

Weight Loss Profile of Synthetic Coral Scaffold in Various Concentration on Phosphate Buffer Saline (PBS)

Weight Loss Profile Perancah Koral Buatan Berbagai Konsentrasi Pada Larutan Phosphate Buffer Saline (Pbs)

Erlina Sih Mahanani¹, Juwita Tiara Normadina²

¹Dosen Program Studi Kedokteran Gigi, ²Mahasiswa Program Studi Kedokteran Gigi

ABSTRACT

Everyday, thousands of surgical procedures performed in the world to repair and replace bone tissue damaged caused by disease or trauma. Tissue engineering techniques is one treatment that works to regenerate tissue that consists of three main components of cells, molecules signal and scaffold. Biodegradable of scaffold must possess in order to adapt to the body. One of biodegradable scaffold properties can be known through the mass release scaffolding or weight loss.

This study aimed to determine the profile of weight loss artificial coral scaffold for bone tissue regeneration.

This type of research is experimental research laboratory. Scaffolds with different concentrations A gelatin scaffold consisting of: CaCO₃ 4: 6, B gelatin: CaCO₃ 7: 3, and C 100% of gelatin. Weight measurements were taken before and after immersion in a solution of PBS.

Soaking done in a different time period ie 1, 2, and 3 weeks. Weight loss calculations using the formula of weight loss. Analysis of data using oneway ANOVA and Kruskal Wallis.

The average weight loss scaffolds A (4: 6) was 6.83%, weight loss scaffold B (7: 3) was 19:18% and weight loss scaffolds C (100% of gelatin) is 43.82%. There are significant differences in all scaffolds A gelatin: CaCO₃ 4: 6, scaffolds B gelatin: CaCO₃ 7: 3, and scaffolds C 100% of gelatin which is C > B > A. There is no difference between the scaffold that is immersed in a period of 1, 2, and 3 weeks.

Keywords: synthetic coral, gelatin, calcium carbonate, degradation, weight loss

INTISARI

Tiap harinya ribuan prosedur pembedahan dilakukan di dunia untuk memperbaiki dan mengganti jaringan tulang yang rusak akibat penyakit maupun trauma. Teknik rekayasa jaringan merupakan salah satu perawatan yang berfungsi untuk meregenerasi jaringan yang terdiri dari tiga komponen utama yaitu sel, *molekul signal* dan perancah. Perancah harus memiliki sifat *biodegradable* supaya dapat beradaptasi dengan tubuh. Sifat *biodegradable* perancah salah satunya dapat diketahui melalui terurainya massa perancah atau *weight loss*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil *weight loss* perancah koral buatan untuk regenerasi jaringan tulang.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Perancah dengan konsentrasi yang berbeda terdiri dari perancah A gelatin : CaCO₃ 4:6, perancah B gelatin : CaCO₃ 7:3, dan perancah C gelatin 100% dilakukan pengukuran berat sebelum dan sesudah perendaman dalam larutan PBS. Perendaman dilakukan dengan kurun waktu berbeda yaitu 1, 2, dan 3 minggu.

Perhitungan *weight loss* menggunakan rumus *weight loss*. Analisis data menggunakan *oneway ANOVA* dan *Kruskal Wallis*.

Rata-rata *weight loss* perancah A (4:6) adalah 6.83 %, *weight loss* perancah B (7:3) adalah 19.18 % dan *weight loss* perancah C (gelatin 100%) adalah 43.82 %. Terdapat perbedaan signifikan pada semua perancah A gelatin : CaCO₃ 4:6, perancah B gelatin : CaCO₃ 7:3, maupun perancah C gelatin 100% dengan C > B > A. Tidak terdapat perbedaan antara perancah yang direndam dalam kurun waktu 1, 2, dan 3 minggu.

Kata Kunci : Koral buatan, gelatin, kalsium karbonat, degradasi, *weight loss*

PENDAHULUAN

Tiap harinya ribuan prosedur pembedahan dilakukan di dunia untuk memperbaiki dan mengganti jaringan yang rusak akibat penyakit maupun trauma. Perkembangan dari *tissue engineering* bertujuan untuk memperbaiki kerusakan jaringan dengan cara pembentukan jaringan baru¹. Teknik rekayasa jaringan merupakan teknik baru yang diperkenalkan untuk mengurangi keterbatasan dalam cangkok tulang dan meningkatkan proses penyembuhan pada kerusakan tulang². Tiga komponen pokok dalam teknik rekayasa jaringan adalah perancah, stem sel dan molekul signal atau *biochemical signal*³. Perancah menentukan struktur dan sifat mekanik dari suatu rekayasa jaringan tulang⁴. Polimer sintesis telah banyak digunakan sebagai bahan untuk perancah, karena dalam memproduksi polimer sintesis, laju degradasi, kekuatan serta struktur mikronya dapat dikendalikan⁵. Gelatin adalah campuran protein yang berasal dari asam atau hidrolisis alkaline kolagen. Gelatin memiliki biokompatibilitas dan *biodegradable* yang baik serta tidak menimbulkan reaksi imun. Gelatin banyak ditemukan di

alam, mudah di proses menjadi berbagai bentuk dan tidak mahal, karenanya, gelatin banyak digunakan sebagai biomaterial dalam bidang rekayasa jaringan⁶. Koral merupakan bagian dari ekosistem laut yang dapat digunakan sebagai bahan baku substansi bioaktif dan banyak digunakan dalam bidang farmasi dan kedokteran⁷. Koral banyak digunakan sebagai perancah karena dapat membawa *growth factor*, memberikan tempat untuk perlekatan, pertumbuhan dan diferensiasi sel⁸.

Karakteristik yang mempengaruhi kerja dari perancah adalah komposisi, morfologi, porositas, *swelling*, biokompatibilitas dan kemampuan biodegradasi⁹. Perancah pada akhirnya harus mengalami degradasi. Laju degradasi perancah harus berjalan dengan tahapan yang baik sampai jaringan baru terbentuk¹⁰. Kemampuan biodegradasi perancah dapat dihitung dengan cara menghitung berat perancah sebelum dan sesudah dilakukan perendaman dalam suatu media tertentu⁹. Degradasi perancah secara *in vitro* dapat diketahui melalui perubahan morfologi, terurainya massa perancah (*weight loss*), berat molekul, dan kekuatan mekanik³.

Setelah ditanam ke dalam tubuh, perancah harus mempertahankan sifat mekanik serta integritas struktural sampai sel beradaptasi dengan lingkungan dan memproduksi matrik ekstraseluler. Perancah pada akhirnya akan tergantikan dengan jaringan baru yang terbentuk, sehingga perancah harus benar-benar terdegradasi dan diserap oleh tubuh tanpa meninggalkan sisa. Laju degradasi perancah yang ideal adalah sama atau sedikit lebih rendah dari laju pembentukan jaringan baru. Pemahaman mengenai perubahan yang terjadi selama degradasi dilakukan untuk memprediksi laju degradasi perancah¹¹.

Degradasi dari perancah, dapat diketahui melalui pengamatan dari perubahan *weight loss*, rasio *swelling* dan modulus tensilnya¹².

Produk degradasi dari perancah polimer bersifat asam, sehingga terjadi perubahan pH atau derajat keasaman pada larutan PBS sebagai bahan perendam perancah, seiring dengan

terurainya massa pada perancah. Titik terendah pH PBS terjadi ketika laju degradasi tinggi dan pH PBS kembali naik ketika laju degradasi menurun¹¹.

Berdasarkan uraian diatas, memberikan inspirasi kepada peneliti untuk melakukan penelitian mengenai porositas perancah untuk regenerasi jaringan tulang.

METODE

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan dilaksanakan pada bulan Oktober sampai November 2015. Subjek penelitian ini adalah perancah koral buatan berbagai konsentrasi, yang terdiri dari 3 konsentrasi berbeda yaitu konsentrasi gelatin : CaCO₃ 4:6, 7:2, dan gelatin 100%. Perancah yang digunakan merupakan perancah yang dikembangkan oleh tim peneliti rekayasa jaringan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian ini memiliki variabel pengaruh : konsentrasi perancah. Variabel terpengaruh berat perancah dan pH larutan pbs. Variabel terkontrol : waktu perendaman, ukuran perancah, volume bahan perendam, dan sterilisasi media.

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu seperti pot, mikro pipet, alat tulis, neraca, *stopwatch*, kertas saring, etanol absolut, perancah dengan konsentrasi gelatin : CaCO₃ sebanyak 4 : 6, 7 : 3, dan gelatin 100%.

Pelaksanaan penelitian ini diawali dari tahap persiapan penelitian dengan menyusun proposal penelitian.

Tahap selanjutnya yaitu pelaksanaan penelitian dengan di awali sidang proposal penelitian dan selanjutnya mengurus surat perizinan penelitian di laboratorium biokimia FKIK UMY. Pengukuran awal yang dilakukan adalah mengukur berat awal masing-masing perancah (W₀) dan pengukuran pH PBS. Perancah selanjutnya direndam dalam larutan PBS dalam 3 kurun waktu berbeda yaitu 1, 2, dan 3 minggu. Setiap 5 hari sekali dilakukan

pengukuran pH larutan PBS. Perancah dikeringkan dalam incubator sampai kering dan beratnya stabil, berat stabil perancah kering dihitung sebagai berat kering perancah (W_t).

Weight Loss perancah ditentukan dengan persamaan :

$$\% W = \frac{W_0 - W_t}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

Uji statistik hasil penelitian menggunakan analisa *one ways* ANOVA jika distribusi data normal, dan analisa *Kruskal-Wallis* digunakan apabila distribusi data tidak normal.

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata *weight loss* perancah A adalah 6.83 %, *weight loss* perancah B adalah 19.18 % dan *weight loss* perancah C adalah 43.82 %.

Tabel 1. Rata-rata % wl

Perancah	Jumlah	Rata-rata %wl
A (4 : 6)	9	6.83%
B (7 : 3)	9	19.18%
C (100%)	9	43.82%

Berdasarkan tabel 1. rata-rata *weight loss* perancah A adalah 6.83 %, *weight loss* perancah B adalah 19.18 % dan *weight loss* perancah C adalah 43.82 %.

Data dibedakan berdasarkan variable konsentrasi dan waktu untuk uji statistik. Uji normalitas dan uji homogenitas dilakukan pada tiap variable untuk mengetahui distribusi data. Hasil variable konsentrasi, diperoleh data berdistribusi normal dan berasal dari variansi yang sama, sehingga data diuji menggunakan *oneway* ANOVA. Variable waktu, didapatkan hasil bahwa data berasal dari variansi yang sama namun berdistribusi tidak normal, sehingga uji statistika menggunakan uji non parametrik, yaitu *Kruskal Wallis*.

Tabel 2. *oneway ANOVA*

	Sum of Square	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6378.442	2	3189.221	34.958	.000
Within Groups	2189.523	24	91.230		
Total	8567.965	26			

Tabel 3. Uji *post hoc* LSD (Multiple Comparisons)

	(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	Perancah A	Perancah B	-12.42222*	4.50259	.011	-21.7151	-3.1293
		Perancah C	-36.99000*	4.50259	.000	-46.2829	-27.6971
	Perancah B	Perancah A	12.42222*	4.50259	.011	3.1293	21.7151
		Perancah C	-24.56778*	4.50259	.000	-33.8607	-15.2749
	Perancah C	Perancah A	36.99000*	4.50259	.000	27.6971	46.2829
		Perancah B	24.56778*	4.50259	.000	15.2749	33.8607

*The mean difference is significant at the .05 level.

Tabel 4. *Homogenous Subsets*

	Konsentrasi	N	Subset for alpha = .05		
			1	2	3
Tukey HSDa	Perancah A	9	6.8389		
	Perancah B	9		19.2611	
	Perancah C	9			43.8289
	Sig.		1.000	1.000	1.000

Uji *oneway ANOVA* menunjukkan bahwa nilai Sig. adalah 0.000 yang berarti <0.05 atau $<\alpha$, nilai tersebut menunjukkan bahwa H_0 ditolak, yaitu terdapat perbedaan antar level faktor atau terdapat perbedaan antara perancah dengan

konsentrasi 4:6, konsentrasi 7:3, dan gelatin 100%. Uji post hoc untuk melihat rerata perbedaan signifikan masing-masing konsentrasi perancah. Beda identik terdapat pada semua level faktor yaitu perancah A, B, maupun C dengan $C > B > A$.

Uji *Kruskal Wallis* digunakan untuk uji statistik data dengan variabel waktu perendaman.

Tabel 5. *Ranks*

	Waktu	N	Mean Rank
data	1 Minggu	9	12.44
	2 Minggu	9	14.17
	3 Minggu	9	15.39
	Total	27	

Tabel 6. *Test Statistics*^{a,b}

	Data
Chi-Square	.626
Df	2
Asymp. Sig.	.731

- a. *Kruskal Wallis Test*
b. *Grouping variable* : waktu

Berdasarkan uji *Kruskal Wallis* yang dilakukan, menunjukkan bahwa nilai Sig. 0.731, sehingga >0.05 atau $> \alpha$ yang berarti H_0 tidak ditolak, yaitu tidak terdapat perbedaan antar level faktor atau tidak terdapat perbedaan antara perancah yang direndam dalam kurun waktu 1, 2, maupun 3 minggu.

Pembahasan

Koral (CaCO_3) memiliki banyak persamaan dengan hidroksiapatit tulang dalam berbagai aspek, salah satunya yaitu sifat biokompatibel dan osteokonduktif. Perbedaan dengan hidroksiapatit yaitu struktur kimianya, dimana hidroksiapatit adalah kalsium fosfat, sedangkan koral adalah kalsium karbonat. Kedua bahan memiliki sifat yang sama baik jika digunakan untuk graft tulang¹³. Scaffold yang terbuat dari bahan kalsium karbonat memiliki sifat biokompatibel dan biodegradable yang baik⁸. Gelatin merupakan polimer alami yang dapat digunakan sebagai biomaterial yang baik dalam regenerasi jaringan, dan memiliki karakteristik fisik-mekanik yang baik¹⁴.

Syarat bahan perancah yang ideal digunakan untuk teknik rekayasa jaringan adalah bahan yang memiliki sifat biodegradasi, biokompatibel, memiliki daya adhesif yang tinggi, berporus, serta memiliki struktur mekanik yang stabil¹⁰. Biodegradasi adalah kemampuan suatu bahan untuk melepaskan ikatan polimer menjadi ikatan yang lebih pendek secara biologi oleh aktivitas enzim¹⁵. Degradasi merupakan factor yang penting yang harus dimiliki oleh perancah. Idealnya, perancah harus dapat menyediakn *mechanical* dan *biochemical support* saat regenerasi jaringan, dan apabila jaringan baru telah terbentuk, perancah harus terdegradasi dan tereliminasi dari tubuh. Degradasi perancah dapat ditentukan dengan cara menghitung persentasi dari *weight loss* perancah¹⁶.

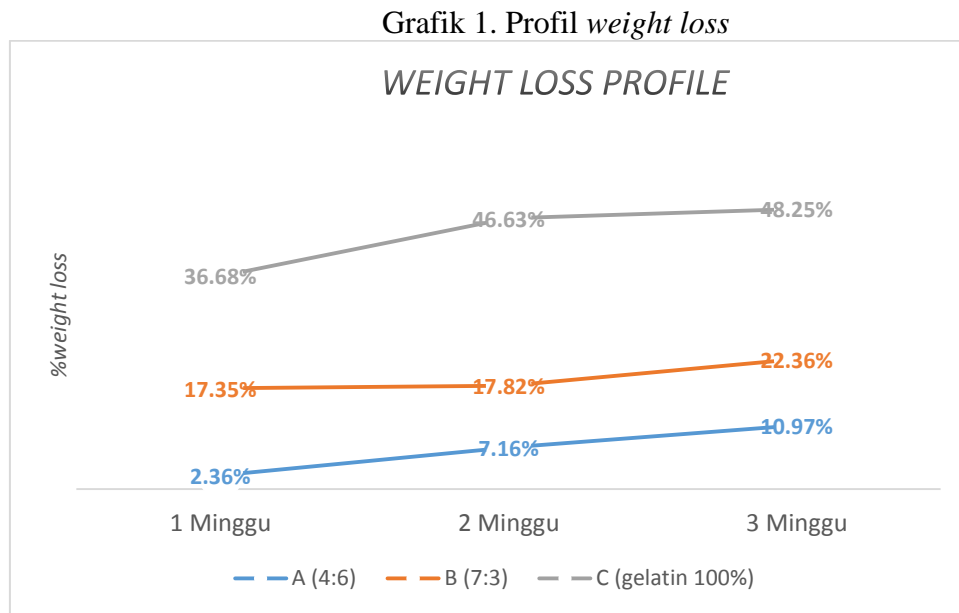
Hidrogel gelatin memiliki stabilitas bentuk yang rendah, kekuatan mekanik yang kurang dan elastisitas yang rendah. Untuk meningkatkan stabilitas dan kekuatan mekaniknya, gelatin dapat diikat dengan unsur kimia sehingga menciptakan ikatan kovalen untuk menggandakan gugus carboxyl dengan gugus amino untuk mendapatkan ikatan amida yang stabil⁶.

Penambahan CaCO_3 pada perancah gelatin menghadirkan ikatan antara ion R-COO-gelatin dengan Ca^{2+} pada CaCO_3 . Proses *crosslinking* menyebabkan ikatan antar molekul gelatin menjadi erat dan rapat dengan molekul CaCO_3 . Degradasi perancah koral buatan

dipengaruhi oleh konsentrasi gelatin dan kalsium karbonat (CaCO_3) dengan ikatan-ikatan pada perancah berupa ikatan interkoneksi molekul-molekul gelatin dan ikatan ionik gelatin dengan kalsium karbonat¹⁸.

Menurut penelitian Xing dkk, gelatin yang tidak memiliki crosslinked dapat menyerap air dan garam lebih banyak daripada gelatin yang memiliki crosslinked dengan suatu unsur. Degradasi pada PBS menunjukkan bahwa degradasi gelatin murni tanpa crosslinked lebih besar daripada gelatin dengan crosslinked. Hal ini menunjukkan bahwa ikatan crosslinked membuat gelatin lebih stabil, maka dari itu, perancah gelatin 100% mengalami degradasi yang lebih cepat karena tidak memiliki ikatan crosslinked dengan senyawa lain, sedangkan perancah gelatin : CaCO_3 konsentrasi 7 : 3 dan 4 : 6 memiliki degradasi yang lebih lama. Perancah berbahan gelatin : CaCO_3 memiliki degradasi yang lebih lama karena memiliki ikatan crosslinked berupa ikatan ionik dan ikatan kovalen. Ikatan kovalen bersifat lebih lemah dibandingkan dengan ikatan ionik, maka dari itu ikatan kovalen terdegradasi sebelum ikatan ionik, karena sifat PBS yang menguraikan ikatan lemah terlebih dahulu¹⁸. Menurut Aufan dkk, semakin sebanding komposisi kedua bahan pembentuk perancah, cenderung semakin banyak ikatan ionik yang terbentuk, hal ini menyebabkan terbentuknya perancah dengan ikatan yang lebih stabil¹⁹, sehingga perancah dengan konsentrasi gelatin : CaCO_3 konsentrasi 7 : 3 terdegradasi lebih cepat dibandingkan perancah gelatin : CaCO_3 konsentrasi 4 : 6.

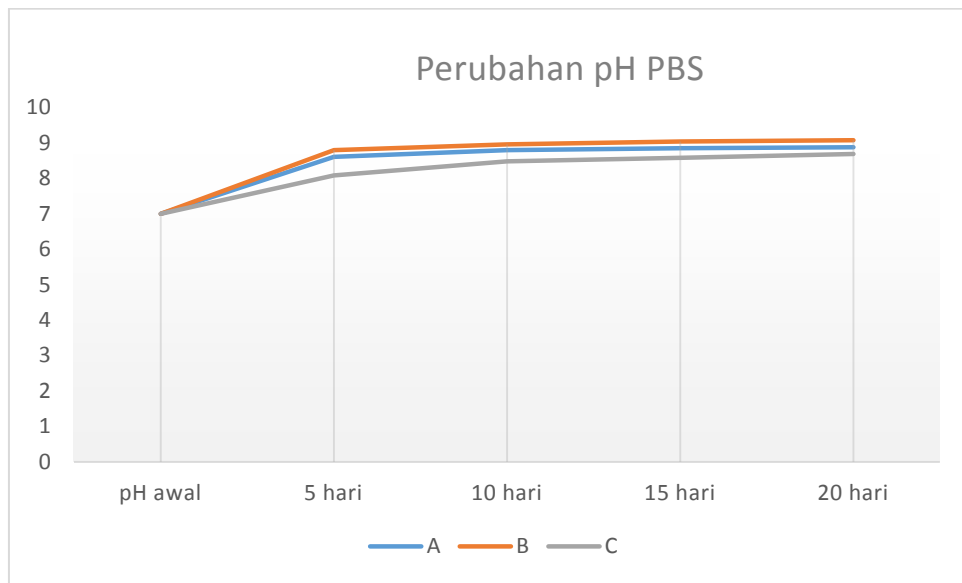
Grafik 1. Menunjukkan *weight loss* perancah koral buatan berdasarkan waktu perendamannya. Berikut dijelaskan dalam Grafik 1.



Hasil ini menunjukkan persamaan dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Serra, 2014) dan (Wu dan Ding, 2004) dimana semakin lama waktu perendaman perancah, maka berat perancah semakin rendah, sehingga *weight loss* perancah semakin tinggi. Berdasarkan grafik tersebut, perancah C (gelatin 100%) memiliki *weight loss*(%) paling tinggi, dan perancah A (4:6) memiliki *weight loss*(100%) paling rendah.

Grafik 2. Menjelaskan tentang perubahan pH yang terjadi pada larutan PBS yang digunakan dalam penelitian ini.

Grafik 2. Perubahan pH PBS



Dari grafik tersebut, diketahui bahwa pH larutan PBS yang digunakan untuk merendam perancah mengalami perubahan, yaitu meningkat menjadi semakin basa setiap kurun waktu. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wu dan Ding (2004), pH larutan PBS yang digunakan untuk merendam perancah mengalami perubahan, yaitu menjadi semakin asam. Hal ini disebabkan karena degradasi dari polimer (PGLA) terjadi melalui hidrolisis kimia dari ikatan ester yang tidak stabil menjadi asam laktat dan asam glycolic sehingga terjadi perubahan derajat keasaman pada larutan PBS. Hasil ini tidak sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wu dan Ding (2004). Hal ini dapat disebabkan oleh karena perbedaan bahan perancah yang digunakan serta teknik pengukuran pH yang dilakukan.

Perancah yang digunakan dalam penelitian ini adalah perancah gelatin yang dibuat dari bovine (tulang sapi) yang dibuat dengan cara *liming*. Menurut Wittich (2005)¹⁷, pH alami dari bovine adalah 9, kemudian gelatin bovine dibuat dengan proses alkali (*liming*) dimana proses tersebut dapat meningkatkan pH gelatin bovine menjadi 9-13 yang berarti basa, sehingga larutan PBS juga menjadi basa. Teknik pengukuran yang dilakukan oleh Wu dan Ding (2004), yaitu dengan mengukur pH larutan setiap satu minggu sekali,

dimana sebelum diukur pH larutannya, larutan PBS diganti terlebih dahulu dengan yang baru. Teknik pengukuran yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu dengan menggunakan pH meter yang diukur setiap 5 hari, selama 3 minggu, tanpa mengganti larutan tersebut.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Terdapat perbedaan signifikan *weight loss* antara masing-masing konsentrasi perancah A (gelatin dan CaCO_3 4:6), perancah B (gelatin dan CaCO_3 7:3), dan perancah C (gelatin 100%).
2. Tidak terdapat perbedaan antara waktu perendaman 1 minggu, 2 minggu, dan 3 minggu.
3. Terdapat perubahan pH pada PBS yang digunakan untuk perendaman perancah.

Adapun saran terkait penelitian ini, antara lain:

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan kurun waktu yang lebih lama.
2. Dilakukan penelitian perhitungan *weight loss* dengan sarana perendaman yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹ O'Brein, F. J. (2011). Biomaterial & Scaffold for Tissue Engineering. *Materials Today*, 14, 88-95.
- ² Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone Regenerative Medicine: Classic Options, Novel Strategies, and Future Directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9, 1-27.
- ³ Serra, T. (2014). *Development of 3D-Printed Biodegradable Composite Scaffold for Tissue Engineering Applications*. Karya Tulis Ilmiah strata dua, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España.
- ⁴ Zhong, D., Wang, C., Yin, K., Liao, Q., Zhou, X., Liu, A., & Kong, L. (2014). In vivo Ossification of A Scaffold Combining β -tricalcium Phosphate and Platelet – Rich Plasma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8, 1381-1388.
- ⁵ Liu, X., & Ma, P. X. (2004). Polymeric Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 477-486.
- ⁶ Xing, Q., Yates, K., Vogt, C., Qian, Z., Frost, M. C., Zhao, F. (2014). Increasing Mechanical Strength of Gelatin Hydrogels by Divalent Metal Ion Removal. *Scientific Reports*, 4:4706, 1-10.
- ⁷ Susanto, A. D., Kardono. (2008). Teknologi Konservasi dan Rehabilitasi Terumbu Karang. *Jurnal Teknologi Lingkungan*, 9, 121-226.
- ⁸ Puvaneswary, S., Raghavendran, H. R. B., Ibrahim, N. S., Murali, R. M., Merican, A. M., Kamarul, T. (2013). A Comparative Study on Morphochemical Properties and Osteogenic Cell Differentiation within Bone Graft and Coral Graft Culture Systems. *International Journal of Medicine Sciences*, 10(12), 1608-1614.
- ⁹ Wattanutchariya, W., & Changkowchai, W. (2014). Characterization of Porous Scaffold from Chitosan-Gelatin/Hydroxyapatite for Bone Grafting. *Proceedings of IMECS*, 2.
- ¹⁰ Gaikwad, V. V., Patil, A. B., & Gaikwad, M. V. (2008). Scaffold for Drug Delivery in Tissue Engineering. *International Journal of Pharmaceutical Science and Nanotechnology*, 1, 113-122.
- ¹¹ Wu, L., & Ding, J. (2004). In Vitro Degradation of Three-dimensional Porous Poly (D,L-lactide-co-glycolide) Scaffold for Tissue Engineering. *Biomaterials*, 25, 5821-5830.
- ¹² Atzet, S., Curtin, S., Trinh, P., Bryant, S., Ratner, B. (2008). Degradable Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-copolycaprolactone Hydrogels for Tissue Engineering Scaffold. *Biomacromolecules*, 9(12), 1-25.
- ¹³ Parizi, A. M., Oryan, A., Shafiei-Sarvestani, Z., Bigham-Sadegh, A. (2013). Effectiveness of synthetic hydroxyapatite versus Persian Gulf coral in an animal model of long bone defect reconstruction. *J Orthopaed Traumatol*, 14, 259–268.
- ¹⁴ Dlukha, R. N. (2014). *Formulasi Membran Hidrogel Berpori Berbasis Kombinasi HPMC(Hydroxy Propyl Methyl Cellulose) dan Gelatin dengan Metode Ice Particle Leaching Serta Penetapan Karakteristik Fisik-Mekanik*. Karya Tulis Ilmiah strata satu, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Yogyakarta.

- ¹⁵ Noezar, I., Praptowidodo, V. S., Nugraheni, R., Nasution, M. H. (2008). Biodegradable Polymer dari Asam Laktat. *Jurnal Teknik Kimia Indonesia* 6 (2), 626-633.
- ¹⁶ Galperin, A., Long, T. J., Garty, S., Ratner, B. D.(2014). Synthesis and fabrication of a degradable poly(N-isopropyl acrylamide) scaffold for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A*. 101(3), 775–786.
- ¹⁷ Wittich, W, J. (2005). *New Automated Industrial Technologies for Improving Chemical Penetration of Bovine Pieces in the Raw Material Processing and Conditioning Areas of Gelatine Manufacture*. Karya Tulis Ilmiah strata dua, University of Canterbury Christchurch, New Zealand.
- ¹⁸ Setyawan, A. A. (2015) *Perbedaan Profil Degradasi Perancah Koral Buatan Berbagai Konsentrasi pada Larutan Phosphate Buffer Saline*. Karya Tulis Ilmiah strata satu, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Yogyakarta.
- ¹⁹ Aufan, M. R., Daulay, A. H., Indriani, D., Nuruddin, A., Purwasasmita, B. S. (2012). Sintesis Scaffold Alginat-Kitosan-Karbonat Apatit sebagai Bone Graft Menggunakan Metode Freeze Drying. *Jurnal Biofisika* 8(1), 16-24.

