

Sintesis dan Karakterisasi Kolagen dari Tendon Sapi (*Bos Sondaicus*) sebagai Bahan *Bone Filler* Komposit Kolagen – Hidroksiapatit

Agnes Krisanti Widyaning, Adri Supardi², Prihartini Widiyanti²

¹Program Studi S1 Teknobiomedik Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

²Staf Pengajar Departemen Fisika Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

Email : fresh_nez08@yahoo.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mensintesis komposit kolagen – hidroksiapatit dengan memanfaatkan tendon sapi, mengetahui karakteristik mikro dan biologis komposit kolagen – hidroksiapatit, serta mengetahui variasi komposisi komposit kolagen – hidroksiapatit yang terbaik untuk dapat diaplikasikan sebagai bahan implant. Prosedur penelitian yang dilakukan adalah mensintesis kolagen dari tendon sapi dengan cara merendam 70 gram tendon dalam 5% HCl selama 24 jam pada suhu 4°C. Perendaman dilakukan dengan perbandingan b:v 1:20. Setelah masa perendaman, filtrat hasil perendaman ditambahkan 1N NaOH. Akan terbentuk gumpalan putih, yang kemudian disaring menggunakan kertas saring. Kolagen basah yang terbentuk sebanyak 13,86%, kemudian dikompositkan dengan hidroksiapatit dengan 7 variasi komposit kolagen - hidroksiapatit yaitu 100:0; 0:100; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40 dan 70:30. Produk hidroksiapatit yang digunakan berasal dari Instalasi Pusat Bioamaterial dan Bank Jaringan Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya. Hasil FTIR komposit terdeteksi adanya pita serapan vibrasi asimetri *stretching* (ν_3) fosfat (PO_4^{3-}), pita serapan ν_3 karbonat (CO_3^{2-}), pita serapan NH dan pita serapan OH. Hasil uji toksisitas menunjukkan sel dapat hidup semua lingkungan sampel. Hasil karakteristik biologi sampel menunjukkan bahwa sampel pada perbandingan kolagen : hidroksiapatit 40 : 60 memiliki potensi besar untuk dijadikan *bone filler* dengan nilai uji MTT *Assay* 108,1%.

Kata Kunci : Kolagen Tendon, Hidroksiapatit, Komposit kolagen –hidroksiapatit, *bone filler*.

Abstract

This study aims to synthesize the composite collagen - hydroxyapatite by using bovine tendon, Knowing and biological characteristics of the micro- composite collagen - hydroxyapatite, and Knowing the composition variation of the composite collagen - hydroxyapatite is best to be applied as an implant material. The procedure is to synthesize research conducted collagen from bovine tendon by soaking 70 grams of tendon in 5% HCl for 24 h at 4 ° C. Soaking is done by comparison wv 1:20. After the immersion, the filtrate was added 1N NaOH immersion results. Will form white lumps, which make use of filter paper and then filtered. The results of this white blob is wet collagen. Collagen is formed and then wet yag dikompositkan with hydroxyapatite with 7 variations of hydroxyapatite collagen composite is 100:0; 0:100; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40 and 70:30. Products derived from hydroxyapatite used Bioamterial Central Bank Network Installation General Hospital Dr. Soetomo Surabaya. FTIR results weredetected composite asymmetric stretching vibration absorption band (ν_3) phosphate (PO_4^{3-}), ν_3 absorption band of carbonate (CO_3^{2-}), NH absorption band and the OH absorption band. For the toxicity test results indicate the cell can survive all environmental samples. The results of the biological characteristics of the samples showed that the samples on a comparison of collagen: hydroxyapatite-40: 60 has great potential to be used as bone filler by the MTT test *Assay*108, 1%.

Key word : Tendon bovine, Hydroxyapatite, Collagen–Hydroxyapatite Composite, Bone Filler.

PENDAHULUAN

Kualitas hidup manusia bergantung pada kesehatan organ dan jaringan. Terganggunya fungsi organ atau jaringan dapat menyebabkan kerusakan yang fatal bagi tubuh. Bila suatu organ telah mengalami kerusakan yang cukup fatal, maka perlu dilakukan tindakan untuk mengganti organ atau jaringan yang rusak tersebut. Penggantian organ atau jaringan inilah yang disebut sebagai implant. Ketika autograft dan allograft sudah tidak memungkinkan untuk digunakan, maka solusi yang tepat adalah penggunaan biomaterial sebagai implant.

Tendon sapi banyak ditemukan dipasaran, mudah didapat dan harga cukup terjangkau. Tendon sapi juga memiliki kandungan kolagen yang cukup tinggi. Kolagen secara luas diaplikasikan dalam bidang medis karena sifatnya yang biokompatibel dengan tubuh dan *biodegradable*. Protein kolagen telah banyak digunakan untuk perbaikan jaringan tulang karena protein ini mampu untuk merangsang pertumbuhan sel – sel tulang baru (Lee *et al*, 2001).

Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) adalah salah satu biomineral paling penting yang ditemukan alami pada jaringan keras. Hidroksiapatit memiliki biokompatibilitas yang sangat baik dengan jaringan keras, osteokondutivitas tinggi dan bioaktivitas meskipun laju degradasi rendah, serta kekuatan mekanik dan potensi osteoinduktif yang baik (Rodrigues *et al*, 2003). Hidroksiapatit digunakan dalam rekonstruksi tulang karena struktur kimia yang mirip dengan komposisi anorganik tulang manusia. Tulang merupakan bagian tubuh kompleks yang terdiri dari protein, terutama kolagen dan mineral hidroksiapatit. Oleh karena itu, penelitian sekarang banyak difokuskan pada biomaterial hidroksiapatit dengan protein dan polimer sintesis lainnya yaitu kolagen.

Komposit kolagen – hidroksiapatit berbentuk *scaffold* banyak dimanfaatkan untuk memperbaiki jaringan tulang rusak. Namun dalam aplikasinya, tidak semua *scaffold* dapat memenuhi kebutuhan untuk menutupi bagian tulang yang rusak. Diperlukan suatu *bone filler* untuk mengisi ruang kosong antar *scaffold*.

Menurut pendapat ahli dalam bidang ortopedi, untuk aplikasi *bone filler* banyak digunakan untuk keperluan bedah mulut, perbaikan struktur wajah dan perbaikan jaringan tulang rawan. Untuk tulang panjang (*long bone*), sangat jarang *bone filler* diaplikasikan karena kurang memberikan sifat mekanik yang diharapkan.

MATERIAL DAN METODE Material

Bahan yang digunakan untuk pembuatan sampel adalah 37% asam klorida (HCl), 40 gram NaOH, asam fosfat, 1M NH_4OH , 5% asam asetat (CH_3COOH), 1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, akuades, 70 gram tendon sapi, serta 10 gram hidroksiapatit tulang sapi bubuk. Untuk karakterisasi sampel, bahan yang diperlukan antara lain sel fibroblast, larutan PBS, EMS 5%, tripsin 0,25%, pewarna MTT, DMSO, serum sapi 10%.

Preparasi Tendon Sapi

Tendon sapi yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) Pegirikan Surabaya. Langkah pertama proses sintesis kolagen adalah mencuci bersih tendon sapi dengan air mengalir. Kemudian tendon dipotong kecil dan dihancurkan. Pemotongan dan penghancuran tendon berguna untuk memperluas permukaan tendon sehingga mengoptimalkan interaksi molekul kolagen dengan larutan pada saat perendaman maupun ekstraksi. Ekstraksi Kolagen

Tendon yang sudah dipotong, dihancurkan dan ditimbang seberat 70 gram, kemudian direndam dalam 5% HCl dengan perbandingan berat tendon dan volume HCl adalah 1 : 20 agar tendon terendam sempurna pada suhu 4°C. Setelah mencapai 24 jam waktu perendaman, cairan dipisah melalui penyaringan dengan kain. Filtrat hasil perendaman ditambahkan dengan larutan NaOH 1 N sampai pH mencapai Ketika pH netral, terbentuk gumpalan putih yang berkumpul ditengah filtrat, kemudian didiamkan selama 30 menit hingga gumpalan putih tersebut mengendap dan selanjutnya disaring.

Komposit Kolagen Hidroksiapatit.

Hidroksiapatit yang digunakan berasal dari tulang sapi produk Instalasi Pusat Bioamterial dan Bank Jaringan Rumah Sakit Umum Dr. Soetomo Surabaya. Dilakukan 7 variasi komposit kolagen – hidroksiapatit yaitu 100:0; 0:100; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40 dan 70:30. Metode pembuatan komposit mengacu pada metode Wenpo *et al* (2009) dengan modifikasi.

Kolagen dilarutkan dalam 1M asam asetat kemudian ditambahkan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dengan perbandingan 1:1:1. Larutan yang masih bersifat asam ini dinetralkan dengan menambahkan 1M NaOH. Hidroksiapatit dilarutkan dalam asam fosfat dengan perbandingan 1:4. Dinetralkan dengan NH_4OH . Larutan kolagen dan larutan hidroksiapatit kemudian dicampurkan dan diaduk selama 15 menit. Larutan

diendapkan ± 6 jam. Cairan diatas endapan dibuang, dan endapan dituang dalam cetakan untuk selanjutnya di- *freeze drying*. Komposit yang didapat berbentuk bubuk. *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) Karakterisasi sampel kolagen dan sampel omposit kolagen – hidroksiapatit menggunakan FTIR *Jasco – 4200*.

MTT Assay

Kultur sel fibroblast dilakukan dengan mengambil sel BHK-21 (*baby hamster kidney*). Uji menggunakan wadah *microwell plate 96*. Satu baris *plate* diisi oleh kontrol media, satu baris lainnya untuk kontrol sel, dan sisanya untuk pengujian sampel. Sebagai kontrol sel dibuat dengan cara menambahkan *bovine serume* dan medium eagle kedalam satu baris *plate*. Kemudian kontrol media dibuat dengan menambahkan medium eagle dan sel fibroblast kedalam satu baris *plate* lainnya. Sampel yang akan diuji berbentuk serbuk. Sampel dilarutkan kedalam medium eagle dan *bovinne serume* sampai mencapai 50cc. Sebanyak 50 μ l larutan sampel diambil, untuk kemudian dilakukan uji.

Setelah sampel ditetaskan kedalam *plate* dengan 8 kali perulangan, semua sampel termasuk kontrol sel dan kontrol media diberi pewarna MTT *stock solution* ((3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Jumlah sel hidup kemudian dihitung dengan menggunakan *Elisa Reader*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

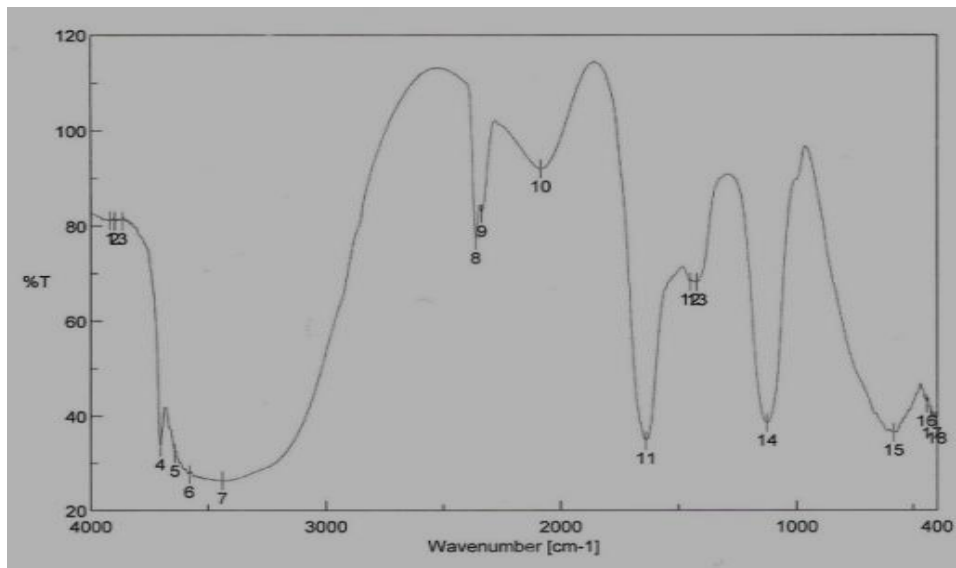
Perendaman 70 gram kolagen dengan HCl 5% menghasilkan kolagen basah sebesar 9,7 gram dengan prosentase :

$$\frac{9.7 \text{ gram}}{70 \text{ gram}} \times 100\% = 13.86\%$$

Menurut Li (2003), ikatan antar molekul kolagen dalam otot bagian kulit dan atau tulang akan meregang (melunak) pada kondisi pH dibawah 4 atau diatas 10. Wang (1994) menyatakan bahwa rantai protein kolagen apabila dipotong (dipecah) dengan HCl akan dihasilkan asam amino dan rantai polipeptida.

Hasil spektroskopi kolagen tendon sapi pada Gambar 1 menunjukkan adanya daerah serapan amida A pada 3438,46 cm^{-1} (titik no.7). Daerah serapan amida A merupakan daerah dimana terdapat ikatan NH *stretching* yang berasosiasi dengan ikatan hidrogen dan OH dari hidroksiprolin (Puspawati *et al*, 2012). Daerah serapan 1421,28

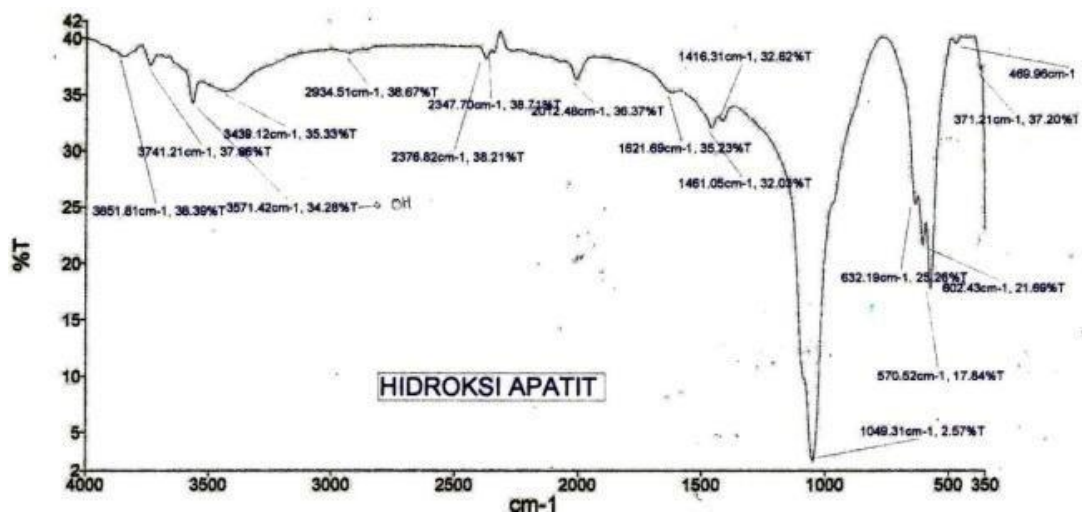
cm^{-1} dan $1449,24 \text{ cm}^{-1}$ (titik no.12 dan no.13) menunjukkan adanya bending OH yang terdapat pada daerah sekitar $1300 - 1550 \text{ cm}^{-1}$. Daerah ini teridentifikasi sebagai serapan amida II. Adanya gugus OH dimungkinkan karena masih ada senyawa OH dari air yang digunakan untuk mengekstraksi kolagen.



Gambar 1. Spektrum FTIR kolagen tendon sapi

Terlihat pula daerah serapan amida I pada bilangan gelombang $1638,23 \text{ cm}^{-1}$ (titik no. 11) . Daerah serapan ini menunjukkan adanya ikatan $\text{C}=\text{O}$ *stretching* dengan kontribusi dari NH *bending* (Puspawati *et al*, 2012) dan $\text{O}-\text{H}$ yang berpasangan dengan gugus karboksil (Suwardi *et al*, 2010). Serapan amida III kolagen tendon sapi teridentifikasi didaerah $1125,26 \text{ cm}^{-1}$ (titik no. 14) yang merupakan gugus dari NH *bending*.

Sedangkakan hasil FTIR hidroksiapatit pada gambar 2 menunjukkan adanya pita serapan vibrasi asimetri *stretching* (ν_3) fosfat (PO_4) pada bilangan gelombang $1049,31 \text{ cm}^{-1}$ dengan puncak yang sangat tajam. Terlihat juga adanya pita serapan ν_3 karbonat (CO_3^{2-}) pada bilangan gelombang $1461,05 \text{ cm}^{-1}$ dan $1416,31 \text{ cm}^{-1}$ dengan intensitas sangat lemah. Adanya kandungan karbonat mengurangi tingkat kristalinitas hidroksiapatit (Mulyaningsih, 2007).



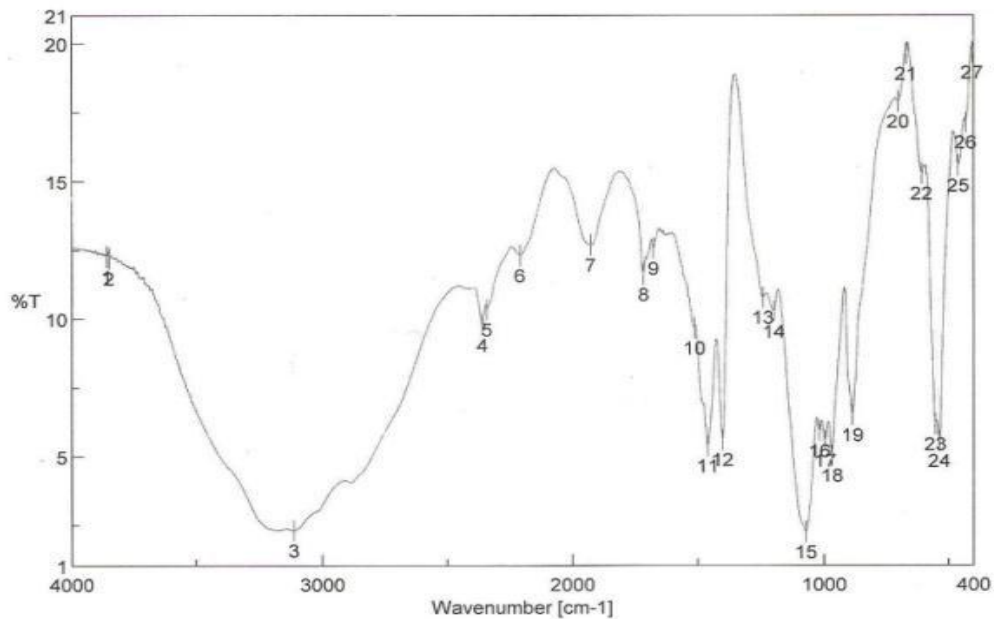
Gambar 2. Spektrum FTIR hidroksiapatit tulang sapi

Pada daerah panjang gelombang $3571,42\text{ cm}^{-1}$ dan $632,19\text{ cm}^{-1}$ terdeteksi daerah serapan gugus hidroksil (OH) dengan intensitas yang lemah. Kristal hidroksiapatit ditandai oleh pita vibrasi asimetri *bending* (ν_4) dalam bentuk pita

belah dengan maksimum pada $570,52\text{ cm}^{-1}$ dan $602,43\text{ cm}^{-1}$. Sedangkan daerah serapan maksimum kristal hidroksiapatit yang tampak menyatu dengan pita ν_4 pada daerah $632,19\text{ cm}^{-1}$ bukan berasal dari PO_4^{3-} , melainkan dari gugus OH. Selain menunjukkan kehadiran kristal apatit, kadar belah pita serapan ν_4 menunjukkan kandungan fase kristal apatit dalam sampel (Djawarni dan Wahyuni, 2002).

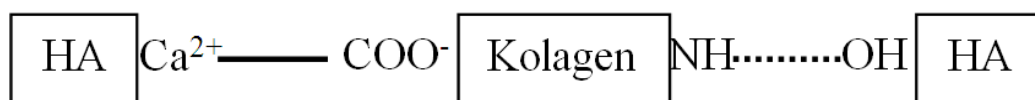
Ketika dikompositkan, hasil FTIR komposit terlihat pada gambar 3 yang menunjukkan adanya serapan amida A dan amida I yang mengalami pergeseran dari hasil FTIR kolagen murni (gambar 1). Amida A bergeser dari posisi spektrum awal $3438,46\text{ cm}^{-1}$ ke titik $3112,55\text{ cm}^{-1}$ (titik no. 3) Pergeseran spektrum amida A dipengaruhi oleh kehadiran gugus OH dari penambahan hidroksiapatit. Daerah amida I mengalami pergeseran dari spektrum awal pada daerah $1638,23\text{ cm}^{-1}$ ke titik $1675,84\text{ cm}^{-1}$ (titik no. 9) dan $1716,34\text{ cm}^{-1}$ (titik no.8). Demikian pula daerah amida II, terjadi pergeseran dari spektrum awal pada titik $1421,28\text{ cm}^{-1}$ dan $1449,24\text{ cm}^{-1}$ ke titik $1461,78\text{ cm}^{-1}$ (titik 11), yang merupakan gugus deformasi NH dan di titik 1402 cm^{-1} (titik 12), yang merupakan gugus CH_2 dari prolin. Spektrum amida III tidak tampak akibat adanya interaksi antara kolagen dan hidroksiapatit.

Gugus fosfat (PO_4^{3-}) milik hidroksiapatit juga terlihat mengalami pergeseran di daerah $1072,23 \text{ cm}^{-1}$ (titik no. 15). Sedangkan kristal hidroksiapatit mengalami pergeseran dari spektrum awal pada $570,52 \text{ cm}^{-1}$ dan $602,43 \text{ cm}^{-1}$ ke titik di daerah $552,506 \text{ cm}^{-1}$ (titik no.23 Gambar 4.3) dan $536,114 \text{ cm}^{-1}$ (titik no.24).



Gambar 3. Spektrum FTIR komposit kolagen – hidroksiapatit

Hasil dari pergeseran spektrum ikatan amida antara spektrum kolagen dan spektrum komposit kolagen – hidroksiapatit, menunjukkan bahwa terjadi ikatan hidrogen yang terbentuk antara gugus OH dari hidroksiapatit dan gugus NH dari kolagen. Hilangnya pita amida III pada daerah sekitar $1229 - 1301 \text{ cm}^{-1}$, memperkuat indikasi adanya ikatan hidrogen. Sedangkan atom Ca^{2+} dari hidroksiapatit dengan gugus $-\text{COO}^-$ dari kolagen membentuk ikatan koordinasi atom anorganik – organik seperti pada Gambar 4.4 (Sionkowska *et al*, 2010).



Gambar 4. Sketsa struktur ikatan komposit kolagen – hidroksiapatit
(— ikatan koordinasi, ---- ikatan hidrogen)

Hasil pengujian selanjutnya adalah uji toksisitas dengan metode *MTT Assay*. Prosentase jumlah sel hidup untuk uji MTT dapat dihitung dengan persamaan :

$$\% \text{sel hidup} = \frac{\text{OD perlakuan} + \text{OD kontrol media}}{\text{OD kontrol sel} + \text{OD kontrol media}} \times 100\%$$

Hasil analisis perhitungan uji *MTT Assay* dapat dilihat pada tabel 1. Pada uji *MTT Assay*, suatu bahan dikatakan tidak toksik apabila prosentase sel hidup masih diatas 60% (Wijayanti,2010). Dibawah 60% menunjukkan bahwa sampel tersebut bersifat toksik dan berbahaya bila diaplikasikan dalam tubuh.

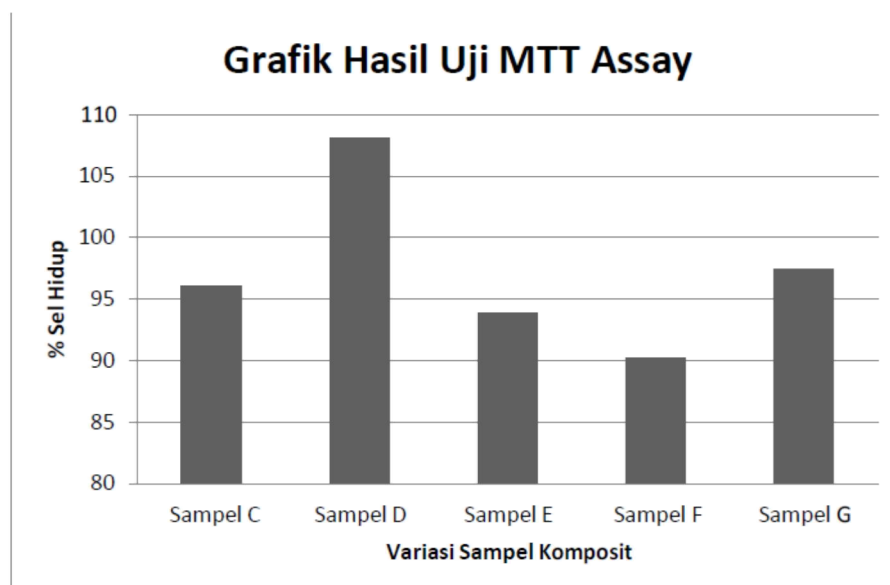
Sampel A dan sampel B merupakan sampel kontrol. Sampel A adalah sampel kolagen tanpa perlakuan, sedangkan sampel B adalah sampel hidroksiapatit tanpa perlakuan. Pada sampel A, hasil uji *MTT Assay* mencapai lebih dari 100%, yaitu 119,4%. Hal ini menunjukkan bahwa sampel kolagen tidak toksik dan mampu menumbuhkan sel fibroblast. Kolagen merupakan suatu protein bioresorbable alami, yang umum digunakan sebagai perancah atau *filler* untuk regenerasi jaringan. Kolagen tipe 1 digunakan sebagai perancah atau filler jaringan tulang. Dalam aplikasi perbaikan jaringan tulang, umumnya kolagen dipakai dalam bentuk komposit, karena jaringan tulang bukan merupakan jaringan lunak, melainkan jaringan keras. Sedangkan sifat kolagen adalah lentur dan lunak, sehingga perlu penambahan bahan lain. Dalam penelitian ini, kolagen dijadikan sebagai matriks dari komposit kolagen – hidroksiapatit yang bisa dijadikan sebagai *bone filler*.

TABEL 1 Hasil Uji MTT *Assay*

Nama Sampel	Rata rata sel hidup	Kontrol Sel	Kontrol Media	% Sel Hidup
Sampel A	0,127	0,091	0,093	119,4
Sampel B	0,080	0,091	0,093	94,3
Sampel C	0,084	0,091	0,093	96,1
Sampel D	0,106	0,091	0,093	108,1
Sampel E	0,079	0,091	0,093	93,9
Sampel F	0,073	0,091	0,093	90,2
Sampel G	0,861	0,091	0,093	97,4

Sampel B merupakan hidroksiapatit menunjukkan hasil uji 94,3% yang menunjukkan sampel ini tidak toksik. Hidroksiapatit memiliki biokompatibilitas yang baik terhadap kontak langsung dengan tulang. Untuk sampel C, sampel D, sampel E, sampel F dan sampel G berturut – turut memiliki prosentase hasil uji sebesar 96,1% ; 108,1% ; 93,9% ; 90,2% dan 97,4%.

Kelima variasi sampel ini juga menunjukkan bahwa sampel tidak toksik. Namun pada sampel D, hasil MTT *Assay* mencapai 108,1%. Hal ini menunjukkan bahwa ada sel yang tumbuh pada sampel (proliferasi). Sampel D merupakan sampel dengan variasi kolagen : hidroksiapatit 40 : 60. Hasil uji MTT 5 variasi sampel dapat disajikan dalam bentuk grafik.



Gambar 5. Diagram Hasil Uji MTT *Assay* 5 Sampel Variasi

Secara keseluruhan hasil uji MTT Assay pada semua variasi sampel menunjukkan hasil yang baik dan tidak toksik. Variasi sampel yang terbaik adalah pada sampel D, yaitu variasi kolagen : hidroksiapatit 40 : 60, karena mampu menunjukkan adanya aktivitas pertumbuhan sel.

KESIMPULAN

Hasil spektroskopi FTIR komposit kolagen - hidroksiapatit terdeteksi adanya gugus N-H dari amida A di serapan $3112,55\text{ cm}^{-1}$, gugus N-H dari amida I terdeteksi di daerah $1675,84\text{ cm}^{-1}$ dan $1675,84\text{ cm}^{-1}$, gugus N-H dari amida II $1240,97\text{ cm}^{-1}$, gugus N-H dari amida III pada serapan $1461,78\text{ cm}^{-1}$ gugus O-H pada daerah serapan $607,467\text{ cm}^{-1}$, gugus PO_4^{3-} pada $1072,23\text{ cm}^{-1}$ dan gugus karboksil $\text{C}=\text{O}$ stretching pada titik $1716,34\text{ cm}^{-1}$.

Hasil karakteristik biologi sampel menunjukkan bahwa sampel pada perbandingan kolagen : hidroksiapatit 40 : 60 memiliki potensi besar untuk dijadikan *bone filler* dengan nilai uji MTT Assay 108,1%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Bapak Drs. Adri Supardi, M.Sc, Ibu Dr. Prihartini Widiyanti, drg., M.kes, Ibu Dyah Hikmawati S.Si M.Si serta pihak pihak yang terlibat dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Lee, C.H ^(a), Singla, A ^(a), Lee, Y^(b). 2001. *Biomedical Application of Collagen*.

^(a)Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, The University of Missouri-Kansas City, ^(b) School of Interdisciplinary Computing and Engineering, The University of Missouri-Kansas City, Kansas City, MO64110, USA

Li, Shu-Thung. 1993. *Collagen Biotechnology and it's Medical Application*.

Biomed. Eng. ppl.Baia Comm. 5 : 646-657

Mulyaningsih, N.N. 2007. *Karakterisasi Hidroksiapatit Sintetik dan Alami pada Suhu 1400°C*. Institut Pertanian Bogor. Bogor

- Mulyaningsih, Neng Nenden. 2007. *Karakterisasi Hidroksiapatit Sintetik dan Alami pada Suhu 1400°C*. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Puspawati ,N.M., Simpen, I.N., Sumerta Miwada, I.N.. 2012. *Isolasi Gelatin dari Kulit Kaki Ayam Broiler dan Karakterisasi Gugus Fungsinya dengan Spektrofotometri FTIR*. Universitas Udayana. Bali.
- Rodrigues ,C.V.M., Serricella, P., Linhares, ABR., Guerdes, RM., Duarte, MEL., Farina, M. 2003. *Characterization of a Bovine Collagen–Hydroxyapatite Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering*. Brazil.
- Sionkowska, A., Kowslowska, J. 2010. *Characterization of Collagen/Hydroxyapatite Composite Sponges as a Potential Bone Substitute*. Faculty of Chemistry. Copernicus University. Torun. Polandia
- Suwardi, Yuniarto., Atmaja, Lukman., Martak, Fahimah. 2010. *Pengaruh Variasi Larutan Asam pada Isolasi Gelatin Kulit Ikan Patin (Pangasius hypothalmus) terhadap Sifat – Sifat Kimia dan Fisik*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- Wang, D. 1994. *Studies on Manufacturing a Functional Ingredient from Porcine skin Collagen by Enzyme Hidroyst*. Tungai University, Taichung. Taiwan.
- Wenpo Feng, Keyong Tang, Xuejing Zheng, Yuanming Qi, Jie Liu. 2009. *Preparation and Characterization of Porous Collagen / Hydroxyapatite / Gum arabic Composite*. China.
- Wijayanti, Fitria. 2010. *Variasi Komposisi Cobalt Chromium pada Komposit Co- Cr- HAP sebagai Bahan implan*. Departemen Fisika. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas. Surabaya