



SINTESIS DAN UJI SITOTOKSISITAS HIDROKSIAPATIT BATU KAPUR SEBAGAI BAHAN GRAFT TULANG

Makmur Sirait dan Bhinar Mustika Aulia

Jurusan Fisika, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Medan
bhinaraulia@gmail.com

Diterima: Agustus 2021. Disetujui: September 2021. Dipublikasikan: Oktober 2021

ABSTRAK

Telah dilakukan Sintesis Dan Uji Sitotoksitas Hidroksiapatit Batu Kapur. Penelitian ini menggunakan metode presipitasi atau metode basah yang bertujuan untuk mendapatkan hidroksiapatit dengan karakterisasi terbaik berdasarkan hasil uji XRD dan uji sitotoksitas dengan metode MTT sehingga layak untuk dijadikan sebagai bahan graft tulang. Hidroksiapatit yang telah terbentuk dikarakterisasi menggunakan XRD untuk melihat fasa, struktur dan ukuran kristal hidroksiapatit, dan uji sitotoksitas dengan metode MTT assay. Hasil karakterisasi XRD serbuk hidroksiapatit menunjukkan puncak-puncak difraksi tertinggi yang terbentuk pada sudut 2θ adalah $26,78^\circ$, $33,14^\circ$, $34,49^\circ$ dan $52,97^\circ$ dengan struktur kristal adalah struktur hexagonal dan ukuran kristal yang diperoleh sebesar $17,8$ nm. Komposit hidroksiapatit tidak toksik berdasarkan hasil uji MTT assay karena pertumbuhan sel hidup melewati batas toksik yakni 70% (grade 3) berdasarkan standar ISO 10993-5:2009 (E). Dengan persentase pertumbuhan sel hidup yang paling tinggi pada konsentrasi HAp $25 \mu\text{g/ml}$ dengan nilai persentase sel hidup sebesar $114,38\%$.

Kata Kunci: Hidroksiapatit, Graft Tulang, XRD, Uji MTT

ABSTRACT

Synthesis and Cytotoxicity Test of Limestone Hydroxyapatite has been carried out. This study uses the precipitation method or the wet method which aims to obtain hydroxyapatite with the best characterization based on the results of the XRD test and the cytotoxicity test with the MTT method so that it is feasible to be used as a bone graft material. The formed hydroxyapatite was characterized using XRD to see the phase, structure, and crystal size of hydroxyapatite, and cytotoxicity test using the MTT assay method. The results of XRD characterization of hydroxyapatite powder showed that the highest diffraction peaks formed at an angle of 2θ were 26.78° , 33.14° , 34.49° , and 52.97° with a crystal structure of hexagonal structure and crystal size of 17.8 nm. The hydroxyapatite composite is not toxic based on the results of the MTT assay because the growth of living cells exceeds the toxic limit of 70% (grade 3) based on the ISO 10993-5:2009 (E) standard. With the highest percentage of live cell growth at a concentration of HAp 25 g/ml with a live cell percentage value of 114.38% .

Keywords: Hydroxyapatite, Bone Graft, XRD, MTT Test

PENDAHULUAN

Setiap tahun kebutuhan *graft* tulang terus bertambah, hal ini disebabkan oleh meningkatnya jumlah kecelakaan yang mengakibatkan patah tulang, penyakit bawaan dan non bawaan. Kerusakan atau cacat pada tulang merupakan suatu masalah kesehatan yang serius karena dapat mengganggu fungsi kerja tubuh manusia. Berdasarkan data di Asia, Indonesia adalah negara yang memiliki jumlah penderita patah tulang tertinggi diantaranya sebanyak 300-400 kasus operasi bedah tulang perbulan di Rumah Sakit Dr. Soetomo Surabaya (Gunawan dkk, 2010). Untuk mengatasi kerusakan tulang perlu penanganan dan penggunaan material yang tepat. Material yang digunakan dalam pengobatan tersebut harus bersifat bioaktif, biokompatibel, dan tidak mengandung toksin/racun (Johansson dkk. 2015; Nayak dkk., 2011).

Graft tulang adalah bahan pengganti tulang yang dapat digunakan sebagai bahan penyembuhan kerusakan tulang setelah melalui tahapan tertentu. *Graft* tulang dapat digunakan untuk memperbaiki tulang yang rusak (fraktur) dan sebagai penyambung untuk mencegah pergeseran tulang. *Graft* tulang yang banyak digunakan adalah jenis *autograft*, *allograft*, *xenograft* dan *synthetic graft* (Wirata, I. W., 2016). Bahan yang paling sesuai dengan persyaratan untuk menjadi *graft* tulang sintetis adalah hidroksiapatit (Khoiriyah, M., 2018).

Hidroksiapatit (HAp) merupakan salah satu biomaterial yang bersifat bioaktif untuk tulang. Biomaterial adalah suatu bahan sintesis yang dapat diimplan ke dalam sistem hidup sebagai pengganti fungsi dari jaringan hidup atau organ. Pada saat ini kebutuhan akan biomaterial sangat tinggi dan telah memberi dampak yang cukup besar terutama dalam bidang kedokteran ortopedi, misalnya saja untuk perbaikan tulang, baik pada perbaikan tulang retak maupun tulang patah (Johansson dkk., 2015; Nayak dkk., 2011).

Hidroksiapatit sendiri dapat dihasilkan dengan menggunakan bahan alami yang mengandung banyak kalsium dalam bentuk kalsium karbonat CaCO_3 . Kalsium karbonat dapat ditemukan dengan mudah di sekitar

lingkungan hidup kita seperti di dalam batu kapur, tulang-tulang, cangkang, dan pelindung hewan lunak (Fitriawan, 2014). Margareta (2015) menggunakan batu kapur sebagai bahan pembuatan Hidroksiapatit, alasan peneliti menggunakan batu kapur karena batu kapur mengandung kalsium murni yang cukup tinggi sebesar 98,2 % .

Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ichsan, Z. M, dkk., (2012) melakukan sintesis makroporus komposit kolagen-hidroksiapatit sebagai kandidat *graft* tulang. Hasil uji sitotoksisitas dengan MTT assay menunjukkan komposit tidak toksik dengan persentase sel hidup di atas 100%.

Sintesis hidroksiapatit dari batu kapur (CaCO_3) dilakukan dengan menggunakan metode presipitasi. Metode presipitasi dilakukan dengan mereaksikan sumber kalsium dengan larutan H_3PO_4 yang berfungsi sebagai fosfat untuk mendapatkan hidroksiapatit (Sirait, M. 2020).

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam sintesis hidroksiapatit batu kapur adalah metode presipitasi.

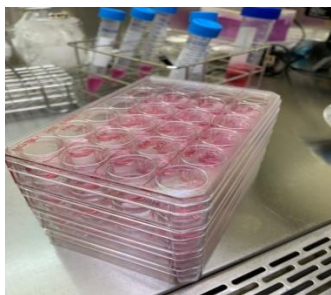
Sintesis Hidroksiapatit

Dengan mengkalsinasi sebanyak 10 gr batu kapur menggunakan *furnance* pada suhu 700°C selama 5 jam. Selanjutnya serbuk batu kapur (CaO) diproses menjadi CaOH dengan melarutkan sebanyak 5,6 gr serbuk CaO kedalam 1 L aquades dan larutan di aduk selama 12 jam lalu difiltrasi dan dikeringkan selama 12 jam pada suhu 70°C . CaOH yang telah terbentuk dimasukkan sebanyak 9,6 gr kedalam larutan H_3PO_4 (11,05 ml H_3PO_4 dimasukkan kedalam 100 ml aquades) kemudian diaduk selama 12 jam, difiltrasi dan dikeringkan pada suhu 70°C selama 12 jam. Lalu dikalsinasi pada suhu 700°C selama 12 jam, HAp dikarakterisasi dengan XRD dan uji sitotoksisitas dengan metode MTT *Assay*.

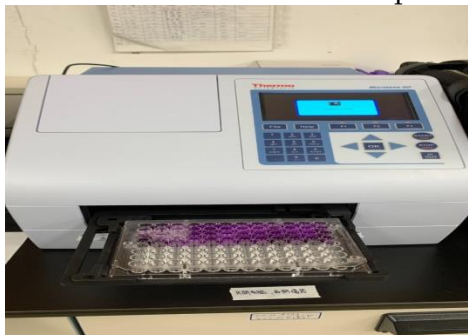
Prosedur Uji Sitotoksisitas

Sel osteoblast dikultur dalam labu kultur sel 75 cm^2 yang mengandung media esensial minimum ditambah dengan 10 % serum janin sapi dan 1 % antibiotik-antimikotik

dipertahankan pada suhu 30° C dalam inkubator dengan atmosfer lembab 5% CO₂. Untuk menilai efek viabilitas sel, suspensi 500 µL sel MC3T3-E1 disimpan kedalam plat 24 wadah dengan kepadatan 2x10⁴ sel/wadah dan di inkubasi selama 1 hari agar sel dapat melekat. Setelah itu, toksisitas sel MC3T3-E1 diteliti pada HAp dengan berbagai konsentrasi (25µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL dan 200 µg/mL) larutan ekstrak ditambahkan ke masing-masing wadah. Wadah tanpa pengenceran ekstrak sampel digunakan sebagai kontrol. Setelah 3 hari inkubasi, media disedot dari semua wadah dan larutan MTT 200 µL tetrazolium bromida biru tiazolil biru ditambahkan ke masing-masing wadah dan dinkubasi selama 4 jam lagi untuk membentuk formazan. Pada akhir masa inkubasi, larutan MTT dihilangkan dan 300 µL dimetil sulfoksida ditambahkan ke setiap wadah. Larutan dipindahkan ke pelat 96-wadah dan absorbansi diukur pada 570 nm menggunakan pembaca pelat mikro. Persentase viabilitas sel dari masing-masing konsentrasi dihitung dengan mengansumsikan viabilitas sel dari kontrol 100%. Seperti tampak pada Gambar 1 dan 2 dibawah ini:



Gambar 1. Wadah Berisi Sel Dan Sampel HAp.



Gambar 2. Pembaca Pelat Mikro ELISA reader

Analisis data dari hasil karakterisasi komposit hidroksiapatit batu kapur sebagai bahan *graft* tulang dilakukan dengan menggunakan data berupa tabel dan grafik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Sintesis hidroksiapatit dilakukan dengan menggunakan metode presipitasi atau metode basah. Hidroksiapatit yang dihasilkan berbentuk serbuk berwarna putih kekuningan seperti tampak pada Gambar 4.

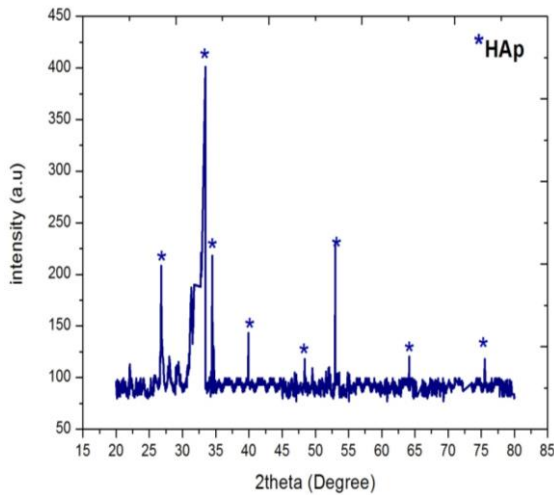


Gambar 4. Hasil Sintesis Hidroksiapatit Batu Kapur

1. Hasil Analisa XRD Hidroksiapatit Batu Kapur

Pengujian dengan alat XRD dilakukan untuk mengetahui fasa dan struktur senyawa kristal dari sampel yang diuji. Fasa tersebut kemudian dianalisa berdasarkan hasil grafik yang terbentuk dengan menyesuaikan masing-masing puncak dengan *Database Joint Commitee On Powder Diffraction Standards* (JCPDS PDF = 090432) dengan fasa sampel hasil pengujian. Pencocokan hasil uji XRD dengan database ini dilakukan dengan mendeteksi sudut 2θ dan celah kisi keduanya. Pola difraksi yang dihasilkan, dibandingkan dengan data standar untuk memperoleh informasi struktur (Floriaan, dkk, 2011).

Pada penelitian ini hidroksiapatit stokiometri merupakan standar yang dimiliki alat penelitian bersumber dari data Joint Committee on Powder Diffraction Standard (JCPDS). Data standar dari JCPDS merupakan data yang secara otomatis muncul apabila senyawa yang di uji memiliki kemiripan dengan data standar.



Gambar 5. Grafik Pola Difraksi Sinar X Pada Hidroksiapatit

Dari grafik pola difraksi sinar X pada hidroksiapatit batu kapur dengan metode pengendapan basa, terlihat fasa kristalin hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) yang terbentuk memiliki karakteristik puncak yang kuat di 2θ pada $26,78^\circ$, $33,14^\circ$, $34,49^\circ$ dan $52,97^\circ$ seperti terlihat pada Gambar 5.

Tabel 1. Data Struktur Kristal dan Parameter Kisi dari Hidroksiapatit.

Hasil Analisa	Hidroksiapatit Batu Kapur	Hidroksiapatit Stokimetri (JCP DS 9-432)	HA 200 Jepang
Struktur Kristal	Hexagonal	Hexagonal	Hexagonal
Parameter Kisi	a= 9,0480 Å c= 6,7040 Å	a= 9,423 Å c= 6,875 Å	a= 9,4166 Å c= 6,8745 Å

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa hidroksiapatit batu kapur memiliki struktur Kristal hexagonal dengan parameter kisi a=9,0480 Å dan c=6,704 berdasarkan hasil data JCPDS 96-110-0067. Dimana hasil ini mendekati dengan data stokimetri dari JCPDS 9-432 dengan nilai parameter kisi a=9,432 Å c=6,875 Å dan data dari HA 200 Jepang nilai parameter kisi a=9,4166 Å c=6,8745 Å dengan struktur kristal hexagonal dan cukup sesuai

dengan hidroksiapatit Firnanelty (Firnanelty, 2016).

Sementara menurut penelitian Putri, dkk. (2015), yang mensistesis hidroksiapatit dengan metode hidrotermal diketahui fasa kristalin hidroksiapatit dicirikan memiliki karakteristik puncak dengan 2θ pada $31,16^\circ$. Diperkuat dengan adanya puncak 2θ pada $25,91^\circ$; $32,03^\circ$; dan $34,49^\circ$ dengan struktur kristal apatite.

2. Hasil Uji Sitotoksisitas Hidroksiapatit dengan MTT (Microtetrazolium)

Salah satu parameter penting yang perlu diperhatikan dalam pemilihan material dibidang medis adalah biokompabilitas. Biokompabilitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu bahan untuk memberi respon biologis yang baik jika diaplikasikan ketubuh (Anusavice, 2003). Pengujian sitotoksisitas suatu material merupakan tahap awal dalam penentuan biokompabilitas material implan.

Uji MTT assay adalah salah satu metode yang digunakan dalam uji sitotoksisitas dan merupakan metode kalorimetrik, dimana pereaksi MTT ini adalah garam tetrazolium yang dapat dipecah menjadi kristal formazan oleh system suksinat tetrazolium reduktase yang terdapat dalam jalur respirasi sel pada mitokondria yang aktif pada sel yang masih hidup. Kristal formazan ini memberi warna ungu yang dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan ELISA reader.

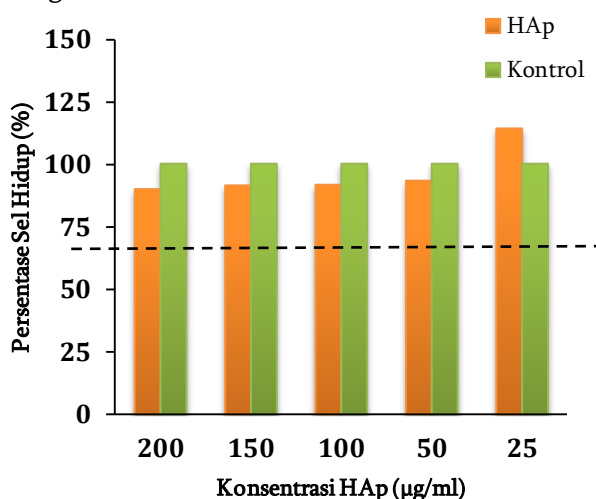
Hasil pengujian tingkat sitotoksisitas menggunakan MTT assay pada sampel hidroksiapatit dengan berbagai konsentrasi sebesar 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml dan 200 µg/ml sementara wadah tanpa pengenceran ekstrak sampel digunakan sebagai kontrol seperti pada tabel dibawah ini.

Tabel 2. Persentase Sel Hidup (%) Hasil Uji MTT Hidroksiapatit

Kontrol		Hidroksiapatit		
Persentase sel hidup	Standar deviasi	Konsentrasi (µg/ml)	Persentase sel hidup (%)	Standar deviasi
100,29	6,19	200	90,13	8,37
		150	91,62	11,69
		100	91,87	10,91
		50	93,51	7,04
		25	114,38	14,46

Dari Tabel 2 didapatkan hasil persentase sel hidup dengan pengujian sitotoksitas menggunakan metode MTT dengan besar persentase sel hidup pada kontrol sebesar 100,29 % dan standar deviasi 6,19. Besar persentase sel hidup pada konsentrasi HAp 200 µg/ml sebesar 90,13%, HAp 150 µg/ml sebesar 91,62%, HAp 100 µg/ml sebesar 91,87%, HAp 50 µg/ml sebesar 93,51% dan HAp 25 µg/ml sebesar 114,38%. Dengan nilai standar deviasi untuk masing-masing konsentrasi adalah 8,37; 11,69; 10,91; 7,04 dan 14,46.

Grafik hubungan antara persentase sel hidup dengan konsentrasi volume hidroksiapatit dapat dilihat pada Gambar 6 sebagai berikut:



Gambar 6. Grafik Hasil Uji Sitotoksitas Dengan Metode MTT

Berdasarkan grafik pada Gambar 6, pertumbuhan sel hidup sampel hidroksiapatit batu kapur memiliki besar 90,13% pada konsentrasi HAp 200 µg/ml, 91,62% pada konsentrasi HAp 150 µg/ml, 91,87% pada

konsentrasi HAp 100 µg/ml, 93,51% pada konsentrasi HAp 50 µg/ml, 114,38% pada konsentrasi HAp 25 µg/ml. Persentase pertumbuhan sel hidup yang paling tinggi terletak pada konsentrasi HAp 25 µg/ml dengan nilai persentase sel hidup sebesar 114,38%.

Persentase sel hidup hidroksiapatit dengan konsentrasi HAp 200 µg/ml, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml mendekati nilai kontrol dan HAp dengan konsentrasi 25 µg/ml berada di atas nilai kontrol. Semua sampel berada di atas batas grade yakni 70 % yang artinya sampel memiliki tingkat persentase sel hidup yang baik. Kontrol sendiri berasal dari wadah tanpa pengenceran ekstrak sampel. Persentase sel hidup yang dihasilkan dari pengujian MTT membuktikan senyawa HAp tidak bersifat toksik pada sel fibroblast.

Pembahasan

Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) merupakan biomaterial yang sering digunakan dalam bidang ortopedi yaitu penanganan kerusakan tulang sebagai *bone graft*, serta dapat diaplikasikan dalam bidang kedokteran gigi. Hidroksiapatit memiliki sifat biokompatibel dan osteokonduktif yang sifatnya sangat mirip dengan penyusun jaringan keras pada tulang dan gigi manusia (Cheng, 2001).

Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) disintesis dari sumber kalsium yang berasal dari kalsium oksida (CaO). Kalsium oksida (CaO) dapat diperoleh dari kalsinasi CaCO_3 yang terkandung di dalam bahan alami seperti batu kapur. Serbuk CaO dilarutkan dengan air untuk diubah menjadi kalsium hidroksida $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Larutan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ dicampur dengan larutan asam fosfat untuk mendapatkan sumber fosfat sebagai ion utama pembentuk hidroksiapatit (Sirait, M. 2020).

Hasil sintesis hidroksiapatit batu kapur memiliki struktur kristal hexagonal, adanya fasa kristal yang terbentuk ditandai dengan adanya puncak-puncak difraksi berdasarkan hasil analisa XRD dan serbuk yang dihasilkan berukuran nano serta tidak bersifat toksik saat diaplikasikan sebagai *graft* tulang. Hasil pengujian sitotoksitas menggunakan metode MTT *Assay* memiliki nilai persentase sel hidup diatas 70% dan bersifat biokompatibel sehingga

dapat memenuhi syarat sebagai kandidat bahan *graft* tulang manusia.

Identifikasi pola difraksi sinar-x hidroksiapatit yang disintesis dicirikan oleh puncak difraksi di antara sudut 2θ pada $19-80^\circ$. Secara kuantitatif didapatkan informasi tentang struktur kristal hidroksiapatit batu kapur yang identik dengan hidroksiapatit stokiometri dan HA 200 Jepang yaitu berbentuk hexagonal. Hal ini dikarenakan parameter kisi kristal hidroksiapatit batu kapur ($a= 9,0480 \text{ \AA}$ $c= 6,7040 \text{ \AA}$) identik dengan parameter kisi hidroksiapatit stokiometri ($a= 9,423 \text{ \AA}$ $c= 6,875 \text{ \AA}$) dan HA 200 Jepang ($a=9,4166 \text{ \AA}$ $c=6,8745 \text{ \AA}$) (Prabaningtyas, 2015). Hidroksiapatit batu kapur yang dihasilkan memiliki ukuran partikel sebesar 17,8 nm yang dihitung dengan menggunakan persamaan Scherrer.

Biokompabilitas merupakan salah satu syarat yang harus dipenuhi oleh HAp untuk aplikasi *graft* tulang sintesis dan menguntungkan bagi proses osteokonduksi, osteoinduksi dan osteogenesis tulang. Hasil dari analisa didapatkan persentase pertumbuhan sel hidup yang paling tinggi terletak pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ dengan nilai persentase sel hidup sebesar 114,38%, tingginya nilai persentase sel hidup ini disebabkan oleh nilai densitas optik sampel yang semakin dekat dengan nilai densitas optik kontrol. Grafik hasil uji MTT pada Gambar 6 menunjukkan bahwa HAp tidak toksik sebagai bahan *graft* tulang karena pertumbuhan sel hidup melewati batas toksik yakni 70% (grade 3) berdasarkan standar ISO 10993-5:2009 (E) dan OD dari perlakuan masih mendekati OD dari kontrol (Wijayanti, 2010).

Hidroksiapatit hasil sintesis memiliki kesamaan struktur kimia dengan tulang mineral pada jaringan tulang manusia, sehingga hidroksiapatit sintetik menunjukkan daya afinitasnya (daya tarik) sangat kuat pada tempat jaringan keras. Pembentukan ikatan kimia dengan tempat jaringan yang bagus memberikan keuntungan pada hidroksiapatit dalam aplikasi klinik sebagai material pengganti tulang (*bone graft*), seperti *allograft* atau sebagai pelapis implant logam (Ardhiyanto, 2011).

Senyawa hidroksiapatit batu kapur telah terbentuk cukup baik dan termasuk kedalam jenis hidroksiapatit nano kristalin yang memiliki derajat kristalinitas yang rendah dengan sifat yang lebih mudah resorpsi, bioaktifitas yang lebih baik dan terbukti lebih cepat untuk pertumbuhan tulang baru. Bioaktifitas yang tinggi dari hidroksiapatit dengan kristalinitas rendah ialah karena release dari ion kalsium dan fosfat ke dalam lingkungan mikro lokal, hal ini menciptakan area yang sesuai untuk pertumbuhan tulang baru (Pascawinata, 2013). Ukuran partikel yang lebih kecil akan meningkatkan luas permukaan kontak HAp dengan jaringan sekitarnya pada saat diaplikasikan. Dengan meluasnya permukaan kontak maka ikatan antar muka antara jaringan tulang dengan HAp akan meningkat (Purwasasmita, 2008).

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dan analisa dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

Fasa kristalin hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) telah terbentuk berdasarkan hasil uji XRD dan memiliki karakteristik puncak yang kuat di 2θ pada $26,78^\circ$, $33,14^\circ$, $34,49^\circ$ dan $52,97^\circ$ dengan struktur kristal adalah struktur hexagonal. Parameter kisi kristal hidroksiapatit batu kapur ($a= 9,0480 \text{ \AA}$ $c= 6,7040 \text{ \AA}$) identik dengan parameter kisi hidroksiapatit stokiometri ($a= 9,423 \text{ \AA}$ $c= 6,875 \text{ \AA}$) dan HA 200 Jepang ($a= 9,4166 \text{ \AA}$ $c= 6,8745 \text{ \AA}$). Komposit hidroksiapatit bersifat biokompabilitas dan tidak toksik sebagai bahan *graft* tulang berdasarkan hasil uji MTT karena pertumbuhan sel hidup melewati batas toksik yakni 70% (grade 3) berdasarkan standar ISO 10993-5. Dengan persentase pertumbuhan sel hidup yang paling tinggi pada konsentrasi 25 $\mu\text{g/ml}$ HAp dengan nilai persentase sel hidup sebesar 114,38%.

Saran untuk penelitian selanjutnya yakni: Penggunaan variasi suhu dan lama waktu sintering agar mendapatkan hasil hidroksiapatit sebagai bahan *graft* dengan karakterisasi terbaik. Penambahan karakterisasi untuk penelitian lebih lanjut untuk mengetahui morfologi permukaan dan ukuran pori dengan pengujian

SEM . Pengujian selanjutnya untuk sifat biokompabilitas dengan uji in vivo.

DAFTAR PUSTAKA

- Anusavice, Kenneth J. 2003. Dental materials eleventh edition. USA: Elsevier science. 832 halaman.
- Ardhiyanto, H. Bowo. 2011. Peran Hidroksiapatit Sebagai Bone Graft Dalam Proses Penyembuhan Tulang. *Stomatognathic (J.K.G Unej)* Vol. 8 No. 2 2011: 118-21. Jember: Universitas Jember.
- Arita K, Yamamoto A, Shinonaga Y, dkk. Hydroxyapatite Particle Characteristics Influence The Enhancement Of The Mechanical And Chemical Properties Of Conventional Restorative Glass Ionomer Cement. *Dental Materials Journal*. 2011; 30(5): 672-683.
- Cheng, Kui, dkk. Synthesis of Hydroxyapatite/Fluoroapatite Solid Solution by a Sol-gel Method. *Material Letters*. Vol. 51 (2001), h. 37-41.
- Firnanely. (2016). Sintesis Komposit Hidroksiapatit-Kitosan-Pva Sebagai Injectable Bone Substitute. Tesis. Bogor: IPB.
- Fitriawan, Margi., Saptaria R.A., Budi A.S., Eva Setyawati, Agus Y., Mahardika. (2014). Sintesis Hidroksiapatit Berbahan Dasar Tulang Sapi dengan Metode Pretipitasi sebagai Kandidat Pengganti Graft Berdasarkan Compressive Strength. *Prisiding SNMF 2014*. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Floriaan S. dkk. (2011). Sintesis Dan Karakterisasi Hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ Dari Batu Kapur Dengan Metode Sol-Gel. Makassar: FMIPA UNHAS.
- Gunawan, Malik A., Mulyadi S., Riana, Hayani, A. 2010. Karakteristik Fisik Dan Mekanik Tulang Sapi Variasi Berat Hidup Sebagai Referensi Desain Material Implan. *Seminar Nasional Tahunan Teknik Mesin (SNMTTM) Ke-9*.
- Johansson, P., Jimbo, R., Kozai, Y., Sakurai, T., Kjellin, P., Currie, F. & Wennerberg, A. (2015). Nanosized Hydroxyapatite Coating on PEEK Implants Enhances Early Bone Formation: A Histological and Three-Dimensional Investigation in Rabbit Bone. *Materials*. 8(7): 3815-3830.
- Khoiriyah, M. dan Sari, E.C. (2018). Sintesis dan Karakterisasi Graft tulang dari Komposit Hidroksiapatit/Kolagen/Kitosan (HA/Coll/Chi) dengan Metode Ex-Situ sebagai Kandidat Implan Tulang. *Unesa Journal of Chemistry* Vol. 7, No. 1. Surabaya: State University of Surabaya.
- Nayak, A.K., Laha, B. & Sen, K. (2011). Development of Hydroxyapatite-Ciprofloxacin Bone-Implants using »Quality by Design«. *Acta Pharmaceutica*. 61. 25-36.
- Pascawinata, Andries. dkk. (2013). Perbandingan proses Penyembuhan Tulang Pada Implantasi Hidroksiapatit Nanokristalin Dengan Hidroksiapatit Mikrokristalin (Kajian Pada Tulang Tibia Kelinci). *J Ked Gi*, Vol. 4, No. 4, Oktober 2013: 236-241. Yogyakarta: UGM.
- Prabaningtyas, R.A.M.S. (2015). Karakterisasi Hidroksiapatit Dari Kalsit (Pt. Dwi Selo Giri Mas Sidoarjo) Sebagai Bone Graft Sintetis Menggunakan X-Ray Diffractometer (Xrd) Dan Fourier Transform Infra Red (Ftir). *Universitas Jember*. Jember: 26-28.
- Purwasasmita, Bambang S. Dan Ramos S. Gultom. 2008. Sintesis Dan Karakterisasi Serbuk Hidroksiapatit Skala Sub-Mikron Menggunakan Metode Presipitasi. *Jurnal Bionatura*, Vol. 10, No. 2, Juli 2008 : 155 – 167. Bandung: ITB.
- Putri, P. dkk. (2015). Pengaruh Rasio Ca/P Dan Ph Pada Sintesa Hidroksiapatit Dari Kulit Kerang Darah Dengan Metode Hidrotermal Suhu Rendah. *Skripsi*. Riau: Fakultas Teknik Universitas Riau.
- Sirait, Makmur., K. Sinulingga., N. Siregar., R. S. D. Siregar. 2020. *Synthesis Of*

Hydroxyapatite From Limestone By
Using Precipitation Method. J. Phys.:
Conf. Ser. 1462 2 (2020) 012058

Sirait, Makmur., K. Sinulingga., N. Siregar.,
Yusnah F. Damanik. 2020. Synthesis
and characterization of hydroxyapatite
from broiler eggshell. AIP Conference
Proceedings 2221, 110030 (2020);

Wijayanti, Fitria. (2010). Variasi Komposit
Cobalt – Chromium Pada Komposit Co-
Cr-HAP Sebagai Bahan Implant. Skripsi
Fakultas Sains dan teknologi Universitas
Airlangga.

Wirata, I. W. , (2016). Bahan Cangkok
Demineralized Freeze-Dried Bovine
Bone Xenograft (DFDBBX) Dan
Hydroxyapatite Bovine Bone Xenograft,
Denpasar, Indonesia: Skripsi,
Universitas Udayana.