

SINTESIS DAN KARAKTERISASI KOMPOSIT HIDROKSIAPATIT (HA) SEBAGAI GRAFT TULANG SINTETIK

Darmawan Darwis, Farah Nurlidar, dan Yessy Warastuti

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi- BATAN

Jl. Lebak Bulus Raya No. 49, Pasar Jumat, Jakarta Selatan

Telp.021-7690709; Fax: 021-7691607

ABSTRAK

SINTESIS DAN KARAKTERISASI KOMPOSIT HIDROKSIAPATIT (HA) SEBAGAI GRAFT TULANG SINTETIK. Telah dilakukan pembuatan dan karakterisasi komposit hidroksiapatit/PVA/PVP/khitosan dengan teknik radiasi. Hidroksiapatit (HA) disintesis dari kalsium hidroksida dan asam fosfat pada suhu dan pH terkontrol menggunakan metode basah (*wet method*). Sedangkan komposit HA/PVA/PVP/khitosan dibuat dengan radiasi sinar gamma pada berbagai dosis. Untuk mengevaluasi HA yang terbentuk selama proses sintesis maka dilakukanlah karakterisasi beberapa parameter seperti rasio Ca/P, pengukuran gugus fungsi menggunakan FTIR dan analisis ukuran kristal dengan SEM. Analisis terhadap komposit hasil iradiasi dilakukan terhadap fraksi gel. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa rata-rata rasio Ca/P dari 3 batch produksi adalah 1,69. Hasil pengukuran gugus fungsi dengan FTIR menunjukkan serapan pada bilangan gelombang (*wave number*) 1035, 603 dan 565 cm^{-1} yang merupakan gugus fosfat (PO_4^{3-}); bilangan gelombang 1421 cm^{-1} yang merupakan gugus karbonat (CO_3^{2-}); dan bilangan gelombang 3450 cm^{-1} yang merupakan gugus hidroksil (OH). Hasil ini menunjukkan bahwa sintesis dengan metode basah menghasilkan senyawa hidroksiapatit dengan tingkat kemurnian yang sangat baik. Komposit HA/PVA/PVP/khitosan yang diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 5 hingga 30 kGy menghasilkan fraksi gel antara 80 - 90 %. Komposit dengan kandungan fraksi gel yang tinggi ini bersifat kaku dan mempunyai kendala dalam pemakaian klinis. Penambahan etanol 5% pada komposit dan iradiasi pada dosis 25 kGy dapat menurunkan fraksi gel dari 90% menjadi 30% serta gel yang dihasilkan bersifat elastis dan mudah dibentuk sesuai keinginan. Sedangkan penambahan gliserin 6% hanya menurunkan fraksi gel dari 90% menjadi 80%. Etanol 5% merupakan *scavenger* yang lebih efektif dibandingkan dengan gliserin 6%

Kata kunci: hidroksiapatit, tulang sintetik, iradiasi gamma, *scavenger*

ABSTRACT

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HYDROXYAPATITE (HA) COMPOSITE AS SYNTHETIC BONE GRAFT. The preparation and characterization of hydroxyapatite/PVA/PVP/chitosan composite has been done. HA was synthesized by wet method from calcium hydroxide and phosphoric acid at controlled pH and temperature. On the other hand, hydroxyapatite/PVA/PVP/chitosan composite was prepared by gamma radiation at various doses. To evaluate HA produced from the process, several properties such as Ca/P ratio, measurement of functional group either by FTIR or by SEM for analysis of crystalline size are measured. Gel fraction measurement was done to analyze the composite formed by radiation. The results show that the average Ca/P ratio from three batch productions is 1.69. Measurement of functional group using FTIR shows absorption namely at wave number values of 1035, 603 and 565 cm^{-1} which indicate phosphate group (PO_4^{3-}); at 1421 cm^{-1} which indicates carbonate group (CO_3^{2-}); and at 3450 cm^{-1} which indicates hydroxyl group (OH). These results imply that the wet method produce HA with excellent purity level. Hydroxyapatite/PVA/PVP/chitosan composite irradiated by gamma ray at 5 to 30 kGy doses produce gel fraction in the range of 80 to 90%. This composite with highly gel content is too rigid that has limited in clinical applications. Addition of ethanol 5% to the composite and irradiation at 25 kGy can reduce gel fraction from 90% to 30% which more elastic property and easy to be formed as desired. In the mean time, addition of glycerin 6% could only reduced gel fraction from 90% to 80%. Ethanol 5% as scavenger is more effective than glycerin 6%.

PENDAHULUAN

Penggunaan graft tulang (*allograft dan xenografi*) di Indonesia terus meningkat dari tahun ke tahun. Hal ini disebabkan oleh bertambah luasnya bidang pemakaian graft tulang tersebut tidak

hanya pada bidang orthopedik tetapi juga telah mulai banyak dipakai pada ophthalmologik dan periodontal (gigi). Selain itu peningkatan pemakaian graft juga disebabkan oleh bertambahnya prevalensi penyakit yang memerlukan graft tulang.

Pada berbagai kasus kerusakan tulang (*bone defect*) seperti kanker tulang, periodontitis dan lain sebagainya, sering diperlukan graft tulang sebagai pengganti tulang yang rusak. Saat ini graft tulang yang banyak digunakan pada bidang ortopedi yaitu *natural bone* antara lain *autograft* (tulang dari pasien yang sama), *allograft* (tulang dari donor manusia lain) dan *xenograft* (tulang sapi). *Autograft* mempunyai kelemahan yaitu tulang harus diambil dari bagian tubuh lain pasien yang sama melalui teknik operasi sehingga dapat menimbulkan masalah-masalah klinis, terbatasnya tulang yang ada dan dapat menimbulkan resiko kematian. Sedangkan *allograft* dan *xenograft* dapat menimbulkan reaksi autoimun serta kemungkinan terjadinya transfer penyakit.

Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi - BATAN telah berhasil membuat beberapa produk graft tulang (*Allograft* dan *xenograft*) steril radiasi untuk keperluan klinis, dan hingga saat ini telah digunakan pada beberapa rumah sakit dengan hasil yang memuaskan (1). *Allograft* merupakan graft tulang yang berasal dari donor manusia baik donor hidup maupun donor jenazah. *Xenograft* merupakan graft tulang yang berasal dari donor spesies selain manusia, umumnya yang digunakan adalah sapi (2-3).

Dalam pengembangan graft tulang kendala utama yang dihadapi yaitu sukar untuk mendapatkan donor tulang sehingga ketersediaan ketiga graft tersebut sangat terbatas disamping masalah yang telah disebutkan diatas. Oleh karena itu perlu suatu alternatif untuk mengganti graft tulang dengan bahan sintetik yang mempunyai sifat menyerupai tulang asli.

Hidroksiapatit (HA) dengan rumus kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ merupakan salah satu senyawa anorganik penyusun jaringan keras (*hard tissue*) tubuh manusia seperti tulang, gigi, dentin dan lain sebagainya (4,5). HA sintetik merupakan material seperti tulang yang mempunyai sifat dapat berikatan dengan tulang secara baik. Beberapa hasil penelitian (6-7) menyebutkan bahwa HA sintetik berpotensi untuk digunakan sebagai pengganti graft tulang (*allograft* dan *xenograft*) dengan sifat biokompatibilitas yang baik terhadap tulang dan gigi. HA telah banyak digunakan sebagai implan biomedik dan regenerasi tulang karena mempunyai sifat bioaktif dan *biodegradable* (8). Namun HA mempunyai kelemahan yaitu bersifat rapuh, tidak bersifat osteoinduktif, sifat mekanik rendah dan ketidakstabilan struktur pada saat bercampur dengan cairan tubuh atau darah pasien. Penyembuhan tulang pada kasus kerusakan tulang (*bone defect*) merupakan suatu proses yang kompleks dimana diperlukan adanya proses osteosis yaitu osteokonduksi dan osteoinduksi. Untuk meningkatkan proses osteosis pada penanganan kerusakan tulang diperlukan suatu bahan yang mempunyai sifat osteoinduksi pada HA sintetik. Salah satu bahan yang mempunyai sifat tersebut adalah khitosan (7). Selain itu agar tulang sintetik ini tidak mudah rapuh, diperlukan adanya pencampuran dengan senyawa yang bersifat elastis seperti polivinil alkohol. Pembuatan HA akan

dilakukan dengan metode basah (*wet method*) yaitu dengan mereaksikan larutan kalsium hidroksida, Ca(OH)_2 dengan larutan asam fosfat, H_3PO_4 pada suhu dan pH tertentu (6, 10).

Pada penelitian ini akan disintesis dan dikarakterisasi HA dan komposit HA-polimer dengan teknik iradiasi gamma dengan maksud dapat digunakan pada berbagai keperluan klinik pada bidang periodontal, ortopedik, dan bedah plastik.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah kalsium hidroksida Ca(OH)_2 (Merck), asam fosfat (H_3PO_4) (Merck), Polivinyl alkohol 72000 (Merck), polivinil pirolidon (PVP) K-90 (Fluka), Gliserin (Merck), etanol absolut (Merck), amoniak (Merck), Ag nitrat (Merck), khitosan (PATIR-BATAN), dan air suling. Semua bahan kimia yang digunakan berkualitas pro analisis (Pa).

Instrumen/alat yang digunakan adalah: Irradiator gamma IRPASENA, SEM, FTIR, Hot Plate, Magnetic stirrer, pH meter, dan alat gelas lainnya.

Metode

Pembuatan Hidroksiapatit (HA). HA dibuat dengan metode basah melalui prinsip reaksi antara kalsium hidroksida dan asam fosfat pada suhu 70°C dan pH 9. Suspensi Ca(OH)_2 dibuat dengan mencampurkan 25 gram Ca(OH)_2 dalam 250 ml air suling. Campuran lalu dipanaskan pada suhu 70°C sambil diaduk dengan magnetik stirrer. Larutan suspensi lalu diukur pH, ditambahkan 150 ml larutan asam fosfat 1,28 M tetes demi tetes dengan kecepatan 0.85-0,9 ml/menit (17 s/d 18 tetes per menit). Pada saat penambahan larutan asam fosfat, terjadi penurunan pH suspensi. Untuk mencegah agar pH tidak lebih rendah dari 9, pada saat pH larutan suspensi mencapai 10, perlahan-lahan kedalam larutan ditambahkan amoniak 1 N bersamaan dengan penambahan asam fosfat hingga larutan asam fosfat habis. Pemanasan dilanjutkan pada 70°C dengan pengadukan selama 2 jam, lalu suspensi didiamkan selama 24 jam. Suspensi disaring dengan menggunakan corong Buchner kertas saring kasar dengan vakum sehingga endapan terpisah dari larutan. Endapan yang diperoleh dicuci dengan air suling sehingga bebas chlorida (diuji dengan larutan Ag nitrat, tidak berwarna/tidak ada endapan). Endapan dikeringkan dalam oven suhu 60°C selama 24 jam dan dihaluskan dengan mortar serta diayak menggunakan saringan stainless steel mesh berukuran 100 mesh.

Pembuatan komposit HA/PVA/PVP/khitosan. Dibuat masing-masing sebanyak 100 ml larutan PVA 7,5% dan PVP 10% dalam air. Kedua larutan tersebut dicampurkan sama banyak (50:50)%. Ke dalam larutan campuran tersebut, ditambahkan sama banyak (50:50) larutan khitosan 2% dalam asam asetat 1%. Campuran dipanaskan pada suhu $70-80^\circ\text{C}$ sambil diaduk selama 3 jam hingga diperoleh campuran homogen.

Penambahan etanol/gliserol pada komposit. Kedalam campuran komposit diatas ditambahkan etanol atau gliserol sebagai *scavenger* dengan berbagai komposisi, diaduk hingga homogen.

Iradiasi campuran komposit. Iradiasi komposit dilakukan menggunakan sinar gamma pada dosis 5 hingga 30 kGy dengan laju dosis 5 kGy/jam.

Analisis

Karakterisasi hidroksiapatit, Untuk mengetahui karakteristik HA yang terbentuk selama sintesis dilakukan analisis terhadap rasio Ca dan fosfat (*Ca/P ratio*) dengan cara titrimetri untuk penetapan kadar kalsium dan metode gravimetri untuk penetapan kadar fosfat; analisis gugus fungsi dilakukan dengan FTIR; dan pengamatan ukuran kristal HA dilakukan dengan *scanning electron microscope* (SEM)

Karakterisasi komposit HA, Karakteristik komposit HA/PVA/PVP dan komposit-*scavenger* dilakukan dengan menentukan fraksi gel yang terbentuk akibat iradiasi gamma dengan cara ekstraksi dalam larutan air pada suhu 90°C selama 8 jam, kemudian gel yang terbentuk dikeringkan pada suhu 105°C hingga berat konstan. Fraksi gel dihitung dengan rumus:

$$\text{Fraksi gel} = \frac{W_k}{W_a} \times 100\%$$

W_k = berat gel kering setelah ekstraksi (mg)

W_a = berat awal komposit (mg)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tulang merupakan material komposit alamiah terdiri dari komponen organik dan inorganik. Komponen inorganik penyusun tulang (45-65%) adalah suatu bentuk kalsium fosfat yang dikenal sebagai hidroksiapatit (HA). HA mempunyai struktur kimia $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$, secara stoikimetri tersusun atas kalsium dan fosfat dengan rasio $\text{Ca/P} = 1,67$ (9). Kandungan kalsium dan fosfat pada tulang dan gigi adalah sekitar 34-37% (Ca) dan 16 – 20% (P). Dari tiga (3) batch produksi HA yang dilakukan diperoleh rasio Ca/P berkisar antara 1,68 – 1,73 dengan nilai rata-rata 1,69 dan kandungan Ca berkisar 35% dan fosfat 20%. Hasil ini menunjukkan bahwa sintesis dengan metode basah yang dilakukan menghasilkan HA dengan tingkat kemurnian yang sangat baik dan menyerupai komposisi kalsium fosfat yang ada pada tulang, sebagaimana diperlihatkan oleh Tabel 1.

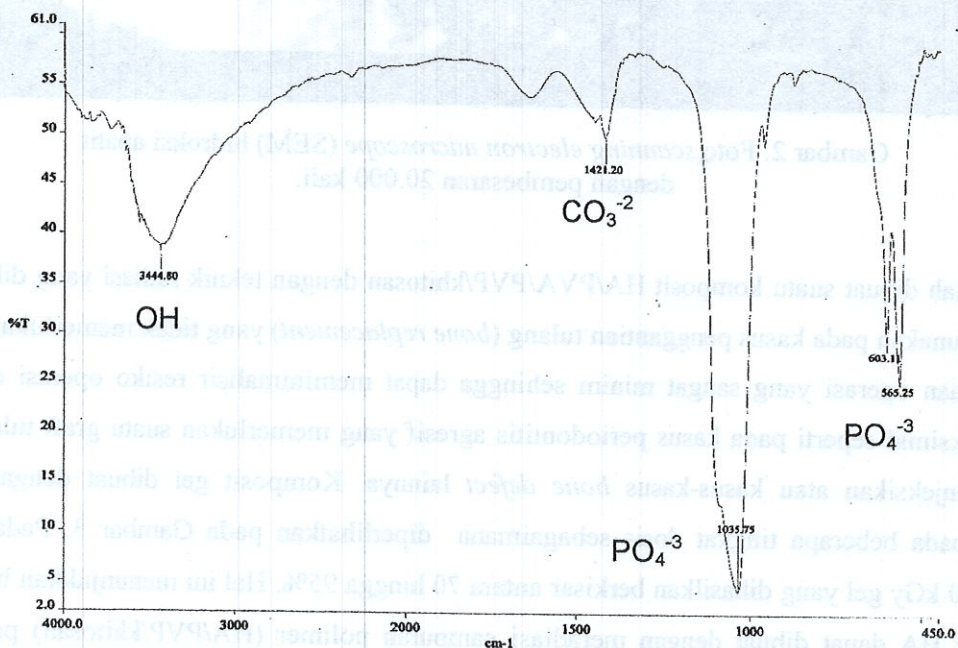
Tabel 1. Komposisi kalsium dan fosfor sebagai hasil sintesis HA dengan metode basah (*wet method*)

NO Batch	Kadar CA (%)	Kadar P (%)	Rasio Ca/P
1	34,57	19,96	1,73
2	35,04	20,83	1,68
3	35,10	20,75	1,69

Pada percobaan ini dilakukan pembuatan HA dengan metode basah. Hal ini dimaksudkan agar diperoleh HA dengan ukuran kristal yang kecil (ukuran nano sampai mikrometer). Sintesis hidroksi apatit dengan metode basah terjadi melalui reaksi sebagai berikut:

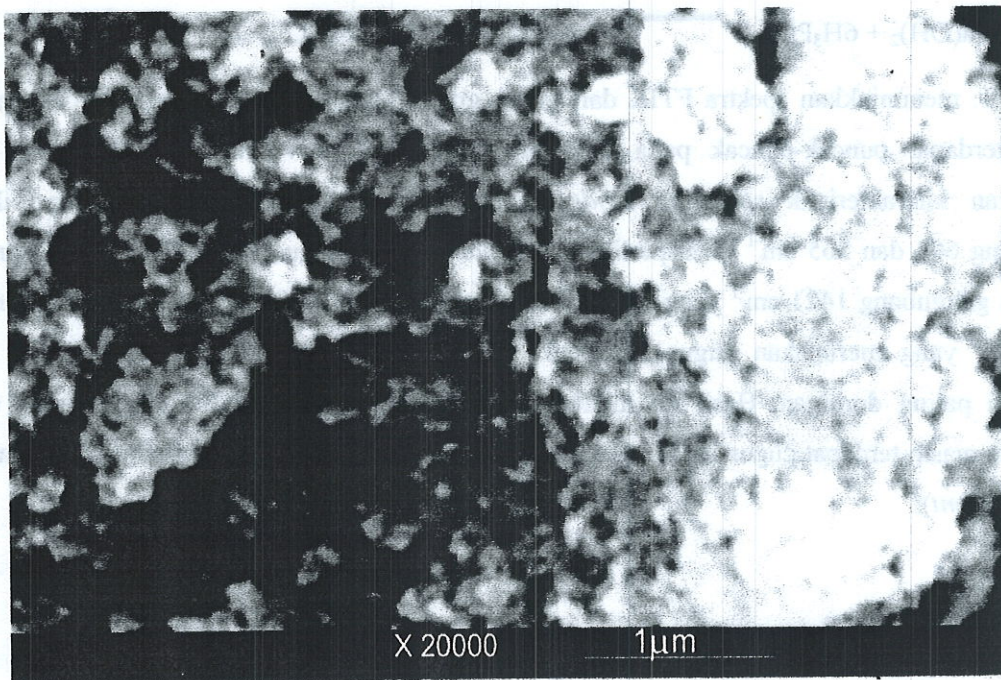


Gambar 1. menunjukkan spektra FTIR dari gugus-gugus fungsi yang ada. Terlihat pada gambar bahwa terdapat puncak-puncak pada bilangan gelombang (*wave number*) 1035 cm^{-1} yang merupakan karakteristik *stretching mode* gugus fosfat, sedangkan serapan pada bilangan gelombang 603 dan 565 cm^{-1} memperlihatkan *bending mode* gugus fosfat (PO_4^{-3}); serapan pada bilangan gelombang 1421 cm^{-1} yang merupakan gugus karbonat (CO_3^{-2}); dan bilangan gelombang 3450 cm^{-1} yang merupakan gugus hidroksil (OH). Dari spektra terlihat bahwa gugus fosfat terdeteksi paling dominan. Hasil ini menunjukkan tingkat kemurnian HA yang sangat tinggi, walaupun masih terdapat gugus karbonat sebagai kalsium karbonat dalam jumlah yang sangat kecil (*trace element*).



Gambar 1. Spektra FTIR dari Hidroksiapatit

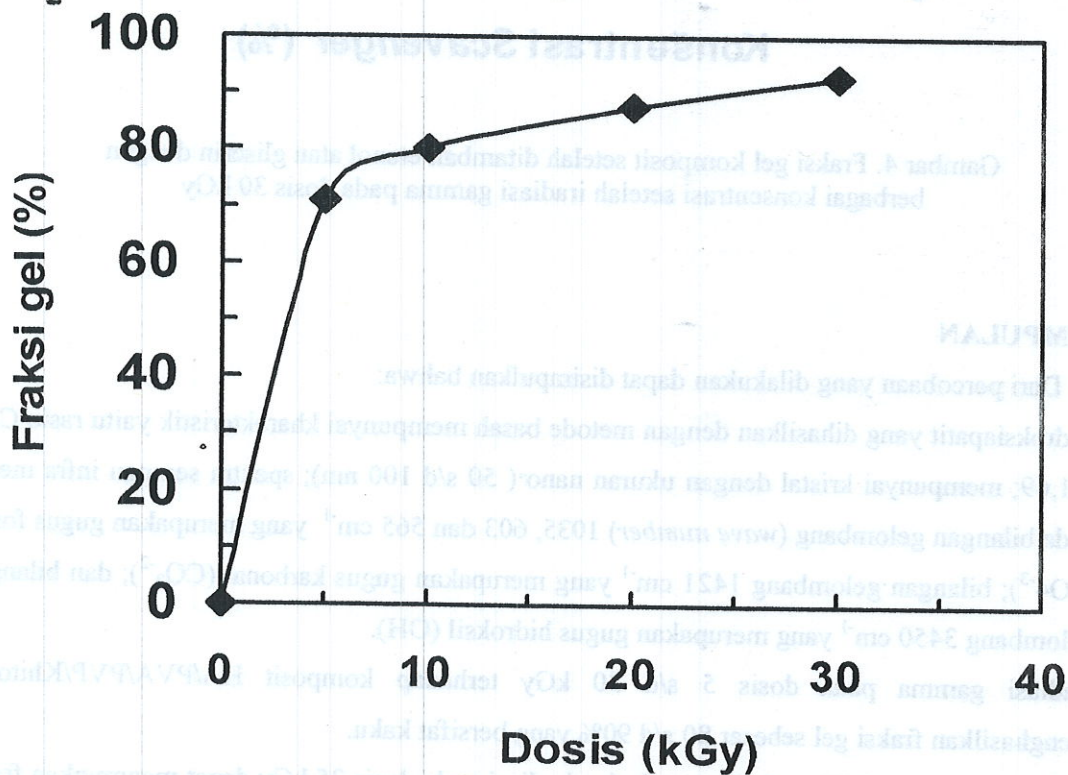
Gambar 1. Spektra infra red (FTIR) hidroksiapatit hasil pembuatan dengan metode basah. Mikroskop elektron (SEM) digunakan untuk melihat ukuran kristal HA yang terbentuk. Gambar 2 memperlihatkan foto mikroskop elektron HA dengan pembesaran 20.000 kali. Jelas terlihat pada gambar bahwa HA tersusun atas kristal dengan ukuran dalam orde nano (50-100 nm). Hal ini membuktikan bahwa asumsi metode basah (*wet method*) secara teoritis menghasilkan HA dengan ukuran kristal nano meter. HA dengan partikel nano sangat bermanfaat sebagai substitusi tulang, karena tulang tersusun atas komponen inorganic terutama HA dengan struktur nano kristal (11). Selain itu nano kristal akan lebih mudah diserap tubuh karena mempunyai luas permukaan yang besar.



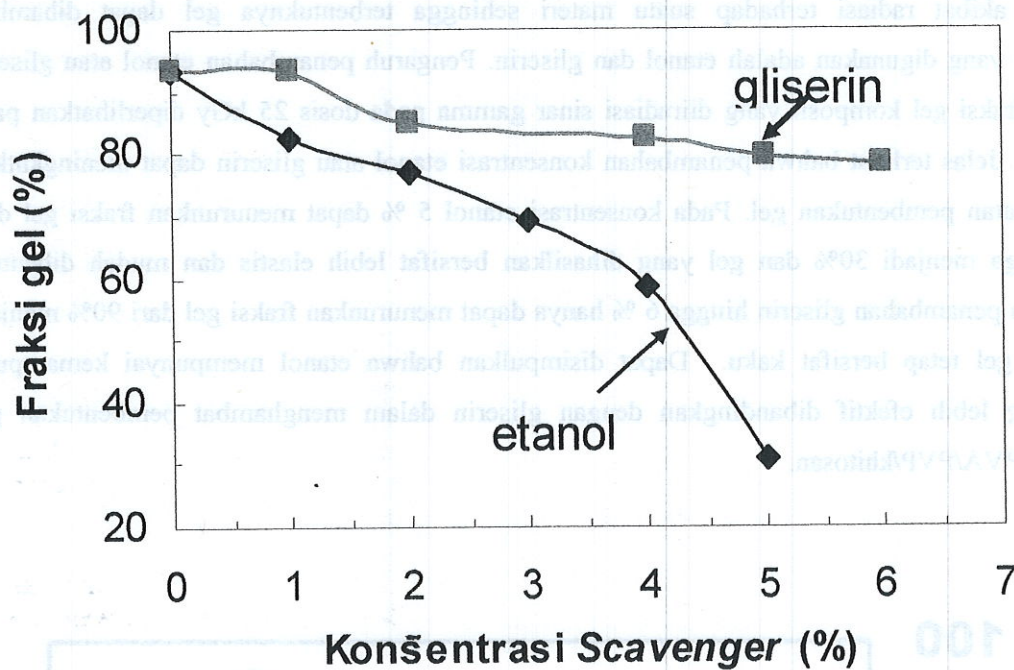
Gambar 2. Foto *scanning electron microscope* (SEM) hidroksi apatit dengan pembesaran 20.000 kali.

Telah dibuat suatu komposit HA/PVA/PVP/khitosan dengan teknik radiasi yang diharapkan dapat digunakan pada kasus penggantian tulang (*bone replacement*) yang tidak memerlukan operasi atau bukaan operasi yang sangat minim sehingga dapat meminimalisir resiko operasi dan hasil yang maksimal seperti pada kasus periodontitis agresif yang memerlukan suatu graft tulang yang dapat diinjeksikan atau kasus-kasus *bone defect* lainnya. Komposit gel dibuat dengan radiasi gamma pada beberapa tingkat dosis sebagaimana diperlihatkan pada Gambar 3. Pada dosis 5 hingga 30 kGy gel yang dihasilkan berkisar antara 70 hingga 95%. Hal ini menunjukkan bahwa gel komposit HA dapat dibuat dengan meradiasi campuran polimer (HA/PVP/khitosan) pada dosis yang relatif rendah.

Namun, komposit dengan kandungan gel sangat tinggi ($\geq 40\%$) bersifat kaku dan mempunyai kendala dalam aplikasinya. Untuk menurunkan kandungan gel pada komposit diperlukan adanya suatu *scavenger*, yaitu senyawa yang dapat menangkap radikal bebas yang terbentuk akibat radiasi terhadap suatu materi sehingga terbentuknya gel dapat dihambat. *Scavenger* yang digunakan adalah etanol dan gliserin. Pengaruh penambahan etanol atau gliserin terhadap fraksi gel komposit yang diiradiasi sinar gamma pada dosis 25 kGy diperlihatkan pada Gambar 4. Jelas terlihat bahwa penambahan konsentrasi etanol atau gliserin dapat meningkatkan penghambatan pembentukan gel. Pada konsentrasi etanol 5 % dapat menurunkan fraksi gel dari 90% hingga menjadi 30% dan gel yang dihasilkan bersifat lebih elastis dan mudah dibentuk. Sedangkan penambahan gliserin hingga 6 % hanya dapat menurunkan fraksi gel dari 90% menjadi 80% dan gel tetap bersifat kaku. Dapat disimpulkan bahwa etanol mempunyai kemampuan *scavenging* lebih efektif dibandingkan dengan gliserin dalam menghambat pembentukan gel komposit PVA/PVP/khitosan.



Gambar 3. Fraksi gel komposit HA/PVA/PVP/Khitosan pada berbagai dosis radiasi gamma.



Gambar 4. Fraksi gel komposit setelah ditambah etanol atau gliserin dengan berbagai konsentrasi setelah iradiasi gamma pada dosis 30 kGy

KESIMPULAN

Dari percobaan yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Hidroksiapatit yang dihasilkan dengan metode basah mempunyai karakteristik yaitu rasio Ca/P = 1,69; mempunyai kristal dengan ukuran nano* (50 s/d 100 nm); spektra serapan infra merah pada bilangan gelombang (*wave number*) 1035, 603 dan 565 cm^{-1} yang merupakan gugus fosfat (PO_4^{3-}); bilangan gelombang 1421 cm^{-1} yang merupakan gugus karbonat (CO_3^{2-}); dan bilangan gelombang 3450 cm^{-1} yang merupakan gugus hidroksil (OH).
2. Iradiasi gamma pada dosis 5 s/d 30 kGy terhadap komposit HA/PVA/PVP/Khitosan menghasilkan fraksi gel sebesar 80 s/d 90% yang bersifat kaku.
3. Penambahan etanol 5% pada komposit dan iradiasi pada dosis 25 kGy dapat menurunkan fraksi gel masing-masing dari 90% menjadi 30% serta gel yang dihasilkan bersifat elastis dan mudah dibentuk sesuai keinginan. Sedangkan penambahan gliserin 6% hanya menurunkan fraksi gel dari 90% menjadi 80%.
4. Etanol 5% merupakan *scavenger* yang lebih efektif dibandingkan dengan gliserin 6%

DAFTAR PUSTAKA

1. Bank Jaringan Riset Batan (BRTB), liflet tissue bank, P3TIR-BATAN
2. VICTOR M.G., and SHARON S., *Biology and Cartilage Allograft in Allograft in orthopaedic practice*, (Andrei A.z. et all Editors), 1992
3. G.O. PHILLIPS (*Editor*), *Allograft in orthopaedic*, *Advanced in Tissue banking*, Vol. 1., 1997
4. NAGAI, et al., *Hydroxyapatite, ceramic material and process for preparing thereof*, **United States Patent** No. 4,448,758, May 15, 1984.
5. MILENKO M., BRUCE, O.F., and MING S.T., *Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material*, **J. of Research of the National Institute of Standards and technology**, vol. 109, p. 553-568, 2004
6. HIDEKI A., *Science and Medical Application of hydroxyapatite*, JAAS, 1991
7. WANPEN T., TAKESHI S., and MITSURU A., *Inorganic-organic polymer Hybrid Scaffold for Tissue Engineering – II: Partial Enzymatic Degradation of Hydroxyapatite-Chitosan Hybrid*, **J. Biomater.Sci. Polymer Ed.** Vol. 13, No 9, 2002
8. YUSON, P., DANGSHENG, X., AND XIAOLIN, C., *Mechanical properties of nanohydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel composite as biomaterial*, **J. Mater Sci** Vol. 42, p. 5129, 2007.
9. FIRMAN, E., et.al., *Pengaruh suhu reaksi terhadap derajat kristalinitas dan komposisi hidroksiapatit dibuat dengan media air dan cairan tubuh buatan*, **Jurnal Sain Materi Indonesia**, p.154, Oktober 2006
10. EMILY,H., *Engineering bioactive polymers for the next generation of bone repair*, Thesis for Doctoral Degree in Drexel University, 2005.
11. CAIXIA, L., ZIHUA, Y., ZHIYUNG, L., and YUNKE, W., *Preparation and characterization of hydroxyapatite/chitosan-sodium alginate composite material*, **CJI**, Vol.8, p. 53, 2006

REFERENCES

1. Iizack Jariangan Riset Patan (BRTB) Hifat tissue bank PATIR-BATAN
2. VICTOR M. G. and SHARON S., *Biology and Chemistry of Alloys in Orthopaedics*, (Anders A. & all Editors), 1992
3. G.O. PHILLIPS (Editor), *Alloys in orthopaedics, Advanced in Tissue banking*, Vol. 1, 1997
4. NAGAI et al., Hydroxyapatite ceramic material and process for preparing thereof, United States Patent No. 4,448,738, May 15, 1984.
5. MILENKO M., BRUCE O.F. and MING S.T., Preparation and Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Resin-based Material, *J. of Research of the National Institute of Standards and Technology*, vol. 109, p. 253-268, 2004
6. HIDEKI A., *Science and Medical Application of hydroxyapatite*, JAA2, 1991
7. WAKABAYASHI T., TAKESEKI S., and MITSURU A., Inorganic-organic polymer hybrid scaffold for tissue engineering – II. Partial functional degradation of hydroxyapatite. *Chemical Hybrid & Biomater. Sci. Polymer Ed.* Vol. 13, No. 9, 2002
8. YUSON P., DANGSHENG X. AND XIAOLIN C., Mechanical properties of nanohydroxyapatite reinforced poly(vinyl alcohol) gel composite as biomaterial, *J. Mater. Sci.* Vol. 42, p. 2129, 2007.
9. FIRMAN E., et al., Pengaruh suhu reaksi terhadap derajat kristinitas dan komposisi hidroksiapatit hibrid dengan matriks oksida karbon hibrid patan, *Jurnal Sains & Kesehatan*, p.124, Oktober 2006
10. EMILY H., *Engineering bioceramic polymers for the next generation of bone repair*, Thesis for Doctoral Degree in Dental University, 2003.
11. CAIXIA L., ZHUA Y., ZHILONG L. and YUNKE W., Preparation and characterization of hydroxyapatite titanium-titanium nitride composite material, *Chin. Vol. 8, p. 53, 1999*