


**FABRIKASI DAN PENCIRIAN HIDROGEL  
KARRAGEENAN/GELATIN DITAUTSILANG  
GENIPIN DIMUATKAN DENGAN SEKRETOM  
FIBROBLAS HIDUNG UNTUK KEGUNAAN  
DALAM MODEL IN VITRO EPITELIUM  
SALURAN PERNAFASAN**



**NASHIHAH BINTI AB KARIM**

**UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA**

 <b>UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA</b> <i>The National University of Malaysia</i>	<b>UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07</b>	<b>No. Semakan: 02</b>	<b>Tarikh Kuat Kuasa: 27/01/2026</b>
	<b>BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS/DISERTASI SELEPAS PEMBETULAN</b> <b>FORM AND CHECKLIST OF AMENDED THESIS/DISSERTATION SUBMISSION</b>		

**F. KELULUSAN DEKAN/PENGARAH / APPROVAL FROM DEAN/DIRECTOR**

Tandatangan: <i>Signature</i>		Tarikh: 24/4/26. <i>Date</i>
Nama dan Cap Rasmi: <i>Name and Official Stamp</i>	<b>PROFESOR DATO' DR MARINA MAT BAKI</b> <b>MB (UKM), MS ORL-HNS (UKM), PhD (UCL)</b> <b>Dekan Fakulti Perubatan</b> <b>Pakar Perunding Kanan ORL-HNS</b> <b>Universiti Kebangsaan Malaysia</b>	

**G. PERAKUAN TESIS/ DISERTASI SARJANA / DOKTOR FALSAFAH (CERTIFICATION OF MASTER'S / DOCTORAL THESIS / DISSERTATION)**

Nama penuh pengarang <i>(Author's Full Name)</i>	NASHIHAH BINTI AB KARIM		
No. Pendaftaran Pelajar <i>(Student's Registration No.)</i>	P114776	Sesi Akademik <i>(Academic Session)</i>	2025/2026
Tajuk Tesis / Disertasi <i>(Thesis / Dissertation Title)</i>	FABRIKASI DAN PENCIRIAN HIDROGEL KARRAGEENAN/GELATIN DITAUTSILANG GENIPIN DIMUATKAN DENGAN SEKRETOM FIBROBLAS HIDUNG UNTUK KEGUNAAN DALAM MODEL IN VITRO EPITELIUM SALURAN PERNAFASAN		

Semua tesis/disertasi dan penerbitan berkaitan hasil penyelidikan pelajar adalah tertakluk kepada Dasar Harta Intelek Universiti Kebangsaan Malaysia.  
*All theses/ dissertations and publications relating to the research work of a student are subject to the Intellectual Property Policy of Universiti Kebangsaan Malaysia.*

Saya mengaku bahawa tahap akses tesis/disertasi ini sebagai (\*Tandakan ✓ dalam kotak bagi maklumat yang berkaitan; tandakan satu (1) kotak di bawah sahaja):  
*I hereby declare the level of access for this thesis/dissertation as follows (tick ✓ the relevant box below; tick only one option).*

Pilihan Tahap Akses <i>Access Level Selection</i>		Tafsiran Tahap Akses Tesis/Disertasi <i>Definition of Thesis/Dissertation Access Level</i>
<input type="checkbox"/>	<b>RAHSIA (CONFIDENTIAL)</b>	Mengandungi maklumat rahsia sepertimana yang diperuntukan bawah Akta Rahsia Rasmi 1972. <i>Contains classified information as stipulated under the Official Secrets Act 1972.</i>
<input type="checkbox"/>	<b>TERHAD (RESTRICTED)</b>	Mengandungi maklumat yang hanya boleh diakses oleh pihak yang mempunyai kebenaran atau keperluan tertentu untuk mengetahuinya yang ditentukan oleh organisasi/ badan di mana penyelidikan dijalankan. <i>Contains information that may only be accessed by parties with specific authorization</i>



UKM-SPKPPP-PT(PdP)-05-AK04-BO07

No. Semakan: 02

Tarikh Kuat Kuasa:  
27/01/2026**BORANG DAN SENARAI SEMAK PENYERAHAN TESIS/DISERTASI  
SELEPAS PEMBETULAN  
FORM AND CHECKLIST OF AMENDED THESIS/DISSERTATION  
SUBMISSION**

<input type="checkbox"/>	<b>AKSES TERBUKA (OPEN ACCESS)</b>	<p><i>or a defined need to know, as determined by the organization or body where the research is conducted.</i></p> <p>Tesis/disertasi versi akhir dalam format PDF yang boleh diakses secara percuma secara dalam talian dan bebas dari isu hak cipta dan pelesenan <i>The final version of the thesis/dissertation in PDF format that is freely accessible online and free from copyright and licensing issues.</i></p> <p>Kementerian Pendidikan Tinggi melalui surat bertarikh 27 Mac 2025 memutuskan bahawa kebenaran akses tesis / disertasi dalam borang serahan akses terbuka ditentukan oleh penyelia (bukan pelajar). <i>The Ministry of Higher Education, through a letter dated 27 March 2025, has decided that permission for thesis / dissertation access in the open access submission form shall be determined by the supervisor (not the student).</i></p>
<input type="checkbox"/>	<b>EMBARGO</b>	<p>Tempoh masa di mana akses kepada tesis/disertasi disekat (ditutup) selama dua (2) tahun atas sebab-sebab tertentu sebagai contoh kerahsiaan atau hak cipta. Tesis/disertasi akan berstatus akses terbuka selepas tamat tempoh embargo. <i>The period during which access to the thesis/dissertation is restricted for two (2) years due to specific reasons, such as confidentiality or copyright. The thesis/dissertation will be granted open-access status upon the expiry of the embargo period.</i></p>

<b>PENGESAHAN PELAJAR (STUDENT VERIFICATION)</b>	<b>PENGESAHAN PENYELIA (SUPERVISOR VERIFICATION)</b>	
 <b>TANDATANGAN PELAJAR (STUDENT'S SIGNATURE)</b>	 <b>TANDATANGAN PENYELIA / PENERUSI JK SISWAZAH (SUPERVISOR'S / CHAIRPERSON SUPERVISION COMMITTEE SIGNATURE)</b>	
Nama Pelajar ( <i>Student name</i> ): NASHIHAH BINTI AB KARIM No. Pendaftaran Pelajar ( <i>Student's Registration No.</i> ) P114776  Tarikh: 20/4/26 ( <i>Date</i> )	Nama Penyelia / Pengerusi JK Siswazah : ( <i>Supervisor's / Chairperson Supervision Committee Name</i> )  Tarikh: ( <i>Date</i> )	<b>PROF. MADYA DR. YOGESHWARAN LOKANATHAN</b> Pensyarah Universiti DS14 Jabatan Kejuruteraan Tisu dan Perubatan Regeneratif (DTERM) Fakulti Perubatan Universiti Kebangsaan Malaysia  22/04/2026

FABRIKASI DAN PENCIRIAN HIDROGEL KARRAGEENAN/GELATIN  
DITAUTSILANG GENIPIN DIMUATKAN DENGAN SEKRETOM FIBROBLAS  
HIDUNG UNTUK KEGUNAAN DALAM MODEL  
IN VITRO EPITELIUM SALURAN PERNAFASAN



NASHIHAH BINTI AB KARIM

TESIS YANG DIKEMUKAKAN UNTUK MEMPEROLEH  
IJAZAH SARJANA SAINS PERUBATAN

FAKULTI PERUBATAN  
UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA  
KUALA LUMPUR

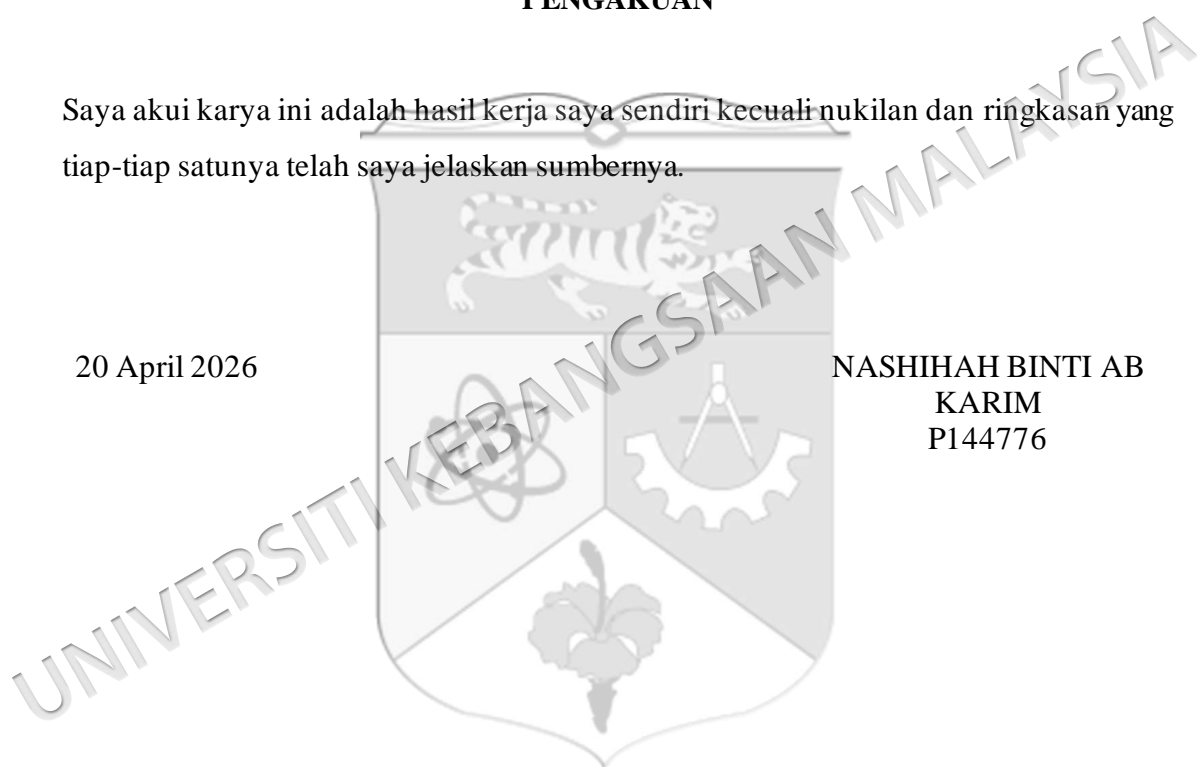
2026

## PENGAKUAN

Saya akui karya ini adalah hasil kerja saya sendiri kecuali nukilan dan ringkasan yang tiap-tiap satunya telah saya jelaskan sumbernya.

20 April 2026

NASHIHAH BINTI AB  
KARIM  
P144776



## PENGHARGAAN

Segala puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan kekuatan, kesehatan dan kesabaran dalam menyelesaikan tesis ini. Tanpa pertolongan-Nya, mustahil saya dapat menyelesaikan penelitian ini dengan baik.

Ucapan terima kasih yang tidak terhingga ditujukan kepada Kementerian Pendidikan Tinggi Malaysia (KPT) atas pembiayaan melalui Geran Penyelidikan Fundamental (FRGS) FRGS/1/2020/SKK0/UKM/02/7 yang telah membolehkan kajian ini dilaksanakan dengan lancar.

Saya juga ingin merakamkan penghargaan kepada Fakulti Perubatan dan Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM), Pusat Pengurusan Penyelidikan dan Instrumentasi (CRIM), UKM atas kemudahan fasiliti makmal, kepakaran akademik, serta sokongan teknikal yang amat bernilai dalam pelaksanaan eksperimen dan analisis data.

Tidak dilupakan juga kepada pihak KPJ Ampang Puteri Specialist Hospital, khususnya kepada semua kakitangan dan kolaborator yang telah memberikan kerjasama dalam aspek klinikal dan sokongan teknikal yang amat membantu, terutamanya dalam pengambilan dan pemrosesan sampel kajian.

Saya ingin menyampaikan rasa terima kasih yang mendalam kepada penyelia utama saya, Prof Madya Dr Yogeswaran, penyelia Bersama, Prof Madya Dr Mohd Fauzi Mh Busra dan Dr Nadhratunnaim Mubarak yang telah memberikan arahan, bimbingan, dukungan selama proses penyusunan tesis ini. Kesabaran dan dedikasi beliau dalam memberikan saran sangat berharga bagi saya.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada ahli kumpulan saya iaitu Firdaus yang telah meluangkan waktu dan tenaga untuk memberikan masukan serta pengetahuan yang bermanfaat bagi kelancaran penelitian ini.

Tidak lupa, saya juga berterima kasih kepada seluruh pensyarah di Jabatan Kejuruteraan Tisu Perubatan Regeneratif (DTERM) yang telah memberikan ilmu dan pengalaman berharga selama masa pengajian saya.

Saya sangat bersyukur atas dukungan yang tidak ternilai dari kedua orang tua saya, serta keluarga besar saya. Mereka selalu memberikan doa, semangat, dan dukungan moral yang luar biasa selama ini.

Akhirnya, saya ucapkan terima kasih kepada semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu, tetapi turut memberikan dukungan dalam bentuk apa pun, sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

## ABSTRAK

Penyakit pernafasan telah menyebabkan impak kesihatan global yang besar. Model epitelium in vitro saluran udara dengan persamaan mikroфизиologi yang tinggi sangat diperlukan untuk lebih memahami penyakit dan jangkitan di saluran pernafasan. Objektif utama kajian ini adalah untuk merekabentuk dan mencirikan hidrogel karrageenan/ gelatin yang dimuatkan dengan sekretom fibroblas hidung sebagai bahan kerangka biobahan yang berpotensi dalam pembinaan epitelium saluran pernafasan. Penyakit pernafasan mempunyai impak kesihatan global yang besar, memerlukan model epitelium saluran pernafasan in vitro yang lebih baik. Walau bagaimanapun, cabaran masih wujud dalam mereka bentuk kerangka, peniruan ECM, dan pembezaan mukosiliar. Permasalahan kajian ini adalah untuk mengenal pasti biobahan yang sesuai, menilai hidrogel gelatin-karrageenan, dan menentukan sama ada sekretom fibroblas hidung boleh meningkatkan penghantaran faktor pertumbuhan dan penjanaan tisu. Kajian ini bertujuan untuk mereka bentuk dan mencirikan hidrogel karrageenan/gelatin yang dimuatkan dengan sekretom fibroblas hidung untuk kejuruteraan epitelium saluran pernafasan. Hidrogel diperbuat daripada kappa karrageenan (karr) dan gelatin bovina (gel). Dalam kajian ini, kepekatan 2% bagi karr dan 5% bagi gel digunakan dan dicampurkan bersama dengan nisbah karr/gel (v/v) yang berbeza iaitu (6:4) dan (8:2). Kemudian, hidrogel berasaskan karr/gel telah ditaut-silang dengan genipin dan dimuatkan dengan sekretom fibroblas hidung. Selepas fabrikasi, sifat fiziko-kimia, mekanikal dan biologikal seperti bioterurai, keporosan, sudut sentuhan air, kadar penghantaran wap air (WVTR), mampatan dan daya tahan, pembengkakan, nanostruktur, kekuatan tegangan dan bioserasi dicirikan. Didapati bahawa, kumpulan C8G2Gnp0.4 menunjukkan ciri-ciri fizikal yang dipertingkatkan dengan ketara; tidak mengalami penguraian walaupun selepas 4 minggu dan menunjukkan sifat hidrofilik yang baik (sudut sentuhan air:  $\leq 90^\circ$ ). Rintangan penguraian dan kekuatan mekanikal hidrogel telah dipertingkatkan melalui pautan silang genipin. Selain itu, hidrogel C8G2Gnp0.4 juga menyokong penempelan sel fibroblas manusia dan telah dipilih sebagai kumpulan yang sesuai untuk dimuatkan dengan sekretom. Hidrogel C8G2Gnp0.4 mengekalkan pelepasan sekretom secara berkala pada kepekatan 100 $\mu$ g/ml dalam tempoh 24 jam dan jangka hayat C8G2Gnp0.4 telah terbiourai sepenuhnya di bawah penyimpanan -80oC pada hari ke-47. Kesimpulannya, sekretom yang dimuatkan dengan hidrogel hibrid mempunyai sifat fiziko-kimia dan mekanikal yang sesuai sebagai perancah biobahan yang berpotensi untuk kegunaan dalam model in vitro epitelium saluran pernafasan pada masa hadapan. Kajian ini berjaya dalam membentuk hidrogel yang boleh bertindak sebagai kerangka fungsian kerana keupayaan mereka untuk mengekalkan struktur 3D dan memberikan sokongan mekanikal kepada sel-sel.

**FABRICATION AND CHARACTERISATION OF GENIPIN-CROSSLINKED  
CARRAGEENAN-GELATINE HYDROGEL INCORPORATED WITH NASAL  
FIBROBLAST SECRETOME FOR FUTURE USE IN AIRWAY EPITHELIUM IN  
VITRO MODEL**

**ABSTRACT**

Respiratory diseases have a major global health impact, requiring improved in vitro airway epithelial models. However, challenges remain in scaffold design, ECM replication, and mucociliary differentiation. The research problem is to identify the suitable biomaterials, evaluating gelatin–carrageenan hydrogels and to determine whether nasal fibroblast secretome can enhance growth factor delivery and tissue regeneration. This study aimed to design and characterize a carrageenan/gelatin hydrogel loaded with nasal fibroblast secretome for airway epithelium engineering. The hydrogel was made from kappa-carrageenan (karr) and bovine gelatin (gel). In this study, a concentration of 2% for karr and 5% for gel was used, and both were mixed at different karr/gel (v/v) ratios, namely (6:4) and (8:2). The karr/gel-based hydrogel was then crosslinked with genipin and loaded with nasal fibroblast secretome. After fabrication, physicochemical, mechanical, and biological properties such as biodegradation, porosity, water contact angle, water vapor transmission rate (WVTR), compression and resilience, swelling, nanostructure, tensile strength, and biocompatibility were characterized. It was found that the C8G2Gnp0.4 group exhibited significantly enhanced physical properties; it did not undergo degradation even after 4 weeks and showed good hydrophilic properties (water contact angle:  $\leq 90^\circ$ ). The degradation resistance and mechanical strength of the hydrogel were improved through genipin crosslinking. In addition, the C8G2Gnp0.4 hydrogel also supported human fibroblast cell adhesion and was selected as the appropriate group for secretome loading. The C8G2Gnp0.4 hydrogel maintained a sustained release of secretome at a concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$  within 24 hours, and its shelf life showed complete degradation under  $-80^\circ\text{C}$  storage on day 47. In conclusion, the secretome-loaded hybrid hydrogel possessed suitable physicochemical and mechanical properties as a potential biomaterial scaffold for future use in in vitro airway epithelial models. This study successfully developed a hydrogel that can act as a functional framework due to its ability to maintain a 3D structure and provide mechanical support to cells.

## KANDUNGAN

		<b>Halaman</b>
<b>PENGAKUAN</b>		ii
<b>PENGHARGAAN</b>		iii
<b>ABSTRAK</b>		iv
<b>ABSTRACT</b>		v
<b>KANDUNGAN</b>		vi
<b>SENARAI JADUAL</b>		ix
<b>SENARAI ILUSTRASI</b>		x
<b>SENARAI SINGKATAN</b>		xii
<b>BAB I</b>	<b>Pengenalan</b>	
1.1	Pendahuluan	1
1.2	Objektif Kajian	4
1.2.1	Objektif Umum	4
1.2.2	Objektif Khusus	4
1.3	Persoalan Kajian	5
1.4	Skop Kajian	5
1.5	Signifikan Kajian	5
1.76	Hipotesis	6
<b>BAB II</b>	<b>Kajian Kepustakaan</b>	
2.1	Kecederaan Epitelium Saluran Udara	6
2.2	Model In Vitro	10
2.3	Biobahan	11
2.4	Karrageenan	16
2.5	Gelatin	19
2.6	Genipin	20
2.7	Karrageenan-Gelatin bersama Genipin	22
2.8	Sekretom	23

	2.8.1 Komponen Sekretom Fibroblas hidung	23
2.9	Kajian Lepas dalam Pembentukan Biobahan/Kerangka dalam Model In Vitro Epitelium Saluran Pernafasan	28

### **BAB III                   METODOLOGI KAJIAN**

3.1	Kelulusan Etika	34
3.2	Carta Alir Kajian	34
3.3	Bahan	36
	3.3.1 Fabrikasi Hidrogel	36
	3.3.2 Reagen Pengkulturan Sel	36
	3.3.3 Alat	36
3.4	Fabrikasi Hidrogel Karragenan/Gelatin	37
3.5	Pengumpulan Sekretom	38
	3.5.1 Pengkulturan Sel dan Pencirian	38
	3.5.2 Pengumpulan Media Kondisi (CM)	39
3.6	Bioterurai	40
3.7	Keporosan	41
3.8	Sudut Sentuhan	42
3.9	Nisbah Pembengkakan	43
3.10	Nanostruktur	44
3.11	Kadar Penghantaran Wap Air (WVTR)	45
3.12	Mampatan dan Daya Tahan	46
3.13	Tempoh Gelasi	47
3.14	Bioserasi	47
	3.14.1 Penempelan Sel	47
3.15	Kadar pelepasan	48
3.16	Penilaian Jangka Hayat-Simpanan	49
3.17	Analisis Statistik	49

### **BAB IV                   HASIL KAJIAN**

4.1	Penampilan Kasar Hidrogel	50
4.2	Kadar Bioterurai	52
4.3	Keporosan	53

4.4	Sudut sentuhan	54
4.5	Nisbah Pembengkakan	55
4.6	Nanostruktur	56
4.7	Kadar Penghantaran Wap Air (WVTR)	59
4.8	Mampatan dan Daya Tahan	60
4.9	Tempoh Gelasi	61
4.10	Penempelan Sel, Kadar Pelepasan dan Penilaian Jangka Hayat Simpanan	62
<b>BAB V PERBINCANGAN</b>		
5.1	Perbincangan	66
<b>BAB VI KESIMPULAN</b>		
6.1	Kesimpulan	80
6.2	Kekurangan dan Cadangan Penambahbaikan	82
<b>RUJUKAN</b>		85
<b>LAMPIRAN</b>		
Lampiran A	Kelulusan etika	97
Lampiran B	Kelulusan Penyelidikan	99
Lampiran C	Penerbitan	101
Lampiran D	Sijil	103

**SENARAI JADUAL**

<b>No. Jadual</b>		<b>Halaman</b>
Jadual 2.1	Ringkasan kajian sifat fizikokimia, mekanikal dan biologi biobahan/perancah dalam model epitelium saluran pernafasan in vitro.	31
Jadual 4.1	Formulasi Hibrid Hidrogel	51



## SENARAI ILLUSTRASI

<b>No Rajah</b>		<b>Halaman</b>
Rajah 2.1	Fungsi penghalang, pelepasan mukosiliari, dan pertahanan perumah dalam epitelium saluran pernafasan biasa	8
Rajah 2.2	Mekanisma Gelasi Karrageenan	17
Rajah 2.3	Mekanisma Gelatin	20
Rajah 2.4	Proses penghasilan dan fungsi genipin	21
Rajah 3.1	Carta Aliran Kajian	36
Rajah 3.2	Fabrikasi hidrogel karrageenan gelatin yang ditaut silang dengan genipin	39
Rajah 3.3	Ilustrasi skematik uji kaji sedut sentuhan	44
Rajah 3.4	Ilustrasi skematik menunjukkan metodologi penempelan sel di atas permukaan hibrid hidrogel	49
Rajah 4.1	Penampilan Kasar Hidrogel	52
Rajah 4.2	Kadar bioterurai hidrogel	54
Rajah 4.3	Keporosan hidrogel karr-gel	55
Rajah 4.4	Bacaan sudut sentuhan	56
Rajah 4.5	Bacaan nisbah pembengkakan	57
Rajah 4.6	Ultra-struktur pandangan keratan rentas kumpulan C8G2Gnp0.3	58
Rajah 4.7	Ultra-struktur pandangan keratan rentas kumpulan C6G4Gnp0.4	58
Rajah 4.8	Ultra-struktur pandangan keratan rentas kumpulan C8G2Gnp0.4	59
Rajah 4.9	Saiz Pori hidrogel	59
Rajah 4.10	Kadar WVTR	60
Rajah 4.11	Peratus Kemampatan dan Daya Tahan	61

Rajah 4.12	Tempoh gelasi	63
Rajah 4.13	Penempelan sel	64
Rajah 4.14	Kadar pelepasan fibronektin daripada karr-gel + CM	65
Rajah 4.15	Penilaian jangka hayat simpanan	66



## SENARAI SINGKATAN

### Penggunaan Dalam Bahasa Inggeris

TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$	HBECs	Human bronchial epithelial cells
FGFs	Fibroblast Growth Factors	Calu-3	Human lung cancer cell line
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	hBSMCs	Human bronchial smooth muscle cells
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
EGF	Epidermal Growth Factor	HA	Hyaluronic acid
BEAS-2B	Normal human bronchial epithelial cell line	PMMA	Poly methylmethacrylate
HRECs	Human respiratory epithelial cells	NFCM	Nasal Fibroblast Condition Medium
hBEpiCs	Human bronchial epithelial cells	DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
hBFs	Human bronchial Fibroblast	AECM	Airway epithelium cell medium
hBM-MSCs	Human bone marrow mesenchymal stem cells	DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
PTBE	Porcine tracheobronchial epithelial cell	ELISA	Enzyme-linked Imunosrbent Assays
RECs	Respiratory epithelial cells	FBS	Fetal bovine serum
MRC-5	Human diploid cell line	EDTA	Asid ethylenediamintetraasetik

NaCl	Sodium Klorida	PCL	Polycaprolactone
PBS	Phosphate buffered saline	TIPS	Thermoresponsive injectable polyethercarbonate
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease	PM	Particulate matter
ECM	Extracellular matrix	WCA	Water contact angle
WVTR	Water Vapour Transmission Rate	SEM	Scanning electron microscopy



## **BAB I**

### **PENGENALAN**

#### **1.1 PENDAHULUAN**

Penyakit pernafasan mempunyai impak kesihatan global yang besar. Menurut Forum Persatuan Pernafasan Antarabangsa, penyakit pernafasan ini adalah antara salah satu punca utama penyakit serius dan kematian di dunia. Terdapat kira-kira 65 juta orang di seluruh dunia mengalami penyakit paru-paru obstruktif kronik (*COPD*) tahap sederhana hingga teruk, manakala sekitar 334 juta lagi menghidap asma. Pada tahun 2015, terdapat 10.4 juta kes tuberkulosis (TB) yang dilaporkan. Selain itu, jangkitan saluran pernafasan akut merupakan antara tiga punca utama kematian dan kecacatan bagi semua peringkat umur. Kanser paru-paru pula menyebabkan kematian kira-kira 1.6 juta orang setiap tahun. Justeru, tisu turbinat hidung berkait rapat dengan penyakit-penyakit tersebut kerana ia membentuk sebahagian daripada sistem "saluran pernafasan bersatu" yang berterusan dan berkongsi struktur epitelium dan tindak balas keradangan yang serupa dengan saluran pernafasan bawah. Di samping itu, turbinat membantu menapis dan menyesuaikan udara yang dihirup, manakala apabila berlakunya sebarang keradangan atau kerosakan, ia akan membenarkan kemasukan alergen, pencemar, dan karsinogen yang lebih besar ke dalam paru-paru, menyumbang kepada perkembangan dan pemburukan asma dan COPD serta meningkatkan risiko kanser. Selain itu, disebabkan kesamaan selnya dan kemudahan capaian, tisu turbinat hidung banyak digunakan dalam penyelidikan dan kejuruteraan tisu sebagai model untuk mengkaji keradangan saluran pernafasan, mekanisme penyakit, dan intervensi terapeutik untuk penyakit pernafasan ini. Menurut kajian Kinga et al., 2018, epitelium saluran udara merupakan salah satu kawasan utama yang terdedah kepada kesan toksik dalam sistem pernafasan, di mana ia berperanan sebagai benteng pelindung bagi melindungi saluran pernafasan. Oleh itu, pembangunan model *in vitro* yang meniru struktur dan fungsi bahagian paru-paru ini

telah menjadi keutamaan utama dalam penyelidikan. Selain itu, epitelium salur udara yang kebanyakannya terdiri daripada sel-sel silia dan sel-sel perembes banyak membantu untuk melindungi dan melembapkan lendir pulmonari (Ghanem et al., 2021). Di samping itu, dalam kajian epidemiologi dan eksperimen menyatakan bahawa penyedutan bahan zarah (*particulate matter*, PM) telah dikaitkan dengan morbiditi dan kematian gangguan kardiopulmonari seperti penyakit kronik paru-paru obstruktif (COPD), asma, kanser paru-paru, radang paru-paru, penyakit jantung iskemia dan strok (Fiordelisi et al., 2017). Ini kerana hidung adalah organ utama hubungan antara mikroba alam sekitar, bahan pencemar dan alergen. Oleh itu, selepas kecederaan yang dialami, epitelium salur udara haruslah diperbaiki dan diperbaharui dengan segera untuk memulihkan integriti dan fungsinya (Iosifidis et al., 2016).

Biobahan memainkan peranan penting dalam pembangunan model *in vitro* terutamanya dalam aplikasi kejuruteraan tisu di mana kerangka bertindak sebagai templat tiga dimensi untuk menyokong lekatan sel, proliferasi, dan pembezaan (Zhang et al., 2018). Sifat fisiokimia dan mekanikal biobahan termasuk keporosan, bioterurai, dan keanjalan adalah penting dalam meniru persekitaran matriks ekstraselular (ECM) asli dan menggalakkan pembentukan tisu yang berfungsi (Nashihah et al., 2023). Antara kebanyakan biobahan, polimer semula jadi telah mendapat perhatian yang ketara disebabkan oleh biokeserasian dan bioaktivitinya. Karrageenan dan gelatin adalah biobahan semula jadi yang banyak dikaji dalam pembuatan hidrogel. Gabungan karrageenan dan gelatin telah terbukti menghasilkan rangka kerja komposit dengan sifat struktur dan biologi yang dipertingkatkan sesuai untuk aplikasi kejuruteraan tisu (Rabiatul et al., 2024). Untuk meningkatkan lagi kestabilan dan kekuatan mekanikal hidrogel ini, genipin sebagai agen pengikat silang yang diperolehi semula jadi selalunya digunakan kerana sitoksisitinya yang rendah (Ng et al., 2023). Selain daripada reka bentuk perancah, penggabungan faktor biologi telah terbukti menjadi salah satu strategi utama untuk meningkatkan penjanaan tisu. Sekretom yang terdiri daripada molekul bioaktif seperti faktor pertumbuhan, sitokin, dan vesikel ekstraselular, memainkan peranan penting dalam komunikasi antara sel dan pembaikan tisu (D'Arrigo et al., 2019).

Pembangunan dan perkembangan dalam pengkulturan pelbagai jenis sel model *in vitro* untuk digunakan dalam sistem epitelium salur udara bawah dan atas merupakan cabaran utama dalam pendekatan kejuruteraan tisu. Oleh itu, kajian ini akan dilakukan untuk memperbaiki kajian terdahulu dengan mencipta hidrogel yang mampu digunakan dalam epitelium saluran udara. Keupayaan sel untuk membina tisu dan mengekalkan fungsi khusus tisu *in vitro* secara kritikal bergantung kepada pelbagai isyarat topografi dan biokimia. Corak topografi baru-baru ini mendapat banyak minat sebagai cara untuk mengawal nasib sel, memahami interaksi sel-mikro, dan menyelesaikan masalah besar ubat regeneratif, pada masa yang sama ia menyediakan isyarat topografi yang boleh mempengaruhi cytoskeleton membina semula atau mencetuskan reseptor membran sel (Ke Zang et al., 2019). Seperti kajian terdahulu, mikrotopologi telah menunjukkan bahawa ia boleh mengawal pertumbuhan sel-sel saraf dan tisu-tisu serta ia juga boleh merangsang percambahan dan pembezaan sel (Fang et al., 2021).

Oleh itu, jenis topografi sesuai yang dibuat pada biobahan boleh digunakan untuk mengawal pengembangan pembezaan dan proliferasi sel (G. Doron dan J. S. Temenof, 2021; J. Minguela et al., 2021). Selain itu, isyarat biokimia boleh dikategorikan mengikut keturunan sel sasaran yang akan mengalami pembezaan. Ia merangkumi komponen sama ada larut atau pegun seperti sitokin, faktor morfogenetik, pelbagai faktor pertumbuhan, protein matriks ekstrasel (ECM) serta molekul kecil yang berupaya meresap ke dalam sel (Barui et al., 2018). Pada masa ini, model *in vitro* dengan persamaan mikrofisiologi yang tinggi serta keupayaan mensimulasikan model penyakit tidak mudah didapati kerana kekurangan pengetahuan mengenai keperluan topografi dan biokimia untuk pembentukan epitelium saluran udara *in vitro* dengan fungsi mukosiliari. Justeru, kajian ini cenderung untuk mengkaji beberapa permasalahan seperti berikut :

- 1) Model epitelium saluran pernafasan yang sedia ada kekurangan kerangka biomimetik yang meniru kedua-dua sifat struktur dan biokimia ECM.
- 2) Karrageenan memberikan kekuatan tetapi kekurangan lekatan sel, manakala gelatin menyokong lekatan tetapi mempunyai kestabilan yang lemah.

- 3) Kajian terhad membincangkan pengoptimuman hidrogel karrageenan–gelatin untuk sifat fisikokimia dan mekanikal yang ideal.
- 4) Penggunaan sekretom fibroblas hidung sebagai komponen bioaktif masih kurang diterokai.
- 5) Terdapat data yang tidak mencukupi mengenai biokeserasian, kadar pelepasan fibronektin dan jangka hayat hidrogel yang dimuatkan dengan sekretom.

## **1.2 OBJEKTIF KAJIAN**

Kajian ini memfokuskan dalam dalam pembangunan perancah biobahan yang baharu bagi kegunaan di dalam model in vitro epitelium saluran pernafasan.

### **1.2.1 Objektif Umum**

Untuk fabrikasi dan mencirikan hidrogel karagenan/gelatin yang dimuatkan dengan sekretom fibroblas hidung sebagai perancah yang berpotensi untuk pembinaan epitelium saluran pernafasan.

### **1.2.2 Objektif Khusus**

- i) Mengfabrikasikan dan mencirikan sifat fiziko-kimia formulasi hidrogel karagenan/gelatin yang ditaut-silang dengan genipin.
- ii) Menentukan kekuatan mekanikal dan sifat biologi iaitu bioserasi sekretom fibroblas hidung yang dimuatkan dalam hidrogel komposit.
- iii) Menilai penguraian dan kadar pelepasan ubat (drug) iaitu bronektin daripada perancah hidrogel.

## **1.3 PERSOALAN KAJIAN**

Bagaimana prestasi hidrogel karrageenan–gelatin ditaut silang dengan genipin yang disertakan dengan medium berkeadaan fibroblas hidung (NFCM) dari segi pembuatan,

sifat biologi, kestabilan, dan tingkah laku pelepasan terkawal untuk potensi aplikasi dalam kejuruteraan tisu epitelium saluran pernafasan?

#### **1.4 SKOP KAJIAN**

Kajian ini memfokuskan kepada pembuatan, pengoptimuman dan pencirian hidrogel karragenan–gelatin ditaut silang dengan genipin yang dipadankan dengan medium berkeadaan fibroblas hidung (NFCM). Skop kajian ini merangkumi penyediaan bahan, penilaian struktur, dan penilaian biologi sistem hidrogel.

Pencirian fizikokimia termasuk penilaian bioterurai, keporosan, sedut sentuhan, nisbah pembengkakan, mikro-struktur, mampatan, daya tahan, WVTR dan tempoh gelasi. Penilaian biologi menumpukan pada penilaian keserasian hidrogel dengan sel. Selain itu, kestabilan dan jangka hayat sistem hidrogel dikaji di bawah keadaan penyimpanan yang terkawal.

Kajian ini terhad kepada analisis eksperimen secara *in vitro* dan tidak termasuk ujian *in vivo*. Hidrogel dinilai sebagai rangka kerja berpotensi untuk pembangunan model epitel saluran pernafasan masa depan dan bukan untuk penggunaan klinikal secara langsung.

#### **1.5 SIGNIFIKAN KAJIAN**

Kajian ini penting dalam bidang biobahan dan kejuruteraan tisu saluran pernafasan kerana ia memperkenalkan sistem hidrogel pelbagai fungsi yang menggabungkan biobahan struktur dengan medium kondisinya yang aktif secara biologi. Integrasi karagenan dan gelatin menyediakan sistem kerangka yang seimbang di mana karagenan menyumbang kepada kestabilan mekanikal dan penghidratan, manakala gelatin menyediakan komponen yang menyokong penempelan dan proliferasi. Penggunaan medium yang dikondisikan fibroblas hidung (NFCM) menambah komponen isyarat yang relevan secara biologi yang mengandungi faktor pertumbuhan, sitokin dan vesikel ekstraselular yang meniru persekitaran mikro saluran pernafasan semula jadi. Gabungan ini dijangka meningkatkan tindak balas selular dan menggalakkan regenerasi tisu dengan cara yang lebih menyerupai keadaan *in vivo*. Selain itu, penilaian keserasian

biologi memastikan bahawa sistem hidrogel sesuai untuk aplikasi biologi, manakala analisis pelepasan terkawal memberikan pandangan tentang penghantaran berterusan molekul bioaktif. Penilaian jangka hayat dan kestabilan juga penting untuk menentukan kebolegunaan praktikal dan potensi sistem hidrogel tersebut. Secara keseluruhan, kajian ini menyumbang kepada pembangunan rangka biomimetik canggih untuk pemodelan epitel saluran pernafasan yang boleh digunakan dalam penyelidikan penyakit pernafasan, saringan ubat, dan perubatan regeneratif.

### 1.6 HIPOTESIS

Ciri fisiokimia yang optimum bagi sekretom fibroblas hidung yang dimuatkan dalam hidrogel kolagen/gelatin adalah penting untuk pembangunan masa depan model epitel saluran pernafasan *in vitro*.



## **BAB II**

### **KAJIAN KEPUSTAKAAN**

Bab ini membentangkan gambaran keseluruhan yang menyeluruh mengenai konsep asas dan bahan yang berkaitan dengan kajian ini. Ia bermula dengan perbincangan mengenai kecederaan epitel saluran pernafasan, menekankan punca, mekanisme, dan implikasinya terhadap kesihatan pernafasan. Bab ini kemudian memperkenalkan model *in vitro* sebagai alat penting untuk mengkaji pembaikan dan regenerasi epitel saluran pernafasan di bawah keadaan makmal yang terkawal. Seterusnya, bab ini meneroka peranan biobahan dalam kejuruteraan tisu, termasuk gambaran keseluruhan pelbagai jenis biobahan dan penggunaannya. Penekanan khusus diberikan kepada bahan tertentu seperti karagenan, gelatin, dan genipin, diikuti dengan perbincangan terperinci mengenai formulasi dan sifat-sifat rangka kerja karagenan–gelatin yang disalurkan silang dengan genipin. Selain itu, konsep sekretom diperkenalkan, dengan penekanan pada komponen dan kepentingan biologi sekretom fibroblas hidung dalam mempromosikan pembaikan dan regenerasi tisu. Akhir sekali, bab ini mengulas kajian-kajian terdahulu yang berkaitan dengan biobahan dan pembentukan kerangka dalam model epitelium pernafasan *in vitro*, menyediakan asas dan konteks untuk penyelidikan semasa.

#### **2.1 KECEDERAAN EPITELIUM SALURAN UDARA**

Paru-paru sentiasa terdedah kepada jangkitan, toksin, dan bahan pencemar bawaan udara yang menekankan homeostasis. Akibatnya, gangguan pernafasan menyebabkan beban penyakit global yang besar dan merupakan antara punca utama kematian di seluruh dunia. Penyakit pernafasan boleh menjejaskan komponen sistem pernafasan

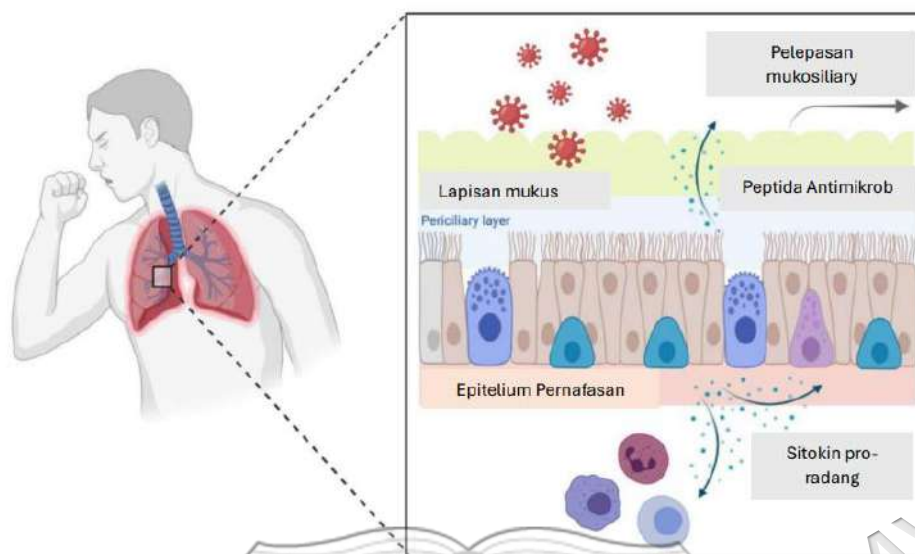
termasuk saluran udara atas dan bawah, paru-paru dan struktur yang berkaitan. Justeru, sistem pernafasan adalah rangkaian yang kompleks dan penting dalam tubuh manusia, khusus untuk pertukaran oksigen dan karbon dioksida dan menjadikan sistem yang paling penting untuk mengekalkan kehidupan yang sihat. Proses di dalam sistem pernafasan melibatkan epitelium saluran udara sebagai komponen utama untuk memastikan pertukaran gas berlaku secara efisien di samping berfungsi sebagai penghalang terhadap sebarang ancaman (Russell RJ et al., 2024).

Epitelium saluran udara adalah sistem kompleks jenis sel yang berbeza yang berfungsi bersama-sama dengan sistem imun untuk membentuk penghalang utuh, yang menghalang zarah asing dan patogen daripada memasuki kompartmen submukosa (Raby et al., 2023). Epitelium tersebut terdapat di sepanjang saluran pernafasan merangkumi hidung, trakea, bronkus, dan bronkiol yang menjadikannya sebagai penghalang pelindung serta pemisah persekitaran luaran secara fizikal, yang terdiri daripada udara dan zarah. Seterusnya, epitelium saluran udara tidak terdiri daripada hanya satu jenis sel. Ia terdiri daripada pelbagai jenis sel, termasuk sel terselium, sel goblet, sel basal dan lain-lain (Ruyssveldt et al., 2021). Setiap jenis sel memainkan peranan tertentu dalam mengekalkan fungsi dan integriti epitelium. Tambahan pula, epitelium tersebut dilengkapi dengan sel penghasil silia dan lendir. Silia yang dihasilkan membantu dalam pergerakan lendiran, zarah dan mikroorganisma yang terperangkap untuk keluar dari saluran pernafasan dan dikenali sebagai pelepasan mukosiliari seperti di Rajah 2.1 (Bustamante-Marin & Ostrowski, 2017).

Kebanyakan penyakit pernafasan yang dialami oleh seseorang individu adalah disebabkan berlakunya kecederaan epitelium saluran udara. Kecederaan tersebut berpunca daripada lapisan sel yang melapisi saluran pernafasan termasuk hidung, trakea, bronkus dan bronkiol telah mengalami kerosakan (Raby et al., 2023). Jangkitan pernafasan yang disebabkan oleh virus atau bakteria boleh mencetuskan keradangan dan menjejaskan fungsi penghalang perlindungan epitelium saluran udara (Oliva & Terrier, 2021). Selain itu, pendedahan kepada perengsa alam sekitar seperti bahan pencemar, asap dan bahan kimia boleh menyumbang kepada kecederaan (Kharrazian, 2021; Nishida & Yatera, 2022). Individu yang mempunyai alahan mungkin mengalami kerosakan epitelium sebagai tindak balas kepada alergen, yang membawa kepada

keradangan dan peningkatan kerentanan (Goleva et al., 2019; Hellings & Steelant, 2020). Di samping itu juga, kecederaan mekanikal yang timbul daripada prosedur perubatan atau trauma juga boleh menyebabkan bahayanya kepada epitelium saluran udara (Prokakis et al., 2014; Struck et al., 2018).

Kesan daripada kecederaan epitelium saluran udara sangatlah penting untuk dititikberatkan. Fungsi penghalang di dalam epitelium yang telah terjejas akan meninggalkan kesan kepada sistem pernafasan untuk lebih mudah terdedah kepada kemasukan patogen dan perengsa seterusnya meningkatkan lagi risiko jangkitan. Keradangan yang berlaku secara berterusan menjadi titik permulaan kepada tindak balas terhadap kecederaan dan kemungkinan boleh berkembang menjadi kronik. Akibatnya, keadaan tersebut menjadi penyumbang kepada berlakunya penyakit asma atau bronkitis kronik (Accordini et al., 2015). Sementara itu, kegagalan fungsi mukosiliari boleh mengakibatkan kerosakan pada silia yang menghalang keberkesanan pelepasan lendir dan puing dari saluran udara (Gudis et al., 2012; Tilley et al., 2015). Epitelium saluran udara yang cedera mungkin menunjukkan sensitiviti yang meningkat dan membawa kepada tindak balas yang berlebihan terhadap rangsangan alam sekitar. Walaupun epitelium memulakan proses pembaikan untuk menjana semula sel-sel yang rosak, kecederaan berterusan atau berulang boleh menyebabkan pembentukan semula yang tidak normal dan memberi kesan kepada ketidakstabilan struktur saluran udara. Oleh itu, pemahaman terhadap pelbagai punca di sebalik dan akibat kecederaan epitelium saluran udara adalah penting untuk merumuskan intervensi khusus yang bertujuan untuk mencegah dan merawat penyakit pernafasan. Rajah 2.1 menggambarkan organisasi struktur dan mekanisme pertahanan epitelium saluran pernafasan. Permukaan saluran pernafasan dilapisi dengan lapisan mukus yang berfungsi sebagai penghalang fizikal untuk menangkap patogen dan zarah yang disedut. Di bawah lapisan ini, lapisan perisilia memudahkan pergerakan silia yang terkoordinasi, membolehkan pembersihan mukosilia untuk mengeluarkan mikroorganisma yang terperangkap. Epitelium pernafasan terdiri daripada pelbagai sel khusus, termasuk sel bersilia dan sel sekretori, yang menyumbang kepada pemeliharaan homeostasis saluran pernafasan. Selain itu, sel epitelium mengeluarkan peptida antimikrob dan sitokin pro-inflamasi yang memainkan peranan penting dalam tindak balas imun bawaan dan pengawalan keradangan.



Rajah 2.1 Rajah menunjukkan fungsi penghalang, pelepasan mukosiliari, dan pertahanan perumah dalam epitelium saluran pernafasan biasa (Love, M.E. et al., 2022)

## 2.2 MODEL IN VITRO

Model *in vitro* merujuk kepada kaedah makmal terkawal yang membolehkan pemerhatian ke atas tisu, sel atau proses biologi di luar konteks biologi asal. Antara kaedah yang kebiasannya digunakan adalah di dalam cawan petri, tabung uji atau plat teaga (*multiwell*). Model *in vitro* digunakan secara meluas dalam penyelidikan untuk menyiasat fungsi selular, interaksi molekul, tindak balas ubat dan mekanisme penyakit dalam persekitaran yang dipermudahkan dan terkawal (Lumin Wang et al., 2024). Model-model ini menyediakan landasan yang berharga untuk memahami proses biologi yang kompleks tanpa kebolehubahan dan kebimbangan etika yang berkaitan dengan kajian *in vivo* (dalam organisma hidup) (Nikolic M et al., 2018).

Model epitelium saluran pernafasan *in vitro* ialah sistem berasaskan makmal yang digunakan untuk mengkaji struktur dan fungsi epitelium pernafasan, tisu yang melapisi saluran pernafasan dalam paru-paru dan saluran hidung. Model ini biasanya terdiri daripada sel epitelium yang dikultur pada membran telap, membolehkan ia menjadi lapisan pseudostratif yang meniru epitelium saluran

pernafasan semula jadi (M Kerry. et al., 2011; Vrana et al., 2013). Model-model ini digunakan untuk mengkaji proses selular seperti pembersihan mukosiliari, fungsi penghalang dan tindak balas kepada patogen, alergen atau bahan pencemar (Hewitt, R.J et al., 2021). Dengan mereplikasi keadaan saluran pernafasan, termasuk pendedahan kepada udara pada permukaan apikal dan medium nutrien pada bahagian basolateral (kultur antara muka udara-cecair), model ini menawarkan landasan yang relevan secara fisiologi untuk memahami penyakit saluran pernafasan seperti asma, penyakit paru-paru obstruktif kronik (COPD) dan fibrosis sistik.

Tambahan pula, model-model ini digunakan dalam pembangunan ubat untuk menilai keberkesanan dan keselamatan rawatan yang disedut serta untuk mengkaji mekanisme yang mengakibatkan kerosakan dan perbaikan epitelium. Model epitelium saluran pernafasan secara *in vitro* menawarkan landasan terkawal dan konsisten untuk mengkaji bagaimana sel saluran pernafasan bertindak balas terhadap rangsangan yang berbeza, menjadikannya sumber penting untuk penyelidikan pernafasan. Memandangkan epitelium saluran pernafasan bertindak sebagai barisan pertahanan pertama terhadap patogen dan alergen yang disedut, model *in vitro* ini membolehkan para penyelidik membuat kajian bagaimana sel epitelium bertindak balas terhadap rangsangan keradangan, membebaskan sitokin dan berinteraksi dengan sel imun (Mark D. Et al., 2014; Sujin et al., 2021; William et al., 2022). Di samping itu juga, inovasi ini melangkaui budaya 2D tradisional dan menawarkan model yang lebih menyerupai kepada struktur, fungsi dan interaksi selular saluran pernafasan *in vivo*. Antara model yang banyak diguna pakai dalam kajian adalah model Saluran Udara 3D, Air-Liquid Interface (ALI) Cultures (rujuk Rajah 2.2), Organoid Saluran Pernafasan, Sistem Ko-Kultur, Saluran Udara Mikrofluidik pada Cip, Model Khusus Pesakit dan Sistem Saringan High-throughput (Can Li et al., 2024; Thimoty et al., 2023; Yin et al., 2022).

### **2.3 BIOBAHAN**

Dalam gabungan dinamik antara biologi dan sains bahan, biobahan kini muncul sebagai salah satu teknologi dan inovasi yang baharu. Umumnya, biobahan adalah sesuatu bahan yang direka bentuk untuk berinteraksi dengan sistem biologi dan berfungsi secara khusus dalam badan atau digunakan bersama dengan entiti biologi (National Institute

of Biomedical Imaging and Bioengineering, 2022). Bahan-bahan yang digunakan untuk menghasilkan biobahan ini boleh diperolehi daripada sumber semula jadi atau disintesis di makmal. Seterusnya, biobahan dicirikan oleh keupayaan tertentu untuk mempamerkan sifat yang disesuaikan seperti biokeserasian, bioterurai dan kekuatan mekanikal (Singvi et al., 2019). Kini, pelbagai bidang termasuk perubatan, pergigian dan juga bioteknologi mengaplikasikan penggunaan biobahan secara meluas. Dalam bidang perubatan, biobahan adalah penting untuk membangunkan implan perubatan, prostetik dan sistem penghantaran *drug* (S. Bhat et al., 2013). Selain itu, dalam bidang kejuruteraan tisu, biobahan memainkan peranan penting dalam mewujudkan perancah dan matriks untuk menyokong pertumbuhan sel dan pertumbuhan semula (Aishwara et al., 2024). Kajian dan penggunaan biobahan telah menyumbang dengan ketara kepada kemajuan dalam penjagaan kesihatan dan teknologi di samping menawarkan penyelesaian inovatif untuk meningkatkan dan memulihkan fungsi biologi.

Biobahan memainkan peranan penting dalam kejuruteraan tisu, di mana ia bertindak sebagai satu alat asas untuk pertumbuhan semula dan pembaikan tisu yang telah rosak (Esther et al., 2014). Kejuruteraan tisu adalah pendekatan interdisipliner yang menggabungkan prinsip-prinsip dari sains bahan, biologi, dan kejuruteraan untuk membangunkan strategi untuk memulihkan, mengekalkan atau meningkatkan fungsi tisu biologi. Dari sudut lain, kepentingan biobahan dalam kejuruteraan tisu terletak pada keupayaannya untuk meniru matriks ekstraselular semulajadi (ECM), rangkaian kompleks protein dan molekul lain yang memberikan sokongan struktur dan biokimia kepada sel-sel dalam tisu hidup (Khanna et al., 2021). Biobahan direka untuk meniru isyarat fizikal dan kimia yang terdapat dalam ECM dan secara tidak langsung mewujudkan persekitaran mikro yang menggalakkan penempelan, percambahan, dan pembezaan sel (Nicholas et al., 2020).

Terdapat beberapa parameter penting untuk menghasilkan biobahan yang terbaik dalam bidang kejuruteraan tisu. Antaranya ialah sifat biokeserasian biobahan terhadap sel. Biokeserasian merujuk kepada keupayaan sesuatu bahan untuk berinteraksi dengan tisu hidup atau organisma tanpa mencetuskan reaksi berbahaya (Huzum et al., 2021). Dalam proses reka bentuk biobahan, pematuhan terhadap aspek biokeserasian perlu diutamakan sebagai elemen teras bagi memastikan kualiti dan

keberkesanan biobahan tersebut dalam aplikasi kejuruteraan tisu. Ini kerana sifat biokeserasian memastikan penerimaan biobahan dalam tubuh badan sekaligus untuk mengelakkan daripada sebarang reaksi yang buruk (Mariani et al. 2019). Beberapa faktor menyumbang kepada biokeserasian sesuatu biobahan. Antaranya ialah komposisi bahan kimia tertentu boleh mencetuskan tindak balas imun atau tindak balas sitotoksik. Pengubahsuaian permukaan juga mempengaruhi peningkatan seperti penambahan bahan salutan dengan molekul bioaktif (Hu et al., 2023). Ini bertujuan untuk mencipta biobahan yang menyatu dengan persekitaran biologi serta menggalakkan interaksi positif dengan sel dan tisu.

Selain itu, ciri-ciri mekanikal yang disesuaikan membolehkan biobahan memberikan sokongan penting terutamanya dalam tisu *load-bearing*. Ciri-ciri mekanikal biomaterial merujuk kepada keupayaan mereka untuk menahan dan menghantar daya mekanikal dan sifat-sifat ini boleh disesuaikan untuk dimuatkan dengan keperluan khusus tisu yang berbeza dalam badan (Ozkhaya et al., 2016). Biobahan boleh direka dengan ciri-ciri mekanikal tertentu seperti keanjalan, kekakuan dan kekuatan untuk dijadikan sebagai alat pengganti atau sokongan kepada tisu asli (Wang et al., 2020). Penyesuaian biobahan melibatkan pemilihan atau mereka bentuk komposisi dan struktur biobahan untuk mencapai ciri-ciri mekanikal yang diperlukan. Sebagai contoh, untuk tisu *load-bearing* seperti tulang atau tulang rawan, biobahan perlu mempunyai gabungan kekuatan dan fleksibiliti yang boleh menahan daya mekanikal berulang tanpa menjejaskan integriti strukturnya (Thong & Jia., 2012). Dalam konteks kejuruteraan tisu, biobahan yang digunakan untuk aplikasi ini mesti mampu menahan beban di atasnya untuk mengelakkan kegagalan mekanikal atau kemerosotan fungsinya dari masa ke masa. Ciri-ciri mekanikal biobahan yang disesuaikan haruslah dipastikan agar dapat memberikan sokongan penting kepada tisu-tisu ini seterusnya menyumbang kepada fungsi dan kelanjutan umurnya.

Di samping itu juga, bioterurai adalah antara salah satu ciri penting biobahan yang memainkan peranan penting aplikasi bioperubatan. Konsep ini berpusat pada keupayaan biobahan untuk mengalami kerosakan atau kemerosotan secara beransur-ansur dari tempoh tertentu dan juga merupakan satu proses yang diselaraskan dengan kadar pertumbuhan semula tisu (Reddy et al., 2021). Bioterurai biobahan secara

beransur-ansur biasanya dibantu oleh proses semula jadi seperti tindak balas enzim, hidrolisis atau mekanisme biokimia lain (Bher et al., 2022). Apabila biobahan mengalami proses penguraian, ia mengeluarkan produk sampingan sama ada berlaku secara semula jadi di dalam badan atau dimetabolisme dengan mudah bagi meminimumkan risiko tindak balas yang buruk. Kelebihan sifat bioterurai terletak pada keupayaannya untuk memberikan sokongan sementara atau perancah untuk pertumbuhan semula tisu secara beransur-ansur. Selain itu, sifat bioterurai sesuatu biobahan memberikan manfaat kepada seseorang kerana dapat mengelakkan daripada menjalani prosedur pembedahan kali kedua (Sheikh et al., 2015). Oleh itu, penggabungan proses penguraian dengan penjanaan semula tisu menjamin bahawa tisu yang baru dapat dibangunkan secara beransur-ansur serta berfungsi dari masa ke masa.

Selepas itu, biobahan boleh direka bentuk dan diubah suai untuk melepaskan molekul bioaktif tertentu secara terkawal dan beransur-ansur. Kejuruteraan ini membolehkan peraturan kinetik pelepasan yang tepat, mempengaruhi tingkah laku selular dan memudahkan pertumbuhan semula tisu. Dengan menggabungkan molekul bioaktif secara strategik seperti faktor pertumbuhan, sitokin, atau molekul isyarat lain ke dalam matriks biobahan, para penyelidik dan saintis boleh mewujudkan persekitaran yang disesuaikan secara aktif bagi membimbing aktiviti selular di tapak implantasi (Nikolova et al., 2019). Pelepasan molekul bioaktif yang terkawal ini penting dalam menggalakkan tindak balas selular yang diinginkan seperti proliferasi, pembezaan dan migrasi sel yang merupakan proses penting bagi mewujudkan pertumbuhan semula tisu (Kim et al., 2016). Dalam pembangunan biobahan, keupayaan untuk melaraskan kinetik pelepasan secara terperinci merupakan aspek kritikal yang menentukan keberkesanan fungsi sesuatu bahan tersebut. Kawalan pada kadar pelepasan membolehkan biobahan melepaskan isyarat bioaktif secara berterusan dan setempat, meniru mekanisme penghantaran isyarat biologi semula jadi dalam tubuh (Lu et al., 2024; Garcia-Garcia et al., 2024). Tambahan pula, pendekatan ini meningkatkan kepada keupayaan biobahan untuk berinteraksi dengan persekitaran biologi dan memupuk tindak balas tisu yang lebih baik. Ia bukan sahaja meningkatkan keberkesanan terapeutik, malah mengekalkan mikropersekitaran yang sesuai untuk pertumbuhan dan pembezaan sel, menyokong aplikasi kejuruteraan tisu dan perubahan regeneratif (Zhang et al., 2024; Sen et al., 2025). Dengan memanfaatkan potensi kejuruteraan biobahan untuk memodulasi

tingkah laku selular melalui pelepasan terkawal, para penyelidik boleh membangunkan strategi terapeutik maju untuk kejuruteraan tisu, perubatan regeneratif dan aplikasi bioperubatan lain.

Dalam aplikasi kejuruteraan tisu, pemilihan jenis biobahan yang bersesuaian merupakan faktor penentu kejayaan pembentukan semula epitelium saluran pernafasan. Secara umumnya, biobahan boleh dibahagikan kepada biobahan semula jadi, sintetik dan hibrid. Biobahan semula jadi seperti kolagen, gelatin, asid hialuronik, kitisan dan matriks ekstraselular dinyahsel (*decellularized extracellular matrix, dECM*) sering menjadi pilihan kerana memiliki ciri bioaktif yang menyerupai matriks asal tisu, sekaligus menyokong lekatan, migrasi dan pembezaan sel epitelium (Garcia-Garcia et al., 2024; Lu et al., 2024). Penggunaan matriks dinyahsel juga membolehkan struktur tiga dimensi semula jadi saluran pernafasan dikekalkan, menjadikannya landasan yang relevan untuk regenerasi tisu (Zhang et al., 2024).

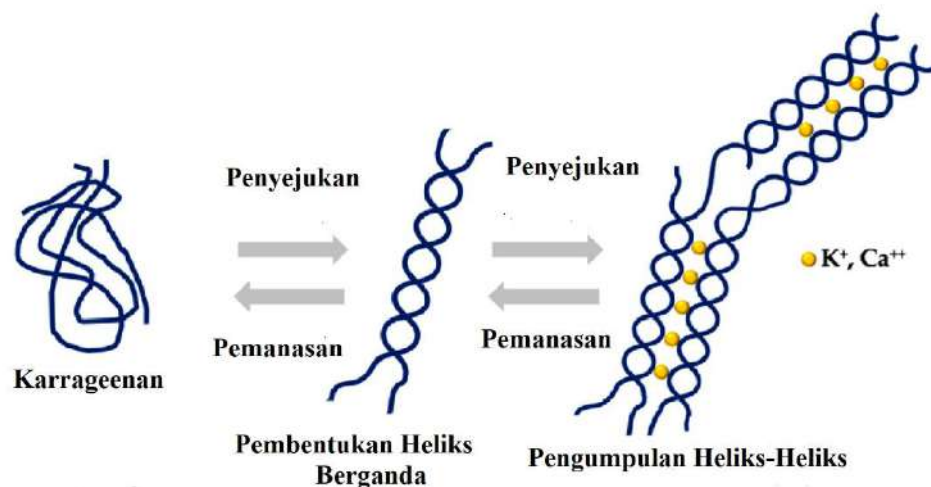
Selain itu, polimer sintetik seperti poli(asid laktik) (PLA), poli(asid glikolik) (PGA), poli(asid laktik-ko-glikolik) (PLGA), polikaprolakton (PCL) dan polietilena glikol (PEG) digunakan secara meluas kerana sifat mekanikalnya yang stabil, kadar penguraian yang boleh diubah suai, serta keboleh-prosesan yang baik melalui kaedah seperti electrospinning atau percetakan 3D (Sen et al., 2025). Walau bagaimanapun, biobahan sintetik sering digabungkan dengan komponen semula jadi untuk membentuk perancah hibrid yang menggabungkan kelebihan bioaktiviti tinggi dengan kekuatan mekanikal yang lebih baik. Sebagai contoh, gabungan kolagen dengan PLGA atau PCL dapat meningkatkan biofungsi perancah dan pada masa yang sama mengekalkan kestabilan struktur (Elsayed et al., 2022).

Terkini, pendekatan seperti penggunaan bio-dakwat berasaskan hidrogel untuk biopercetakan segmen trakea atau saluran udara turut diterokai dan membolehkan susunan sel epitelium saluran pernafasan dihasilkan secara lebih tepat (Liu et al., 2023). Oleh itu, reka bentuk dan pemilihan biobahan yang tepat, sama ada semula jadi, sintetik atau hibrid, adalah kritikal dalam memastikan persekitaran mikro yang kondusif bagi pembentukan semula epitelium saluran pernafasan yang berfungsi dengan baik.

## 2.4 KARRAGEENAN

Polisakarid ialah kelas karbohidrat kompleks dan merupakan biomolekul penting yang berperanan sebagai alat proses biologi dan aplikasi perindustrian. Selain itu, polisakarid terdiri daripada rantaian panjang molekul gula dan makromolekul ini berfungsi sebagai rizab tenaga kritikal, komponen struktur dalam dinding sel serta menjadi antara salah satu bahagian penting ECM. Alginat, agar dan agaros adalah salah satu polisakarid yang berasaskan rumpai laut yang paling banyak dan dikaji dengan baik (Jafari et al., 2022). Selain daripada itu, karageenan (karr) juga merupakan polisakarid yang diekstrak daripada rumpai laut. Dalam konteks semasa, karr yang terdapat dalam keluarga alga merah marin, muncul sebagai takungan polisakarid menarik yang dibezakan oleh struktur unik dan ciri-ciri fungsinya (Yegappan et al., 2018). Karr telah lama diterokai untuk pelbagai aplikasi terutamanya dalam bidang kejuruteraan tisu. Hal ini kerana, karr mempunyai beberapa ciri khusus yang menjadikannya amat berpotensi untuk digunakan dalam aplikasi kejuruteraan tisu.

Karrageenan terdiri daripada unit disakarida berulang  $\beta$ -D-galaktosa dan  $\alpha$ -D-galaktosa yang dihubungkan melalui ikatan glikosidik berselang-seli  $\beta(1\rightarrow4)$  dan  $\alpha(1\rightarrow3)$ . Strukturnya dicirikan oleh kehadiran kumpulan sulfat ( $-\text{OSO}_3^-$ ) pada pelbagai posisi sepanjang tulang belakang, yang memberikan cas negatif yang kuat, hidrofilik tinggi, dan aktiviti biologi. Dalam  $\kappa$ -karrageenan, salah satu bentuk yang paling banyak dikaji, residu  $\alpha$ -D-galaktosa mengandungi jambatan 3,6-anhidrogalaktosa yang meningkatkan kekakuan rantai dan menggalakkan pembentukan gel. Perbezaan dalam darjah dan kedudukan sulfasi menghasilkan jenis karrageenan yang berbeza ( $\kappa$ ,  $\iota$ , dan  $\lambda$ ), yang berbeza dalam kekuatan gel dan tingkah laku reologi. Secara keseluruhan, struktur kimia karrageenan terutamanya corak sulfasi dan kandungan anhidrogalaktosanya menentukan sifat fizikokimia dan kesesuaian untuk aplikasi perubatan seperti hidrogel dan kejuruteraan tisu (Necas & Bartosikova, 2013; Liu et al., 2023).



Rajah 2.2

Imej ini menggambarkan mekanisme gelasi karrageenan, di mana polimer beralih dari struktur gelung rawak pada suhu tinggi kepada pembentukan heliks berganda yang tersusun semasa penyejukan. Penyejukan seterusnya menggalakkan pengumpulan heliks-heliks, yang membawa kepada pembentukan rangkaian gel tiga dimensi yang stabil. Proses ini distabilkan oleh kehadiran kation seperti K<sup>+</sup> dan Ca<sup>2+</sup>, yang bertindak sebagai jambatan ion antara heliks, meningkatkan kekuatan dan kestabilan rangkaian. Gelasi ini boleh diterbalikkan dengan haba, bermakna ia boleh kembali ke keadaan sol semasa dipanaskan dan membentuk gel semula semasa disejukan. (Sumber: E.M Pacheco et al., 2020)

Antara ciri khusus yang terdapat pada karr ialah biokeserasian. Umumnya, karr dianggap mempunyai sifat biokeserasian dan diterima dengan baik oleh tisu hidup tanpa menyebabkan reaksi buruk yang ketara. Ini dapat dibuktikan melalui sumber karr diperolehi, di mana karr wujud secara semula jadi yang diekstrak daripada rumput laut merah dan digunakan dalam diet tradisional selama berabad-abad (Necas et al., 2013). Ciri ini amat bermanfaat dalam pelbagai sektor seperti industri makanan dan farmaseutikal kerana karr digunakan di atas sifat serba bolehnya, termasuk sebagai agen penggegelan, penebalan dan juga penstabilan. Oleh kerana keupayaannya sebagai lengai kimia, karr tidak mengalami sebarang reaksi yang akan menghasilkan kesan sampingan yang berbahaya dan menjadi penyumbang kepada profil keselamatan secara keseluruhannya (Youenes et al., 2018). Karr juga diiktiraf secara umum sebagai selamat (*Generally Recognized as Safe - GRAS*) oleh pihak berkuasa kawal selia dan dianggap tidak mungkin menyebabkan kemudaratan di bawah penggunaan biasa dalam produk makanan (Liao et al., 2021). Potensi alergikunya yang juga terhad dan jarang

berlakunya tindak balas buruk membuktikan sifat keserasiannya dengan tubuh manusia (Mokhtari et al., 2021). Walaupun sesetengah individu mungkin sensitif terhadap karr, tindak balas alahan jarang berlaku. Kebanyakan tindak balas buruk yang berkaitan dengan karr adalah bersifat gastrousus dan sering dikaitkan dengan jumlah penggunaan yang lebih besar (Abud et al., 2024). Walaupun terdapat perbincangan berterusan mengenai potensi risiko penggunaan karr, bukti saintifik semasa secara konsisten menunjukkan ia bersifat biokeserasian dan selamat digunakan dalam pelbagai aplikasi pengguna (Vieira et al., 2023; Santos et al., 2022).

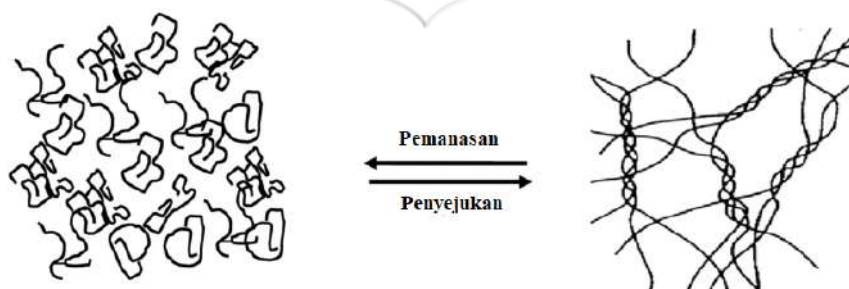
Seterusnya, karr terkenal dengan keupayaannya untuk membentuk gel atau dikenali sebagai sifat penggelan. Karr boleh didapati dalam pelbagai jenis dan masing-masing mempunyai ciri-ciri unik yang memberi kesan kepada kegunaannya. Antara jenis karr utama yang sering digunakan dalam industri dan penyelidikan ialah kappa karrageenan ( $\kappa$ -karr) yang mengandungi hanya satu kumpulan sulfat, iota karrageenan ( $\iota$ -karr) yang mengandungi dua kumpulan sulfat dan lambda karrageenan ( $\lambda$ -karr) yang mengandungi tiga kumpulan sulfat (Rupert et al., 2022; Subramanian & Varade, 2017).  $\kappa$ -karr dibezakan dengan keupayaannya untuk mencipta struktur gel yang kuat dan teguh. Karr, terutamanya,  $\kappa$ -karr menjalani proses dua langkah yang melibatkan peralihan gegelung ke helix apabila penyejukan berlaku diikuti oleh pengagregatan pergantungan kation (*cation-dependent*) antara helices, di mana kehadiran kation yang tertentu seperti kalium atau kalsium adalah sangat penting untuk proses penggelan berlaku secara berterusan (Manriquez-Hernandez, 2016).

## 2.5 GELATIN

Gelatin ialah satu jenis protein yang diperoleh daripada hidrolisis separa kolagen semulajadi yang terdapat dalam kolagen haiwan daripada kulit, rawan, tulang, dan tendon (Radhakrisnan et al., 2016). Gelatin dibentuk oleh ikatan peptida kovalen ( $-\text{CONH}-$ ) yang menghubungkan asid amino, manakala pelbagai kumpulan fungsi rantai sisi seperti amino ( $-\text{NH}_2$ ), karboksil ( $-\text{COOH}$ ), dan hidroksil ( $-\text{OH}$ ) tetap terdedah sepanjang rantai polimer (Song et al., 2024). Kumpulan fungsi ini membolehkan pembentukan ikatan hidrogen yang meluas, kelekatan air dan interaksi antara molekul, yang bertanggungjawab terhadap keupayaan gelatin membentuk gel dan sifat viskoelastiknya (Xu et al., 2025). Pengedaran berat molekul gelatin berbeza bergantung

pada sumber dan syarat pengekstrakannya (kolagen yang dirawat dengan asid atau alkali) akan menyebabkan perbezaan panjang rantai dan titik isoelektrik. Dalam aplikasi kejuruteraan tisu, kumpulan fungsi reaktif ini juga menjadikan gelatin sangat sesuai untuk pengubahsuaian kimia dan penyilangan contohnya dengan genipin untuk meningkatkan kestabilan mekanikal dan ketahanan penguraiannya (Zhang et al., 2024).

Gelatin sangat hidrofilik dan mempunyai sifat penghalang gas yang baik (K.Deshmuk et al., 2017). Semasa pautan silang gelatin, genipin digunakan sebagai reagen penghubung silang kerana kepada keupayaannya untuk meningkatkan sifat mekanikal dan mempunyai sifat bukan toksik (TH Nguyen et al., 2016). Seperti yang dilaporkan oleh (Nga T. et al., 2021), hydrogel gelatin yang mengandungi kepekatan genipin tertinggi mengekalkan daya proliferasi dan tidak mendorong kepada peningkatan dalam pengeluaran lima sitokin pro-radang iaitu TNF $\alpha$ , IL6, IP10, IL1 $\beta$  dan IFN $\beta$ . Selain itu, gelatin banyak digunakan sebagai polimer hidrogel berikutan sifat penghidratannya seperti pembengkakan dan keterlarutan; ciri-ciri proses penggelan seperti pembentukan gel, teksturisasi, penebalan, dan kapasiti pengikatan air; dan tingkah laku permukaan seperti pembentukan emulsi dan buih, penstabilan, lekatan dan kohesi, fungsi koloid pelindung, dan kapasiti pembentuk filem (Rashid et al., 2019). Ia juga sesuai untuk pelbagai aplikasi bioperubatan kerana biokeserasian, ketoksikan rendah, aktiviti antimikrob, dan keboleh bioterurai. Hidrogel yang berasaskan gelatin digunakan dalam penghantaran ubat (*drug delivery*) dan kejuruteraan tisu kerana kebolehan untuk menyokong lekatan dan proliferasi sel (Panupong et al., 2017).



Rajah 2.3

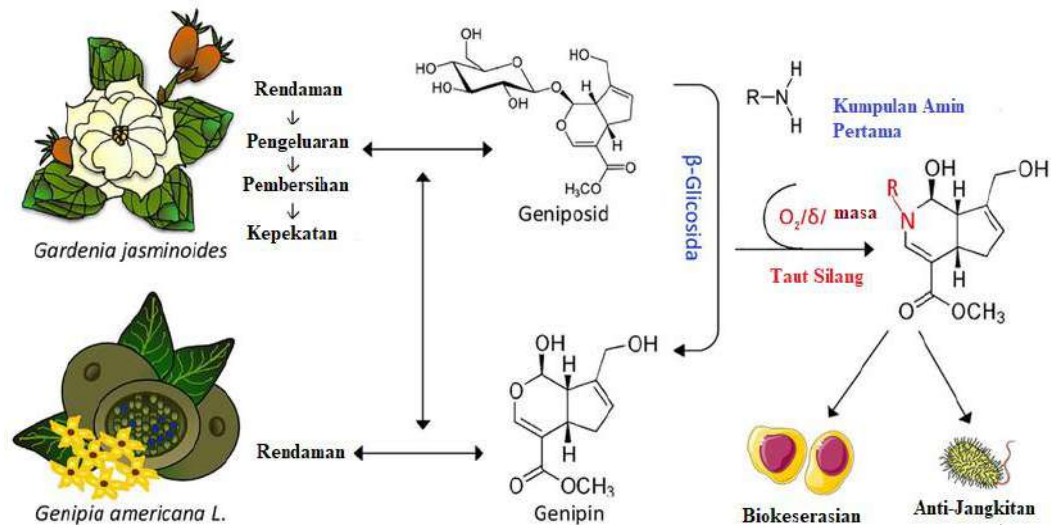
Ilustrasi gambar menunjukkan bahawa apabila bahan (polimer) dipanaskan, rantai molekul menjadi lebih longgar dan tidak teratur. Apabila disejukan semula, rantai tersebut akan menyusun diri dengan lebih teratur dan membentuk struktur yang lebih kuat serta stabil. (Sumber : Eysturskarð Jonhard, 2010).

## 2.6 GENIPIN

Genipin ialah agen penghubung silang semula jadi yang diperoleh daripada buah gardenia (*Gardenia jasminoides*) dan biasanya digunakan dalam bidang bioperubatan untuk menghubungkan silang biopolimer seperti kolagen, gelatin dan protein lain. Secara kimia, ia mempunyai formula molekul  $C_{11}H_{14}O_5$  dan berat molekul kira-kira 226.23 g/mol, dan ia tergolong dalam kelas monoterpenoid siklopenta[c]piran (iridoid) yang dicirikan oleh sistem cincin bisiklik terfusi. Strukturnya mengandungi sistem cincin dihidropiran yang sangat reaktif dengan pelbagai kumpulan hidroksil ( $-OH$ ) dan fungsi ester/lakton, yang menyumbang kepada polariti dan kelarutan airnya. Ciri penting dalam struktur genipin ialah kehadiran karbon olefin elektronik pada kedudukan C3, yang mudah mengalami serangan nukleofilik oleh kumpulan amina primer dalam protein seperti gelatin, yang membawa kepada pembentukan silang kovalen stabil dan rangkaian polimer berpigmen biru yang khas (Wahba, 2024; Xu et al., 2024; Manickam et al., 2014; Zhang et al., 2024).

Genipin telah banyak digunakan disebabkan sifat-sifat yang ada padanya seperti biokeserasian ketoksikan yang rendah dan keupayaan untuk membentuk pautan silang yang stabil dan kuat (Kildeeva et al., 2020). Ia memainkan peranan penting dalam mencipta hidrogel atau biobahan yang lebih tahan lama dan kukuh dari segi struktur. Genip yang akan menjadi agen taut silang menonjol sebagai pendekatan terkemuka untuk fabrikasi biomatriks, direka untuk mengatasi batasan ini dan mengoptimumkan hasil klinikal masa depan, terutamanya dalam menggalakkan penyembuhan luka (Nike et al., 2022).

Selain itu, ia menawarkan banyak kelebihan kepada biomatriks yang difabrikkan, termasuklah kekuatan mekanikal dan kekuatan yang dipertingkatkan, kestabilan haba yang lebih baik, mengurangkan keterlarutan apabila terdedah kepada enzim dan persekitaran cecair, dan kapasiti bengkak serta peningkatan keanjalan dan kelikatan (A.Mior et al., 2019; Busra et al., 2017). Walaupun ia mempunyai banyak kebaikan, kawalan yang teliti terhadap kepekatan genipin dan faktor persekitaran diperlukan untuk mengoptimumkan pautan silang tanpa menjejaskan fleksibiliti atau biokeserasian.



Rajah 2.4

Imej ini menerangkan proses penghasilan dan fungsi genipin sebagai agen taut silang. Bahan mentah diperoleh daripada tumbuhan *Gardenia jasminoides* dan *Genipa americana* melalui proses pengekstrakan seperti maceration, purification, dan concentration untuk mendapatkan sebatian geniposide. Geniposide kemudiannya ditukarkan kepada genipin melalui tindakan enzim  $\beta$ -glikosidase. Genipin seterusnya bertindak balas dengan kumpulan amina primer ( $-NH_2$ ) dalam biopolimer melalui kehadiran oksigen dan masa, membentuk ikatan silang (crosslinking). Proses ini menghasilkan struktur polimer yang lebih kuat dan stabil, serta meningkatkan sifat biokeserasian dan memberikan kesan anti-infeksi (Sumber : Neri Numa et al., 2017).

## 2.7 KARRAGEENAN-GELATIN BERSAMA GENIPIN

Gabungan gelatin dan karrageenan menawarkan kelebihan sinergi dengan menggabungkan sifat melekat daripada gelatin dengan ciri bioaktif dan hidrofilik karrageenan. Rangka komposit berasaskan polimer ini menunjukkan tingkah laku pembengkakan, sifat mekanikal dan fungsi biologi yang lebih baik berbanding sistem komponen tunggal. Sebagai contoh, rangka hibrid  $\kappa$ -karrageenan/gelatin telah menunjukkan hasil yang positif dalam menyokong proliferasi sel dan pembentukan matriks ekstraselular serta menunjukkan potensi baik untuk aplikasi tisu regeneratif (Liu et al., 2023).

Walaupun mempunyai ciri-ciri yang menjanjikan, beberapa jurang penyelidikan masih wujud. Terdapat kekurangan protokol pembuatan yang diseragamkan dan kajian *in vivo* yang terhad menilai prestasi jangka panjang serta biokeserasian rangka

karrageenan–gelatin–genipin. Selain itu, pengoptimuman nisbah polimer dan keadaan penyilang-taut memerlukan kajian lanjut untuk mencapai keseimbangan ideal antara kekuatan mekanikal dan prestasi biologi.

Secara ringkas, gelatin yang disilang dengan genipin telah disahkan secara meluas sebagai sistem rangka yang bioserasi dan kukuh dari segi mekanikal, manakala karrageenan menawarkan bioaktiviti tambahan dan sifat meniru ECM. Integrasi bahan-bahan ini ke dalam satu rangka komposit tunggal mewakili pendekatan yang menjanjikan tetapi kurang diterokai dalam kejuruteraan tisu, memerlukan kajian lanjut untuk merealisasikan sepenuhnya potensinya dalam perubatan regeneratif.

## 2.8 SEKRETOM

Sekretom didefinisikan sebagai set lengkap molekul bioaktif yang dilepaskan oleh sel termasuk sitokin, faktor pertumbuhan, kemokin, lipid, dan vesikel ekstraselular (EVs)—telah muncul sebagai strategi tanpa-sel yang menjanjikan dalam kejuruteraan tisu dan perubatan regeneratif (Kim et al., 2022). Menurut kajian Da Silva et al., 2025, dalam beberapa tahun kebelakangan ini, sekretom yang diperoleh daripada sel stem mesenkimal (MSC) telah mendapat perhatian yang ketara kerana ia telah menghasilkan banyak kesan terapeutik sel stem di samping mengelakkan daripada kesan yang berkaitan dengan pemindahan sel hidup, seperti penolakan imun, tumorigenisiti, dan sekatan regulatori. Sekretom ini menjalankan kesan regeneratifnya terutamanya melalui mekanisme isyarat parakrin, yang mengawal keradangan, menggalakkan angiogenesis, menghalang apoptosis, dan merangsang proliferasi sel serta pengubahsuaian matriks ekstraselular (D'Arrigo et al., 2019). Antara komponennya, EV seperti ekzosom memainkan peranan utama dalam komunikasi antara sel dengan memindahkan protein dan asid nukleik berfungsi ke sel sasaran, dengan itu memodulasi proses pembaikan tisu (Zhang et al., 2025). Kajian pra-klinikal telah menunjukkan bahawa terapi berasaskan sekretom dapat meningkatkan regenerasi pelbagai tisu termasuk rawan, tulang, kulit, dan otot dengan meningkatkan keadaan mikropersekitaran tempatan dan mengaktifkan laluan pembaikan endogen.

Sekretom fibroblas hidung ialah koleksi bahan yang dihasilkan dan dikeluarkan oleh fibroblas hidung, iaitu sel khusus yang terdapat dalam tisu penghubung mukosa

hidung. Fibroblas ini ialah sel khusus yang terletak di dalam tisu penghubung mukosa hidung, lapisan hidung yang lembap serta lapisan pelindung (Rohaina et al., 2018). Sekretom fibroblas terdiri daripada pelbagai protein, faktor pertumbuhan, sitokin dan molekul lain yang penting untuk mengekalkan struktur dan fungsi tisu hidung (Park et al., 2018). Dengan pelepasan bahan-bahan ini, ia memainkan peranan penting dalam mengawal pembaikan tisu, memodulasi tindak balas imun, mengawal keradangan serta pada masa yang sama dapat menjamin kesihatan keseluruhan dan daya tahan saluran hidung. Aktiviti rembesan ini menjadi sangat penting apabila badan menghadapi kecederaan atau jangkitan, di mana ia mampu bertindak sebagai mekanisme pertahanan badan dan mengekalkan integriti tisu hidung.

### **2.8.1 Komponen Sekretom Fibroblas hidung**

#### **ECM**

Komponen utama sekretom fibroblas hidung terdiri daripada pelbagai molekul yang penting untuk mengekalkan kesihatan dan kefungsi tisu hidung. Molekul ini adalah termasuk protein matriks ekstraselular (*ECM*) yang menyediakan sokongan struktur seperti kollagen, fibronektin dan juga elastin (Kular et al., 2014). Selain itu, ECM ialah rangkaian kompleks protein dan molekul lain yang memberikan sokongan struktur dan biokimia kepada sel dalam tisu (Muncie et al., 2018). Fibroblas hidung bertanggungjawab untuk merembeskan komponen ECM. Protein ECM yang dirembeskan oleh fibroblas hidung memainkan berperanan dalam mengekalkan integriti tisu, menyokong fungsi selular dan menyumbang kepada pembaikan dan penjana semula tisu (Kendall et al., 2014). ECM merangkumi kollagen seperti kollagen jenis I, III dan IV (Singh et al., 2023). Jenis kollagen itu sering dirembeskan oleh fibroblas dan juga merupakan protein struktur utama dalam ECM. Fungsinya adalah memberikan kekuatan tegangan kepada tisu serta memainkan peranan penting dalam penyembuhan luka. Seterusnya, kollagen jenis I ialah bentuk yang paling banyak dan ia akan membentuk menjadi fibril yang telah ditaut silang untuk memberikan kekuatan (Henriksen and Karsdal, 2016). Manakala kollagen jenis III sering ditemui bersama Jenis I dan terlibat dalam mengekalkan keanjalan tisu dan kollagen jenis IV ialah komponen utama membran asas yang menyokong lapisan sel epitelium (Kuivaniemi et al., 2019; Velez et al., 2012).

Selain itu, fibronectin juga menjadi salah satu protein di dalam ECM. Fibronectin ialah glikoprotein yang mempunyai berat molekul tinggi dan mempunyai fungsi yang penting dalam struktur dan ECM (Alandi et al., 2016). Ia dirembeskan oleh pelbagai sel, termasuk fibroblas hidung dan penting untuk proses seperti lekatan sel, migrasi, pertumbuhan dan pembezaan (Speziale et al., 2019). Tambahan pula, fibronectin wujud dalam dua bentuk utama seperti fibronectin plasma larut yang beredar dalam darah dan terlibat dalam penyembuhan luka dan pembekuan manala bentuk yang kedua ialah fibronectin selular tidak larut, yang membentuk komponen penting ECM (Febrek et al., 2019). Di ECM, fibronectin bertindak sebagai perancah pengikat, berinteraksi dengan pelbagai komponen ECM seperti kolagen, fibrin dan proteoglikan serta integrin pada permukaan sel (Kim et al., 2011). Interaksi ini penting untuk melabuhkan sel pada ECM, memberikan kestabilan mekanikal, dan membimbing pergerakan sel semasa proses kritikal seperti pembaikan tisu dan perkembangan embrio. Fibronectin juga penting untuk proses penyembuhan luka kerana ia menggalakkan migrasi fibroblas ke ruang kecederaan dan membantu membentuk matriks sementara yang menyokong penjanaan semula tisu (Yue, 2014; Liu ZL et al., 2023). Tambahan pula, fibronectin mengikat pelbagai faktor pertumbuhan, mengawal tindak balas selular kepada isyarat persekitaran sekali gus mempengaruhi proses penting seperti angiogenesis (pembentukan saluran darah baharu) dan tindak balas imun (Zhou et al., 2023). Walau bagaimanapun, dalam keadaan patologi seperti fibrosis dan keradangan kronik, pemendapan fibronectin yang tidak normal boleh menyebabkan pembentukan semula tisu yang berlebihan seterusnya akan mengakibatkan kekejangan tisu.

Seterusnya, elastin ialah protein matriks ekstraselular (ECM) kritikal yang dirembeskan oleh fibroblas, termasuk dalam tisu hidung, dan memainkan peranan penting dalam memberikan keanjalan dan daya tahan kepada tisu yang mengalami tekanan mekanikal berulang seperti kulit, paru-paru dan saluran darah. Dalam sekretom fibroblas hidung, elastin menyumbang kepada fleksibiliti struktur mukosa hidung, membolehkannya meregang dan berundur selepas proses ubah bentuk berlaku serta mengekalkan fungsi saluran hidung semasa pernafasan, bersin, dan pergerakan lain (Trebacz et al., 2023). Elastin terdiri daripada monomer tropoelastin, yang bersilang untuk membentuk rangkaian elastik yang tahan lama yang membolehkan tisu kembali kepada bentuk asalnya selepas diregangkan (Ozsvar et al., 2021). Sifat ini amat penting

dalam tisu seperti mukosa hidung, di mana keanjalan diperlukan untuk menampung perubahan tekanan dan aliran udara (Edward dan Annamaraju, 2023). Sebagai tambahan kepada peranan strukturnya, elastin berinteraksi dengan komponen dan sel ECM lain melalui protein pengikat elastin, yang membantu mengawal tingkah laku selular seperti percambahan, pembezaan dan migrasi (Bax et al., 2018; Heinz et al., 2018). Ketidakteraturan pengeluaran atau bioterurai elastin seperti yang dilihat dalam penuaan atau penyakit tertentu seperti rhinosinusitis kronik boleh menyebabkan kekejangan tisu dan kehilangan keanjalan dan pada masa yang sama menyumbang kepada fungsi hidung terjejas dan peningkatan kerentanan terhadap kecederaan atau keradangan (Baumann et al., 2021).

### **Faktor Pertumbuhan (*Growth Factor*)**

Faktor pertumbuhan (*growth factor*) ialah molekul isyarat yang dikeluarkan oleh fibroblas hidung yang penting untuk mengawal aktiviti selular seperti percambahan, pembezaan, migrasi dan pembaikan tisu. Dalam sekretom fibroblas hidung, faktor pertumbuhan ini adalah kunci untuk mengekalkan keseimbangan fungsi tisu hidung, membantu dalam penyembuhan luka dan mengawal tindak balas keradangan. Faktor pertumbuhan merangkumi 5 elemen iaitu *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (*TGF- $\beta$* ), *Fibroblast Growth Factors* (*FGFs*), *Vascular Endothelial Growth Factor* (*VEGF*), *Platelet-Derived Growth Factor* (*PDGF*) dan *Epidermal Growth Factor* (*EGF*) (Saad dan Chapple, 2022).

TGF- $\beta$  ialah sitokin serba boleh yang memainkan peranan penting dalam mengawal pelbagai aktiviti selular seperti pertumbuhan sel, pembezaan dan regulasi imun (Deng et al., 2024). Dalam fibroblas hidung, TGF- $\beta$  adalah penting untuk memelihara keseimbangan tisu dan memudahkan penyembuhan luka. Ia amat penting untuk merangsang pengeluaran protein matriks ekstraselular (ECM) seperti kolagen dan fibronectin untuk membaiki dan mengukuhkan tisu yang rosak. Protein TGF- $\beta$  dibebaskan daripada sel sebagai kompleks protein besar yang terdiri daripada tiga komponen: dimer TGF- $\beta$  matang, dimer propeptida TGF- $\beta$  (juga dikenali sebagai protein berkaitan kependaman, atau LAP) dan protein pengikat TGF- $\beta$  terpendam (LTBP) (David C, et al., 2004). Pengaktifan TGF- $\beta$  berlaku apabila LAP berpisah daripada dimer TGF- $\beta$  matang (Morikawa et al., 2016). Seterusnya, FGF merupakan

keluarga protein isyarat yang bertindak dalam pelbagai proses biologi termasuk percambahan sel, pembezaan, migrasi dan pembaikan tisu (Teven et al., 2014). FGF terlibat dalam kedua-dua pembangunan dan penyelenggaraan tisu, mempengaruhi pembentukan tisu seperti kulit, saluran darah, dan sistem saraf. Dalam fibroblas hidung, FGF memainkan peranan penting dalam memudahkan pembaikan dan penjanaan semula tisu. Selain itu, FGF adalah penting dalam menggalakkan angiogenesis, proses pembentukan saluran darah baharu, yang penting untuk membekalkan nutrien dan oksigen kepada tisu yang mengalami penjanaan semula (Schuhladen dan Boccaccini, 2019).

Elemen ketiga di dalam faktor pertumbuhan ialah VEGF. VEGF ialah sejenis protein isyarat penting dalam sekretom fibroblas hidung memainkan peranan penting dalam angiogenesis atau perkembangan saluran darah baharu seperti FGF (Schuhladen dan Boccaccini, 2019). Fungsi utama VEGF yang dikenalpasti adalah untuk merangsang pertumbuhan saluran darah dan meningkatkan kebolehtelapannya untuk memastikan tisu terutamanya dalam proses pembaikan atau penjanaan semula serta menerima oksigen dan nutrien yang mencukupi (Johnson dan Wilgus, 2014). Dalam tisu hidung, fibroblas membebaskan VEGF sebagai tindak balas kepada paras oksigen rendah (hipoksia) atau kecederaan sekaligus menggalakkan pembentukan kapilari baharu untuk menyokong kawasan yang rosak (Zimna dan Kurpisz, 2015). Sebagai tambahan kepada perannya dalam perkembangan vaskular, VEGF menyokong penyelenggaraan dan penjanaan semula mukosa hidung, yang merupakan lapisan pelindung di dalam saluran hidung. Dengan meningkatkan bekalan darah ke tisu yang rosak atau meradang, VEGF mempercepatkan proses penyembuhan dan membantu memulihkan integriti tisu (Belvedere et al., 2022). Walau bagaimanapun, aktiviti VEGF yang berlebihan boleh menyumbang kepada keadaan patologi, seperti rhinosinusitis kronik dan polip hidung, di mana pertumbuhan saluran darah yang tidak normal dan peningkatan kebolehtelapan vaskular boleh memburukkan lagi keradangan dan pembentukan semula tisu (Delshad et al., 2016). Secara keseluruhan, VEGF merupakan faktor penting untuk kedua-dua pembaikan tisu normal dan proses patologi dalam fibroblas hidung.

PDGF ialah faktor pertumbuhan yang berperanan penting dalam mengawal percambahan, migrasi dan kewujudan pelbagai jenis sel terutamanya fibroblas, sel otot dan sel mesenkim yang lain (Morbidelli dan Donnini, 2022; Demoulin dan Essagher, 2014). PDGF terdiri daripada isoform yang berbeza dan kebiasannya dirujuk sebagai PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, dan PDGF-DD yang membentuk dimer dan mengikat reseptor PDGF tertentu pada permukaan sel untuk memulakan laluan isyarat intraselular (Gude et al, 2014). Dalam konteks fibroblas hidung, PDGF adalah penting untuk penyembuhan luka dan pembaikan tisu (Jian et al., 2022). Ia merangsang migrasi fibroblas ke ruang kecederaan dan menggalakkan percambahan sel serta pada yang sama memastikan sel mencukupi tersedia untuk membina semula tisu yang telah rosak. Tambahan pula, PDGF merangsang pengeluaran ECM seperti kolagen, yang membantu mengukuhkan kekuatan dan kestabilan tisu semasa proses penyembuhan (Herrera et al., 2018). PDGF juga mencetuskan pembebasan matriks metalloproteinase (MMP) dalam pembentukan semula ECM bagi memudahkan penjanaan semula tisu yang betul (Trypuc et al., 2016).

Akhir sekali, EGF ialah molekul isyarat berkuasa yang mengawal pertumbuhan sel, percambahan dan pembezaan sama seperti fungsi PDGF (Wee dan Wang, 2017). Kesan tersebut dapat dilihat apabila EGF mengikat ke *Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*, di mana EGFR merupakan antara reseptor tirosin kinas yang terletak di permukaan sel. Apabila ikatan antara EGF dan EGFR terjadi, maka berlakunya pengaktifan dan akan mencetuskan pelbagai isyarat intraselular yang menggalakkan kelangsungan hidup, pertumbuhan dan pembahagian sel (Shami et al., 2011). Hal ini menjadikan EGF amatlah penting dalam tisu epitelium termasuklah tisu dalam kulit dan lapisan organ dalaman seperti mukosahidung. EGF juga terlibat dalam pengawalseliaan pembezaan sel dan penyelenggaraan penghalang epitelium yang sihat (Laube et al., 2021). Isyaratnya adalah penting untuk memastikan sel menjalani pembezaan sel dengan betul kepada jenis yang diperlukan untuk membentuk tisu berfungsi. Walau bagaimanapun, disregulasi isyarat EGF selalunya adalah disebabkan oleh ekspresi berlebihan EGFR atau mutasi dalam laluan dan boleh membawa kepada keadaan patologi seperti kanser, di mana percambahan sel yang tidak normal dan pertumbuhan tisu berlaku (Masuda et al., 2012).

## 2.9 KAJIAN LEPAS DALAM PEMBENTUKAN BIOBAHAN/KERANGKA DALAM MODEL IN VITRO EPITELIUM SALURAN PERNAFASAN

Dalam membangunkan biomaterial baharu untuk kegunaan masa hadapan dalam model in vitro epitelium saluran pernafasan, terdapat sifat fizikokimia dan mekanikal seperti bioterurai, nisbah bengkak, keliangan, ultra-struktur, kekuatan mekanikal, sudut sentuhan, dan kadar penghantaran wap air (WVTR) yang perlu dikaji. Sifat mekanikal, rintangan korosi/bioterurai, dan sifat elektrik/optik ialah ciri fizikokimia yang paling penting bagi sesuatu bahan. Menurut kajian literatur yang dilakukan oleh Nashihah et al., 2023, terdapat beberapa kajian lepas berkaitan pembuatan biobahan untuk digunakan dalam model in vitro epitelium saluran pernafasan (Rujuk jadual 2.1).

Pemilihan karrageenan, gelatin dan sekretom dalam kajian ini berdasarkan hasil kajian dari biobahan sebelumnya yang menunjukkan bahawa perilaku sel sangat diatur oleh komposisi kerangka, kimia permukaan dan mikro seni bina. Dalam pelbagai kajian, hidrogel dan kerangka hibrid telah menunjukkan bahawa isyarat biokimia seperti protein ECM memainkan peranan penting dalam lekatan sel, penjajaran, pembiakan dan pembezaan. Berdasarkan jadual 2.1, kemajuan terkini dalam kejuruteraan tisu telah menunjukkan bahawa kedua-dua komposisi biobahan dan isyarat mikro persekitaran sangat mempengaruhi tingkah laku sel, pembezaan, dan hasil penjanaan semula tisu. Gelatin dipilih sebagai komponen utama kerana ia adalah terbitan kolagen yang ternyahasli yang mengekalkan motif pelekat sel utama. Ini disokong oleh penemuan daripada sistem berasaskan kolagen dan gelatin, di mana isyarat topografi dan biokimia secara signifikan mempengaruhi penjajaran dan polarisasi sel epitel (Soleas et al., 2015). Begitu juga, kajian kolagen IV dan laminin menunjukkan bahawa protein yang berasal dari ECM adalah penting untuk mempromosikan lekatan sel dan mengekalkan fenotip epitel (Hamilton et al., 2020). Oleh itu, gelatin bertindak sebagai komponen yang meniru ECM yang aktif secara biologi yang meningkatkan lekatan sel dan menyokong organisasi seperti tisu.

Bertentangan dengan fungsi biologi gelatin, karrageenan dipilih kerana peranannya sebagai agen penstabil struktur dan fizikokimia. Karrageenan adalah polisakarida bersulfat yang mampu membentuk rangkaian hidrogel yang sangat terhidrat dan stabil dengan kekuatan mekanikal, porositi, dan tingkah laku bengkak

yang boleh disesuaikan. Kajian literatur mengenai rangkaian berasaskan polisakarida seperti kitosan, alginat dan agarosa secara konsisten menunjukkan bahawa integriti struktur dan pengekalan air adalah penting untuk mengekalkan persekitaran mikro tiga dimensi yang kondusif untuk pertumbuhan sel dan penyebaran nutrien. Sebagai contoh, rangkaian komposit kitosan–gelatin dan nanofiber PCL/kitosan yang dipintal secara elektrosinning dilaporkan meningkatkan kestabilan mekanikal sambil mengekalkan keserasian biologi dan menggalakkan penyerapan sel (Mahoney et al., 2016; Romanova et al., 2019). Begitu juga dengan fibroin sutera dan rangka bentuk polimer semula jadi lain telah menunjukkan hasil yang memberangsangkan dalam aplikasi kejuruteraan tisu kerana keseimbangan antara kekuatan mekanikal dan keserasian biologi mereka (Chen et al., 2018). Dalam konteks ini, karrageenan berfungsi sebagai matriks hidrogel yang boleh dipercayai yang menyediakan sokongan struktur, mengekalkan tahap penghidratan yang tinggi dan membenarkan penggabungan komponen bioaktif tanpa menjejaskan integriti rangka kerja.

Walaupun komponen struktur dan pelekat adalah penting, kajian kini semakin menekankan bahawa isyarat biokimia juga sama pentingnya untuk penjanaan semula tisu yang berfungsi. Ini telah membawa kepada penggabungan molekul bioaktif seperti faktor pertumbuhan, sitokin dan sekretom yang diperolehi daripada sel ke dalam sistem penyokong. Sekretom yang terdiri daripada campuran kompleks faktor larut dan vesikel ekstraselular yang dirembeskan oleh sel, telah dibuktikan sebagai pengatur yang berkuasa dalam pembaikan dan penjanaan semula tisu. Kajian melibatkan hidrogel berasaskan fibrin yang digabungkan dengan fibroblas telah menunjukkan pematangan epitel yang dipertingkatkan melalui mekanisme isyarat parakrin, di mana faktor yang dirembes mengatur komunikasi sel–sel dan pemodelan semula tisu (Albers et al., 2016). Begitu juga, sistem kerangka yang dilengkapi dengan asid retinoik telah menunjukkan peningkatan dalam pembezaan epitel dan hasil regeneratif di mana ia menekankan kepentingan modulasi biokimia dalam strategi kejuruteraan tisu (O’Leary et al., 2020). Selain itu, kerangka hibrid seperti kolagen dan fibroin sutera telah menunjukkan bahawa kehadiran isyarat bioaktif secara ketara meningkatkan pembezaan sel dan fungsi khusus tisu (Wu et al., 2020; Zhong et al., 2019). Penemuan ini menyokong dengan kuat penggunaan sekretom sebagai bahan tambahan biologi aktif yang mampu

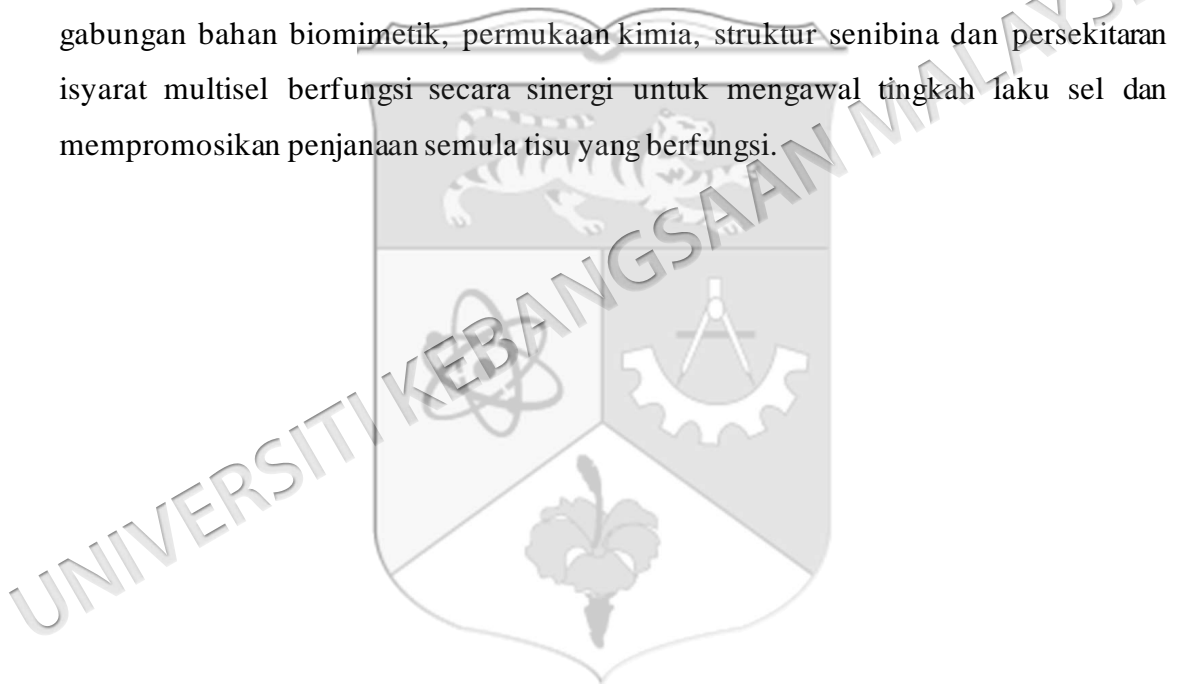
mencipta semula persekitaran isyarat dinamik tisu asli dan mempercepatkan proses regeneratif.

Apabila penemuan ini digabungkan, reka bentuk yang jelas akan dihasilkan dengan baik. Karrageenan menyediakan rangka mekanikal dan seni bina 3D terhidrat yang diperlukan untuk sokongan sel dan pengangkutan nutrien. Gelatin menyumbang fungsi biologi melalui motif menyerupai ECM, membolehkan lekatan sel dan interaksi penandaan isyarat. Sekretom memperkenalkan persekitaran biokimia dinamik yang kaya dengan faktor pertumbuhan dan molekul isyarat, yang secara aktif mengawal tingkah laku sel dan menggalakkan regenerasi tisu. Reka bentuk tiga bahagian ini selaras dengan prinsip kejuruteraan biobahan kontemporari yang menekankan bahawa biobahan yang terbaik bukan sahaja perlu menyokong sel secara struktur tetapi juga secara aktif mengarahkan tingkah laku sel melalui isyarat biokimia dan biomekanikal. Selain itu, perbandingan literatur dalam jadual 2.1 merentasi pelbagai sistem kerangka mengukuhkan rasional ini. Sebagai contoh, kerangka berasaskan PMMA dan yang diubah suai menggunakan UV telah menunjukkan kesesuaian untuk keadaan pertumbuhan sel epitelium tertentu (Rabiatul et al., 2015), manakala sistem sutera fibroin/metilselulosa hidrokispropil 3D-cetak telah menunjukkan hasil yang baik dalam aplikasi kejuruteraan tisu epitelium (Zhong et al., 2019). Kerangka nanofiber elektrospun dan hidrogel berasaskan fibrin pula menunjukkan bahawa nanostruktur dan komposisi biokimia secara langsung mempengaruhi kematangan dan organisasi sel. Kajian-kajian ini secara kolektif menekankan bahawa prestasi kerangka dimaksimumkan apabila reka bentuk bahan menggabungkan kestabilan struktur, bioaktiviti permukaan dan isyarat biokimia merupakan pendekatan yang tepat diambil dalam sistem hidrogel karegenan–gelatin–sekretom.

Apabila digabungkan, ketiga-tiga komponen ini menangani keperluan pelengkap yang dikenal pasti dalam literatur: karrageenan menyediakan kestabilan mekanikal dan struktur, gelatin membekalkan isyarat ECM-mimetik bioaktif untuk lekatan sel, dan sekretom menghantar isyarat biokimia dinamik yang mengawal tingkah laku sel. Strategi reka bentuk ini selaras dengan prinsip biomaterial moden, yang menekankan pembangunan kerangka pelbagai fungsi yang mampu meniru kedua-dua kompleksiti fizikal dan biokimia persekitaran mikro tisu asli. Oleh itu, sistem hidrogel

karrageenan–gelatin–sekretom dipilih sebagai pendekatan yang rasional dan disokong oleh literatur untuk meningkatkan tindak balas sel dan potensi regenerasi tisu.

Kesimpulannya, kajian literatur menyokong dengan kuat pembangunan sistem hidrogel komposit yang menggabungkan karrageenan, gelatin dan sekretom. Gabungan ini dipilih untuk meniru kerumitan hierarki persekitaran tisu asli dengan menggabungkan sokongan mekanikal, bioaktiviti meniru ECM dan isyarat biokimia regeneratif. Reka bentuk sebegini dijangka meningkatkan lekatan sel, menggalakkan pembentukan tisu yang teratur dan memperbaiki potensi regeneratif keseluruhan berbanding sistem hidrogel berkomponen tunggal. Keseluruhannya, kajian-kajian ini secara kolektif menekankan bahawa kejayaan kejuruteraan tisu bergantung pada gabungan bahan biomimetik, permukaan kimia, struktur senibina dan persekitaran isyarat multisel berfungsi secara sinergi untuk mengawal tingkah laku sel dan mempromosikan penjanaan semula tisu yang berfungsi.



Jadual 2.1 Ringkasan kajian sifat fizikokimia, mekanikal dan biologi biobahan/perancah dalam model epitelium saluran pernafasan in vitro.

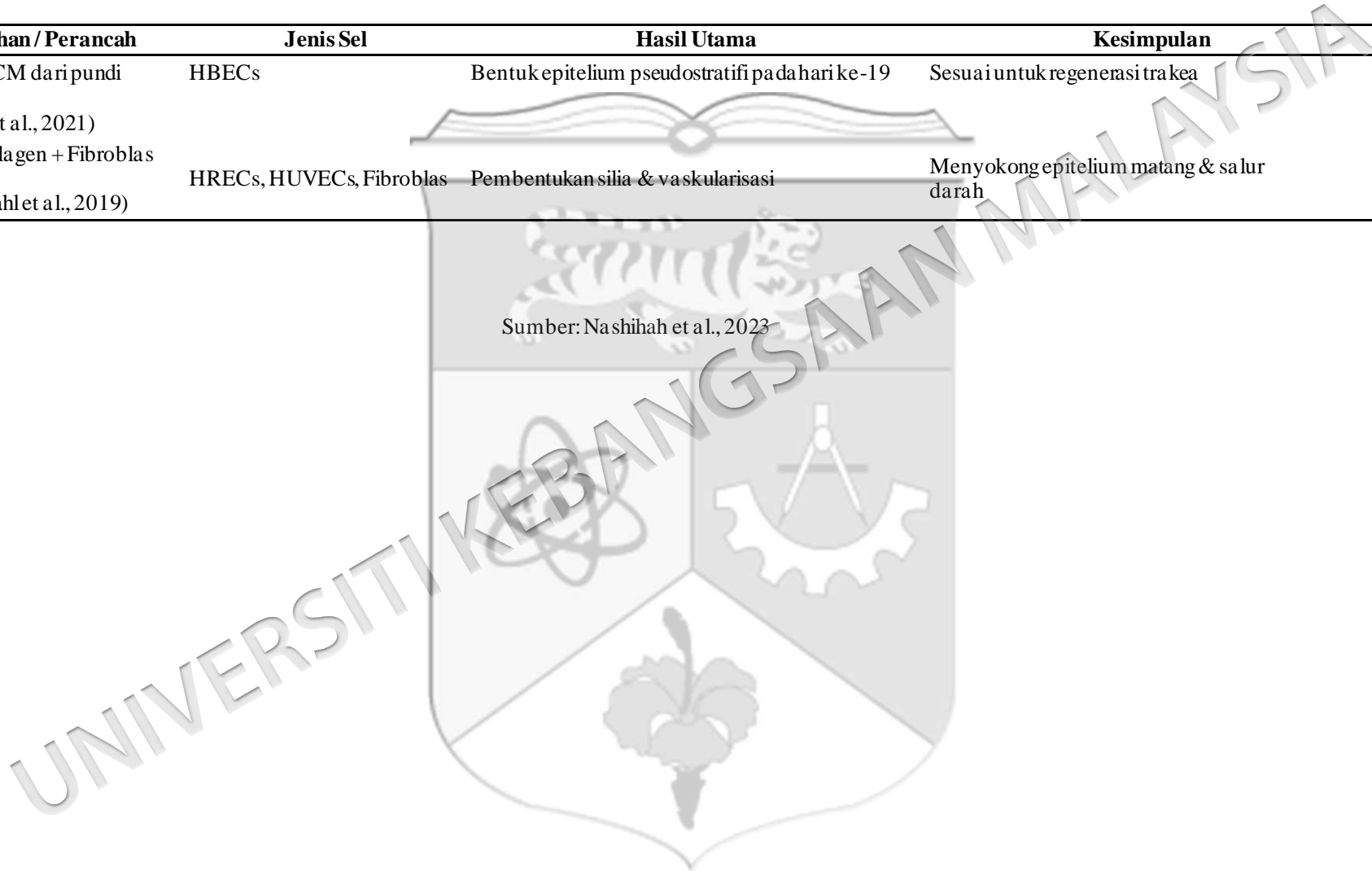
Biobahan/Perancah	Jenis Sel	Hasil Utama	Kesimpulan
Hidrogel gelatin mikroalur (Soleas J.P et al., 2015)	BEAS-2B	99.48% sel tersebar, sejajar dengan alur, pembentukan silia telah berlaku	Topografi mempengaruhi penjajaran dan polarisasi sel
CGP (kitosan-gelatin polilaktida) dengan HA (Romanova et al., 2019)	Sel epitelium respiratori (HRECs)	Proliferasi tinggi pada lapisan nanofiber; pembezaan mukosilier dihalang pada perancah tebal	HA meningkatkan hidrofilik permukaan
3D-TIPS dengan hidrogel kolagen (Wu L. et al., 2020)	hBEpiCs, hBFs, hBM-MSCs	Proliferasi & aktiviti metabolik meningkat; meniru ECM dengan lebih baik	Hidrogel hibrid menyokong pembezaan
Nanofiber PCL/kitosan elektrospin (Mahoney et al., 2016)	Sel epitelium trakeobronkial babi (PTBE)	Keanjalan tinggi, lekatan sel baik	Mempunyai sifat biokeserasian dan struktur fiber yang baik
PMMA (dirawat UV & genipin) (Rabiatulet et al., 2015)	Sel epitelium respiratori (RECs)	Proliferasi tertinggi pada PMMA-UV; kolagen jelas kelihatan	PMMA-UV terbaik untuk pertumbuhan REC in vitro
Hidrogel SF/HPMC cetakan 3D (Zhong et al., 2019)	BEAS-2B	Porositi tinggi, viabiliti >90%, lekatan & pertumbuhan sel baik	Sesuai untuk pertumbuhan epitelium trakea
Kolagen IV & laminin ECM (Hamilton et al., 2020)	HBECs	Sokong lekatan sel tetapi pembezaan terhad	Sesuai untuk kajian lekatan sel
Gel fibrin (Albers et al., 2016)	RECs	Fibroblas membantu pembezaan epitelium	Fibrin + fibroblas tingkatkan kematangan epitelium
Perancah fibroin sutera 3D (Chen Z et al., 2018)	HBECs	Pertumbuhan & viabiliti sel baik sehingga hari ke-21	Berpotensi untuk pembaikan trakea
PCL-Kitosan+ asid retinoik (O'leary et al., 2020)	Calu-3	Kekalkan viabiliti; perlukan ujian lanjut	Berpotensi sebagai perancah terapeutik
Perancah plasma manusia (Yunus et al., 2021)	RECs	Perkembangan, penghasilan mukin, peningkatan Ki-67	Sesuai untuk pembinaan semula tisu epitelium

bersambung...

... sambungan

Biobahan/Perancah	Jenis Sel	Hasil Utama	Kesimpulan
Hidrogel ECM dari pundi kencing (Ravindra et al., 2021)	HBECs	Bentuk epitelium pseudostratifikasi pada hari ke-19	Sesuai untuk regenerasi trakea
Fibrin + Kola gen + Fibroblas (Tri-kultur) (Kreimendahl et al., 2019)	HRECs, HUVECs, Fibroblas	Pembentukan silia & vaskularisasi	Menyokong epitelium matang & salur darah

Sumber: Nashihah et al., 2023



## **BAB III**

### **METODOLOGI KAJIAN**

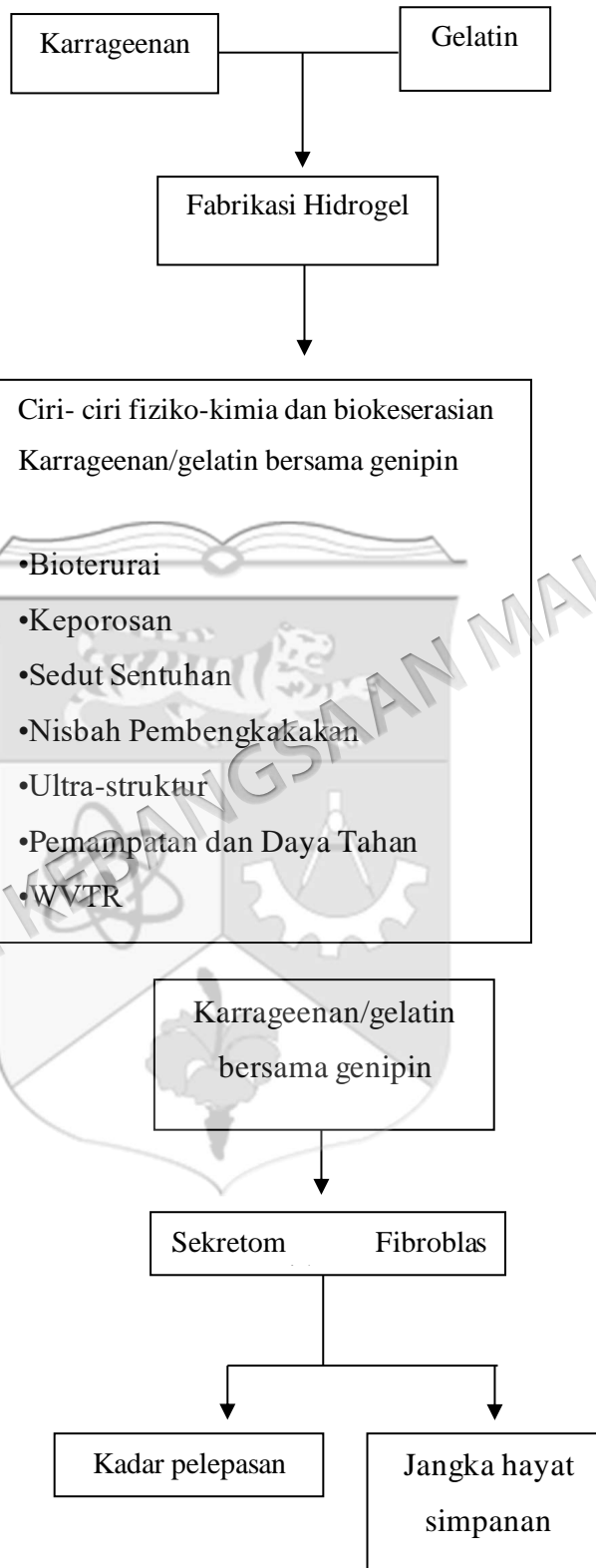
#### **3.1 KELULUSAN ETIKA**

Reka bentuk kajian dan pengumpulan sampel telah mendapat kelulusan etika daripada Jawatankuasa Etika Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia (UKM PPI/111/8/JEP-2021-005) seperti di lampiran A dan B. Semua prosedur yang melibatkan pengumpulan sampel, pemprosesan, dan kultur sel telah mematuhi kelulusan etika. Tisu turbinat hidung berlebihan diperoleh daripada pesakit yang menjalani pembedahan turbinat di Hospital Pakar KPJ Ampang Puteri dengan persetujuan bertulis. Enam turbinat hidung manusia digunakan untuk mengumpul medium bersyarat (CM).

#### **3.2 CARTA ALIR KAJIAN**

Rajah 3.1 menunjukkan aktiviti penyelidikan yang terlibat dalam kajian ini.

*Ditautsilang dengan genipin*



Rajah 3.1 Carta Alir Kajian

### 3.3 BAHAN

#### 3.3.1 Fabrikasi Hidrogel

Antara bahan yang digunakan semasa proses fabrikasi hidrogel ialah serbuk kappa-karrageenan (karr) yang diambil daripada Tacara Sdn Bhd (Sabah, Malaysia) (TA150), gelatin (gel) (Nitta-Gelatin Inc., Osaka, Japan), genipin (FUJIFILM Wako Chemicals Corporation, U.S.A.) dan etanol (TRP Technologies, Malaysia).

#### 3.3.2 Senarai Reagen Pengkulturan Sel yang Digunakan

Semua reagen pengkulturan sel yang digunakan dalam kajian ini adalah gred analisis dan disediakan dalam keadaan steril. Reagen ini dikendalikan mengikut protokol makmal untuk memastikan kesterilan dan mencegah pencemaran sepanjang prosedur eksperimental. Antara reagen yang digunakan ialah Kolagenase Jenis 1 (Worthington, USA), Medium Dulbecco's Eagle yang Diubahsuai: Campuran Nutrien F-12 (DMEM/F12; Biowest, USA), A. Medium Pertumbuhan Epitel Saluran Pernafasan (AEGM; PromoCell, Sigma-Aldrich, USA), Serum Janin Lembu (FBS; Gibco, Invitrogen, USA), B. Medium Bebas Serum Keratinosit Terspesifikasi (DKSFM; Gibco, Invitrogen, USA), Garam Fosfat Dulbecco yang Di-Bufferkan (DPBS; Invitrogen, UK), Campuran Trypsin Versene (Bio Whittaker, Lonza, USA), TrypLETM Select (Gibco, Invitrogen, USA), Pewarna Biru Trypan (Gibco, Invitrogen, USA), Bikarbonat Natrium ( $\text{NaHCO}_3$ ; Sigma-Aldrich, USA), Penimbal asid 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic (HEPES) (Gibco, Invitrogen, USA), Antibiotik Antimikotik (100X) (Gibco, Invitrogen, USA), and Glutamax (Gibco, Invitrogen, USA).

#### 3.3.3 Senarai Peralatan yang Digunakan

Peralatan yang digunakan dalam kajian ini terdiri daripada peralatan makmal yang diperlukan untuk pembuatan hidrogel, pengkulturan sel dan analisis sampel. Semua instrumen telah dikalibrasi dan diselenggara dengan betul sebelum digunakan untuk memastikan ketepatan dan kebolehpercayaan keputusan. Peralatan tersebut dioperasikan mengikut arahan pengilang dan garis panduan makmal yang telah ditetapkan. Antara alat yang digunakan ialah Harmony Digital Hot Plate Stirrer (LMS,

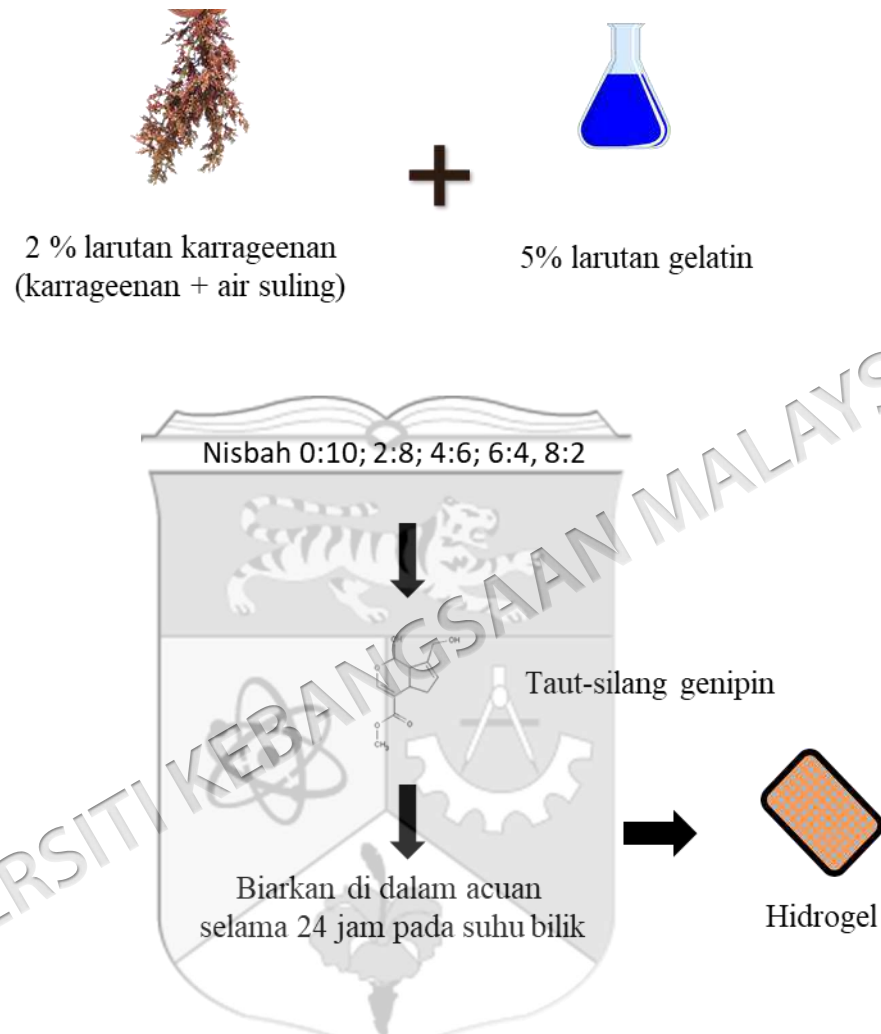
Jepun), Verner Kaliper, Termometer, Pemusing (Hettich Zentaifugen, Jerman), Mikroskop Cahaya Olympus CK30 (Olympus, German), Mikroskop Terbalik CK40 (Olympus, German), Pipet (Eppendorf Research Corp, USA), Pengawal Pipet, Kabinet Keselamatan Biologi Kelas II (Bio-cabinets Australia Pty Ltd, Australia), Vortex (VelpScientifica, Italy), Spektrofotometer (BioTek Power Wave XS, USA), Bekalan Kuasa Voltan Tinggi, Pam Saring Mikrofluida NE-1002X Berprogram (New Era Pump, USA), Hematositometer (LaborOptik, UK), Galaxy □ CO2 Incubators (RS Biotech, UK), Mikroskop Fluoresens Terbalik Nikon Eclipse Ti (Nikon, Jepun), Mikroskop Elektron Imbasan (Zeiss, Jerman), Pengering Beku dan Peti Sejuk Beku -80°C

### 3.4 FABRIKASI HIDROGEL KARRAGENAN/GELATIN

Hidrogel telah diperbuat daripada kappa karrageenan (karr) dan gelatin lembu (gel). Dalam kajian ini, kepekatan awal yang digunakan bagi karr adalah sebanyak 2% dan gel adalah sebanyak 5%. Untuk menghasilkan kepekatan tersebut, karr dan gel telah dilarutkan berasingan dalam air suling pada suhu 60°C dan 40°C selama dua jam. Hal ini kerana, gelatin menunjukkan sistem gel protein yang sensitif terhadap haba (*thermoreversible*) yang cair apabila dipanaskan, manakala karr bertindak sebagai polimer karbohidrat yang memerlukan haba untuk pelarutan dan membentuk gel apabila disejukkan disebabkan pembentukan heliks yang distabilkan oleh ion, mencerminkan kimia protein berbanding polimer karbohidrat yang berbeza serta mekanisme interaksi mereka. Seterusnya, kedua-dua larutan tersebut telah dicampur mengikut nisbah karr/gel yang berbeza iaitu karr/gel (0:10), (6:4) ml dan (8:2) ml. Selepas itu, larutan karr/gel telah dipaut silang menggunakan genipin secara pracampur untuk menghasilkan kepekatan genipin sebanyak 0.2%, 0.3% dan 0.4% (berat/isi padu) pada suhu 30°C sebelum dituangkan ke dalam acuan silikon yang dibaluti dengan kerajang aluminium. 7 kumpulan hidrogel dihasilkan seperti berikut:

- 1) C0G10Gnp0.2 merujuk kepada nisbah Karr:Gel 0:10 dan kepekatan genipin 0.2%.
- 2) C6G4Gnp0.2 merujuk kepada nisbah Karr:Gel 6:4 dan kepekatan genipin 0.2%.
- 3) C8G2Gnp0.2 merujuk kepada nisbah Karr:Gel 8:2 dan kepekatan genipin 0.2%.
- 4) C6G4Gnp0.3 merujuk kepada nisbah Karr:Gel 6:4 dan kepekatan genipin 0.3%.
- 5) C8G2Gnp0.3 merujuk kepada nisbah Karr:Gel 8:2 dan kepekatan genipin 0.3%.

- 6) C6G4Gnp0.4 merujuk kepada nisbah Karr:Gel 6:4 dan kepekatan genipin 0.4%.  
 7) C8G2Gnp0.4 merujuk kepada nisbah Karr:Gel 8:2 dan kepekatan genipin 0.4%.



Rajah 3.2 Skematik aliran kerja menggambarkan fabrikasi hidrogel karrageenan gelatin yang ditaut silang dengan genipin, menghasilkan rangkaian hidrogel tiga dimensi yang stabil untuk aplikasi kejuruteraan tisu.

### 3.5 PENGUMPULAN SEKRETOM

#### 3.5.1 Pengkulturan Sel dan Pencirian

Dengan persetujuan bertulis daripada pesakit sebelum pembedahan, sampel turbinat hidung telah diambil sebagai tisu berlebihan daripada Pusat Perubatan UKM dan Hospital Pakar KPJ Ampang Puteri. Sampel tersebut di simpan di dalam kotak

simpanan sejuk beku sebelum diproses. Kriteria untuk kemasukan dan pengecualian dan juga jenis pensampelan yang disebutkan ditulis seperti berikut.

Kriteria untuk dimasukkan: Semua pesakit yang menerima pembedahan turbinat daripada pelbagai umur dan jantina

Kriteria pengecualian: Pesakit yang mempunyai kanser

Jenis pensampelan yang disebutkan: Pensampelan mudah

Sampel turbinat dibersihkan dengan membasuhnya berkali-kali dengan *Dulbecco Phosphate Buffer Solution (DPBS)* dan kemudian memotongnya menjadi kepingan kecil untuk pemprosesan selanjutnya. Larutan kolagenase jenis 1 (Worthington, NJ, Amerika Syarikat) digunakan untuk mencerna tisu, yang mengambil masa selama 1-2 jam dalam pengocak inkubator pada suhu 37 °C dengan bantuan larutan kolagenase jenis 1. Apabila tisu yang dicerna bebas daripada fibroblas dan sel epitelium saluran udara (AEC), ia diemparkan pada 5000 rpm selama 5 minit. Kemudian pellet tersebut diampai dalam medium kultur bersama *Airway Epithelium Cell Medium (AECM)*, F-12, dan *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)*, dalam nisbah 2:1:1. Seterusnya, *foetal bovine serum (FBS)* (GIBCO, NY, USA) ditambah kedalam campuran, yang kemudiannya dibiakkan ke dalam plat enam telaga. Seterusnya, sel-sel tersebut dikulturkan pada suhu 37 °C dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% selama 2-3 hari, dengan medium pengkulturan yang ditukar setiap 2-3 hari. Selepas itu, fibroblas disingkirkan menggunakan kaedah pengtripsinisasi, dengan meninggalkan koloni AEC. Sebaik sahaja sel-sel telah mencapai kepadatan 80-90%, fibroblas ditripsinisasi menggunakan 0.05% Trypsin-EDTA (Lonza, Amerika Syarikat) untuk mengasingkannya daripada AEC dan jika AEC tidak membiak dengan baik, AECM digunakan dan melalui proses "passage" dalam pengkulturan sel.

### 3.5.2 Pengumpulan Media Kondisi (CM)

Dalam FD+10%, fibroblas FBS (P3) dikulturkan sehingga konfluen. Sel-sel itu kemudiannya dibasuh dengan DPBS dan dikulturkan sama ada selama tiga hari atau lebih di dalam kelalang atau di *Airway Epithelial Cell Growth Medium (AECM)*.

Medium buangan dikumpulkan dan ditetapkan sebagai *Nasal Fibroblast Condition Medium* (NFCM).

### 3.6 BIOTERURAI

Kajian bioterurai ini diuji untuk mensimulasikan persekitaran bioterurai enzim fisiologi yang serupa dengan keadaan tisu saluran pernafasan *in vivo*, di mana biobahan terdedah kepada kedua-dua cecair badan berair dan aktiviti enzim daripada enzim pengubahsuaian matriks ekstraselular seperti kolagenase. PBS digunakan untuk meniru keadaan ionik fisiologi dan pH cecair badan manusia (pH 7.2–7.4), manakala kolagenase dimasukkan untuk meniru bioterurai enzimatik yang dilalui oleh enzim pemecah kolagen yang hadir semasa pembaikan tisu dan proses keradangan pada kecederaan epitelium saluran pernafasan. Sampel yang digunakan untuk ujian bioterurai disediakan dan telah dihasilkan seperti yang diterangkan dalam protokol penyediaan hidrogel sebelum dipotong kepada dimensi yang seragam untuk dicelupkan dalam medium bioterurai.

Untuk ujian bioterurai, sampel hidrogel karr/gel yang dipaut silang dengan genipin di sejuk bekukan terlebih dahulu di dalam -80 selama enam jam sebelum dikering sejuk beku selama 24 jam. Selepas disejuk bekukan, sampel telah dimasukkan ke dalam mesin kering sejuk beku di bawah keadaan vakum, membolehkan ais menjalani proses pemejalwapan terus dari pepejal ke wap tanpa melalui fasa cecair. Langkah ini menghapuskan majoriti air (biasanya 90%) sambil mengekalkan struktur dalaman yang terbentuk semasa pembekuan. Seterusnya, berat hidrogel tersebut ditimbang dan direkod ( $B_{Awal}$ ).

Berikutan itu, sampel direndam dalam larutan PBS yang mengandungi kolagenase jenis I (0.0006%) sebanyak 4ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 7, 14, 21, 28 dan 35 hari. Dalam kajian lepas, penilaian awal dalam 5 minggu pertama adalah penting untuk menilai sama ada kadar penguraian selaras dengan pertumbuhan tisu, memastikan keseimbangan optimum antara sokongan rangka dan penyerapan semula (Wang, H. et al., 2025). Larutan kolagenase yang mengandungi hidrogel dikeluarkan mengikut tempoh masa yang berbeza dan dicuci dengan menggunakan PBS sebanyak 3 kali. Sampel hidrogel dicuci dengan PBS adalah bertujuan untuk menghapuskan elemen bioterurai yang longgar dan medium yang tertinggal bagi

memastikan penentuan kehilangan berat yang tepat di bawah keadaan fisiologi yang relevan (Ullah et al., 2020; El-Nablaway et al., 2024). Seterusnya, hidrogel itu dikering sejuk bekukan selama 24 jam dan berat akhir hidrogel tersebut ditimbang ( $B_{\text{Akhir}}$ ).

Peratusan penurunan berat hidrogel ( $B_{\text{Hilang}} \%$ ) dikira seperti berikut:

$$B_{\text{Hilang}} \% = \frac{(B_{\text{Awal}} \text{ g} - B_{\text{Akhir}} \text{ g}) \times 100}{B_{\text{Awal}} \text{ g}}$$

$B_{\text{Hilang}}$  = Berat Hilang (%)

$B_{\text{Awal}}$  = Berat Awal sebelum direndam PBS (g)

$B_{\text{Akhir}}$  = Berat Akhir selepas dicuci dengan PBS (g)

### 3.7 KEPOROSAN

Keporosan hidrogel kart/gel dipaut silang dengan genipin ditentukan menggunakan kaedah penggantian pelarut. Hidrogel direndam di dalam etanol selama 24 jam dalam pada suhu bilik 25°C. Hidrogel kemudiannya ditimbang semula selepas dilapisi dengan kertas penapis untuk mengeluarkan etanol yang berlebihan ( $M_1$ ). Kaliper vernier digunakan untuk mengukur saiz hidrogel. Porositi dikira menggunakan persamaan berikut:

$$\varepsilon = \frac{(M_1 - M_0)}{\rho V}$$

$\rho$  = ketumpatan etanol (g/ml)

$V$  = isipadu hidrogel (cm<sup>3</sup>)

### 3.8 SUDUT SENTUHAN

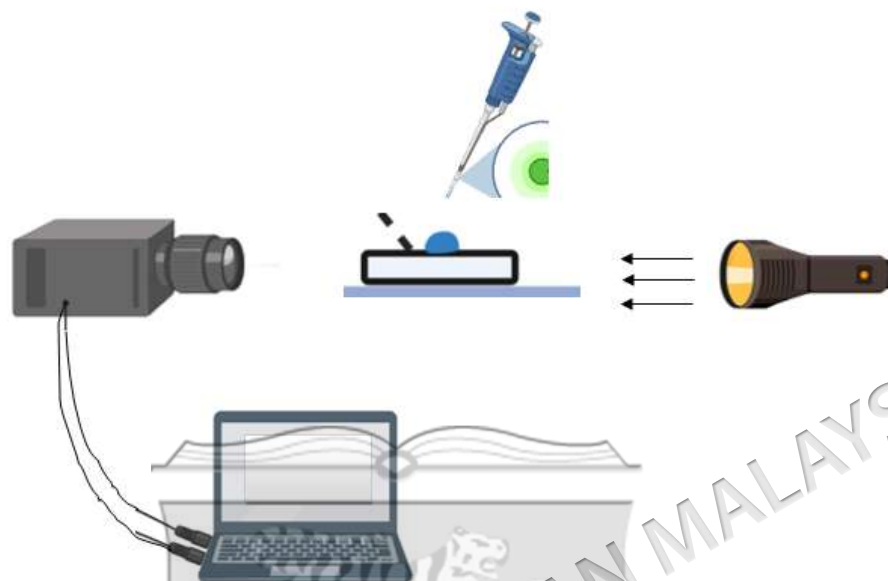
Sudut sentuhan air (WCA) digunakan untuk menentukan kebolehtelapan permukaan kerangka sama ada hidrofilik atau hidrofobik (Maqsood et al., 2015). Menurut Cheng L et al., 2004, persamaan Young-Dupre biasanya digunakan untuk mengira CA:

$$\cos \theta = \frac{(\bar{\gamma}_{SV} \text{ N/m} - \bar{\gamma}_{SL} \text{ N/m})}{\bar{\gamma}_{LV} \text{ N/m}}$$

di mana  $\bar{\gamma}$  ialah ketegangan antara fasa pepejal (S), cecair(L), dan wap (V). Kebasahan permukaan hidrogel yang dihasilkan dinilai menggunakan pengukuran sudut sentuh air statik. Analisis ini dijalankan untuk menentukan sifat hidrofilik permukaan hidrogel, yang merupakan parameter penting yang mempengaruhi perlekatan sel, penyerapan protein, dan kesesuaian keseluruhan untuk aplikasi epitel saluran pernafasan secara in vitro. Walau bagaimanapun, sudut sentuh air dalam kajian ini diukur dengan meletakkan hidrogel karr/gel dipaut silang genipin pada permukaan kaca gelas yang stabil dan diambil menggunakan lensa makro yang dipasang pada kamera telefon pintar untuk memberikan tumpuan kepada permukaan gelatin (J Selvarajah et al., 2020).

Air suling digunakan sebagai cecair ujian kerana penggunaannya yang standard dalam penilaian kebasahan permukaan dan keupayaannya untuk mewakili keadaan fisiologi berair. Mikropipet digunakan untuk melepas titisan air dengan isipadu tetap sebanyak 3  $\mu\text{L}$  ke atas permukaan sampel hidrogel dengan cermat. Titisan dilepaskan pada kadar terkawal kira-kira 1  $\mu\text{L/s}$  untuk memastikan pembentukan titisan yang konsisten dan mengurangkan distorsi dinamik sudut sentuh. Semua ukuran dijalankan pada suhu bilik ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) di bawah keadaan persekitaran semula jadi. Sudut sentuhan statik direkodkan dalam masa 5–10 saat selepas titisan diletakkan untuk menangkap tingkah laku basah awal sebelum penyerapan atau penyebaran yang ketara berlaku. Bagi setiap formulasi hidrogel, ukuran sudut sentuhan dilakukan di tiga hingga lima kawasan

berbeza pada permukaan sampel untuk mengambil kira ketidak-teraturan permukaan. Nilai purata bagi ukuran ini dikira dan dilaporkan sebagai sudut sentuhan akhir.



Rajah 3.3 Ilustrasi skematik uji kaji sudut sentuhan dan dianalisis menggunakan perisian ImageJ

### 3.9 NISBAH PEMBENGGKAKAN

Ciri nisbah pembengkakan hidrogel menyediakan maklumat integriti rangkaian sebelum dan selepas pemuatan NFCM dalam rangkaian. Untuk menilai nisbah pembengkakan hidrogel, kerangka tersebut difabrikasi dan kemudian dibekukan terlebih dahulu pada  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  selama 6 jam. Selepas itu, ia dikeringkan beku selama 24 jam. Kerangka hidrogel yang telah dikeringkan kemudian diletakkan ke dalam *24-well plate* dan berat awalnya diukur dan direkodkan. Seterusnya, 1–2 mL larutan Phosphate-buffered saline (PBS) ditambah ke setiap lubang sehingga kerangka hidrogel sepenuhnya tenggelam dan dibiarkan pada suhu bilik selama 6 jam untuk membolehkan pembengkakan. Akhir sekali, kerangka dikeluarkan dan berat akhir diukur dan direkodkan. Nisbah pembengkakan (Q) hidrogel dikira daripada persamaan:

$$Q (\%) = (W_f - W_i) / W_i \times 100$$

$W_f$  = Berat hidrogel bengkak pada keseimbangan (g)

$W_i$  = Berat kering hidrogel tulen (g)

### 3.10 NANOSTRUKTUR

Mikroskop elektron imbasan (SEM) adalah salah satu instrumen yang paling banyak digunakan untuk mengkaji struktur biobahan dan antara muka hidrogel ke tisu biologi (Grandfield K, 2012). Pelbagai teknik 3D boleh didapati dalam penyelidikan kejuruteraan tisu termasuk SEM untuk mengkaji morfologi sel, biobahan dan hubungannya (Cuijpers et al., 2011). SEM dijalankan pada hidrogel tanpa sel untuk memahami ciri-ciri fizikal saiz berliang, kelianan yang saling berkaitan dan morfologi permukaan.

Ujian nanostruktur hidrogel karr/gel yang ditatut silang dengan genipin telah diuji menggunakan mikroskop elektron imbasan (SEM). Sampel hidrogel disediakan mengikut formulasi yang ditetapkan sebelum dianalisis. Selepas proses sintesis, hidrogel dipotong menjadi spesimen yang seragam untuk memastikan konsistensi dalam pemprosesan. Berikutan kandungan air yang tinggi dalam hidrogel, pengeringan beku dilakukan untuk mengekalkan struktur berliang dalaman sebelum pengimejan SEM. Sampel tersebut dibekukan terlebih dahulu di dalam peti sejuk beku  $-80^{\circ}\text{C}$ . Kemudian, sampel beku mengalami proses pengeringan beku dalam pengering beku di bawah keadaan vakum sehingga kelembapan dikeluarkan sepenuhnya dan menghasilkan rangka hidrogel yang berpori kering. Sampel telah dipotong menggunakan bilah pencukur yang bersih bertujuan untuk memaparkan morfologi keratan rentas dalaman. Setelah itu, sampel dihantar ke makmal ICRIM, UKM untuk menjalani analisis tersebut. Sampel yang dihantar dimasukkan ke dalam mikroskop elektron imbasan model Zeiss keluaran dari Jerman. Imej diambil pada pembesaran 50x. Beberapa kawasan termasuk kawasan pusat dan periferal setiap sampel, dianalisis untuk memastikan keterwakilan statistik. Seterusnya, analisis saiz pori dijalankan menggunakan perisian ImageJ. Imej SEM ditukar kepada skala kelabu dan ditentukan ambang untuk membezakan rongga pori daripada matriks polimer. Untuk setiap kumpulan, 100 pori diukur untuk memastikan kebolehpercayaan statistik. Keputusan

dinyatakan sebagai saiz pori purata  $\pm$  sisihan piawai, dan taburan saiz liang dibentangkan dalam bentuk histogram.

### 3.11 KADAR PENGHANTARAN WAP AIR (WVTR)

Nilai bacaan kadar penghantaran wap air (WVTR) di dalam kajian ini disunting dari kajian Rui et al., 2016. Secara ringkas, kerangka karr/gel dipaut silang genipin hidrogel diletakkan di bahagian atas botol kaca berbentuk silinder yang mengandungi 10 mL air suling. Kemudian sampel tersebut ditempatkan di dalam persekitaran terkawal iaitu di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% dan 37 °C selama 24 jam. Keputusan telah direkodkan dan dianalisis menggunakan formula di bawah:

$$WVTR (gm^2j^{-1}) = \frac{(W_i - W_f)}{(A \times masa)}$$

W<sub>i</sub> = Berat awal (g)

W<sub>f</sub> = Berat akhir (g)

A = Luas permukaan botol silinder (m<sup>2</sup>)

### 3.12 MAMPATAN DAN DAYA TAHAN

Ujian mampatan kebiasaanya dilakukan dengan meletakkan sampel ujian di permukaan rata dan kemudian mengenakan berat tertentu pada sampel tersebut. Ia digunakan untuk menentukan had anjal biobahan dan untuk mengenal pasti kekuatan mampatan. Protokol ini dimulakan dengan menghasilkan kerangka hidrogel menggunakan acuan plat 6-lubang dengan ketebalan kira-kira 5 mm untuk memastikan keseragaman dalam ujian mekanikal. Setelah hidrogel tersedia, rangka sampel tersebut diletakkan di permukaan rata dan imej awal (sebelum mampatan) diambil untuk menetapkan dimensi dan bentuk asalnya. Beban tetap sebanyak 300 g kemudian dikenakan selama 5 minit untuk menghasilkan mampatan. Selepas itu, beban diangkat dan imej kedua (selepas mampatan) diambil untuk menilai perubahan bentuk.

Bagi ujian daya tahan pula adalah merujuk kepada keupayaan sesuatu bahan untuk menahan perubahan bentuk elastik tanpa berubah bentuk secara plastik. Ujian ini

dijalankan dengan menghidratkan sampel yang dimampatkan untuk mengukur pemulihan bentuk. Jika bahan gagal memulihkan bentuknya, ia bermakna bahawa bahan tersebut mengalami beberapa perubahan bentuk yang menunjukkan ketahanan yang terhad. Untuk menilai ketahanan dan tingkah laku pemulihan bahan, kerangka hidrogel kemudiannya direndam dalam air suling selama 5 minit, membolehkan ia menyerap semula air dan berpotensi mengekalkan semula strukturnya yang asal. Selepas penghidratan, imej ketiga (“selepas penghidratan”) direkodkan. Akhir sekali kesemua imej yang ditangkap dianalisis menggunakan perisian ImageJ untuk mengukur secara kuantitatif perubahan dalam kawasan kerangka kerja pada setiap peringkat. Prosedur ini membolehkan penilaian yang mudah terhadap kedua-dua deformasi mampatan dan keupayaan pemulihan serta memberikan gambaran mengenai kestabilan mekanikal dan ketahanan hidrogel sebagai tindak balas terhadap pembebanan dan penghidratan semula. Kedua-dua parameter dinilai dan dikira dengan menggunakan rumusan seperti di bawah.

$$\text{Nisbah mampatan (\%)} = \left( \frac{A_i - A_c}{A_i} \right) \times 100$$

$$\text{Nisbah daya tahan (\%)} = \left( \frac{A_f}{A_c} \right) \times 100$$

$A_i$  = Luas ketebalan sebelum pemampatan

$A_c$  = Luas ketebalan selepas pemampatan

$A_f$  = Luas ketebalan selepas penghidratan semula

### 3.13 TEMPOH GELASI

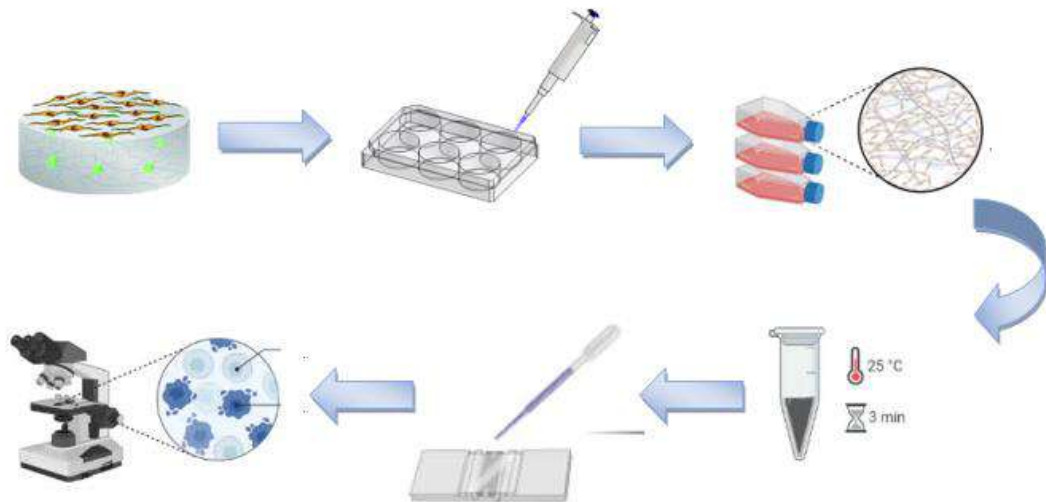
Tempoh gelasi hidrogel diuji untuk mengenal pasti titik di mana prekursor cecair berubah menjadi rangkaian separa pepejal. Kaedah yang digunakan di dalam kajian ini adalah ujian pembalikan botol. Protokol dimulakan dengan menyediakan larutan prekursor hidrogel. Selepas taut silang dicampur bersama larutan hidrogel, larutan tersebut dimasukkan serta merta ke dalam botol silinder kaca dan pengukuran masa dimulakan. Botol silinder kaca tersebut dibalikkan secara berkala sehingga menjadi gel. Masa gelasi diambil apabila bahan tersebut tidak lagi mengalir di bawah graviti.

### 3.14 BIOSERASI

#### 3.14.1 Penempelan Sel

Parameter ini dilakukan adalah untuk mengetahui peratus sel yang melekat di atas hidrogel pada masa tertentu selepas sel dibiakkan. Sampel karr/gel dipaut silang genipin telah disterilkan dengan teliti untuk memastikan persekitaran yang bersih dan terkawal. Hidrogel yang steril telah difabrikasi di dalam kabinet keselamatan biologi kelas II dan seterusnya disteril dengan menggunakan etanol. Berikutan itu, sel-sel fibroblas telah dibiakkan dengan teliti ke atas permukaan sampel hidrogel yang steril. Selepas kira-kira 2/3 jam pembedihan sel di atas hidrogel, medium ditambah kedalam plat tersebut. Seterusnya, *16-well plate* diletakkan di dalam inkubasi CO<sub>2</sub> sebanyak 5% dan suhu 37 C selama 24 jam bagi membolehkan sel-sel melekat pada sampel. Selepas itu, sampel dibasuh menggunakan DPBS dari Sigma, Amerika Syarikat dan larutan tersebut dipindahkan ke dalam tiub 15 ml untuk diemparkan. Larutan DPBS yang mengandungi sel dikira menggunakan haemositometer beserta larutan 0.4% *trypan blue*. Akhir sekali, peratus pelekatan sel dikira dengan menggunakan formula:

$$\text{Peratus penempelan sel \%} = \frac{\text{Pembedihan awal sel} - \text{bilangan sel dalam DPBS}}{\text{Pembedihan awal sel}} \times 100\%$$



Rajah 3.4 Ilustrasi skematik menunjukkan metodologi penempelan sel di atas permukaan hidrogel hibrid

### 3.15 KADAR PELEPASAN NFCM

Profil kadar pelepasan NFCM (mengandungi fibroblas hidung) daripada hidrogel karr/gel yang dimuatkan telah diukur dengan kehadiran fibronectin dalam bahan larut serap. Larutan karr-gel disediakan dan dicampur dengan 100 µg/ml NFCM secara pra-campuran. Selepas 8, 16, dan 24 jam, NFCM yang dilepaskan diukur menggunakan fibronectin ELISA kit daripada Abcam.

Karr-gel hidrogel yang dimuatkan dengan NFCM telah diproses menjadi bahan larut resap. Seterusnya, bahan larut resap tersebut dikumpulkan diinkubasi dan dikumpulkan pada 8, 16 dan 24 jam sebelum disimpan pada suhu -80°C untuk analisis menggunakan ELISA kit. Piawaian fibronectin yang dicairkan secara bersiri dibuat dalam pelarut ujian. Secara ringkas, 300 µl pencair ujian telah ditambah kepada setiap 6 tiub yang dilabelkan dengan kepekatan standard yang sesuai (1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62.5 pg/mL, dan 31.3 pg/mL). Pencair ujian digunakan sebagai standard sifar (0 pg/mL). Piawaian dan sampel supernatan sel telah ditambah ke dalam tiub yang sepadan (100 µul piawaian atau sampel/wel) dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Seterusnya, supernatan dikeluarkan dari setiap tiub dan 100 µl Biotin-antibodi (1X) telah ditambah ke dalam setiap tiub dan diinkubasi selama 1 jam

pada suhu 37°C. Kemudian, larutan disedut dan dibasuh 2 kali menggunakan Wash Buffer (200µl). Selepas mencuci terakhir, penimbal dikeluarkan dengan menyedut dan menterbalikkan plat untuk menggosoknya pada tisu bersih. Seterusnya, 100µl HRP-avidin (1X) ditambah pada setiap tiub dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Langkah mencuci diulang selama 5 kali dan 90ul Substrat TMB telah ditambah ke setiap tiub dan diinkubasi selama 15-30 minit pada suhu 37°C. Seterusnya, 50µl cecair henti telah ditambah pada setiap tiub. Akhirnya, ketumpatan optik setiap tiub ditentukan dalam masa 5 minit, menggunakan pembaca plat mikro yang ditetapkan kepada 450 nm.

### **3.16 PENILAIAN JANGKA HAYAT-SIMPANAN**

Jangka hayat hidrogel karr-gel yang dimuatkan NFCM diukur dengan keupayaannya untuk membebaskan rembesan selepas tempoh penyimpanan yang lama. Karr-gel dicampur dengan 100ug/ml NFCM dan membentuk hidrogel serta diletakkan di dalam peti sejuk beku -80°C untuk penyimpanan bagi mengekalkan aktiviti biologi faktor pertumbuhan. Selepas 1, 15, dan 47 hari penyimpanan, hidrogel dikeluarkan dan dinyahbekukan terlebih dahulu. Keupayaan pelepasan sekretom oleh perancah diukur menggunakan kit ELISA daripada Abcam.

### **3.17 ANALISIS STATISTIK**

Bagi setiap keadaan, data direkodkan sebagai purata penentuan triplikat. Ujian-t untuk perbezaan yang signifikan digunakan dalam analisis statistik. Analisis statistik dijalankan dengan menggunakan perisian GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., USA), dan data akan dilaporkan sebagai SD min. ANOVA sehala dengan ujian yang paling kurang signifikan digunakan untuk menentukan kesignifikan statistik. Tahap kesignifikan statistik ditetapkan pada  $p < 0.05$ .

## BAB IV

### HASIL KAJIAN

#### 4.1 PENAMPILAN KASAR HIDROGEL

Hidrogel karrageenan-gelatin (CG) ditaut silang dengan genipin (gnp) berjaya dihasilkan dan dibentuk menggunakan bekas silikon. Proses taut silang yang berlaku menjadikan hydrogel CGGnp menjadi kebiruan dan bertukar menjadi biru gelap selama 24 jam dibiarkan di suhu bilik. Terdapat beberapa kumpulan yang dihasilkan mengikut nisbah berbeza untuk karrageenan dan gelatin serta kepekatan genipin di dalam cecair hydrogel. Antara Kumpulan tersebut ialah C0G10Gnp0.2, C6G4Gnp0.2, C8G2Gnp0.2, C6G4Gnp0.3, C8G2Gnp0.3, C6G4Gnp0.4 dan C8G2Gnp0.4. Rajah di bawah menunjukkan bentuk dan penampilan kasar bagi setiap kumpulan CGGnp.

Jadual 4.1 Formulasi Hibrid Hidrogel

Kumpulan	Karrageenan (ml)	Gelatin (ml)	Genipin (%)
C0G10Gnp0.2	0	10	0.2
C6G4Gnp0.2	6	4	0.2
C8G2Gnp0.2	8	2	0.2
C6G4Gnp0.3	6	4	0.3
C8G2Gnp0.3	8	2	0.3
C6G4Gnp0.4	6	4	0.4
C8G2Gnp0.4	8	2	0.4

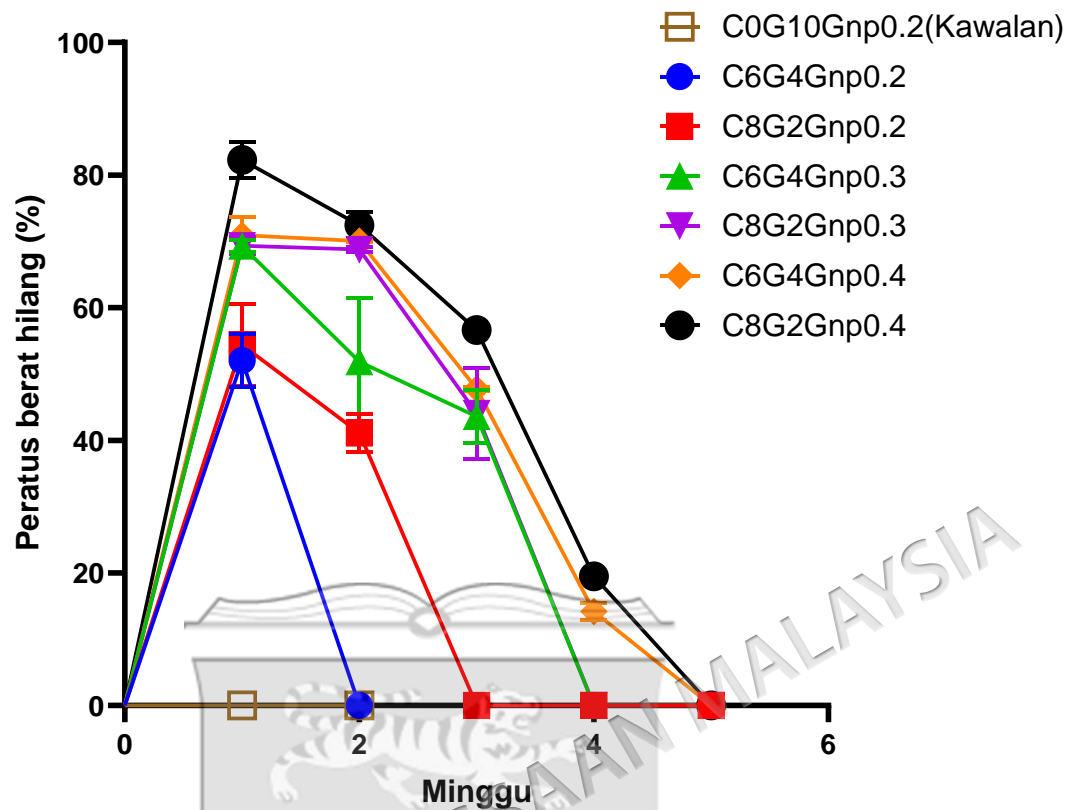




Rajah 4.1 Penampilan kasar hidrogel

#### 4.2 KADAR BIOTERURAI

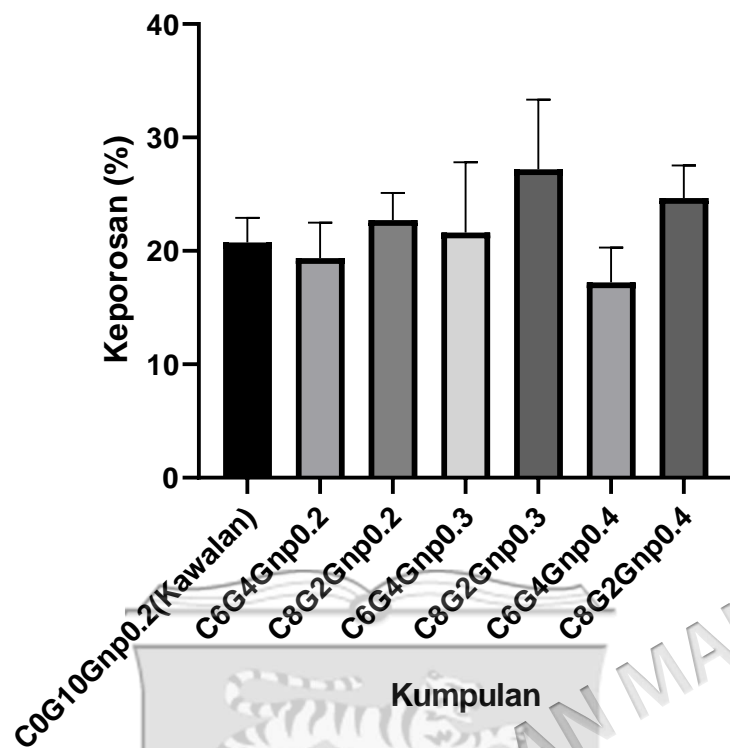
Kadar bioterurai hidrogel yang ditunjukkan di Rajah 4.2 dinilai melalui kaedah bioterurai enzimatik. Penurunan berat kerangka hidrogel menunjukkan kadar bioterurai diperolehi berikutan rendaman hidrogel tersebut di dalam larutan kollagenas jenis I selama beberapa minggu. Seperti yang dipamerkan di rajah 4.2, CGGnp0.2 hanya mampu bertahan selama 1 minggu lebih dan mengalami bioterurai sepenuhnya pada minggu ke 2. Manakala kumpulan C8G2Gnp0.2 mendapati bahawa proses bioterurai sepenuhnya berlaku pada minggu ke 3 dan diikuti oleh kumpulan C6G4Gnp0.3 dan C8G2Gnp0.3 pada minggu ke 4. Seterusnya, proses bioteruraise sepenuhnya oleh kumpulan yang terdiri daripada C6G4Gnp0.4 dan C8G2Gnp0.4 berlaku pada minggu ke 5. Peningkatan kandungan nisbah dalam karrageenan dan kepekatan genipin dalam hidrogel memainkan peranan yang penting dalam mengawal kadar biodegrasi.



Rajah 4.2 Kadar bioterurai hidrogel. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 2 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *two-way anova* (*nilai-p* < 0.05)

### 4.3 KEPOROSAN

Keporosan dalam biobahan merujuk kepada kehadiran liang atau ruang lompong dalam bahan, yang biasanya diukur sebagai peratusan jumlah isipadu yang diduduki oleh liang-liang ini. Secara langsung, parameter ini mempengaruhi keupayaan bahan untuk menyokong infiltrasi sel, pengangkutan nutrien, sifat mekanikal dan biokeserasian keseluruhannya. Rajah 4.3 menunjukkan kesemua kumpulan berada di bawah peratus 30% keporosan. Kumpulan C8G2Gnp0.3 mengindikasikan peratus keporosan yang tertinggi dan mempunyai lebih banyak ruang kosong atau liang dalam strukturnya berbanding kumpulan yang lain.

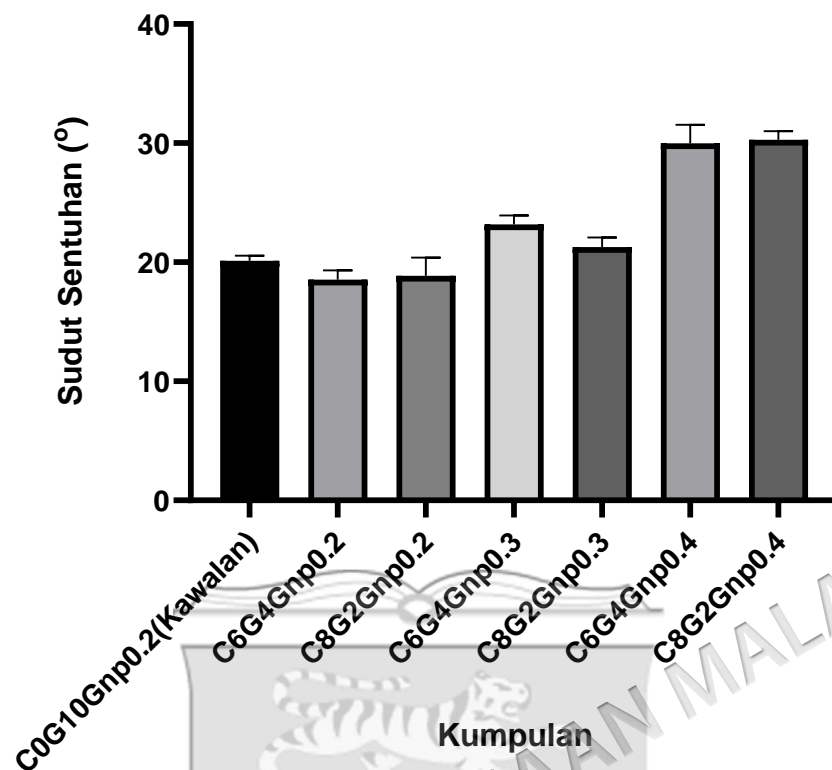


Rajah 4.3

Keporosan hidrogel kar-gel. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 3 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way anova*. Tiada perbezaan signifikan di dalam keporosan untuk setiap kumpulan.

#### 4.4 SUDUT SENTUHAN

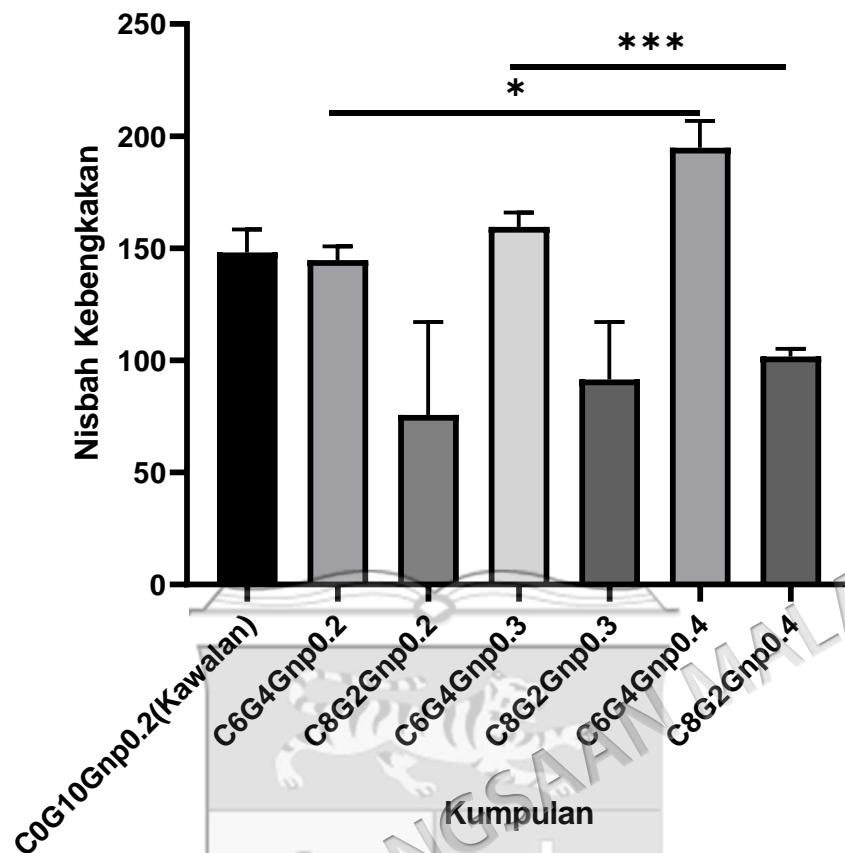
Sudut sentuhan dinilai untuk menentukan kebolehasahan kerangka hidrogel sama ada hidrofilik aatau hidrofobik. Merujuk kepada rajah 4.4, kajian mendapati bahawa semua kumpulan perancah hidrogel menunjukkan sudut sentuhan berada di bawah  $90^\circ$ . Justeru, bacaan sudut sentuhan tersebut membuktikan bahawa kesemua perancah mempunyai permukaan hidrofilik, yang membawa maksud kepada kebolehpayaan berinteraksi baik dengan persekitaran berair.



Rajah 4.4 Bacaan sudut sentuhan. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 4 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way anova* (*nilai-p* < 0.0001)

#### 4.5 NISBAH PEMBENGGKAKAN

Nisbah pembengkakan juga merupakan salah satu parameter terpenting bagi menentukan ciri-ciri fizikomekanikal yang baik bagi menghasilkan biobahan untuk kegunaan di dalam aplikasi model in-vitro epitelium saluran pernafasan. Parameter ini dijalankan bagi mengukur sejauh mana hidrogel yang difabrikkan boleh menyerap cecair dan mengembang. Hasil mendapati kumpulan C6G4Gnp0.4 mempunyai bacaan nisbah pembengkakan yang lebih tinggi berbanding kumpulan yang lain. Nisbah pembengkakan yang lebih tinggi menunjukkan bahawa hidrogel C6G4Gnp0.4 boleh menyerap lebih banyak cecair dan mengembang, mengekalkan fleksibiliti dan biokeserasian tanpa kehilangan kekuatan mekanikal.

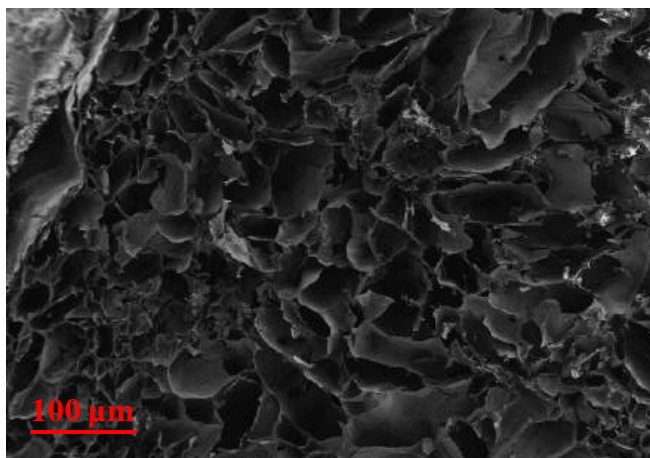


Rajah 4.5

Bacaan nisbah pembengkakan. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 4 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way anova* (nilai- $*p < 0.05$ ,  $** < 0.01$ )

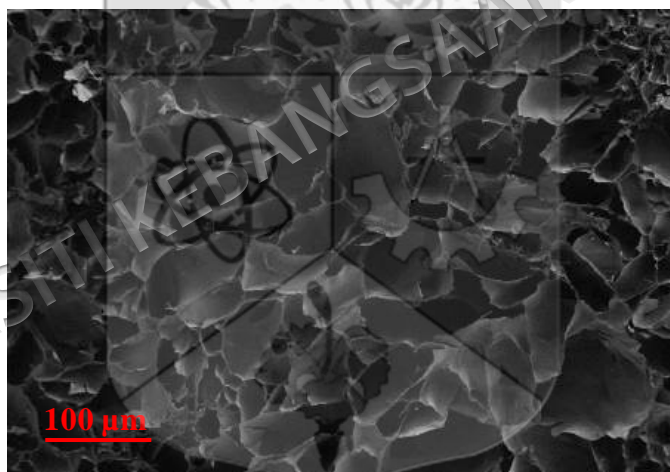
#### 4.6 NANOSTRUKTUR

Nanostruktur dapat dilihat di atas permukaan hidrogel dengan menggunakan alat SEM. Kesemua gambar di bawah menunjukkan struktur mikropori perancah. Imej diambil pada pembesaran  $50\times$ . Bar skala merah bersamaan dengan  $100\ \mu\text{m}$ . Taburan liang berdasarkan saiz dapat dilihat berdasarkan garis bar di Rajah 4.7. Berdasarkan analisis, kesemua kumpulan berada di bawah purata saiz pori  $60\ \mu\text{m}$ . Untuk ujian ini, hanya 3 daripada 6 kumpulan sampel telah diuji berikutan dengan sifat fiziko-kimia yang lebih baik dan stabil.

**C8G2Gnp0.3**

Rajah 4.6

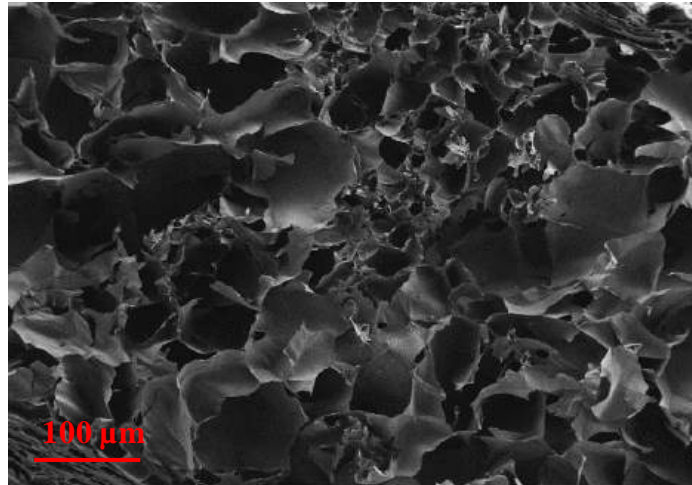
Mikro-struktur pandangan keratan rentas kumpulan C8G2Gnp0.3

**C6G2Gnp0.4**

Rajah 4.7

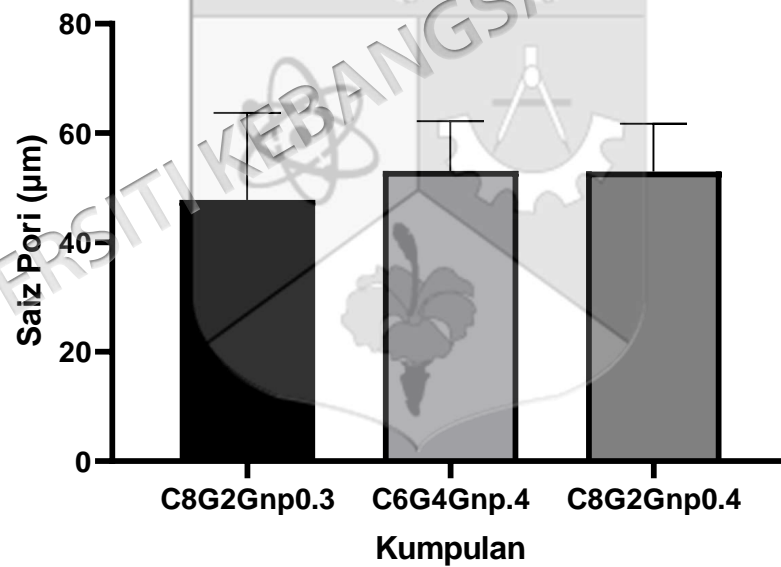
Mikro-struktur pandangan keratan rentas kumpulan C6G2Gnp0.4

## C8G2Gnp0.4



Rajah 4.8

Mikro-struktur pandangan keratan rentas kumpulan C8G2Gnp0.4

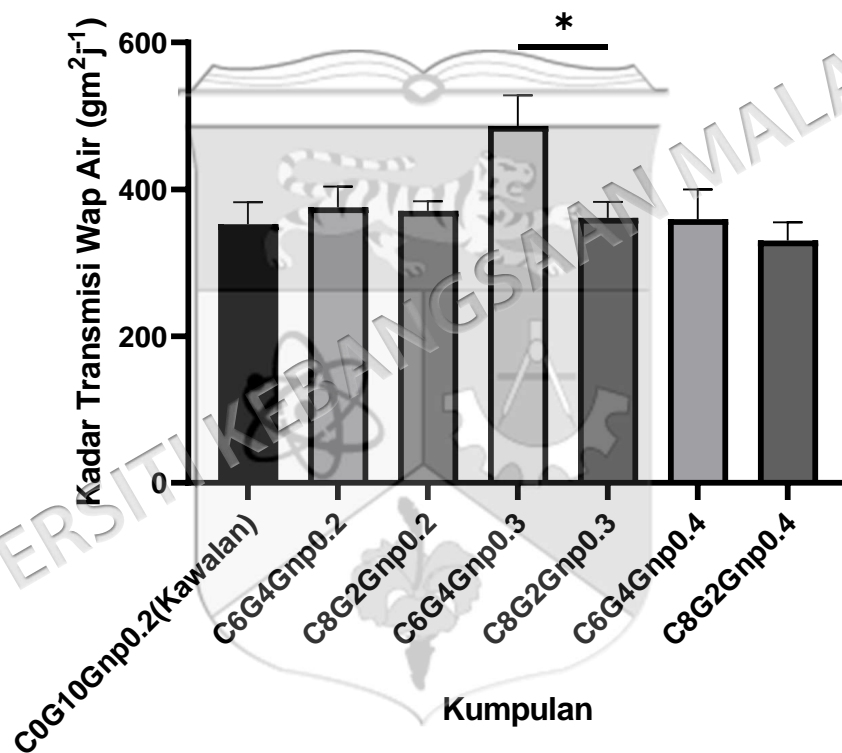


Rajah 4.9

Saiz pori hidrogel. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 2 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way anova*. Tia da perbezaan signifikan di dalam taburan saiz pori untuk setiap kumpulan.

#### 4.7 KADAR TRANSMISI WAP AIR (WVTR)

WVTR diukur bertujuan untuk menilai kadar wap air yang meresap melalui biokerangka pada keadaan tertentu. Hasil kajian mendapati bahawa kumpulan C6G4Gnp0.4 memperoleh purata kadar transmisi wap air yang tertinggi iaitu  $486.18 \text{ gm}^2\text{j}^{-1}$ , dan terdapat perbezaan signifikan dengan kumpulan yang lain. Akan tetapi, semua kerangka hidrogel menunjukkan WVTR kurang daripada  $1500 \text{ gm}^2\text{j}^{-1}$ , di mana bacaan WVTR perlulah lebih daripada  $1500 \text{ gm}^2\text{j}^{-1}$  berikutan kandungan lembapan optimum untuk sel proliferasi dan fungsi biasa.

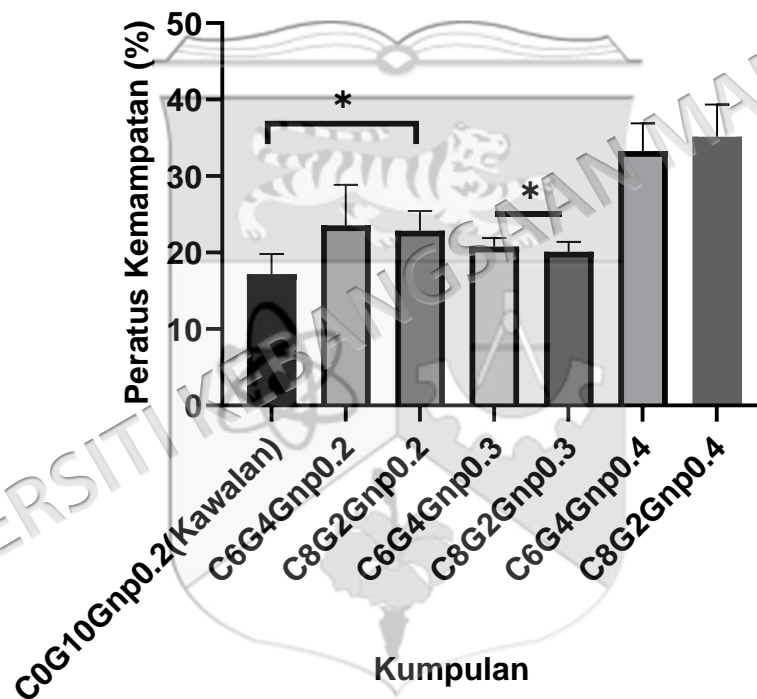


Rajah 4.10 Kadar WVTR. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 3 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way* anova (*nilai-p* > 0.05)

#### 4.8 KEMAMPATAN DAN DAYA TAHAN

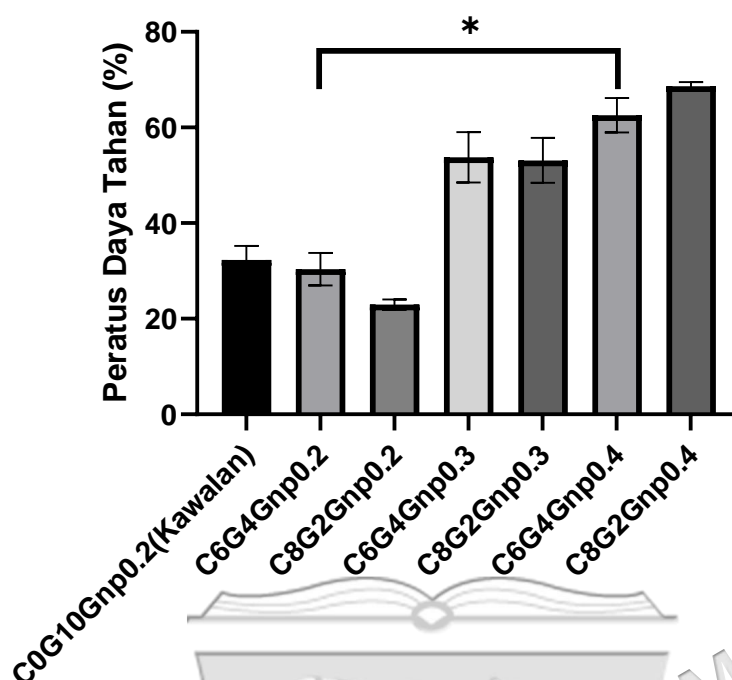
Sifat kemampatan dan daya tahan biobahan ialah parameter kritikal yang menentukan kesesuaiannya untuk pelbagai aplikasi bioperubatan. Kemampatan merujuk kepada

keupayaan biobahan untuk menahan daya yang menolak atau menghimpit yang menghasilkan pengurangan isipadu atau ketebalannya manakala daya tahan ialah ukuran keupayaan bahan untuk menyerap tenaga apabila proses deformasi secara anjal berlaku dan membebaskan tenaga itu semasa beban tersebut diturunkan. Berdasarkan Rajah 4.1 (a)-(b) , setiap kumpulan menunjukkan bacaan peratus kemampatan berada dibawah 40% dan peratus daya tahan di bawah 80%. Kumpulan C8G2Gnp0.4 mempunyai bacaan peratus kemampatan dan daya tahan yang tertinggi iaitu 68.62% dan 35.16% masing-masing sekaligus mempamerkan kekakuan, kekuatan mampatan yang tinggi dan keanjalan untuk daya tahan yang sangat baik.



Rajah 4.11 (a)

Peratus Kemampatan



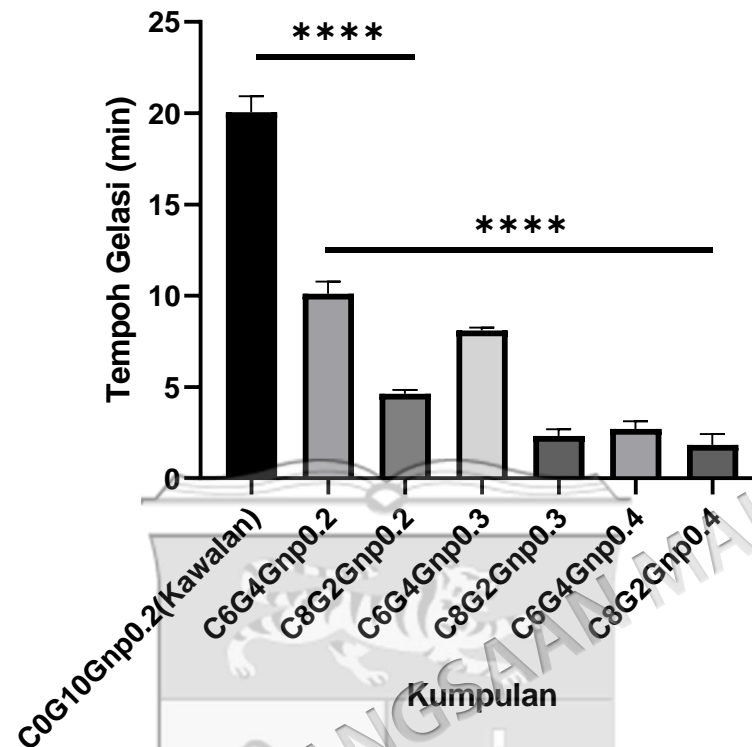
Kumpulan  
Rajah 4.11 (b) Peratus Daya Tahan

Rajah 4.11 (a)-(b)

Kompresi dan Resilen. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 2 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way anova* (nilai- $*$   $p < 0.05$ ).

#### 4.9 TEMPOH GELASI

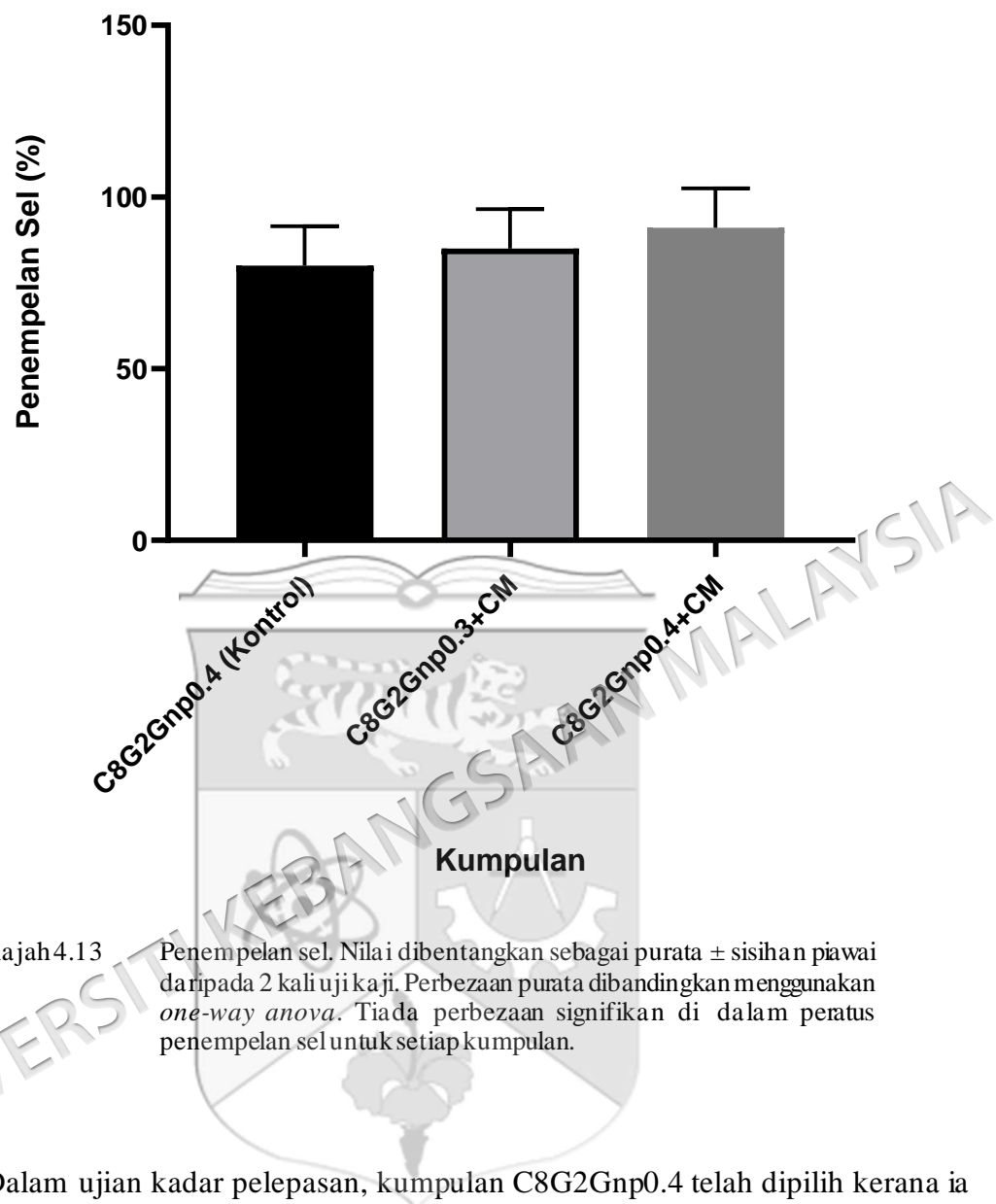
Tempoh gelasi ialah parameter penting dalam pembangunan biobahan kerana ia menentukan tingkah laku dan prestasi biobahan terutamanya hidrogel, biobahan suntikan, dan perancah yang digunakan dalam kejuruteraan tisu. Ia mentakrifkan tempoh yang diperlukan untuk biobahan beralih daripada keadaan cecair atau separa cecair kepada keadaan yang lebih pepejal, seperti gel. Kajian mendapati bahawa C8G2Gnp0.4 ialah kumpulan ter pantas untuk berubah menjadi gel dan terpolimer berbanding kumpulan lain dan C0G10Gnp0.2 menjadi kumpulan yang paling terlambat. Hal ini kerana, nisbah kandungan karrageenan di dalam hidrogel lebih tinggi berbanding gelatin. Selain itu, kepekatan genipin yang tinggi juga menjadi salah satu penyumbang kepada tempoh gelasi yang singkat.



Rajah 4.1 Tempoh gelasi. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 2 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way anova* (*nilai-p* < 0.0001)

#### 4.10 PENEMPELAN SEL, KADAR PELEPASAN DAN PENILAIAN JANGKA HAYAT-SIMPANAN

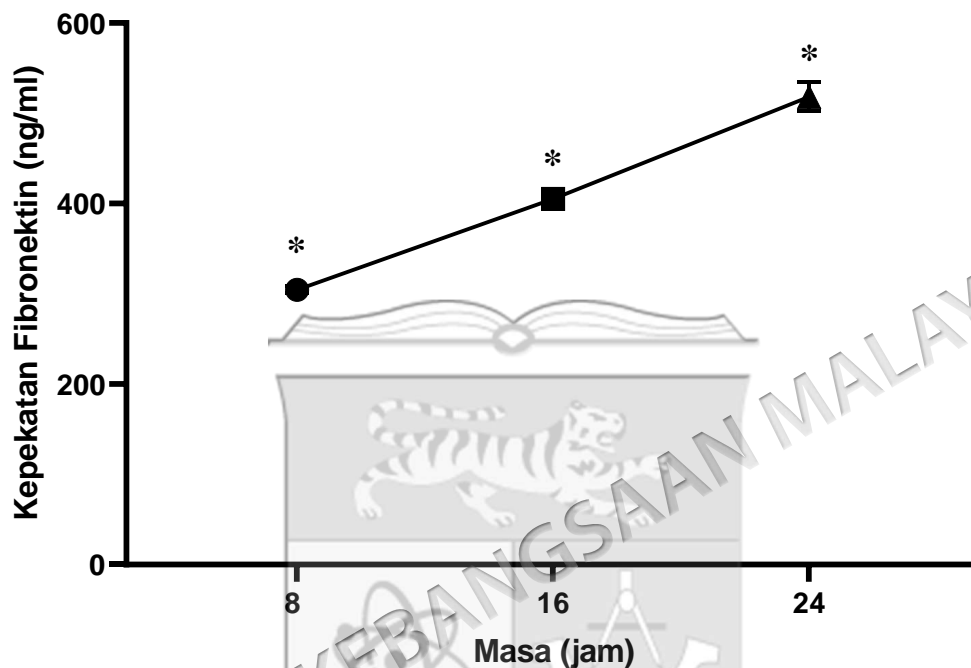
Penempelan sel ialah aspek penting biobahan dalam kejuruteraan tisu dan perubahan regeneratif. Ia melibatkan kapasiti sel untuk melekat pada permukaan biobahan atau perancah, yang penting untuk keberkesanan bahan-bahan ini dalam memudahkan proses pembaikan dan penjanaan semula tisu. Hanya tiga kumpulan termasuk kumpulan kawalan diuji berikutan sigati fiziko-kimia yang lebih baik berbanding yang lain. Kajian ini mendapati bahawa kesemua kumpulan yang diuji mengecapi 80% penempelan tisu di atas permukaan perancah hidrogel. Perancah hidrogel yang mencapai lebih 80% penempelan sel menunjukkan bahawa perancah ini menyediakan persekitaran yang sesuai untuk sel melekat dengan cekap dan sekaligus menjadi penunjuk kukuh perancah yang berpotensi untuk menyokong penjanaan semula tisu.



Rajah 4.13 Penempelan sel. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 2 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way anova*. Tiada perbezaan signifikan di dalam peratus penempelan sel untuk setiap kumpulan.

Dalam ujian kadar pelepasan, kumpulan C8G2Gnp0.4 telah dipilih kerana ia mempunyai sifat fiziko-kimia dan biologi yang paling baik berbanding kumpulan yang lain. Latutan C8G2Gnp0.4 telah dicampurkan dengan 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  medium kondisi fibroblas hidung (NFCM) dan dibentuk menjadi hidrogel. Seterusnya hidrogel yang difabrikkan telah melalui proses bahan larut serap bagi menguji kepekatan fibronektin dengan menggunakan kit ELISA fibulin-I manusia. Pengaruh kandungan fibronektin terhadap penempelan selular adalah penting untuk kejuruteraan tisu kerana ia membantu merekrut sel ke perancah, menggalakkan integrasi serta penjanaan semula tisu. Kehadiran fibronektin dalam medium merupakan penunjuk utama bagi keberhasilan pembebasan sekretom NFCM daripada hidrogel. Justeru, kadar profil pelepasan NFCM daripada C8G2Gnp0.4 ini dari semasa ke semasa telah diukur untuk

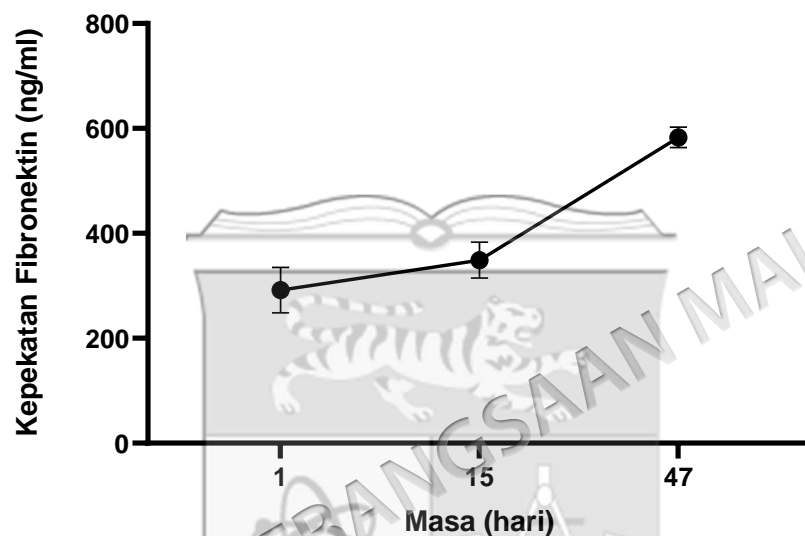
menilai sejauh mana keberkesanan media terkondisi boleh dikekalkan dan dihantar dengan cara yang terkawal. Seperti di Rajah 4.14, profil pelepasan fibronektin daripada hidrogel C8G2Gnp0.4 menunjukkan hasil yang positif berikutan terdapat peningkatan kepekatan fibronektin yang konsisten sepanjang 24 jam.



Rajah 4.14 Kadar pelepasan fibronektin daripada karr-gel + CM. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 2 kali uji kaji. Perbezaan purata dibandingkan menggunakan *one-way anova* (nilai- $*p < 0.05$ ).

Penilaian jangka hayat perancah hidrogel C8G2Gnp0.4 yang dimuatkan dengan NFCM telah dinilai dengan mengukur kepekatan fibronektin dalam medium selepas medium selepas inkubasi jangka panjang perancah hidrogel yang difabrikkan. Tujuan penilaian ini adalah untuk menentukan berapa lama ketahanan sifat bioaktif NFCM, terutamanya fibronektin, kekal stabil dan berfungsi dari semasa ke semasa apabila disimpan atau digunakan dalam aplikasi yang berpanjangan. Parameter ini penting untuk memastikan perancah tersebut mengekalkan potensi terapeutiknya semasa dalam proses penyimpanan atau penggunaan dalam aplikasi kejuruteraan tisu. Merujuk kepada Rajah 4.15, C8G2Gnp0.4 telah teruraian sepenuhnya pada hari ke-47 dan bacaan kepekatan fibronektin  $582.99 \pm 39.85$  ng/ml boleh dikesan dalam medium ampai. Keupayaan perancah hidrogel C8G2Gnp0.4 untuk mengekalkan fibronektin dalam

keadaan bioaktif dan berfungsi untuk tempoh yang panjang, khususnya sehingga 47 hari. Peningkatan kepekatan fibronektin menunjukkan proses penguraian hidrogel telah berlaku secara beransur-ansur dari semasa ke semasa. Walaupun selepas 47 hari, fibronektin masih boleh dikesan dalam medium dan membuktikan bahawa ia dapat mengekalkan aktiviti biologinya dan tidak merosot atau kehilangan fungsi dalam tempoh ini.



Rajah 4.14 Kadar pelepasan fibronektin untuk menilai jangka hayat simpanan. Nilai dibentangkan sebagai purata  $\pm$  sisihan piawai daripada 2 kali uji kaji. Tiada perbezaan signifikan yang diperhatikan dari segi pelepasan berkala fibronektin.

## **BAB IV**

### **PERBINCANGAN**

Pada era globalisasi ini, peningkatan pembuatan hidrogel berlaku bertujuan untuk membangunkan model in vitro epitelium saluran pernafasan. Model in vitro berasaskan hidrogel sangatlah berkesan dalam mereplikasi persekitaran mikro tiga dimensi (3D) kompleks saluran pernafasan serta membuahkan landasan yang lebih tepat untuk mengkaji tingkah laku sel epitelium saluran pernafasan di bawah keadaan normal dan tidak normal. Dengan menyerupai ciri struktur dan biokimia saluran pernafasan asli, model ini memberikan pandangan yang berharga tentang cara sel epitelium berinteraksi dengan matriks sekelilingnya dan antara satu sama lain. Ia membolehkan para penyelidik meneroka mekanisme penyakit utama termasuk tindak balas selular terhadap patogen, kesan bahan pencemar alam sekitar dan perkembangan penyakit pernafasan kronik. Model 3D juga berupaya untuk mengkaji sel migrasi, sel pembezaan dan penjanaan semula tisu, dengan lebih baik tidak seperti kultur dua dimensi (2D) tradisional (Lee et al., 2023). Oleh itu, kajian ini dilakukan bagi membangun serta menambah baik lagi biobahan yang telah dicipta sebelum ini.

Dalam kajian ini, biobahan yang baru difabrikasikan telah dinilai bagi keupayaannya untuk menyokong dalam aplikasi penjanaan semula epitelium saluran pernafasan pada masa yang akan datang. Biobahan yang digunakan ialah hidrogel karragen yang ditaut silang dengan genipin. Secara teknikal, penilaian dilakukan berdasarkan beberapa parameter iaitu kadar bioterurai, keporosan, nisbah kebengkakan dan kompresi serta resilen. Komposisi karragenan, gelatin dan genipin memainkan peranan penting dalam menentukan prestasi ciri fizikokimia dan biologi hidrogel yang terhasil, dan kepelbagaian nisbah boleh mempengaruhi hasil uji kaji. Kepekatan karragenan terutamanya akan mengawal integriti struktur, porositi dan tingkah laku pengembangan

hidrogel kerana keupayaannya membentuk rangkaian polisakarida yang stabil, di mana kepekatan yang lebih tinggi biasanya meningkatkan kekuatan gel dan berkemungkinan mengurangkan saiz pori dan kemampuan penyebaran sel (García-García et al., 2019). Sebaliknya, gelatin menyumbang kepada motif pengikatan sel bioaktif dan meningkatkan biokeserasian. Walaubagaimanapun, peningkatan kandungan gelatin boleh mengurangkan kestabilan mekanikal dan mempercepat penguraian jika tidak ditaut silang dengan secukupnya (Wang et al., 2021). Genipin bertindak sebagai agen taut silang semula jadi yang menstabilkan rangkaian polimer dengan membentuk ikatan kovalen dengan kumpulan amino dalam gelatin seterusnya mampu meningkatkan kekuatan mekanikal dan mengawal penguraian (Ahmed et al., 2022).

Berdasarkan kajian yang dilakukan, hibrid hidrogel iaitu karr/gel ditaut-silang genipin berjaya menunjukkan kadar bioterurai yang sesuai, bacaan keporosan dan nisbah kebengkakan yang baik serta mempunyai struktur fizikal yang lebih kukuh. Hidrogel karr-gel bagi kumpulan C6G4Gnp0.4 dan C8G2Gnp0.4 mengalami proses bioterurai sepenuhnya pada minggu ke-5. Secara amnya, rangka bahan yang optimum harus kekal stabil semasa fasa awal keradangan dan proliferaatif penyembuhan, kemudian akan terurai secara beransuran apabila pematapan matriks ekstraselular dan pematangan tisu berlaku. Bagi kebanyakan jenis tisu, tempoh bioterurai berlaku bermula dari beberapa minggu hingga beberapa bulan bagi tisu yang cepat pulih, dan sehingga 1–2 tahun bagi tisu yang pulih lebih perlahan seperti tulang rawan atau tulang, di mana sokongan struktur yang berpanjangan diperlukan. Dalam kebanyakan strategi dalam aplikasi kejuruteraan tisu pada saluran pernafasan, jangka masa terurai yang disyorkan berkisar dari sekitar 2–12 minggu untuk aplikasi pembaikan epitel yang ringkas, manakala pembinaan saluran pernafasan atau trakea yang lebih kompleks mungkin memerlukan kestabilan yang lanjutan sehingga 3–6 bulan bagi menyokong pematangan epitel sepenuhnya, integrasi vaskular dan penyusunan semula matriks ekstraselular (Elliott et al., 2021). Ketidaksamaan dalam masa terurai boleh menyebabkan komplikasi klinikal iaitu penguraian pramatang yang boleh mengakibatkan keruntuhan saluran pernafasan atau liputan epitel yang tidak lengkap, manakala ketahanan yang terlalu lama boleh menyumbang kepada keradangan kronik, risiko jangkitan akibat pemeliharaan mukus dan pengurangan pembersihan (Porzionato et al., 2023). Penguraian gelatin dikawal oleh gabungan mekanisme sinergistik,

terutamanya pemecahan hidrolik, penguraian enzimatik dan pelarutan fizikal (Gómez-Guillén et al., 2011). Dalam persekitaran berair, gelatin mengalami hidrolisis ikatan peptidnya yang membawa kepada penguraian rangkaian polimernya secara beransur-ansur (Zhao et al., 2017). Dalam sistem biologi, enzim proteolitik seperti metalloproteinasi matriks (MMP) dan kolagenase mempercepat lagi penguraian dengan memecahkan rantai protein secara khusus. Proses-proses ini saling berkaitan, kerana penyerapan air meningkatkan kedua-dua tindak balas hidrolik dan kebolehcapaian enzim, seterusnya memperkuat keseluruhan penguraian (Bello & Oyekanmi, 2020). Kepekatan genipin yang tinggi berhasil menjadikan hibrid hidrogel yang lebih kukuh dan stabil kerana sifat genipin dalam meningkatkan kestabilan mekanikal biobahan, pada masa yang sama berjaya melambatkan penguraian untuk dimuatkan dengan kadar penyembuhan tisu (Mc Gann et al., 2015). Selain itu, penguraian penuh menjelang minggu ke-5 membawa maksud kepada kedua-dua perancah (C6G4Gnp0.4 dan C8G2Gnp0.4) telah hancur sepenuhnya. Penguraian biasanya berlaku melalui hidrolisis, aktiviti enzimatik atau proses biologi lain di mana air dan enzim dalam badan memecahkan biobahan kepada komponen lebih kecil yang dimetabolismakan atau dikumuhkan (Hynes et al., 2023). Garis masa penguraian selama 5 minggu mempamerkan bahawa bahan-bahan tersebut direka untuk kadar penguraian sederhana, sesuai untuk menyokong penjanaan semula tisu jangka pendek hingga pertengahan. Jangka masa ini mungkin sejajar dengan aplikasi epitelium saluran pernafasan di mana perancah perlu menyokong sel selama beberapa minggu, membolehkan penempelan sel awal, proliferasi dan pendedapan matriks sebelum merosot apabila tisu yang baru terbentuk mengambil alih (Varma et al., 2018). Kadar penguraian adalah penting dalam memastikan biobahan melaksanakan fungsi yang sesuai. Hal ini kerana jika bahan terurai terlalu cepat, ia tidak akan memberikan sokongan struktur yang mencukupi untuk sel tumbuh dan membentuk tisu baru serta boleh menyebabkan integrasi dan pembentukan tisu yang lemah. Manakala jika bahan itu mengalami penguraian terlalu perlahan, ia mungkin menghalang pembentukan tisu baru atau menyebabkan keradangan akibat kehadiran bahan asing yang berpanjangan di dalam badan. Dengan kadar penguraian sepenuhnya dalam masa 5 minggu, perancah hidrogel karr-gel mencapai keseimbangan optimum, memberikan sokongan mekanikal yang mencukupi semasa peringkat awal penyembuhan tisu serta membenarkan integrasi tisu dan mengelakkan kehadiran bahan asing jangka panjang.

Keporosan atau keliangan biobahan untuk penjanaan semula epitelium saluran pernafasan adalah penting dalam mempengaruhi keupayaan bahan untuk menggalakkan pertumbuhan tisu, mengawal tingkah laku sel, memudahkan pertukaran nutrien dan mengekalkan sifat mekanikal (Hernandez et al., 2022). Keporosan yang tinggi dalam biobahan yang digunakan untuk epitelium saluran pernafasan membolehkan pertempelan sel dan migrasi sel epitelium yang lebih baik (Mittal et al., 2012). Struktur permukaan berliang biobahan mampu menyerupai ECM semula jadi di mana ia dapat menyediakan kawasan permukaan yang mencukupi untuk sel melekat dan merebak. Struktur liang yang saling berkait memudahkan pergerakan sel basal dan dapat menjana semula epitelium saluran pernafasan (Raby et al., 2023). Proses ini penting untuk membangunkan epitelium berstrata yang merangkumi sel khusus seperti sel bersilia dan sel goblet. Selain daripada itu, epitelium saluran pernafasan memerlukan bekalan oksigen, nutrien, dan faktor pertumbuhan yang mencukupi untuk hidup dan percambahan sel. Biobahan yang sangat berliang akan memastikan nutrien dan oksigen boleh meresap dengan mudah ke seluruh perancah. Peningkatan keliangan meningkatkan resapan oksigen dan nutrien, menyokong kemandirian dan percambahan sel epitelium (Bruz˙auskaite et al., 2015). Perancah berliang juga boleh menyokong fungsi mukosiliari dengan membenarkan sel bersilia tumbuh dan membentuk silia berfungsi bagi mengekalkan mekanisme pertahanan semula jadi saluran pernafasan melalui pembersihan lendir. Walaupun keporosan yang tinggi bermanfaat untuk pertumbuhan sel dan pengangkutan nutrien, ia boleh menjejaskan sifat mekanikal biobahan (Morawska, 2021). Dalam konteks epitelium saluran pernafasan, perancah mestilah cukup fleksibel untuk menyokong pergerakan pernafasan. Walaubagaimanapun, kajian ini mendapati bahawa kesemua kumpulan hibrid hidrogel mempunyai keporosan di bawah 30%, yang boleh mempengaruhi pembiakan sel di mana sel tidak dapat bergerak dengan mudah ke dalam kerangka dan kekurangan nutrient dan oksigen yang mengakibatkan kepada pelambatan sel proliferasi.

Di samping itu, hasil ujian untuk sudut sentuhan bagi semua kumpulan hidrogel berada di bawah 90°. Ini membuktikan bahawa semua kumpulan menunjukkan sifat permukaan hidrofilik yang sangat diperlukan untuk kegunaan pada aplikasi biobahan dalam epitelium saluran pernafasan. Secara umum, sudut sentuhan yang lebih rendah daripada 90° menunjukkan keterbasahan yang kuat dan membolehkan air atau cecair

biologi merebak dengan mudah di seluruh permukaan bahan (Liu, H. et al., 2021). Ciri ini amat penting dalam persekitaran epitelium saluran pernafasan, di mana kehadiran mukus dan kelembapan tinggi memerlukan biobahan untuk mengekalkan penghidratan yang berkesan dan keserasian permukaan (Peng, T. et al., 2023). Dari perspektif biologi, permukaan hidrofilik (sudut sentuhan  $< 90^\circ$ ) diketahui dapat meningkatkan lekatan sel, proliferasi dan pembentukan lapisan epitel yang penting untuk penjana semula dan pemodelan epitelium saluran pernafasan (Kelly, S. J. et al., 2024). Selain itu, permukaan yang basah telah terbukti mempengaruhi tindak balas tisu awal, di mana peningkatan hidrofilik meningkatkan penyerapan protein yang menggalakkan dan menyokong penempelan sel epitelium. Ini amat penting bagi model saluran pernafasan *in vitro* kerana epitelisasi yang betul bergantung pada interaksi permukaan–sel yang dikawal oleh keterbasahan (Wang, C. et al., 2023). Walaupun semua kumpulan bersifat hidrofilik, perbezaan kecil dalam sudut sentuhan antara setiap kumpulan mungkin dipengaruhi oleh variasi dalam ketumpatan taut-silang, komposisi dan morfologi permukaan (Matthew et al., 2026). Semua kumpulan dalam kajian ini dijangka dapat menyokong interaksi dan pengekal cecair yang cekap, meniru persekitaran mikro hidrasi semula jadi tisu saluran pernafasan. Secara keseluruhannya, hidrofilk konsisten yang ditunjukkan mencadangkan bahawa bahan-bahan ini sesuai digunakan untuk aplikasi epitelium saluran pernafasan kerana ia mempunyai permukaan yang lembap dan biokeserasian yang menyokong interaksi sel, hidrasi mukus, dan integrasi tisu (Wang, 2022).

Seterusnya, komposisi polimer memainkan peranan penting dalam menentukan tingkah laku pembengkakan biobahan. Kumpulan yang mempunyai nisbah pembengkakan tertinggi mengandungi jumlah komponen hidrofilik yang lebih besar secara semula jadinya akan menarik lebih banyak air, lalu mengakibatkan peningkatan kebengkakan (Peters et al., 2021). Ini adalah kerana kumpulan hidrofilik mempunyai pertalian yang kuat untuk air, mudah membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air serta meningkatkan pengambilan air (Rodrigues et al., 2021). Epitelium saluran pernafasan memerlukan persekitaran yang lembap untuk berfungsi dengan berkesan. Kelembapan ini diperlukan untuk pembersihan mukosiliari, di mana silia pada sel epitelium menggerakkan lendir untuk memerangkap dan mengeluarkan patogen dan serpihan (Adivitiya et al., 2021). Bahan bengkak, seperti hidrogel boleh menyerap

cecair dan mengekalkan penghidratan serta mewujudkan persekitaran basah yang serupa yang menyokong daya maju sel epitelium dan meniru saluran pernafasan semula jadi. Justeru, gabungan hidrogel karr-gel dalam kajian ini menghasilkan nisbah pembengkakan yang baik kerana kedua-duanya adalah daripada kumpulan hidrofilik. Apabila biobahan membengkak, struktur liangnya boleh berubah dan akan mempengaruhi pengangkutan nutrien, oksigen, dan molekul isyarat ke sel epitelium yang tertanam atau di sekelilingnya (Liu S et al., 2021). Kajian pembengkakan membantu menilai bagaimana keliangan bahan dipengaruhi oleh pengambilan air, yang secara langsung boleh memberi kesan kepada penyusupan selular dan pertukaran nutrien. Bahan dengan tingkah laku bengkak yang optimum menyediakan struktur berliang bagi memudahkan penyebaran nutrien penting dan penyingkiran sisa metabolik, mewujudkan persekitaran yang kondusif untuk sel proliferasi dan penjanaan semula tisu. Faktor lain yang menyumbang kepada peningkatan nisbah pembengkakan ialah luas permukaan biobahan itu sendiri (Feng W et al., 2023). Nisbah luas permukaan kepada isipadu biobahan mempengaruhi seberapa cepat ia membengkak. Ini boleh dilihat daripada bahan dengan luas permukaan yang lebih tinggi berbanding isipadunya menyerap air dan membengkak lebih cepat kerana ia mempunyai lebih banyak pendedahan kepada cecair sekeliling. Dalam hal ini, kumpulan C6G4Gnp0.4 menunjukkan nisbah pembengkakan yang paling tinggi bermungkinan disebabkan kerangka hibrid hidrogel yang kurang tebal berbanding kumpulan yang lain. Ini kerana struktur dalaman dalam hidrogel kumpulan C6G4Gnp0.4 adalah kurang padat atau mempunyai penghalang permukaan yang lebih rendah berbanding kumpulan lain. Permukaan hibrid hidrogel yang lebih nipis ini membolehkan molekul air meresap dengan lebih cepat ke dalam rangkaian. Ini juga boleh meningkatkan pendedahan berkesan kumpulan fungsi hidrofilik (seperti kumpulan hidroksil, karboksil, atau amina), yang menarik dan mengikat air melalui ikatan hidrogen.

Kerangka hidrogel dengan saiz pori kurang daripada  $60\ \mu\text{m}$  memainkan peranan penting dalam mengawal tingkah laku sel dan amat sesuai untuk aplikasi kejuruteraan tisu saluran pernafasan. Kajian sebelum ini telah menunjukkan bahawa saiz liang dalam julat kira-kira  $25\text{--}60\ \mu\text{m}$  memberikan keseimbangan optimum antara penempelan sel dan penyebaran nutrien, yang penting untuk penjanaan tisu yang berkesan (Mukasheva et al., 2024). Struktur pori yang lebih kecil meningkatkan luas permukaan yang tersedia

untuk lekatan sel. Seterusnya ia mendorong kepada kepadatan sel yang lebih tinggi dan meningkatkan interaksi sel-sel di mana ia menjadi komponen penting untuk pembentukan lapisan epitel. Dalam aplikasi kejuruteraan tisu saluran pernafasan, bacaan saiz pori di bawah  $60\ \mu\text{m}$  ini amat penting kerana epitelium saluran pernafasan memerlukan sel yang padat untuk mengekalkan fungsi penghalang dan aktiviti fisiologi yang betul. Walaupun saiz pori hidrogel yang lebih besar mungkin memudahkan vaskularisasi dan penembusan sel yang lebih mendalam, pori yang lebih kecil adalah lebih berkesan pada peringkat awal pembangunan tisu, terutamanya dalam membentuk lapisan epitelium yang seragam (Zhu et al., 2018). Selain itu, kajian model saluran pernafasan terkini telah menunjukkan bahawa kerangka hidrogel dengan saiz liang dalam julat  $15\text{--}56\ \mu\text{m}$  mampu menyokong pertumbuhan dan pembezaan epitelium saluran pernafasan di bawah keadaan antara muka udara-cecair, sekali gus mengesahkan lagi kesesuaiannya untuk aplikasi tisu pernafasan (Nejati & Mongeau, 2023). Oleh itu, hidrogel dengan saiz liang kurang daripada  $60\ \mu\text{m}$  dianggap sangat sesuai untuk kejuruteraan tisu saluran pernafasan, kerana ia memberikan keseimbangan antara kestabilan mekanikal, lekatan sel, dan pembentukan tisu berfungsi.

Parameter kadar transmisi wap air (WVTR) sangatlah berkeperluan dalam aplikasi seperti penyembuhan luka, penghantaran ubat (drug) dan kejuruteraan tisu kerana ia memengaruhi keseimbangan kelembapan, pencegahan dehidrasi dan prestasi secara menyeluruh (Norahan et al., 2020). WVTR merujuk kepada jumlah wap air yang boleh melalui kawasan unit hidrogel per unit masa dan menjadi penunjuk kebolehtelapan hidrogel kepada wap air (Cazon et al., 2022). WVTR amat penting dalam menghasilkan biobahan yang sesuai kerana biobahan yang dihasilkan akan berinteraksi dengan tisu biologi atau persekitaran luaran. Merujuk kepada hasil kajian ini, kumpulan kumpulan C6G4Gnp0.4 memperolehi purata kadar transmisi wap air yang tertinggi berbanding kumpulan lain. Ini menunjukkan bahawa hidrogel C6G4Gnp0.4 berkemampuan untuk mengeluarkan wap air yang lebih banyak dan hidrogel C8G2Gnp0.4 yang mempunyai WVTR yang paling rendah menunjukkan bahawa hidrogel tersebut lebih tahan lembapan. Perbezaan bacaan WVTR bergantung kepada ketebalan lapisan hidrogel sekaligus memberi impak yang besar kepada nilai bacaannya. Hidrogel yang lebih nipis cenderung mempunyai kadar penghantaran wap air yang lebih tinggi kerana wap boleh melalui bahan dengan lebih mudah. Apabila

ketebalan meningkat, WVTR berkurang kerana wap air mempunyai laluan yang lebih panjang untuk meresap melalui struktur hidrogel (Jarvis et al., 2017). Kajian lepas menunjukkan bahawa bacaan WVTR sekitar 2000 g/m<sup>2</sup>/hari memberikan keseimbangan kelembapan yang optimum telah meningkatkan proliferasi dan fungsi sel epitel, manakala nilai yang lebih rendah (kurang 1000 g/m<sup>2</sup>/hari) dan terlalu tinggi (lebih 3000 g/m<sup>2</sup>/hari) boleh memberi kesan negatif kepada penjanaan tisu dalam aplikasi kejuruteraan tisu saluran pernafasan (Xu et al., 2016). Oleh itu, untuk reka bentuk biobahan, WVTR terkawal dalam julat sederhana (1500–2500 g/m<sup>2</sup>/hari) secara amnya dianggap sesuai untuk meniru keadaan jalan pernafasan fisiologi dan menyokong penjanaan epitelium yang optimum. Julat ini menyediakan pengawalan kelembapan yang mencukupi sambil memastikan biobahan mengekalkan persekitaran terhidrat, penting untuk fungsi sel epitelium, dan masih membenarkan pertukaran gas yang betul (oksigen dan karbon dioksida) yang diperlukan untuk kesihatan sel. Namun begitu, kajian ini gagal menghasilkan hidrogel yang mempunyai WVTR yang lebih daripada 1500 hingga 2500 g/m<sup>2</sup>/hari berikutan semua kumpulan hibrid hidrogel berada di bawah bacaan 600 g/m<sup>2</sup>/hari. Justeru, untuk parameter WVTR hibrid hidrogel ini tidak sesuai jika digunakan di kawasan yang memerlukan resapan gas atau untuk penyembuhan luka. Hal ini kerana WVTR di bawah 1000 g/m<sup>2</sup>/hari boleh menyumbang kepada keadaan hipoksia (paras oksigen rendah) yang membawa kepada fungsi selular terjejas, penyembuhan yang lebih perlahan, atau bahkan kematian sel jika oksigen tidak boleh meresap dengan cekap melalui hidrogel (Silvestro et al., 2020).

Di samping itu juga, hasil kajian mendapati bahawa semua kumpulan hidrogel karr-gel menghasilkan bacaan mampatan di bawah 40%. Berdasarkan kajian sebelumnya, bahan harus menahan sekurang-kurangnya 30% mampatan tanpa mengalami ubah bentuk plastik dan deformasi (Li. L, et al., 2023). Oleh itu, kebanyakan kajian menasarkankan untuk membuat biobahan yang mencapai nilai modulus mampatan dalam julat terikan 10%–30%. Hibrid hidrogel yang difabrikkan di dalam kajian ini telah dimampatkan di bawah 40% daripada isipadu asalnya dan mengakibatkan beberapa proses mekanikal dan biologi telah berlaku. Perubahan elastik tersebut menyebabkan bahan boleh kembali kepada bentuk asalnya sebaik sahaja daya mampatan dikeluarkan. Walau bagaimanapun, apabila mampatan meningkat ke arah 40%-50%, bahan mungkin mengalami beberapa tahap ubah bentuk plastik dan

membawa kepada perubahan kekal dalam struktur. Hidrogel yang dimampatkan juga akan mempengaruhi tegasan yang meningkat secara tidak linear dengan terikan (ubah bentuk berbanding saiz asal). Pada mampatan yang lebih rendah (<40%), umumnya biobahan akan bertindak mengikut Undang-undang Hooke, di mana tegasan berkadar langsung dengan ketegangan (Gilbert, 2022). Di luar ambang ini, bahan mungkin mempamerkan tindak balas atau kegagalan yang tidak linear. Selain itu, perancah hibrid hidrogel ini mempunyai keupayaan penyerapan tenaga yang tinggi. Pada mampatan di bawah 40%, hidrogel yang telah difabrikkan boleh menyerap tenaga mekanikal dengan cekap tanpa kerosakan kekal (Sun Q et al., 2022). Ini sangatlah berguna dalam aplikasi model *in vitro* epitelium saluran pernafasan kerana perancah tisu atau implan yang digunakan mestilah menyerap kejutan atau tegasan. Mampatan yang kurang daripada 40% juga akan mempengaruhi viabiliti sel (Onal et al., 2022). Bacaan mampatan sederhana boleh menggalakkan tingkah laku selular tertentu, seperti pembezaan atau proliferasi, manakala jika bacaan kompresi yang terlalu banyak boleh membahayakan sel atau menjejaskan fungsinya (Sun Y dan Li, 2018). Tekanan mekanikal menggalakkan pembezaan sel epitelium kepada sel bersilia atau goblet. Kedua-dua sel itu adalah penting bagi mengekalkan mekanisme pembersihan mukosiliari di saluran pernafasan. Tambahan pula, sel akan mengesan perubahan mekanikal dalam persekitaran mereka. Hasil bacaan kompresi di dalam kajian ini, boleh meningkatkan mekanotransduksi di mana ia menyebabkan sel mengubah suai ekspresi gen, sintesis protein dan aktiviti lain sebagai tindak balas kepada rangsangan mekanikal (Wagh et al., 2021). Proses ini memainkan peranan penting dalam penjanaan semula tisu dengan menggalakkan pertumbuhan dan pembaikan. Sementara itu, nilai bacaan daya tahan bagi semua kumpulan hidrogel karr-gel mengecapi di bawah nilai 80%. Hidrogel terutamanya yang digunakan di dalam aplikasi bioperubatann, direka bentuk untuk berubah bentuk secara anjal apabila tertakluk kepada daya mekanikal. Apabila dimampatkan atau diregangkan kepada kurang daripada 80% daripada saiz awalnya, hidrogel mengekalkan keupayaannya untuk kembali kepada bentuk asal sebaik sahaja daya dikeluarkan. Daya tahan ini disebabkan oleh rangkaian polimer yang sangat terhidrat dan fleksibel (Simionescu dan Ivanov, 2015). Dalam kejuruteraan tisu, hidrogel sering digunakan sebagai perancah untuk menyokong pertumbuhan sel. Bacaan resilen di bawah 80% adalah bersesuaian kerana ia perlu mengekalkan struktur

dan sifat mekanikalnya semasa menjalani pergerakan tisu semula jadi, seperti regangan dan mampatan semasa fungsi badan seperti pernafasan atau pengecutan otot.

Sementara itu, tempoh gelasi juga merupakan salah satu sifat penting dalam membangun biobahan terutamanya untuk hidrogel. Ini berikutan kerana ia menentukan seberapa cepat larutan boleh beralih daripada keadaan cecair kepada struktur seperti gel separa pepejal atau pepejal (Hanna et al., 2023). Ciri ini penting dalam aplikasi sistem penghantaran ubat (*drug*), kejuruteraan tisu dan penyembuhan luka. Untuk kumpulan C8G2Gnp0.4 formulasi ini mampu membentuk gel lebih cepat daripada formulasi lain dan menunjukkan komponen yang ada di dalam hidrogel tersebut berinteraksi dengan cepat untuk mencipta struktur gel yang stabil. Tempoh gelasi yang cepat juga merujuk kepada bahan boleh diproses dengan lebih cekap. Dalam tetapan industri atau klinikal, gelasi yang lebih pantas meminimumkan masa menunggu semasa proses pembuatan atau aplikasi, meningkatkan aliran kerja dan mengurangkan masa yang diperlukan untuk penggunaan produk (Firoozi, 2023). Tempoh gelasi dipengaruhi oleh pelbagai faktor, termasuk kepekatan komponen (seperti kepekatan polimer), komposisi kimia, kehadiran agen penghubung silang, suhu, pH, dan kekuatan ionik larutan (Kenari et al., 2013; Liu et al., 2016). Dalam kumpulan C8G2Gnp0.4, gabungan nisbah kandungan karr yang lebih tinggi berbanding gel serta kepekatan agen taut silang, genipin membolehkannya mencapai gelasi dengan lebih cepat daripada formulasi yang lain. Apabila nisbah karagenan lebih tinggi daripada gelatin, masa gelasi keseluruhan biasanya dikurangkan. Ini kerana karagenan seperti kappa-karagenan, membentuk gel lebih cepat daripada gelatin kerana keupayaannya untuk berinteraksi cepat dengan kation dan membentuk rangkaian gel tegar (Wang Y et al., 2018). Gelatin biasanya lebih fleksibel dan elastik, tetapi apabila karagenan berada dalam kadar nisbah yang lebih tinggi, rangkaian karagenan mendominasi dan mengurangkan fleksibiliti keseluruhan gel (Samatra et al., 2022). Ini bermakna walaupun gelatin mungkin menyumbang kepada beberapa keanjalan, gelasi karagenan yang cepat dan kuat akan mengurangkan pengaruh ciri-ciri fleksibel gelatin.

Semua kumpulan karr-gel hidrogel yang dimuatkan dengan sekretom fibroblas hidung (CM) yang dihasilkan dalam kajian ini berjaya mengecapi penempelan sel sebanyak 80%. Ini menunjukkan lebih daripada 80% sel fibroblas digunakan yang

disemai pada hidrogel berjaya melekat pada permukaannya. Hidrogel yang menggabungkan polimer semula jadi (seperti asid hyaluronik, alginat, atau gelatin) cenderung menggalakkan lampiran sel yang lebih tinggi kerana bahan ini hampir menyerupai ECM (Cao et al., 2021). Ia menyediakan persekitaran yang lebih semula jadi untuk sel-sel melekat sendiri, yang membawa kepada kadar lampiran yang lebih tinggi. Tahap penempelan sel yang tinggi ini penting untuk pembangunan *in vitro* model saluran pernafasan berfungsi. Penempelan sel yang tinggi (>80%) juga memastikan proliferasi, pembezaan dan fungsi sel yang betul serta menjadikan hidrogel landasan yang boleh dipercayai untuk mereplikasi tingkah laku tisu saluran pernafasan dan membaiki tisu saluran pernafasan yang rosak (Xia et al., 2022). Tambahannya, nilai bacaan penempelan sel yang tinggi meminimumkan pembentukan jurang antara sel. Ini adalah penting untuk mencegah pendedahan kepada bahan berbahaya dan mengekalkan integriti lapisan epitelium. Dalam konteks ini, epitelium saluran pernafasan membentuk penghalang penting antara persekitaran luaran dan sistem pernafasan dan menjadi pelindung kepada zarah, patogen dan toksin yang disedut. Dengan kadar penempelan melebihi 80%, hidrogel memudahkan pembentukan lapisan epitelium yang berterusan dan teguh (Lu P. Et al., 2024). Ini memastikan hidrogel boleh menyerupai penghalang pelindung saluran pernafasan semula jadi di samping membolehkan pemodelan fungsi saluran pernafasan bertindak secara tepat. Seterusnya, hidrogel yang mencapai kadar penempelan sel yang tinggi selalunya mempunyai permukaan yang meniru ECM semula jadi. Contohnya, mencampurkan protein ECM (seperti fibronectin atau kolagen) ke dalam struktur hidrogel. Isyarat biokimia ini meningkatkan keupayaan sel untuk melekat, memastikan lebih 80% sel berjaya melekat. Ini dapat dibuktikan dengan bacaan penempelan sel pada kumpulan C8G2Gnp0.3+CM dan C8G2Gnp0.4+CM yang lebih tinggi berbanding kumpulan C8G2Gnp0.4. Ringkasnya, hidrogel yang dihasilkan dalam kajian ini dengan bacaan penempelan sel yang tinggi (>80%) sesuai untuk membaiki atau penjana semula tisu saluran pernafasan. Dalam situasi seperti pembinaan semula trakea atau merawat kerosakan saluran pernafasan, hidrogel ini mampu digunakan bagi menggalakkan perlekatan sel yang tinggi serta membantu mewujudkan lapisan epitelium yang kuat dan berfungsi menyokong penyembuhan dan penjana semula tisu.

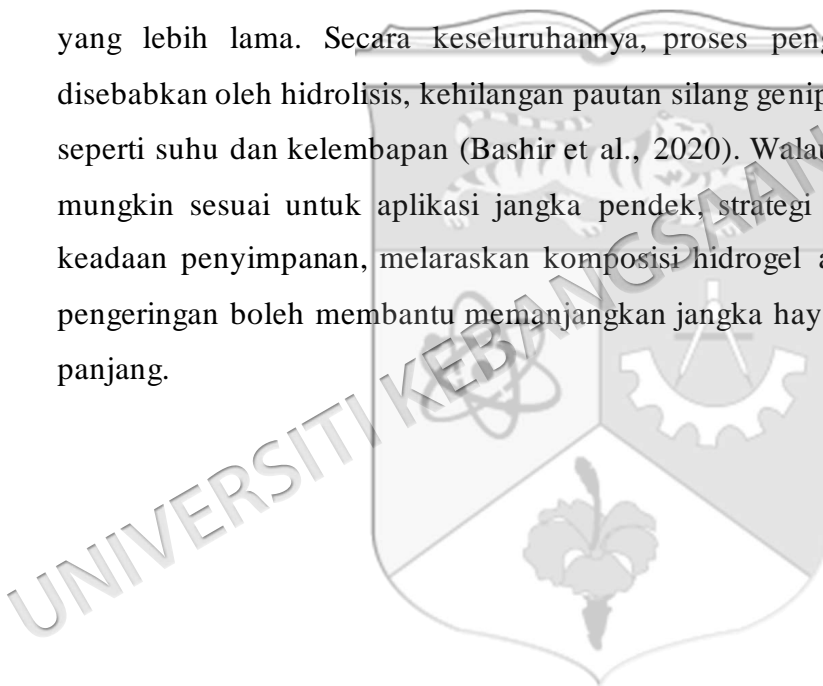
Umumnya, hidrogel yang mempunyai sifat detoksifikasi dan antibakteria boleh meningkatkan prestasi biologi rangka tisu secara signifikan dengan mewujudkan persekitaran mikro yang lebih menggalakkan dan melindungi untuk pertumbuhan sel dan penjana semula tisu. Dalam konteks kejuruteraan tisu saluran pernafasan atau epitelial, pencemaran bakteria dan pengumpulan hasil metabolik toksik boleh menjejaskan keberlangsungan sel dengan teruk, mengganggu pembentukan matriks ekstraselular dan menimbulkan tindak balas keradangan (Li et al., 2018). Oleh itu, fungsi antibakteria yang dimasukkan ke dalam hidrogel membantu menghalang lekatan dan pembiakan mikroorganisma, seterusnya mengurangkan risiko jangkitan dan mengekalkan integriti rangka semasa aplikasi *in vitro* atau *in vivo*. Strategi biasa termasuk penggabungan polimer bioaktif, agen antimikrob semula jadi, atau komponen biofungsional yang mengganggu membran sel bakteria atau menghalang metabolisme mikrobakteria (Zhang et al., 2020). Kajian telah menunjukkan bahawa biobahan dengan fungsi antibakteria dan gabungan detoksifikasi boleh meningkatkan proliferasi sel, mengurangkan tekanan oksidatif dan mempromosikan pembentukan tisu yang lebih stabil berbanding hidrogel konvensional tanpa sifat sedemikian (Wang et al., 2022). Oleh itu, integrasi fungsi-fungsi ini ke dalam sistem hidrogel menyediakan persekitaran mikro yang lebih kondusif dan bioaktif, yang amat bermanfaat untuk aplikasi lanjutan seperti model epitel saluran udara *in vitro* dan rangka pemulihan perubatan.

Selain itu, dapatan kajian ini menunjukkan terdapat peningkatan pelepasan fibronektin oleh hidrogel C8G2Gnp0.4+CM selama 24 jam. Dalam tempoh 24 jam, pelepasan fibronektin yang terkawal ini berperanan dalam menggalakkan aktiviti selular seperti lekatan, penempelan dan pembaikan tisu (Parisi et al., 2018). Pelepasan fibronektin daripada hidrogel dikawal oleh mekanisme berasaskan resapan di mana protein perlahan-lahan melakukan migrasi dari dalam matriks hidrogel ke persekitaran luar. Pelepasan yang meningkat memastikan bahawa fibronektin tersedia secara berterusan kepada sel dalam tempoh 24 jam, dan bukannya dilepaskan dalam keadaan letusan pantas. Ini penting untuk mengekalkan persekitaran yang aktif secara biologi kerana tindak balas yang berlaku terhadap kehadiran berterusan fibronektin. Sementara itu, epitelium saluran pernafasan yang cedera atau rosak boleh diperbaiki berikutan berlaku peningkatan pelepasan fibronektin yang menggalakkan proliferasi sel epitelium ke arah ruang kecederaan. Ini membantu menggalakkan pembaikan dan penjana

semula lapisan epitelium. Bekalan fibronektin yang stabil menyokong keupayaan sel untuk melakukan proses proliferasi merentasi perancah hidrogel dan mengisi jurang serta memperbaiki tisu yang rosak dengan lebih cekap (Longstreth dan Wang, 2024; Skoczynski et al., 2024). Peningkatan pelepasan fibronektin dalam karr-gel hidrogel mampu meminimumkan risiko penguraian pesat oleh protease yang terdapat dalam persekitaran tisu. Dengan membebaskan fibronektin secara perlahan-lahan selama 24 jam, hidrogel memastikan protein kekal menjadi bioaktif untuk tempoh yang lebih lama (Thang et al., 2023). Dalam maksud yang lain, ia boleh terus mengikat reseptor integrin pada permukaan sel dan berinteraksi dengan komponen ECM lain seperti kolagen. Bioaktiviti ini penting untuk menyokong lekatan, penempelan dan proliferasi sel. Sistem pelepasan yang meningkat memberikan manfaat untuk penghantaran fibronektin terutamanya dalam situasi di mana pembaikan tisu yang disasarkan diperlukan. Sistem ini memastikan bahawa protein terapeutik dilepaskan secara terkawal dan beransur-ansur, membolehkan mereka kekal tersedia di tapak tindakan dalam tempoh yang panjang. Ketersediaan yang berterusan ini meningkatkan keberkesanan rawatan regeneratif dan sistem penyampaian ubat dengan menyediakan sokongan berterusan. Sistem ini juga mengurangkan keperluan untuk dos berulang atau aplikasi protein terapeutik. Dengan menyampaikan bekalan protein yang stabil dari semasa ke semasa, sistem ini membolehkan campur tangan yang kurang kerap bagi meningkatkan pematuhan dan keselesaan pesakit, terutamanya dalam tetapan klinikal.

Akhir sekali, dalam kajian ini menunjukkan jangka hayat C8G2Gnp0.4 telah terurai sepenuhnya di bawah penyimpanan  $-80^{\circ}\text{C}$  pada hari ke-47. Penguraian ini menandakan berakhirnya jangka hayat fungsinya dan membawa maksud kepada hidrogel tidak lagi stabil atau boleh digunakan selepas 47 hari (Haouet et al., 2017). Pada hari ke-47, hidrogel mencapai tahap di mana integriti strukturnya telah terjejas sepenuhnya. Ini bermakna matriks karagenan-gelatin-genipin tidak lagi disatukan dan membawa kepada perpecahan lengkap atau pembubaran hidrogel. Pada ketika ini, ia tidak lagi boleh berfungsi sebagai perancah atau pembawa untuk sel, ubat-ubatan atau biomolekul lain. Suhu penyimpanan secara tidak langsung mempengaruhi jangka hayat hidrogel (Jain et al., 2017). Suhu tinggi boleh mempercepatkan proses penguraian dengan meningkatkan kadar tindak balas kimia, manakala pembekuan boleh menyebabkan kerosakan struktur pada matriks hidrogel. Sebaiknya, hidrogel harus

disimpan pada suhu sederhana dan stabil untuk mengelakkan kemerosotan pramatang. Bagi mengekalkan aktiviti biologi faktor pertumbuhan, penyimpanan dilakukan di peti sejuk beku  $-80^{\circ}\text{C}$ . Jika hidrogel digunakan untuk tujuan penghantaran ubat, penguraian lengkap pada hari ke-47 menunjukkan bahawa ia tidak lagi berkesan mengawal pembebasan ubat yang dienkapsul. Sebaik sahaja gel rosak, sebarang ubat yang tinggal sama ada akan dilepaskan sekaligus atau menjadi tidak berkesan, menjejaskan kesan terapeutik. Satu cara untuk memanjangkan jangka hayat hidrogel ialah dengan membekukan kering (lyophilis) hidrogel tersebut untuk menghilangkan kelembapan dan menstabilkan struktur (Lopes et al., 2024). Hidrogel kemudiannya boleh dihidrat semula sebelum digunakan. Kaedah ini boleh menghalang proses penguraian yang berlaku dengan kehadiran kelembapan, membolehkan hidrogel disimpan untuk tempoh yang lebih lama. Secara keseluruhannya, proses penguraian mungkin berlaku disebabkan oleh hidrolisis, kehilangan pautan silang genipin dan faktor persekitaran seperti suhu dan kelembapan (Bashir et al., 2020). Walaupun jangka hayat 47 hari mungkin sesuai untuk aplikasi jangka pendek, strategi seperti mengoptimumkan keadaan penyimpanan, melaraskan komposisi hidrogel atau menggunakan teknik pengeringan boleh membantu memanjangkan jangka hayat untuk kegunaan jangka panjang.



## BAB VI

### KESIMPULAN

#### 6.1 KESIMPULAN

Hidrogel karr-gel ditaut silang dengan genipin berjaya dihasilkan bagi menambah baik lagi sifat fizikokimia dan mekanikal. Dapatan kajian ini menunjukkan bahawa hidrogel C6G2Gnp0.4 dan C8G2Gnp0.4 mengalami degradasi sepenuhnya menjelang minggu ke-5, menunjukkan kesesuaiannya untuk aplikasi yang memerlukan degradasi jangka sederhana seperti di dalam aplikasi epitelium saluran pernafasan. Kadar penghantaran wap air (WVTR) untuk semua hidrogel yang diuji adalah di bawah 1500 g/m<sup>2</sup>/hari, menunjukkan keseimbangan kelembapan terkawal yang tidak sesuai. Selain itu, sudut sentuhan untuk semua hidrogel adalah kurang daripada 90°, menunjukkan sifat hidrofilik mereka, yang menggalakkan interaksi yang baik dengan persekitaran akueus dan menyokong lekatan sel.

Hidrogel C6G4Gnp0.4 mempamerkan kapasiti pembengkakan paling tinggi dan memberi kelebihan yang lebih baik berbanding kumpulan lain. Seterusnya, semua kumpulan karr-gel hidrogel menunjukkan nilai keporosan di bawah 30% menunjukkan struktur berliang yang agak rendah, yang boleh mempengaruhi pengangkutan nutrien dan sifat mekanikal. Nilai kompresi untuk semua kumpulan hidrogel adalah di bawah 40% dan daya tahan di bawah 80%, menunjukkan bahawa hidrogel ini menawarkan fleksibiliti dan integriti mekanikal yang mencukupi untuk aplikasi bioperubatan. Tambahan pula, penempelan sel melebihi 80% untuk semua hidrogel menunjukkan biokompatibiliti yang sangat baik dan potensi untuk menyokong pertumbuhan sel dan penjanaan semula tisu. Selain itu, hidrogel C8G2Gnp0.4+CM menunjukkan pelepasan tambahan fibronektin yang bermanfaat dalam tempoh 24 jam bagi menyokong penempelan sel yang berterusan dan pembaikan tisu dalam aplikasi regeneratif. Penilaian penyimpanan jangka-hayat hidrogel telah terdegradasi sepenuhnya pada hari

ke-47. Ia menunjukkan bahawa kestabilannya sesuai untuk kegunaan jangka sederhana tetapi mungkin memerlukan pelarasan untuk tempoh penyimpanan yang lebih lama. Hidrogel tersebut juga kekal stabil selama hampir dua bulan sebelum degradasi bermula, menjadikannya sesuai untuk aplikasi seperti penghantaran ubat in situ atau pengurusan luka, di mana kerosakan terkawal dari semasa ke semasa adalah penting. Secara keseluruhan aspek, hidrogel C8G2Gnp0.4 dipilih menjadi biobahan yang sesuai dan terbaik bagi aplikasi kejuruteraan tisu, penghantaran ubat dan penggunaan di dalam epitelium saluran pernafasan pada masa yang akan datang.

## 6.2 Limitasi dan Cadangan

Hidrogel karr-gel mempamerkan degradasi lengkap pada minggu ke-5 dan hari ke-47 untuk penilaian jangka hayat menunjukkan ia hanya sesuai untuk aplikasi jangka pendek hingga sederhana. Ini mungkin menghadkan penggunaannya dalam situasi yang memerlukan sokongan atau kestabilan jangka panjang seperti dalam penjanaan semula tulang atau luka penyembuhan perlahan. Untuk memanjangkan kebolegunaan hidrogel untuk aplikasi jangka panjang, mengubah suai kadar degradasi perlu diterokai. Pelarasan kepekatan agen penghubung silang seperti genipin atau menggabungkan penstabil tambahan untuk memperlambatkan degradasi, membolehkan hidrogel digunakan dalam situasi yang memerlukan sokongan yang lebih berpanjangan, seperti penjanaan semula tisu tulang.

Bacaan WVTR di bawah  $1000 \text{ g/m}^2$  boleh menyebabkan pengumpulan lembapan, peningkatan risiko jangkitan, maserasi, pengurangan pertukaran oksigen, dan pengurusan eksudat yang tidak cekap dalam luka eksudat tinggi. Untuk aplikasi yang memerlukan penyejatan lembapan yang lebih cepat, kawalan eksudat yang lebih tinggi, atau pelepasan ubat yang lebih berkesan, WVTR yang lebih tinggi mungkin lebih sesuai. Bagi meningkatkan WVTR hidrogel, cara lain seperti meningkatkan keporosan, mengurangkan ketebalan bahan, mengoptimumkan pautan silang atau menggunakan polimer yang lebih bernafas adalah pendekatan biasa yang boleh dilakukan. Justeru, kajian lain perlu dilakukan bagi meningkatkan lagi kadar bacaan WVTR.

Keporosan semua hidrogel di dalam kajian ini adalah di bawah 30%. Walaupun bermanfaat untuk kekuatan mekanikal, mungkin tidak memberikan kelebihan dalam pertukaran nutrien yang mencukupi dan penyingkiran sisa untuk tisu yang sangat vaskularisasi. Keliangan terhad ini boleh menghalang keberkesanan hidrogel untuk aplikasi yang memerlukan penyusupan sel yang ketara. Kajian masa depan boleh memberi tumpuan kepada mengubah suai keliangan hidrogel untuk meningkatkan penyusupan sel dan pertukaran nutrien. Ini boleh dicapai melalui teknik seperti corak mikro, kemasukan porogen atau melaraskan formulasi untuk meningkatkan keliangan tanpa menjejaskan kekuatan mekanikal.

Parameter untuk menguji kekuatan bahan dalam kajian ini sangatlah terbatas. Hanya kompresi dan resilen sahaja yang diuji dan menyebabkan bahan tersebut tidak boleh dikatakan kuat dan kukuh sepenuhnya. Sifat mekanikal mungkin memerlukan penambahbaikan selanjutnya untuk digunakan dalam persekitaran yang tertakluk kepada tekanan mekanikal yang ketara. Ujian lain juga haruslah dilakukan seperti ujian Young-Modulus atau reologi bagi membuktikan kekuatan sesuatu bahan tersebut. Di samping itu, kajian ini hanyalah menfokuskan menilai sifat fizikokimia dan biologikal in vitro hidrogel sahaja. Namun, ujian in vivo diperlukan untuk mengesahkan biokompatibiliti, kadar degradasi dan keberkesanan terapeutik dalam persekitaran biologi sebenar, di mana faktor seperti tindak balas imun, aktiviti enzimatik dan daya mekanikal dinamik boleh menjejaskan prestasi hidrogel. Model haiwan boleh digunakan untuk menguji keberkesanan penghantaran ubat dan penjanaan semula tisu dalam persekitaran yang lebih kompleks.

Walaupun hidrogel menunjukkan peningkatan pelepasan fibronektin, terdapat penelitian yang terhad bagi fungsi faktor pertumbuhan lain, antibiotik atau molekul bioaktif untuk aplikasi khusus seperti kawalan jangkitan atau penyembuhan luka yang dipertingkatkan. Kajian yang lain amat diperlukan meningkatkan fleksibiliti hidrogel untuk pelbagai aplikasi di dalam kegunaan klinikal. Dengan mengambil kira kesemua cadangan yang diusulkan, hidrogel boleh dioptimumkan lagi untuk rangkaian aplikasi klinikal yang lebih luas dan menyediakan penyelesaian yang lebih bagus untuk kejuruteraan tisu, penyembuhan luka dan penghantaran ubat.

Hidrogel karr-gel ditaut silang dengan genipin berjaya dihasilkan bagi menambah baik lagi sifat fizikokimia dan mekanikal. Kajian ini telah berjaya memenuhi ketiga-tiga objektif yang ditetapkan. Objektif pertama dicapai melalui fabrikasi dan pengoptimuman formulasi hidrogel hibrid berasaskan karagenan dan gelatin. Ciri fiziko-kimia telah dianalisis dan menunjukkan bahawa formulasi yang dibangunkan mempunyai sifat yang stabil dan sesuai untuk aplikasi bioperubatan. Dapatan kajian ini menunjukkan bahawa hidrogel C6G2Gnp0.4 dan C8G2Gnp0.4 mengalami penguraian sepenuhnya menjelang minggu ke-5, menunjukkan kesesuaiannya untuk aplikasi yang memerlukan penguraian jangka sederhana seperti di dalam aplikasi epitelium saluran pernafasan. Kadar penghantaran wap air (WVTR) untuk semua hidrogel yang diuji adalah di bawah  $1500 \text{ g/m}^2/\text{hari}$ , menunjukkan keseimbangan kelembapan terkawal yang tidak sesuai. Selain itu, sudut sentuhan untuk semua hidrogel adalah kurang daripada  $90^\circ$ , menunjukkan sifat hidrofilik mereka, yang menggalakkan interaksi yang baik dengan persekitaran akueus dan menyokong lekatan sel. Hidrogel C6G4Gnp0.4 mempamerkan kapasiti pembengkakan paling tinggi dan memberi kelebihan yang lebih baik berbanding kumpulan lain. Seterusnya, semua kumpulan karr-gel hidrogel menunjukkan nilai keporosan di bawah 30% menunjukkan struktur berliang yang agak rendah, yang boleh mempengaruhi pengangkutan nutrien dan sifat mekanikal. Nilai kompresi untuk semua kumpulan hidrogel adalah di bawah 40% dan daya tahan di bawah 80%, menunjukkan bahawa hidrogel ini menawarkan fleksibiliti dan integriti mekanikal yang mencukupi untuk aplikasi bioperubatan.

Tambahan pula, objektif kedua kajian ini telah tercapai di mana pemuatan sekretom fibroblas hidung ke dalam matriks hidrogel telah berjaya dilakukan. Hasil kajian menunjukkan bahawa sekretom mengekalkan aktiviti bioaktif dan hidrogel menyokong persekitaran yang kondusif bagi pertumbuhan dan aktiviti sel, menandakan potensi bahan ini sebagai sistem penghantaran bioaktif untuk aplikasi regeneratif. Penempelan sel melebihi 80% untuk semua hidrogel menunjukkan biokeserasian yang sangat baik dan potensi untuk menyokong pertumbuhan sel dan penjanaan semula tisu. Selain itu, kajian penguraian dan profil pelepasan ubat menunjukkan bahawa hidrogel ini mampu mengalami penguraian secara terkawal dan melepaskan bahan bioaktif dalam tempoh masa yang berpanjangan. Ini membuktikan bahawa sistem ini berpotensi

digunakan untuk terapi tempatan jangka panjang dengan keberkesanan yang stabil. Hidrogel C8G2Gnp0.4+CM menunjukkan pelepasan tambahan fibronectin yang bermanfaat dalam tempoh 24 jam bagi menyokong penempelan sel yang berterusan dan membaiki tisu dalam aplikasi regeneratif. Penilaian penyimpanan jangka-hayat hidrogel telah terurai sepenuhnya pada hari ke-47. Ia menunjukkan bahawa kestabilannya sesuai untuk kegunaan jangka sederhana tetapi mungkin memerlukan pelarasan untuk tempoh penyimpanan yang lebih lama. Hidrogel tersebut juga kekal stabil selama hampir dua bulan sebelum penguraian bermula, menjadikannya sesuai untuk aplikasi seperti penghantaran ubat in situ atau pengurusan luka, di mana kerosakan terkawal dari semasa ke semasa adalah penting. Secara keseluruhan aspek, hidrogel C8G2Gnp0.4 dipilih menjadi biobahan yang sesuai dan terbaik bagi aplikasi kejuruteraan tisu, penghantaran ubat dan penggunaan di dalam epitelium saluran pernafasan pada masa yang akan datang.

Kesimpulannya, hidrogel hibrid karagenan/gelatin yang dibangunkan dalam kajian ini telah menunjukkan potensi besar sebagai biobahan pelbagai fungsi untuk kejuruteraan tisu dan sistem penghantaran bioaktif, dengan prestasi yang baik dari segi kestabilan struktur, keserasian biologi dan pelepasan terkawal. Potensi ini disokong oleh beberapa aspek utama. Pertama, dari sudut kestabilan struktur, hidrogel yang diformulasikan menunjukkan kekuatan mekanikal yang mencukupi dan kestabilan morfologi yang baik sepanjang tempoh kajian, menjadikannya sesuai untuk aplikasi yang memerlukan sokongan mekanikal sederhana seperti sokongan tisu lembut. Kedua, dari segi keserasian biologi, hidrogel ini bukan sahaja menunjukkan menyokong lekatan, penyebaran sel, terutamanya apabila dimuatkan dengan sekretom fibroblas. Ini menunjukkan bahawa bahan ini mampu menyediakan persekitaran mikro yang sesuai untuk pertumbuhan sel dan pemulihan tisu. Seterusnya, dari sudut pelepasan bioaktif, hidrogel ini mampu melepaskan kandungan secara terkawal dan berterusan dalam tempoh masa yang signifikan, menunjukkan ciri pelepasan kinetik yang sesuai untuk penghantaran terapeutik jangka sederhana hingga panjang. Gabungan ketiga-tiga ciri ini yang mempunyai kestabilan struktur, biokeserasian, dan keupayaan pelepasan terkawal menjadikan hidrogel karagenan/gelatin ini bukan sahaja sesuai sebagai sistem penghantaran ubat, malah berpotensi digunakan sebagai perancah regeneratif bagi

aplikasi kejuruteraan tisu yang kompleks seperti kulit, saluran pernafasan, atau permukaan mukosa.

## 6.2 KEKURANGAN DAN CADANGAN PENAMBAHBAIKAN

Hidrogel karr-gel mempamerkan penguraian lengkap pada minggu ke-5 dan hari ke-47 untuk penilaian jangka hayat menunjukkan ia hanya sesuai untuk aplikasi jangka pendek hingga sederhana. Ini mungkin menghadkan penggunaannya dalam situasi yang memerlukan sokongan atau kestabilan jangka panjang seperti dalam penjanaan semula tulang atau luka penyembuhan perlahan. Untuk memanjangkan kebolegunaan hidrogel untuk aplikasi jangka panjang, mengubah suai kadar penguraian perlu diterokai. Pelarasan kepekatan agen penghubung silang seperti genipin atau menggabungkan penstabil tambahan untuk memperlahankan penguraian, membolehkan hidrogel digunakan dalam situasi yang memerlukan sokongan yang lebih berpanjangan, seperti penjanaan semula tisu tulang.

Bacaan WVTR di bawah  $1000 \text{ g/m}^2$  boleh menyebabkan pengumpulan lembapan, peningkatan risiko jangkitan, maserasi, pengurangan pertukaran oksigen, dan pengurusan eksudat yang tidak cekap dalam luka eksudat tinggi. Untuk aplikasi yang memerlukan penyejatan lembapan yang lebih cepat, kawalan eksudat yang lebih tinggi, atau pelepasan ubat yang lebih berkesan, WVTR yang lebih tinggi mungkin lebih sesuai. Bagi meningkatkan WVTR hidrogel, cara lain seperti meningkatkan keporosan, mengurangkan ketebalan bahan, mengoptimumkan pautan silang atau menggunakan polimer yang lebih bernafas adalah pendekatan biasa yang boleh dilakukan. Justeru, kajian lain perlu dilakukan bagi meningkatkan lagi kadar bacaan WVTR.

Keporosan semua hidrogel di dalam kajian ini adalah di bawah 30%. Walaupun bermanfaat untuk kekuatan mekanikal, mungkin tidak memberikan kelebihan dalam pertukaran nutrien yang mencukupi dan penyingkiran sisa untuk tisu yang sangat vaskularisasi. Keliangan terhad ini boleh menghalang keberkesanan hidrogel untuk aplikasi yang memerlukan penyusupan sel yang ketara. Kajian masa depan boleh memberi tumpuan kepada mengubah suai keliangan hidrogel untuk meningkatkan penyusupan sel dan pertukaran nutrien. Ini boleh dicapai melalui teknik seperti corak

mikro, kemasukan porogen atau melaraskan formulasi untuk meningkatkan keliangan tanpa menjejaskan kekuatan mekanikal.

Parameter untuk menguji kekuatan bahan dalam kajian ini sangatlah terbatas. Hanya kompresi dan resilen sahaja yang diuji dan menyebabkan bahan tersebut tidak boleh dikatakan kuat dan kukuh sepenuhnya. Sifat mekanikal mungkin memerlukan penambahbaikan selanjutnya untuk digunakan dalam persekitaran yang tertakluk kepada tekanan mekanikal yang ketara. Ujian lain juga haruslah dilakukan seperti ujian Young-Modulus atau reologi bagi membuktikan kekuatan sesuatu bahan tersebut. Di samping itu, kajian ini hanyalah menfokuskan menilai sifat fizikokimia dan biologikal in vitro hidrogel sahaja. Namun, ujian in vivo diperlukan untuk mengesahkan biokeserasian, kadar penguraian dan keberkesanan terapeutik dalam persekitaran biologi sebenar, di mana faktor seperti tindak balas imun, aktiviti enzimatik dan daya mekanikal dinamik boleh menjejaskan prestasi hidrogel. Model haiwan boleh digunakan untuk menguji keberkesanan penghantaran ubat dan penjanaan semula tisu dalam persekitaran yang lebih kompleks. Ujian ini penting untuk menentukan tindak balas imun, kadar penguraian sebenar dalam tisu hidup, serta keberkesanan terapeutik sebenar bagi regenerasi tisu atau penghantaran ubat. Selain itu, pemantauan terhadap keradangan, fibrosis dan biokeserasian jangka panjang akan memberikan maklumat kritikal tentang keselamatan klinikal hidrogel ini.

Walaupun hidrogel menunjukkan peningkatan pelepasan fibronectin, terdapat penelitian yang terhad bagi fungsi faktor pertumbuhan lain, antibiotik atau molekul bioaktif untuk aplikasi khusus seperti kawalan jangkitan atau penyembuhan luka yang dipertingkatkan. Kajian yang lain amat diperlukan meningkatkan fleksibiliti hidrogel untuk pelbagai aplikasi di dalam kegunaan klinikal. Dengan mengambil kira kesemua cadangan yang diusulkan, hidrogel boleh dioptimumkan lagi untuk rangkaian aplikasi klinikal yang lebih luas dan menyediakan penyelesaian yang lebih bagus untuk kejuruteraan tisu, penyembuhan luka dan penghantaran ubat.

## RUJUKAN

- Abid Naeem, Chengqun Yu, Lili Zhou, Yingqiu Xie, Yuhua Weng, Yuanyu Huang, Mengjie Zhang, Qi Yang (2025) Shape memory hydrogels in tissue engineering: Recent advances and challenges, *Bioactive Materials*, Volume 54,
- Aishwarya, B. K., Revathi, V., Singh, N., Mathew, L., Dhamija, K., Fallah, M. H., & Kalra, R. (2024). Biodegradable Polymer Biomaterials for Tissue Engineering Applications: A Critical Review. *E3S Web of Conferences*, 529. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202452901051>
- Baumann, L., Bernstein, E. F., Weiss, A. S., Bates, D., Humphrey, S., Silberberg, M., & Daniels, R. (2021). Clinical Relevance of Elastin in the Structure and Function of Skin. *Aesthetic Surgery Journal Open Forum*, 3(3). <https://doi.org/10.1093/asjof/ojab019>
- Bax, D. v., Smalley, H. E., Farndale, R. W., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2019). Cellular response to collagen-elastin composite materials. *Acta Biomaterialia*, 86, 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.12.033>
- Belvedere, R., Novizio, N., Morello, S., & Petrella, A. (2022). The combination of mesoglycan and VEGF promotes skin wound repair by enhancing the activation of endothelial cells and fibroblasts and their cross-talk. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15227-1>
- Bher, A., Mayekar, P. C., Auras, R. A., & Schvezov, C. E. (2022). Biodegradation of Biodegradable Polymers in Mesophilic Aerobic Environments. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232012165>
- Bružauskaitė, I., Bironaitė, D., Bagdonas, E., & Bernotienė, E. (2016). Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects. In *Cytotechnology* (Vol. 68, Issue 3, pp. 355–369). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9895-4>
- Cazón, P., Morales-Sanchez, E., Velazquez, G., & Vázquez, M. (2022). Measurement of the Water Vapor Permeability of Chitosan Films: A Laboratory Experiment on Food Packaging Materials. *Journal of Chemical Education*, 99(6), 2403–2408. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.2c00449>
- D'Arrigo, D., Roffi, A., Cucchiari, M., Moretti, M., Candrian, C., & Filardo, G. (2019). Secretome and extracellular vesicles as new biological therapies for knee osteoarthritis: A systematic review. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1867. <https://doi.org/10.3390/jcm8111867>

Da Silva, K., Kumar, P., & Choonara, Y. E. (2025). The paradigm of stem cell secretome in tissue repair and regeneration: Present and future perspectives. *Wound Repair and Regeneration*, 33(1), e13251. <https://doi.org/10.1111/wrr.13251>

*Delshad 2016.* (n.d.).

Deng, Z., Fan, T., Xiao, C., Tian, H., Zheng, Y., Li, C., & He, J. (2024). TGF- $\beta$  signaling in health, disease, and therapeutics. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 9, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01764-w>

Elliott, M. B., & others. (2021). Airway tissue engineering and regenerative medicine approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 174, 76–94

1. El-Nablaway, M. et al. (2024). *Mucoadhesive hydrogels for biomedical applications*. *Frontiers in Bioengineering*.

El-Nablaway, M., Abd El-Moneim, A., & El-Feky, G. (2024). Mucoadhesive hydrogels for biomedical applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1384326. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1384326>

Fauzi, M. B., Lokanathan, Y., Nadzir, M. M., Aminuddin, S., Ruszymah, B. H. I., & Chowdhury, S. R. (2017). Attachment, proliferation, and morphological properties of human dermal fibroblasts on ovine tendon collagen scaffolds: A comparative study. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 24(2), 33–43. <https://doi.org/10.21315/mjms2017.24.2.5>

Feng, W., & Wang, Z. (2023). Tailoring the Swelling-Shrinkable Behavior of Hydrogels for Biomedical Applications. In *Advanced Science* (Vol. 10, Issue 28). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/advs.202303326>

Garcia Garcia, A., Muñana González, S., Lanceros Mendez, S., Ruiz Rubio, L., Alvarez, L. P., & Vilas Vilela, J. L. (2024). Biodegradable Natural Hydrogels for Tissue Engineering, Controlled Release, and Soil Remediation. *Polymers*, 16(18), 2599. <https://doi.org/10.3390/polym16182599> MDPI

Haouet, M. N., Tommasino, M., Mercuri, M. L., Benedetti, F., di Bella, S., Framboas, M., Pelli, S., & Altissimi, M. S. (2018). Experimental accelerated shelf life determination of a ready-to-eat processed food. *Italian Journal of Food Safety*, 7(4), 189–192. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.6919>

Hernandez, J. L., & Woodrow, K. A. (2022). Medical Applications of Porous Biomaterials: Features of Porosity and Tissue-Specific Implications for Biocompatibility. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 11, Issue 9). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adhm.202102087>

Herrera, A., Herrera, M., Guerra-Perez, N., Galindo-Pumariño, C., Larriba, M. J., García-Barberán, V., Gil, B., Giménez-Moyano, S., Ferreiro-Montegudo, R., Veguillas, P., Candia, A., Peña, R., Pinto, J., García-Bermejo, M. L., Muñoz, A., García de Herreros, A., Bonilla, F., Carrato, A., & Peña, C. (2018). Endothelial cell activation on 3D-matrices derived from PDGF-BB-stimulated fibroblasts is mediated by Snail1. *Oncogenesis*, 7(9). <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0085-z>

Hu, X., Wang, T., Li, F., & Mao, X. (2023). Surface modifications of biomaterials in different applied fields. In *RSC Advances* (Vol. 13, Issue 30, pp. 20495–20511). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d3ra02248j>

Huzum, B., Puha, B., Necoara, R., Gheorghievici, S., Puha, G., Filip, A., Sirbu, P., & Alexa, O. (2021). Biocompatibility assessment of biomaterials used in orthopedic devices: An overview (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(5). <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10750>

Institute of Biomedical Imaging, N. (2022). *m~ National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering Biomaterials What are biomaterials?* [www.nibib.nih.gov](http://www.nibib.nih.gov)

Jabłońska-Trypuć, A., Matejczyk, M., & Rosochacki, S. (2016). Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. In *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* (Vol. 31, pp. 177–183). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161620>

Jian, K., Yang, C., Li, T., Wu, X., Shen, J., Wei, J., Yang, Z., Yuan, D., Zhao, M., & Shi, J. (2022). PDGF-BB-derived supramolecular hydrogel for promoting skin wound healing. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01390-0>

Johnson, K. E., & Wilgus, T. A. (2014). Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Advances in Wound Care*, 3(10), 647–661. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0517>

2. Kelly, S. J. et al. (2024). *Water sorption in airway mucus*. *Biomacromolecules*.

Kendall, R. T., & Feghali-Bostwick, C. A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. In *Frontiers in Pharmacology: Vol. 5 MAY*. Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00123>

Khanna, A., Zamani, M., & Huang, N. F. (2021). Extracellular matrix-based biomaterials for cardiovascular tissue engineering. In *Journal of Cardiovascular Development and Disease* (Vol. 8, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcdd8110137>

- Kildeeva, N., Chalykh, A., Belokon, M., Petrova, T., Matveev, V., Svidchenko, E., Surin, N., & Sazhnev, N. (2020). Influence of genipin crosslinking on the properties of Chitosan-based films. *Polymers*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/POLYM12051086>
- Kim, H. J., Kim, G., Lee, J., Lee, Y., & Kim, J. H. (2022). Secretome of stem cells: Roles of extracellular vesicles in diseases, stemness, differentiation, and reprogramming. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 19(1), 19–33
- Kim, S. H., Turnbull, J., & Guimond, S. (2011). Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 209, Issue 2, pp. 139–151). <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>
- Kuivaniemi, H., & Tromp, G. (2019). Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. In *Gene* (Vol. 707, pp. 151–171). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.003>
- Kular, J. K., Basu, S., & Sharma, R. I. (2014). The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. In *Journal of Tissue Engineering* (Vol. 5). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2041731414557112>
- Laube, M., Dornis, D., Wenzel, F., & Thome, U. H. (2021). Epidermal growth factor strongly affects epithelial Na<sup>+</sup> transport and barrier function in fetal alveolar cells, with minor sex-specific effects. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95410-y>
- Leach, T., Gandhi, U., Reeves, K. D., Stumpf, K., Okuda, K., Marini, F. C., Walker, S. J., Boucher, R., Chan, J., Cox, L. A., Atala, A., & Murphy, S. v. (2023). Development of a novel air–liquid interface airway tissue equivalent model for in vitro respiratory modeling studies. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-36863-1>
- Lee, E. J., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2014). Biomaterials for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 42(2), 323–337. <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6>
- Liao, Y. C., Chang, C. C., Nagarajan, D., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2021). Algae-derived hydrocolloids in foods: applications and health-related issues. In *Bioengineered* (Vol. 12, Issue 1, pp. 3787–3801). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1946359>
3. Liu, H. et al. (2021). *Wettability and contact angle affect pharmacodynamic behavior*. Drug Delivery.
- Liu, S., Yu, J. M., Gan, Y. C., Qiu, X. Z., Gao, Z. C., Wang, H., Chen, S. X., Xiong, Y., Liu, G. H., Lin, S. E., McCarthy, A., John, J. v., Wei, D. X., & Hou, H. H.

- (2023). Biomimetic natural biomaterials for tissue engineering and regenerative medicine: new biosynthesis methods, recent advances, and emerging applications. In *Military Medical Research* (Vol. 10, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40779-023-00448-w>
- Lopes, P. M., Fechete, R., Mintean, F., Mare, L., Moldovan, D., Moldovan, M., Cuc, S., Saroși, C. L., & Popescu, V. (2024). The Influence of Lyophilization Pretreatment and Whey Content on Whey and Gelatin-Based Hydrogels. *Gels*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/gels10040229>
- Lu, H., Cai, Z., & Hu, P. (2024). Recent Advances in Polymeric Delivery Vehicles for Controlled and Sustained Drug Release. *Pharmaceutics*, 16(9), 1184. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16091184> MDPI+1ScienceDirect+1
- Manickam, B., Sreedharan, R., & Elumalai, M. (2014). Genipin—the natural water soluble cross-linking agent and its importance in modified drug delivery systems: An overview. *Current Drug Delivery*, 11(1), 139–145.
- Mao, A. S., Shin, J. W., Utech, S., Wang, H., Uzun, O., Brooks, A. D., ... Mooney, D. J. (2017). Deterministic encapsulation of single cells in thin tunable microgels for niche modelling and therapeutic delivery. *Nature Materials*, 16, 236–243
- Martins, R. S., et al. (2024). Composite hydrogel for bioengineered tracheal graft. *Journal of Clinical Medicine*, 13(17).
- Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G. N., & Ueno, N. T. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. In *Breast Cancer Research and Treatment* (Vol. 136, Issue 2, pp. 331–345). <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2289-9>
- Matthew P Wylie, Jia Li, Grainne Murphy, Jasmine Ross, Jane Burns, David S Jones, Colin P McCoy, Development of antibacterial coatings for endotracheal tubes with enhanced antibacterial release properties through combined antibiotic loading, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 78, Issue 1, January 2026,
- McGann, M. E., Bonitsky, C. M., Jackson, M. L., Ovaert, T. C., Trippel, S. B., & Wagner, D. R. (2015). Genipin crosslinking of cartilage enhances resistance to biochemical degradation and mechanical wear. *Journal of Orthopaedic Research*, 33(11), 1571–1579. <https://doi.org/10.1002/jor.22939>
- Mohd Yunus, M. H. (2019). Genipin-Crosslinked Gelatin Scaffold in Tissue Engineering: A Systematic Review. *Medicine & Health*, 14(2), 1–16. <https://doi.org/10.17576/MH.2019.1402.01>
- Mokhtari, H., Tavakoli, S., Safarpour, F., Kharaziha, M., Bakhsheshi-Rad, H. R., Ramakrishna, S., & Berto, F. (2021). Recent advances in chemically-modified and hybrid carrageenan-based platforms for drug delivery, wound healing, and

- tissue engineering. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13111744>
- Moon, S., Kim, D. H., & Shin, J. U. (2021). In vitro models mimicking immune response in the skin. In *Yonsei Medical Journal* (Vol. 62, Issue 11, pp. 969–980). Yonsei University College of Medicine. <https://doi.org/10.3349/ymj.2021.62.11.969>
- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (Vol. 8, Issue 5). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>
- Mukasheva, F., Adilova, L., Dyussenbinov, A., Yernaimanova, B., Abilev, M., & Akilbekova, D. (2024). Optimizing scaffold pore size for tissue engineering: insights across various tissue types. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1444986.
- Muncie, J. M., & Weaver, V. M. (2018). The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 130, pp. 1–37). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.002>
- Nashihah, A. K., Muhammad Firdaus, F. I., Fauzi, M. B., Mobarak, N. N., & Lokanathan, Y. (2023). Role of Biomaterials in the Development of Epithelial Support in 3D In Vitro Airway Epithelium Development: A Systematic Review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 19). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241914935>
- Necas, J., & Bartosikova, L. (n.d.). Carrageenan: a review. In *Veterinarni Medicina* (Vol. 58, Issue 4).
- Nejati, S., & Mongeau, L. (2023). Injectable pore-forming hydrogels for soft tissue engineering. *Scientific Reports*, 13, 14303.
- Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive Materials*, 4, 271–292. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>
- Norahan, M. H., Pedroza-González, S. C., Sánchez-Salazar, M. G., Álvarez, M. M., & Trujillo de Santiago, G. (2023). Structural and biological engineering of 3D hydrogels for wound healing. In *Bioactive Materials* (Vol. 24, pp. 197–235). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.11.019>
- Onal, S., Alkaisi, M. M., & Nock, V. (2022). Microdevice-based mechanical compression on living cells. *ISCIENCE*, 25, 105518. <https://doi.org/10.1016/j.isci>

Ott, H. C., Matthiesen, T. S., Goh, S. K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I., & Taylor, D. A. (2016). Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 14(2), 213–221

Ozsvar, J., Yang, C., Cain, S. A., Baldock, C., Tarakanova, A., & Weiss, A. S. (2021). Tropoelastin and Elastin Assembly. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.643110>

Parisi, L., Toffoli, A., Ghezzi, B., Mozzoni, B., Lumetti, S., & Macaluso, G. M. (2020). A glance on the role of fibronectin in controlling cell response at biomaterial interface. In *Japanese Dental Science Review* (Vol. 56, Issue 1, pp. 50–55). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.11.002>

Park, S. R., Kim, J. W., Jun, H. S., Roh, J. Y., Lee, H. Y., & Hong, I. S. (2018). Stem Cell Secretome and Its Effect on Cellular Mechanisms Relevant to Wound Healing. *Molecular Therapy*, 26(2), 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.023>

4. Peng, T. et al. (2023). *Antibacterial-Based Hydrogel Coatings and Their Application in the Biomedical Field*. *Journal of Functional Biomaterials*.

Peters, J. T., Wechsler, M. E., & Peppas, N. A. (2021). Advanced biomedical hydrogels: Molecular architecture and its impact on medical applications. In *Regenerative Biomaterials* (Vol. 8, Issue 6). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/rb/rbab060>

Porzionato, A., et al. (2023). Biomaterials for tracheal and airway tissue engineering: A review. *Acta Biomaterialia*, 157, 1–20

Raby, K. L., Michaeloudes, C., Tonkin, J., Chung, K. F., & Bhavsar, P. K. (2023). Mechanisms of airway epithelial injury and abnormal repair in asthma and COPD. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1201658>

Raica, M., & Cimpean, A. M. (2010). Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. In *Pharmaceuticals* (Vol. 3, Issue 3, pp. 572–599). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph3030572>

5. Recent hydrogel wettability study (2025). *Journal of Functional Biomaterials*.

Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. In *Polymers* (Vol. 13, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13071105>

- Rees, W. D., Telkar, N., Lin, D. T. S., Wong, M. Q., Poloni, C., Fathi, A., Kobor, M., Zachos, N. C., & Steiner, T. S. (2022). An in vitro chronic damage model impairs inflammatory and regenerative responses in human colonoid monolayers. *Cell Reports*, 38(3). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110283>
- Rodrigues, R. F., Freitas, A. A., Canongia Lopes, J. N., & Shimizu, K. (2021). Ionic liquids and water: Hydrophobicity vs. hydrophilicity. *Molecules*, 26(23). <https://doi.org/10.3390/molecules26237159>
- Samatra, M. Y., Noor, N. Q. I. M., Razali, U. H. M., Bakar, J., & Shaarani, S. M. (2022). Bovidae-based gelatin: Extractions method, physicochemical and functional properties, applications, and future trends. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 21, Issue 4, pp. 3153–3176). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12967>
- Selvarajah, J., Saim, A. bin, Idrus, R. B. H., & Lokanathan, Y. (2020). Current and alternative therapies for Nasal Mucosa injury: A review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21020480>
- Sen, S., Dong, C., Jons, C. K., Song, Y. E., Prossnitz, A. N., & Appel, E. A. (2025). Evolving transport properties of dynamic hydrogels enable self tuning of short and long term cargo delivery [Preprint]. arXiv. arxiv.org
- Sheikh, Z., Najeeb, S., Khurshid, Z., Verma, V., Rashid, H., & Glogauer, M. (2015). Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications. In *Materials* (Vol. 8, Issue 9, pp. 5744–5794). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma8095273>
- Silvestro, I., Lopreiato, M., D'abusco, A. S., di Lisio, V., Martinelli, A., Piozzi, A., & Francolini, I. (2020). Hyaluronic acid reduces bacterial fouling and promotes fibroblasts' adhesion onto chitosan 2D-wound dressings. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6). <https://doi.org/10.3390/ijms21062070>
- Singh Kaushik, M., Chakraborty, S., Veleri, S., & Kateriya, S. (2021). *biology Mucociliary Respiratory Epithelium Integrity in Molecular Defense and Susceptibility to Pulmonary Viral Infections*. <https://doi.org/10.3390/biology>
- Singh, D., Rai, V., & K Agrawal, D. (2023). Regulation of Collagen I and Collagen III in Tissue Injury and Regeneration. *Cardiology and Cardiovascular Medicine*, 07(01). <https://doi.org/10.26502/fccm.92920302>
- Singhvi, M. S., Zinjarde, S. S., & Gokhale, D. v. (2019). Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 127, Issue 6, pp. 1612–1626). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jam.14290>

- Song, X., Chu, T., Shi, W., & He, J. (2024). Expression, characterization, and application of human-like recombinant gelatin. *Bioresources and Bioprocessing*, 11(69)
- Speziale, P., Arciola, C. R., & Pietrocola, G. (2019). Fibronectin and its role in human infective diseases. In *Cells* (Vol. 8, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8121516>
- Teven, C. M., Farina, E. M., Rivas, J., & Reid, R. R. (2014). Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. In *Genes and Diseases* (Vol. 1, Issue 2, pp. 199–213). Chongqing Medical University. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.09.005>
- Thang, N. H., Chien, T. B., & Cuong, D. X. (2023). Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. In *Gels* (Vol. 9, Issue 7). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/gels9070523>
- Thustochowicz, M. E., Kisiel, B., & Thustochowicz, W. (2019). Quality of life and clinical outcomes in Polish patients with high activity rheumatoid arthritis treated with leflunomide (Arava®) in Therapeutic Program: A retrospective analysis of data from the plus study. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(11), 1545–1553. <https://doi.org/10.17219/acem/104531>
- Tong, Z., & Jia, X. (2012). Biomaterial-based strategies for the engineering of mechanically active soft tissues. *MRS Communications*, 2(2), 31–39. <https://doi.org/10.1557/mrc.2012.4>
- Trębacz, H., & Barzycka, A. (2023). Mechanical Properties and Functions of Elastin: An Overview. In *Biomolecules* (Vol. 13, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom13030574>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1843, Issue 11, pp. 2563–2582). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. (2020). Classification, processing, and application of hydrogels: A review. *Polymers*, 12(3), 614. <https://doi.org/10.3390/polym12030614>
- Velez, A. M. A., & Howard, M. S. (2012). Collagen IV in normal and in disease process. In *North American Journal of Medical Sciences* (Vol. 4, Issue 1, pp. 1–8). <https://doi.org/10.4103/1947-2714.92892>
- Vrana, N. E., Lavalle, P., Dokmeci, M. R., Dehghani, F., Ghaemmaghami, A. M., & Khademhosseini, A. (2013). Engineering functional epithelium for regenerative medicine and in vitro organ models: A review. In *Tissue Engineering - Part B*:

*Reviews* (Vol. 19, Issue 6, pp. 529–543).  
<https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0603>

Wagh, K., Ishikawa, M., Garcia, D. A., Stavreva, D. A., Upadhyaya, A., & Hager, G. L. (2021). Mechanical Regulation of Transcription: Recent Advances. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 31, Issue 6, pp. 457–472). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.02.008>

Wahba, M. I. (2024). A comprehensive review on genipin: An efficient natural cross-linker for biopolymers. *Polymer Bulletin*, 81, 14251–14305

6. Wang, C. et al. (2023). *Influence of surface wettability on soft tissue healing*. BMC Oral Health.

Wang, L., Hu, D., Xu, J., Hu, J., & Wang, Y. (2024). Complex in vitro model: A transformative model in drug development and precision medicine. In *Clinical and Translational Science* (Vol. 17, Issue 2). John Wiley and Sons Inc.  
<https://doi.org/10.1111/cts.13695>

Wang, L., Wang, C., Wu, S., Fan, Y., & Li, X. (2020). Influence of the mechanical properties of biomaterials on degradability, cell behaviors and signaling pathways: Current progress and challenges. In *Biomaterials Science* (Vol. 8, Issue 10, pp. 2714–2733). Royal Society of Chemistry.  
<https://doi.org/10.1039/d0bm00269k>

7. Wang, materials review (2022). *Tailoring wettability for biomedical devices*.

Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. In *Cancers* (Vol. 9, Issue 5). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/cancers9050052>

Xia, J., Liu, Z. Y., Han, Z. Y., Yuan, Y., Shao, Y., Feng, X. Q., & Weitz, D. A. (2022). Regulation of cell attachment, spreading, and migration by hydrogel substrates with independently tunable mesh size. *Acta Biomaterialia*, 141, 178–189.  
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.01.025>

Xu, D., Hui, Y. Y., Zhang, W., et al. (2024). Genipin-crosslinked hydrogels for food and biomedical applications: A scientometric review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 282, 137478.

Xu, X., Xi, Y., & Weng, Y. (2025). Gelatin-based materials: Fabrication, properties and applications in the food packaging system. *RSC Advances*, 15, 30605–30621.

Xu, Y., Kong, X., Li, J., Cui, T., Wei, Y., Xu, J., Zhu, Y., & Zhu, X. (2021). Mild Hypoxia Enhances the Expression of HIF and VEGF and Triggers the Response to Injury in Rat Kidneys. *Frontiers in Physiology*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fphys.2021.690496>

- Yin, Y., Haller, M., Li, T., & Ma, L. (2023). Development of an in-vitro high-throughput screening system to identify modulators of genitalia development. *PNAS Nexus*, 2(1). <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac300>
- Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Filipič, M., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Kuhnle, G. G., Lambré, C., Leblanc, J. C., Lillegaard, I. T., Moldeus, P., Mortensen, A., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., ... Dusemund, B. (2018a). Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed Eucheuma seaweed (E 407a) as food additives. *EFSA Journal*, 16(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5238>
- Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Filipič, M., Frutos, M. J., Galtier, P., Gott, D., Gundert-Remy, U., Kuhnle, G. G., Lambré, C., Leblanc, J. C., Lillegaard, I. T., Moldeus, P., Mortensen, A., Oskarsson, A., Stankovic, I., Waalkens-Berendsen, I., Woutersen, R. A., ... Dusemund, B. (2018b). Re-evaluation of carrageenan (E 407) and processed Eucheuma seaweed (E 407a) as food additives. *EFSA Journal*, 16(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5238>
- Yue, B. (2014). Biology of the extracellular matrix: An overview. In *Journal of Glaucoma* (Vol. 23, Issue 8, pp. S20–S23). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/IJG.0000000000000108>
- Zhang, Q., He, P., Shi, S., et al. (2025). Secretome enriched with small extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells enhances tissue regeneration. *Journal of Nanobiotechnology*, 23, 434.
- Zhang, Q., Yan, Y., Li, Z., Du, J., Zhang, K., Zhang, L., et al. (2024). A uniform unsaturated crosslinking strategy to construct injectable alginate hydrogel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127726. PMC
- Zhang, Y., et al. (2024). Recent advances in gelatin-based biomaterials for tissue engineering. *International Journal of Pharmaceutics*, 126828
- Zhou, F., Sun, J., Ye, L., Jiang, T., Li, W., Su, C., Ren, S., Wu, F., Zhou, C., & Gao, G. (2023). Fibronectin promotes tumor angiogenesis and progression of non-small-cell lung cancer by elevating WISP3 expression via FAK/MAPK/ HIF-1 $\alpha$  axis and activating wnt signaling pathway. *Experimental Hematology and Oncology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00419-w>
- Zhu, Y., et al. (2018). Injectable porous biohybrid hydrogels for soft tissue applications. *Acta Biomaterialia*, 73, 112–126.
- Zimna, A., & Kurpisz, M. (2015). Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2015/549412>

**LAMPIRAN A**  
**KELULUSAN ETIKA**



PUSAT PENGURUSAN PENYELIDIKAN DAN INSTRUMENTASI • CENTRE FOR RESEARCH AND INSTRUMENTATION MANAGEMENT

Rujukan: UKM PPI/11/8/JEP-2021-005

Tarikh: 13 Januari 2021

Dr. Yogeswaran a/l Lokanathan  
Pusat Kajian Kejuruteraan Tisu Dan Perubatan Regeneratif  
Hospital Canselor Tuanku Muhriz  
Pusat Perubatan UKM

Y.Bhg. Profesor/Datuk/Dato'/Datin/Tuan/Puan,

**KELULUSAN ETIKA MENJALANKAN PENYELIDIKAN DI UKM**

Tajuk Penyelidikan : *Elucidating The Role Of Topographical And Biochemical Cues In Functionalization Of In Vitro Airway Epithelium Layer*

Perkara yang tersebut di atas adalah dirujuk.

2. Sukacita dimaklumkan, Jawatankuasa Etika Penyelidikan UKM meluluskan permohonan penyelidikan Y. Bhg. Profesor/Datuk/Dato'/Datin/Tuan/Puan bagi tajuk diatas. Tempoh kelulusan penyelidikan adalah daripada **07 Januari 2021 – 06 Januari 2024**. Sila kemukakan sebarang Laporan Kesan Sampingan, Laporan Kemajuan Setiap 6 Bulan dan Laporan Akhir sebak sahaja penyelidikan tamat kepada Jawatankuasa Etika Penyelidikan UKM.

3. Sukacita diingatkan projek penyelidikan ini hanya boleh dijalankan setelah mendapat surat kelulusan menjalankan penyelidikan dari Timbalan Dekan Penyelidikan Fakulti atau Pengarah Pusat/Institut.

Sekian, terima kasih.

Yang benar,

**PROFESOR DATO' DR. FUAD ISMAIL**

Pengerusi  
Jawatankuasa Etika Penyelidikan  
Universiti Kebangsaan Malaysia


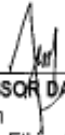
- s.k. - **Pengarah**  
Pusat Pengurusan Penyelidikan dan Instrumentasi (CRIM)  
Universiti Kebangsaan Malaysia
- **Pengarah**  
Hospital Canselor Tuanku Muhriz  
Pusat Perubatan UKM
- **Timbalan Dekan (Penyelidikan & Inovasi)**  
Sekretariat Penyelidikan Perubatan & Inovasi  
Hospital Canselor Tuanku Muhriz  
Pusat Perubatan UKM

Sekretariat Etika Penyelidikan Universiti Kebangsaan Malaysia  
Tingkat 1, Blok Klinik, Hospital Canselor Tuanku Muhriz, Pusat Perubatan UKM, Jalan Yasecob Latif, Bandar Tun Razak, 56000 Cheras Kuala Lumpur.  
Telefon: +603-9145 5046 / 5048  
Email: [sepukm@ukm.edu.my](mailto:sepukm@ukm.edu.my) Web: <http://research.ukm.my/jepukm/>



Mengilham Harapan, Mencipta Masa Depan • *Inspiring Futures, Nurturing Possibilities*

[www.ukm.my](http://www.ukm.my)

<b>NAME OF ETHICS COMMITTEE/IRB:</b> Research Ethics Committee, The National University of Malaysia	<b>ETHICS COMMITTEE/IRB REF NO :</b> UKM PPI/111/8/JEP-2021-005
<b>PROTOCOL TITLE:</b> Elucidating The Role Of Topographical And Biochemical Cues In Functionalization Of In Vitro Airway Epithelium Layer	
<b>PRINCIPAL INVESTIGATOR:</b> Dr. Yogeswaran a/l Lokanathan Centre for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Hospital Canselor Tuanku Muhriz UKM Medical Centre	
The following items <input checked="" type="checkbox"/> have been received and reviewed in connection with the above study to be conducted by the above investigator.	
<b>Documents</b>	
<input checked="" type="checkbox"/> Research Application Form	
<input checked="" type="checkbox"/> Research Proposal / Protocol	
<input type="checkbox"/> Publication Policy	
<input type="checkbox"/> Non-Disclosure Agreement	
Information Sheet:-	
<input checked="" type="checkbox"/> Malay <input checked="" type="checkbox"/> English	
Consent Form:-	
<input checked="" type="checkbox"/> Malay <input checked="" type="checkbox"/> English	
Questionnaire:-	
<input type="checkbox"/> Malay <input type="checkbox"/> English	
Curriculum Vitae of Researcher:-	
<input checked="" type="checkbox"/> Principal <input checked="" type="checkbox"/> Co-researcher <input type="checkbox"/> Student	
<input checked="" type="checkbox"/> Good Clinical Practice Certificate (GCP)	
<input checked="" type="checkbox"/> Project Agreement	
The Research Ethics Committee, The National University of Malaysia operates in accordance to the International Conference of Harmonization Good Clinical Practice Guidelines.	
Comments (if any): _____	
Date of Approval: 07 January 2021	
 <b>PROFESSOR DATO' DR. FUAD ISMAIL</b> Chairman Research Ethics Committee The National University of Malaysia	

**LAMPIRAN B**  
**KELULUSAN PENYELIDIKAN**



FAKULTI PERUBATAN • FACULTY OF MEDICINE

Rujukan: UKM FPR.4/244/SY20-164  
Tarikh : 7 Disember 2021

Profesor Madya Dr. Yogeswaran A/L Lokanathan  
Pusat Kejuruteraan Tisu dan Perubatan Regeneratif  
Fakulti Perubatan UKM

YBhg. Profesor/Datuk/Dato/Datin/Tuan/Puan,

**KELULUSAN PERMOHONAN TAMBAHAN PELAJAR PROJEK PENYELIDIKAN**

Tajuk Penyelidikan : *Elucidating the Role of Topographical and Biochemical Cues in Functionalization of In Vitro Airway Epithelium Layer*

Kod Projek : FRGS/1/2020/SKK0/UKM027

Dengan hormatnya merujuk kepada perkara di atas.

Adalah dimaklumkan bahawa, Jawatankuasa Penyelidikan Perubatan, Fakulti Perubatan UKM bersetuju dan meluluskan permohonan tambahan pelajar bagi projek penyelidikan di atas. Butiran kelulusan adalah seperti berikut:

- |                    |   |   |
|--------------------|---|---|
| 1. Nama Pelajar    | : | Muhammad Firdaus bin Fairuz Izan  |
| UKM Per            | : | P115970   |
| Jabatan/Organisasi | : | Pusat Kejuruteraan Tisu dan Perubatan Regeneratif,<br>Fakulti Perubatan UKM |
| Status             | : | Penambahan Pelajar  |
| 2. Nama Pelajar    | : | Nashihah binti Ab Karim   |
| UKM Per            | : | P114776   |
| Jabatan/Organisasi | : | Pusat Kejuruteraan Tisu dan Perubatan Regeneratif,<br>Fakulti Perubatan UKM |
| Status             | : | Penambahan Pelajar  |

Sekian, terima kasih.

Yang benar,

PROFESOR DR. TAN GEOK CHIN

SEKRETARIAT PENYELIDIKAN & INOVASI UKM  
Tingkat 2, Kompleks Pendidikan Perubatan Canselor Tuanku Ja'afar, Jalan Yaacob Latif,  
Bandar Tun Razak, 56000 Cheras, Kuala Lumpur, Malaysia.  
Telefon: +603-8146 5002/5003/8480/8481/8486/8487/8488  
E-mel: [sppl@ppukm.ukm.edu.my](mailto:sppl@ppukm.ukm.edu.my) Laman Web: <http://www.ukm.my/spitper/>

Mengilham Harapan, Mencipta Masa Depan • Inspiring Futures, Nurturing Possibilities

[www.ukm.my](http://www.ukm.my)

## LAMPIRAN C

## PENERBITAN

International Journal of  
Molecular Sciences

Review

# Role of Biomaterials in the Development of Epithelial Support in 3D In Vitro Airway Epithelium Development: A Systematic Review

Ab Karim Nashihah <sup>1</sup>, Fairuz Izan Muhammad Firdaus <sup>1,3</sup>, Mh. Busra Fauzi <sup>1,3</sup>, Nadhratun Naiim Mobarak <sup>2,3</sup> and Yogeswaran Lokanathan <sup>1,4</sup>

- <sup>1</sup> Centre for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur 56000, Malaysia; firdaus.dani@ppm.uitm.edu (F.I.M.F.); fauzibusra@ukm.edu.my (M.B.F.)
- <sup>2</sup> School of Chemical Sciences and Food Technology, Faculty of Science and Technology, Universiti Kebangsaan Malaysia UKM, Bangi 43600, Malaysia; nadhratunnaiim@ukm.edu.my
- <sup>3</sup> Correspondence: iyoges@ppukm.ukm.edu.my

**Abstract:** Respiratory diseases have a major impact on global health. The airway epithelium, which acts as a frontline defense, is one of the most common targets for inhaled allergens, irritants, or microorganisms to enter the respiratory system. In the tissue engineering field, biomaterials play a crucial role. Due to the continuing high impact of respiratory diseases on society and the emergence of new respiratory viruses, in vitro airway epithelial models with high microphysiological similarities that are also easily adjustable to replicate disease models are urgently needed to better understand those diseases. Thus, the development of biomaterial scaffolds for the airway epithelium is important due to their function as a cell support device in which cells are seeded in vitro and then are encouraged to lay down a matrix to form the foundations of a tissue for transplantation. Studies conducted in in vitro models are necessary because they accelerate the development of new treatments. Moreover, in comparatively controlled conditions, in vitro models allow for the stimulation of complex interactions between cells, scaffolds, and growth factors. Based on recent studies, the biomaterial scaffolds that have been tested in in vitro models appear to be viable options for repairing the airway epithelium and avoiding any complications. This review discusses the role of biomaterial scaffolds in in vitro airway epithelium models. The effects of scaffold, physicochemical, and mechanical properties in recent studies were also discussed.

**Keywords:** airway epithelium; biomaterial; scaffold; mucociliary differentiation; in vitro



**Citation:** Nashihah, A.K.; Muhammad Firdaus, F.I.; Fauzi, M.B.; Mobarak, N.N.; Lokanathan, Y. Role of Biomaterials in the Development of Epithelial Support in 3D In Vitro Airway Epithelium Development: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 14935. <https://doi.org/10.3390/ijms241914935>

Academic Editors: José Luis Yoca-Hernán and Yury A. Skorik

Received: 18 August 2023

Revised: 2 October 2023

Accepted: 2 October 2023

Published: 5 October 2023




Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Respiratory diseases have a massive impact on global health. The top 20 causes of disability-adjusted life years (DALYs) in the 2020 Global Burden of Disease Report include four of the “big five” lung diseases after examining all ages and all nation income levels [1]. The fourth major cause is lower tract respiratory infection, the sixth is chronic obstructive pulmonary disease (COPD), the twelfth is tuberculosis (TB), and the seventeenth is lung cancer. According to the Forum of International Respiratory Societies held in 2017, there are an estimated 65 million people with moderate to severe COPD, about 334 million people suffer from asthma, 10.4 million people developed TB in 2015, acute lower respiratory tract infections have been identified as one of the top three causes of death and disability in both children and adults, and lung cancer kills 1.6 million people each year. In addition, inhalation of particulate matter (PM) has been linked to morbidity and mortality in cardiopulmonary disorders such as COPD, asthma, lung cancer, pneumonia, ischemic heart disease, and stroke in recent epidemiological and experimental studies [2,3]. The nose, as the primary organ exposed to environmental microbes, pollutants, and allergens, plays

Review

# Application of Conditioned Medium for In Vitro Modeling and Repair of Respiratory Tissue

Fairuz Izan Muhammad Firdaus <sup>1</sup>, Ab. Karim Nashihah <sup>1</sup>, Mh. Busra Mohd Fauzi <sup>1</sup> , Maarof Manira <sup>1</sup> ,  
Saim Aminuddin <sup>2,3</sup> and Yogeswaran Lokanathan <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Centre for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Universiti Kebangsaan Malaysia, Kuala Lumpur 56000, Malaysia

<sup>2</sup> Graduate School of Medicine, KPJ Healthcare University College, Kota Seremban, Nilai 71800, Malaysia

<sup>3</sup> KPJ Ampang Puteri Specialist Hospital, Ampang 68000, Malaysia

\* Correspondence: [yoges@pp UKM. ukm.edu.my](mailto:yoges@pp UKM. ukm.edu.my)

**Abstract:** Background: The idea of exploring respiratory therapy in vitro predominantly guided by cell-secreted substances has gained ground in recent years. A conditioned medium (CM) consists of protein milieu that contains a diverse spectrum of cytokines, chemokines, angiogenic agents, and growth factors. This review evaluated the efficacy of using CM collected in an in vitro respiratory epithelial model. Methods: Twenty-six papers were included in this review: twenty-one cellular response studies on respiratory secretome application and five studies involving animal research. Results: The CM produced by differentiated cells from respiratory and non-respiratory systems, such as mesenchymal stem cells (MSC), exhibited the similar overall effect of improving proliferation and regeneration. Not only could differentiated cells from respiratory tissues increase proliferation, migration, and attachment, but the CM was also able to protect the respiratory epithelium against cytotoxicity. Most non-respiratory tissue CM was used as a treatment model to determine the effects of the therapy, while only one study used particle-based CM and reported decreased epithelial cell tight junctions, which harmed the epithelial barrier. Conclusion: As it resolves the challenges related to cell development and wound healing while simultaneously generally reducing the danger of immunological compatibility and tumorigenicity, CM might be a potential regenerative therapy in numerous respiratory illnesses. However, additional research is required to justify using CM in respiratory epithelium clinical practice.

**Keywords:** airway epithelium; airway epithelial regeneration; conditioned medium; secretome; tissue engineering; regenerative medicine; preclinical study; mesenchymal stem cell



**Citation:** Muhammad Firdaus, F.I.; Nashihah, A.K.; Mohd Fauzi, M.B.; Manira, M.; Aminuddin, S.; Lokanathan, Y. Application of Conditioned Medium for In Vitro Modeling and Repair of Respiratory Tissue. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 5862. <https://doi.org/10.3390/app13105862>

Academic Editor: Thomas Schwertli

Received: 3 March 2023

Revised: 3 May 2023

Accepted: 5 May 2023

Published: 30 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Respiratory illnesses such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD), asthma, pulmonary hypertension, and occupational lung diseases are the third largest cause of mortality worldwide, affecting millions each year [1]. Acute and chronic lung disorders, including bronchial asthma, pneumonia, and COPD, depend on the interaction of airway epithelial cells (EC) with pathogens and endogenous signals [2]. The current treatments are ineffective, and some treatments are simply palliative, as they treat the symptoms but are ineffective for rescuing or regenerating cellular function or even halting the degenerative process [3,4]. From the nasal cavity to the bronchi, the respiratory tree is lined with pseudostratified columnar ciliated epithelium. As the respiratory epithelium is in constant contact with the external environment, which includes germs, allergens, and air pollutants [5,6], the fundamental task of protecting the airway integrity is in constant jeopardy, resulting in epithelial degradation and the development of acute and chronic lung illnesses [7–9].

Given that the respiratory system is the primary pathway for airborne toxicants, the respiratory epithelium presents a physical barrier with tight junction (TJ) complexes

## LAMPIRAN D

## SIJIL





**CERTIFICATE  
OF PARTICIPATION**  
Proudly presented to  
**Nashihah Ab Karim**

for Poster Presentation entitled **Fabrication And Characterization of Carrageenan/Gelatine Hydrogel for Future Use in Airway Epithelium In Vitro Model**

during *SHIFT International Conference & Winter School, and the 9th MTERMS, in conjunction with European Wellness Academy's Bio-Regenerative Precision Medicine*

**SHIFT-MTERMS-EWA'S BRPM 2024**  
In Kuala Lumpur, MALAYSIA  
27-29 February 2024



ASSOCIATE PROF DR MOHD FAUZI MH BUSRA  
CHAIR, SHIFT-MTERMS-EWA'S BRPM 2024



UNIVERSITI KEBANGSAAN MALAYSIA