

Sintesis dan Karakterisasi Pasta *Injectable Bone Substitute* Iradiasi Berbasis Hidroksiapatit

Synthesis and Characterization of Irradiated Injectable Bone Substitute Paste Based on Hydroxyapatite

Yessy Warastuti dan Basril Abbas

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi, BATAN
Jl. Lebak Bulus No. 49 Jakarta Selatan 12440
e-mail : yessyw@batan.go.id

Diterima 30 Mei 2011; Disetujui 23 September 2011

ABSTRAK

Sintesis dan Karakterisasi Pasta *Injectable Bone Substitute* Irradiasi Berbasis Hidroksiapatit. Telah dilakukan sintesis dan karakterisasi komposit hidroksiapatit - kitosan - *hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC) dalam bentuk pasta *injectable bone substitute* (IBS). Komposit dibuat melalui pengadukan hidroksiapatit, kitosan dan HPMC sampai homogen. Pasta IBS diiradiasi pada dosis steril 25 kGy dengan mesin berkas elektron. Karakterisasi pasta IBS dilakukan dengan mengukur kadar air, identifikasi gugus fungsi dengan *Fourier Transform Infra Red Spectrophotometer* (FTIR) dan morfologi sampel dengan *Scanning Electron Microscope Energy Dispersive Spectrophotometer* (SEM EDS). Hasil percobaan menunjukkan bahwa kadar air pasta IBS iradiasi lebih tinggi jika dibanding dengan pasta non iradiasi karena proses radiolisis dari air. Beberapa pita serapan yang khas dari pasta IBS teridentifikasi yaitu karbonat (CO_3^{2-}) pada bilangan gelombang 1420 cm^{-1} , fosfat (PO_4^{3-}) pada bilangan gelombang 1043 cm^{-1} , 605 cm^{-1} dan 568 cm^{-1} serta pita serapan NH_2 dari kitosan pada bilangan gelombang 1599 cm^{-1} . Gugus fungsi pasta IBS non iradiasi tidak berbeda signifikan dengan pasta IBS iradiasi. Pasta IBS berukuran mikro yaitu 0,05 sampai 0,1 μm . Iradiasi pasta IBS dengan EBM tidak mengubah morfologi dan struktur sampel.

Kata kunci : *Injectable Bone Substitute*, hidroksiapatit, iradiasi berkas elektron

ABSTRACT

Synthesis and Characterization of Irradiated Injectable Bone Substitute Paste Based on Hydroxyapatite. Synthesis and characterization of hydroxyapatite, chitosan and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) composite in injectable paste form have been done. The composite was synthesized by stirring hydroxyapatite, chitosan and HPMC until homogen. IBS paste was irradiated at the dose of 25 kGy (sterile dose). Characterization of IBS paste was conducted by measuring of the water content, identification of functional group with *Fourier Transform Infra Red Spectrophotometer* (FTIR), and identification of sample morphology with *Scanning Electron Microscope Energy Dispersive Spectrophotometer* (SEM EDS). The result showed that the water content of irradiated sample was higher than unirradiated sample due to water radiolysis. Several specific bands of IBS paste were identified, i.e., carbonate (CO_3^{2-}), at 1420 cm^{-1} , phosphate (PO_4^{3-}) at 1043 cm^{-1} , 605 cm^{-1} , 568 cm^{-1} and chitosan (NH_2) at 1599 cm^{-1} . There is no significant difference in absorbed band between irradiated and unirradiated samples. IBS paste has a microstructure with the size of 0.05 - 0.1 μm . Electron beam irradiation did not change the structure and morphology of sample.

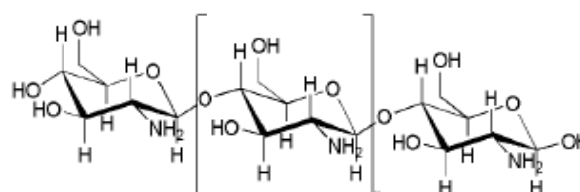
Key words : Injectable bone substitute, hydroxyapatite, electron beam irradiation

PENDAHULUAN

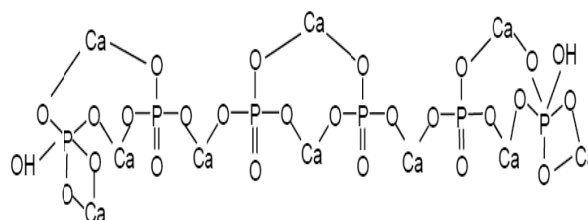
Sejak beberapa dekade terakhir ini, penelitian biomaterial ditujukan pada sintesis bahan biokeramik untuk pemakaian biomedis. Di antara berbagai jenis biokeramik, hidroksiapatit (HAp) adalah senyawa yang paling sering digunakan, terutama untuk bidang ortopedi dan periodontal. Hidroksiapatit adalah senyawa mineral anggota kelompok mineral apatit yang merupakan unsur anorganik utama penyusun tulang dan gigi. Hidroksiapatit memiliki beberapa karakteristik, yaitu bioaktif, biokompatibel, osteokonduktif, tidak toksik, dan tidak imunogenik, sehingga senyawa ini paling banyak digunakan untuk bahan pengganti tulang [1, 2, 3]. Akan tetapi hidroksiapatit bersifat rapuh sehingga agak sulit dibentuk sesuai dengan bahan implan yang dibutuhkan sebagai pengganti tulang. Serbuk hidroksiapatit yang dipakai untuk implan pada tulang yang rusak memiliki kelemahan yaitu tidak stabil ditanam sebagai implan. Oleh karena itu, beberapa peneliti telah mengembangkan suatu komposit hidroksiapatit dengan polimer untuk memperbaiki sifat mekaniknya [4]. Bahan komposit dari polimer alam merupakan generasi biomaterial masa datang yang penting dikembangkan dalam bidang rekayasa jaringan (*tissue engineering*). Salah satu polimer alam yang dapat digunakan untuk memperbaiki kelemahan hidroksiapatit adalah kitosan.

Kitosan [*poly(1,4)-D-glucopyranosamine*], merupakan senyawa turunan hasil deasetilasi kitin yang dapat diperoleh dari cangkang hewan laut seperti udang dan kepiting. Sifat yang penting dari kitosan adalah biokompatibel, biodegradabel, biofungsional dan tidak toksik. Berdasarkan sifat tersebut kitosan banyak digunakan di bidang kesehatan dan obat seperti untuk bahan pelepas obat dan sebagai *growth factor* pada pelapis obat. Campuran kitosan dan hidroksiapatit akan menghasilkan perbaikan di mana kitosan bersifat osteoinduktif karena mengandung *growth factor* dan hidroksiapatit bersifat osteokonduktif yang

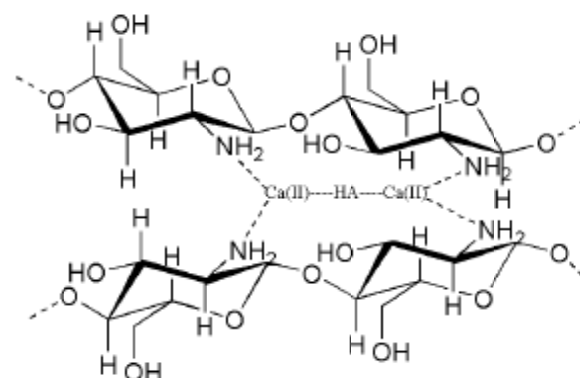
menyediakan pertumbuhan bagi sel osteoblast sehingga penambahan kitosan dapat memperbaiki sifat mekanik dan kekuatan dari hidroksiapatit [5]. Sebagai *growth factor*, kitosan dapat mempercepat pembentukan tulang baru karena strukturnya sama dengan *glycosamino glycans* dan *hyaluronic acid* yang terdapat pada kartilago [6,7,8]. Struktur kitosan dan hidroksiapatit disajikan pada Gambar 1 dan 2. Ion Ca^{2+} pada hidroksiapatit berikatan dengan $-\text{NH}_2$ dari kitosan membentuk ikatan koordinasi. Interaksi tersebut digambarkan pada Gambar 3 [9].



Gambar 1. Struktur kitosan



Gambar 2. Struktur hidroksiapatit



Gambar 3. Interaksi hidroksiapatit dengan kitosan

Beberapa pemakaian periodontal memerlukan graft biomaterial dalam bentuk *injectable* (dapat disuntikkan) yang berfungsi sebagai pengisi. Kelebihan *injectable system* ini antara lain dapat dibentuk sesuai dengan

bentuk rongga tulang yang akan diisi dan terpolimerisasi *in situ* setelah disuntikkan. Selain itu, komposit dalam bentuk *injectable* bersifat steril dan siap pakai [10, 11, 12]. Untuk menghasilkan komposit yang *injectable*, diperlukan suatu bahan pembuat gel atau pasta yang berfungsi sebagai matriks. Polimer yang banyak digunakan berasal dari golongan selulosa dan turunannya seperti *hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC). HPMC adalah polimer yang dapat larut dalam air dan banyak digunakan pada industri makanan sebagai pengental, pembuat gel dan bahan penstabil. Selain itu, banyak dipakai pula dalam industri farmasi untuk mengontrol sistem pelepasan obat. HPMC juga bersifat biokompatibel dan biodegradabel, sehingga sesuai jika dipakai untuk pembuatan komposit hidroksiapatit -kitosan. HPMC membentuk ikatan kompleks dengan kalsium fosfat, kitosan dan asam organik [5, 13, 14].

Pada penelitian ini dilakukan sintesis dan karakterisasi komposit pasta *injectable bone substitute* (IBS) dari serbuk hidroksiapatit, kitosan, dan HPMC. Iradiasi pasta IBS menggunakan mesin berkas elektron (MBE) dosis 25 kGy dilakukan agar dihasilkan produk yang siap pakai. Karakterisasi dilakukan dengan mengukur kadar air, dan analisis menggunakan *Fourier Transform Infra Red Spectrophotometer* (FTIR) dan *Scanning Electron Microscope Energy Dispersive Spectrophotometer* (SEM EDS).

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan antara lain HPMC produksi Sigma Aldrich, kitosan *medical grade* produksi PT Biotech Surindo, Cirebon, asam asetat glasial 100%, kalsium hidroksida, asam orto fosfat, dan larutan amoniak 25% produksi Merck.

Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik Acculab BL 210 S Sartorius, Sanyo MDF U4086 SBT *Ultra Low deep freezer*, *lyophilizer* Christ Beta I, *Vacuum*

sealer Quick Vac Speedy buatan Italia, Mesin Berkas Elektron (MBE) GJ-2 buatan Cina, *Moisture Balance* Ohaus MB 200, Spectrometer FTIR Shimadzu buatan Jepang, SEM JEOL JSM-6390 buatan Jepang, peralatan gelas (gelas ukur, Erlenmeyer, dan gelas piala), dan Terumo Syringe 1 ml.

Pembuatan Pasta IBS

Serbuk hidroksiapatit dibuat dengan cara mencampur kalsium hidroksida, asam orto fosfat dan amoniak 25% dengan menggunakan metode yang telah dilakukan sebelumnya [15]. Serbuk HPMC 2% (w/v) dilarutkan dalam air panas suhu 90-100°C. Kitosan 1% (w/v) dilarutkan dalam asam asetat glasial 100%. Kedua larutan tersebut dicampur serbuk hidroksiapatit dengan perbandingan berat 3:1:1. Campuran berbentuk pasta dimasukkan ke dalam jarum suntik kemudian dikemas ke dalam plastik polietilen (PE) kemudian divakum. Pasta IBS diiradiasi dengan dosis 25 kGy menggunakan Mesin Berkas Elektron (MBE) dengan tegangan 1,5 MeV, arus 2 mA, dan kecepatan konveyor 11,7 Hz.

Analisis Kadar Air menggunakan *Moisture Balance*

Sampel IBS iradiasi dan non iradiasi diukur kadar airnya dengan menggunakan *moisture balance* OHAUS MB 200. Sampel dikeluarkan dari jarum suntik, diletakkan pada piringan aluminium foil yang ada dalam alat *moisture balance*. Sampel pasta dipanaskan selama 1 jam pada suhu 105° C. Kadar air sampel tertera pada alat *moisture balance*.

Analisis Gugus Fungsi menggunakan Spektrofotometer FTIR

Pasta IBS hasil iradiasi dan non iradiasi dibekukan pada suhu -80°C selama satu malam, kemudian dikeringbekukan selama 48 jam. Setelah kering, sampel dihaluskan sehingga berbentuk serbuk kering. Serbuk kering dicampur dengan serbuk KBr dengan perbandingan sampel dan KBr sebanyak 1 : 100, kemudian dianalisis dengan spektrofotometer FTIR pada bilangan

gelombang 4000 cm^{-1} hingga 500 cm^{-1} . Dengan cara yang sama, HPMC, kitosan, dan hidroksiapatit diukur pula serapannya.

Karakterisasi Pasta IBS menggunakan SEM

Bentuk morfologi dan struktur pasta IBS dianalisis dengan menggunakan SEM JEOL JSM-6390 dan hasil analisis mikro diukur dengan *Energy Dispersive Spectrophotometer* (EDS). Tegangan yang digunakan 20 kV dengan perbesaran 20.000 kali. Dari hasil karakterisasi dengan SEM, dapat terlihat struktur mikro permukaan sampel pasta IBS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Kadar Air dengan *Moisture Balance*

Gambar 4 memperlihatkan sampel pasta IBS yang telah diiradiasi menggunakan mesin berkas elektron pada dosis 25 kGy yang merupakan dosis steril menurut ISO 13409 [16].



Gambar 4. Sampel pasta IBS

Secara visual hasil sampel IBS setelah diiradiasi menunjukkan pasta berwarna putih yang kental dan homogen. Hasil pengukuran kadar air ditampilkan pada Tabel 1.

Dari hasil pengukuran kadar air terlihat bahwa rata-rata kadar air pasta IBS meningkat setelah iradiasi. Setelah dihitung menggunakan ANOVA, diperoleh nilai F-hitung sebesar 6,72 dan F-tabel sebesar 7,71.

Nilai F-hitung lebih kecil daripada F-tabel, hal tersebut berarti bahwa kenaikan kadar air pasta IBS iradiasi tidak signifikan dibandingkan dengan pasta non iradiasi walaupun nilai rata-rata kadar air kedua jenis sampel tersebut berbeda. Kenaikan kadar air pasta IBS iradiasi terjadi karena adanya proses degradasi. Larutan polimer yaitu hidroksipropil-kitosan cenderung untuk mengalami degradasi jika diiradiasi pada konsentrasi rendah, sekitar 5% - 10% dan baru akan mengalami ikatan silang jika diiradiasi pada konsentrasi 40% [17, 18]. Konsentrasi larutan kitosan dan HPMC yang digunakan pada penelitian ini cukup rendah yaitu 1% dan 2%. Adanya asam asetat sebagai pelarut kitosan dapat menyebabkan rusaknya ikatan hidrogen via formasi NH_3^+ sehingga meningkatkan mobilitas molekul hidroksipropil-kitosan dalam larutan. Selain itu, adanya proses radiolisis air dapat menghasilkan produk primer makroradikal antara lain e_{aq}^- , $\text{H}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, H_2 , O , H^+ , H_2O_2 . Pada larutan yang konsentrasinya rendah, makroradikal tersebut dipisahkan oleh air dan terletak berjauhan satu dengan yang lainnya sehingga mencegah terjadinya ikatan intermolekul.

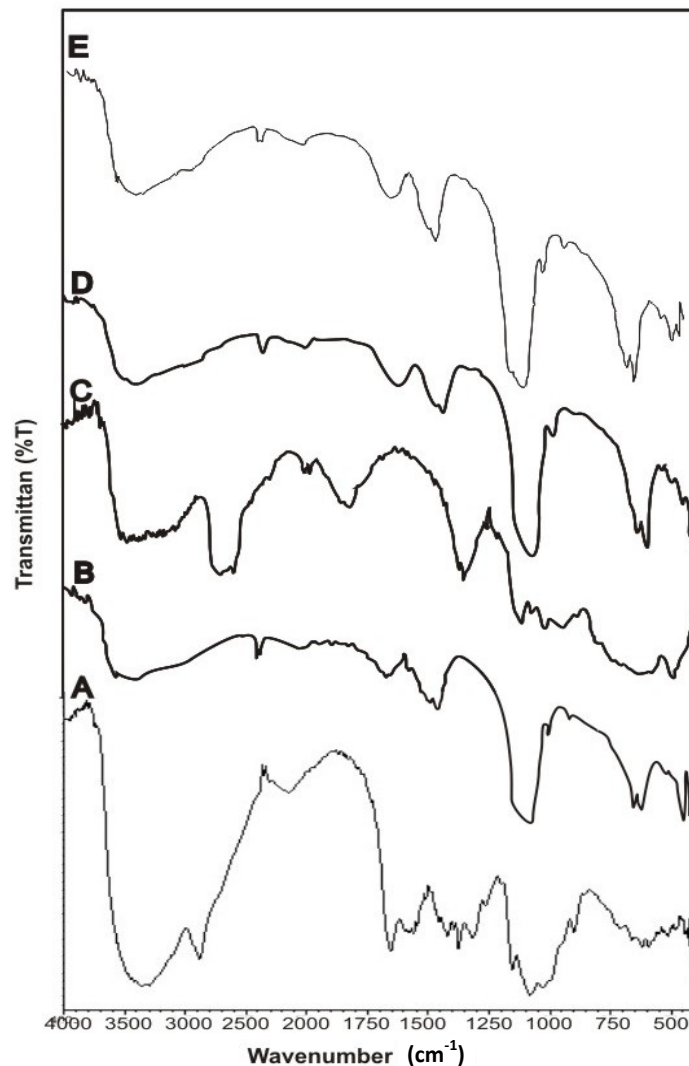
Tabel 1. Kadar air pasta IBS

Pasta IBS	Kadar air Pasta IBS (%)	
	Non Iradiasi	Iradiasi 25 kGy
Ulangan 1	73,9	75,4
Ulangan 2	72,7	75,8
Ulangan 3	71,2	74,6
Ulangan 4	71,4	76,6
Ulangan 5	74,5	79,4
Rata-rata	72,7 ± 1,5	76,3 ± 1,8

Analisis Gugus Fungsi dengan FTIR

Analisis ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik gugus fungsi yang terbentuk dari sampel pasta IBS. Spektrum FTIR dari kitosan, hidroksiapatit, HPMC, pasta IBS non iradiasi dan pasta IBS iradiasi disajikan pada Gambar 5.

Gambar 5(A) adalah spektrum FTIR dari kitosan. Pada spektrum tersebut terlihat



Gambar 5. Spektrum FTIR kitosan (A), hidroksiapatit (B), HPMC (C), pasta IBS non iradiasi (D), dan pasta IBS iradiasi (E)

pita serapan yang khas pada bilangan gelombang 3728 - 2547 cm⁻¹ yang merupakan vibrasi regang dari H yang berikatan dengan NH. Pada bilangan gelombang 2879 cm⁻¹ adalah vibrasi regang C-H. Kemudian pada bilangan gelombang 1652 cm⁻¹ dan 660 cm⁻¹ berturut turut adalah vibrasi tekuk NH₂ dan vibrasi tekuk N-H, sedangkan pada bilangan gelombang 1081 cm⁻¹ adalah vibrasi regang dari C-O. Spektrum FTIR dari hidroksiapatit terdapat pada Gambar 5(B). Terlihat pita serapan yang khas pada bilangan gelombang 569

cm⁻¹, 603 cm⁻¹, dan 1043 cm⁻¹ merupakan spektrum dari fosfat (PO₄³⁻). Pita serapan khas terlihat pula pada bilangan gelombang 874 cm⁻¹ dan 1420 cm⁻¹ yang merupakan spektrum dari karbonat (CO₃²⁻). Sedangkan bilangan gelombang 3780 - 2980 cm⁻¹ adalah spektrum vibrasi regang OH (ikatan H intermolekular). Gambar 5(C) adalah spektrum FTIR dari HPMC. Pita serapan pada bilangan gelombang 2894 cm⁻¹ dan 2838 cm⁻¹ adalah vibrasi regang dari C-CH₃ dan vibrasi regang dari C-H alifatik atau O-CH₃. Bilangan gelombang 2057 cm⁻¹ dan

1644 cm^{-1} adalah vibrasi regang C-O dan vibrasi regang C-C, sedangkan bilangan gelombang 1452 cm^{-1} dan 1373 cm^{-1} adalah vibrasi tekuk dari CH_2 dan C- CH_3 . Bilangan gelombang 948 cm^{-1} merupakan vibrasi regang dari C-OH. Spektrum FTIR pasta IBS yang tidak di iradiasi terdapat pada Gambar 5(D). Bilangan gelombang 3795 - 2895 cm^{-1} menunjukkan spektrum OH, dan 3441 cm^{-1} menunjukkan vibrasi regang N-H bebas. Pita serapan NH_2 dari kitosan terdapat pada bilangan gelombang 1599 cm^{-1} . Bilangan gelombang 1635 cm^{-1} dan 1453 cm^{-1} menunjukkan vibrasi regang C-C dan vibrasi tekuk dari CH_2 . Sementara pita serapan yang khas dari hidroksiapatit yaitu karbonat terdapat pada bilangan 1420 cm^{-1} sedangkan fosfat terdapat pada bilangan gelombang 1043 cm^{-1} , 605 cm^{-1} dan 569 cm^{-1} . Gambar 5(E) adalah spektrum FTIR pasta IBS iradiasi dosis 25 kGy. Bilangan gelombang 3810 - 2910 cm^{-1} dan 3394 cm^{-1} merupakan spektrum OH dan vibrasi regang

N-H bebas. Pita serapan NH_2 pada 1593 cm^{-1} , bilangan gelombang 1635 cm^{-1} menunjukkan vibrasi regang C-C dan bilangan gelombang 1453 cm^{-1} menunjukkan vibrasi tekuk dari CH_2 . Serapan karbonat pada 1420 cm^{-1} sedangkan serapan fosfat pada 1041 cm^{-1} , 604 cm^{-1} dan 569 cm^{-1} . Spektrum FTIR pasta IBS menunjukkan gugus fungsi dari hidroksiapatit, kitosan dan HPMC. Hasil pengukuran FTIR pasta IBS non iradiasi dengan pasta IBS iradiasi 25 kGy tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, kecuali hanya terjadi pergeseran bilangan gelombang. Pergeseran tersebut terjadi pada bilangan gelombang 3394 cm^{-1} menjadi 3441 cm^{-1} untuk vibrasi regang N-H bebas pada pasta IBS iradiasi dan non iradiasi, 1593 cm^{-1} menjadi 1599 cm^{-1} untuk pita serapan NH_2 dan terjadi pula pergeseran bilangan gelombang untuk vibrasi regang OH dan fosfat. Ringkasan hasil interpretasi FTIR terdapat pada Tabel 2.

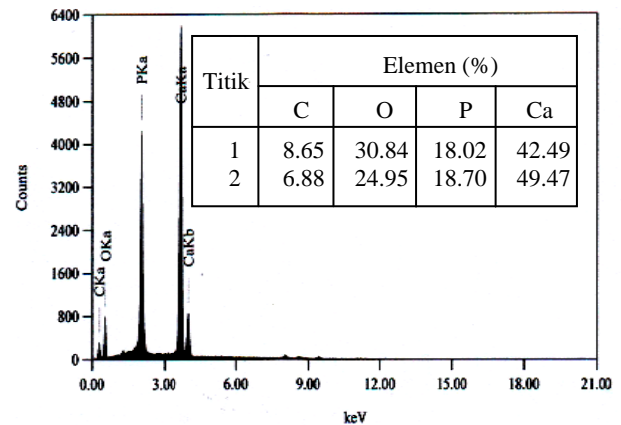
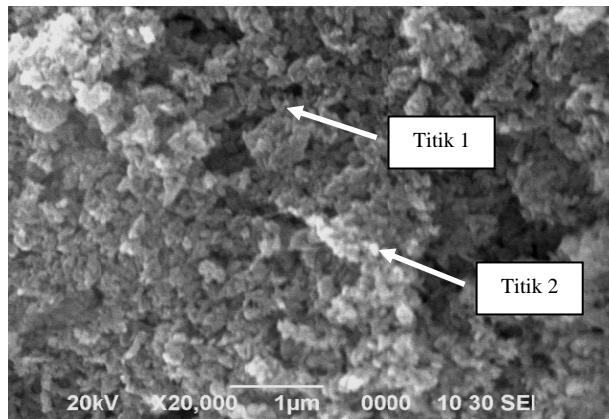
Tabel 2. Interpretasi FTIR sampel

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})				
	Kitosan	Hidroksiapatit	HPMC	Pasta IBS non iradiasi	Pasta IBS iradiasi
Vibrasi regang H-NH	3728 - 2547	-	-	-	-
Vibrasi regang OH (ik. H intermolekular)	-	3780 - 2980	-	3795 - 2895	3810 - 2910
Vibrasi regang N-H bebas	-	-	-	3441	3394
Vibrasi regang C- CH_3	-	-	2894	-	-
Vibrasi regang C-H alifatik atau O- CH_3	2879	-	2838	-	-
Vibrasi regang C-O	1081	-	2057	-	-
Vibrasi regang NH_2	1652	-	-	1599	1593
Vibrasi regang C-C	-	-	1644	1635	1635
Vibrasi tekuk CH_2	-	-	1452	1453	1453
Vibrasi tekuk C- CH_3	-	-	1373	-	-
Serapan karbonat (CO_3^{2-})	-	874, 1420	-	1420	1420
Serapan fosfat (PO_4^{3-})	-	569, 603, 1043	-	569, 605, 1043	569, 604, 1041
Vibrasi regang C-OH	-	-	948	-	-
Vibrasi tekuk N-H	660	-	-	-	-

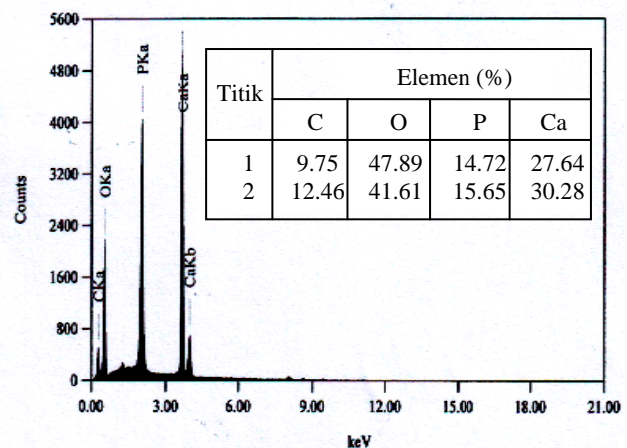
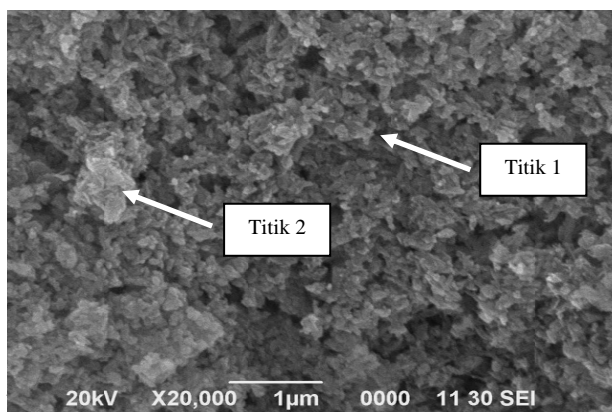
Analisis IBS dengan SEM dan EDS

Bentuk morfologi dan struktur pasta IBS dapat dilihat pada Gambar 6 dan 7.

Selain itu bila dilihat dari persentase analisa semi kuantitatif menunjukkan bahwa persen elemen pembentuk pasta IBS, yaitu C



Gambar 6. Hasil analisis SEM EDS pasta IBS non iradiasi



Gambar 7. Hasil analisis SEM EDS pasta IBS iradiasi 25 kGy

Gambar 6 menunjukkan hasil SEM sampel pasta IBS non iradiasi. Terlihat bahwa dengan perbesaran 20.000 kali ukuran pori terkecil dari sampel pasta IBS kering berukuran antara 0,05 sampai 0,1 µm. Ditinjau dari morfologinya, dapat dianalisis bahwa hasil pencampuran pasta belum cukup homogen walaupun secara visual sudah terlihat homogen. Hal tersebut dapat terlihat dari gumpalan putih pada gambar yang merupakan serbuk hidroksiapatit tidak tersebar secara merata.

(karbon), O (oksigen), P (fosfor), dan Ca (kalsium) dari pengambilan dua titik, yaitu titik 1 dan titik 2 menunjukkan adanya perbedaan. Gambar 7 menunjukkan hasil SEM dari pasta IBS iradiasi EBM dosis 25 kGy. Seperti halnya pada sampel pasta IBS non radiasi, terlihat bahwa morfologi sampel berbentuk gumpalan dan strukturnya berukuran mikro, dengan ukuran terkecil antara 0,05 sampai 0,1 µm. Iradiasi berkas elektron tidak mengubah struktur dan morfologi pasta IBS.

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pasta *injectable bone substitute* (IBS) berbasis senyawa hidroksiapatit dapat disintesis dengan menggunakan teknik iradiasi berkas elektron.

Berdasarkan analisis gugus fungsi dengan FTIR dan analisis morfologi struktur mikro dengan SEM-EDS disimpulkan bahwa pasta IBS iradiasi 25 kGy tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan pasta IBS non iradiasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. NAYAK, K.A., Hydroxyapatite synthesis methodologies: an overview, *Int.J. Chem. Tech.Res.*, **2** (2), 903-907 (2010).
2. AOKI H. "Synthesis and Medical Application of Hydroxyapatite Nanocomposite", Takayama Press System, Co. Inc., Tokyo, (1991).
3. CENGIZ, B., YAVUZ, G., and NURAY, Y., Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanocomposite, *Colloids and Surface A: Physicochem.Eng.Aspects*, **322**, 29-33 (2008).
4. KASHIWAZAKI H., YUSUKE K., ATSUSHI M., KEISUKE Y., and TADASHI I., Fabrication of porous chitosan/hydroxyapatite nanocomposites: their mechanical and biological properties, *Bio. Med. Mat. and Eng.*, **19**, 133-140, (2009).
5. FENG, KO H., CHARLES, S., and PRASHANT, N.K., Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffold for tissue engineering, *Phil. Trans. R. Soc. A.*, **368**, 1981-1987, (2010).
6. SUH, J.K., and MATTHEW, H.W., Application of chitosan based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering : a review, *Biomaterials.*, **21**, 2589-2598 (2000).
7. SEO, YJ., LEE, JY., PARK, YJ., LEE, YM., YONG, K., RHYU, IC., and HAN, SB., Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds of bone formation, *Biotechnol Lett.*, **26**, 1037-1041 (2004).
8. DI, MA., SIHIGER, M., and RISBUD, M.V., Chitosan : a versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering, *Biomaterials.*, **26**, 5983-5990 (2005).
9. VENKATESAN, J., and SE-KWON KIM., Chitosan composite for bone tissue engineering-An Overview, *Marine Drugs.*, **8**, 2252-2266 (2010).
10. LAPKOWSKI., WEISS, P., LEGEROS, R.Z. and BOULER, J.M., Fourier-transform infrared spectroscopy study of an organic-mineral composite for bone and dental substitute materials, *J. Mat. Sci.*, **8**, 621-629.(1997).
11. LEROUXEL, E., PIERRE, W., BERNARD, G., ANNE, M., PAUL, P., JEROME, G., and PIERRE, C., Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: An experimental study in rats, *Biomaterials.*, **27**, 4566-4572 (2006).
12. LIU, H., HONG, LI, WENJUN, C., YUAN, Y., MINYING, Z., and CHANGREN, Z., Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials, *Acta Biomat.*, **2**, 557-565 (2006).

-
13. DE MOURA, M.R., AVENA, R.J., MCHUGH, T.H., KROCHTA, J.M., and MATTOSO, L.H.C., Properties of novel hydroxypropyl methylcellulose films containing chitosan nanoparticles, *J. Food Sci.*, **73** (2008).
 14. JYOTI, M.A., VANVIET T., YOUNG, KM., and BYONG, TK., In vitro bioactivity and biocompatibility of calcium phosphate cements using hydroxyl-propyl-methyl-cellulose (HPMC), *J.Appl.Surface Sci.*, **257**, 1533-1539 (2010).
 15. WARASTUTI, Y., dan ABBAS, B., Pembakuan Proses Pembuatan dan Karakterisasi Senyawa Hidroksiapatit sebagai Senyawa Pengganti Tulang, Prosiding Seminar Nasional Keselamatan, Kesehatan dan Lingkungan IV, Depok 27 Agustus 2008, 305-315 (2008).
 16. ISO 13409 : Sterilization of health care products - radiation sterilization substantiation of 25 kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches.
 17. ZHAO, L and MITOMO H., Radiation effects on dihydroxypropyl-chitosan, *J.Polym.Degrad.Stab.*, **93**, 1607-1610 (2008).
 18. ZHAO, L and MITOMO H., Hydrogels of dihydroxypropyl chitosan crosslinked with irradiation at paste-like condition, *J.Carb.Pol.*, **76**, 314-319 (2009).
-

