

Fabrikasi dan Pencirian Kerangka 3D Polimer-Bioseramik Berliang untuk Aplikasi Kejuruteraan Tisu

(Fabrication And Characterization of Porous 3D Polymer Bioceramic Scaffold for Tissue Engineering Applications)

Song See Lee^a, Lohashenpahan Shanmuganatha^a, Abu Bakar Sulong^b, Mohd Reusmaazran Yusof^c, Muhammad Azmi Abdul Hamid^d, Rahimi L. Muhamud^e & Ng Min Hwei^{a*}

^a*Center of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Jalan Yaacob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia*

^b*Department of Mechanical and Manufacturing, Faculty of Engineering & Built Environment, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi Selangor, Malaysia*

^c*Material Technology Group, Malaysian Nuclear Agency, Bangi, 43300, Selangor, Malaysia*

^d*Department of Applied Physics, Faculty of Sciences and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor, Malaysia*

^e*RS Advance Technology Sdn Bhd, Bkt. Raja Industrial Estate, 40000 Shah Alam, Selangor, Malaysia.*

Corresponding author: angela@ppukm.ukm.edu.my

Received 11 August 2023, Received in revised form 20 September 2023
Accepted 30 October 2023, Available online 30 May 2024

ABSTRAK

Kertas teknikal ini menjelaskan kaedah fabrikasi kerangka tulang tiga dimensi yang terdiri daripada bioseramik berliang dan polimer semulajadi untuk aplikasi kejuruteraan tisu tulang. Seterusnya, komposit ini dicirikan dari segi sifat-sifat fisiko-kimia dan mekanikalnya. Secara ringkasnya, hidroksiapatit (HA) and beta-trikalsium fosfat (β -TCP) dicampur dalam nisbah 7:3 telah difabrikasi sebagai kerangka bioseramik berliang manakala gelatin atau kolagen digunakan sebagai polimer tambahan ke atas kerangka bioseramik. Berbagai teknik telah diterokai untuk penghasilan liang dalam kerangka tulang. Keputusan imbasan tomografi mikro berkomputer membuktikan bahawa teknik templat korban dan bahan pengikat berjaya menghasilkan kerangka tulang berliang yang sekata. Purata keliangan untuk kerangka ($n=6$) adalah $52.36\% \pm 3.2$ di mana $51.27\% \pm 3.3$ ialah saling berhubung. XRD dan FTIR membuktikan bahawa tiada transformasi ciri struktur kimia bioseramik malah PO_4^{3-} dan HPO_4^{3-} masih dikekalkan bagi bioseramik HA/ β -TCP yang dihasilkan setelah persinteran di bawah suhu tinggi setinggi $1300\text{ }^\circ\text{C}$. Polimer berjaya digabungkan ke dalam kerangka bioseramik berliang melalui tekanan negatif diikuti dengan tekanan positif. Hasil ujian mekanikal mendapati bahawa tegasan mampatan maksimum kerangka bioseramik tanpa kolagen adalah 1.750 ± 0.212 MPA manakala kerangka bioseramik kolagen adalah lebih tinggi iaitu pada 1.905 ± 0.007 MPA. Terikan mampatan maksimum kerangka bioseramik tanpa kolagen pula adalah $1.565 \pm 0.757\%$ manakala kerangka bioseramik kolagen adalah kira-kira tiga kali ganda lebih tinggi, iaitu pada $5.540 \pm 1.032\%$. Secara kesimpulannya, kerangka bioseramik HA/ β -TCP berliang adalah serasi dengan aplikasi kejuruteraan tisu dan dapat meningkatkan kekuatan mekanikal kerangka bioseramik menyerupai kekuatan mekanikal tulang kanselus.

Kata Kunci: Hidroksiapatit, Beta-trikalsium fosfat, bioseramik

This technical paper explains the fabrication and characterization method of a three-dimensional bone scaffold composed of porous bioceramics and natural polymers for bone tissue engineering applications. In brief, hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (β -TCP) were mixed in a 7:3 ratio and fabricated as the porous bioceramic framework, while gelatin or collagen was used as an additional polymer on the bioceramic framework. Various techniques have been explored for creating pores within the bone scaffold. Micro-computed tomography scan results demonstrate that sacrificial template and binder techniques successfully produce uniform porous bone scaffolds. The average porosity for the scaffolds ($n=6$) is $52.36\% \pm 3.2$, with $51.27\% \pm 3.3$ being interconnected. X-ray diffraction (XRD) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) confirm that there is no characteristic chemical structure transformation in the bioceramic. The PO_4^{3-} and HPO_4^{3-} groups are retained in the HA/ β -TCP bioceramic after sintering at a high temperature of 1300°C . Polymers are successfully incorporated into the porous bioceramic framework through negative pressure followed by positive pressure. Mechanical testing results show that the maximum compressive strength of the collagen-free bioceramic framework is 1.750 ± 0.212 MPa, while the collagen-containing bioceramic framework is higher at 1.905 ± 0.007 MPa. The corresponding maximum compressive strain for the collagen-free bioceramic framework is $1.565 \pm 0.757\%$, whereas the collagen-containing bioceramic framework is approximately three times higher, at $5.540 \pm 1.032\%$. In conclusion, the porous HA/ β -TCP bioceramic scaffold is compatible with tissue engineering applications and can enhance the mechanical strength of the bioceramic scaffold to resemble cancellous bone mechanical strength.

Keywords: Hydroxyapatite, Beta-tricalcium phosphate, bio ceramic

PENDAHULUAN

Tulang merupakan organ yang menyokong pelbagai organ yang di dalam badan dan membantu dalam pergerakan badan (Bellido et al. 2019). Tulang mempunyai kebolehan untuk memperbaiki dan menumbuh semula sendiri apabila mempunyai kecacatan tulang yang mungkin disebabkan oleh trauma, tumor atau infeksi tulang (Kenkre & Bassett, 2018) Walau bagaimanapun, sesetengah kecacatan tulang terlalu besar seperti kecacatan kritikal tulang atau kecacatan tidak bersatu tulang telah melebihi kemampuan membaikpulih tulang atau bermaksud tulang tidak dapat sembuh sendiri secara spontan (Ganey et al. 2009). Cacatan kritikal tulang memerlukan pembedahan yang melibatkan prosedur cantuman tulang untuk membantu pembaikan tulang dan secara langsungnya mengembalikan kefungsi tulang (Ghensi et al. 2017).

Transplan autograf merupakan satu kaedah yang mengambil tisu dari satu bahagian ke satu lagi dalam badan individu yang sama. Transplan autograf tidak memerlukan proses kimia kerana autograf adalah osteokonduktif secara semula jadi dan sifat ini menyebabkan kaedah autograf menjadi piawai rawatan sebagai pengganti tulang kepada pesakit ortopedik (Shah et al. 2019). Namun kaedah autograf memberi pemulihan terbaik untuk kecederaan tulang, tetapi kaedah ini adalah terhad dari segi jumlah dan menyebabkan kecederaan yang tidak dielakkan terhadap penderma kerana kaedah memerlukan pembedahan ke atas penderma untuk mengeluarkan tisu yang diperlu (Raheem et al. 2011). Oleh itu, alograf dan xenograf telah digunakan sebagai tulang gantian dalam amalan kritikal untuk meningkatkan jumlah tulang gantian. Alograf merupakan kaedah yang mengambil tisu daripada individu yang lain dan diimplantasi kepada pesakit. (Abdul Wahab et al. 2020)

Kekurangan kaedah gantian ini adalah mempunyai risiko yang membawa bakteria, risiko transmisi penyakit virus atau respons imunogenik. Xenograf merupakan kaedah yang mengambil dari sumber haiwan juga mempunyai risiko yang sama dengan alograf (Kakiuchi et al. 1985; Raheem et al. 2011). Implan logam merupakan kaedah yang memberi kekuatan yang paling tinggi antara jenis tulang gantian (Shibuya & Jupiter, 2015). Namun demikian, implan tulang logam mempunyai risiko yang menyebabkan halangan dalam aliran darah di bahagian cedera. Tulang gantian 3D sintetik menggunakan biobahan atau bioseramik merupakan satu kaedah yang selamat daripada risiko pemindahan bakteria dan virus dari penderma (Fu et al. 2011). Walau bagaimanapun, graf tulang 3D sintetik yang diperbuat daripada bahan logam atau plastik tidak dapat membaikpulih tisu-tisu tulang sepenuhnya disebabkan oleh kekurangan aktiviti biokimia seperti '*bone morphogenic protein*' (BMP) dan '*alkaline phosphatase*', '*bone sialoprotein*' yang aktif untuk membantu proses baikpulih tisu tulang (Turnbull et al. 2018). Semua batasan graf tulang disenaraikan di atas telah memandu pembangunan tulang kejuruteraan tisu untuk mengatasi kelemahan tulang gantian yang sedia ada (Ganey et al. 2009). Secara prinsipnya, tulang kejuruteraan tisu harus merangkumi kerangka yang merupai matriks tisu tulang, sel osteoprogenitor hidup yang akan merembeskan faktor biokimia pertumbuhan semula tisu tulang seperti yang disebut di atas. Maka, syarat utama, kerangka yang digunakan untuk aplikasi kejuruteraan tisu haruslah bioserasi dengan sel osteoprogenitor, baik untuk perlekatan sel dan mengandungi liang supaya sel dapat menembusi ke bahagian dalam kerangka.

Hidroksiapatit (HA) mempunyai nisbah stoikiometri Ca/P 1.67 dan bentuk kristalan heksagon. HA merupakan

pilihan utama bioseramik untuk penggunaan dalam bidang ortopedik dan bidang pergigian disebabkan tulang semulajadi mengandungi 70% HA, justeru penggunaannya yang meluas dalam kedua-dua bidang tersebut (Kavasi et al. 2021). Dari segi klinikal, HA dianggap selamat kerana ia merupakan bahan yang hampir lengai dalam keadaan fisiologi cecair badan (Cunniffe et al. 2010).

Secara idealnya, setelah implantasi dalam badan, kerangka tulang kejuruteraan tisu harus mengalami degradasi dan pada masa yang sama membenarkan sel osteoprogenitor menghasilkan matriks tisu tulang baru. Salah satu ciri penting bioseramik adalah keupayaannya untuk berinteraksi dengan sel dan membebaskan ion kalsium dan fosforus (Meirelles et al. 2008; Shuib et al. 2008). Dua ion tersebut merupakan komponen yang penting dalam mendorong aktiviti osteogenik dan selanjutnya meningkatkan pembentukan tisu tulang (Tan et al. 2022). HA telahpun diguna secara klinikal sebagai bahan tulang gantian kerana sifat mekanikalnya yang setara dengan tulang dan keupayaan HA untuk menjalani degradasi secara perlahan sementara menanti sel tulang hos menghasilkan matriks tulang baru. HA telah disalutkan di atas pelbagai jenis implan logam untuk meningkatkan osteokonduktiviti dan osteoinduktiviti implan logam (Meirelles et al. 2008) Tetapi, salah satu batasan HA ialah ianya mengambil masa yang sangat panjang untuk diserap, justeru itu pembebasan ion kalsium dan fosforus adalah juga sangat lambat.

Kelebihan trikalsium fosfat (TCP) adalah dari segi kebolehpemrosesan serapan yang tinggi dan pembebasan ion kalsium dan fosfat yang cepat. Oleh demikian, TCP adalah lebih osteoinduktif berbanding dengan HA dan memainkan peranan yang penting dalam pembentukan tisu tulang. TCP mempunyai dua bentuk polimorf yang diketahui, Alfa Trikalsium fosfat (α -TCP) and Beta Trikalsium fosfat (β -TCP). Berbanding dengan β -TCP, biodegradasi α -TCP adalah jauh lebih tinggi dan larut dengan terlalu cepat menyebabkan penghasilan kalsium dan fosfat yang mendadak dan mungkin toksik kepada tisu hos. Kesimpulannya, bahan sintetik seperti HA dan β -TCP tidak ada isu imunologik (Dong et al. 2013; Ramli et al. 2020) dan adalah lebih ideal untuk digunakan dalam fabrikasi kerangka tulang gantian. Kajian lepas oleh penyelidik kumpulan kami, menunjukkan bahawa ratio HA kepada β -TCP yang berlainan mempunyai kadar degradasi dan kekuatan mekanikal yang berlainan (Mas'ood et al. 2018; Sadeghilar et al. 2014)). Penetapan ratio ini akan bergantung kepada lokasi tulang yang ingin diganti dan berat yang perlu ianya tanggung.

Kolagen merupakan protein yang paling banyak dalam mamalia antara polimer semula jadi (Mustafa Kamal Israk et al. 2021). Kolagen menyediakan sokongan struktur dan mekanikal kepada tisu dan organ, dan memenuhi fungsi

biomekanik dalam tulang, rawan, kulit, tendon dan ligamen. Kerangka kolagen telah digunakan dalam pelbagai aplikasi perubatan: penghantaran ubat, pad hemostatik, gantian kulit, dan sebagai substrat kejuruteraan tisu. Lebih daripada sembilan puluh peratus matriks organik tulang adalah kolagen. Oleh demikian, penghasilan kerangka tulang dengan mengisi liang bioseramik dengan kolagen adalah satu langkah yang penting (Stadlinger et al. 2008). Secara alternatif, gelatin, iaitu kolagen terhidrolisa merupakan bentuk kolagen yang lebih senang didapati dan berkost rendah. Ianya terdiri daripada amino asid yang sama seperti kolagen tetapi mempunyai sifat fisikokimia yang agak berbeza. Satu kelebihan gelatin adalah fungsi polimerisasi gel pada suhu yang rendah i.e. 22.4-25.2 °C. Secara prinsipnya, penambahan polimer dapat meningkatkan daya mampatan kerangka bioseramik dan juga menggalakkan perlekatan sel.

KAEDAH FABRIKASI KERANGKA BIOSERAMIK BERLIANG

Bahan mentah untuk menghasilkan kerangka bioseramik terdiri daripada serbuk hidroksiapatit (*hydroxyapatite*; HA) diperoleh daripada Sigma Aldrich, USA dan serbuk beta trikalsium fosfat (*Beta tricalcium phosphate*; β TCP) diperoleh daripada Berkeley Advanced Bimaterials, USA. Bahan penyerak Darvan C diperoleh daripada Vanderbilt Company Inc., USA. Bahan kimia lain yang digunakan semasa menghasilkan kerangka bioseramik adalah diperolehi daripada Sigma Adrich, USA. Terdapat tiga kaedah fabrikasi komposit hidroksiapatit/HA-beta trikalsium fosfat/ β -TCP diperkenalkan dalam kajian ini. Kaedah pertama adalah penggunaan porogen untuk menghasilkan sifat keliang di Fakulti Sains & Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia. Kaedah kedua merupakan kaedah polimerisasi gel dan templat korban yang dijalankan di Agensi Nuklear Malaysia. Kaedah ketiga adalah penggunaan bahan pengikat dan templat korban yang dijalankan di RS Advanced Technology Sdn. Bhd. Dalam ketiga-tiga kaedah fabrikasi komposit nisbah HA dan β -TCP ditetapkan berdasarkan nisbah berat HA kepada β -TCP pada 7:3 dan dibentuk dalam berbagai bentuk (silindar, cakera, dan kuboid).

PENGURANGAN SAIZ HIDROKSIAPATIT

Sebelum fabrikasi, saiz zarah HA telah dikurangkan dengan kaedah bebola pengisar basah menggunakan pengisar (Pulverisette 5, Fritsch, Germany) disebabkan saiz yang

besar dan bentuk tidak teratur. 70% etanol dijadikan bahan penyerak (*dispersant*) dalam proses pengisar tersebut. Dua puluhan lima gram (2.5 g) HA dicampur dengan 5 gram bebola dan 10 ml 70% etanol. Campuran HA dengan etanol diempas pada 280 rpm selama 24 jam. HA dikeringkan dalam inkubator selama 12 jam dengan suhu 40 °C. HA dalam bentuk ketulan dihancurkan dan dikisarkan menjadi serbuk dengan lesung dan alu.

KAEDAH I: PENGGUNAAN POROGEN

Fabrikasi komposit hidroksiapatit/HA-beta trikalsium fosfat/ β -TCP di sini menggunakan kaedah larut lesap porogen. Kaedah menggunakan porogen untuk menghasilkan sifat keliangan. Porogen akan dihapuskan atau dipindah dari kerangka di akhir proses. Porogen yang digunakan adalah alkohol polivinil (PVA). Fabrikasi menggunakan teknik porogen dijalankan di Fakulti Sains dan Teknologi, UKM. Serbuk bioseramik HA dan β -TCP dicampurkan dengan nisbah berat 7:3. PVA dicampurkan dengan bioseramik menggunakan nisbah berat 1:9. Campuran dikisar menggunakan bebola pengisar untuk memastikan pencampuran PVA dan bioseramik adalah seragam. Campuran PVA dan bioseramik dimasukkan dalam acuan berbagai bentuk. Campuran tersebut dibiarkan dalam inkubator selama 3 hari dalam suhu 37 °C. Pada hari keempat, campuran bioseramik dikeluarkan dari acuan dan kering disinter dalam relau, suhu relau dinaikkan dengan kadar satu darjah Celsius seminit sampai 1300 °C dan kekal dalam suhu tersebut selama satu jam.

KAEDAH II: POLIMERASI GEL AKRILAMIDA DAN TEMPLATE KORBAN

PENYEDIAAN LARUTAN MONOMER DAN PENSINTERAN KOMPOSIT HIDROKSIAPATIT-BETA TRIKALSIMUM FOSFAT

Larutan monomer disediakan untuk melarutkan serbuk bioseramik HA dan β -TCP (7:3). Larutan monomer sebanyak 5 ml mengandungi 14.17 peratusan berat monomer, Dimethylacrylamide dan 2.83 peratusan berat penghubung silang, N,N-methylenebisacrylamide disediakan. 2.905 g serbuk HA dan 1.245 g serbuk β -TCP dicampurkan dalam larutan monomer, 1ml bahan penyerak, Darvan C dicampur dengan larutan monomer bersama serbuk bioseramik. Campuran bioseramik dan monomer dikisar menggunakan bebola pengisar untuk bertukar jadi campuran separa cair. Campuran separa cair (*slurry*)

dikacau selama 1 jam untuk memastikan keseragaman dicapai. 0.3 ml (5 peratusan berat) ammonium persulfat dan 0.2ml (99 peratusan) N,N,N-tetramethylenediamine sebagai reagen pempolimeran untuk mempolimerkan larutan monomer bersama bioseramik. Span poliuretana (PU sponge) direndam dalam campuran separa cair tersebut dengan segera. Untuk mencapai penyerapan yang sekata, span PU perlu ditekan dengan forsep dan dilepaskan dengan perlahan-lah berulang kali sebelum polimerasi gel berlaku. Span PU mengandungi gel bioseramik dikeringkan dalam inkubator yang bersuhu 40 °C selama 1 jam dan dikeringkan dalam suhu bilik selama 24 jam. Span bioseramik yang sudah kering disinter dalam relau, suhu relau dinaikkan dengan kadar satu darjah Celsius seminit sehingga mencapai 600 °C dan kekal dalam suhu tersebut selama satu jam untuk menginsinerasikan busa dan bahan monomer dan pensinteran disambung balik dengan kenaikan suhu sehingga mencapai 1300 °C dan kekal selama dua jam dalam suhu tersebut.

KAEDAH III: PENGGUNAAN BAHAN PENGIKAT DAN TEMPLAT KORBAN

Kaedah ini menggunakan templat korban iaitu span poliurethane yang sama seperti Kaedah I tetapi menggunakan bahan pengikat (*binder*) yang berlainan. Secara ringkasnya, bahan bioseramik HA dan β -TCP ditimbang menggunakan nisbah berat HA dengan β -TCP ialah 7:3. 70 g serbuk HA dan 30 g serbuk β -TCP dimasukkan dalam bikar yang mengandungi 900g bebola pengisar. Sebanyak 66.7 ml air suling ditambah dalam bikar untuk melarutkan HA dan β -TCP untuk menjadi campuran separa cair (*slurry*), nisbah air suling dengan bahan bioseramik ialah 6:4. Sebanyak 3% (5 g) bahan penyerak (*dispersant*) (RSAT X) akan ditambah dalam campuran separa cair untuk menyebarkan campuran separa cair kepada keadaan cecair. Bikar ditutup dengan ketat dan untuk mengelakkan kebocoran semasa pengisaran. Bikar dan campuran separa cair dikisar secara horizontal selama 2 jam untuk mengacau campuran separa cair tersebut sehingga sebati. Selepas pengisaran selama 2 jam, 1% (1.667 g) bahan pengikat (*binder*) (palm stearin, Malaysian Palm Oil Berhad) dan tiga titis bahan penyepuh (*deformer*) (RSAT D44) turut ditambah. Campuran separa cair HA/ β -TCP akan menjalankan pengisaran bebola secara horizontal selama 24 jam. Span poliurethane direndam dalam campuran separa cair tersebut dan dikeringkan semalaman dalam suhu bilik. Span yang sudah kering disinter dalam relau, suhu relau dinaikkan dengan kadar satu darjah Celsius seminit sampai 1300 °C dan kekal dalam suhu tersebut selama satu jam.

KAJIAN KEPOROSAN

Peratusan porositi adalah penting bagi kerangka kejuruteraan tisu. Dalam kajian ini, imbasan tomografi mikro berkomputer (*Micro computed tomography, MicroCT*) digunakan untuk mengkaji peratusan keporosan dan size liang. Komposit HA/ β -TCP diimbas dengan Skyscan 1076 *in vivo* scanner (Bruker, Belgium). Voltan pengimbas ditetapkan dalam 100 kV dan 1.0 mm aluminium sebagai penapis. Parameter untuk mengimbas adalah 540 ms untuk masa dedahan, lima bingkai purata untuk setiap posisi dan 0.5 darjah setiap langkah putaran. Dengan imej yang diambil oleh MicroCT, struktur dalaman kerangka seperti kehomogenan liang, peratusan liang tertutup dan liang terbuka, saiz liang boleh ditentukan. Pembinaan semula imej kepada imej 3D dilakukan dengan menggunakan perisian NRecon (Bruker, Belgium). Imej 3D kemudian dianalisis dengan perisian CTAn (Bruker, Belgium) untuk mengkaji keporosan kerangka.

PENCIRIAN KIMIA KERANGKA BIOSERAMIK

Komposit bioseramik dihasilkan perlu dicirikan untuk memastikan proses pensinteran tidak mengubah struktur molekul bioseramik. Komposit bioseramik telah dicirikan dengan menggunakan Belauan Sinar-X, (XRD) dan Spektroskopi inframerah fourier transformasi, (FTIR). Bahan mentah komposit bioseramik iaitu HA dan β -TCP turut dicirikan melalui XRD dan FTIR untuk membezakan 3 sebatian iaitu HA, β -TCP dan HA/ β -TCP.

BELAUAN SINAR-X

Belauan Sinar-X (*X-ray Diffraction, XRD*) menggunakan D8 Advance (Bruker, USA) dijalankan untuk mengenalpasti kristaliniti kerangka bioseramik melalui sinaran Cu K α , dengan peningkatan voltan 40 kV dan arus filament 40 mA.

SPEKTROSKOPI INFRAMERAH TRANSFORMASI FOURIER

Spektroskopi inframerah transformasi Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR*) dijalankan menggunakan Sistem Pengimejan Spectrum 400 FT-IR/NIR (Perkin Elmer, USA) dari 600 cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹. Ikatan kimia dari hidroksiapatit dan trikalsium fosfat piawai digunakan sebagai rujukan.

PENYEDIAAN POLIMER

Kaedah seterusnya bertujuan memasukkan polimer (gelatin atau kolagen) ke dalam liang bioseramik hidroksiapatit/HA-beta trikalsium fosfat/ β -TCP. Polimer yang digunakan dalam kajian ini adalah gelatin lembu (Nitta Gelatin, Japan) dan kolagen kambing adalah dari tendon kambing yang diekstrak seperti proses berikut.

PENGEKSTRAKAN KOLAGEN DARI TENDON KAMBING
(*OVIS ARIES*)

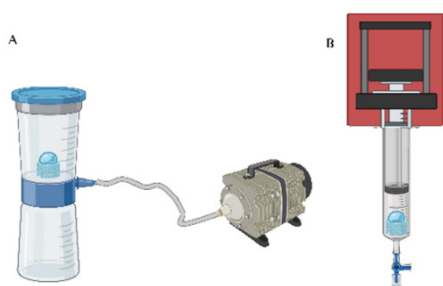
Kolagen yang digunakan dalam kajian ini adalah daripada tendon kambing (*ovis aries*). Tendon dipisahkan daripada kaki kambing biri-biri. Tendon direndam dalam 0.35 M asid asetik steril selama 48 jam. Tendon dikisarkan dengan mesin pengisar sehingga tendon bertukar tekstur menjadi licin dan berkrim. Tendon dimasukkan dalam tiub emparan 50 ml dan diemparkan dengan kelajuan 5000 rpm selama 5 minit dalam suhu 4 °C. Buih dikeluarkan dari tiub dan supernatan disimpan di bikar, pelet diperoleh dibuang. Simpan supernatan dalam tiub emparan 50ml yang mempunyai 5 g NaCl. NaCl dilarutkan oleh supernatan sebelum disimpan dalam peti sejuk yang bersuhu 4 °C selama 12 jam. Supernatan diemparkan dengan kelajuan 5000 rpm selama 5 minit dalam suhu 4 °C sekali lagi. Cecair jernih dibuang dan palet keruh disimpan ke dalam bikar dan disejukkan dalam peti sejuk yang bersuhu 4 °C. 14 kd tiub dialisis yang berpanjang 30 cm dididih dan dicuci oleh air suling. Supernatan dituangkan ke dalam tiub dialisis. Tiub dialisis direndam dalam air suling sejuk selama 72 jam. Air suling ditukar setiap 12 jam selama 72 jam. Tiub dialisis dicucuk oleh jarum untuk membuang cecair jernih. Kandungan yang tinggal disimpan dalam piring petri dan dibekukan dalam keadaan -80 °C selama 6 jam. Kolagen dikering beku dan ditimbang berat setelah kolagen telah kering. 1.5 g kolagen yang kering dilarutkan dalam 100 ml 0.35 M asid asetik steril untuk mencapai 15 mg/ml cecair kolagen. Cecair kolagen dipindah ke dalam tiub emparan 50 ml dan diemparkan dengan kelajuan 5000 rpm selama 5 minit dalam suhu 4 °C. Buih udara dikeluarkan selepas emparan. Cecair kolagen ini akan disimpan dalam suhu 4 °C sehingga diperlukan.

PENGABUNGAN POLIMER KEPADA KERANGKA
BIOSERAMIK

Mula-mulanya, kerangka HA/ β TCP diletak di atas unit penapis membran berliang 0.2 μ m. Unit penapis vakum pula disambungkan ke pam makmal vakum (Sartolab BT 150ml vacuum filtration unit, Sartorius AG, Jerman). Polimer dengan isipadu yang setara dengan kerangka dititis

ke atas kerangka dan unit penapis membran ditutup. Seterusnya, pam vakum (Cole-Parmer, USA) dihidupkan selama 20 minit untuk menyediakan persekitaran bervakum supaya polimer ditarik ke bawah dan melalui liang kerangka bioseamik. Seterusnya, komposit HA/ β TCP yang telah disalut dengan polimer dimuatkan ke dalam picagari 50 ml yang dipasang dengan pili penutup 3-arah. Picagari dikenakan tekanan yang kuat secara berterusan untuk 20 minit supaya polimer dapat menembusi liang bioseamik. Bagi komposit bioseamik gelatin, 7% (berat/isipadu dalam larutan fosfat penyebat garam) gelatin dicampur dengan 0.1% (berat/isipadu dalam 70% ethanol) genipin (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Shibukawa, Japan) dan dititis atas kerangka bioseamik berliang dengan segera sebelum polimerisasi gelatin berlaku. Komposit bioseamik gelatin berada dalam picagari selama 20 minit semasa polimerisasi gel berlaku.

Bagi komposit bioseamik kolagen, 0.015g/ml kolagen (w/v dalam 0.35M asid asetik) dititis atas kerangka bioseamik berliang dalam picagari dan dikenakan tekanan seperti disebut di atas. Seterusnya picagari bersama dengan komposit bioseamik dibeku dalam -80°C selama 6 jam. Ini diikuti oleh proses pembekuan kering (Cryodos 50, Telstar, Japan) untuk 24 jam pada -56°C di bawah tekanan atmosfera 5 mTorr. Kedua-dua jenis komposit bioseamik polimer dipecah separuh untuk diperhatikan sama ada polimer berjaya mengisi liang dalaman kerangka.



RAJAH 1. Penggabungan polimer dengan kerangka bioseamik berliang. A. Tekanan negatif B. Tekanan positif.

PENGESANAN POLIMER DALAM KERANGKA BIOSERAMIK

Pengesanan polimer adalah penting untuk mengenalpasti keberkesanan kaedah yang digunakan untuk mengintegrasikan polimer ke dalam liang komposit bioseamik. Polimer gelatin dapat diperhatikan dengan mata kasar kerana warna biru hasil tindakbalas gelatin dengan genipin (agen taut-silang). Kolagen perlu diwarnakan dengan pewarna khusus supaya dapat dikesan oleh sebab kolagen mempunyai sama warna dengan bioseamik iaitu putih.

PEWARNAAN PICROSIRIUS RED

Kolagen dapat dikesan menggunakan kit *Picrosirius Red Stain* (Polysciences, USA), di mana pewarna kit ini akan mewarnakan kolagen dengan warna merah dan membenarkan pembezaan kolagen dengan bioseamik. Untuk tujuan ini, kerangka kolagen telah dibelah separuh untuk memberi akses kepada pewarna untuk mencapai bahagian dalam komposit. Penetapan komposit bioseamik kolagen dengan 10% formalin selama 5 minit. Cuci komposit bioseamik kolagen dengan air ternyahion dan mewarnakan komposit dengan pewarna larutan Picrosirius Red daripada kit selama 90 minit. Komposit seterusnya dicuci dengan HCl daripada kit selama 1 minit dua kali. Komposit dicuci dengan air ternyahion dan dehidrat komposit dengan 70% ethanol selama 30 saat. Kewujudan kolagen diperhatikan.

IMBASAN MIKROSKOP ELEKTRON

Kerangka dibelah separuh dan diproses untuk Mikroskop Elektron Pengimbasan Pelepasan Medan (Field Emission Scanning Electron Microscopy) menggunakan FEI Quanta 650 (Thermo Fisher, USA) untuk meneliti kehadiran kolagen di bahagian dalam kerangka bioseamik.

UJIAN KEKUATAN MEKANIKAL

Ujian mampatan telah dipilih dalam kajian kekuatan mekanikal. Ujian mampatan menggunakan Instron 8872 (Instron, USA) dilakukan dengan kapasiti beban maksimum 10 kN. Tegangan mampatan (MPA) dan terikan mampatan (%) didapati melalui Instron 8872. Sampel yang diuji dengan kekuatan mekanikal adalah kerangka bioseamik dan kerangka bioseamik kolagen.

KEPUTUSAN

Rajah 2 menunjuk komposit HA/ β -TCP yang dihasilkan oleh tiga kaedah. Secara kasarnya, kaedah I menghasilkan kerangka dengan keporosan dan saiz liang yang kurang memuaskan dari segi saiz dan kesekataan. Antara tiga kaedah fabrikasi komposit HA/ β -TCP, kaedah 2 dan III yang menggunakan templat korban adalah paling berkesan untuk menghasilkan kerangka kejuruteraan tisu tulang yang berliang. Walaubagaimanapun, komposit HA/ β -TCP dihasilkan oleh kaedah I dan 2 adalah sangat rapuh dan mudah pecah. Maka, kerangka menggunakan kaedah III adalah lebih memuaskan dari segi keporosan, keseragaman liang dan juga kekuatan mekanikal.

PENGIMBASAN TOMOGRAFI MIKRO BERKOMPUTER

Dari analisa 3D pembentukan semula pengimbasan tomografi mikro berkomputer, kerangka bioseramik adalah berliang dan mempunyai liang yang saling berhubung.

Dengan menggunakan analisis perisian CTAn (Bruker, Belgium), peratusan keliangan tedapat ditentukan iaitu purata keliangan untuk kerangka (n=6) dari Kaedah III adalah $52.36\% \pm 3.2$ di mana $51.27\% \pm 3.3$ ialah saling berhubung.



(A)



(B)



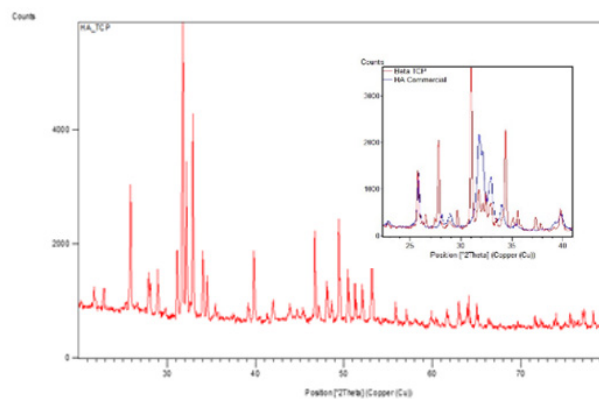
(C)

RAJAH 2. Imej komposit hidroksiapatit-beta trikalsium fosfat selepas disinter melalui (a) kaedah porogen, kaedah polimerisasi gel & templat korban, dan (c) kaedah bahan pengikat & templat korban.

PEMBELAUAN SINAR-X (XRD)

Rajah 3 menunjukkan keputusan XRD bagi kerangka bioseramik dari Kaedah III, Rajah 4.3 menunjukkan keputusan FTIR yang diuji atas bioseramik HA, β -TCP

dan HA/ β -TCP. Keputusan XRD komposit bioseramik HA/ β -TCP selepas pensinteran HA tulen, β -TCP tulen mempunyai corak puncak yang serupa. Ini menunjukkan komposit bioseramik mengekalkan formula struktur kimia yang sama selepas pensinteran.

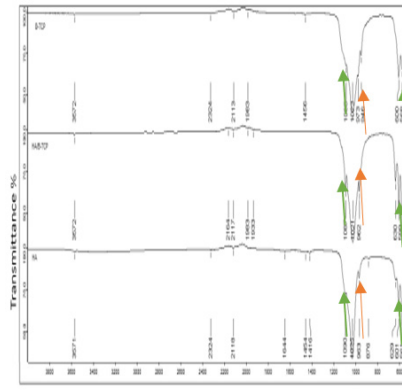


RAJAH 3. Graf besar menunjukkan spektrum XRD kerangka HA/ β -TCP dan graf kecil menunjukkan spektrum HA dan β -TCP tulen sebagai rujukan.

SPEKTROSKOPI INFRAMERAH TRANSFORMASI FOURIER (FTIR)

Rajah 4 menunjukkan keputusan FTIR yang diuji atas bioseramik HA, β -TCP dan HA/ β -TCP dari Kaedah III. Spektrum FTIR mengesahkan kehadiran PO_4^{3-} dan HPO_4^{2-}

dalam bioseramik yang dihasil. Perbandingan spektrum FTIR HA dan β -TCP menunjukkan HA dan β -TCP tulen mempunyai puncak yang sama bagi PO_4^{3-} ($1021\text{--}1025\text{ cm}^{-1}$, $599\text{--}601\text{ cm}^{-1}$, $545\text{--}561\text{ cm}^{-1}$, dan HPO_4^{3-} ($962\text{--}967\text{ cm}^{-1}$).

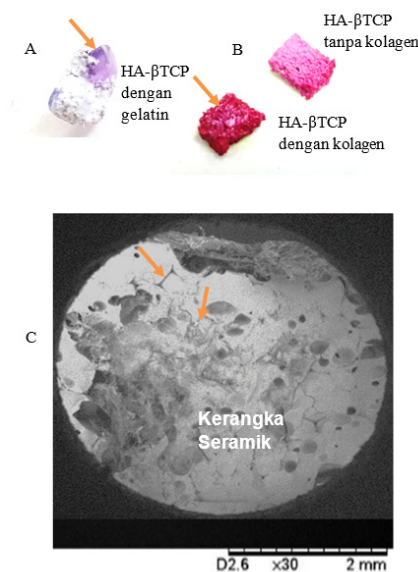


RAJAH 4. Spektrum FTIR kerangka HA/ β -TCP dan spektrum HA dan β -TCP tulen sebagai rujukan $\rightarrow \text{PO}_4^{3-}$ $\rightarrow \text{HPO}_4^{3-}$

PENGESANAN POLIMER SELEPAS PENGABUNGAN KOLAGEN KE BIOSERAMIK

Penggabungan polimer ke dalam kerangka bioseramik yang dihasilkan melalui kaedah III berjaya dilakukan menggunakan kaedah tekanan negatif dari vakum pump diikuti dengan tekanan positif melalui pelocok picagari. Rajah 5A menunjukkan bahawa polimer gelatin menyaluti

kerangka bioseramik dari kaedah I tetapi tidak berjaya diintegrasikan ke dalam liang komposit bioseramik dari kaedah I (Rajah 5A). Rajah 5B pula menunjukkan bahawa kolagen mampu menyelaputi luaran komposit bioseramik (merah gelap) dan juga menembusi ke dalam liang dalaman kerangka bioseramik kaedah III. Sebagai perbandingan, kerangka bioseramik tanpa kolagen (merah ringan) turut diwarnakan.

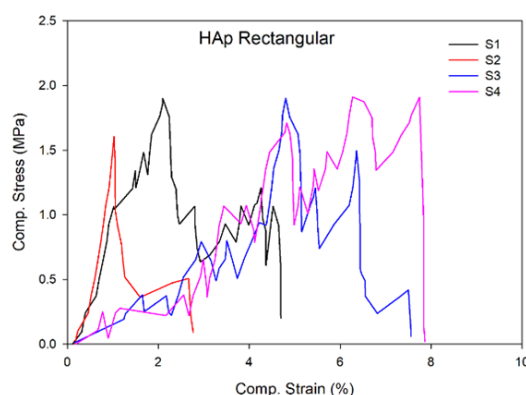


RAJAH 5. Komposit bioseramik polimer (A) Gel berwarna biru mewakili gelatin yang ditaut silang dengan genipin dan didapati menyaluti luaran tetapi tiada di dalam kerangka bioseramik Kaedah II. (B) Komposit bioseramik kolagen diwarnakan oleh *Picrosirius Red* dan didapati di luar dan dalam kerangka bioseramik. (C) Gambar imbasan mikroskopi electron menunjukkan kehadiran kolagen di bahagian dalam kerangka bioseramik. Anak panah jingga menunjuk kepada lapisan / gel / serat kolagen

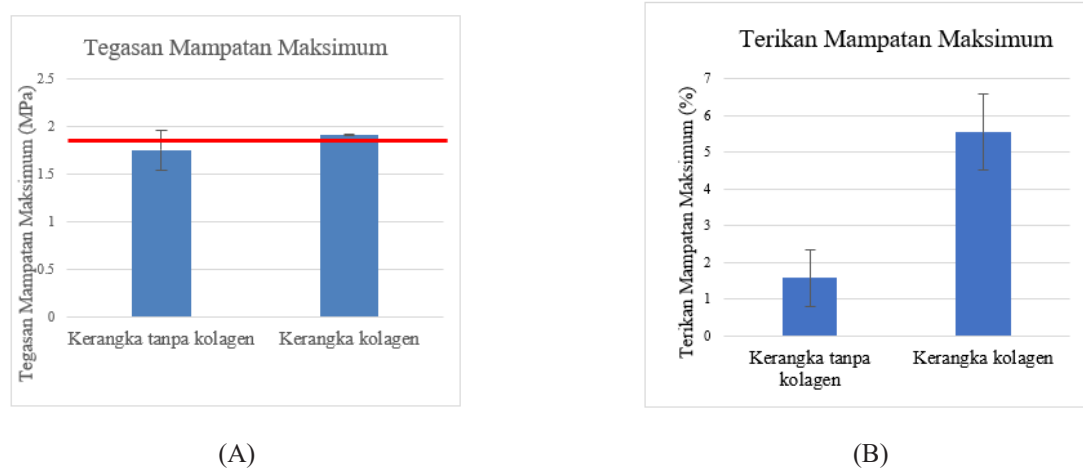
ANALISA KEKUATAN MEKANIKAL KERANGKA BIOSERAMIK KOLAGEN

Analisa kekuatan mekanikal telah dijalankan ke atas komposit bioseramik kolagen menggunakan kerangka bioseramik Kaedah III. Rajah 6 menunjukkan tegasan mampatan maksimum (*maximum compression stress*) antara kerangka bioseramik dan kerangka bioseramik kolagen di mana tegasan mampatan maksimum kerangka bioseramik tanpa kolagen menunjukkan 1.750 ± 0.212 MPA manakala kerangka bioseramik kolagen menunjukkan

1.905 ± 0.007 MPA. Rajah 6 menunjukkan terikan mampatan maksimum (*maximum compression strain*) antara kerangka bioseramik dan kerangka bioseramik kolagen di mana terikan mampatan maksimum kerangka bioseramik tanpa kolagen menunjukkan $1.565 \pm 0.757\%$ manakala kerangka bioseramik kolagen menunjukkan $5.540 \pm 1.032\%$. Rajah 6 menunjukkan graf tegasan-terikan yang diujikaji dalam kajian kekuatan mekanikal. Walaubagaimanapun, perbezaan ini tidak signifikan ($p > 0.05$), mungkin disebabkan oleh bilangan sampel yang kecil ($n=3$).



RAJAH 6. Contoh graf tegasan-terikan yang diujikaji dalam kajian kekuatan mekanikal kerangka bioseramik dengan dan tanpa kolagen; hitam dan merah (HA/ β -TCP tanpa kolagen, S1 dan S2), biru dan ungu (HA/ β -TCP dengan kolagen S3 dan S4)



RAJAH 7. (A). Tegasan mampatan maksimum antara kerangka bioseramik. (B) Terikan mampatan maksimum kerangka bioseramik. Garisan merah menunjukkan daya mampatan minimum tulang kanselus iaitu 2MPa

PERBINCANGAN

Aplikasi klinik komposit biomimetik berjaya melibatkan interaksi antara sel, isyarat biologi dan biobahan dalam kebelakangan ini. Namun demikian, terdapat banyak soalan yang tidak terjawab and sempadan yang tidak diterokai yang boleh mempengaruhi peranan bahan bioseramik

dalam penjanaan semula tulang. Pemahaman asas dalam kedua-dua sains hayat dan sains fizikal diperlukan untuk membangunkan teknologi perubatan regenerasi yang berjaya. Penyelidikan era baru harus diarahkan ke arah biomimik yang lebih baik proses regenerasi tisu tulang semula jadi seperti gandingan angiogenesis dan osteogenesis yang mungkin memerlukan pengambilan dan pembezaan sel progenitor. Ini telah mendorong kajian yang menfabrikasi

kerangka kejuruteraan tisu tulang yang mempunyai fungsi biologi yang tempatan mahupun sistemik. Kajian ini bertujuan untuk menghasilkan kerangka kejuruteraan tisu tulang yang mampu biomimik struktur tisu tulang dengan percampuran polimer semula jadi ke atas biosemeramik berliang. (Chahal et al. 2019)

PERBANDINGAN TIGA KAEDAH FABRIKASI

Jadual 1 menunjukkan perbandingan tiga pendekatan yang telah diperkenalkan untuk fabrikasi biosemeramik tulang dalam kajian ini. Setiap kaedah yang telah dijalankan dalam kajian ini mempunyai kebaikan dan keburukannya.

JADUAL 1. Kebaikan dan Kelemahan antara 3 jenis kaedah fabrikasi biosemeramik

Kaedah Fabrikasi Biosemeramik	Kebaikan	Kelemahan
Kaedah I: Penggunaan Porogen	Kos yang rendah	Kerangka dihasil adalah sangat rapuh dan bersifat keliangan yang tidak setara. (Lyckfeldt & Ferreira 1998; Ozgur Engin & Tas 1999)
Kaedah II: Penggunaan Polimerisasi gel & templat korban	Kerangka dihasilkan berbentuk jaring	Kerangka yang dihasil adalah rapuh dan mempunyai kekuatan mekanikal yang rendah. (Motealleh et al. 2016)
Kaedah III: Penggunaan Bahan pengikat & templat korban	Kerangka yang dihasil adalah tidak rapuh dan mempunyai kekuatan mekanikal yang tinggi dan berbentuk jaring. (Luo et al. 2017)	Kemungkinan akan mengambil masa yang panjang untuk degradasi

Disebabkan kelemahan yang dipersembahkan oleh kerangka yang dihasilkan melalui porogen, kaedah penggunaan templat korban telah disyorkan bagi fabrikasi kerangka biosemeramik berliang. Menggunakan teknik ini, sifat keliangan kerangka yang dihasil akan bergantung kepada keseragaman dan sifat liangan templat korban. Kajian ini menggunakan span polyurethane di mana tiada maklumat pencirian keliangan didapati dari pembekal. Pada masa hadapan, spesifikasi keliangan span polyurethane perlu ditetapkan supaya penghasilan kerangka yang konsisten dapat dicapai. Antara tiga kaedah yang digunakan dalam kajian ini, kerangka yang dihasilkan menggunakan kaedah III adalah paling memuaskan. Ini kerana, selain daripada penghasilan keliangan yang seragam, kaedah ini menghasilkan kerangka yang lebih keras dan senang ditangani. Hasil kajian ini merumuskan bahawa pemilihan bahan pengikat yang sesuai amatlah penting dalam fabrikasi kerangka biosemeramik berliang. Keliangan kerangka sentiasa menjadi isu hangat dalam bidang kejuruteraan tisu. Hasil analisa imbasan tomografi berkompouter (micro CT scanning) telah menunjuk bahawa komposit biosemeramik yang dihasil mempunyai keliangan yang sesuai untuk perlekatan sel. Liang komposit biosemeramik juga menunjukkan liang yang dihasil adalah liang yang bersaling hubung. Liang yang bersaling hubung adalah penting bagi penghijrahan sel (Okamoto et al. 2006).

Pencirian komposit biosemeramik berliang kaedah III telah dijalankan menggunakan Belauan Sinar-x (XRD) dan Spektrometer Infra-Merah, FTIR. XRD merupakan

peralatan yang menggunakan teknik analisis pantas untuk mengenal pasti jenis bahan serta sifat fasa dan sifat kristalnya. Dengan itu, perubahan struktur yang diinduksi dalam bahan kristal dengan mengadun dengan bahan lain boleh dipantau menggunakan teknik XRD. Bacaan dari XRD menunjukkan bahawa komposit biosemeramik Hidroksiapatit/HA-Beta Trikalsium Fosfat/ β -TCP mempunyai corak spektrum yang serupa dengan bahan mentah komposit iaitu HA dan β -TCP. Ini membuktikan bahawa proses pensinteran tidak mengubah sifat fasa semula jadi HA dan β -TCP (Gonon 2021; Rajeswari et al. 2019).

FTIR merupakan peralatan untuk mengenal pasti anggaran ikatan kimia yang terdapat dalam sampel. Demikian ini, analisis FTIR digunakan untuk mengenal pasti bahan organik, bukan organik dan polimer yang menggunakan cahaya inframerah untuk mengimbas sampel. Perubahan dalam corak ciri jalur serapan jelas menunjukkan perubahan dalam komposisi bahan. FTIR berguna dalam mengenal pasti dan mencirikan bahan yang tidak diketahui, mengesan bahan cemar dalam bahan dan mencari bahan tambahan. Sebarang puncak luar biasa menunjukkan kemungkinan kehadiran bahan cemar (Spiegelberg, 2009; Titus et al. 2018). Spektrum FTIR menunjukkan puncak dan corak yang sama bagi HA, β -TCP dan HA/ β -TCP. Ini menunjukkan tiada kemunculan bahan cemar dan proses pensinteran tiada menyebabkan ikatan kimia bahan mentah HA dan β -TCP untuk berubah.

Dalam ujian kekuatan mekanikal, kerangka bioseramik dan kerangka bioseramik kolagen telah dibanding. Tujuan penambahan kolagen adalah untuk meningkatkan kekuatan mekanikal kerangka. Keputusan ujian mekanikal telah menunjukkan bahawa tegasan mampatan maksimum bagi dua jenis kerangka adalah tiada perbezaan keertian manakala terikan mampatan maksimum bagi kerangka bioseramik kolagen adalah lebih tinggi berbanding dengan kerangka bioseramik tanpa kolagen. Ini menunjukkan bahawa kolagen yang telah ditambah telah meningkatkan potensi terikan kerangka. Kekuatan mekanikal bioseramik tersebut boleh dibandingkan dengan kekuatan tulang kanselus (cancellous / spongy bone) iaitu di antara 2 hingga 16 MPa (Gerhardt & Boccaccini, 2010).

KESIMPULAN

Secara kesimpulannya, kerangka bioseramik HA/TCP berliang dapat difabrikasi dengan lebih seragam melalui kaedah templat korban. Optimisasi menggunakan pengikat (binder) dan bahan penyepuh (deformer) yang sesuai dapat menghasilkan kerangka bioseramik yang lebih padat dan keras. Penggabungan kolagen ke dalam kerangka bioseramik dapat mengatasi masalah kerapuhan (brittleness) malah meningkatkan lagi daya terikan mampatan kerangka ini. Kajian bioserasi dengan sel osteoprogenitor, dan sifat osteoinduktif serta osteoinduktif komposit ini perlu dijalankan seterusnya untuk menyokong penggunaan komposit ini bagi kejuruteraan tisu tulang.

PENGHARGAAN

Kajian ini mendapat bantuan kewangan dari geran penyelidikan Fakulti Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia (FF-2016-111) dan dana dari Kementerian Pendidikan Tinggi Malaysia (TRGS/2/2014/UKM/02/4). Penghargaan juga kepada Alahyarham Prof. Madya Dr. Roslinda Shamsudin yang telah memberi bantuan dan panduan teknikal yang berharga bagi fabrikasi kerangka bioseramik dalam kajian ini.

PENGISYTIHARAN KEPENTINGAN BERSAING

Tiada.

RUJUKAN

- Abdul Wahab, R. M., Ng, W. C., Yazid, F., Luchman, N. A., & Zainal Ariffin, S. H. 2020. Orthodontic considerations in bone graft selection for alveolar cleft repair. *Sains Malaysiana* 49(2): 349–356. <https://doi.org/10.17576/jsm-2020-4902-13>
- Chahal, S., Kumar, A., & Hussian, F. S. J. 2019. Development of biomimetic electrospun polymeric biomaterials for bone tissue engineering. A review. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 30(14): 1308–1355.
- Cunniffe, G. M., Dickson, G. R., Partap, S., Stanton, K. T., & O'Brien, F. J. 2010. Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine* 21(8): 2293–2298. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3964-1>
- Dong, Y., Chen, X., & Hong, Y. 2013. Tissue-engineered bone formation in vivo for artificial laminae of the vertebral arch using β -tricalcium phosphate bioceramics seeded with mesenchymal stem cells. *Spine* 38(21). <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182a3cbb3>
- Fu, Q., Saiz, E., & Tomsia, A. P. 2011. Direct ink writing of highly porous and strong glass scaffolds for load-bearing bone defects repair and regeneration. *Acta Biomaterialia* 7(10): 3547–3554. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.030>
- Ganey, T., Hutton, W., & Meisel, H. J. 2009. Symposium on osteoconductive carriers. *SAS Journal* 3(3): 108. <https://doi.org/10.1016/j.esas.2009.09.005>
- Gerhardt, L. C., & Boccaccini, A. R. 2010. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials* 3(7): 3867–3910. <https://doi.org/10.3390/ma3073867>
- Ghensi, P., Bressan, E., Gardin, C., Ferroni, L., Ruffato, L., Caberlotto, M., Soldini, C., & Zavan, B. 2017. Osteo Growth Induction titanium surface treatment reduces ROS production of mesenchymal stem cells increasing their osteogenic commitment. *Materials Science and Engineering C* 74: 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.032>
- Gonon, M. 2021. Case Studies in the X-ray Diffraction of Ceramics. In *Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses* (pp. 560–577). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818542-1.00005-9>
- Kakiuchi, M., Hosoya, T., Takaoka, K., Amitani, K., & Ono, K. 1985. Human bone matrix gelatin as a clinical alloimplant A retrospective review of 160 cases. In *International Orthopaedics (SICOT)* (Vol. 9).
- Kavasi, R. M., Coelho, C. C., Platania, V., Quadros, P. A., & Chatzinikolaidou, M. 2021. In vitro biocompatibility assessment of nano-hydroxyapatite. *Nanomaterials*

- 11(5). <https://doi.org/10.3390/nano11051152>
- Kenkre, J. S., & Bassett, J. H. D. 2018. The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry* 55(3): 308–327.
- Luo, H., Zhang, Y., Li, G., Tu, J., Yang, Z., Xiong, G., Wang, Z., Huang, Y., & Wan, Y. 2017. Sacrificial template method for the synthesis of three-dimensional nanofibrous 58S bioglass scaffold and its in vitro bioactivity and cell responses. *Journal of Biomaterials Applications* 32(2): 265–275. <https://doi.org/10.1177/0885328217715784>
- Lyckfeldt, O., & Ferreira, J. M. F. 1998. Processing of porous ceramics by starch consolidation. *Journal of the European Ceramic Society* 18.
- Mas'ood, N. N., Mohd Foudzi, F., Sulong, A. B., Muhamad, N., Mohamed, I. F., Mohd Salleh, F., & Emeka, U. B. 2018. Two component materials in powder metallurgy: A review paper focused on the processing technique applied in powder metallurgy. *Jurnal Kejuruteraan* SI1(6): 23–31. [https://doi.org/10.17576/jkukm-2018-si1\(6\)-04](https://doi.org/10.17576/jkukm-2018-si1(6)-04)
- Meirelles, L., Arvidsson, A., Andersson, M., Kjellin, P., Albrektsson, T., & Wennerberg, A. 2008) Nano hydroxyapatite structures influence early bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 87(2): 299–307. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31744>
- Motealleh, A., Eqtesadi, S., Perera, F. H., Pajares, A., Guiberteau, F., & Miranda, P. 2016. Understanding the role of dip-coating process parameters in the mechanical performance of polymer-coated bioglass robocast scaffolds. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 64: 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.08.004>
- Mustafa Kamal Israk, S. I., Abd Rahman, N., Fuad, M. N., & Mohd Ali, J. 2021. Extraction of protein from moringa oleifera leaves for facial mask production. *Jurnal Kejuruteraan* 33(4): 1097–1104. [https://doi.org/10.17576/jkukm-2021-33\(4\)-32](https://doi.org/10.17576/jkukm-2021-33(4)-32)
- Okamoto, M., Dohi, Y., Ohgushi, H., Shimaoka, H., Ikeuchi, M., Matsushima, A., Yonemasu, K., & Hosoi, H. (2006). Influence of the porosity of hydroxyapatite ceramics on in vitro and in vivo bone formation by cultured rat bone marrow stromal cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17(4), 327–336. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-8232-z>
- Ozgun Engin, N., & Tas, A. C. (1999). Manufacture of Macroporous Calcium Hydroxyapatite Bioceramics. *Journal of the European Ceramic Society*, 19(13), 2569–2572.
- Raheem, O., Kulidjian, A. A., Wu, C., Jeong, Y. B., Yamaguchi, T., Smith, K. M., Goff, D., Leu, H., Morris, S. R., Cacalano, N. A., Masuda, K., Jamieson, C. H., Kane, C. J., & Jamieson, C. A. (2011). A novel patient-derived intra-femoral xenograft model of bone metastatic prostate cancer that recapitulates mixed osteolytic and osteoblastic lesions. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 9). <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/185>
- Rajeswari, A., Jackcina Stobel Christy, E., Gopi, S., Jayaraj, K., & Pius, A. (2019). Characterization studies of polymer-based composites related to functionalized filler-matrix interface. In *Interfaces in Particle and Fibre Reinforced Composites: Current Perspectives on Polymer, Ceramic, Metal and Extracellular Matrices* (pp. 219–250). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102665-6.00009-1>
- Ramli, M. I., Mohd Foudzi, F., Sulong, A. B., Abdul Yazid, F. A., Muhamad, N., & Hui, D. (2020). Characterization of Titanium Alloy-Hydroxyapatite Composite through Powder Injection Molding. *Jurnal Kejuruteraan* 32(4): 735–742. [https://doi.org/10.17576/jkukm-2020-32\(4\)-25](https://doi.org/10.17576/jkukm-2020-32(4)-25)
- Sadeghilar, A., Ng, A., Hwei, M., Hazla, N., Haflah, M., Rose, I. M., & Firouzi, S. 2014. Local tissue reaction and biodegradation of hydroxyapatite/ tricalcium phosphate composites. *World Journal of Medical Sciences* 11(3): 301–305. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjms.2014.11.3.680>
- Shah, F. A., Thomsen, P., & Palmquist, A. 2019. Osseointegration and current interpretations of the bone-implant interface. *Acta Biomaterialia* 84: 1–15.
- Shibuya, N., & Jupiter, D. C. 2015. Bone graft substitute: Allograft and xenograft. *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery* 32(1): 21–34. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2014.09.011>
- Shuib, S., Sahari, B., Ahmed Shokri, A., & Soon Chai, C. 2008. The design improvement of hip implant for Total Hip Replacement (THR). *Jurnal Kejuruteraan* 20(1): 107–113. <https://doi.org/10.17576/jkukm-2008-20-10>
- Spiegelberg, S. 2009. Characterization of physical, chemical, and mechanical properties of UHMWPE. In *UHMWPE Biomaterials Handbook* (pp. 355–368). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374721-1.00024-9>
- Stadlinger, B., Pilling, E., Mai, R., Bierbaum, S., Berhardt, R., Scharnweber, D., & Eckelt, U. 2008. Effect of biological implant surface coatings on bone formation, applying collagen, proteoglycans, glycosaminoglycans and growth factors. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19(3): 1043–1049. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3077-7>

- Tan, S. C., Ibrahim, I., Daud, R., & Kamarrudin, N. S. 2022. Effect of dental implant micro-thread designs on stress distribution in bone-implant interface. *Jurnal Kejuruteraan* 34(2): 255–261. [https://doi.org/10.17576/jkukm-2022-34\(2\)-09](https://doi.org/10.17576/jkukm-2022-34(2)-09)
- Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., & Roopan, S. M. 2018. Nanoparticle characterization techniques. In *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (pp. 303–319). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>
- Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., Li, B., & Shu, W. 2018. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. In *Bioactive Materials* 3(3): 278–314. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>