discus intervertebral, pembuluh darah, tendon, ligamen, kulit, dan komponen utama dari ekstraselular matriks. Kolagen memiliki kandungan RGD (*Arg-Gly-Asp*) dan non RGD yang dapat mengikat sel permukaan terkait integrin sehingga memudahkan migrasi, perlekatan, proliferasi, dan diferensiasi sel.<sup>13</sup> Kolagen telah digunakan dalam berbagai aplikasi pada rekayasa jaringan karena memiliki sifat biokompatibilitas yang baik, *biodegradable*, dan antigenisitas yang rendah.<sup>14,15</sup> Material ini merupakan salah satu material yang cocok dalam memperbaiki kerusakan jaringan dan organ.<sup>16</sup> Kolagen dapat dibuat menjadi *scaffold* yang berguna untuk regenerasi tulang karena dapat diserap oleh tubuh serta memiliki perlekatan yang baik dengan sel.<sup>17</sup> Kolagen memiliki kelemahan yaitu waktu degradasi yang cepat dan kekuatan mekanik yang lemah. Untuk menutupi kelemahan tersebut, kombinasi kitosan dan kolagen diperlukan untuk menghasilkan material yang lebih baik. Kitosan dan kolagen dapat dikombinasikan menjadi suatu material baru dengan membentuk struktur unik yang dapat meningkatkan kekuatan mekanik dan

menurunkan tingkat biodegradasi terhadap kolagenase.<sup>18</sup>

## TELAAH PUSTAKA

### **Scaffold**

*Scaffold* merupakan istilah untuk sintesis matriks ekstraseluler yang menjadi tempat penempelan dan tempat pertumbuhan sel-sel baru, matriks ini harus terbuat dari bahan yang *biodegradable* yang mampu dimetabolisme tubuh dan akhirnya hilang ketika sel-sel baru sudah mulai tumbuh banyak, sehat, dan *survive*.<sup>19</sup> *Scaffold* merupakan biomaterial yang memfasilitasi pertumbuhan dan pembentukan jaringan tulang baru yang lebih teratur. *Scaffold* memiliki struktur berpori bersifat *biodegradable* dan biokompatibel.<sup>20</sup>

*Scaffold* 3 dimensi (3D) dengan struktur berpori memainkan peran penting dalam memanipulasi fungsi sel dan mendukung pembentukan organ baru (Gambar 1). Kriteria desain *scaffold* untuk rekayasa jaringan harus memenuhi beberapa hal, sebagai berikut: (1) permukaan harus dapat menjadi tempat adhesi sel, merangsang pertumbuhan sel, dan menjadi retensi sel yang telah berdiferensiasi; (2) *scaffold* harus biokompatibel; (3) *scaffold* harus *biodegradable* dan pada akhirnya akan tereliminasi; (4) porositas harus cukup tinggi untuk memberikan ruang yang cukup untuk adhesi sel, regenerasi matriks ekstraselular, dan struktur pori harus memungkinkan pemerataan sel melalui *scaffold* untuk memfasilitasi pembentukan jaringan yang homogen; (5) material dapat dibuat menjadi struktur 3D, dan memiliki sifat mekanik yang kuat.<sup>9</sup> Menurut Cui *et al.* kriteria *scaffold* ideal yang terbuat dari bahan organik maupun inorganik dengan struktur berpori adalah dapat menyediakan *micro-environment* yang cocok untuk proliferasi osteoblas dan osteogenesis.<sup>16</sup> Sejumlah *scaffold* 3D berpori dibuat dari berbagai jenis bahan *biodegradable* yang telah dikembangkan dan digunakan untuk rekayasa jaringan hati, kulit, tulang, tulang rawan, kandung kemih, dan ligamen, dan lain-lain.<sup>9</sup>



**Gambar 1. Scaffold 3D untuk regenerasi jaringan tulang<sup>21</sup>**

Tujuan menggunakan *scaffold* untuk regenerasi jaringan tulang adalah untuk memperkuat dan mengontrol konsentrasi elemen yang ditemukan secara alami dalam tulang autogenous yang menyebabkan perbaikan tulang lebih cepat dan respon lebih kuat. Dalam *scaffold*, protein yang osteogenik atau komponen osteoinduktif (misalnya, sel-sel batang mesenkimal dari sumsum tulang atau *growth factor*) dapat terkonsentrasi dan menuju pada *scaffold* akibat sifat osteokonduktif. Sifat kemampuan resorpsi dari *scaffold* harus sesuai dengan tingkat yang diharapkan saat regenerasi pada daerah defek. Dengan cara ini, matriks osteokonduktif bertindak sebagai perantara dari agen bioaktif, fungsi matriks bukan sekedar sebagai *scaffold* pasif namun juga permukaan kimia pada *scaffold* menunjukkan efek langsung pada daerah defek serta memperantarai molekul bioaktif seperti *growth factor* dan molekul adhesi.<sup>22</sup>

### **Kitosan**

Kitosan (*poly-D-glucosamine*) merupakan biopolimer yang dihasilkan dari proses deasetilasi kitin. Deasetilasi alkalin dari kitin ini akan menghasilkan kitosan yang secara struktural mirip dengan glikosaminoglikan.<sup>23</sup> Kitin (*poly-N-acetyl-D-glucosamine*) adalah salah satu biopolimer alami yang paling umum digunakan<sup>10</sup> dan bisa ditemukan pada kulit invertebrata, seperti udang atau kepiting, dinding sel fungi/yeast, dan endoskeleton dari moluska atau eksoskeleton arthropoda. Kitin terdiri dari rantai linier

**Tabel 1. Sifat Fisikokimia dan Biologis dari Kitosan<sup>25</sup>**

Sifat Fisikokimia Kitosan	Sifat Biologis Kitosan
Berat molekul 104 Da.	<i>Biocompatible</i> dan <i>biodegradable</i>
Memiliki tiga jenis gugus fungsional reaktif yaitu sebuah gugus amino serta gugus hidroksil primer dan sekunder	Haemostatik, bakteriostatik, dan fungistatik
Memiliki titik leleh ketika dipanaskan	Antitumor
Hampir semua larutan asam dapat melarutkan kitosan; yang paling sering digunakan adalah asam format dan asam asetat.	Aman dan tidak toksik
Densitas muatan yang tinggi pada pH <6,5	Dapat mengikat sel-sel mamalia secara agresif
Viskositas, tinggi ke rendah	Memiliki efek dalam meregenerasi jaringan ikat gusi

dari gugus *acetylglucosamine*. Pada proses deasetilasi, kitosan diperoleh dengan cara menghilangkan gugus *acetyl* ( $\text{CH}_3\text{-CO}$ ) pada molekul yang akan larut dengan asam dan melepaskan gugus amina ( $\text{NH}$ ) yang akan memberikan karakteristik kationik pada kitosan.<sup>24</sup> Berat molekul kitosan adalah 50-2000 kDa, dengan derajat deasetilasi sekitar 30-98%.<sup>23</sup> Polimer ini telah dianggap sebagai material yang memiliki banyak kelebihan secara fungsional karena memiliki biokompatibilitas yang baik, *biodegradable*, dan toksisitas yang rendah.<sup>4</sup>

Kitosan dapat dibuat menjadi beberapa bentuk seperti gel, membran, bubuk, dan larutan yang telah dikomersialkan dan digunakan untuk aplikasi biomedis.<sup>23</sup> Dalam bidang biomedis, kitosan digunakan sebagai *drug delivery system*, penyembuhan luka, regenerasi jaringan ikat gusi, agen antitumor, antibakteri, dan dapat digunakan sebagai *scaffold* untuk regenerasi jaringan lunak maupun keras.<sup>26</sup> Pada penyembuhan luka, bahan ini dapat meningkatkan regenerasi jaringan dan meningkatkan sintesa kolagen oleh fibroblas.<sup>14</sup> Pada penelitian *in vitro*, kitosan berpotensi untuk mendukung diferensiasi sel-sel osteoprogenitor dan memfasilitasi pembentukan tulang.<sup>27</sup> Kitosan dapat merangsang pertumbuhan dan diferensiasi sel osteoblas dalam kultur sel.<sup>28</sup>

### Kolagen

Kolagen merupakan salah satu protein berserat yang berlimpah dan paling banyak ditemukan pada vertebrata yaitu sekitar 25-35% dari total protein tubuh.<sup>12</sup> Protein

ini merupakan komponen utama dari ekstraselular matriks. Sampai saat ini telah ditemukan sekitar 28 tipe kolagen yang dikode oleh 45 gen yang berhasil diidentifikasi. Kolagen memiliki tiga rantai polipeptida (*triple helical*) yang masing-masing mengandung satu atau lebih pengulangan asam amino dengan struktur ( $\text{Gly-X-Y}$ ), dimana X dan Y dapat terdiri dari banyak asam amino.<sup>29</sup> Kolagen dapat ditemukan di kartilago, tulang, *discus intervertebral*, pembuluh darah, tendon, ligamen, kulit, dan kornea. Berbagai tipe kolagen disintesa oleh fibroblas, sel otot polos, sel endotel, sel epitel, kondrosit, osteoblas, myoblas, dan sel *notochord*. Kolagen tipe I paling banyak ditemukan dari 28 macam tipe kolagen yang sudah diketahui dan mayoritas ditemukan di dalam penyusun tulang yaitu >90% dari massa organik tulang.<sup>13</sup> Kolagen tipe I banyak ditemukan pada bagian tubuh yang lunak seperti kulit dan tendon, maupun bagian tubuh yang keras seperti pada tulang.<sup>30</sup>

Kolagen diketahui sebagai material yang paling menjanjikan dan telah ditemukan pada berbagai aplikasi dalam rekayasa jaringan karena memiliki sifat biokompatibilitas yang baik, *biodegradable*, dan antigenisitas yang rendah.<sup>14</sup> Material ini merupakan salah satu material yang cocok dalam memperbaiki kerusakan jaringan dan organ.<sup>16</sup> Kolagen dapat dibuat menjadi *scaffold* yang berguna untuk regenerasi tulang karena dapat diserap oleh tubuh serta memiliki perlekatan yang baik dengan sel.<sup>17</sup> Kolagen memiliki banyak sifat unik dan berguna sebagai *scaffold* untuk regenerasi jaringan. Kolagen

memiliki antigenisitas rendah, toksisitas rendah, afinitas yang tinggi terhadap air, dan *biodegradable*.<sup>31</sup> Kandungan kolagen terdiri dari domain RGD (*Arg-Gly-Asp*) dan non-RGD yang mengikat permukaan sel melalui integrin yang memfasilitasi migrasi, perlekatan, proliferasi, dan diferensiasi sel. Material berbahan dasar kolagen dapat digunakan untuk *suturing*, implan, *wound dressing*, DDS (*drug delivery system*), dan dapat dikembangkan menjadi *scaffold* dengan atau tanpa protein bioaktif dan sel yang berpotensi meregenerasi jaringan lunak maupun jaringan keras seperti kulit dan tulang.<sup>13</sup>

## Pembahasan

Inovasi rekayasa jaringan tulang difokuskan pada aplikasi biomaterial yang sedang dikembangkan diantaranya adalah *scaffold*. *Scaffold* yang berbentuk 3 dimensi (3D) dengan struktur berpori cocok untuk perlekatan sel, proliferasi, diferensiasi, dan pembentukan jaringan yang spesifik.<sup>6</sup> Biomaterial yang dapat dibuat dalam bentuk *scaffold* diantaranya adalah kitosan dan kolagen. Kitosan dan kolagen merupakan polimer yang memiliki sifat biodegradabel dan biokompatibel yang baik serta toksisitas yang rendah, sehingga cocok untuk dikombinasikan dalam bentuk *scaffold* karena syarat *scaffold* yang baik harus memiliki sifat-sifat tersebut.<sup>32</sup>

Kitosan merupakan polisakarida alami yang secara struktur mirip dengan glukosaminoglikan yaitu *poly-D-glucosamine*. Pada jaringan ikat tubuh, glukosaminoglikan merupakan komponen yang paling banyak terdapat di dalam ekstraseluler matriks (ECM).<sup>33</sup> Kitosan dihasilkan dari deasetilasi kitin dengan cara menghilangkan gugus *acetyl*, sehingga membuat kitosan ini bermuatan positif (kationik).<sup>24</sup> Semakin tinggi derajat deasetilasi dari kitin akan memberikan sifat kationik yang lebih besar. Selain itu, semakin tinggi derajat deasetilasi akan berpengaruh pada kemampuan biodegradasi yang semakin rendah.<sup>34</sup> Kitosan yang bermuatan positif ini dapat membentuk

ikatan ion kompleks dengan cara berikatan dengan bahan yang bermuatan negatif seperti kolagen.<sup>35</sup> Sifat kationik pada kitosan ini dapat merangsang adhesi sel, sebagai modulator morfologi sel, diferensiasi, pergerakan sel, sintesa dan fungsi sel.<sup>36</sup>

Kitosan juga diketahui dapat merangsang pertumbuhan dan diferensiasi dari osteoblas pada kultur sel. Kitosan dapat dibuat dalam berbagai bentuk dan digunakan secara luas dalam bidang medis untuk pengobatan seperti penyembuhan luka, regenerasi jaringan ikat gusi, dan sebagai *scaffold* untuk regenerasi jaringan lunak maupun keras.<sup>11</sup>

Pada penelitian *in vitro* didapatkan efek kitosan pada pembentukan tulang sudah mencapai tingkat seluler yang dapat mempengaruhi terjadinya peningkatan diferensiasi sel osteoprogenitor dan menstimulasi pembentukan tulang baru.<sup>23</sup> Saat ini, kitosan menjadi salah satu material yang menarik untuk diteliti khususnya sebagai pengganti tulang dengan banyak karakteristik yang diinginkan sehingga memungkinkan dalam menghasilkan *scaffold* yang baik.<sup>37</sup> Namun, keberadaan *scaffold* berbahan material tunggal dengan menggunakan bahan organik kurang mampu untuk memenuhi semua kriteria yang dibutuhkan dalam keberhasilan suatu regenerasi jaringan tulang. Keberadaan kitosan sendiri tidak cukup osteokonduktif, sehingga kemampuan dalam pembentukan tulang baru masih kurang optimal. Pendekatan untuk mengatasi kelemahan ini adalah dengan cara merancang suatu komposit dengan menggabungkan kekuatan dari bahan yang berbeda sehingga dapat meminimalkan kelemahan dari dua bahan yang berbeda tersebut.<sup>8</sup> Salah satu bahan organik yang juga berperan dalam rekayasa jaringan adalah kolagen.<sup>16</sup> Kolagen memiliki sifat anionik atau bermuatan negatif. Kombinasi kitosan (kationik) dan kolagen (anionik) dapat membentuk ion kompleks yang dapat memaksimalkan sifat osteokonduktif bahan terhadap kerusakan tulang. Osteokonduksi yang optimal dapat mensupport perlekatan sel-sel pembentuk



tulang yang penting untuk proses pembuatan tulang baru.<sup>38</sup>

## Kesimpulan

*Scaffold* 3D berupa kombinasi kitosan dan kolagen berperan dalam regenerasi tulang karena kombinasi kedua bahan tersebut menjadi polimer alami yang memiliki ion kompleks sehingga dapat memaksimalkan sifat osteokonduktifitas yang dimiliki.

## Daftar Pustaka

1. Fokkema SJ. 2002. *The central role of monocytes in systemic immune effects induced by the chronic periodontal infection*. Ponsen & Looijen BV. Wageningen. pp.104-16.
2. Melok AW. 2009. *Perbedaan Kadar Matrix Metalloproteinase-8 setelah scaling dan pemberian tetrasiklin pada penderita Periodontitis Kronis*. Jurnal PDGI. 58(1). pp. 1.
3. Tampubolon NS. 2008. *Dampak karies gigi dan Penyakit Periodontal*. USU Repository. pp.7.
4. Venkatesan J and Kim S. 2010. *Chitosan composites for bone tissue engineering – an overview*. Mar Drugs. 8. pp. 2252-66.
5. Mehta M, Schmidt-Bleek K, Duda GN, and Mooney DJ. 2012. *Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone*. Adv Drug Deliv Rev. pp.1-2.
6. Niu X, Fan Y, Liu X, Li X, Li P, Wang J, Sha Z, and Feng Q. 2011. *Repair of bone defect in femoral condyle using microencapsulated chitosan, nanohydroxyapatite/collagen and poly (L-lactide)-based microsphere-scaffold delivery system*. Artificial Organs. 35(7). pp. 119.
7. Tal H. 2012. Bone Regeneration. Croatia: InTech. pp.28
8. Ariani MD, Matsuura A, Hirata I, Kubo T, Kato K, and Akagawa Y. 2013. *New development of carbonate apatite-chitosan scaffold based on lyophilization technique for bone tissue engineering*. Dental Materials Journal. vol.32, no.2. pp. 317-18.
9. Chen G, Ushida T, and Tateishi T. 2002. *Scaffold design for tissue engineering*. Macromol Biosci. 2. pp. 68-9.
10. Amaral IF, Cordeiro AL, Sampaio P, et al.. 2007. *Attachment, spreading, and short-term proliferation of human osteoblastic cells cultured on chitosan films with different degrees of acetylation*. J Biomaterial Science Polymer. 18. pp. 469-85.
11. Sonia TA and Sharma CP. 2011. *Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective*. Adv Polym Sci. 243. pp. 23-54.
12. Huda, N. et al., 2013. Preliminary study on physicochemical properties of duck feet collagen. *International Journal of Poultry Science*, 12(10), pp.615.
13. Kruger TE, Miller AH, and Wang J. 2013. *Collagen scaffolds in bone sialoprotein-mediated bone regeneration*. The Scientific World Journal. pp. 1.
14. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, and Han C. 2003. *Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering*. Journal Biomaterials. 24. pp. 4832-34.
15. Osidak EO, Osidak MS, Akhmanova MA, and Domogatskii SP. 2014. *Collagen-A biomaterial for delivery of growth factors and tissue regeneration*. Russian Journal of General Chemistry. vol 84, no.2. pp. 368-9.
16. Cui K, Zhu Y, Wang XH, Feng QL, and Cui FZ. 2004. *A porous scaffold from bone-like powder loaded in a collagen-chitosan matrix*. Journal of Bioactive and Compatible Polymers. Vol. 19. pp. 18.
17. Carlson GA, Dragoo JL, Samimi B, Bruckner DA, Bernard GW, Hedrick M & Benhaim P. 2004. *Bacteriostatic properties of biomatrices against common orthopaedic pathogens*. Biochemical and Biophysical Research Communications. vol. 321, no. 2. pp. 472-78.
18. Arpornmaeklong P, Suwatwirote N, Pripatnanont P, and Oungbho K. 2007. *Growth and differentiation of mouse*

- osteoblasts on chitosan-collagen sponges*. Int.J.Oral Maxillofac. 36. pp. 328-29.
19. Richard, Antonios, Mikos and Kasper FK. 2013. *Scaffold/ Extracellular Matrix Hybrid Constructs for Bone-Tissue Engineering*. Healthcare Mater.(2). pp 12-24.
  20. Indrani JD dan Adi WA. 2012. *Preparasi Nanokristalin Hidroksiapatit Untuk Scaffold Rekayasa Jaringan Tulang*. Indonesian Journal of Material Science. pp. 36-9.
  21. Steichen R. 2012. Biomaterials for 3D Tissue Culture. Available at: <http://www.cellon.lu/productsscaffolds.html>. Accessed at: 30<sup>th</sup> March 2015.
  22. Fleming JE Jr, Cornell CN, Muschler GF. *Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering*. Orthop Clin North Am. 2000; 31(3):357-74.
  23. Kung S, Devlin H, et al.. 2011. *The osteoconductive effect of kitosan-collagen composites around pure titanium implant surfaces in rats*. J periodont Res. vol.46. pp. 127.
  24. Kim S and Venkatesan J. 2014. Chitin and chitosan derivatives: Advances in drug discovery and developments. CRC Press - Taylor & Francis Group, ILC. pp.3-4.
  25. Tiwary AK, Sapra B, Kaur G, Rana V. 2011. Chitosan: Modifications and applications in dosage form design. Nova Science Publishers, Inc. pp.73
  26. Ariani MD, Matsuura A, Hirata I, Kubo T, Okazaki M, and Akagawa Y. 2012. Fabrication of highly deacetylated chitosan *scaffold* for tissue engineering. pp.10.
  27. Dai T, Tanaka M, Huang YY, and Hamblin MR. 2011. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. Expert Rev Anti Infect Ther. (9):7. p.8.
  28. Wang J, de Boer J, de Groot K. 2008. Proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells on calcium phosphate/ chitosan coatings. J Dent Rest. p.650-54.
  29. Fratzl P. 2008. *Collagen (Structure and Mechanics)*. Germany: Springer. pp.1-16.
  30. Kiruthiga N, Sujithra S, and Kumaresan R. 2013. International journal of institutional pharmacy and life sciences , 3(December), pp.53-4.
  31. Liu, Y., Ma, L. & Gao, C., 2012. Facile fabrication of the glutaraldehyde cross-linked collagen/chitosan porous *scaffold* for skin tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 32(8), pp.2361. Available at: [http://dx. doi. org/10.1016/j.msec.2012.07.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2012.07.008).
  32. Zhao H, Ma L, Gao C, and Shen J. 2008. Fabrication and properties of mineralized collagen-chitosan/hydroxyapatite scaffolds. Polymers for advanced technologies. pp. 1591.
  33. Lee JE et al. 2005. Evaluation of chondrogenesis in collagen/chitosan/ glycosaminoglycan *scaffolds* for cartilage tissue engineering. Tissue engineering and regenerative medicine. vol.2. no.1. pp.47.
  34. Jiang T, Deng M, Fattah WIA, and Laurencin CT. 2012. Chitosan-based biopharmaceutical scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 403-4.
  35. Ishihara M, Fujita M, Kishimoto S, Hattori H, and Kanatani Y. 2012. Biological, chemical, and physical compatibility of chitosan and biopharmaceuticals. John Wiley & Sons, Ltd. pp.94-6.
  36. Gorgieva S and Kokol V. 2011. Collagen- vs. Gelatine-based biomaterials and their biocompatibility: review and perspectives. Biomaterials Applications for Nanomedicine. pp. 21-35.
  37. Thein-Han WW and Misra RDK. 2009. *Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering*. Acta Biomaterialia. 5. pp.1182-97.
  38. Tal H. 2012. Bone Regeneration. Croatia: InTech. pp.28.