

# Pengembangan Obat Regeneratif Berbasis Nano Kitosan Oligosakarida untuk *Bone Substitute* dan Terapinya untuk Efisiensi Pengobatan

Genady Althaf Jauhar, Yuli Setiyorini, dan Sungging Pintowantoro  
Departemen Teknik Material dan Metalurgi, Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)  
*e-mail*: althafgenady@gmail.com

**Abstrak**—Patah tulang merupakan diskontinuitas atau kerusakan struktur jaringan tulang, tulang rawan atau epifisis dan merupakan masalah kesehatan baik di Indonesia maupun dunia. Tulang adalah jaringan komposit yang terdiri dari matriks organik, mineral anorganik, sel, dan air. Untuk mengatasi masalah penyembuhan yang terjadi pada patah tulang digunakan material *bone substitute* sebagai salah satu metode untuk mengoptimalkan proses penyembuhan pada tulang. Proses *In-Vitro* digunakan untuk mengetahui bagaimana pengaruh bidegradabilitas dan *bioresorbable*. Proses *In-Vitro* dilakukan dengan mencelupkan *bone substitute* pada larutan saline. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui performa biodegradasi dan *bioresorbable* material *bone cement* dengan variasi komposisi serta memprediksi optimasi *treatment* melalui pengamatan *in-vivo*. Dalam penelitian ini digunakan menggunakan variasi sampel *bone cement*, yakni: Cs3Hap37, Cs4Hap36, dan Cs5Hap35. Variasi *bone filler* menggunakan variasi sampel, yakni: Cs2Hap20, Cs2Hap30, dan Cs2Hap40. Dari *immersion test* didapatkan jika *bone substitute* mempunyai sifat biodegradasi dan *bioresorbable* dengan mampu terdegradasi pada larutan saline. Hasil penimbangan berat specimen semua sampel menunjukkan tren peningkatan setiap minggunya. Dari pengujian FTIR ditemukan *peak* baru setelah 3 minggu perendaman. Berdasarkan uji UV-Vis terlihat adanya *peak* setelah perendaman pada minggu pertama.

**Kata Kunci**—*Bone Cement, In-Vitro, In-Vivo*.

## I. PENDAHULUAN

PATAH tulang merupakan diskontinuitas atau kerusakan struktur jaringan tulang, tulang rawan atau epifisis dan merupakan masalah kesehatan baik di Indonesia maupun dunia. Pada tahun 2007, jumlah kasus patah tulang yang ditangani Rumah Sakit dr. Cipto Mangunkusumo sendiri mencapai 784 kasus dan 27% di antaranya memerlukan Tindakan rekonstruksi baik dengan ataupun tanpa tandur tulang. Patah tulang merupakan salah satu cedera yang paling umum dialami pada sistem musculoskeletal. Contohnya, di Amerika Serikat terdapat 15,3 juta kasus patah tulang tiap tahunnya, yang menyebabkan masyarakat menanggung biaya perawatan yang besar, hilangnya produktivitas, serta kemungkinan cacat permanen [1]. Proses penyembuhan patah tulang merupakan proses koordinasi yang rumit, sehingga menyebabkan sekitar 5-10% dari tulang yang retak berakhir dengan *nonunion* atau penyembuhan yang tidak sempurna [2].

Tulang merupakan pembentuk rangka pada tubuh manusia. Tulang adalah jaringan komposit yang terdiri dari matriks organik, mineral anorganik, sel, dan air [3]. Bagian tulang yang berpotensi paling besar mengalami *nonunion* adalah bagian *humerus*, *femur*, dan *tibia*. Pada studi yang

dilakukan di Skotlandia, terdapat penderita *nonunion* sebanyak 13 dari 1000 penderita patah tulang bagian *pelvis* dan *femur*, 30 dari 1000 patah tulang bagian *humerus*, dan 55 per 1000 patah tulang pada bagian *tibia* dan *fibula* [4]. *Nonunion* dapat dikategorikan sebagai penghentian pertumbuhan tulang, sehingga membuat tulang tidak dapat menyatu seperti semula dan membuat proses penyembuhan memakan waktu yang lama [5].

*Bone cement* merupakan metode penyembuhan patah tulang dengan memberikan substitut tulang yang diimplankan pada tulang. *Bone substitute* biasanya terbuat dari *polymethyl methacrylate* (PMMA) karena sifatnya yang biokompatibel [6]. Dalam penggunaannya, PMMA bisa ditambahkan dengan hidroksiapatit (HAp) yang didapat dari tulang hewan seperti sapi atau lebih dikenal sebagai *bovine*. HAp digunakan karena merupakan bahan utama penyusun tulang pada manusia dan hewan, HAp juga memiliki sifat bioaktif, biokompatibel, dan sifat osteokonduktif yang mirip dengan tulang alami, sehingga dapat digunakan sebagai pengganti tulang alami manusia [7].

Untuk mengetahui apakah penggunaan *bone substitute* bisa efektif digunakan untuk remodeling atau pembentukan tulang yang patah, maka diperlukan pengujian secara *in-vivo*. Pengujian secara *in-vivo* merupakan metode pengujian menggunakan keseluruhan dari organisme. Hewan yang paling sering digunakan dalam pengujian *in-vivo* adalah tikus wistar, karena mampu mempresentasikan fisiologis manusia dengan baik [8]. Tikus wistar juga merupakan hewan yang paling umum digunakan dalam penelitian di laboratorium [9]. Untuk mengetahui apakah *bone substitute* mempunyai biodegradabilitas dan *bioresorbable* yang baik ketika digunakan di dalam tubuh, maka dilakukan pengujian secara *In-Vitro* dengan menggunakan larutan saline.

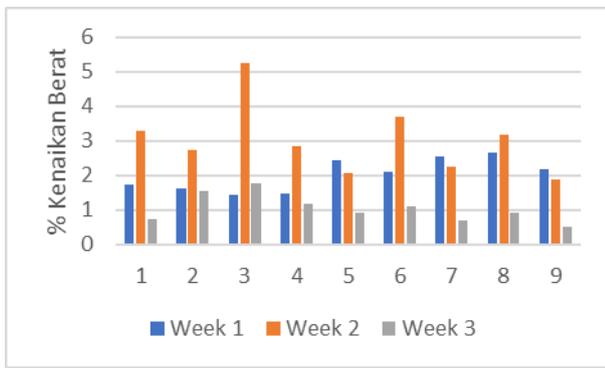
## II. METODOLOGI PENELITIAN

### A. Material

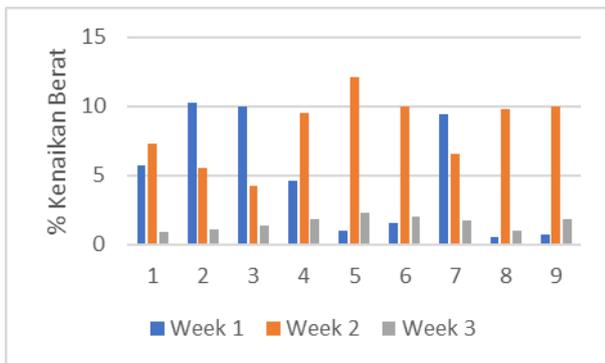
Material *bone substitute* yang digunakan terbagi menjadi 2 jenis, yaitu *bone cement* dan *bone filler*. Kedua variasi tersebut berbasis Polymethyl methacrylate (PMMA), Hidroksiapatit (Hap), dan Kitosan Oligosakarida (COS). *Bone cement* menggunakan variasi PMMA 60% tetap untuk semua variasi, dengan COS 3%, 4%, dan 5%, serta Hap 37%, 36%, dan 37%. *Bone filler* menggunakan variasi COS 2% tetap untuk semua variasi, dengan PMMA 78%, 68%, dan 58%, serta Hap 20%, 30%, dan 40%.

### B. Immersion Test

Pengujian *in-vitro* dilakukan dengan menggunakan *immersion test* dengan cara melakukan perendaman *bone*



Gambar 1. Perubahan berat *bone cement* sesudah perendaman selama 1 minggu, 2 minggu, dan 3 minggu (presentase kenaikan).



Gambar 2. Perubahan berat *bone filler* sesudah perendaman selama 1 minggu, 2 minggu, dan 3 minggu (presentase kenaikan).

*substitute* yang difabrikasi ke dalam larutan saline (0,9% NaCl) pada temperatur 37°C. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui bagaimana performa *bone substitute* saat kontak dengan larutan saline. Pengujian ini dilakukan terhadap semua variasi *bone substitute* : a. Cs2HAp20, b. Cs2HAp30, c. Cs2HAp40, d. Cs3HAp37, e. Cs4HAp36, e. Cs5HAp35, masing-masing menggunakan repetition 3 kali sampel.

C. Pengujian

Dalam penelitian ini dilakukan pengujian komposisi menggunakan *Weighing measurement*, pengamatan morfologi dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM), pengujian *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), dan UV-Vis.

1) *Weighing Measurement*

*Weighing measurement* dilakukan dengan cara menimbang *bone substitute* yang telah dilakukan *immersion* untuk dibandingkan berat sebelum dan sesudah *immersion*.

2) *Pengamatan Morfologi dengan SEM*

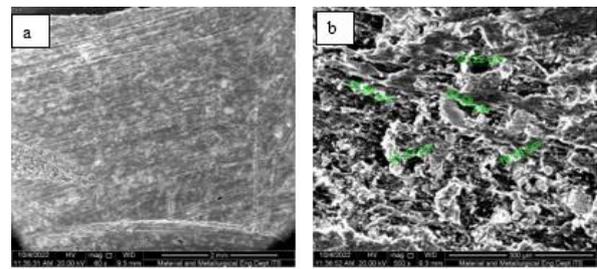
Pengamatan morfologi dilakukan untuk mengetahui bagaimana kondisi permukaan dan *cross section* pada material *bone substitute*. Pengamatan ini menunjukkan adanya pori-pori yang terbentuk pada *bone substitute*.

3) *Pengujian FTIR*

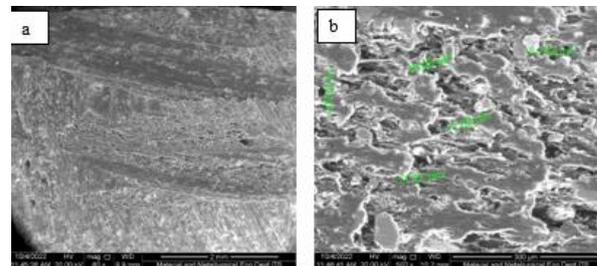
Pengujian FTIR digunakan untuk melihat gugus fungsi dari *bone cement* yang telah terfabrikasi untuk dibandingkan sebelum dan sesudah dilakukan *immersion testing*. Pengujian ini dilakukan setiap 2 minggu sekali. Pada pengujian ini dilihat apakah terjadi perbedaan pada *bone cement* untuk mengetahui proses resorpsi pada larutan.

4) *Pengujian UV-Vis*

Pengujian UV-Vis bertujuan untuk melihat tingkat



Gambar 3. Hasil SEM pada *bone cement* variasi Cs3Hap37: a) *surface* perbesaran 60x dan b) *cross section* perbesaran 500x.



Gambar 4. Hasil SEM pada *bone cement* variasi Cs4Hap36: a) *surface* perbesaran 60x dan b) *cross section* perbesaran 500x.

absorbansi dari larutan control yang dipakai sebelum dan sesudah *immersion testing*. Kemudian diamati pada rentang *peak* absorbansi yang telah muncul. Pengujian dilakukan setiap 1 minggu sekali.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. *Hasil Weighing Measurement*

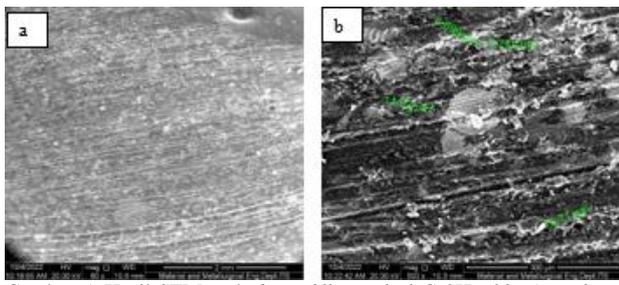
*Weighing measurement* dilakukan dengan cara menimbang *bone substitute* yang telah dilakukan *immersion* untuk dibandingkan berat sebelum dan sesudah *immersion*. Dari data tersebut diketahui berapa persen perubahan berat pada *bone substitute*.

Gambar 1 merupakan perubahan berat *bone cement* sesudah perendaman selama 1 minggu, 2 minggu, dan 3 minggu. Gambar 2 merupakan perubahan berat *bone filler* sesudah perendaman selama 1 minggu, 2 minggu, dan 3 minggu. Berdasarkan data, terlihat bahwa *bone substitute* baik *bone cement* maupun *bone filler* mengalami kenaikan berat setelah *immersion*. Kenaikan berat tersebut karena *bone cement* mampu menyerap air karena memiliki pori-pori yang menyebar antara ruang antarmolekul. Molekul air juga cukup kecil untuk masuk ke dalam ruang antara molekul polimer. Pengaruh temperatur ketika *immersion* juga menyebabkan rantai polimer menjadi rileks dan meningkatkan ruang antarmolekul. Oleh karena itu, *bone cement* mengalami kenaikan berat karena adanya larutan saline yang masuk melalui pori-pori *bone cement* sehingga mengalami *swelling*. *Swelling* yang terbentuk membuat *bone substitute* bisa menyerap air yang meminimalisir penyusutan ukuran *bone cement*. Terserapnya air ke dalam *bone substitute* juga memberikan kemungkinan untuk pelepasan obat yang berkelanjutan di *bone substitute*.

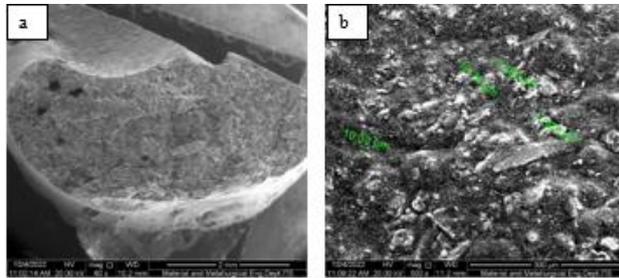
B. *Hasil Pengamatan Morfologi dengan SEM*

1) *Bone Cement*

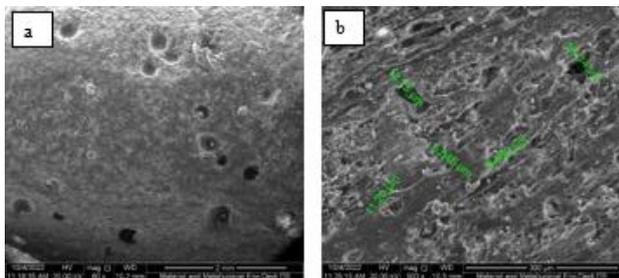
Pada pengujian SEM ditemukan adanya beberapa pori yang terbentuk pada semua variasi *bone cement*. Biomaterial dengan struktur berpori yang saling berhubungan telah ditunjukkan untuk bisa meningkatkan pembentukan tulang



Gambar 5. Hasil SEM pada *bone filler* variasi Cs2Hap20: a) *surface* perbesaran 60x dan b) *cross section* perbesaran 500x.



Gambar 6. Hasil SEM pada *bone filler* variasi Cs2Hap30: a) *surface* perbesaran 60x dan b) *cross section* perbesaran 500x.

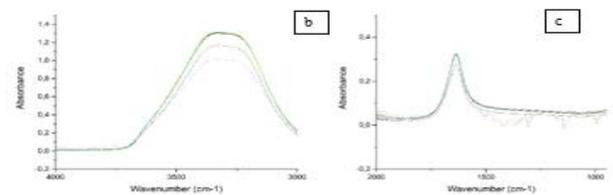
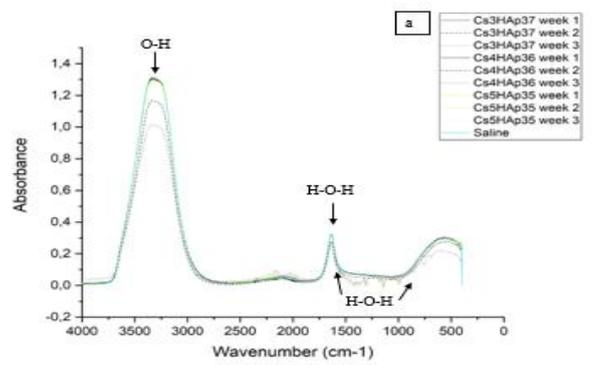


Gambar 7. Hasil SEM pada *bone filler* variasi Cs2Hap40: a) *surface* perbesaran 60x dan b) *cross section* perbesaran 500x.

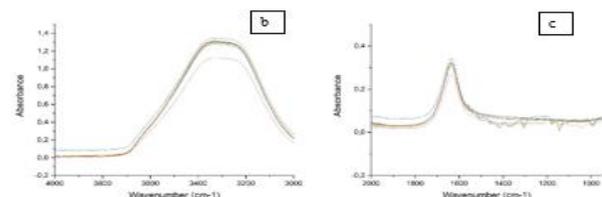
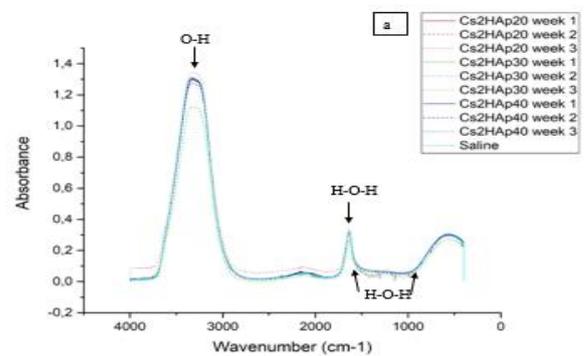
yang lebih baik [10]. *Bone cement* dengan pori mampu mendorong pertumbuhan jaringan lunak dan keras ke dalam material [11]. Pori membuat jaringan tulang mampu tumbuh dengan baik ke dalam pori-pori. Dimensi dan morfologi pori-pori merupakan faktor penting untuk osseointegrasi yang baik [12]. Gambar 3 merupakan hasil SEM pada *bone cement* variasi Cs3Hap37. Lebar pori-pori pada *bone cement* berikisar antara 11-33  $\mu\text{m}$  dengan pori-pori yang paling banyak dan paling lebar terjadi pada variasi Cs3Hap37 seperti terlihat pada Gambar 4 yang menyajikan hasil SEM pada *bone cement* variasi Cs5Hap35. Hal ini mengindikasikan jika adanya penambahan kitosan oligosakarida membuat pori-pori yang terbentuk pada *bone cement* semakin kecil dan sedikit. Sebaliknya, dengan kenaikan hidroksiapatit membuat pori-pori yang terbentuk menjadi semakin banyak dan lebar pada *bone cement* [13].

## 2) Bone Filler

Pada pengamatan menggunakan SEM terlihat adanya beberapa porous yang terbentuk pada semua variasi *bone filler*. Gambar 5 merupakan hasil SEM pada *bone filler* variasi Cs2Hap20. Gambar 6 merupakan hasil SEM pada *bone filler* variasi Cs2Hap30. Gambar 7 merupakan hasil SEM pada *bone filler* variasi Cs2Hap40. Dari ketiga variasi tersebut, pori-pori paling banyak ditemukan pada variasi Cs2Hap40. Adanya pori-pori tersebut membuat larutan saline mampu terserap ke dalam *bone substitute* yang mengakibatkan terjadinya kenaikan berat ketika dilakukan penimbangan [14]. Pori-pori yang terbentuk pada *bone filler*



Gambar 8. Grafik analisis FTIR larutan variasi *bone cement* setelah perendaman saline minggu ke-1, minggu ke-2, dan minggu ke-3: a) *Wavenumber* 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , b) *Wavenumber* 4000-3000  $\text{cm}^{-1}$ , dan c) *Wavenumber* 2000-950  $\text{cm}^{-1}$ .

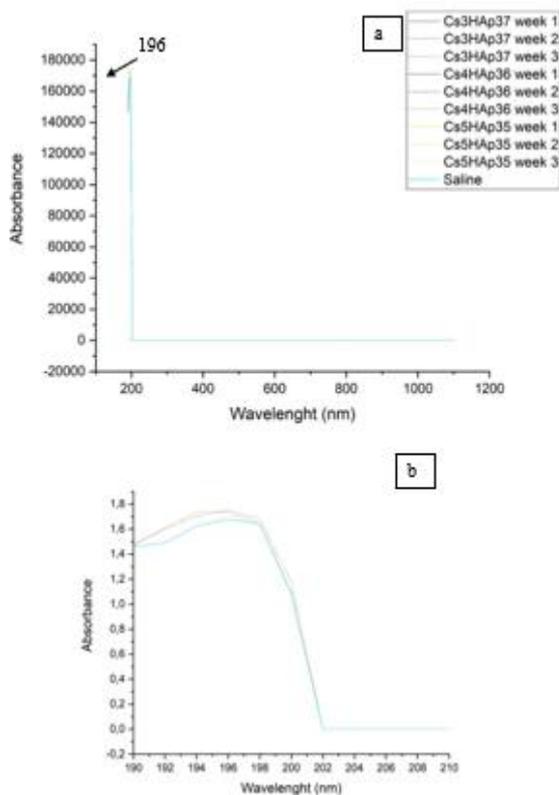


Gambar 9. Grafik analisis FTIR larutan variasi *bone filler* setelah perendaman saline minggu ke-1, minggu ke-2, dan minggu ke-3: a) *Wavenumber* 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ , b) *Wavenumber* 4000-3000  $\text{cm}^{-1}$ , dan c) *Wavenumber* 2000-950  $\text{cm}^{-1}$ .

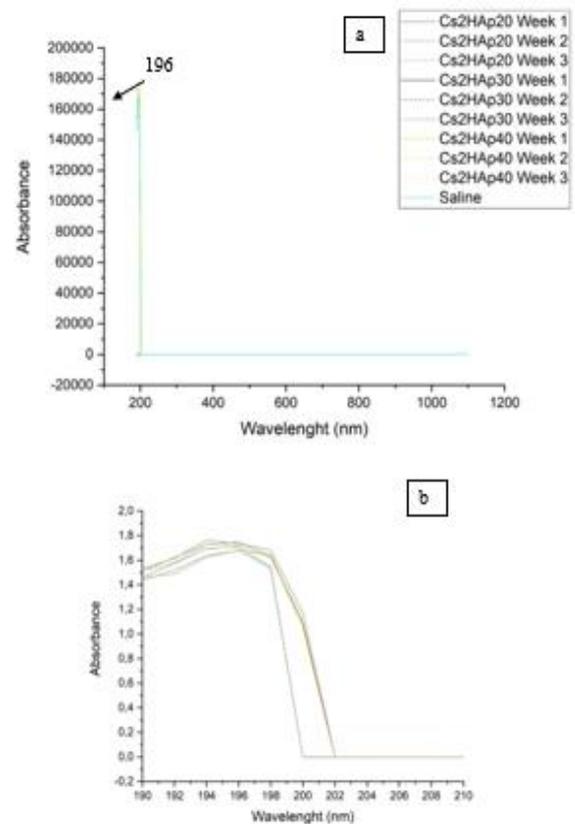
terlihat tidak sebesar pada *bone cement*, dengan lebar berkisar 11 $\mu\text{m}$ . Hal ini dikarenakan pada *bone filler* menggunakan PMMA yang lebih banyak daripada *bone cement*. Variasi dengan pori-pori yang paling besar terjadi pada Cs2Hap40 karena memiliki kandungan hidroksiapatit paling tinggi. Seperti yang terjadi pada *bone cement*, pada *bone filler* penambahan hidroksiapatit juga membuat pori-pori pada *bone filler* menjadi semakin banyak dan lebar [13]. Sebaliknya, penambahan PMMA membuat pori-pori yang terbentuk tidak terlalu banyak dan cenderung kecil.

## C. Hasil Pengujian FTIR

Pengujian FTIR dilakukan untuk menganalisis gugus-gugus fungsi pada larutan saline kontrol (0,9% NaCl) terhadap semua variasi sampel: a. Cs3Hap37, b. Cs4Hap36, c. Cs5Hap35, d. Cs2Hap20, e. Cs2Hap30, dan f. Cs2Hap40. Pengujian FTIR dilakukan setiap minggu dengan masing-



Gambar 10. Grafik analisis UV-Vis larutan variasi *bone cement* setelah perendaman saline minggu ke-1, minggu ke-2, dan minggu ke-3: a) *Wavelength* 190-1200 nm dan b) *Wavelength* 190-210 nm.



Gambar 11. Grafik analisis UV-Vis larutan variasi *bone filler* setelah perendaman saline minggu ke-1, minggu ke-2, dan minggu ke-3: a) *Wavelength* 190-1200 nm dan b) *Wavelength* 190-210 nm.

masing sampel terdiri dari tiga repetisi yang akan dilakukan sebanyak 3 kali.

1) *Bone Cement*

Hasil pengujian FTIR menunjukkan ditemukan *peak* O-H pada rentang *wavenumber* 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$  dan H-O-H bending pada rentang 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ . Pada pengujian FTIR yang dilakukan pada larutan saline setelah perendaman belum terlihat perbedaan yang signifikan pada minggu pertama dan minggu kedua. Perubahan baru terlihat pada minggu ketiga ketika terbentuk *peak* baru pada rentang 1600-1000  $\text{cm}^{-1}$  yang diakibatkan oleh *bone substitute* yang mulai terdegradasi [15]. Dari pengujian FTIR juga terlihat jika variasi Cs5Hap35 memiliki intensitas yang paling tinggi setelah perendaman. Hal itu dipengaruhi karena memiliki kandungan kitosan oligosakarida yang paling tinggi dibandingkan 2 variasi lainnya. Kandungan hidroksiapatit yang dimilikinya juga yang tertinggi. Hal ini mengindikasikan bahwa pada variasi Cs5Hap35 lebih mudah untuk terdegradasi [13]. Gambar 8 menunjukkan grafik analisis FTIR larutan variasi *bone cement* setelah perendaman saline minggu ke-1, minggu ke-2, dan minggu ke-3.

2) *Bone Filler*

Hasil pengujian FTIR menunjukkan ditemukan *peak* O-H pada rentang *wavenumber* 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$  dan H-O-H bending pada rentang 1800-1500  $\text{cm}^{-1}$ . Pada pengujian FTIR yang dilakukan pada larutan saline setelah perendaman belum terlihat perbedaan yang signifikan pada minggu pertama dan minggu kedua. Perubahan baru terlihat pada minggu ketiga ketika terbentuk *peak* baru pada rentang 1600-1000  $\text{cm}^{-1}$  yang diakibatkan oleh *bone substitute* yang mulai terdegradasi [15]. Pada Gambar 9 menunjukkan jika

pada variasi Cs2Hap20 memiliki intensitas yang paling tinggi dibandingkan dengan 2 variasi lainnya. Hal ini disebabkan karena memiliki komposisi PMMA yang paling tinggi. Variasi tersebut juga memiliki kandungan hidroksiapatit yang paling rendah. Hal ini menunjukkan jika penambahan PMMA berpotensi mempercepat proses biodegradasi setelah dilakukan perendaman dengan larutan saline [16].

D. Hasil Pengujian UV-Vis

Pengujian UV-Vis dilakukan untuk mengetahui respon *bone substitute* dengan larutan saline. Pengujian UV-Vis dilakukan setiap minggu sebanyak 3 kali untuk setiap variasi sampel: a. Cs3Hap37, b. Cs4Hap36, c. Cs5Hap35, d. Cs2Hap20, e. Cs2Hap30, dan f. Cs2Hap40. Pengujian UV-Vis dilakukan pada rentang *wavelength* 190-1100 nm. *Peak* yang muncul mengindikasikan terjadinya pelepasan *bone substitute*.

1) *Bone Cement*

Pada hasil pengujian UV-Vis untuk larutan saline kontrol tidak ditemukan adanya *peak*. *Peak* muncul setelah larutan mengalami perendaman oleh *bone substitute* selama satu minggu pada *wavelength* 196 nm [17]. Hal ini mengindikasikan adanya pelepasan *bone cement* dalam skala yang sangat kecil. Pada minggu kedua dan ketiga setelah perendaman tidak ditemukan adanya *peak* lain pada larutan untuk semua variasi sampel. Hal ini menunjukkan bahwa pelepasan yang terjadi pada *bone substitute* selama tiga minggu perendaman sangat kecil. Dari hasil pengujian UV-Vis juga ditemukan jika semakin tinggi kandungan kitosan oligosakarida maka intensitasnya juga semakin tinggi. Terlihat pada Gambar 10 jika variasi Cs5Hap35

mempunyai tingkat intensitas yang paling tinggi dibandingkan dengan 2 variasi lainnya.

## 2) Bone Filler

Pada hasil pengujian UV-Vis untuk larutan saline kontrol tidak ditemukan adanya *peak*. *Peak* muncul setelah larutan mengalami perendaman oleh *bone filler* selama satu minggu pada *wavelength* 196 nm [17]. Hal ini mengindikasikan adanya pelepasan *bone substitute* dalam skala yang sangat kecil. Pada minggu kedua dan ketiga setelah perendaman tidak ditemukan adanya *peak* lain pada larutan untuk semua variasi sampel. Hal ini menunjukkan bahwa pelepasan yang terjadi pada *bone substitute* selama tiga minggu perendaman sangat kecil. Dari ketiga variasi intensitas yang paling tinggi terjadi pada variasi Cs2Hap20 yang memiliki kandungan PMMA paling banyak dibandingkan 2 variasi lainnya. Variasi tersebut juga memiliki kandungan hidroksiapatit yang lebih rendah. Dari data seperti terlihat pada Gambar 11 semakin tinggi kandungan hidroksiapatit maka semakin rendah intensitasnya pada pengujian UV-Vis.

Pengujian *immersion* dapat digunakan untuk mengetahui seberapa bagus sifat biodegradabilitas dan bioresorbabilitas dari *bone cement* dan *bone cement injectable*. Berdasarkan pengamatan melalui mikroskop stereo sebelum perendaman dilakukan terlihat adanya beberapa pori-pori yang terdapat pada permukaan *bone cement* dan *bone cement injectable*. Pori-pori tersebut membuat *bone cement* menjadi lebih elastis, lebih ringan, dan memiliki ketahanan yang lebih kuat (Johnson et al., 2010). Kemudian setelah perendaman selama satu minggu terlihat pada bagian permukaan *bone cement* terlihat permukaan sedikit lebih halus yang menandakan jika *bone cement* dapat terdegradasi pada larutan saline (0,9% NaCl). Untuk mendukung sifat biodegradabilitas pada *bone cement* juga dilakukan penimbangan specimen sebelum dan sesudah dilakukan perendaman. Seperti terlihat pada Gambar 11 menunjukkan jika dalam dua minggu setelah perendaman bobot specimen justru mengalami kenaikan dan sedikit penurunan pada minggu ketiga. Kenaikan berat tersebut disebabkan karena *bone cement* yang digunakan pada penelitian kali ini memiliki sifat mampu menyerap larutan. Meskipun PMMA mempunyai sifat hidrofobik, tetapi masih mampu untuk menyerap larutan kurang lebih sebesar 2% [18]. Pada saat perendaman terjadi dua proses pada specimen, yaitu ekstraksi monomer dan penyerapan air secara difusi ke dalam polimer. Oleh karena itu, sebenarnya perubahan berat specimen adalah kombinasi peningkatan berat karena air dan kehilangan berat karena pencucian monomer [19].

Pada minggu kedua ditemukan penurunan intensitas pada *wavenumber* 3500-3000 pada variasi CsHAp30. Pada variasi lainnya perubahan intensitas tidak terlalu signifikan antara minggu pertama dan kedua. Berdasarkan pengujian UV-VIS pada larutan saline control tidak menunjukkan *peak*. Kemudian setelah satu minggu perendaman terjadi kenaikan *peak* pada sekitar *wavelength* 200-300 pada semua variasi. Puncak *peak* terjadi pada 196 pada setiap variasi. Pada minggu kedua tidak terjadi perubahan *peak* yang signifikan. Pengaruh penambahan kitosan oligosakarida pada *bone cement* mampu meningkatkan sifat degradasi dalam darah serta meningkatkan porositas dan antibiotik [20]. Pada pengamatan menggunakan mikroskop stereo tidak ditemukan perubahan signifikan pada permukaan semua

variasi *bone cement* setelah 3 minggu perendaman. Pada pengamatan morfologi tidak ditemukan perubahan yang terlalu signifikan pada permukaan *bone cement* maupun *bone filler* sebelum dan sesudah perendaman.

## IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penimbangan berat specimen diketahui jika specimen mengalami kenaikan berat karena mempunyai sifat *absorbion*. Berdasarkan pengujian FTIR yang dilakukan terlihat adanya *peak* baru setelah minggu ketiga perendaman pada larutan saline, yang membuktikan adanya degradasi material *bone substitute* pada larutan saline. Sementara untuk pengujian UV-Vis tidak ditemukan perubahan yang signifikan selama tiga minggu perendaman. Hal ini menunjukkan bahwa semua specimen mempunyai sifat biodegradable dan bioresorbable karena mampu terdegradasi pada larutan saline dalam jumlah yang sangat kecil.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] C. R. Pivonka, Peter and Dunstan, "Role of mathematical modeling in bone fracture healing," *Off. J. Int. Bone Miner. Soc.*, vol. 1, 2012, doi:10.1038/bonekey.2012.221.
- [2] T. A. Einhorn, "Enhancement of fracture-healing," *J. Bone Jt. Surg.*, vol. 77, no. 6, pp. 940-956, 1995.
- [3] S. N. Safadi, Faye F and Barbe, Mary F and Abdelmagid, Samir M and Rico, Mario C and Aswad, Rulla A and Litvin, Judith and Popoff, "Bone Structure, Development and Bone Biology," Springer, pp. 1-50, 2009, doi:10.1007/978-1-59745-347-9\_1.
- [4] B. J. Ekegren, Christina L and Edwards, Elton R and De Steiger, Richard and Gabbe, "Incidence, costs and predictors of non-union, delayed union and mal-union following long bone fracture," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 15, no. 12, p. 2845, 2018, doi:10.3390/ijerph15122845.
- [5] S. Stewart, "Fracture non-union: a review of clinical challenges and future research needs," *Malaysian Orthop. J.*, vol. 13, no. 2, p. 1, 2019, doi:10.5704/MOJ.1907.001.
- [6] A. Vaishya, Raju and Chauhan, Mayank and Vaish, "Bone cement," *J. Clin. Orthop. Trauma*, vol. 4, no. 4, pp. 157-163, 2013, doi:10.1016/j.jcot.2013.11.005.
- [7] T. Saputra, Antonius Adi Hendra and Triyono, Joko and Triyono, "Bovine Bone Hidroksiapatite Materials Mechanics Properties at 900 C and 1200 C of Calcination Temperature," Departemen Teknik Mesin, Universitas Sebelas Maret, 2017.
- [8] G. Ihedioha, John Ikechukwu and Ugwuja, Jerome Ifeanyichukwu and Noel-Uneke, Onyinyechukwu Ada and Udeani, Ikechukwu John and Daniel-Igwe, "Reference values for the haematology profile of conventional grade outbred albino mice (*Mus musculus*) in Nsukka, Eastern Nigeria," *Anim. Res. Int.*, vol. 9, no. 2, 2012, issn:159-3115.
- [9] J. M. and others Koolhaas, "The Laboratory Rat," Wiley-Blackwell Oxford, UK, 2010, doi:10.1002/9781444318777.ch22.
- [10] D. Karageorgiou, Vassilis and Kaplan, "Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, 2005, doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
- [11] W. He, Qiang and Chen, Huiling and Huang, Li and Dong, Jingjing and Guo, Dagang and Mao, Mengmeng and Kong, Liang and Li, Yang and Wu, Zixiang and Lei, "Porous surface modified bioactive bone cement for enhanced bone bonding," 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0042525.
- [12] Z. Tang, Hwei and Killough, John E and Heidari, Zoya and Sun, "A new technique to characterize fracture density by use of neutron porosity logs enhanced by electrically transported contrast agents," *SPE J.*, vol. 22, no. 04, 2017, doi: 10.2118/181509-PA.
- [13] T. P. R. Montano, Carlos J. and Lemos, Bruno R.S. and Yoshida, Maria I. and Almeida, Natanael G.S. and Campos, "Hydroxyapatite influence on the thermal and mechanical properties of a highly porous bone cement," *La Rev. Latinoam. Metal. y Mater.*, vol. 41, no. 1, 2021, p.issn:0255-6952, e.issn:224-7113.
- [14] S. L. Ayre, Wayne Nishio and Denyer, Stephen P. and Evans, "Ageing and moisture uptake in polymethyl methacrylate (PMMA) bone cements," *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.*, vol. 32, pp. 76-88, 2014, doi: 10.1016/j.jmbm.2013.12.010.

- [15] T. Park, Ji-Won and Hwang, Jin-Uk and Back, Jong-Ho and Jang, Seong-Wook and Kim, Hyun-Joong and Kim, Pan-Seok and Shin, Seunghan and Kim, "high strength plga/hydroxyapatite composites with tunable surface structure using plga direct grafting method for orthopedic implants," *Compos. Part B Eng.*, vol. 178, 2019, doi: 10.1016/j.compositesb.2019.107449.
- [16] K. Shanti, R. and Hadi, A.N. and Salim, Y.S. and Chee, S.Y. and Ramesh, S. and Ramesh, "Degradation of ultra-high molecular weight poly (methyl methacrylate-co-butyl acrylate-co-acrylic acid) under ultra violet irradiation," *R. Soc. Chem. Adv.*, vol. 7, no. 1, pp. 112–120, 2017, doi: 10.1039/C6RA25313J.
- [17] N. and others Zhong, Leilei and Yao, Lutian and Tower, Robert J and Wei, Yulong and Miao, Zhen and Park, Jihwan and Shrestha, Rojesh and Wang, Luqiang and Yu, Wei and Holdreith, "Single cell transcriptomics identifies a unique adipose lineage cell population that regulates bone marrow environment," *Elife*, vol. 9, 2020, doi: 10.7554/eLife.54695.
- [18] D. N'diaye, Mambaye and Pascaretti-Grizon, Florence and Massin, Philippe and Baslé, Michel Felix and Chappard, "Water absorption of poly (methyl methacrylate) measured by vertical interference microscopy," *Langmuir*, vol. 28, no. 31, 2012, doi: 10.1021/la302260a.
- [19] W. Harper, E.J. and Braden, M. and Bonfield, "Mechanical properties of hydroxyapatite reinforced poly (ethylmethacrylate) bone cement after immersion in a physiological solution: influence of a silane coupling agent," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 11, no. 8, 2000, doi: 10.1023/A:1013057724268.
- [20] M. V. Di Martino, Alberto and Sittinger, Michael and Risbud, "Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering," *Biomaterials*, vol. 26, no. 30, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.016.