

Artikel Asli/Original Articles

**Perbandingan antara Perancah Tulang Nanobiokomposit Alginat/ Kulit Kerang dan Alginat/Kalsium Karbonat terhadap Pertumbuhan Osteoblas
(Comparison of Alginate/Cockle Shell Powder Nanobiocomposite and Alginate/ Calcium Carbonate Bone Scaffolds on Osteoblast Growth)**

HEMABARATHY BHARATHAM, ZARIYANTEY ABDUL HAMID, MUHAMMAD FIKRI MUSA, NURNADIAH AHMAD & ENOCH KUMAR PERIMAL

ABSTRAK

Kalsium karbonat (CaCO_3) memainkan peranan yang penting dalam merangsang pertumbuhan osteoblas. Kajian ini dijalankan untuk membandingkan prestasi perancah nanobiokomposit alginat/kulit kerang (nCP) yang mengandungi CaCO_3 dari sumber semula jadi dan perancah alginat/kalsium karbonat (CC) yang mengandungi CaCO_3 sintetik terhadap pertumbuhan osteoblas melalui kajian *in vitro* dan pemerhatian awal kebioserasian *in vivo*. Perancah tulang berbentuk tiga dimensi dibangunkan dengan menggunakan campuran 40% Alginat dan 60% serbuk kulit kerang bersaiz nano (perancah nCP) atau serbuk CaCO_3 sintetik (perancah CC). Kajian *in vitro* terhadap pembebasan kalsium dan aktiviti enzim alkalin fosfatase (ALP) pada kedua-dua perancah yang telah dibenihkan dengan osteoblas ditentukan pada hari ketiga, kelima dan ketujuh pengkulturan. Kajian *in vivo* dijalankan dengan implantasi subkutan perancah yang telah dibenihkan dengan osteoblas pada bahagian dorsum lapan ekor mencit selama 21 hari. Setelah 21 hari, perancah dikeluarkan dari mencit untuk pemerhatian histologi menggunakan pewarnaan H&E and von Kossa. Hasil kajian *in vitro* menunjukkan peningkatan secara signifikan ($p < 0.05$) perembesan kalsium dan aktiviti enzim ALP pada perancah nCP pada hari ketujuh berbanding perancah CC pada hari ketiga dan kelima. Pemerhatian histologi terhadap kedua-dua perancah menunjukkan infiltrasi dan proliferasi osteoblas serta pembentukan tisu tulang peringkat awal. Pembentukan saluran darah juga dapat dikenal pasti pada perancah nCP. Kedua-dua perancah menunjukkan potensi untuk menyokong dan membantu pertumbuhan osteoblas namun perancah nCP didapati menunjukkan potensi yang lebih baik secara keseluruhan. Kesimpulannya, CaCO_3 dari sumber semula jadi iaitu kulit kerang dan bersaiz nano berpotensi untuk dijadikan sebagai biobahan di dalam aplikasi kejuruteraan tisu tulang.

Kata kunci: Perancah tulang; serbuk nano kulit kerang; kalsium karbonat; biobahan; osteoblas

ABSTRACT

Calcium carbonate (CaCO_3) plays a crucial role in influencing the growth of osteoblast. This study was conducted to compare the performance of alginate/cockle shell powder nanobiocomposite (nCP) bone scaffold developed from naturally occurring CaCO_3 with alginate/calcium carbonate (CC) bone scaffold developed using synthetic CaCO_3 . The study compares the performance of the scaffold in supporting the growth of osteoblast through *in vitro* evaluations as well as initial biocompatibility observations through *in vivo* methods. Both scaffolds were developed using the mixture of 40% alginate solution with either 60% of nano cockle shell powder or synthetic CaCO_3 to obtain a three dimensional scaffold structure. *In vitro* evaluation on calcium release and ALP enzyme activity was conducted on both scaffolds seeded with osteoblast on day's three, five and seven using commercial kits. *In vivo* observations using histological methods were further conducted by implanting osteoblast seeded scaffold subcutaneously at the dorsum of 8 albino mice for 21 days. Findings from *in vitro* studies showed a significant increase ($p < 0.05$) in the release of calcium and ALP enzyme activity in nCP scaffolds on day seven compared to days three and five of CC scaffold. Histological observations using H&E and von Kossa staining showed infiltration and proliferation of osteoblast on both scaffolds as well as early stage bone tissue formation. Formation of new blood vessels within the scaffolds was also observed in nCP scaffold. Both the developed scaffolds were noted to support osteoblast growth and new tissue formation with better potentials displayed by nCP scaffolds comparatively. This study shows that naturally occurring CaCO_3 obtained from cockle shells in the form of nano powder has good potentials to be used as a biomaterial for bone tissue engineering applications.

Keywords: Bone scaffold; Nano cockle shell powder; calcium carbonate; biomaterial; osteoblast

PENGENALAN

Tulang memainkan peranan yang penting dalam pergerakan tubuh badan. Penggunaan bahan gantian tulang (bone graft) merupakan antara kaedah rawatan konvensional untuk merawat keretakan tulang, menggantikan atau menjana semula tulang yang telah rosak. Namun, penggunaan kaedah konvensional ini boleh membawa kepada komplikasi seperti jangkitan kuman, kesakitan, kehilangan darah, penolakan imun serta kos pembedahan yang tinggi di samping limitasi jumlah tisu untuk pemindahan (Allais et al. 2015; Burg et al. 2000). Sebagai alternatif, penggunaan perancah tulang semakin mendapat perhatian sebagai bahan pengantiaan tulang. Perancah tulang merupakan pengganti biologi yang mampu memulihkan, mengekalkan dan meningkatkan fungsi tisu. Penggunaan perancah tulang sebagai bahan implan dapat menggantikan kaedah pemindahan tulang daripada penderma kepada penerima melalui perangsangan pertumbuhan semula sel tulang serta mempercepatkan proses penyembuhan. Selain itu, perancah tulang juga mampu mengatasi masalah dalam kaedah konvensional kerana ia tidak memberikan sebarang masalah pada sistem imun (Teti et al. 2013).

Polimer sama ada dari sumber semula jadi ataupun sintetik sesuai digunakan dalam proses fabrikasi perancah tulang. Keunikan ciri-ciri fizikal, mekanikal dan kimia yang terdapat pada sesuatu polimer membolehkan ia digunakan dalam proses pembangunan sesuatu perancah. Perancah yang terhasil berasaskan bahan polimer menunjukkan ciri-ciri fizikal dan mekanikal yang sesuai, struktur integriti yang mencukupi dan permukaan yang luas tanpa merangsangkan sebarang tindak balas imun. Ciri-ciri ini dapat membantu interaksi osteoblas dalam proses regenerasi struktur tulang yang baharu (Hemabarathy et al. 2014a). Alginat merupakan polimer yang sering digunakan dalam fabrikasi perancah tulang. Ia juga merupakan biobahan utama yang boleh menyamai fungsi matriks tisu badan dan menunjukkan sifat bioerasi yang baik dengan badan perumah (Lee & Mooney 2011). Alginat juga sering digunakan dalam pembaikan tisu dan penyembuhan luka disebabkan kegunaan klinikalnya yang selamat sebagai bahan implan.

Berdasarkan kajian yang telah dilakukan oleh Mustakimah et al. (2012), kulit kerang daripada spesies *Anadara granosa* didapati mengandungi antara 95% hingga 99% kalsium karbonat. Kalsium merupakan mineral yang amat penting dalam pembentukan dan pertumbuhan tulang. Kandungan mineral kalsium yang tinggi dalam kulit kerang spesies ini sangat berpotensi untuk digunakan sebagai bahan biologi (biomaterial) dalam proses membaik pulih tulang. Kalsium karbonat boleh dijumpai dalam banyak bentuk polimorf antaranya kalsit, aragonite dan vaterit. Kalsium karbonat dalam bentuk polimorf aragonit adalah yang paling sesuai digunakan untuk pembentukan perancah kerana bentuknya yang stabil, serta mempunyai ketumpatan yang lebih tinggi dan kekerasan yang berpatutan (Mohamed et al. 2012). Menurut kajian Zuki

et al. (2011), kalsium karbonat yang dijumpai daripada kulit kerang adalah dalam bentuk polimorf aragonit.

Sehingga kini, kajian perbandingan antara perancah yang menggunakan kalsium karbonat daripada sumber semula jadi dan sintetik untuk diaplikasikan dalam bidang kejuruteraan tisu masih kurang. Justeru, kajian ini membandingkan kesan penggunaan kalsium karbonat daripada sumber semula jadi dalam bentuk serbuk kerang bersaiz nano dengan kalsium karbonat daripada sumber sintetik di dalam pembangunan perancah tulang untuk aplikasi regenerasi tisu tulang.

KAEDAH KAJIAN

PEMBENTUKAN PERANCAH TULANG

Pembentukan perancah dilakukan menggunakan kaedah beku-kering (freeze-drying method) berdasarkan kaedah Hemabarathy et al. (2014a). Perancah nanobiokomposit (nCP), disediakan dalam nisbah 40:60 % (w/v) menggunakan 40% larutan hidrokoloid alginat dan 60% serbuk nano kulit kerang. Larutan alginat disediakan mengikut kaedah Hemabarathy et al. (2014a) manakala serbuk nano kulit kerang diperoleh daripada Islam et al. (2012). Campuran digaulkan sebati pada kelajuan 600 rpm, dituangkan kedalam acuan khas dan seterusnya dibekukan pada suhu -20°C selama 24 jam. Perancah yang terbentuk kemudiannya dibeku-kering pada suhu -50°C selama 24 jam menggunakan mesin *freeze-dryer*. Perancah yang terbentuk di pindah silang melalui perendaman di dalam larutan 1% kalsium klorida (CaCl₂), dibekukan pada suhu -20°C selama 24 jam dan dibeku-kering pada suhu -50°C selama 24 jam. Perancah alginat/kalsium karbonat (CC) juga disediakan mengikut kaedah yang sama dengan menggunakan 60% serbuk kalsium karbonat sintetik. Perancah yang terhasil dipotong pada ketebalan 2x5 mm dan diautoklaf sebelum digunakan.

KAJIAN IN-VITRO PEREMBESAN KALSIMUM DAN AKTIVITI ENZIM ALKALIN FOSFATASE (ALP)

Osteoblas dari sel stem mesenkima biri-biri digunakan dalam kajian *in vitro* perancah. Osteoblas dibenihkan ke atas perancah nCP (1×10^5 sel/perancah) dan CC dan dikultur dalam plat 24-telaga selama tiga, lima dan tujuh hari. Medium pertumbuhan diambil untuk analisis perembesan kalsium menggunakan kit komersial (Abcam-ab102505) manakala perancah nCP dan CC yang digunakan dihomogenasi untuk analisis aktiviti enzim alkaline fosfatase (ALP) pada sel lisat menggunakan kit komersial *QuantiChrom™ Alkaline Phosphatase* (DALP-250).

KAJIAN IN-VIVO IMPLANTASI PERANCAH

Kajian implantasi perancah dilakukan mengikut kaedah Shamsul et al. (2011) dengan modifikasi. Perancah nCP dan CC yang steril dibenihkan dengan osteoblas pada

ketumpatan 2.5×10^4 sel/perancah selama 24 jam sebelum proses implantasi dijalankan. Seterusnya, implantasi dilakukan ke atas 8 ekor mencit ICR albino secara subkutan di bahagian dorsum kiri (perancah CC) dan kanan (perancah nCP) pada setiap haiwan. Setelah 21 hari implantasi, perancah dikeluarkan untuk analisa histologi menggunakan pewarnaan H&E dan von Kossa.

ANALISIS STATISTIK

Analisa statistik dijalankan menggunakan perisian *SPSS Statistic version 22*. Perbandingan antara kumpulan kajian dianalisa menggunakan ujian *analysis of variance* (ANOVA). Keputusan dinyatakan sebagai purata \pm purata ralat piawai (SEM). Ujian *post-hoc* dilakukan menggunakan ujian *Tukey's multiple comparison test* untuk nilai signifikan ($p < 0.05$).

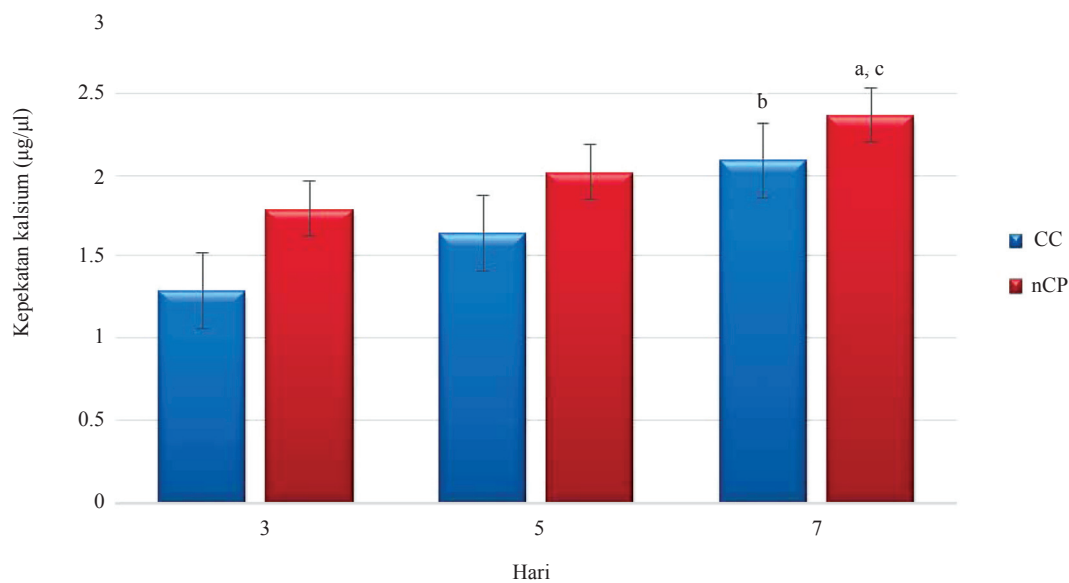
KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

KAJIAN IN-VITRO

ANALISIS PEREMBESAN KALSIMUM

Rajah 1 menunjukkan peningkatan kepekatan kalsium yang dibebaskan dari kedua-dua perancah bermula pada hari ketiga sehingga hari ketujuh. Hasil analisis statistik menunjukkan terdapat peningkatan kepekatan yang signifikan ($p < 0.05$) bagi kalsium yang dirembeskan oleh perancah nCP pada hari ketujuh (2.4 ± 0.24) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ berbanding dengan hari pertama (1.8 ± 0.46) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

μl perancah nCP dan hari ketiga (1.3 ± 0.11) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan kelima (1.6 ± 0.12) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ perancah CC. Perembesan kalsium oleh perancah CC pada hari ketujuh (2.1 ± 0.12) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pula didapati berbeza secara signifikan ($p < 0.05$) apabila dibandingkan dengan perembesan kalsium daripada perancah CC pada hari ketiga (1.3 ± 0.11) $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Penilaian perembesan kalsium daripada kedua-dua perancah yang telah dibenihkan dengan sel osteoblas menunjukkan terdapat peningkatan jumlah kepekatan kalsium dari hari ketiga hingga kelima. Menurut Guo et al. (2011), peningkatan perembesan kalsium membantu dalam proses pembezaan atau proliferasi sel osteoblas. Hasil kajian ini menunjukkan kedua-dua perancah mampu merembeskan jumlah kalsium yang secukupnya untuk digunakan oleh sel osteoblas dalam proses percambahan. Namun begitu, di dalam kajian ini, jumlah kalsium yang dirembeskan daripada perancah nCP adalah lebih tinggi berbanding jumlah kalsium yang dirembeskan oleh perancah CC. Hal ini berlaku mungkin disebabkan kewujudan fasa kalsium karbonat yang berbeza antara kulit kerang (fasa aragonit) dan juga kalsium karbonat sintetik (fasa kalsit). Berdasarkan kajian yang telah dibuat oleh Hoque, Shehryar dan Islam (2013), kalsium karbonat dalam fasa aragonit yang dijumpai di dalam kulit kerang lebih mudah untuk berdegradasi berbanding kalsium karbonat dalam fasa kalsit. Fasa kalsium karbonat yang boleh ditemui dalam bahan membentuk perancah berkemungkinan memberi kesan terhadap perembesan kalsium daripada perancah tersebut yang secara tidak langsung memainkan peranan yang penting dalam mempengaruhi pertumbuhan osteoblas pada perancah yang digunakan.

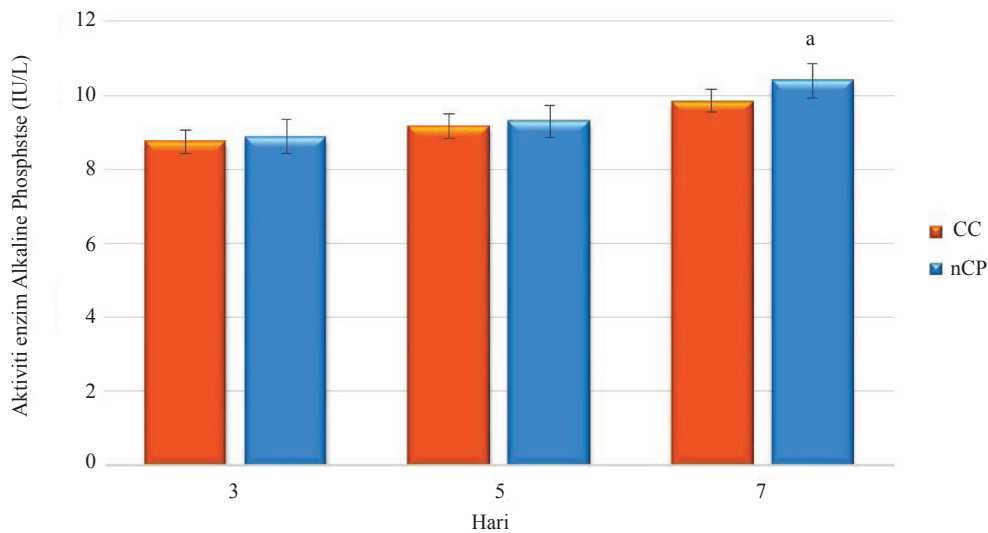


RAJAH 1. Kepekatan kalsium yang dirembeskan oleh perancah CC dan nCP pada hari ketiga, kelima dan ketujuh. Setiap data diwakili oleh purata \pm SEM ($n = 6$). (CC: perancah alginat/kalsium karbonat; nCP: perancah nanobiokomposit alginat/serbuk kulit kerang; ^a $p < 0.05$ berbanding nCP hari pertama, ^b $p < 0.05$ berbanding CC hari ketiga, ^c $p < 0.05$ berbanding CC hari ketiga dan kelima)

ANALISIS AKTIVITI ENZIM ALKALIN FOSFATASE (ALP)

Rajah 2 menunjukkan aktiviti enzim ALP kedua-dua perancah pada hari ketiga, kelima dan ketujuh. Hasil kajian mendapati terdapat peningkatan yang signifikan ($p < 0.05$) pada aktiviti enzim ALP pada perancah nCP pada hari ketujuh (10.4 ± 0.24) IU/L berbanding dengan perancah CC pada hari ketiga (8.8 ± 0.47) IU/L dan kelima (9.2 ± 0.24) IU/L kajian. Aktiviti ALP amat penting sebagai penanda bagi proses pembezaan awal sel tulang dan ia amat berkait rapat dengan proses kalsifikasi tulang. Peningkatan penghasilan enzim ini diperlukan sebelum proses mineralisasi matriks pada perancah bermula dan dapat dikaitkan dengan proses semula jadi fasa pematangan matriks tisu tulang yang melihat peningkatan penghasilan enzim ALP oleh osteoblas (Zuki et al. 2011). Menurut kajian daripada Guo et al. (2011), peningkatan aktiviti enzim ALP

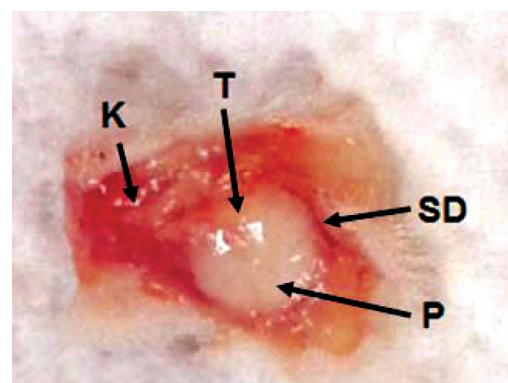
menunjukkan bahawa pembentukan tisu tulang sedang berlaku. Berdasarkan kajian ini, peningkatan aktiviti enzim ALP yang disokong dengan peningkatan perembesan kalsium pada kedua-dua perancah menunjukkan bahawa proses pembentukan awal tisu tulang dapat berlaku seawal hari ketujuh. Peningkatan dalam kadar perembesan kalsium secara tidak langsung mendorong percambahan dan proliferasi sel osteoblas. Proses proliferasi sel osteoblas menyumbang kepada peningkatan penghasilan enzim ALP yang memainkan peranan yang penting dalam proses mineralisasi dan pematangan tisu tulang baru. Perancah nCP juga turut menunjukkan peningkatan aktiviti enzim ALP yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan aktiviti enzim ALP pada perancah CC. Ini menunjukkan potensi perancah nCP dalam membantu dan menyokong proses pembentukan awal tisu tulang pada kadar yang lebih cepat justeru dapat meningkatkan tempoh penyembuhan.



RAJAH 2. Aktiviti enzim alkalin fosfatase daripada osteoblas yang dibenihkan pada perancah CC dan nCP pada hari ketiga, kelima dan ketujuh. Setiap data diwakili oleh purata \pm SEM ($n = 6$). (CC: perancah alginat/kalsiumkarbonat; nCP: perancah nanobiokomposit alginat/serbuk kulit kering; ^a $p < 0.05$ berbanding CC hari ketiga dan kelima)

KAJIAN IN-VIVO

Rajah 3 menunjukkan sampel tisu perancah nCP yang telah di keluarkan setelah tamat tempoh implantasi. Pemerhatian makroskopik menunjukkan kehadiran tisu penyambung yang didapati menyelaputi permukaan perancah. Penyelaputan tisu penyambung dapat diperhatikan pada kedua-dua perancah nCP dan CC yang telah diimplan secara subkutan di bahagian dorsum mencit. Pembentukan saluran darah juga dapat dilihat di bahagian permukaan sesetengah perancah nCP yang dikeluarkan setelah tamat tempoh implantasi.

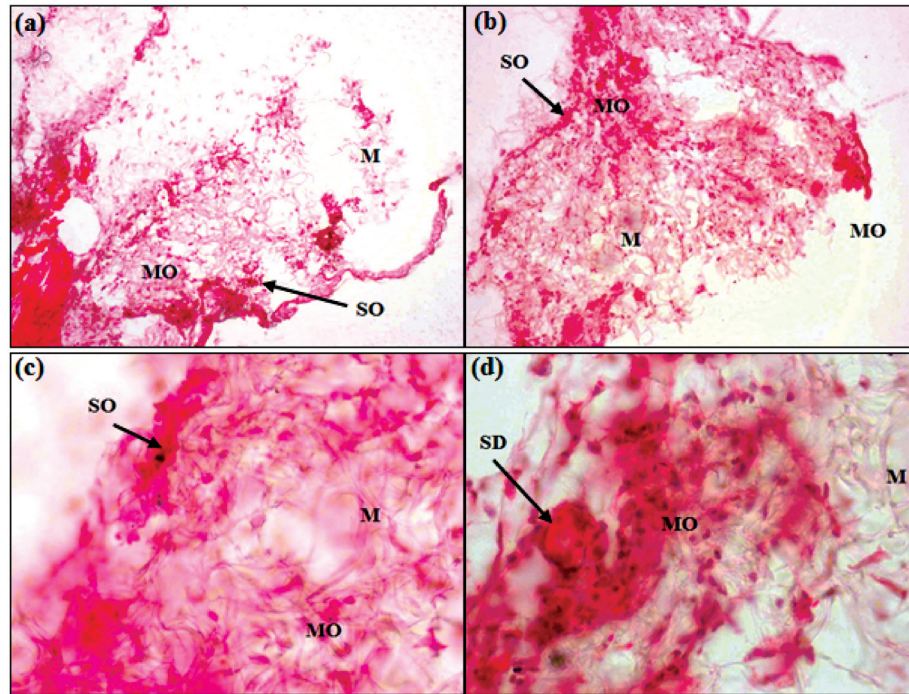


RAJAH 3. Pemerhatian makroskopik terhadap perancah nCP yang dikeluarkan setelah diimplantasi selama 21 hari di bahagian dorsum mencit. (K: kulit mencit; T: tisu penyambung; SD: saluran darah; P: perancah tulang)

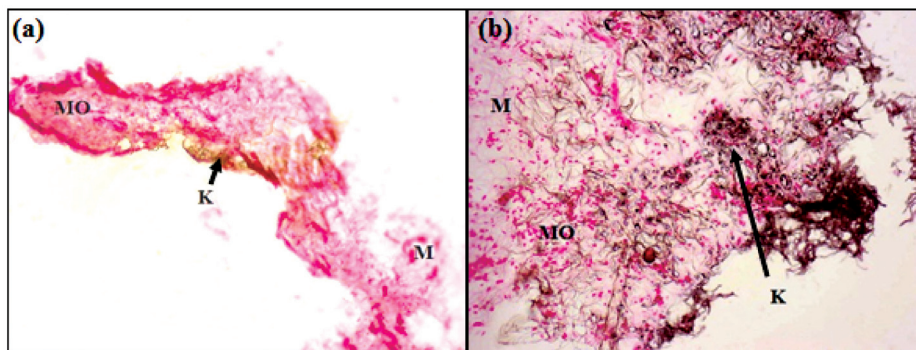
PEMERHATIAN HISTOLOGI

Rajah 4 menunjukkan bahagian implan perancah nCP dan CC yang telah diwarnakan dengan pewarnaan H&E. Pemerhatian histologi menunjukkan infiltrasi dan proliferasi sel osteoblas yang telah dibenihkan pada permukaan perancah. Pada magnifikasi x10, dapat diperhatikan taburan rawak osteoblas pada permukaan kedua-dua perancah CC dan nCP. Struktur osteoblas dapat

dikenal pasti dengan melihat pada sitoplasma (merah) dan nukleus (ungu) yang jelas di permukaan matriks perancah yang berwarna merah jambu. Pemerhatian histologi pada magnifikasi x40 menunjukkan penggugusan (cluster) sel-sel pada sesetengah kawasan implan yang menghasilkan keamatan warna yang lebih pekat. Pemerhatian kapilari darah pada permukaan perancah nCP merupakan salah satu pemerhatian yang penting dalam penilaian keberkesanan penggunaan perancah tersebut.



RAJAH 4. Pemerhatian histologi terhadap perancah CC (a: x10 dan c: x40) dan nCP (b: x10 dan d: x40) yang telah diimplan secara subkutan di bahagian dorsal mencit selama 21 hari (Pewarnaan H&E) (CC: perancah alginat/kalsium karbonat; nCP: perancah nanobiokomposit alginat/serbuk kulit kerang; M: matriks perancah yang tidak mengandungi osteoblas; MO: matriks perancah yang mengandungi osteoblas; SO: gugusan osteoblas; SD: kapilari darah)



RAJAH 5. Pemerhatian histologi terhadap perancah CC (a) dan nCP (b) yang telah diimplan secara subkutan di bahagian dorsal mencit selama 21 hari (Pewarnaan von Kossa, x10). (CC: perancah alginat/kalsium karbonat; nCP: perancah nanobiokomposit alginat/serbuk kulit kerang; M: matriks perancah yang tidak mengandungi sel osteoblas; MO: matriks perancah yang mengandungi sel osteoblas; K: kawasan mineralisasi kalsium)

Berdasarkan kajian oleh Ghanaati et al. (2011), osteoblas yang terdapat pada perancah mampu memberikan isyarat bagi proses pembentukan salur darah di dalam tisu perumah dan kewujudan salur darah ini dapat membantu proliferasi osteoblas justeru meningkatkan keupayaan proses penyembuhan. Tindak balas tisu perumah terhadap perancah adalah dikatakan baik apabila terdapat proses pembentukan saluran darah (angiogenesis) pada perancah yang dapat membantu pertumbuhan sel osteoblas dengan membekalkan pelbagai nutrien dan faktor pertumbuhan yang penting dalam mempercepatkan proses penyembuhan. Peningkatan dalam jumlah sel yang diperhatikan pada perancah nCP turut dapat dikaitkan dengan peningkatan dalam kadar pembebasan kalsium dan aktiviti enzim ALP yang diperhatikan melalui kajian in vitro. Pemerhatian histologi menggunakan pewarnaan von Kossa menunjukkan deposisi kalsium pada permukaan perancah CC dan nCP seperti yang diperhatikan pada Rajah 4. Di bawah magnifikasi x10 kehadiran deposisi kalsium ini dapat dilihat dengan pewarnaan mineral kalsium yang menghasilkan warna perang atau hitam yang menunjukkan proses mineralisasi peringkat awal pada kedua-dua perancah. Berdasarkan keamatan kehadiran deposisi tersebut, pemerhatian histologi ini menunjukkan bahawa perancah nCP mempunyai kawasan deposisi mineral kalsium yang lebih luas berbanding perancah CC. Pembentukan tulang pada peringkat awal dapat dilihat apabila proses mineralisasi tulang berlaku pada perancah. Verma & Kumar (2010) menyatakan bahawa proses mineralisasi yang dapat dikesan pada perancah tulang menunjukkan sifat perancah tersebut yang mempunyai potensi yang baik untuk menjalankan proses membaikpulih tulang. Hasil kajian ini dapat disokong dengan hasil pemerhatian histologi menggunakan pewarnaan H&E yang menunjukkan kehadiran dan taburan osteoblas yang tinggi yang dapat membantu mempercepatkan proses mineralisasi tulang. Pemerhatian awal histologi menunjukkan bahawa perancah nCP mempunyai prestasi yang lebih baik dan sifat biokompatibiliti yang tinggi untuk membantu pertumbuhan osteoblas justeru dapat mempercepatkan proses penyembuhan. Hal ini mungkin juga disebabkan penggunaan serbuk kulit kerang yang bersaiz nano dalam pembentuk perancah nCP dimana penggunaan saiz nano dapat meningkatkan luas permukaan perancah untuk membantu dalam pelekatan dan percambahan osteoblas.

KESIMPULAN

Kajian ini menunjukkan kedua-dua perancah yang dibangunkan menggunakan komposisi alginat/serbuk kulit kerang (nCP) dan alginat/kalsium karbonat (CC) dapat menyokong pertumbuhan osteoblas serta menunjukkan sifat bioerasi yang baik secara in vitro dan in vivo. Perbandingan prestasi menunjukkan pemerhatian yang lebih baik pada perancah nCP yang mungkin disebabkan terdapatnya pengaruh fasa kalsium karbonat dan saiz

bahan nano yang digunakan dalam pembangunan perancah tersebut. Pemerhatian ini turut membuktikan bahawa kalsium karbonat dari sumber semula jadi daripada kulit kerang (*Anadara granosa*) amat berpotensi untuk digunakan sebagai biobahan di dalam bidang kejuruteraan tisu tulang pada masa hadapan.

RUJUKAN

- Allais, M., Maurette, P.E., de Morais, N.G., da Costa, T.B., Fraga, S., e Silva, E.D. d. O., Laureano Filho, J.R. & de Castro, C.M.B. 2015. Comparative study of bone regeneration in critical cranial bone defects using bone marrow adult stem cells and calcium phosphate. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial (English Edition)* 37(1): 15-22.
- Burg, K.J., Porter, S. & Kellam, J.F. 2000. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials* 21(23): 2347-2359.
- Ghanaati, S., Unger, R.E., Webber, M.J., Barbeck, M., Orth, C., Kirkpatrick, J.A., Booms, P., Motta, A., Migliaresi, C., Sader, R.A. & Kirkpatrick, C.J. 2011. Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. *Biomaterials* 32(32): 8150-8160.
- Guo, X., Yan, S., Shi, B., & Feng, Y. 2011. Effect of excessive vitamin a on alkaline phosphatase activity and concentrations of calcium-binding protein and bone gla-protein in culture medium and CaBP mRNA expression in osteoblasts of broiler chickens. *Asian Australasian Journal of Animal Science* 24(2): 239.
- Hemabarathy, B., Zuki A.B.Z., Perimal, E.K., Loqman, M.Y. & Muhajir, H. 2014a. Development and characterization of novel porous 3D alginate-cockle shell powder nanobiocomposite bone scaffold. *Biomed Research International Volume* (6723): 11.
- Hoque, M.E., Shehryar, M. & Islam, K.M.N. 2013. Processing and characterization of cockle shell calcium carbonate (CaCO₃) Bioceramic for Potential Application in Bone Tissue Engineering. *J. Material Sci. Eng.* 2(4).
- Islam, K. N., Zuki, A. B. Z., Ali, M. E., Hussien, M. Z., Noordin, M. M., Loqman, M. Y., Wahid, H., Hakim, M. A., & Hamid, S. B. A. 2012. Facile Synthesis of Calcium Carbonate Nanoparticles from Cockle Shells. *Journal of Nanomaterials* 2012 (534010).
- Lee, K.Y. & Mooney, D.J. 2011. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 37(2012): 106-126.
- Mohamed, M., Suzana, Y. & Maitra, S. 2012. Decomposition study of calcium carbonate in cockle shell. *Journal of Engineering Science And Technology* 7(1): 1-10.
- Mustakimah, M., Suzana, Y. & Saikat, M. 2012. Decomposition of calcium carbonate in cockle shell. *Engineering Science and Technology* 7(1): 1-10.
- Shamsul, S., Tan, K.K., Chen, H.C., Aminuddin, S. & Ruszymah, I. 2013. Tricalcium phosphate/ hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone. *Indian J. Med. Res.* 137: 1093-1101.
- Teti, G., Bigi, A., Mattioli-Belmontes, M., Giardino, R., Fini, M., Mazzotti, A. & Falconi, M. 2013. Morphological evaluation of adhesion and proliferation of osteoblast like cells grown on gelatin/genipin scaffold. *Journal of Life Sciences* 7(9): 965-970.

Verma, S. & Kumar, N. 2010. Effect of biomimetic 3D environment of an injectable polymeric scaffold on MG-63 osteoblastic-cell response. *Materials Science and Engineering* 30(8): 1118-1128.

Zuki, A.B., Bahaa, F.H. & Noordin, M.M. 2011. Cockle shell-based biocomposite scaffold for bone tissue engineering. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering* 11: 365-39.

Hemabarathy Bharatham
Zariyantey Abdul Hamid
Muhammad Fikri Musa
Nurnadiah Ahmad
Program Sains Bioperubatan
Pusat Pengajian Sains Diagnostik dan Kesihatan Gunaan
Fakulti Sains Kesihatan
Universiti Kebangsaan Malaysia
Jalan Raja Muda Abdul Aziz
53000 Kuala Lumpur, Malaysia

Enoch Kumar Perimal
Jabatan Sains Bioperubatan
Fakulti Perubatan dan Sains Kesihatan
Universiti Putra Malaysia
43400 UPM, Serdang
Selangor

Pengarang untuk dihubungi: Hemabarathy Bharatham
Emel: hema@ukm.edu.my

Tel: +603-9289 8076
Fax: +603-2692 9032

Diterima: Ogos 2016
Diterima untuk diterbitkan: Februari 2017

