

**UJI BANDING KEPADATAN OSTEOBLAS PADA SUBSTITUSI TULANG MENGGUNAKAN
GRAFT TULANG TERDEMINERALISASI (DBM) DENGAN KARBONAT APATIT HASIL
SINTESIS DARI KALSIMUM HIDROKSIDA DAN ASAM FOSFAT
(UJI *IN-VIVO* PADA TULANG KONDILUS FEMUR TIKUS *WISTAR*)**

Nur R.A.S. Aji, Sudirman, F. Ridho, Geovanni H.M. Ariananda, Osa A. Hafiyah
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Autograft masih menjadi baku emas dalam perawatan bedah tulang meskipun pasien harus mengalami rasa sakit ataupun kemungkinan terjadinya komplikasi. Di sisi lain *allograft* dan *xenograft* secara teoritis dapat menyebabkan penularan penyakit. Sementara itu, di Indonesia perawatan bedah tulang masih menggunakan graft tulang dari mayat yang tergolong sebagai *allograft* ataupun menggunakan hidroksiapatit sintesis yang harganya sangat mahal. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kepadatan osteoblas pada substitusi tulang menggunakan graft tulang terdemineralisasi (DBM, *demineralized bone matrix*) dengan karbonat apatit hasil sintesis dari kalsium hidroksida dan asam fosfat. Penelitian ini diawali dengan sintesis karbonat apatit melalui reaksi secara sederhana kalsium hidroksida dan asam fosfat di laboratorium kemudian menguji hasil reaksi untuk melihat berhasil tidaknya sintesis karbonat apatit. Pengujian dilakukan dengan membandingkan pola difraksi sinar-X antara karbonat apatit hasil sintesis dengan pola karbonat apatit standar. Setelah diketahui bahwa sintesis berjalan sempurna maka karbonat apatit hasil sintesis dipergunakan untuk implantasi pada kondilus femur tikus *Wistar* dibandingkan dengan graft tulang terdemineralisasi sebagai kontrol positif. Implantasi dilakukan selama 3, 7, 14, 28, dan 56 hari. Tikus kemudian dikorbankan untuk diperiksa kepadatan osteoblasnya secara histologis. Hasilnya dianalisis dengan menggunakan analisis variansi 2 jalur untuk melihat ada tidaknya pengaruh perbedaan jenis graft tulang terhadap kepadatan osteoblas. Hasilnya menunjukkan bahwa puncak aktivitas osteoblas terjadi pada hari ke-14 pada kedua kelompok perlakuan kemudian menurun hingga hari ke-56. Setelah dilakukan analisis statistik melalui uji Anava, diperoleh hasil bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara pengaruh CHA dengan DBM terhadap kepadatan osteoblas. Diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan sumbangan data bagi perawatan bedah tulang yang lebih baik.

Kata kunci: karbonat apatit, *demineralized bone matrix*, osteoblas, substitusi tulang, graft tulang

PENDAHULUAN

Saat ini graft tulang telah menjadi metode terapi yang efektif untuk mengatasi defek atau kerusakan tulang karena berbagai penyebab (Van Gaalen dkk., 2008). Graft tulang merupakan metode terapi dengan mengganti tulang yang rusak dengan tulang yang lain untuk merangsang pertumbuhan tulang baru. Baku emas dalam metode graft tulang ini adalah *autograft*, yaitu graft tulang yang didapat dari tulang individu yang sama. Selain *autograft* dikenal juga *allograft* (graft yang berasal dari spesies yang sama) dan *xenograft* (graft yang diambil dari spesies yang berbeda). Pada tahun

1881, Macewen adalah orang pertama yang mendeskripsikan prosedur rekonstruksi tulang humerus pada anak dengan menggunakan *allograft*. Namun demikian, *allograft* dan *xenograft* memiliki kelemahan, antara lain dapat memicu respon imunologis resipien serta berisiko menimbulkan transfer patogen.²

Demineralized Bone Matrix (DBM) merupakan salah satu alternatif graft tulang yang telah digunakan secara luas di pasaran. *Demineralized Bone Matrix* merupakan graft tulang yang sangat bagus untuk merangsang pembentukan tulang.³ *Demineralized Bone Matrix* dibuat dengan mengekstraksi tulang

kortikal manusia dengan menggunakan asam. Hasil ekstraksi tersebut masih menyisakan bahan-bahan yang berguna bagi pertumbuhan tulang, seperti protein non-kolagen, faktor pertumbuhan tulang osteoinduktif, *bone morphogenic proteins*, dan kolagen tipe I.4 Penggunaan DBM sebagai graft tulang sudah terbukti berhasil memperbaiki jaringan tulang yang mengalami kerusakan.5-8

Meskipun DBM merupakan pilihan populer para klinisi di Indonesia, tetapi komersialisasi DBM sebagai *graft* tulang menyebabkan DBM tidak dapat diakses secara luas karena harganya yang relatif sangat mahal. Dengan demikian, diperlukan alternatif graft tulang yang memenuhi persyaratan klinis dan dapat diproduksi dengan cara yang murah dan mudah.

Berbagai penelitian telah dikembangkan untuk menyediakan alternatif graft tulang sintesis. Graft tulang sintesis yang telah dipakai secara luas dalam bidang kedokteran dan kedokteran gigi yaitu hidroksiapatit sintesis ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$; HA). Hidroksiapatit sintesis dapat diproduksi dengan berbagai cara, antara lain: preparasi dengan metode basah (kimiaawi termasuk metode presipitasi, teknik hidrotermal, dan hidrolisis) dan metode kering.9 Furuta dkk. (1998) mensintesis hidroksiapatit dari reaksi antara gipsium *mold waste* 5x10x20 mm dengan 40 mililiter 0,5 M larutan diamonium hidrogen fosfat dengan cara pemanasan hidrotermal (*conventional hydrothermal*) pada suhu 50-1000C dan dipelajari sifat-sifatnya.10 Sementara itu Nasution (2006) mereaksikan serbuk kalsit [kalsium karbonat (CaCO_3)] Gunung Kidul dengan larutan 0,5 M trisodium fosfat [$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$] untuk membuat hidroksiapatit.11 Hidroksiapatit sintesis menunjukkan osteokonduktivitas yang bagus, akan tetapi sulit diresorpsi oleh tubuh karena memiliki kristalinitas yang tinggi dan komposisi kimiaawi yang berbeda dengan mineral tulang.12 Oleh karena itu, para peneliti kemudian memusatkan perhatian terhadap pengembangan CHA (*carbonated hydroxyapatite*) yang memiliki kristalinitas rendah dan komposisi yang sama dengan tulang manusia, terutama dalam bentuk serbuk.13, 14

TUJUAN

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan sintesis karbonat apatit dari kalsium hidroksida dan asam fosfat, serta membandingkan kepadatan osteoblas pada kondilus femur tikus *Wistar* yang diimplantasi menggunakan karbonat apatit hasil sintesis dengan DBM.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris yang menggunakan subjek penelitian berupa tikus *Wistar* usia 2 bulan dengan berat badan 180-240 gram. Bahan-bahan utama yang diperlukan dalam penelitian ini adalah kalsium hidroksida ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), asam fosfat (H_3PO_4), dan graft tulang terdeminalisasi (DBM). Adapun bahan-bahan tambahan yang dipergunakan adalah ketamin 10% sebagai cairan anestesi dengan dosis 0,2 ml dalam 1 mL aquadestilata yang diberikan melalui injeksi intramuskular, akuadestilata steril, benang jahit *catgut*, formalin 10%, aluminium klorida, HCl 37% dan asam formiat pekat sebagai bahan dekalsifikasi jaringan, alkohol 70%, 80%, 95%, alkohol absolut untuk dehidrasi jaringan, *xylol* untuk penjernihan jaringan, parafin cair, Mayer-Hematoksilin dan Eosin sebagai pewarna jaringan, balsem *kanada* untuk merekatkan kaca penutup dan kaca objek.

Penelitian ini menggunakan beberapa alat dan sarana, seperti kandang tikus, pakan tikus, *decapitator*, *mesh filter*, timbangan digital, pH-meter, seperangkat alat bedah, mikromotor dan *contra angle*, *round bur low speed*, *separating disk*, alat sterilisasi, seperangkat peralatan pembuatan preparat histologis dengan pengecatan HE, mikroskop cahaya, dan kamera.

Penelitian ini menggunakan tikus *Wistar* sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi dua kelompok masing-masing 15 ekor, yakni kelompok perlakuan menggunakan CHA dan kelompok kontrol positif menggunakan DBM.

Selanjutnya masing-masing kelompok dibagi menjadi lima sub kelompok yang masing-masing berjumlah tiga ekor berdasarkan jumlah harinya, yakni 3, 7, 14, 28, dan 56 hari. Semua tikus diberi pakan yang sama dan dipelihara dalam kandang yang berbeda.

Penelitian diawali dengan melakukan pembuatan karbonat apatit dengan mereaksikan secara sederhana kalsium hidroksida dan asam fosfat di laboratorium kemudian menguji hasil reaksi untuk melihat berhasil-tidaknya sintesis karbonat apatit. Pengujian dilakukan dengan membandingkan pola difraksi sinar-X antara karbonat apatit hasil sintesis dengan pola karbonat apatit standar. Setelah diketahui bahwa sintesis berjalan sempurna, karbonat apatit tersebut diimplantasikan pada area luka tulang kondilus femur tikus *Wistar* sesuai dengan lama perlakuan harinya.

Area luka dibuat dengan mikromotor sebelum dilakukan implantasi dengan ukuran 3x3x2 mm³. Metode yang sama juga dilakukan pada tikus kelompok kontrol positif yang menggunakan DBM. Setelah masa perlakuan selesai, tikus dikorbankan dan didekapitasi untuk mengambil tulang kondilus femurnya dan dibuat preparat histologis dengan pengecatan Hematoksin-Eosin. Preparat diamati di bawah mikroskop dan diambil tiga lapang pandang secara acak, lalu dihitung kepadatan osteoblasnya, kemudian hasil perhitungan tersebut dibuat reratanya. Setelah dilakukan uji normalitas dan homogenitas atas data yang diperoleh, data yang didapat dianalisis dengan menggunakan analisis variansi dua jalur (Anava) untuk melihat ada tidaknya pengaruh perbedaan jenis *graft* tulang terhadap

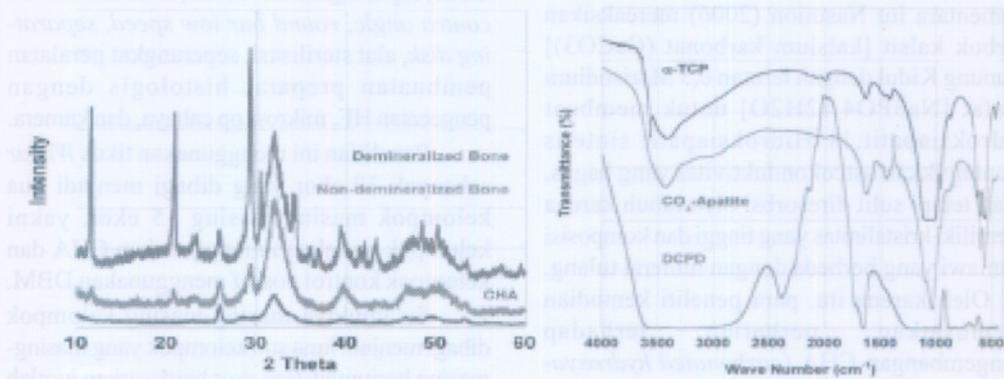
kepadatan osteoblas. Apabila diketahui adanya perbedaan, maka analisis statistik dilanjutkan dengan analisis LSD (*Least Significant Difference*) untuk melihat perbedaan antarkelompok.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi CHA dilakukan untuk mengetahui keberhasilan sintesis dengan menguji keberadaan kandungan karbonat dan fosfat dalam CHA hasil sintesis. Karakterisasi CHA dilakukan dengan analisis FTIR (*Fourier Transform Infrared*) dan pengujian XRD (*X-Ray Diffraction*) sebagaimana tertera pada Gambar 1.

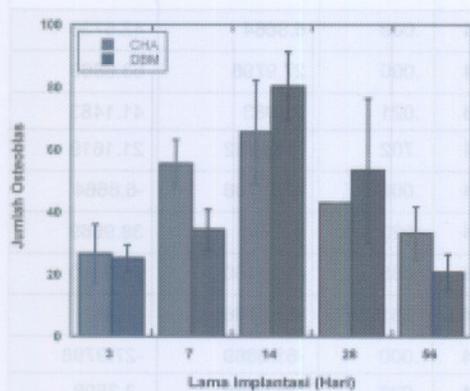
Berdasarkan pola difraksi sinar X, terdapat kristal apatit pada 25,50 dan 32,50 yang menunjukkan keberhasilan sintesis CHA. Apabila dibandingkan dengan pola difraksi DBM dan NDBM, terdapat kemiripan antara CHA dan DBM/NDBM yaitu dalam hal keberadaan kristal apatit pada 25,50 dan 32,50. Pada pola spektra uji FTIR, tampak bahwa pada bilangan gelombang 880-870 cm⁻¹ dan 1550-1400 cm⁻¹ terdapat banyak serapan gelombang yang spesifik untuk ikatan kimia senyawa CO₃²⁻ dan pada bilangan gelombang 980-1100 cm⁻¹ dan 560-600 cm⁻¹ terdapat banyak serapan gelombang yang spesifik untuk ikatan kimia PO₄³⁻. Uji FTIR menunjukkan senyawa PO₄³⁻ dan CO₃²⁻ pada CHA telah terbentuk.

Keberhasilan substitusi tulang dapat



Gambar 1. Pola difraksi sinar-X CHA hasil sintesis dari kalsium hidroksida dan asam fosfat dibandingkan dengan DBM dan tulang asli (NDBM) serta spektra inframerah CHA dibandingkan dengan α -TCP, DCPD (*dicalcium phosphate dihydrate*).

dilihat dari adanya aktivitas pembentukan jaringan tulang baru, dalam hal ini yang menjadi parameter adalah jumlah osteoblas. Substitusi tulang menggunakan CHA menunjukkan osteoblas mulai terbentuk pada hari ke-3. Peningkatan jumlah osteoblas pada kelompok CHA dapat diamati pada hari ke-3 sampai dengan hari ke-14. Adapun penurunan terjadi setelah hari ke-14, ditandai dengan jumlah osteoblas lebih sedikit pada hari ke-28 daripada jumlah osteoblas pada hari ke-14. Jumlah osteoblas terbanyak pada hari ke-14, baik pada kelompok CHA maupun pada kelompok DBM. Peningkatan jumlah osteoblas pada kelompok DBM dapat diamati pada hari ke-7 sampai dengan hari ke-14. Hasil dapat dilihat pada Gambar 2



Gambar 2. Grafik rerata jumlah osteoblas

Jumlah spesimen pada CHA yang dipakai adalah 14, sedangkan jumlah spesimen pada kelompok DBM yang dipakai adalah 15. Perbedaan jumlah ini terjadi karena salah satu spesimen dalam kelompok CHA mengalami kerusakan, yaitu pada kelompok hari ketiga sehingga tidak dimasukkan dalam penghitungan. Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov (a) pada CHA menunjukkan angka signifikansi 0,2 sementara DBM menunjukkan 0,095. Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk pada CHA menunjukkan angka signifikansi 0,119 sementara DBM menunjukkan angka 0,072. Berdasarkan perhitungan SPSS, data dianggap normal jika angka signifikansinya berada dalam kisaran lebih dari 0,05 dan $\alpha = 95\%$. Berdasarkan hasil tersebut, maka data perhitungan osteoblas pada penelitian ini normal sehingga dapat

diterapkan uji Anava sesuai yang direncanakan.

Tabel 1. Hasil Anava Dua Jalur

Kelompok lama perlakuan	Rerata osteoblas Kelompok CHA	Rerata osteoblas Kelompok DBM	P
3	26,66	25,22	0,285
7	55,38	34,44	0,62
14	65,55	80,33	0,42
28	43,00	53,44	0,69
56	33,33	20,88	0,24*
Rerata	46,08	42,86	0,989
Deviasi Standar	21,75	23,60	

Melalui analisis variansi dua jalur (Tabel 1), dapat dijelaskan pengaruh variabel lama perlakuan dan jenis perlakuan terhadap kepadatan osteoblas. Variabel lama perlakuan menunjukkan perbedaan hasil yang signifikan dengan angka signifikansi 0,00. Variabel jenis perlakuan tidak menunjukkan perbedaan pengaruh yang signifikan (ditunjukkan dengan angka signifikansi 0,732).

Sementara itu, kombinasi dari variabel hari dan perlakuan juga menunjukkan hasil yang tidak signifikan dengan angka sebesar 0,227. Berdasarkan perhitungan tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan antara CHA dan DBM. Angka signifikansi dianggap signifikan jika besarnya kurang dari 0,05.

Uji LSD (*Least Significant Difference*) dilakukan untuk mencari perbedaan yang signifikan antarkelompok (Tabel 2). Hasil dianggap signifikan jika besarnya kurang (lebih kecil) dari 0,05. Perbedaan yang sangat signifikan terjadi antara kelompok hari ke-3 dengan kelompok hari ke-14 (ditunjukkan dengan angka signifikansi 0,000) dan kelompok hari ke-56 dengan kelompok hari ke-14 (ditunjukkan dengan angka signifikansi 0,000).

Perbedaan yang tidak signifikan nampak pada perbandingan antara kelompok hari ke-56 dan hari ke-3 (ditunjukkan dengan angka signifikansi 0,885) dan perbandingan antara kelompok hari ke-28 dan ke-7 (angka signifikansi 0,702).

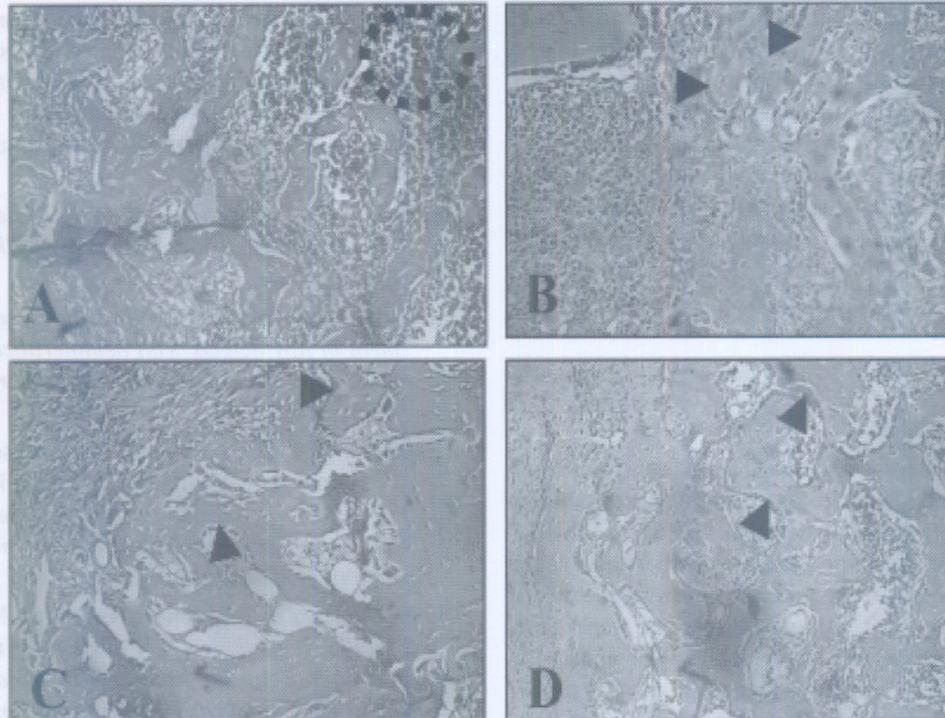
Tabel 2. Hasil Uji LSD (Multiple Comparisons)

(I) HARI	(J) HARI	Beda Rerata (I-J)	Std. Error	Sig.	Tingkat kepercayaan 95%	
					Batas Bawah	Batas Atas
HARI KE 3	HARI KE 7	-19.1150(*)	8.94638	.046	-37.8400	-.3900
	HARI KE 14	-47.1433(*)	8.94638	.000	-65.8683	-28.4183
	HARI KE 28	-22.4233(*)	8.94638	.021	-41.1483	-3.6983
	HARI KE 56	-1.3100	8.94638	.885	-20.0350	17.4150
HARI KE 7	HARI KE 3	19.1150(*)	8.94638	.046	.3900	37.8400
	HARI KE 14	-28.0283(*)	8.53004	.004	-45.8819	-10.1748
	HARI KE 28	-3.3083	8.53004	.702	-21.1619	14.5452
	HARI KE 56	17.8050	8.53004	.051	-.0486	35.6586
HARI KE 14	HARI KE 3	47.1433(*)	8.94638	.000	28.4183	65.8683
	HARI KE 7	28.0283(*)	8.53004	.004	10.1748	45.8819
	HARI KE 28	24.7200(*)	8.53004	.009	6.8664	42.5736
	HARI KE 56	45.8333(*)	8.53004	.000	27.9798	63.6869
HARI KE 28	HARI KE 3	22.4233(*)	8.94638	.021	3.6983	41.1483
	HARI KE 7	3.3083	8.53004	.702	-14.5452	21.1619
	HARI KE 14	-24.7200(*)	8.53004	.009	-42.5736	-6.8664
	HARI KE 56	21.1133(*)	8.53004	.023	3.2598	38.9669
HARI KE 56	HARI KE 3	1.3100	8.94638	.885	-17.4150	20.0350
	HARI KE 7	-17.8050	8.53004	.051	-35.6586	.0486
	HARI KE 14	-45.8333(*)	8.53004	.000	-63.6869	-27.9798
	HARI KE 28	-21.1133(*)	8.53004	.023	-38.9669	-3.2598

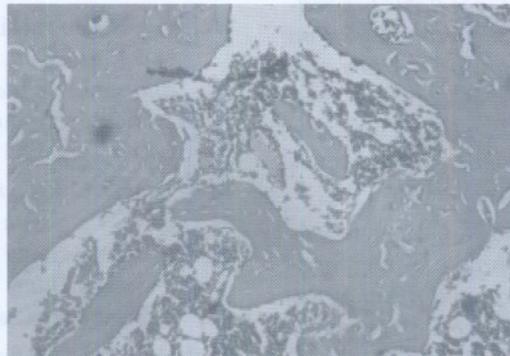
Hasil pengamatan histologis pada area defek menunjukkan bahwa pada hari ke-3 pasca substitusi tulang terdapat sebaran sel leukosit polimorfonuklear baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan. Gambar 3 menunjukkan jumlah osteoblas dalam jumlah yang sangat sedikit, baik pada kelompok CHA maupun kelompok DBM. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa CHA dan DBM memiliki kemampuan yang sama dalam memacu perkembangan jaringan tulang baru. Berdasarkan hasil penelitian ini, tampak bahwa CHA yang diproduksi secara sederhana telah menunjukkan kemampuan yang baik sebagai graft atau pengganti tulang yang bersifat *bioabsorbable*.¹⁵ Komposisi kimiawi CHA yang menyerupai tulang,¹⁶ memiliki kristalinitas yg rendah dan resorbabilitas osteoklas serta osteokonduktivitas yang

baik¹² menyebabkan superioritas CHA dalam penelitian ini. Selain kristalinitas yang rendah, CHA juga mudah larut secara *in vivo* sehingga meningkatkan konsentrasi lokal ion kalsium dan fosfat yang penting untuk pembentukan tulang baru¹⁷ yang juga telah dibuktikan dari hasil penelitian ini. Lebih lanjut lagi, CHA dapat mempengaruhi inisiasi perlekatan sel inisial dan deposisi matriks kolagen.¹⁷

Idealnya, graft tulang harus menyediakan empat elemen, yaitu matriks osteokonduktif untuk pertumbuhan tulang, faktor-faktor osteoinduktif, sel-sel osteogenik, dan integritas struktural.¹⁸ Dalam hal ini, DBM mengandung faktor-faktor pertumbuhan tulang, yakni BMP, PDGF, GDF, dan TGF- α 1 yang mempengaruhi proliferasi sel-sel pertumbuhan tulang. Perbandingan komposisi antara DBM dan CHA adalah adanya kandungan faktor osteo-



Gambar 3. Pada perbesaran 200 X (A) Preparat CHA hari-3 menunjukkan banyak infiltrat sel radang dan osteoblas masih sedikit; (B) Pada preparat CHA hari-7 terlihat osteoblas lebih banyak dari hari-3. (C) Pada preparat CHA hari-14 terlihat banyak osteoblas mengelilingi tulang baru. Puncak aktivitas osteoblas terjadi pada hari ke-14. (D) Gambaran histologis CHA hari-28 terlihat osteoblas lebih sedikit dari hari-14. Aktivitas osteoblas berkurang. Area tulang baru yang terbentuk bertambah.



Gambar 4. Pada preparat CHA hari-56 terlihat osteoblas lebih sedikit dari hari-28. Berkurangnya jumlah osteoblas karena aktivitas osteoblas menghasilkan matriks tulang sehingga osteoblas terjebak dalam matriks menjadi osteosit. Tampak area tulang baru yang terbentuk semakin luas. (Perbesaran 200X).

konduksi dan osteoinduksi pada DBM, sementara CHA hanya mengandung faktor osteokonduksi saja. Baik CHA maupun DBM tidak mengandung sel-sel osteoprogenitor dan memiliki imunogenisitas yang negatif¹⁸. Kemampuan yang sama antara DBM dan CHA disebabkan karena kedua graf ini memiliki faktor osteokonduktif yang bagus. Keunggulan CHA yang mudah larut secara in vivo¹⁷ mengimbangi fungsi faktor osteokonduksi dari DBM.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa CHA maupun DBM memiliki kemampuan yang sama (tidak berbeda secara signifikan) terhadap kemampuan pembentukan tulang baru, dengan parameter kepadatan osteoblas pada tulang tikus Wistar. Namun demikian perkembangan kepadatan osteoblas pasca implantasi bervariasi dari hari ke hari, dengan adanya variasi graft tulang.

DAFTAR PUSTAKA

- Ana ID, Mudjosemedi M, Sofro ASM, Leeuwenourgh SCG, Ishikawa K, Jansen JA. *Development of In jectable Carbonate Apatite Bone Substitute Based on Phasetransformation of Gypsum and Calcium Hydroxide: Preliminary Studies on Factors Influencing Carbonate Apatite Synthesis*. *Archieves Bioceramics Research*. Volume 8: 1-2.
- Barralet J, Best S, Bonfield W. *Carbonate Substitution in Precipitated Hydroxyapatite: An Investigation into Effect of Reaction Temperature and Bicarbonate Ion Concentration*. *J. Biomed Mater Res*. 1998; 41(1): 79.
- Furuta S, Katsuri H, Komarneni S. *Porous Hydroxyapatite Monoliths From Gypsum Waste*. *J Mater Chem*. 1998; 8: 2803-6.
- Gepstein R, Weiss RE, Saba F, Hallel T. *Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder*. *JBJS*. 1987; 69A:7.
- Ishikawa K, Matsuya S. *Bioceramics*, dalam Milne, I, Ritchie RO dan Karihaloo B, (editor). *Comprehensive Structural Integrity: Fracture of Materials from Nano to Macro Bioengineering*. Amsterdam: Elsevier. 2003.
- Itiravivong P. *Demineralized Bone Particles. Metals, Materials, and Minerals Bulletin*
- Kaban LB, Mulliken JB, and Glowacki J. *Treatment of jaw defects with demineralized bone implants*. *J Oral Maxillofac Surg*. 1983; 40: 623-626
- Kirkpatrick CJ, Fuchs S, Peters K, Brochhausen C, Hermanns MI, Unger RE (2006), *Visions for regenerative medicine: interface between scientific fact and science fiction*, *Artif Organs* 30: 822
- Lin X, Matsuya S, Takeuchi A, Nakagawa M, Terada Y, Ishikawa K. *Fabrication Of Carbonate Apatite Monolith By Treatment Of Calcite in Phospat Solutions*. 2006. 37-39.
- Lee Y, Min Hahm Y, Matsuya S, Nakagawa M, Ishikawa K. *Development of macropores in calcium carbonate body using novel carbonation method of calcium hydroxyde/sodium chloride composite*. *J Mater Sci*. 2007; 42: 5728-5735.
- Mulliken JB, Glowachi J Kaban LB, Folkman J, and Murray JE. *Use of demineralized allrogenic implants for the correction of maxillocraniofacial deformities*. *Annals of Surgery*. 1981; 194:3. 366-372.
- Nasution DA. *Fabrikasi serta studi sifat mekanis dan fisis biokeramik hidroksiapatit (HAP) dari kalsit Gunung Kidul*. Tesis S2. Yogyakarta: Sekolah Pasca Sarjana UGM; 2006.
- Parikh SN. *Bone graft substitutes: past, present, future*. *Journal of Postgraduate Medicine*. 2002; 48: 6.
- Sonis ST, Kaban LB, Glowachij. *Clinial trial of demineralized bone powder in the treatment of periodontal defects*. *J Oral Med*. 1983; 383: 3.
- Sopyan I, Singh R, Hamdi Mohammed. *Synthesis of nano sized hydroxyapatite*

powder using sol-gel technique and its conversion to dense and porous bodies. Indian Journal Of Chemistry. 2008; 47A: 1626-1627

Suchanek WL, Shuk P, Byarappa K, Riman RE, Tenhuisen K, Janas VF. *Mechanochemical Hydrothermal Synthesis of Carbonated Apatite Powder at Room Temperature.* Biomaterials. 2002; 23 : 699.

van Gaalen, S, Kruyt, M, Meijer, G, Mistry, ., Mikos, A, van den Beucken, J, Jansen, J, de Groot, K, Cancedda, R, Olivio, C, Yaszemki, M, dan Dhert, W, 2008, *Chapter 19: Tissue Engineering of Bone* dalam Blitterswijk, C., (ed.): *Tissue Engineering*, Elsevier, San Diego, 560-567.

Zaman CT, Takeuchi A, Matsuya S, Nakagawa, Ishikawa K. *Fabrication of Carbonate Apatite Monolith from Calcite-Gypsum Composite as Bone-Substitues.* Archives of Biocheramics Researches. 2006; 6 : 50.