

**Potensi Kolagen Kulit Ikan Lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus* var)
Sebagai *Scaffold* Kolagen-Hidroksiapatit pada *Bone Tissue Engineering***

Ary Andini¹⁾ Dyah Hikmawati²⁾ Sri Sumarsih³⁾

¹⁾ Mahasiswa Program Studi S1 Teknobiomedik angkatan 2008, Departemen Fisika, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. ²⁾ Staf Pengajar Program Studi Fisika, Departemen Fisika, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. ³⁾ Staf Pengajar Program Studi Kimia, Departemen Kimia Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

Email: semnasfisika@unair.ac.id

ABSTRAK

Telah dilakukan sintesis *scaffold* kolagen-hidroksiapatit berbasis kolagen kulit ikan Lele Sangkuriang untuk aplikasi *bone tissue engineering*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui prosentase kolagen dari kulit ikan Lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus* var) dan karakterisasi *scaffold* kolagen-hidroksiapatit berbahan dasar kolagen kulit Ikan Lele Sangkuriang. Proses isolasi kolagen dari kulit ikan Lele Sangkuriang dilakukan dengan ekstraksi kulit ikan dalam asam asetat 0,5 M selama 24 jam, hasil isolasi kolagen kemudian dibagi menjadi beberapa konsentrasi kolagen, yaitu 0%, 5%, 15%, 20%, dan 25% terhadap hidroksiapatit. Proses pembuatan *scaffold* kolagen-hidroksiapatit dilakukan dengan mencampurkan larutan kolagen netral dan larutan hidroksiapatit secara *in situ*. Analisis karakterisasi *scaffold* kolagen-hidroksiapatit dilakukan dengan menggunakan uji densitas, porositas, kekuatan tekan, FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), SEM (*Scanning Electrone Microscope*), dan uji toksisitas dilakukan dengan Uji MTT. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa prosentase kolagen yang terkandung pada kulit ikan Lele Sangkuriang adalah 25,18%, dan hasil analisis karakterisasi *scaffold* kolagen-hidroksiapatit yang didapatkan menunjukkan bahwa *scaffold* kolagen 10%-hidroksiapatit memiliki nilai densitas dan kekuatan tekan tertinggi, yaitu 0,1867 gr/cm³ dan 14,950 KPa. Nilai porositas

tertinggi dimiliki oleh 25% kolagen-HA dengan 70,38%. Berdasarkan hasil spektrum FTIR membuktikan bahwa *scaffold* yang dihasilkan tersusun atas kolagen dan hidroksiapatit, hasil SEM menunjukkan permukaan *scaffold* yang berpori, dan hasil Uji MTT mengindikasikan bahwa *scaffold* kolagen-hidroksiapatit tidak bersifat toksik. Hal ini menunjukkan bahwa *scaffold* kolagen-hidroksiapatit berbahan dasar kolagen kulit ikan Lele Sangkuriang dapat digunakan sebagai implan *bone tissue engineering*.

Key Word: Scaffold, Kolagen-Hidroksiapatit, Tissue Engineering, Clarias gariepinus var, Bone Tissue Engineering

PENDAHULUAN

Tissue Engineering adalah suatu interdisipliner ilmu biomedis yang menggabungkan berbagai ilmu pengetahuan seperti material, teknik, kimia, biologi sel dan molekuler. Tujuan dari aplikasi *Tissue Engineering* adalah untuk mengembangkan *biological substitute* yang berfungsi untuk menyusun, memelihara, memperbaiki atau mengembalikan kembali fungsi jaringan yang rusak (Laurencin and Nair, 2008). *Scaffold* merupakan salah satu komponen *Tissue Engineering* yang dapat digunakan pada aplikasi *bone tissue engineering* untuk memperbaiki jaringan tulang yang rusak (*bone tissue repair*).

Berdasarkan informasi dari Medtech@Insight dalam Laurencin and Nair, 2008, pada tahun 2003, potensial pasar Amerika Serikat untuk produk TE terutama untuk aplikasi tulang dan otot mencapai \$23.8 Miliar dan diperkirakan pada tahun 2013 akan mencapai \$39.0 Miliar. Jumlah ini akan terus bertambah pada tahun selanjutnya, karena jumlah penderita kelainan tulang dan otot seperti penyakit dan fraktur tulang meningkat setiap tahunnya.

Pada pembuatan *scaffold* diperlukan material yang mirip dengan komposisi tulang seperti komposit kolagen-hidroksiapatit. Hidroksiapatit digunakan dalam *tissue engineering* karena biokompatibel dan osteokonduksi. Namun, hidroksiapatit juga memiliki sifat rapuh dan getas. Oleh karena itu, agar hidroksiapatit dapat dijadikan *scaffold bone tissue* diperlukan campuran biomaterial lain seperti kolagen untuk meningkatkan kualitas *scaffold*.

Kolagen merupakan suatu protein jaringan ikat yang banyak ditemukan pada protein mamalia. Sekitar 25%-35% protein tubuh disusun oleh kolagen. Menurut Lee *et al* (2001), kolagen sebagai biomaterial banyak digunakan dalam aplikasi medis karena biokompatibel, biodegradabel dan memiliki dampak antigenisitas yang rendah (Song Eun *et al*, 2006).

Sumber kolagen pada mamalia biasanya terdapat pada kulit babi, kulit sapi dan tulang hewan ternak. Namun, akhir-akhir ini ditemukan bahwa hewan ternak rawan terinfeksi penyakit TSE (*Transmissible Spongiform Encephalopathy*), BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy*) dan FMD (*Foot and Mouth Disease*). Oleh karena itu, menurut Nagai *et al* (2002) diperlukan sumber alternatif kolagen baru

yaitu kulit atau sisik ikan (HaiYing *et al*, 2006) yang salah satunya adalah kolagen dari kulit ikan Lele Sangkuriang (*Clarias gariepinus var*). Kolagen dari kulit atau sisik ikan halal untuk dikonsumsi (Shen *et al*, 2007), dan baik untuk kulit dibandingkan dengan kolagen dari ternak dan unggas.

Pada penelitian ini, diharapkan hasil *scaffold* kolagen-hidroksiapatit ini memiliki kualitas, struktur dan fungsi yang optimal sebagai pengembangan terapi modern berbasis *bone tissue engineering*.

METODE

Bahan dan Alat

Kulit ikan Lele Sangkuriang diperoleh dari industri petani tambak di desa Kedung Banteng, Tanggulangin, Sidoarjo. Kulit ikan Lele Sangkuriang segera dimasukkan ke dalam peti pendingin setelah dibersihkan dari sisa daging kemudian disimpan di lemari pendingin dengan suhu -20°C . Bahan-bahan lain yang digunakan adalah asam asetat, kristal NaOH, kristal NaCl, aquades, kristal $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4 , NH_4OH . Alat-alat yang digunakan meliputi: peti pendingin, penyaring, corong, peralatan gelas, pengaduk magnetik, tabung selofan, timbangan analitik, *freeze dryer*, dan sentrifugator.

Persiapan Sampel

Kulit ikan lele (*Clarias gariepinus var*), dipotong 2-5 mm tipis pada suhu 0°C . Potongan kulit ikan dicuci dengan air dingin (4°C) selama 20 menit. Kulit ikan yang telah dicuci lalu dicampur dengan 0,1 M NaOH pada suhu 4°C sebanyak delapan kali, lalu kulit ikan dicuci dengan aquades (4°C) sampai mencapai pH dasar aquades. Lalu dikeringkan dengan menggunakan *freezer dryer*.

Ekstraksi Kolagen

Lemak pada kulit ikan dimasrasi selama 2 hari dengan Heksane (4°C). Kemudian dicuci dengan aquades (4°C). Residu yang terbentuk diekstrak dengan

0,5 M asam asetat (1 gr kulit per 20 ml dari 0,5 M asam asetat) selama 24 jam, lalu sampel disaring. Larutan kental yang terbentuk disentrifuse pada 8000 rpm selama 30 menit. Residu dari filtrasi, dicampur dan diekstrak kembali dalam 0.5 M asam asetat (1 gr dari residu per 20 ml asam asetat) selama 24 jam dan disentrifuse kembali pada 8000 rpm selama 30 menit. Supernatan yang terbentuk dicampur dan digaramkan dengan menambahkan NaCl hingga konsentrasi akhirnya mencapai 0,9 M. Endapan kolagen dipisahkan dengan mensentrifugasi pada 8000 rpm. Supernatan hasil sentrifuse dipresipitasi kembali dengan NaCl lagi kemudian disentrifuse pada 8000 rpm selama 30 menit setelah terjadi endapan kolagen. Kolagen basah yang terbentuk, kemudian didialisis dengan akuades selama 4 hari dengan. Kolagen yang terbentuk disimpan pada suhu 4°C.

Pembuatan *Scaffold* Kolagen-Hidroksiapatit

Larutan kolagen netral 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% dibuat dengan melarutkan kolagen dalam 0,5 M asam asetat, kemudian ditambahkan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.02 M yang pH larutan dikontrol hingga netral dengan menggunakan NaOH. Larutan hidroksiapatit dibuat dengan melarutkan hidroksiapatit dalam H_3PO_4 kemudian ditambahkan NH_4OH sampai mencapai pH netral. Proses pembuatan scaffold dilakukan dengan mencampurkan larutan kolagen netral dengan larutan hidroksiapatit. Dalam prosesnya, dilakukan pengadukan selama 1,5 jam, dan diinkubasi pada suhu ruang (21-22 °C) selama 20 jam kemudian dilakukan pencucian dengan aquades dan sentrifugasi. Teknik pemisahan fasa padat-cair yang digunakan untuk menghasilkan *scaffold* dengan pori yang baik pada komposit kolagen-hidroksiapatit adalah dengan melakukan pendinginan komposit hingga -20°C selama sehari, kemudian pelarut dapat dihilangkan dengan *freeze-drying*.

Kadar Kolagen

Perhitungan kadar kolagen dihitung dengan menggunakan persamaan berikut.

$$\text{Kolagen(\%)} = \frac{\text{Berat Kolagen Basah}}{\text{Berat Kulit Ikan Basah}} \times 100\%$$

FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Spektrum FTIR *scaffold* kolagen-hidroksiapatit didapatkan dengan menggunakan Tensor™ FT-IR spektrometer (Bruker Optics Inc.).

Densitas dan Porositas

Scaffold Kolagen-HA diukur berat keringnya (W_k). Lalu sampel direndam dalam air kemudian air dikeluarkan. Volume benda diperoleh dari selisih volume akhir (V_2) dikurangi volume awal (V_1). Setelah itu, sampel ditimbang untuk mendapatkan nilai berat basah (W_b). Untuk menghitung densitas (D) dan porositas (P) menggunakan persamaan $D = \frac{W_k}{V_2 - V_1}$ dan $P = \frac{W_b - W_k}{V_2 - V_1} \times 100\%$.

Kekuatan Tekan

Uji kekuatan Tekan *scaffold* kolagen-hidroksiapatit ditentukan diletakkan pada benda uji pada mesin Erweka TBH 220. Mesin tekan dijalankan dengan penambahan beban konstan. Pembebanan dilakukan sampai sampel uji menjadi retak atau hancur.

SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Struktur penampang melintang dari *scaffold* dapat dilihat dengan menggunakan *Scanning Electron Microscopy*, SEM (Inspect S50, FEI Corp., Jepang).

Uji MTT

Scaffold kolagen-hidroksiapatit disterilisasi dengan menggunakan sinar UV selama 24 jam, kemudian dilarutkan dalam 0,5 cc *eagel* dan *bovine* serum untuk pertumbuhan selnya. Larutan sampel kemudian dialirkan pada permukaan sel fibroblast BHK-21 dan ditunggu selama sehari untuk mengetahui perkembangan sel-nya. Masing-masing sampel diulang dengan delapan kali dan diisi larutan sampel 50µm per well-nya. Pada awal perlakuan warnanya ungu

kemudian ditambahkan pereaksi MTT {3-(4,5-Dimetil-2-thiazolil)-2,5-diphenil-2H-tetrazolium bromida}, dan untuk pembacaan sel BHK-21 yang hidup menggunakan *Elisa reader*.

Akhir dari uji sitotoksitas melalui uji MTT memberikan informasi % sel yang mampu bertahan hidup, sedangkan pada organ target memberikan informasi langsung tentang perubahan yang terjadi pada fungsi sel secara spesifik. Berikut adalah persamaan yang digunakan untuk menghitung prosentase sel yang hidup.

$$\% \text{Sel Hidup} = \frac{\text{Perlakuan} + \text{Kontrol Media}}{\text{Kontrol Sel} + \text{Kontrol Media}} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kolagen

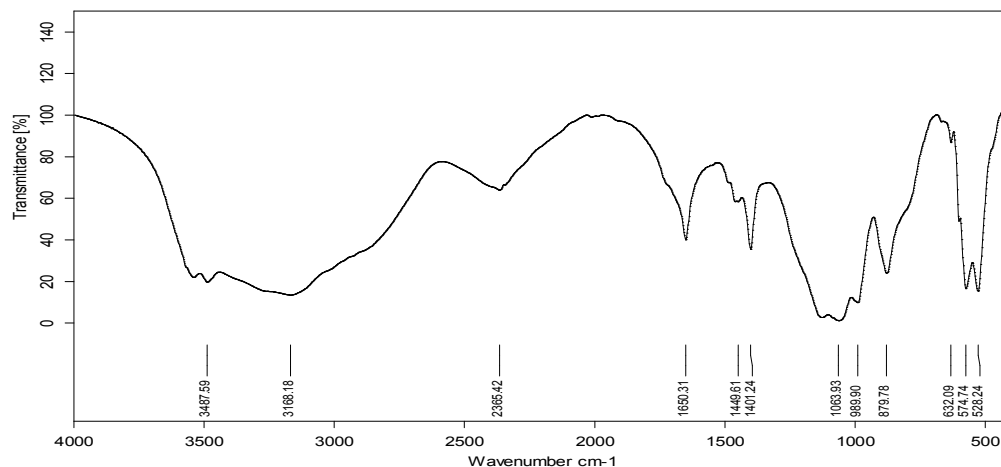
Pada proses isolasi kolagen dilakukan dengan menggunakan kulit ikan Lele Sangkuriang dengan berat basah 55 gr melalui ekstraksi dalam asam asetat 0,5 M selama 24 jam. Kolagen yang didapatkan dari hasil isolasi adalah 13,85 gr sehingga diperoleh kadar kolagen yang terkandung dalam kulit ikan Lele Sangkuriang sebesar 25, 18%. Jumlah prosentase kolagen ini mendekati jumlah prosentase kolagen dari *channel catfish (Ictalurus punctatus)* yaitu 25,8% (Liu *et al.*, 2007). Hal ini menunjukkan bahwa kulit ikan Lele Sangkuriang dapat digunakan sebagai sumber kolagen.

Scaffold Kolagen-Hidroksiapatit

Pembuatan *scaffold* kolagen-hidroksiapatit dilakukan secara *in situ* dengan mencampurkan kolagen kulit ikan Lele Sangkuriang dengan variasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% dengan larutan hidroksiapatit. *Scaffold* yang dihasilkan tampak seperti pada gambar berikut ini.



Gambar 1. *Scaffold* Kolagen-Hidroksiapatit



Gambar 2. Hasil FTIR *Scaffold* Kolagen-Hidroksiapatit

FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)

Analisis spektrum FTIR *scaffold* kolagen-hidroksiapatit pada Gambar 2 membuktikan bahwa *scaffold* kolagen-hidroksiapatit terdiri dari dua komponen utama, yaitu kolagen dan hidroksiapatit. Hal ini dibuktikan dengan susunan utama *scaffold* yang berupa spektrum FTIR kolagen dan hidroksiapatit dengan sedikit pergeseran absorbansi bilangan gelombang. Pada kolagen kulit ikan Lele terjadi pergeseran ikatan amida yang mengabsorpsi N-H *stretching* dari 3267,89 cm⁻¹, C=O *stretching* dari 650,1 cm⁻¹, C-N *Stretching vibration* 1508,75 cm⁻¹, C-H *stretching* pada 1212.11 cm⁻¹ (Liu *et al.*, 2006). Pada hasil FTIR hidroksiapatit menghasilkan pergeseran pita absorpsi gugus hidrogen (-OH) pada 3546,62 cm⁻¹ dan 632,09 cm⁻¹, dan gugus fosfat pada 1067,73 cm⁻¹, 1063,93 cm⁻¹ (Ramli dkk., 2011), dan 574,74 cm⁻¹ (Jie and Yubao, 2004).

Densitas, Porositas, Kekuatan Tekan

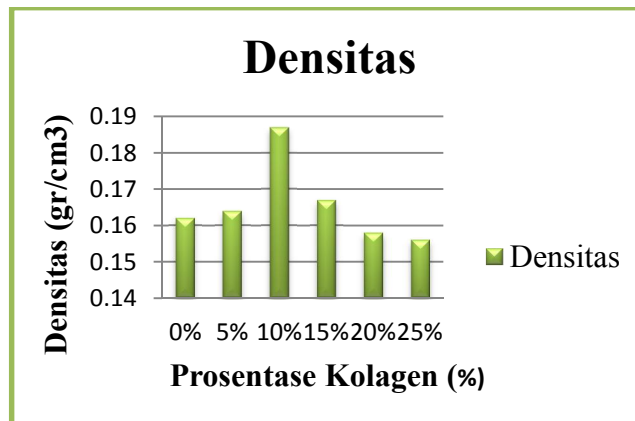
Hasil analisis nilai densitas dan porositas *scaffold* kolagen-hidroksiapatit menunjukkan bahwa prosentase kolagen berpengaruh terhadap nilai densitas dan porositas *scaffold*. Nilai maksimum densitas dimiliki *scaffold* kolagen 10% -HA, yaitu 0,187 gr/cm³ dengan porositas terendah yaitu 55,53%, dan porositas tertinggi dimiliki oleh *scaffold* kolagen 25%-hidroksiapatit, yaitu 70,38% dengan densitas terendah 0,156 gr/cm³. Hal ini membuktikan bahwa nilai densitas berbanding

terbalik nilai porositas. Nilai densitas dan porositas *scaffold* kolagen-hidroksiapatit secara keseluruhan telah sesuai dengan standar tulang *cancellous*, yaitu densitas 0,1-1 gr/cm³ (Ficai *et al.*, 2011) dan porositas 50-90% (Liu *and* Webster, 2007). Sehingga *scaffold* kolagen-hidroksiapatit berbasis kolagen kulit ikan Lele Sangkuriang dapat diaplikasikan sebagai *bone tissue engineering* untuk proses penyembuhan jaringan tulang yang rusak.

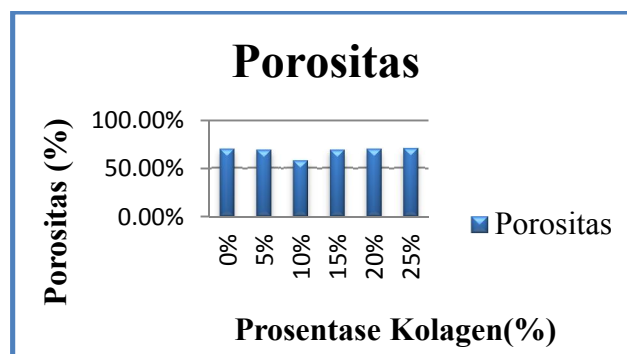
Nilai kekuatan tekan berhubungan erat dengan densitas dan porositas karena nilai kekuatan tekan berbanding lurus dengan densitas, dan berbanding terbalik dengan nilai porositas. Hal ini telah sesuai dengan penelitian bahwa nilai kekuatan tekan tertinggi dimiliki oleh *scaffold* kolagen 10%-hidroksiapatit, yaitu 14,95%. Meskipun nilai *scaffold* kolagen-HA yang dihasilkan tidak sesuai dengan referensi tulang *cancellous*, yaitu 2-12 MPa (Ficai *et al.*, 2011), namun fungsi kekuatan tekan pada *scaffold* untuk aplikasi *bone tissue engineering* sebagai penahan *bone crash* telah digantikan oleh penyanggah (*bandage*) tulang.

Tabel 1. Hasil Data Uji Densitas

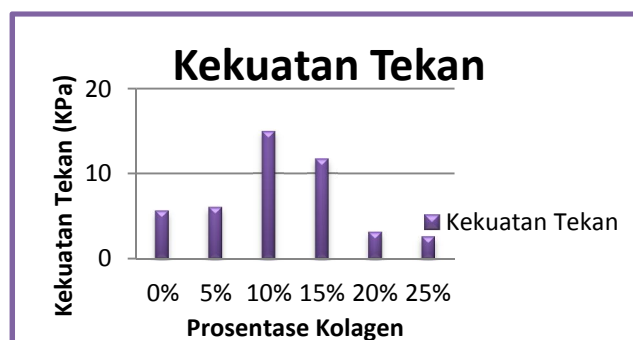
No.	Prosentase Kolagen	Densitas (gr/cm ³)	Porositas (%)	σ (KPa)
1.	0 %	0,1621	69,93	5,690
2.	5%	0,1640	68,89	6,097
3.	10%	0,1867	57,88	14,950
4.	15%	0,1675	68,82	11,760
5.	20%	0,1583	69,97	3,190
6.	25%	0,1565	70,38	2,670



Gambar 3. Diagram Batang Pengaruh Prosentase Kolagen pada Densitas *Scaffold* Kolagen-Hidroksipatit

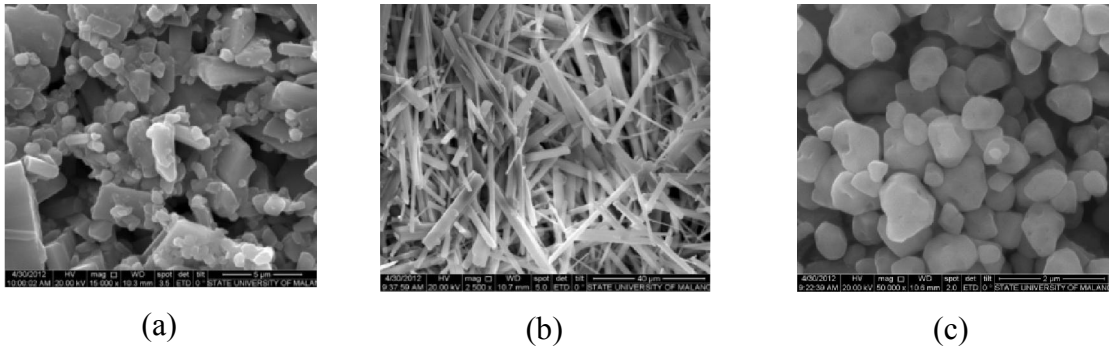


Gambar 4. Diagram Batang Pengaruh Prosentase Kolagen pada Porositas *Scaffold* Kolagen-Hidroksipatit



Gambar 5. Diagram Batang Pengaruh Prosentase Kolagen pada Nilai Kekuatan Tekan *Scaffold* Kolagen-Hidroksipatit

Scanning Electron Microscope (SEM)



Gambar 6. (a), (b), (c) dan (d) menunjukkan penampang melintang *scaffold* kolagen-hidroksiapatit dengan perbesaran yang berbeda-beda.

Gambar 6. (a). menunjukkan struktur penampang melintang serat-serat kolagen pada perbesaran 2.500 kali. Gambar 6. (b). menunjukkan struktur penampang melintang hidroksiapatit pada perbesaran 50000 kali yang berupa butiran-butiran kristal sesuai dengan hasil SEM hidroksispatit pada penelitian Widiyastuti dkk., 2009. Dan Gambar 6 (c) *scaffold* kolagen-hidroksiapatit dengan perbesaran 15.000 kali.

Berdasarkan hasil SEM pada Gambar 6 (c) menunjukkan bahwa *scaffold* kolagen-hidroksiapatit yang dihasilkan memiliki pori-pori $\pm 3,316 \mu\text{m}$ dan memiliki permukaan yang bergranul akibat hidroksiapatit yang menempel pada serat-serat kolagen sehingga memudahkan sel osteoblast menempel pada *scaffold*. Hal ini memberikan keuntungan tersendiri bagi *scaffold* sebagai implan tulang karena memicu percepatan reaksi antara *scaffold* dan jaringan tulang disekitarnya sehingga proses penyembuhan tulang lebih cepat terjadi (Laurencin and Nair, 2008). Meskipun nilai makroporous tidak sesuai dengan yang diharapkan yaitu 50-400 μm , tapi tidak ada tetapan ukuran pori yang pasti untuk tiap-tiap jaringan tulang di tubuh, karena tiap-tiap bagian-bagian tulang memiliki karakteristik berbeda yang cocok untuk melakukan migrasi, proliferasi, adhesi, dan diferensiasi. Oleh karena itu, untuk mengetahui lebih detail tentang peran *scaffold* kolagen-hidroksiapatit dengan makroporous $\pm 3,316 \mu\text{m}$ dalam migrasi,

proliferasi, adhesi, dan diferensiasi untuk perbaikan jaringan tulang diperlukan uji secara *in vivo* pada hewan coba.

Uji MTT

Pada uji MTT menggunakan sel fibroblast BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*), dengan hasil tampak pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji MTT

No.	Kontrol Sel	Kontrol Media	Kontrol Perlakuan	
			Hidroksiapatit	<i>Scaffold</i> Kolagen-Hidroksiapatit
1.	0,0900	0,0870	0,0930	0,0810
2.	0,0810	0,0830	0,0850	0,0700
3.	0,1070	0,1090	0,1080	0,1010
4.	0,1060	0,1120	0,1110	0,0970
5.	0,0680	0,0700	0,0680	0,0540
6.	0,1060	0,1080	0,1090	0,0920
7.	0,0820	0,0860	0,0850	0,0700
8.	0,0870	0,0880	0,1200	0,0780
Rata-rata	0,090875	0,092875	0,097375	0,080375

$$\text{Sel Hidup (\%)} = \frac{0,097375 + 0,092875}{0,090875 + 0,092875} \times 100\% = 103,5374\%$$

Hasil prosentase sel BHK-21 yang hidup pada *scaffold* kolagen-hidroksiapatit adalah sebagai berikut.

$$\text{Sel Hidup (\%)} = \frac{0,080375 + 0,092875}{0,090875 + 0,092875} \times 100\% = 94,2857\%$$

Berdasarkan hasil uji MTT dapat diketahui bahwa hidroksiapatit dan *scaffold* kolagen-hidroksiaptit dengan sel hidup 103,5374% dan 94,285% tidak

bersifat toksik karena prosentase sel hidup $\geq 60\%$. Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian Rubianto yang menyatakan suatu sampel tidak bersifat toksik jika prosentase sel hidup mencapai 92,3%-100% (Meizarni, 2005).

KESIMPULAN

Prosentase kolagen basah yang dihasilkan dari ekstraksi kolagen kulit ikan Lele Sangkuriang dalam pelarut asam asetat adalah $\pm 25,18\%$. Prosentase kolagen terhadap hidroksiapatit dalam *scaffold* memiliki pengaruh terhadap nilai densitas, porositas dan kekuatan tekan. Nilai densitas dan kekuatan tekan tertinggi dimiliki oleh 10% kolagen-hidroksiapatit dengan nilai $0,1867 \text{ gr/cm}^3$ dan $14,950 \text{ KPa}$. Nilai porositas tertinggi dimiliki oleh 25% kolagen-hidroksiapatit dengan $70,38\%$, dan hasil SEM (*Scanning Electron Microscope*) menunjukkan penampang melintang *scaffold* memiliki makroporous $\pm 3,316 \mu\text{m}$, serta hasil uji MTT yang menunjukkan bahwa *scaffold* kolagen-hidroksiapatit tidak bersifat toksik.

Saran

Dalam rangka mengetahui kualitas kolagen dari kulit ikan Lele Sangkuriang dapat dilakukan uji SDS-*Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE), analisis asam amino, *swelling test*, dan viskositas. Dan untuk mengetahui fungsi dan peran *scaffold* kolagen- hidroksiapatit sebagai *bone repair* diperlukan uji secara *in vivo* pada hewan coba sehingga dapat diketahui secara jelas terjadinya proliferasi, migrasi dan *attachment cell*.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami ucapkan pula kepada Dr. Prihartini Widiyanti, drg., M.Kes dan Dr. Ferdiansyah, dr., SPOT atas saran, kritik dan bimbingan dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Bareil, Remi Parenteau. Gauvin, Robert. Berthod, François. 2010. *Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. Material, 2010: 3:1863-1887
- Carrico, Ana Claudia. Farracho, Marta. Nunes, Cecília. Ruela, Ana Margarida. Semedo, João. 2007. *Bone Tissue Engineering: Production of Scaffold*. Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa
- Feng, Wenpo. Tang, Keyong. Zheng, Xuejing. Qr, Yuanming. Liu, Jie. 2009. *Preparation and Characterization of Porous Collagen/Hydroxyapatite/Gum Arabic Composit*. Zhengzhou University: Cina
- Ficai, Anton. Andronescu, Ecaterina. Voicu, Georgeta. Ficai, Denisa. 2011. *Advances in Composite Materials for Medicine and Nanotechnology*. Politehnica University of Bucharest, Faculty of Applied Chemistry and Materials Science: Romania
- Friess W. *Collagen - Biomaterial for Drug Delivery*. Eur J Pharm Biopharm, 1998;45:113-136
- Gelse, K. Poschl, E. Aigner, T. 2003. *Collagens-Structure, Function, and Synthesis*. Advanced Drug Delivery, 2003;55:1531-1546
- Jie, Wei. Yubao, Li. 2003. *Tissue Engineering Scaffold Material of nano-Apatite Crystals and Polyamide Composite*. European Polymer Journal 2004;40:509–515
- Kordi H, M. K., Ghufon. 2010. *Budi Daya Ikan Lele di Kolam Terpal*. Lily Publisher: Yogyakarta
- Kutz, Myer. 2003. *Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design*. McGraw-Hill: New York
- Laurencin, Cato T. Nair, Lakshmi S. 2008. *Nanotechnology and Tissue Engineering*. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton. Hlm. 329-347
- Lawson, AC. Czernuszka, JT. 1998. *Collagen–Calcium Phosphate Composites*. Proc Instr Mech Eng, 1998;212(11):413–438

- Liu, HaiYing. Li, Ding. Guo, ShiDong. 2006. *Studies on Collagen from The Skin of Channel Catfish (Ictalurus punctatus)*. Food Chemistry, 2007;101: 621–625
- Peranginangin, Rosmawaty. Kusumawati, Rinta. Apriantoro, Eko Wahyudi. 2008. *Isolasi dan Karakterisasi Kolagen yang Diekstraksi dari Kulit Ikan Lele Kerapu (Epinephelus tauvina)*. Seminar Nasional Tahunan V Hasil Penelitian Perikanan dan Kelautan, 26 Juli 2008, PP-23.
- Rodrigues, C.V.M. Serricellab, P. Linhares, A.B.R. Guerdes, R.M. Borojevic, R. Rossi, M.A. Duarte, M.E.L. Farinac, M. *Characterization of Bovine Collagen-Hydroxyapatite Composite Scaffold for Bone Tissue Engginering*. Biomaterials, 2003; 24:4987-4997
- Tierney, Claire M. Haugh, Matthew G. Liedl, Jakob. Mulcahy, Fergal. Hayes, Brian. O'brien, Fergal J. 2009. *The effect of Collagen Concentration and Crosslink Density on Biological, Structural and Mechanical Properties of Collagen-GAG Scaffolds for Bone Tissue Engineering*. Journal of the Mechanical Behaviour of Biomedica Materials, 2009;2(2):202-9
- Wahl, DA. Czernuska, JT. 2006. *Collagen-Hydroxyapatite Composites for Hard Tissue Repair*. European Cells and Materials, 2006;11:43-56