

PEMBUATAN PASTA DAN PEMBENTUKAN LAPISAN TIPIS HIDROKSI APATIT KARBONAT

Selfa Dewati Samah*, Syukri Arief, dan Novesar Jamarun
Laboratorium Kimia, Material Jurusan Kimia FMIPA,
Universitas Andalas, Padang 25136
*Email : cl_che@yahoo.com

ABSTRACT

Paste of Carbonated Hydroxyapatite (CHA) as a biocompatible material that can be used in the bone and teeth repair has been developed on preparation of thick film. CHA paste was prepared by mixing precipitate of CHA with CaSO_4 and polyethylene glycol (PEG) in 2-propanol as solvent. Paste was deposited on substrate to get thick films by screen printing method. X ray diffraction (XRD) analysis has shown hexagonal crystal structure and crystal size of CHA acquired 7,2 nm by Scherrer's method. Fourier Transform Infrared (FTIR) analysis has shown absorption spectra which indicating phosphate, carbonate, and hydroxide group. Size of this composite particles analyzed by PSA (particle size analyzer) about $3\mu\text{m}$ and pore size was 0.44-0.49 nm obtained from BET analysis, increased with the addition of CaSO_4 (0.44 to 0,49 nm). Rephrase PEG was found as an adhesive and homogenize paste on substrat surface. In addition, CHA paste also potentially can be used as bone cement.

Keywords : *Paste, thick film, carbonated hydroxyapatite*

PENDAHULUAN

Semen, pengisi (*filler*) atau material substitusi tulang mulai banyak dikembangkan para peneliti saat ini di Indonesia, mengingat produksi biomaterial khususnya yang memiliki fungsi sebagaimana yang tersebut diatas masih relatif sedikit.. Material yang telah digunakan dan diujikan sebagai bahan implan yaitu material dari jenis logam dan non-logam. Contoh beberapa material logam tersebut yaitu Ti, Ti *alloy*, *stainless steel*, dan *alloy CrCoMo*, sedangkan material non-logam seperti keramik ZrO_2 , polimer polietilen, dan komposit C/C.

Berdasarkan pengujian implantasi, logam Ti relatif lebih baik dibandingkan dengan material lainnya untuk digunakan sebagai implan^[1]. Akan tetapi, material implan berjenis metal ini dikhawatirkan akan dapat menghasilkan ion yang justru berbahaya.

Oleh karena itu perlu dilakukan pelapisan dengan material yang bersifat biokompatibel.

Untuk mengatasi beberapa permasalahan diatas dikembangkan suatu material yang lebih kompatibel terhadap jaringan tulang yaitu dari jenis dan turunan senyawa kalsium fosfat, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Semen tulang kalsium fosfat (*Calcium Phosphat Bone Cements/CPBCs*) lebih bersifat osteotransduktif yaitu kemampuan CPBCs untuk mengalami transformasi menjadi jaringan tulang baru setelah implanasi. Selain itu CPBCs juga relatif mudah dibentuk (dicetak). Tidak hanya sebagai semen tulang, senyawa turunan kalsium fosfat ini juga dapat digunakan sebagai pengisi (*filler*) dan bahan implan/pengganti tulang^[2].

Keunggulan material dalam bentuk semen dibandingkan bentuk granul, blok, maupun serbuk yaitu bersifat dapat diinjeksikan

(*injectable*) sehingga dapat mengisi ruang (kavitasi) pada tulang dan gigi yang cacat serta bersifat dapat mengeras sendiri^[3,4]. Keunggulan lain dari semen ini yaitu dapat dicetak sehingga dapat juga digunakan sebagai pengisi pada tulang yang rusak^[5,6].

Semen berbahan dasar kalsium fosfat dapat dibentuk melalui pencampuran satu atau lebih senyawa kalsium fosfat dalam suatu larutan berair. Diantara senyawa kalsium fosfat yang dimaksud yaitu hidroksi apatit dan β -TCP (tri kalsium fosfat). Senyawa ini selain dapat dibuat dalam bentuk semen (yang bersifat *injectable*) juga telah dibuat dalam bentuk blok dan granul^[7].

Ada beberapa jenis turunan kalsium fosfat salah satunya adalah mineral apatit^[8]. Dari banyak macam senyawa turunan kalsium fosfat, mineral apatit berupa hidroksi apatit (HA) dan hidroksi apatit karbonat (*carbonated hydroxy apatite*, CHA) cukup banyak dikembangkan dalam penelitian khususnya penelitian yang berkaitan dengan tulang dan gigi karena mineral ini bersifat biokompatibel. Namun, dari segi pengujian CHA memiliki sifat osteokonduktifitas dan lebih mudah mengalami bioresorpsi dibandingkan dengan HA^[9].

CHA dikenal juga dengan *dahllite* terbentuk dari proses karbonasi senyawa HA. Istilah lain yang digunakan untuk senyawa ini yaitu CO₃-Ap. CHA ini dapat dimanfaatkan sebagai material substitusi tulang dan remineralisasi enamel (email gigi)^[9,10]. Material tersebut juga dapat digunakan sebagai implan tulang dengan dilapiskan pada suatu substrat (berbahan logam, keramik atau polimer). Tujuan pelapisan adalah untuk meningkatkan sifat mekanik material implan, meningkatkan respon sel dan sifat osteokonduktifitas, serta menurunkan pembentukan ion-ion logam (jika logam digunakan sebagai bahan implan). Sifat material implan (hasil pelapisan) tidak hanya ditentukan dari komposisi senyawa dan kristalinitasnya, namun juga dari ada tidaknya pori.

Sebagai jenis batuan fosfat, CHA memiliki sifat diantaranya nilai densiti 1,732 g/cm³ dan kekerasan vicker 556 MPa (pada konsentrasi 95% CHA, 5% weddellite), stabil pada pH

diatas 7^[11]. CHA tidak stabil secara termal, kestabilan tersebut tergantung komposisi kimia penyusun CHA yang tepat dan kondisi atmosfer^[12,13]. Keberadaan gugus karbonat sangat dipengaruhi oleh temperatur dan atmosfer pemanasan^[13].

CHA dapat dibuat dalam bentuk *powder* ataupun lapisan. Berbeda dengan HA (yang telah banyak diteliti membentuk pasta), penelitian CHA dalam bentuk pasta masih relatif sedikit.

Pembentukan lapisan tipis (*thin film*) HA dan CHA telah dikembangkan dengan berbagai macam metode diantaranya biomimetik, prekalsifikasi, elektrodeposisi, *electron-beam deposition*, *plasma spraying*, dan *sputtering*. Khusus untuk HA juga telah dikembangkan dalam bentuk lapisan berupa *thick film*. Mene et al (2010) telah membuat HA dalam bentuk *thick film* dengan metode *screen printing*^[14]. Oleh karena itu perlu dikembangkan penelitian pembentukan pasta CHA sebagai alternatif pembuatan pasta semen tulang dan pembentukan *thick film* CHA sebagai alternatif pembentukan lapisan tipis CHA.

Pasta CHA dibuat dengan menggunakan polietilen glikol (PEG) sebagai perekat (binder) dan pembentukan *thick film* CHA dibuat melalui metode *screen printing*. PEG telah banyak digunakan sebagai material yang kompatibel dalam bidang medis. Penggunaan PEG meliputi pada proses *drug delivery system*, mediator transfer gen, dan lain-lain. Selain PEG juga digunakan gipsium sebagai material tambahan. Penambahan gipsium bertujuan mengimbangi sifat PEG yang higroskopis dimana gipsium itu sendiri bersifat mampu berinteraksi dengan air. Gipsium juga merupakan material yang kompatibel, dimana daya resorpsinya sangat cepat dan penggunaannya sebagai biomaterial dalam mengatasi tulang yang rusak dikombinasi dengan biomaterial yang lain dengan daya resorpsi yang relatif lebih rendah.

Dalam penelitian ini dilihat kemampuan injektabilitas pasta CHA dengan penambahan PEG sebagai perekat dan aditif kalsium sulfat. PEG diharapkan dapat meningkatkan sifat adesif pasta sehingga dapat membantu dalam pelapisan pada permukaan substrat

yang dapat digunakan sebagai implant, sedangkan penambahan kalsium sulfat diharapkan membantu dalam peningkatan porositas material tersebut.

METODOLOGI PENELITIAN

Peralatan dan Bahan

Peralatan yang digunakan diantaranya adalah peralatan gelas kimia, termometer, kertas pH universal, kertas saring, *hotplate stirrer*, substrat (plat stainless still dan kaca), *Fourier Transform Infrared* (FTIR) (Jasco, FT/IR-460 Plus), Particle Size Analyzer (PSA) (Analysette 22 NanoTec Plus. Fritsch), Metode Brunauer-Emmet-Teller (BET) dan *X-ray Diffraction* (XRD) (Philips PW 1710, radiasi $\text{CuK}\alpha$).

Adapun bahan yang digunakan adalah Ca-asetat hidrat $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Merck), $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Merck), aquades, 2-propanol (Merck), ammonia (Brastaco), CaSO_4 (Brastaco), dan polietilen glikol 1000 (Merck).

Pembuatan Hidroksi Apatit Karbonat (*Carbonated Hydroxy Apatite, CHA*)

Pembentukan CHA yang relatif sederhana dikembangkan melalui pereaksian kalsium asetat ($\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) dengan campuran amonium dihidrogen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) dan amonium karbonat ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) pada suhu 60°C dalam suasana basa dengan perbandingan komposisi berturut-turut 0,2 M : 0,12 M : 0,06 M (Yokota, 2006).

Pembuatan CHA didahului dengan pembuatan larutan $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0,2M dan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,12 M yang di dalamnya terdapat $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 0,06 M. Untuk pembuatan larutan tersebut masing-masing ditimbang 3,16 g, 1,38 g, dan 0,94 g (secara berturut-turut) dan dilarutkan dalam labu ukur 100 mL. Larutan kalsium asetat kemudian ditempatkan dalam Erlenmeyer 250 mL.

CHA dibuat dengan penambahan 100 mL larutan $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ sedikit demi

sedikit sambil distirer ke dalam larutan kalsium asetat hidrat 100 mL dengan konsentrasi 0,2 M^[15]. pH campuran ini diatur pada kisaran 8 dengan penambahan ammonia cair dan dipanaskan pada suhu tidak lebih dari 60°C selama 3 jam. Endapan yang terbentuk disaring dengan menggunakan kertas saring. Endapan yang diperoleh selanjutnya dibentuk menjadi pasta.

Pembentukan Pasta CHA

Pasta dibuat melalui penambahan endapan CHA hasil saringan dengan perekat berupa polietilen glikol (PEG). PEG yang ditambahkan sebelumnya dilarutkan 2-propanol. Larutan PEG dicampurkan dengan CHA dengan variasi perbandingan 1:7, 1:8, 1:9 dan 1:10 (PEG : CHA). Selain variasi perbandingan jumlah PEG, dalam penelitian ini juga dilakukan variasi penambahan CaSO_4 yaitu 0%, 1%, 5%, dan 9% terhadap berat total campuran dengan tujuan melihat pengaruh penambahan CaSO_4 terhadap permukaan material komposit tersebut khususnya terhadap porositasnya. Campuran diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen dalam gelas beaker 25 mL. Pasta yang terbentuk dilapiskan terhadap substrat untuk membentuk *thick film*.

Pembentukan Lapisan Tipis CHA (Metode *Screen Printing*)

Pasta CHA dilapiskan pada substrat dengan metode *screen printing*. Substrat yang digunakan berupa plat (dengan ukuran film 1 1,5 x p 5 cm) yang divariasikan dari jenis logam (berupa *stainless steel*) dan kaca.

Pada proses pelapisan, permukaan substrat dibersihkan dengan alkohol sebelum dilakukan pelapisan. Pasta CHA ditempatkan pada substrat (yang telah dibatasi dengan selotip pada sisi kanan dan kiri) dan diratakan dengan menggunakan *squeegee*. *Squeegee* yang digunakan berupa *roller* yang terbuat dari kaca. Lapisan tipis yang telah terdeposisi pada permukaan substrat dikeringkan pada suhu ruang dan diukur ketebalannya berdasarkan perbandingan volume dari lapisan CHA yang terbentuk terhadap luas permukaan lapisan tersebut.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Endapan CHA yang diperoleh dari prosedur yang telah dilakukan selanjutnya dikeringkan pada suhu kamar untuk dilakukan uji FT-IR (Gbr. 1) dan karakterisasi *x-ray diffraction*, XRD (Gbr. 2).

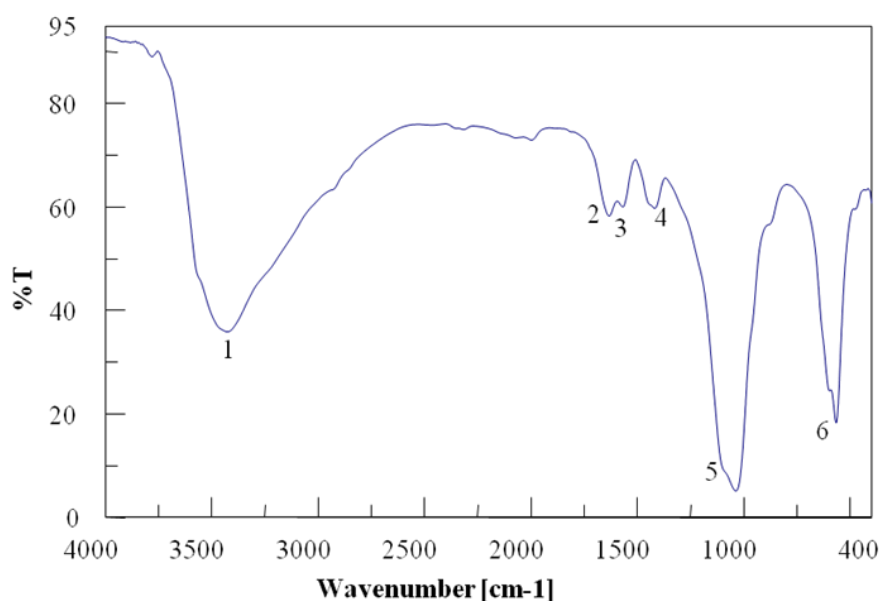
Hasil Analisis Spektrofotometer FT-IR

Hasil analisis dengan spectrum FTIR terhadap sampel CHA diperlihatkan pada Gambar 1. Pada Gambar 1 terlihat adanya pita serapan gugus PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , dan OH⁻ didalam sampel. Serapan pada angka gelombang 1420,32 cm^{-1} (nomor 4 pada gambar 1) menunjukkan adanya serapan oleh ion karbonat (CO_3^{2-}). Serapan pada angka gelombang 1038,48 cm^{-1} (nomor 5 pada Gambar 1) dan didukung pada daerah sidik jari pada 566,969 cm^{-1} (nomor 6 Gambar 1) menunjukkan pita serapan untuk ion fosfat (PO_4^{3-}) serta serapan pada angka gelombang 3424, 96 cm^{-1} (nomor 1 pada Gambar 1) menunjukkan pita serapan stretching O-H. Hal ini merujuk pada referensi dimana daerah serapan pada angka gelombang sekitar 1450-1410 cm^{-1} menunjukkan pita serapan spesifik untuk ion CO_3^{2-} , sedangkan serapan pada angka gelombang 1100-950 cm^{-1} dan 3920-3280 cm^{-1} berturut-turut menunjukkan serapan oleh gugus P-O pada PO_4^{3-} dan O-H stretching. Ion PO_4^{3-} juga dapat memberikan

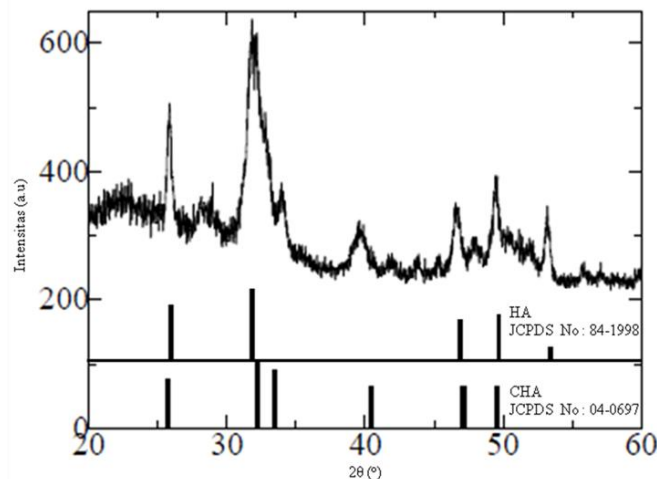
serapan pada daerah sidik jari pada 567 cm^{-1} [15, 16]. Puncak lain yang terdeteksi pada nomor 2 dan 3 merupakan stretching C=O dimana stretching C=O terjadi pada daerah 200-1500 cm^{-1} [13]. Puncak ini merupakan puncak pengotor berupa gas CO_2 yang terdeteksi saat pengukuran.

Hasil Analisis XRD (X-Ray Diffraction)

Analisis XRD digunakan untuk mengetahui susunan atom-atom dalam suatu kristalin sehingga akan diketahui struktur, orientasi dan ukuran kristal. Gambar 2 merupakan pola XRD dari hidroksi apatit karbonat dan hidroksi apatit yang memperlihatkan kecocokan dengan data standar (JCPDS No: 04-0697 untuk CHA, dan JCPDS no. 84-1998 untuk HA). Hal ini didukung dengan kesamaan puncak pada sudut $2\theta = 31.82^\circ$, 25.84° , 33.2° , dan 39.52° terhadap standar JCPDS No: 04-0697 serta kesamaan puncak 2θ terhadap standar JCPDS no. 84-1998 dengan puncak-puncak yang mewakili yaitu pada 2θ 28.84° ; 31.82° ; 46.56° , 49.44° dan 53.2° . Struktur kristal untuk pola XRD tersebut adalah heksagonal. Dari data difraksi sinar-X dapat diketahui ukuran kristal dengan menggunakan metode Debye-Scherrer, yaitu 7,43 nm.



Gambar 1. Spektrum FTIR dari endapan hidroksi apatit karbonat.



Gambar 2. Pola XRD dari hidroksi apatit (HA) dan *carbonated hydroxyl apatite* (CHA)

Pembentukan Lapisan Tipis Hidroksi Apatit Karbonat (*Carbonated Hydroxyapatite, CHA*)

Lapisan tipis CHA dibentuk menggunakan metode *Screen Printing*. Pasta yang digunakan dalam pembentukan lapisan dibuat dengan mencampurkan CHA, PEG, dan gipsum (perbandingan tertentu). Adapun ketebalan lapisan tipis yang diperoleh 1,35–5 μm menggunakan substrat kaca dan 3,02–7,64 μm untuk substrat baja.

Gambar 3 merupakan bentuk lapisan CHA yang diperoleh setelah dideposisi pada permukaan substrat baja. Pada gambar tersebut terlihat lapisan yang relatif halus dan homogen dengan adanya penambahan PEG dibandingkan dengan lapisan yang terbentuk tanpa adanya PEG. Berdasarkan hasil ini terlihat peranan PEG sebagai perekat yang dapat meningkatkan daya adesif pasta pada substrat. Dengan semakin tingginya daya adesif maka kekuatan lapisan yang terbentuk semakin meningkat^[17].

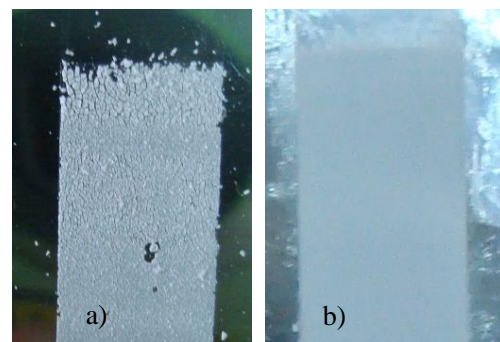
Analisis Permukaan

Berdasarkan hasil analisis permukaan menggunakan metode BET diperoleh sebaran ukuran pori partikel sampel dengan komposisi 0% CaSO_4 , 3% PEG yaitu $\pm 4,44 \text{ \AA}$, sedangkan untuk sampel dengan komposisi 9% CaSO_4 , 3% PEG yaitu $\pm 4,94 \text{ \AA}$. Dari hasil ini dapat diketahui bahwa

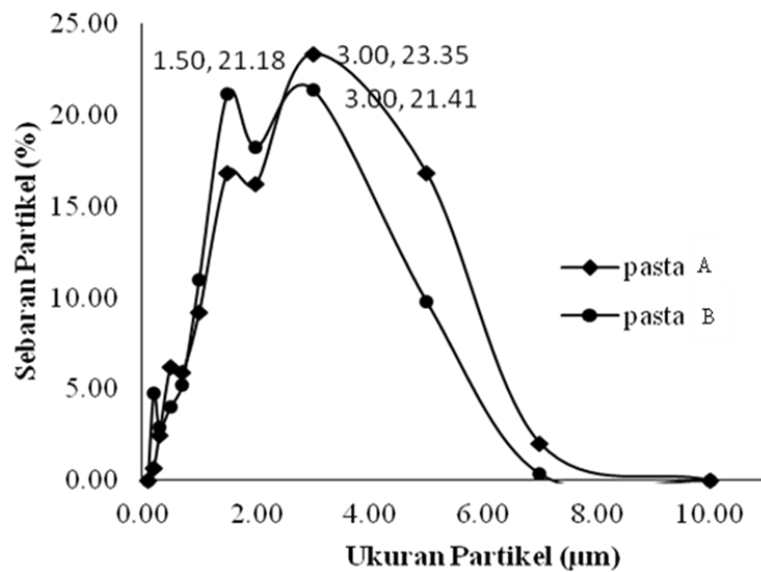
dengan penggunaan kadar PEG yang sama sedangkan kadar CaSO_4 divariasikan terlihat peningkatan ukuran pori, sehingga dapat disimpulkan penambahan CaSO_4 dapat berfungsi dalam pembentukan pori yang lebih besar. CaSO_4 memiliki kemampuan *interlocking* material pembentuk semen^[6].

Karakterisasi Particle Size Analyze (PSA)

Ukuran dan distribusi partikel penyusun pasta dapat diketahui melalui karakterisasi menggunakan peralatan *Particle Size Analyze* (PSA). Dimana, dari Gambar 4 dapat diketahui bahwa distribusi ukuran partikel yang paling banyak adalah 3 μm dengan persentase distribusi sebesar 23,35% (pasta A ; 3% PEG, 1% CaSO_4) dan 21,41% (pasta B ; 3% PEG, 9% CaSO_4).



Gambar 3. Foto lapisan komposit CHA- CaSO_4 pada permukaan baja; a) tanpa PEG; b) dengan adanya PEG.



Gambar 4. Kurva ukuran dan distribusi partikel dari pasta A (3% PEG, 1% CaSO₄) dan B (pasta B ; 3% PEG, 9% CaSO₄).

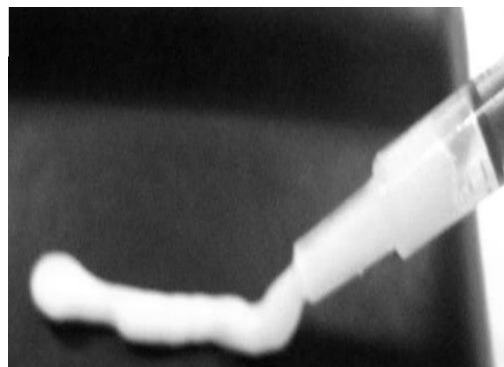
Dengan membandingkan persentase ukuran partikel 3 µm pada kedua pasta yaitu 23,35 : 21, 41% masing-masing untuk pasta A serta B, dapat diartikan bahwa perbedaan kandungan CaSO₄ (1 dan 9%) tidak berpengaruh signifikan terhadap sebaran ukuran dominan partikel dalam sampel

Pengujian Injektabilitas Pasta

Salah satu kelebihan pasta yaitu bisa diinjeksikan sehingga dapat menjangkau ruang-ruang yang sempit saat proses kavitasi. Sifat pasta yang mudah / dapat diinjeksikan (*injectable*) diuji dengan menggunakan *syringe* ukuran 1 cc (Gbr. 5).

Pasta dengan komposisi 7% PEG, 9% CaSO₄ dan pasta dengan komposisi 4% PEG, 9% CaSO₄ memiliki kemampuan untuk diinjeksikan dengan menggunakan *syringe*, sedangkan pasta dengan komposisi 3% PEG, 9% CaSO₄ sulit untuk menginjeksikan dengan menggunakan ujung jarum suntik karena terjadinya penyumbatan pada jarum tersebut. Hal ini dimungkinkan karena komposisi pasta tersebut cenderung lebih cepat mengering yang menyebabkan penyumbatan pada ujung jarum. Namun demikian, injeksi tanpa ujung jarum masih dapat memperlihatkan sifat *injectable* pasta. Dari hasil pengamatan ini dapat dikatakan

bahwa kekentalan pasta dengan menggunakan pelarut 2-propanol dengan perbandingan volumenya terhadap massa CHA 1,33-1,67 bersifat *injectable*



Gambar 5. Injektabilitas pasta menggunakan *syringe* 1 cc.

KESIMPULAN

Penelitian ini telah menjelaskan alternatif pembentukan pasta dan lapisan tipis dari hidroksi apatit karbonat. Analisis XRD menunjukkan CHA yang dibentuk dari metode yang dipakai tidak dalam fasa murni melainkan dalam bentuk campuran dengan HA dengan ukuran kristal 7,2 nm. Pasta CHA dapat dibentuk dengan penambahan CHA

dengan PEG dan PEG berperan sebagai perekat pasta pada substrat dimana tanpa PEG partikel tidak dapat menempel dengan baik pada permukaan substrat. Penambahan CaSO_4 berperan dalam interlocking material pembentuk pasta dan pembentukan pori serta membantu mempercepat proses pengeringan semen. Pasta berpotensi untuk dapat digunakan sebagai semen tulang

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam penelitian ini diucapkan terimakasih pada Bapak Adel Fisli di BATAN, Serpong yang telah memberikan bantuan dalam pengukuran analisis permukaan.

DAFTAR PUSTAKA

1. D. Kubies, L. Himmlova, T. Riedel, E. Chanova, K. Balik, M. Douderova, J. Bartova, V. Pesakova. The Interaction of Osteoblasts with Bone-Implant Materials : 1. The Effect of Physicochemical Surface Properties of Implant Materials. *Physiol. Res.* 60, 95-111, (2011).
2. Hongjin Qiu, Jian Yang, Pradeep Kodali, Jason Koh, Guillermo A. Ameer. A citric acid-based hydroxyapatite composite for orthopedic implants. *Biomaterials*, 27, 5845-5854. (2006).
3. Khodir, Wan Khartini Wan, Roslinda Shamsudin, Abdul Razak Daud, dan Yusof Abdullah. Injectable Hydroxyapatite- β -Tricalciu Phosphate-Calcium Sulphate Biocement. *Sains Malaysiana*, 34, 2, 77-80, (2005).
4. Vallet-Regi Maria, Jose' Mari'a Gonza'lez-Calbet. Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in Solid State Chemistry*, 32, 1-31, (2004).
5. Dorozhkin, V. Sergey, Self-setting Calcium Orthophosphate Formulations : Cements, Concretes, Paste, and Putties, *International Journal of Materials and Chemistry*, 1(1), 1-48, (2011).
6. A. Slosarczyk, J. Czechowska, Z. Paszkiewicz, A. Zima, New Bone Implant Material with Calcium Sulfate and Ti Modified Hydroxyapatite, *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 43, (2010).
7. M.P. Ginebra, M. Espanol, E.B. Montufar, R. A. Perez, and G. Mestres, New Processing Approaches in Calcium Phosphate Cements and Their Applications in Regenerative Medicine, *Acta Biomaterialia*, 6, 2863-2873, (2010).
8. Driessens, Osteotransductive Bone Cements. Proceeding of the Institution of Mechanical Engineers, part H : *Journal of Engineering Medicine*, 212, 6, 427-435, (1998).
9. E. Landi, G. Celotti, G. Logroscino, A. Tampieri. Carbonated Hydroxyapatite as Bone Substitute, *Journal of the European Ceramic Society*, 23, 2931-2937, (2003).
10. N. Roveri, E. Battistella, I. Foltran, E. Foresti, M. Lafisco, M. Lelli, B. Palazzo, dan L. Rimondini, Synthetic Biomimetic Carbonate-Hydroxyapatite Nanoscrystals for Enamel Remineralization, *Advanced Materials Research*, 47-50, 821-824, (2008).
11. A. Hesse, D. Heimbach, Causes of Phosphate Stone Formation and the Importance of Metaphylaxis by Urinary Acidification : a review, *World Journal Urology*, 17, 308-315, (1999).
12. Lafon, Jean-Philippe, Eric Champion, Didier Bernache-Assollant, Raymonde Gibert, Anne-Marie Danna, Thermal Decomposition of Carbonated Calcium Phosphate Apatites, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 72 (3), 1127-1134, (2003).
13. J. Barralet, J. C. Knowles, S. Best, W. Bonfield, Thermal Decomposition of Synthesised Carbonate Hydroxyapatite, *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, 13, 529-533, (2002).

14. R. U. Mene, M. P. Mahabole, R. C. Aiyer, dan R. S. Khairnar, Hydroxyapatite Nanoceramic Thick Film : An Efficient CO₂ Gas Sensor, *The Open Applied Physics Journal*, **3**, 10-16, (2010).
15. Yokota, Rie, Hidetaka Hayashi, Isao Hirata, Yasuo Miake, Takaaki Yanagisawa, Masayuki Okazaki. Detailed Consideration of Physicochemical Properties of CO₃apatites as Biomaterials in Relation to Carbonate Content Using ICP, X-ray Diffraction, FT-IR, SEM, and HR-TEM. *Dental Materials Journal*, **25** (3), 597-603, (2006).
16. Stuart, Barbara. H. Infrared Spectroscopy : Fundamentals and Applications, John Willey & Sons, Ltd., 46, 96, 102, (2004)
17. C.C. Silva, H. H. B. Rocha, F. N. A. Freire, M. R. P. Santos, K. D. A. Saboia, J. C. Goes, A. S. B. Sombra. Hydroxyapatite Screen-printed Thick Films : Optical and Electrical Properties. *Materials Chemistry and Physics*, **92**, 260-268, (2005).