

Evaluasi Radiografi terhadap Kepadatan Tulang Hasil Implan Scaffold 3D Bifasik Kalsium Fosfat Alginat pada Domba Lokal (*Ovis aries*)

(RADIOGRAPHIC EVALUATION OF BONE DENSITY AFTER IMPLANTATION OF 3D BIPHASIC CALCIUM PHOSPHATE ALGINATE SCAFFOLD ON LOCAL SHEEP (OVIS ARIES))

Dwi Utari Rahmiati^{1*}, Gunanti¹, Eva Harlina², Kiagus Dahlan³

¹Divisi Bedah dan Radiologi,
Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,

²Divisi Patologi, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
Kampus Dramaga Jl. Agatis Dramaga Bogor 16680.

³Divisi Biofisika, Departemen Fisika,
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
Institut Pertanian Bogor. Kampus Dramaga
Jl. Meranti Dramaga Bogor 16680

*email: dwi.ut@apps.ipb.ac.id

Abstract

This study aims to; 1) evaluate the osteogenesis ability of Biphasic Calcium Phosphate (BCP)-alginate 70/30 based on changes in size of defect and relative bone density, 2) implant response tissue based on relative muscle density peri implant. The BCP used in this study made from hydroxyapatite (HA) 70, tricalcium phosphate (TCP) 30 and alginate as porogen. The implant material made in 3D form and have diameter porous 200-400 μ m which similar size with the bone trabecula. This study used three local sheep (*Ovis aries*) male 1.5 years old, weight average 20 kg. The implant material is grown on the right sheep tibia. As a control, the left tibia is made defective with no implantable material. Evaluate osteogenesis and implant tissue responses using radiography and assess the grey values of a particular area. Osteogenesis is also assessed based on the size of the defect. Based on the size of the defect, the right defect shows no significant value. The size of the left defect shows a significant value between day 0 and day 30, and 90. The relative bone density of the right defect shows a significant value between day 7 and 30. In the left defect, the relative bone density shows the significant between 0 and 90. The relative density of the muscle does not show significant values either on the right or left defects.

Keywords: biphasic calcium phosphate; grey value; radiography; relative bone density; relative muscle density

PENDAHULUAN

Fraktur merupakan cedera umum yang terjadi pada jaringan keras tubuh. Proses persembuhan tulang melibatkan proses secara biologis dan mekanis. Waktu yang diperlukan untuk persembuhan tulang hingga terjadinya *remodeling* jaringan adalah satu hingga dua tahun (Ghiasi *et al.*, 2017). Menurut Hamish dan Butterworth (2000) kecepatan persembuhan tulang dipengaruhi oleh tipe tulang yang mengalami fraktur, tipe fraktur, umur pasien, metode fiksasi serta ada atau tidaknya penyakit sistemik. Gerakan atau mobilitas pasien harus dikurangi selama proses persembuhan. Efek pembatasan ini, membuat kasus fraktur menimbulkan kerugian dari segi sosial dan ekonomi. Kerugian dari segi sosial pasien menjadi sulit bergerak, sulit mengerjakan segala sesuatu sendiri dan berkurangnya waktu untuk bersosialisasi dengan orang lain di luar rumah atau di tempat umum lainnya. Kerugian dari segi ekonomi, pasien harus mengeluarkan biaya untuk pengobatan dan berkurangnya pemasukan akibat tidak dapat bekerja. Diperlukan suatu metode yang dapat mempercepat persembuhan tulang untuk mengatasi kerugian-kerugian tersebut. Metode yang telah dikembangkan dikenal dengan cangkok tulang/*bone graft*.

Terdapat tiga jenis *bone graft* yaitu *autograft*, *allograft* dan *xenograft* (Hamish dan Butterworth 2000). Ketiganya memiliki kendala dalam aplikasinya sebagai upaya medis penanganan fraktur (Amini *et al.*, 2012; Gamblin *et al.*, 2014). Metode yang saat ini masih terus dikembangkan sebagai pengganti *bone graft* yaitu biomaterial. Salah satu jenis biomaterial yang banyak dikembangkan yaitu berbahan biokeramik kalsium fosfat. Bahan ini banyak dikembangkan karena bersifat biokompatibel, osteokonduktif dan non imunogenik (Yu *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2017). Penggunaan bahan ini tidak terlepas dari kendala. Kendala pertama yaitu bahan ini memiliki sifat osteogenesis yang rendah (Gamblin *et al.*, 2014) dan dalam bentuk poros, bahan ini memiliki kekuatan yang rendah (Ramay dan Zhang, 2004).

Evaluasi osteogenesis dapat dikaji berdasarkan ukuran defek tulang dan kepadatan/densitas tulang menggunakan x-ray atau radiografi. Radiografi digunakan untuk melihat perbaikan jaringan tulang dengan penilaian opasitas tulang akibat adanya deposisi

mineral (Morgan *et al.*, 2015). Penggunaan radiografi pada penelitian terkait biomaterial kalsium fosfat juga telah dilakukan oleh Walsh *et al.* (2017) dan Chen *et al.* (2015) untuk mengevaluasi osteogenesis, penyerapan implan serta reaksi biologis jaringan sekitar tulang.

Berdasarkan kendala pengembangan biokeramik kalsium fosfat yang disampaikan sebelumnya, pada penelitian ini disintesis Bifasik Kalsium Fosfat (BKF) dengan formulasi yang berbeda, yaitu hydroxyapatit (HA) 70 dan Trikalsium Fosfat (TKF) 30. Bahan implan dibuat dalam bentuk *scaffold* 3D dan poros dengan diameter 200–400 μm yang menyerupai ukuran trabekula tulang. Perubahan formulasi HA dan pembuatan poros dengan ukuran trabekula tulang diharapkan mampu meningkatkan kekuatan bahan implan. Pembentukan bahan implan menjadi *scaffold* 3D diharapkan mampu meningkatkan osteogenesis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi kemampuan osteogenesis bahan implan BKF-alginat 70/30 berdasarkan perubahan ukuran defek area implan dan perubahan densitas defek sebagai densitas relatif tulang, dan meneliti respons implan dengan jaringan sekitar tulang berdasarkan densitas relatif otot sekitar implan.

METODE PENELITIAN

Seluruh prosedur dalam penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, dengan nomor 052/KEH/SKE/2017. Hewan coba dalam penelitian ini yaitu, tiga ekor domba jantan dengan umur 1,5 tahun dan bobot badan \pm 20 kg yang sebelumnya diaklimatisasi selama 14 hari dan perawatan pada kandang individu. Proses penanaman implan dilakukan melalui prosedur operasi. Domba dibius dengan pemberian kombinasi anestetikum ketamine HCl 10% dosis 2 mg/kg BB dan xylaxine HCl 10% dosis 0,1 mg/kg BB (Plumb 2008) via intravena. Defek dan penanaman pelet BKF alginat dilakukan secara aseptis. Tulang tibia kiri sebagai kontrol positif (dibuat defek namun tidak ditanam pelet BKF alginat), sedangkan tulang tibia kanan sebagai perlakuan (dibuat defek dan ditanam pelet BKF alginat). Orientasi sayatan yaitu garis lurus persendian femoro tibia di medial 3,6 cm dari kaudal ke kranial dan tegak lurus dari titik tersebut 5,7 cm ke arah distal. Defek dibuat menggunakan bor tulang untuk

membuat lubang sesuai dengan ukuran implan (diameter 0,8 cm dan panjang 0,4 cm).

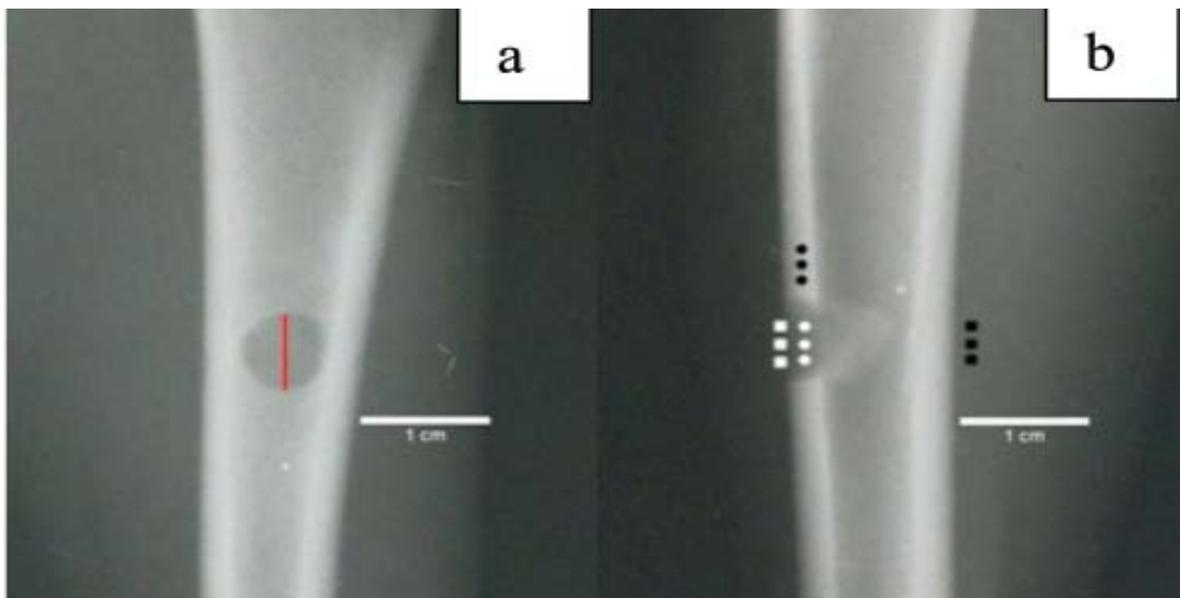
Evaluasi radiografi dilakukan pada hari ke-0, 7, 30, 60 dan 90. Standar pandang untuk pengambilan gambar radiografi tibia yaitu mediolateral dan kraniokaudal (Gambar 1a). Evaluasi radiografi dilakukan berdasarkan interaksi x-ray dengan film peka terhadap cahaya; yang menghasilkan tiga kemungkinan warna yaitu; (1) area hitam menunjukkan adanya interaksi x-ray dengan film. Area hitam disebut juga sebagai area keterpaparan x-ray densitas tinggi. Warna hitam disebut juga sebagai *radioluscent*; (2) Area putih menunjukkan tidak adanya interaksi x-ray dengan film. Area putih disebut juga sebagai area keterpaparan x-ray densitas rendah. Warna putih disebut juga sebagai *radiopaque*; dan 3) Area abu-abu menunjukkan adanya interaksi sebagian x-ray dengan film. Area abu-abu disebut juga sebagai area keterpaparan x-ray densitas sedang (Thrall 2013). Perubahan ukuran defek, didasarkan pada lebar atau diameter area *radioluscent* pada lokasi defek (Gambar 1a). Densitas relatif tulang dinilai secara kuantitatif dengan menilai *grey value area defect* tulang dengan bantuan Image-J. Densitas relatif otot peri implan dinilai secara kuantitatif dengan menilai *grey value area defect* peri implan dengan bantuan Image-J. Lokasi pengambilan area untuk dianalisis *grey value* disajikan pada Gambar 1b

Grey value menunjukkan absorpsi sinar-x oleh suatu jaringan. Pada pemrosesan gambar menggunakan image-J, setiap *pixel* memiliki rentang 0–255 (Geiger *et al.*, 2016). Nilai nol untuk *radioluscent*. *Radioluscent* menandakan rendahnya absorpsi sinar x oleh jaringan. Nilai 255 untuk warna putih (*radiopaque*). *Radiopaque* menandakan absorpsi total, seluruh sinar-x diserap oleh jaringan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini mengadopsi metode yang dilakukan oleh Geiger *et al.* (2016) dengan sedikit modifikasi dalam penentuan *region of interest* (ROI) dan penentuan nilai relatif. Densitas relatif tulang digunakan untuk mengevaluasi proses persembuhan. Densitas relatif tulang didapatkan dengan cara membagi rata-rata *grey value* defek tulang dengan rata-rata *grey value* jaringan tulang non defek, sedangkan densitas relatif otot peri implan didapatkan dengan cara membagi rata-rata *grey value* otot peri implan dengan rata-rata *grey value* otot.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ukuran Defek

Berdasarkan hasil pengukuran defek menggunakan image-J, defek tibia kanan dan kiri menunjukkan pengurangan ukuran defek. Ukuran defek tibia kanan tidak menunjukkan



Gambar 1. 1a Standar pandang mediolateral (ML). Pengukuran defek (garis merah). 1b Standar pandang kraniokaudal (KK). Pengukuran densitas relatif tulang (defek \bar{I} %, tulang \bar{I} %) dan densitas relatif otot peri implan (peri implan; \bar{j} %, otot %)

nilai yang signifikan. Pada tibia kiri, ukuran defek menunjukkan nilai yang signifikan antara hari ke-0 dengan hari ke-30 dan ke-90 (Tabel 1). Perbandingan antara ukuran defek kanan dan kiri tidak menunjukkan nilai yang signifikan. Ukuran defek pada hari ke-7 menunjukkan adanya pengurangan ukuran defek disebabkan oleh terisinya defek dengan kalus, sehingga aspek defek yang awalnya hitam (*radioluscent*) menjadi abu-abu menyerupai jaringan sekitar. Terbentuknya kalus dipengaruhi oleh *growth factor* dan sel mesenkim yang memiliki kemampuan osteogenik. *Growth factor* dikeluarkan oleh makrofag dan platelet, sedangkan sel mesenkim berasal dari periosteum, endosteum dan medula. Proliferasi sel mesenkim membentuk kolagen dan neovaskularisasi (McGavin dan Zachary, 2007).

Tabel 1. Ukuran defek tibia kanan dan kiri pada domba lokal (*Ovis aries*) yang diimplan scaffold 3D bifasik kalsium fosfat alginat

Waktu pengamatan (Hari ke-)	Ukuran defek (cm)	
	Kanan	Kiri
0	0,68 ± 0,13 ^a	0,73 ± 0,05 ^a
7	0,69 ± 0,05 ^a	0,71 ± 0,04 ^{ab}
30	0,70 ± 0,02 ^a	0,66 ± 0,03 ^b
60	0,66 ± 0,05 ^a	0,35 ± 0,32 ^{ab}
90	0,31 ± 0,31 ^a	0,07 ± 0,13 ^b

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai berbeda nyata (p<0.05)

Tabel 2. Densitas relatif tulang pada defek tibia kanan dan kiri pada domba lokal (*Ovis aries*) yang diimplan scaffold 3D bifasik kalsium fosfat alginat

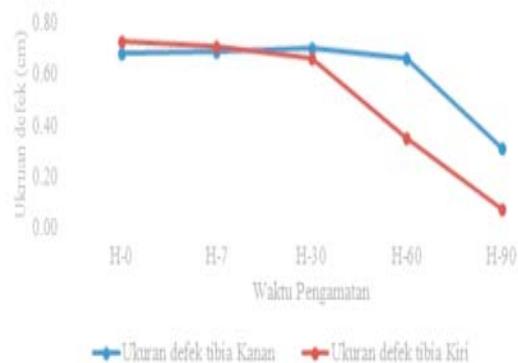
Waktu pengamatan (Hari ke-)	Densitas relatif tulang (arbitrary unit/ AU)	
	Kanan	Kiri
0	0,82 ± 0,15 ^{ab}	0,79 ± 0,02 ^a
7	1,03 ± 0,07 ^a	0,89 ± 0,07 ^{ab}
30	0,86 ± 0,05 ^b	0,91 ± 0,08 ^{ab}
60	0,98 ± 0,31 ^{ab}	0,89 ± 0,13 ^{ab}
90	0,93 ± 0,12 ^{ab}	1,01 ± 0,02 ^b

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai berbeda nyata (p<0.05)

Pengurangan defek tibia kiri lebih banyak dibandingkan defek tibia kanan (Gambar 2). Hal ini menandakan bahwa kontrol mengalami pembentukan kalus lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan. Bahan implan yang digunakan dalam penelitian ini telah disintesis dengan memiliki banyak poros. Adanya poros diharapkan mampu menjadi lokasi sel mesenkim untuk berlekatan, sehingga mampu menginduksi proliferasi dan neovaskularisasi. Hal ini disebabkan oleh poros yang berperan dalam difusi oksigen dan jalur pembuangan metabolisme sel. Selain itu, ukuran poros sangat memengaruhi adhesi sel, interaksi sel dan transmigrasi sel yang berperan dalam proses regenerasi jaringan (Bruzauskaite *et al.*, 2016). Regenerasi jaringan atau disebut sebagai kalus (pertumbuhan tulang baru) menyebabkan mengecilnya ukuran defek (Zhao *et al.*, 2016). Berdasarkan hal ini, maka dengan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara defek tibia kiri dan tibia kanan, bahan implan yang sedang dinilai ini, ternyata kurang mampu menginduksi proliferasi neovaskularisasi

Densitas Relatif Tulang

Densitas relatif tulang digunakan untuk mengetahui densitas tulang berdasarkan *grey value*. Densitas relatif tulang pada defek kanan, menunjukkan nilai yang signifikan antara hari ke-7 dan ke-30 (Tabel 2). Pada defek kiri, densitas relatif tulang menunjukkan nilai yang signifikan antara hari ke-0 dan ke-90 (Tabel 2). Pada hari ke-7, terjadi peningkatan densitas relative, baik pada defek kanan maupun pada defek kiri. Hal ini disebabkan oleh adanya proses peradangan. Densitas relatif defek kanan lebih tinggi dibandingkan dengan defek kiri. Hal ini



Gambar 2. Ukuran defek tibia kanan dan kiri pada domba lokal (*Ovis aries*) yang diimplan scaffold 3D bifasik kalsium fosfat alginat

Tabel 3 Densitas relatif otot peri implan pada defek tibia kanan dan kiri pada domba lokal (*Ovis aries*) yang diimplan scaffold 3D bifasik kalsium fosfat alginat

Waktu pengamatan (Hari ke -)	Densitas relatif otot peri implan (<i>arbitrary unit/AU</i>)	
	Kanan	Kiri
0	1,36 ± 0,09 ^a	1,08 ± 0,11 ^a
7	1,61 ± 0,24 ^a	1,24 ± 0,10 ^a
30	1,62 ± 0,68 ^a	1,27 ± 0,41 ^a
60	1,35 ± 0,15 ^a	1,32 ± 0,28 ^a
90	1,25 ± 0,11 ^a	1,20 ± 0,03 ^a

Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan nilai berbeda nyata ($p < 0.05$)

disebabkan oleh adanya kerusakan tulang akibat defek ditambah dengan bahan implan yang mengisi defek. Menurut McGavin dan Zachary, (2007) pada saat peradangan berproses terjadi akumulasi cairan berupa eksudat, akumulasi sel peradangan. Menurut Thrall (2013) cairan atau jaringan lunak, transudat atau eksudat serta tulang lunak dapat menghasilkan gambaran radiografi abu-abu. Densitas kelompok cairan, lebih kecil dibandingkan tulang namun lebih besar dibandingkan lemak (Thrall 2013). Menurut Marsell dan Einhorn (2011) pada kerusakan tulang, dapat terjadi reaksi peradangan akut berupa akumulasi cairan peradangan dan migrasi sel radang terjadi dalam waktu 24–72 jam. Hal ini menyebabkan pada hari ke-7 tidak menunjukkan nilai densitas relatif yang signifikan jika dibandingkan dengan hari ke-0.



Gambar 3. Densitas relatif tulang pada defek tibia kanan dan kiri pada domba lokal (*Ovis aries*) yang diimplan scaffold 3D bifasik kalsium fosfat alginat

Penurunan densitas relatif defek kanan pada hari ke-30, menyerupai pola hasil pengujian bioaktivitas implan BKF dalam *Simulated Body Fluid* (SBF). Perendaman BKF pada hari ke-7 mengalami peningkatan konsentrasi kalsium dalam SBF, kemudian turun pada hari ke-30 dan meningkat kembali pada hari ke-60 (Marliani 2015). Rendahnya nilai densitas relatif tulang terjadi karena rendahnya *grey value* defek dan tingginya *grey value* tulang non defek. Menurut Castilho *et al.* (2014) *remodeling* tulang yang ditanam BKF terjadi secara sempurna melalui terdegradasinya TKF diikuti dengan aliran kalsium dari TKF dan cairan tubuh untuk membentuk endapan sekitar lapisan apatit. Berdasarkan hal ini, kemungkinan terjadi aliran besar kalsium dari bahan implan untuk membentuk lapisan apatit di sekitar tulang. Hal ini menyebabkan berkurangnya densitas defek.

Densitas relatif tulang tibia kiri menunjukkan nilai satu pada hari ke-90 (Gambar 3). Nilai satu menandakan bahwa defek menunjukkan absorpsi yang sama dengan tulang non defek. Hal ini menunjukkan bahwa defek pada tibia kiri menunjukkan persembuhan sempurna.

Densitas Relatif Otot Peri Implan

Penilaian terhadap densitas relatif otot peri implan dilakukan untuk melihat persembuhan jaringan sekitar defek. Perbandingan densitas antara peri implan dengan otot digunakan untuk mengetahui reaksi jaringan sekitar terhadap bahan implan. Densitas relatif otot peri implan baik pada defek kanan maupun kiri tidak menunjukkan adanya nilai yang signifikan (Tabel 3).



Gambar 4. Densitas relatif otot peri implan pada defek tibia kanan dan kiri pada domba lokal (*Ovis aries*) yang diimplan scaffold 3D bifasik kalsium fosfat alginat

Tidak adanya nilai yang signifikan pada defek kanan dengan kiri mengindikasikan bahwa bahan implan diterima dengan baik oleh tubuh. Seluruh nilai densitas relatif otot peri implan lebih dari satu. Hal ini menunjukkan bahwa *grey value* otot peri implan lebih besar dibandingkan *grey value* otot. Menurut Einhorn dan Gerstenfeld (2015) reaksi pembentukan kalus dapat terjadi pada lokasi jarak antar tulang atau jalur fraktur. Pembentukan kalus diawali dengan akumulasi fibroblast. Akumulasi ini tidak mengikuti margin tulang, sehingga pada awal pembentukan kalus, terlihat penonjolan di sekitar defek. Hal inilah yang menyebabkan area peri implan menunjukkan peningkatan *grey value*. Nilai densitas relatif otot peri implan menunjukkan penurunan baik pada kaki kanan dan kiri, seiring dengan laju persembuhan (Gambar 4). Hal ini terjadi karena adanya proses *remodeling*. Proses ini terjadi melalui pembentukan pembuluh darah, diikuti dengan berkurangnya matriks tulang, sehingga penonjolan akan berkurang (Einhorn dan Gerstenfeld, 2015; Marsell dan Einhorn, 2011).

Evaluasi Radiografi

Berdasarkan ketiga parameter yang diamati pada hasil radiografi lokasi defek tibia kiri dan kanan, bahan implan dinilai kurang mampu menginduksi pembentukan tulang baru. Hal ini dapat teramati pada ukuran defek dan densitas relatif tulang. Ukuran defek kontrol yang lebih kecil pada akhir pengamatan menunjukkan bahwa proliferasi jaringan dan persembuhan lebih cepat terjadi, dibandingkan pada defek perlakuan. Demikian pula dengan adanya densitas relatif tulang pada defek kontrol yang hampir sama dengan tulang non defek pada akhir pengamatan menunjukkan densitas defek yang sama dengan tulang non defek. Hal ini juga menandakan bahwa defek kontrol telah terisi dengan material yang sama padatnya dengan tulang non defek. Berdasarkan hal ini, maka diperlukan kembali evaluasi terhadap ukuran poros dan perbandingan komposit dalam bahan implan, di samping itu, bahan implan terbukti tidak menunjukkan reaksi perlawanan dari jaringan sekitar implan. Hal ini dapat diamati dari nilai densitas relatif otot peri implan yang sama dengan jaringan di area non defek. Hasil ini menunjukkan bahwa bahan yang digunakan sebagai komposisi implan tidak berbahaya dan biokompatibel.

SIMPULAN

Berdasarkan pengamatan radiologi, kontrol menunjukkan persembuhan yang lebih baik dibandingkan perlakuan. Bahan implan dinilai kurang mampu menginduksi osteogenesis, namun bersifat biokompatibel dengan jaringan sekitar

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Institut Pertanian Bogor atas pendanaan dalam penelitian ini melalui Program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (PUPT) tahun ke-2, tahun anggaran 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. 2012. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng* 40(5): 363-408.
- Bruzauskaite I, Bironaite D, Bagdonas E, Bernotiene E. 2015. Scaffold and cells for tissue regeneration: Different scaffold pore size- different cells effect. *Cytotechnology* 68: 355-369
- Castilho M, Moseke C, Ewald A, Gbureck U, Groll J, Pires I, Teâmar J, Vorndran E. 2014. Direct 3D powder printing of biphasic calcium phosphate *scaffold* for substitution of complex bone defect. *Biofabrication* 6: 1-12.
- Chen YJ, Pao JI, Chen CS, Chen YC, Chang CC, Hung FM, CHang CH. 2015. Evaluation of new biphasic calcium phosphate bone substitute: Rabbit femur defect model and preliminary clinical result. *J Med Biol Eng* 37: 85-93
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC. 2015. Fracture healing: mechanism and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 11(1): 45-54.
- Gamblin AL, Brennan MA, Renaud A, Yagita H, Lezot F, Heymann D, Trichet V, Layrolle P. 2014. Bone tissue formation with human

- mesenchymal stem cells and biphasic calcium phosphate ceramics: the local implication of osteoclasts and macrophages. *Biomaterials* 35: 9660–9667.
- Gao C, Peng S, Feng P, Shuai C. 2017. Bone biomaterials ad interactions with stem cells. *Bone Res* 5(17059): 1-33
- Geiger M, Blem G, Ludwig A. 2016. Evaluation of imageJ for relative bone density measurement and clinical application. *J Oral Health Craniofac Sci* 1: 12-21.
- Ghiasi M, Chen J, Vaziri A, Rodrigues EK, Nazariana A. 2017. Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods. *Bone Rep* 6: 87-100.
- Hamish RD, Butterworth SJ. 2000. *A Guide to Canine and Feline Orthopaedic Surgery*. Iowa (US). Blackwell Sc.
- Marliani. 2015. Pengujian bioaktivitas perancah berpori *biphasic calcium phosphate* sebagaimaterial pengganti tulang pada domba [Tesis]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Marsell R, Einhorn TA. 2011. The biology of fracture healing. *Injury* 46(2): 551-555.
- McGavin MD, Zachary JE. 2007. *Pathologic Basis Veterinary Disease*. 4th ed. Missouri (US). Elsevier.
- Morgan EF, Giacomo AD, Gerstenfeld LC. 2014. Overview of fracture healing and its assessment. *Methods Mol Biol* 1130: 13-31
- Plumb DC. 2008. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. 6th ed. Iowa (US): Blackwell.
- Ramay HRR, Zhang M. 2004. Biphasic calcium phosphate nanocomposite porous scaffolds for load-bearing bone tissue engineering. *Biomaterials* 25: 5171-5180.
- Thrall DE. 2013. *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*. 6th ed. Carolina (US). Elsevier Inc.
- Walsh WR, Oliver RA, Christou C, Lovric V, Walsh ER, Prado GR, Haider T. 2017. Critical size bone defect healing using collagen-calcium phosphate bone graft materials. [internet]. doi:10.1371/journal.pone.0168883. 12(1): 1-21
- Yu X, Tang X, Gohil SV, Laurencin CT. 2015. Biomaterials for bone regenerative engineering. *Adv Healthc Mater* 4(9): 1268-1285
- Zhao MD, Huang JS, Zhang ZC, Gui KK, Xiong M, Yin P, Yuan FL, Cai GP. 2016. Construction of rasial defect models in rabbits to determine the critical size defect [internet]. doi: 10.1371/journal.pone.0146301. 11(1): 1-15.