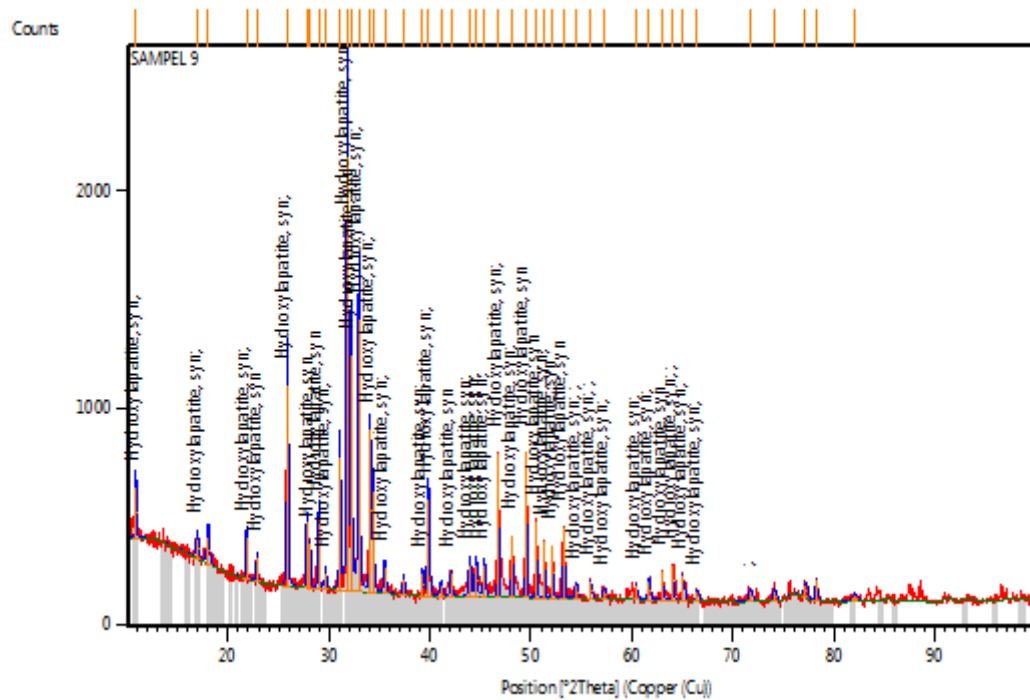


# LAMPIRAN

## I. INSTRUMEN

## Contoh data hasil analisa dengan XRD

### Graphics



### Peak List

Pos. [°2Th.]	Height [cts]	FWHMLeft [°2Th.]	d-spacing [Å]	Rel. Int. [%]
10.8491	238.03	0.1023	8.15503	11.87
16.9441	88.18	0.3070	5.23285	4.40
18.0266	124.79	0.3070	4.92097	6.22
21.7966	188.21	0.1279	4.07760	9.39
22.8670	113.07	0.1023	3.88909	5.64
25.8760	928.27	0.1279	3.44327	46.30
27.7944	310.13	0.1023	3.20982	15.47
28.1295	209.67	0.0768	3.17235	10.46
28.9541	335.20	0.1279	3.08384	16.72
29.6287	74.12	0.2047	3.01515	3.70
31.0494	619.31	0.1279	2.88035	30.89
31.7780	2004.83	0.1535	2.81596	100.00
32.1861	1093.19	0.1279	2.78118	54.53
32.9105	1263.76	0.1535	2.72159	63.04
34.0574	757.18	0.1023	2.63253	37.77
34.3322	474.35	0.1279	2.61208	23.66
35.4989	123.25	0.2047	2.52886	6.15
37.3635	76.36	0.1535	2.40684	3.81
39.2271	105.13	0.1535	2.29668	5.24
39.8007	451.20	0.1791	2.26489	22.51
41.0580	51.72	0.3070	2.19840	2.58
42.0387	107.63	0.1535	2.14935	5.37
43.8844	146.21	0.2047	2.06314	7.29
44.5245	148.20	0.2047	2.03496	7.39

45.3419	150.03	0.2047	2.00016	7.48
46.6860	663.31	0.0768	1.94566	33.09
48.0759	287.15	0.1023	1.89260	14.32
49.4669	677.84	0.0768	1.84260	33.81
50.4807	356.83	0.0768	1.80795	17.80
51.2661	268.72	0.0768	1.78208	13.40
52.0741	244.85	0.0768	1.75631	12.21
53.1873	334.94	0.0768	1.72215	16.71
54.4428	61.41	0.3070	1.68537	3.06
55.8818	82.69	0.1535	1.64533	4.12
57.2345	41.78	0.3070	1.60962	2.08
60.4165	65.93	0.1535	1.53224	3.29
61.6269	91.78	0.2047	1.50502	4.58
62.9780	134.28	0.0936	1.47472	6.70
63.9641	168.88	0.0936	1.45434	8.42
64.9982	122.70	0.1535	1.43487	6.12
66.4085	43.60	0.3070	1.40778	2.17
71.6907	53.73	0.3070	1.31649	2.68
74.0570	52.92	0.3070	1.28018	2.64
77.1243	57.39	0.4093	1.23674	2.86
78.1993	99.63	0.1535	1.22241	4.97
81.9416	27.69	0.6140	1.17579	1.38

#### Pattern List

Visible Fac.	Ref.Code Chem. Formula	Score	Compound Name	Displ.[°2Th]	Scale
	01-076-0694	75	Calcium Phosphate ..	0.000	
1.026	Ca <sub>5</sub> ( P O <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> O H				
	01-072-7587	34	Calcium Phosphate	0.000	
0.371	Ca <sub>3</sub> ( P O <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>				
	01-084-1265	33	Calcium Hydroxide	0.000	
0.208	Ca ( O H ) <sub>2</sub>				



## II. PERSONALIA TENAGA PENELITI

### Personalia tenaga peneliti beserta kualifikasinya

No	a) Nama lengkap b) Tenaga peneliti c) Keahlian/Kualifikasi	a) Unit kerja b) Instansi	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	a) <b>Ahmad Fadli</b> b) Ketua Peneliti c) Biomaterials	a) Teknik Kimia b) Universitas Riau	12 jam/minggu
2.	a) <b>Fajril Akbar</b> b) Anggota Peneliti I c) Kimia bahan	a) Teknik Kimia b) Universitas Riau	10 jam/minggu
3.	a) <b>Komalasari</b> b) Anggota Peneliti II c) Teknik Kimia	a) Teknik Kimia b) Universitas Riau	10 jam/minggu

### **III. HKI (*Draft*) DAN PUBLIKASI**

## Deskripsi

### **METODE PRODUKSI HIDROKSIAPATIT DARI KULIT KERANG DARAH MENGUNAKAN CARA HIDROTERMAL SUHU RENDAH**

#### **Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berhubungan dengan metode sintesis serbuk hidroksiapatit dengan metode hidrotermal pada suhu rendah. Bahan baku yang digunakan adalah kulit kerang darah, ammonium dihidrogen phosphate dan air distilat. Proses sintesis pada serbuk hidroksiapatit pada teknik ini dilakukan pada suhu rendah yaitu (70°C -90°C) dibandingkan dengan teknik–teknik hidrotermal yang lain.

#### **Latar Belakang Invensi**

Jumlah penderita kerusakan tulang di Indonesia meningkat yang disebabkan oleh kecelakaan, osteoporosis dan bencana alam. Data dari Badan Pusat Statistik menunjukkan pada tahun 2012 terjadi 117 ribu peristiwa yang mengakibatkan cacat atau kerusakan tulang pada korban. Insiden patah tulang akibat osteoporosis terus meningkat dari sekitar 20 ribuan kasus pada tahun 2007 menjadi sekitar 43 ribuan kasus pada tahun 2010. Kerusakan tulang ini dapat menyebabkan penurunan fungsi gerak pada tubuh. Untuk memperbaiki kerusakan pada struktur tulang ini dapat digunakan metode cangkok tulang atau implan.

Hidroksiapatit dengan rumus molekul  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$  yang disingkat HA adalah biokeramik yang banyak digunakan untuk memperbaiki dan merekonstruksi bagian tulang manusia yang rusak terutama sebagai tulang pengganti dalam pengisian tulang. Salah satu cara memperoleh hidroksiapatit adalah melalui reaksi senyawa–senyawa kalsium oksida dengan ammonium dihidrogen fosfat. Kalsium oksida yang digunakan dapat dibeli di pasaran atau juga dapat diperoleh dari bahan alam antara lain kulit telur, batu kapur, batu karang dan kulit kerang.

Kulit kerang mengandung kalsium karbonat yang tinggi hingga 98%. Kulit kerang merupakan salah satu komoditas yang melimpah di Indonesia. Produksi kerang–kerangan di Indonesia dari tahun 2002 hingga 2006 terus meningkat dengan data berturut–turut adalah sebesar 7 ton, 12,86 ton, 12,99 ton, 16,35 ton, dan 18,87 ton.



Penggunaan kulit kerang sebagai bahan baku sintesis hidroksiapatit dilakukan oleh Zhang dan Vecchio [2005] menggunakan metode hidrotermal dengan suhu reaksi 200°C yang dilakukan di dalam *autoclave* selama 4 hari, 8 hari dan 20 hari. Metode hidrotermal pada suhu reaksi 100°C dan 200°C dilakukan oleh Sadat-Shojai *et al* [2012] dengan pH 4, 6 dan 9 dengan hasil menunjukkan bahwa HA yang dihasilkan dengan rasio Ca/P sebesar 1,67 didapatkan pada pH 4. Alqap dan Sopyan [2009] menggunakan metode hidrotermal dengan suhu reaksi 90°C menggunakan bahan baku CaO murni komersial dimana pencampuran bahan dilakukan serentak. Tujuan invensi ini adalah membuat serbuk hidroksiapatit dari kulit kerang darah untuk aplikasi tulang implan menggunakan metode hidrotermal suhu rendah dengan pencampuran bahan bertahap.

### **Ringkasan Invensi**

Objek invensi ini berhubungan dengan suatu metode untuk memproduksi serbuk hidroksiapatit dari kulit kerang darah yang dinamakan hidrotermal suhu rendah. Metode ini terdiri dari tahapan: (a) kalsinasi kulit kerang darah pada suhu 1000°C selama 24 jam, (b) pengadukan dan pemanasan campuran pada suhu 70°C -90°C hingga diperoleh paste, (c) pengeringan pasta dalam oven pada suhu 120°C selama 15 jam, (d) penghalusan pasta menjadi serbuk, (e) kalsinasi serbuk pada suhu 900°C menjadi serbuk hidroksiapatit. Sifat-sifat serbuk hidroksiapatit yang dihasilkan adalah kemurnian 92% dengan ukuran butir sekitar 62 nm.

### **Uraian Singkat Gambar**

Gambar 1. Grafik XRD kulit kerang (a) sebelum dan (b) setelah dikalsinasi pada suhu 1000°C

Gambar 2. Grafik FTIR serbuk setelah dikalsinasi pada suhu 900°C

Gambar 3. Grafik mikro serbuk setelah dikalsinasi pada suhu 900°C

Gambar 4. Struktur mikro serbuk setelah dikalsinasi pada suhu 900°C

### **Uraian Lengkap Invensi**

Hidroksiapatit (HA) adalah salah satu jenis biokeramik yang banyak digunakan pada biomedis karena sifatnya yang unggul yaitu biokompatibel pada tubuh. Selain itu, harga HA sintetik di Indonesia relatif mahal contohnya harga

hidroksiapatit yang diproduksi oleh Merck Jerman adalah Rp 5.000.000 untuk 5 gram HA. Padahal kebutuhan terhadap hidroksiapatit meningkat akibat tingkat kerusakan tulang yang tinggi. Berbagai teknik telah dikembangkan untuk proses sintesis hidroksiapatit diantaranya adalah metode hidrotermal [Sopyan *et al.*, 2009; Sadat-Shojai *et al.*, 2011], sol gel [Bezzi *et al.*, 2002; Eugene *et al.*, 2004], presipitasi [Mobasherpour *et al.*, 2007] dan *mechanochemical* [Rhee, 2002; Fahami *et al.*, 2011]. Tujuan investasi ini adalah membuat serbuk hidroksiapatit dari bahan baku kulit kerang dengan metode hidrotermal suhu rendah. Proses diawali dengan cara mencampurkan 31,6 gram CaO, ammonium dihidrogen fosfat ((NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dengan perbandingan rasio Ca/P yang ditentukan (0,67; 1,67; 2,67) serta aquades sebanyak 600 mL didalam gelas kimia 1000 mL. Lalu pH campuran tersebut diatur sesuai dengan yang telah ditentukan (4, 6, 9) dengan penambahan HNO<sub>3</sub> ataupun NH<sub>4</sub>OH. Campuran tersebut dipanaskan pada suhu 70-90°C sambil diaduk dengan kecepatan 200-300 rpm selama 2; 2,5; 3; 3,5 dan 4 jam. Hasil sintesis berupa *slurry*, selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 120°C selama 15 jam. Sampel hasil *pengeringan* pada oven dihancurkan hingga halus dengan lumpang dan dikalsinasi pada suhu 900°C dengan laju pemanasan 10°C/menit selama 0,5 – 1,5 jam. Proses kalsinasi akan dilakukan dilakukan pada temperatur 700°C hingga 1000°C dengan waktu tinggal 60 menit hingga 180 menit. Setelah didapatkan hasil berupa bubuk hidroksiapatit, dilakukan pengujian yang dilakukan dengan XRD, SEM dan FTIR.

Gambar 1 adalah hasil analisa XRD kulit kerang halus sebelum dan sesudah kalsinasi dimana terlihat bahwa hampir keseluruhan CaCO<sub>3</sub> terdekomposisi menjadi CaO. Gambar 2 menunjukkan difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan variasi suhu reaksi 70°C, 80°C dan 90°C pada kecepatan pengadukan 300 rpm. Difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit (Gambar 2 menunjukkan bahwa reaksi hidrotermal ammonium hidrogen fosfat dan kalsium yang berasal dari kulit kerang darah menghasilkan intensitas yang dimiliki secara bersama oleh beberapa fasa senyawa kalsium fosfat. Fasa yang muncul selain hidroksiapatit adalah apatit karbonat tipe A (kalsium hidroksida) dan apatit karbonat tipe B (kalsium fosfat). kalsium hidroksida terbentuk karena pada saat proses reaksi sebagian CaO bereaksi dengan air yang digunakan sebagai pelarut.

Difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan suhu 70°C pada kecepatan pengadukan 300 rpm pada Gambar 2 (a), puncak dengan intensitas tertinggi

terdapat pada sudut  $2\theta$  :  $31,03^\circ$ ,  $27,77^\circ$ ,  $34,3^\circ$ ,  $31,75^\circ$ ,  $25,73^\circ$ . Hidroksiapatit yang dihasilkan dengan kristalinitas yang cukup sebesar 40%. Fasa tertinggi yang muncul yaitu hidroksiapatit. Selain itu masih ada puncak yang dimiliki oleh apatit karbonat tipe A (kalsium hidroksida). Difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan suhu  $80^\circ\text{C}$  pada kecepatan pengadukan 300 rpm pada Gambar 2 (b), puncak dengan intensitas tertinggi terdapat pada sudut  $2\theta$  :  $31^\circ$ ,  $34,33^\circ$ ,  $31,76^\circ$ ,  $27,78^\circ$ ,  $25,82^\circ$ . Hidroksiapatit yang dihasilkan dengan kristalinitas yang meningkat sebesar 55%. Fasa tertinggi yang muncul yaitu hidroksiapatit. Selain itu masih ada puncak yang dimiliki oleh apatit karbonat tipe A (kalsium hidroksida) dan apatit karbonat tipe B (kalsium fosfat). Difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan suhu  $90^\circ\text{C}$  pada kecepatan pengadukan 300 rpm pada Gambar 2 (c), teramati puncak-puncak yang mulai menyempit, menandakan kristalinitas dari sampel mulai naik. Puncak dengan intensitas tertinggi terdapat pada sudut  $2\theta$  :  $31,75^\circ$ ,  $32,88^\circ$ ,  $32,16^\circ$ ,  $25,85^\circ$ ,  $34,03^\circ$ . Hidroksiapatit yang dihasilkan dengan kristalinitas yang semakin meningkat sebesar 80%. Fasa tertinggi yang muncul yaitu hidroksiapatit. Selain itu masih ada puncak yang dimiliki oleh apatit karbonat tipe A (kalsium hidroksida) dan apatit karbonat tipe B (kalsium fosfat). Difraktogram hasil sintesis hidroksiapatit sebelum kalsinasi dengan kecepatan pengadukan 300 rpm dan suhu  $90^\circ\text{C}$  pada Gambar 2 (d), menghasilkan puncak dengan intensitas tertinggi terdapat pada sudut  $2\theta$ :  $34^\circ, 47^\circ, 31,7^\circ$ ,  $50,75^\circ$ , dan  $32,18^\circ$ . Fasa tertinggi yang muncul yaitu apatit karbonat tipe A (kalsium hidroksida). Fasa yang muncul selain kalsium hidroksida adalah hidroksiapatit dan kalsium silika. Hasil sintesis sebelum kalsinasi dengan kecepatan pengadukan 300 rpm dan suhu  $90^\circ\text{C}$  belum menghasilkan hidroksiapatit yang sesuai dengan data JCPDS hidroksiapatit yaitu No. 09-0432 dan pola difraksi dari hidroksiapatit komersial. Hasil perhitungan ukuran diameter kristal dengan persamaan *Scherer* dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Ukuran diameter kristal dihitung dengan persamaan *Scherer*

Suhu ( $^\circ\text{C}$ )	Diameter kristal (nm)
70	63,43
80	52,85
90	52,48

Hasil analisa pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa semakin meningkatnya suhu reaksi, ukuran diameter kristal yang diperoleh semakin kecil. Semakin tinggi suhu reaksi akan menyebabkan susunan atom dalam sampel semakin teratur sehingga semakin banyak kristal yang terbentuk. Derajat kristalinitas merupakan besaran yang menyatakan banyaknya kandungan kristal dalam suatu material dengan membandingkan luasan kurva kristal dengan luasan kristal.

Difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan suhu rendah 90°C dibandingkan dengan difraktogram hidroksiapatit dengan suhu tinggi 180°C [Hien, 2010] pada kecepatan pengadukan 300 rpm dapat dilihat pada Gambar 3 sebagai berikut. Difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan suhu 90°C pada kecepatan pengadukan 300 rpm pada Gambar 2 (a), teramati puncak-puncak yang mulai menyempit, menandakan kristalinitas dari sampel mulai naik. Puncak dengan intensitas tertinggi terdapat pada sudut  $2\theta$  : 31,75°, 32,88°. Fasa tertinggi yang muncul yaitu hidroksiapatit. Selain itu masih ada puncak yang dimiliki oleh apatit karbonat tipe A (kalsium hidroksida) dan apatit karbonat tipe B (kalsium fosfat). Difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan suhu 180°C pada Gambar 2 (b), teramati puncak-puncak yang mulai menyempit. Puncak dengan intensitas tertinggi terdapat pada sudut  $2\theta$  : 31.77° and 32.20°. Fasa tertinggi yang muncul yaitu hidroksiapatit. Selain itu masih ada puncak yang dimiliki oleh apatit karbonat tipe A (kalsium hidroksida) dan apatit karbonat tipe B (kalsium fosfat).

Difraktogram hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan suhu rendah 90°C menghasilkan kristal dengan ukuran 52,48 nanometer sedangkan difraktogram hidroksiapatit dengan suhu tinggi 180°C menghasilkan kristal dengan ukuran 200 nm [Hien, 2010]. Metode hidrotermal merupakan metode yang paling tepat untuk mendapatkan sampel dengan kualitas baik, kemurnian tinggi, seragam, kristalinitas tinggi, dan reaktivitasnya sangat tinggi. Tetapi untuk mengurangi *cost*, energi dan kecelakaan kerja lebih baik menggunakan suhu rendah dengan konsep pelarutan yang memerlukan energi rendah.

Gambar 3 menunjukkan spektrum FTIR hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan variasi suhu reaksi 70°C, 80°C dan 90°C pada kecepatan pengadukan 300 rpm. Hasil pengukuran hidroksiapatit menggunakan metode hidrotermal yang disintesis dengan kecepatan pengadukan 300 rpm pada suhu reaksi 70°C menggunakan analisa FTIR ditunjukkan pada Gambar 3. Gugus fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) vibrasi asimetri *stretching* hasil kalsinasi terdeteksi pada bilangan gelombang 1019  $\text{cm}^{-1}$  yang

menunjukkan bahwa terbentuk kristal pada hasil kalsinasi. Pita fosfat pada spektrum hidroksiapatit komersial hadir sebagai pita kecil pada bilangan gelombang  $878\text{ cm}^{-1}$  dan  $961\text{ cm}^{-1}$ . Selain itu dalam spektrum hidroksiapatit terlihat pita serapan karakteristik  $\text{H}_2\text{O}$  disekitar  $2021\text{ cm}^{-1}$ ,  $2167\text{ cm}^{-1}$  dan  $2182\text{ cm}^{-1}$ . adanya kenaikan intensitas pada pita  $2250\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan pita dari  $\text{H}_2\text{O}$  dipermukaan dikarenakan sampel HA menyerap air dipermukaannya. Hal ini dikarenakan teknik penyimpanan sampel yang kurang baik yakni tidak menyertakan *silica gel* pada waktu penyimpanannya atau mungkin juga dikarenakan HA yang dihasilkan dari proses kalsinasi menjadi lebih higroskopis karena suhu kalsinasi yang makin tinggi. Hasil pengukuran hidroksiapatit menggunakan metode hidrotermal yang disintesis dengan kecepatan pengadukan  $300\text{ rpm}$  pada suhu  $80^\circ\text{C}$  menggunakan analisa FTIR ditunjukkan pada Gambar 3 (b). Gugus fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) vibrasi asimetri *stretching* hasil kalsinasi terdeteksi pada bilangan gelombang  $1025\text{ cm}^{-1}$  dan  $1087\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan bahwa terbentuk kristal pada hasil kalsinasi. Pita fosfat pada spektrum hidroksiapatit komersial hadir sebagai pita kecil pada bilangan gelombang  $963\text{ cm}^{-1}$ . Selain itu dalam spektrum hidroksiapatit terlihat pita serapan karakteristik  $\text{OH}^-$  disekitar  $3643\text{ cm}^{-1}$  dan  $630\text{ cm}^{-1}$ . Hal ini dapat terjadi karena serbuk HA bersifat higroskopis sehingga memungkinkan terjadinya hidrasi dari udara. Gugus OH pada region  $3643\text{ cm}^{-1}$  ini disebut air absorpsi, sedangkan gugus OH yang terdeteksi disekitar bilangan gelombang  $630\text{ cm}^{-1}$  merupakan ilustrasi dari air absorpsi. Selain itu dalam spektrum hidroksiapatit terlihat pita serapan karakteristik  $\text{H}_2\text{O}$  disekitar  $2036\text{ cm}^{-1}$ . Hasil pengukuran hidroksiapatit menggunakan metode hidrotermal yang disintesis dengan kecepatan pengadukan  $300\text{ rpm}$  pada suhu  $90^\circ\text{C}$  menggunakan analisa FTIR ditunjukkan pada Gambar 3 (c). Gugus fosfat ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) vibrasi asimetri *stretching* hasil kalsinasi terdeteksi pada bilangan gelombang  $1024\text{ cm}^{-1}$  dan  $1085\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan bahwa terbentuk kristal pada hasil kalsinasi. Selain itu dalam spektrum hidroksiapatit terlihat pita serapan karakteristik  $\text{OH}^-$  disekitar  $3642\text{ cm}^{-1}$ . Hal ini dapat terjadi karena serbuk HA bersifat higroskopis sehingga memungkinkan terjadinya hidrasi dari udara. Gugus OH pada region  $3642\text{ cm}^{-1}$  ini disebut air absorpsi.

Identifikasi fasa kristal dengan analisis difraksi sinar-X (XRD), juga dikarakterisasi dengan SEM (*scanning electron microscopy*). Dari hasil foto SEM tampak morfologi kristal beberapa senyawa apatit yang berkumpul sehingga tampak lebih besar dengan butir yang halus dan seragam [V'azquez, 2005]. Sampel dengan suhu pemanasan lebih tinggi menghasilkan kristal dengan kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan sampel dengan suhu pemanasan yang lebih rendah. Karena dengan suhu pemanasan yang tinggi akan membuat proses *coarsening* (pertumbuhan) partikel semakin baik [Wang, 2011]. Berdasarkan analisa XRD, struktur kristalin pada sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 2.** Struktur kristalin sampel hidroksiapatit dengan variasi suhu reaksi

Suhu (°C)	Komposisi	Struktur kristalin
70	Calcium Phosphate Hidroksida Calcium Phosphate	Monoclinic Rhomboidal
80	Calcium Phosphate Hidroksida Calcium Phosphate Calcium Hydroxide	Hexagonal Rhomboidal Monoclinic
90	Calcium Phosphate Hidroksida Calcium Phosphate Calcium Hydroxide	Hexagonal Rhomboidal Monoclinic

Struktur kristalin yang dihasilkan pada analisa XRD adalah struktur *monoclinic* dan *hexagonal*. Hasil foto SEM untuk hasil kalsinasi hidroksiapatit dengan variasi suhu reaksi 70°C, 80°C dan 90°C pada kecepatan pengadukan 300 rpm ditunjukkan pada Gambar 4.

Hasil observasi sampel dengan SEM dapat dilihat pada Gambar 4. Perbesaran yang digunakan adalah 7500x. Partikel pada sampel A1 membentuk agglomerat dan tampak seperti kelompok partikel berukuran besar, sedangkan pada sampel A3 partikel yang dihasilkan berbentuk granular dan tampak seperti kelompok partikel kecil yang rapat. Ukuran butir pada sampel A3 terlihat lebih kecil dibandingkan dengan sampel A1 dan A2. Hal ini diperkuat dengan hasil perhitungan ukuran kristal dari hasil pola XRD. Butir didefinisikan sebagai kristal

individu. Ukuran kristal sampel A3 menghasilkan kristal yang sangat kecil berukuran nano yaitu ~52,48 nm sedangkan A1 dan A2 ~63,43 nm dan ~52,85 nm (berdasarkan perhitungan dengan persamaan *Scherrer*). Kenaikan suhu mengakibatkan meningkatnya energi getaran termal, yang kemudian mempercepat difusi atom melalui batas butir, dari butiran yang kecil menuju yang lebih besar. Dari Gambar 4 dapat dilihat bahwa jarak antar partikel yang mulanya sangat rapat menunjukkan kerenggangannya ketika suhu pemanasan semakin rendah. Akan tetapi pengaruh ini tidak dapat dijelaskan lebih banyak karena partikel-partikel HA yang diperoleh cenderung membentuk agglomerat.

**Tabel 3.** Komposisi konsentrasi senyawa hidroksiapatit

<b>Senyawa</b>	<b>Konsentrasi senyawa</b>
Hidroksiapatit (HAp)	92%
CaO	3%
CaCO <sub>3</sub>	1%
Ca(OH) <sub>2</sub>	1%
Ca(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	3%

Tabel 3 merupakan komposisi konsentrasi dari tiap senyawa yang ada pada salah satu sampel hidroksiapatit pada variasi suhu kalsinasi 900°C dengan waktu tinggal selama 2 jam. Pada tabel menunjukkan komposisi hidroksiapatit dan senyawa lainnya yang terkandung.

## **Klaim**

1. Suatu metode untuk memproduksi serbuk hidroksiapatit dari kulit kerang darah terdiri dari langkah:

(a) kalsinasi kulit kerang darah.

(b) pencampuran bahan ammonium dihidrogen phosphate, kalsium oksida dan air.

(c) pengadukan dan pemanasan campuran bahan hingga terbentuk pasta

(d) pengeringan pasta di dalam oven

(e) penghalusan pasta menjadi serbuk

(f) kalsinasi serbuk menjadi hidroksiapatit.

2. Metode yang diklaim 1, dimana pencampuran dalam step (b) adalah pencampuran bertahap yaitu ammonium dihidrogen phosphate dengan air dan kemudian CaO dicampurkan ke dalam campuran kedua bahan.

3. Metode yang diklaim 1, dimana pemanasan dalam step (e) adalah dilakukan pada temperatur 70°C -90°C hingga terbentuk pasta.

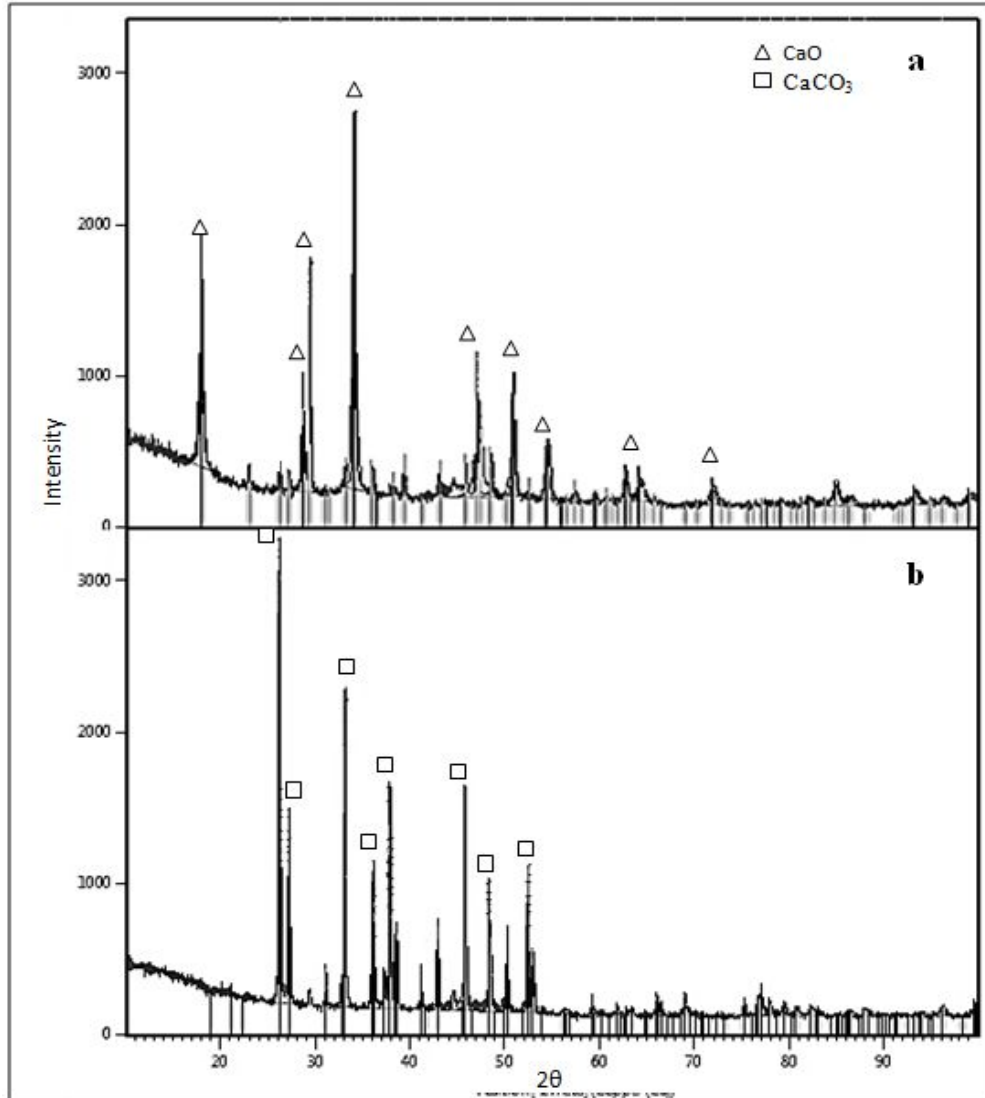


## Abstrak

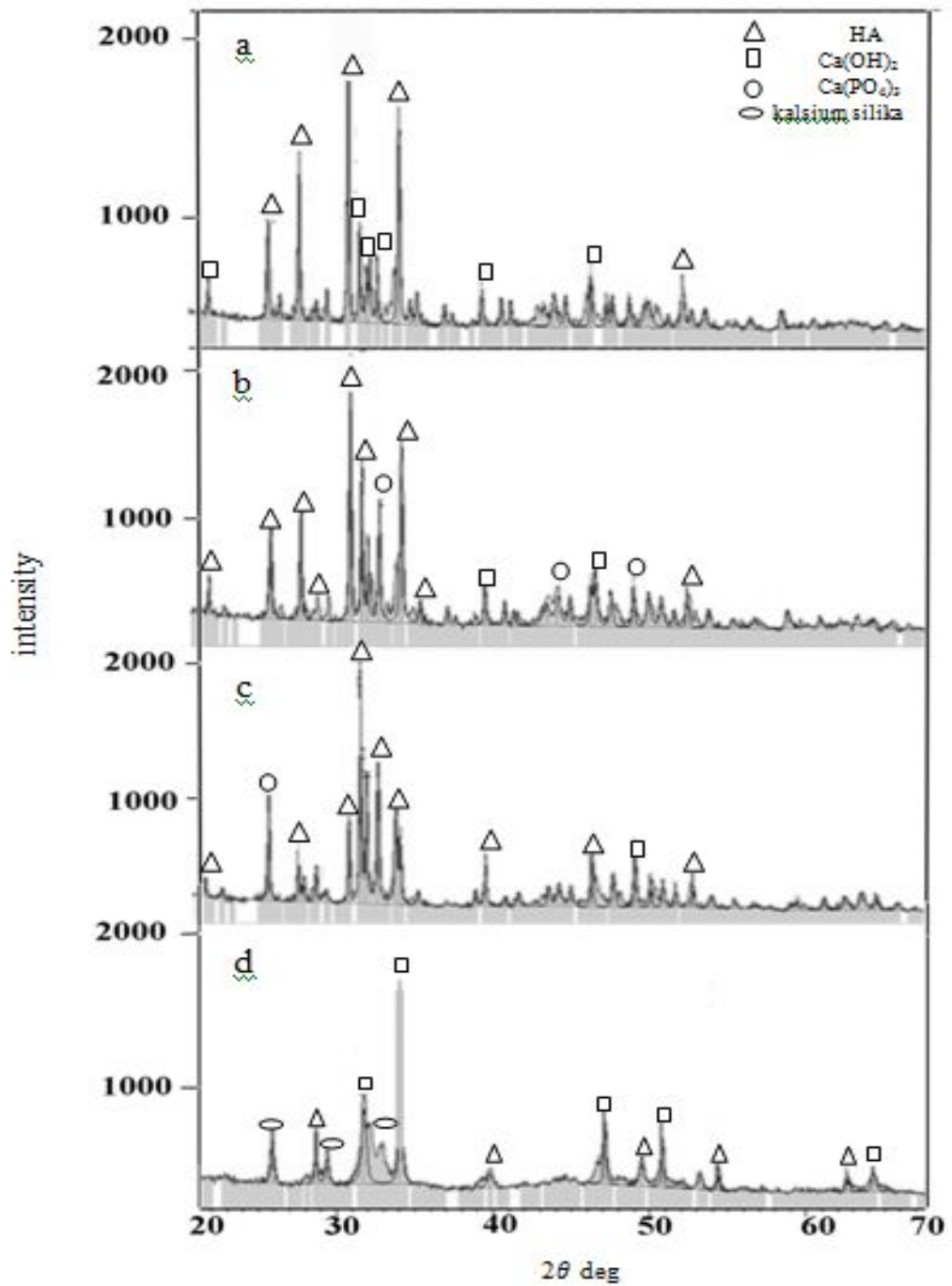
### **METODE PRODUKSI HIDROKSIAPATIT DARI KULIT KERANG DARAH MENGUNAKAN CARA HIDROTHERMAL SUHU RENDAH**

Serbuk hidroksiapatit telah berhasil dibuat dengan metode hidrotermal suhu rendah menggunakan bahan baku kulit kerang darah. Proses diawali dengan cara mencampurkan CaO dari kulit kerang, ammonium dihidrogen fosfat dengan perbandingan rasio Ca/P tertentu serta aquades sebanyak 600 mL. Campuran tersebut dipanaskan pada suhu 70-90°C sambil diaduk dengan kecepatan tertentu. Hasil sintesis berupa *slurry*, selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 120°C selama 15 jam. Sampel kering selanjutnya dihancurkan hingga halus dan dikalsinasi pada suhu 700-900°C dengan laju pemanasan 10°C/menit selama 1 jam. Serbuk hidroksiapatit hasil sintesis yang telah dikalsinasi selanjutnya diuji menggunakan XRD, FTIR dan SEM. Ukuran diameter kristal hidroksiapatit yang diperoleh dengan variasi suhu reaksi 70 °C, 80 °C dan 90 °C pada kecepatan pengadukan 300 rpm adalah 63,43 nm, 52,85 nm dan 52,48 nm.

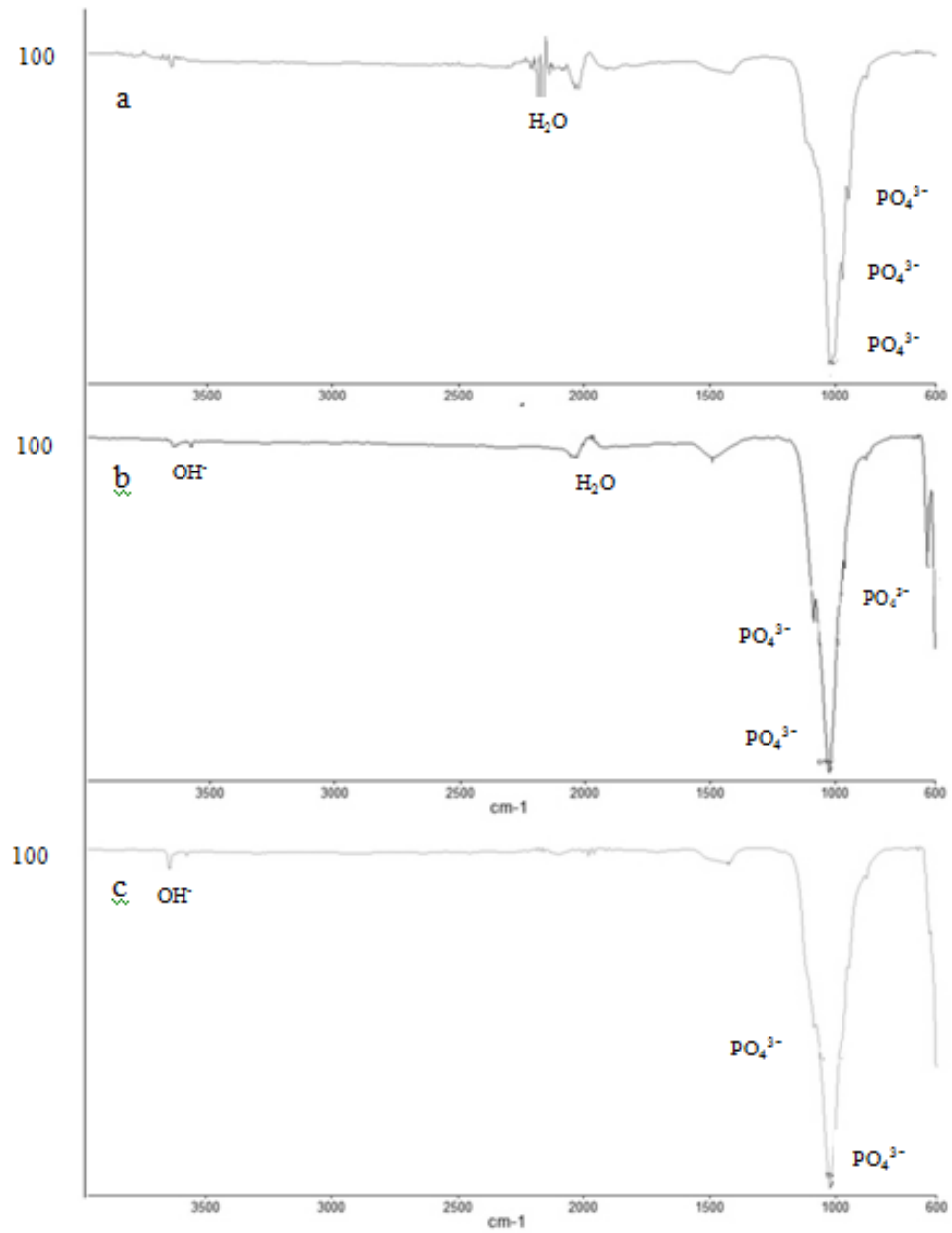
Gambar 1.



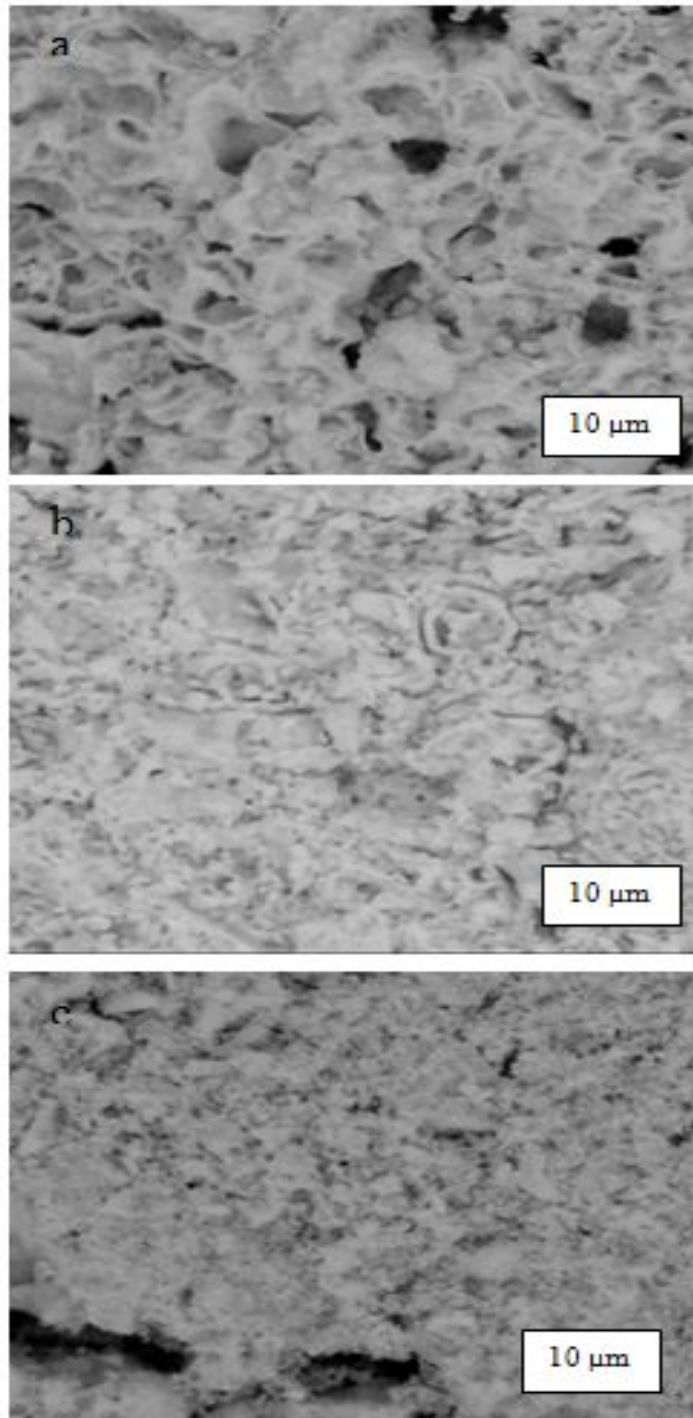
Gambar 2.



Gambar 3.



Gambar 4.



**Publikasi**

*Presented at*

**International Conference on Ocean, Mechanical and Aerospace for  
Scientists and Engineers 2014 (OMAse-2014)  
19 – 20 November 2014  
Pekanbaru, Indonesia**

# Hydroxyapatite Powder Prepared by Low Temperature Hydrothermal Method from Sea Shells

Ahmad Fadli\*, Fajril Akbar, Pancasila Putri, Dewi Indah Pratiwi and Ikhbal Muhara

Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, University of Riau  
Kampus Binawidya Jl. HR Subrantas Km. 12,5 Pekanbaru 28293 Riau Indonesia

\*Corresponding author: fadliunri@yahoo.com

## Paper History

Received:

Received in revised form:

Accepted:

## ABSTRACT

Hydroxyapatite is bioceramics that widely used in the medical world especially for bone implant and cell culture. Hydroxyapatite was synthesized by low temperature hydrothermal method which sea shells as derived CaO and  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  with Ca/P ratio of 0.67, 1.67, 2.67 were heated at 70°C, 80°C, 90°C and stirred at 300 rpm. The obtained paste was dried and then the powder calcined in the temperature range of 700°C - 1000°C. In order to study the morphology and structural characteristics, XRD and SEM were used to estimate the particle size of the powder. FTIR was used to identify organic or inorganic chemicals for estimating the number of components of an unknown mixture. The crystal diameter of hydroxyapatite increased with Ca/P ratio and reaction temperature. Majority hydroxyapatite phase was obtained at Ca/P ratio of 2.67 and 90°C reaction temperature.

**KEY WORDS:** *Hydroxiapatite, hydrothermal, powder, characterization*

## 1.0 INTRODUCTION

Hydroxyapatite (HAP) is the main mineral constituent of teeth and bones [1]. Because of biocompatibility, bioactivity, low solubility in water and ability to replace toxic ions, HAP ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) are widely used in biomaterials [2, 3]. Therefore, multiple techniques has been used for preparation of

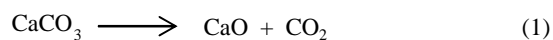
HAP, including precipitation [4], mechanochemical [5, 6], and hydrothermal [7, 8].

As proposed by Alqap and Sopyan [9], low temperature hydrothermal method provides advantages in comparison other methods due the stable phase of HAP. It poses more convenient method for synthesis HAP with low temperature hydrothermal method than hydrothermal method because it has no need for high temperatures when forming the HAP powder, thus lowering energy costs [10]. It is also more convenient than mechanochemical procedure since low temperature hydrothermal method presents an aqueous phase that is not available in the mechanochemical method. This aqueous phase can accelerate kinetic processes that commonly limit the rate of reaction, such as dissolution, diffusion, adsorption, reaction, and crystallization [11]. The low temperature hydrothermal method also offers variability in particle size by changing the controlled variables such as temperature, pH, rate of stirring, and amount of reactants or Ca/P ratio.

## 2.0 EXPERIMENTAL

### 2.1 Materials Preparation

The starting materials in this experiment were ammonium dihydrogen phosphate ( $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ) (Merck, Germany) and sea shell (*Anandara Granosa*) from Pekanbaru local market. Initially, sea shell were cleaned and dried at ambient temperature for 24 hours. Subsequently, dried sea shell was crushed and sieved using a 100-mesh sieve. Sea shells powder were calcinated at 1000°C for 24 hours to changed  $\text{CaCO}_3$  to CaO, by these following reaction:



### 2.2 Synthesis of Hydroxyapatite Powder

For the preparation of the solution, CaO and  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$  was dropwise in 600 mL distilled water with Ca/P ratio of 0.67, 1.67 and 2.67. The suspension was heated at 70°C, 80°C, 90°C while



stirred at 300 rpm until paste was obtained. Then the paste was dried at 120°C for 15 hours and crushed until powder form. The prepared powders were then calcined in furnace at 900°C. A heating rate of 5°C min<sup>-1</sup> was applied until the required temperature was reached and then the heating was continued for 1 hour. Variables in this work were Ca/P ratio (0.67, 1.67 and 2.67) and reaction temperatures (70°C, 80°C and 90°C).

### 2.3 Characterization

The crystal and phase structures of the samples were identified using a X-ray diffractometer (XRD) with CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ ) incident radiation over the  $2\theta$  range of 20-60° at room temperature. Moreover, the isolate peaks assigned to (002), (112), and (300) planes were used to estimate the crystallite size (D) of HAP phases, respectively, using the well-known Scherrer's formula as followed [12]:

$$D = \frac{k\lambda}{\beta \times \cos\theta} \quad (2)$$

Where k is a shape factor equal to 0.9,  $\lambda$  is the X-ray wave length,  $\beta$  is the full-width at half-maximum (in radians), and  $\theta$  is the diffraction angle related to the diffraction peak under consideration.

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was used for identification of functional groups present in the HAP powder. The morphology and size of the nanoparticles were studied using scanning electron microscopy (SEM)

## 3.0 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 FTIR Spectra

FTIR spectroscopy analysis was also used in this study. FTIR identify the functional groups in the sample. Functional groups that are identified in the FTIR analysis, among others  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  in the range 4000 to 600  $\text{cm}^{-1}$  as shown in Figure 1. According Alqap and Sopyan [9] group  $\text{PO}_4$  bands appear at wavelengths from 1100 to 1019, 958, 962 and 605  $\text{cm}^{-1}$  in addition to that. In 0.67 Ca/P ratio sample  $\text{PO}_4^{3-}$  ribbon appears at a wavelength of 953, 1027, and 1067  $\text{cm}^{-1}$ . In 1.67 Ca/P ratio sample appears at a wavelength of 962, 1087, 1023  $\text{cm}^{-1}$ , whereas in 2.67 Ca/P ratio sample at wavelengths of 963, 1024, and 1086  $\text{cm}^{-1}$  as shown in Figure 1.

In addition  $\text{PO}_4^{3-}$  group, there are  $\text{OH}^-$  ion appears by FTIR analysis of the samples. Where  $\text{OH}^-$  ion occurs at a wavelength of 3700 - 2500, 630, and 667  $\text{cm}^{-1}$ . In 0.67 Ca/P ratio sample  $\text{OH}^-$  group appears at a wavelength of 683 and 612  $\text{cm}^{-1}$ . In 1.67 Ca/P ratio sample appears at wavelengths 3572, 3642, 628  $\text{cm}^{-1}$ , where as in 2.67 Ca/P ratio sample at a wavelength of 3643 and 630  $\text{cm}^{-1}$ . Then there  $\text{HPO}_4^{2-}$  group contained at wavelengths 1308 and 1260  $\text{cm}^{-1}$  in 0.67 Ca/P ratio sample. Figure 1 also shows clusters at wavelengths 788 and 710  $\text{cm}^{-1}$  which is based on research Alqap and Sopyan [9] at the around that wavelength the functional group that appears was a group of  $\text{P}_2\text{O}_7$ . This proves the presence of calcium pyrophosphate phase.

The results obtained spectrum for each researcher of HAP is different but still in the adjacent values. The results show that there is another group of compounds that should not exist in a pure hydroxyapatite. Figure 2 shows the FTIR spectrum of

synthesized hydroxyapatite with variations in temperature 70°C, 80°C and 90°C. The measurement results of hydroxyapatite synthesized using hydrothermal method with temperature at 70°C using FTIR analysis shown in Figure 2.

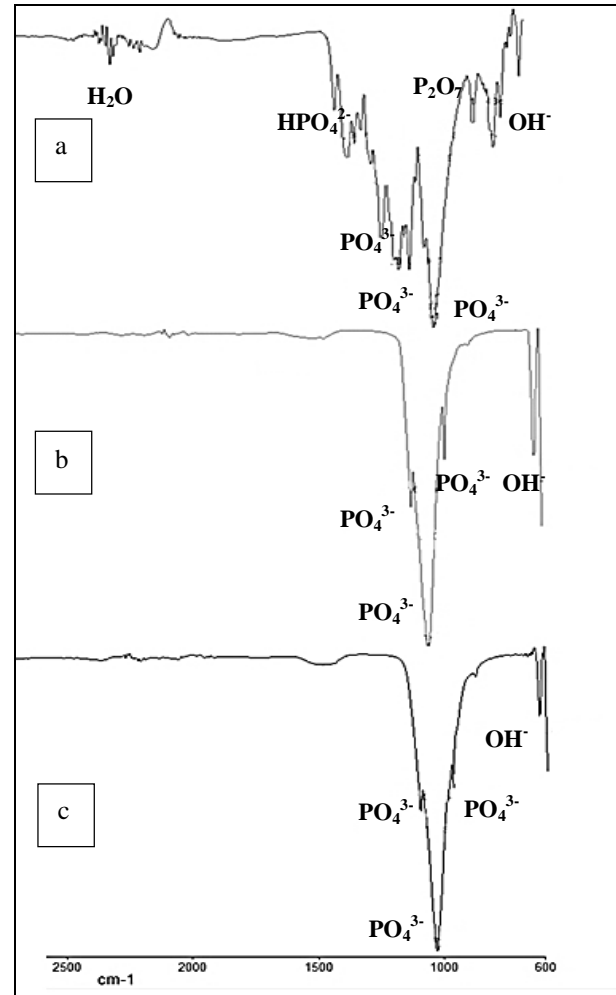


Figure 1 : FTIR spectra of HAP prepared for Ca/P ratio of (a) 0.67 (b) 1.67 and (c) 2.67

Phosphate groups ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) asymmetric stretching vibration synthesized detected at wave number 1019  $\text{cm}^{-1}$  which indicates that the crystals formed in the synthesis results. In addition, the hydroxyapatite visible spectrum characteristic absorption band around 2021  $\text{cm}^{-1}$ , 2167  $\text{cm}^{-1}$  and 2182  $\text{cm}^{-1}$ . An increase in the intensity of the band 2250-2000  $\text{cm}^{-1}$  which is a band of  $\text{H}_2\text{O}$  on the surface because the surface absorbs water samples HAP. This is possible because the sample storage techniques unfavorable silica gel which does not include the storage time or may also be due to HAP produced from the calcination process becomes more hygroscopic due to the higher calcination temperature. The measurement results of hydroxyapatite synthesized using low temperature hydrothermal method with 2.67 Ca/P ratio using FTIR analysis shown in Figure 2. Phosphate groups ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) asymmetric stretching vibration synthesized detected at wave number 1024  $\text{cm}^{-1}$  and 1085  $\text{cm}^{-1}$  which indicates that the crystals formed in the synthesis results. In





addition, the hydroxyapatite visible spectrum characteristic of the OH<sup>-</sup> absorption band around 3642 cm<sup>-1</sup>. This can happen because the HAP powder is hygroscopic, thus precipitating the hydration of the air. OH<sup>-</sup> group at 3642 cm<sup>-1</sup> region is called water absorption. Ribbon uptake carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) synthesis were also detected at wave number 1423 cm<sup>-1</sup> which is the asymmetric stretching vibration absorption band is weak with no form of symmetry.

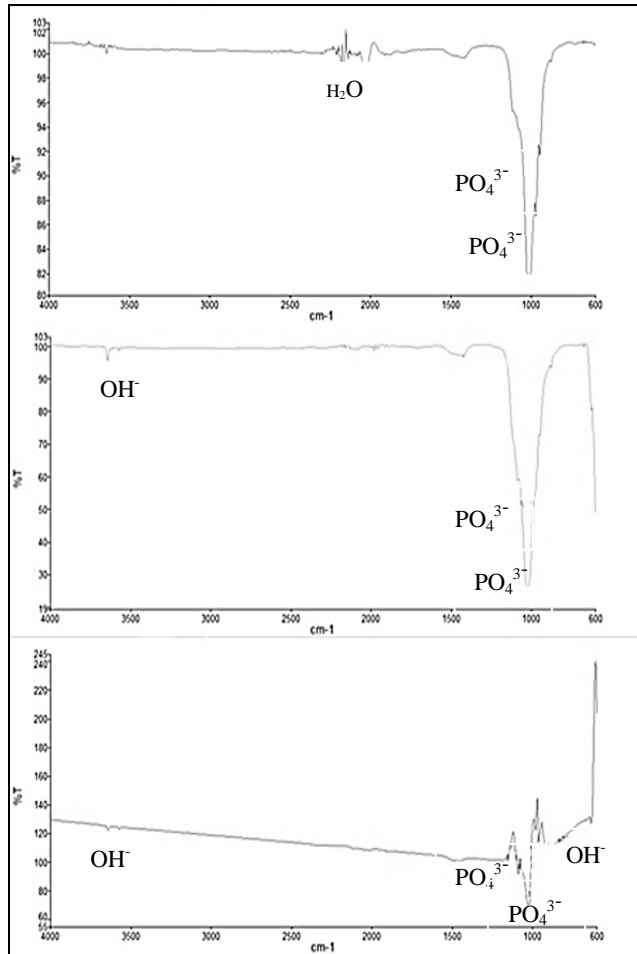


Figure 2 : FTIR spectra of HAP prepared at reaction temperature of (a) 70°C (b) 80°C and (c) 90°C

The measurement results of hydroxyapatite synthesized using hydrothermal method with low temperature of 90°C using FTIR analysis shown in Figure 2. Phosphate groups (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) asymmetric stretching vibration synthesized detected at wave number 1025 cm<sup>-1</sup> and 1241 cm<sup>-1</sup> which indicates that the crystals formed in the synthesis results. Ribbon phosphate present in the spectrum of commercial hydroxyapatite as a small band at wave number 878 cm<sup>-1</sup>, 961 cm<sup>-1</sup> and 981 cm<sup>-1</sup>. In addition, the hydroxyapatite visible spectrum characteristic of the OH<sup>-</sup> absorption band around 3641 cm<sup>-1</sup> and 636 cm<sup>-1</sup>. This can happen because the HAP powder is hygroscopic, thus precipitating the hydration of the air. OH<sup>-</sup> group at 3641 cm<sup>-1</sup> region is called water absorption, whereas the OH groups were detected around the wave number of 636 cm<sup>-1</sup> is an illustration of the water

absorption. Carbonate absorption band (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) synthesis were also detected at wave number 1463 cm<sup>-1</sup> which is the asymmetric stretching vibration absorption band is weak with no form of symmetry.

### 3.2 X-ray Analysis

From the results of XRD analysis, it is found that a change in the intensity of the peak from diffractogram. The results of XRD analysis as shown in Figure 3 where for each sample shows the majority present of peaks are hydroxyapatite. Peak of the hydroxyapatite 0.67 Ca/P ratio sample at 2θ 25.853°, 31.719° and 32.847° with hkl (002), (211) and (300). In the 1.67 Ca/P ratio sample at 2θ 25.853°, 31.740°, and 32.857° with hkl (002), (211) and (300). And on the 2.67 Ca/P ratio sample at 2θ 25.879°, 31.739°, and 32.865° with hkl (002), (211) and (300). Where in the peak hkl values are similar to pattern characterization results of XRD analysis from JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) with PDF Card No. 09-432. In addition, from the data base of results obtained XRD analysis of crystal crystal diameter each sample based on the Scherrer equation, where the crystal diameter grew along with the increasing ratio of Ca/P and temperature is shown in table 1.

Table 1: The average crystallite size of the samples

Ca/P ratio	Reaction temperature (°C)	Crystal diameter (nm)
0.67	90	54.38
1.67	90	52.37
2.67	90	52.32
2.67	70	63.43
2.67	80	55.85
2.67	90	52.48

Based on the analysis of XRD peaks can also be seen other than hydroxyapatite on samples where each sample contains phases as shown in Table 2. In samples with a ratio of 0.67 there is a phase other than the phase composition of hydroxyapatite, the calcium pyrophosphate. The calcium pyrophosphate compound formed by calcium hydroxide derived from the mixing of CaO with water reacts with phosphoric acid, resulting in a calcium dihydrogen phosphate as the following equation:



Then calcium dihydrogen phosphate reacts with ammonia to produce monetite (CaHPO<sub>4</sub>) or dicalcium phosphate anhydrous (DCPA) as shown in the following reaction:



Table 2: Phase contained in different Ca/P ratio samples

Ca/P ratio	Mineral phase
0.67	Hydroxiapatite, Calcium phosphate
1.67	Hydroxiapatite, Tricalcium phosphate
2.67	Hydroxiapatite, Calcium hydroxide

Where monetite (DCPA) is what causes the formation of calcium pyrophosphate. Monetite (DCPA) decomposes into calcium pyrophosphate at a temperature of 700-900°C, this was also a study done by Alqap and Sopyan [9].

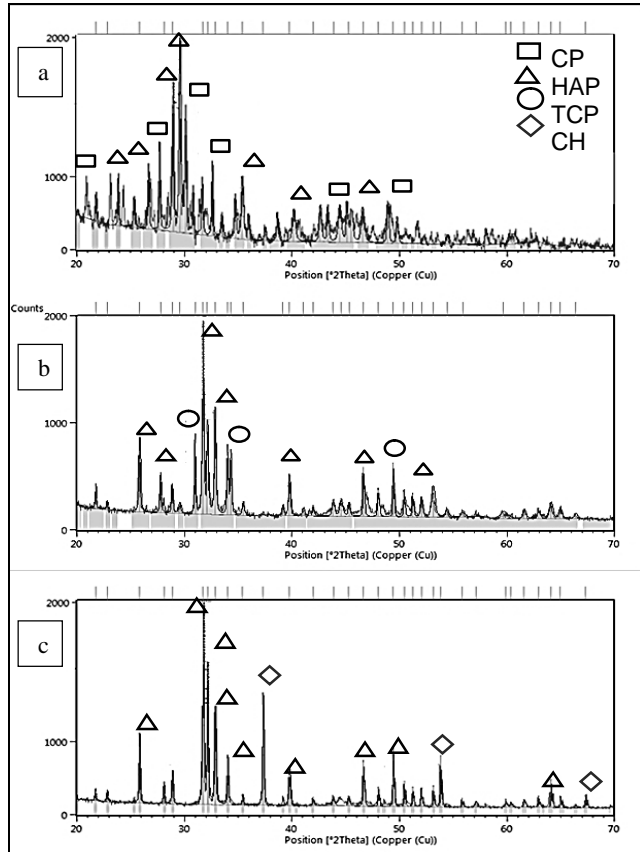
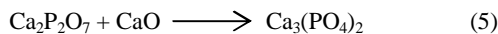
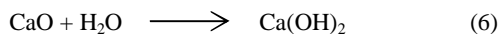


Figure 3 : XRD patterns of HAP at Ca/P ratio of (a) 0,67 (b) 1,67 and (c) 2,67

In samples with a ratio of 1.67 Ca/P phase composition consisting of hydroxyapatite, and tricalcium phosphate. The formation of tricalcium phosphate in 0.67 Ca/P sample is influenced by the ratio of Ca/P in which the ratio of Ca/P is smaller than tricalcium phosphate hydroxyapatite, it is also consistent with studies conducted by Zhang and Darvell [13] where tricalcium phosphate formed in the mass ratio of Ca/P 1.67. Also according Alqap and Sopyan [9] CaO were still present in the sample can cause the formation of tricalcium phosphate and calcium pyrophosphate react like the following reaction:



While the 2.67 Ca/P sample phase composition was consisting of hydroxyapatite and calcium hydroxide. Where calcium hydroxide CaO derived from mixing with water following reaction:



### 3.2 Morphology Sample

From the results of SEM morphology appears apatite crystals that gather several compounds that appear larger with a smooth and uniform grain [14]. Samples with higher heating temperatures produce crystals with a purity higher than samples with lower heating temperatures. Because of the high temperature heating will make the process of better particles growth [15].

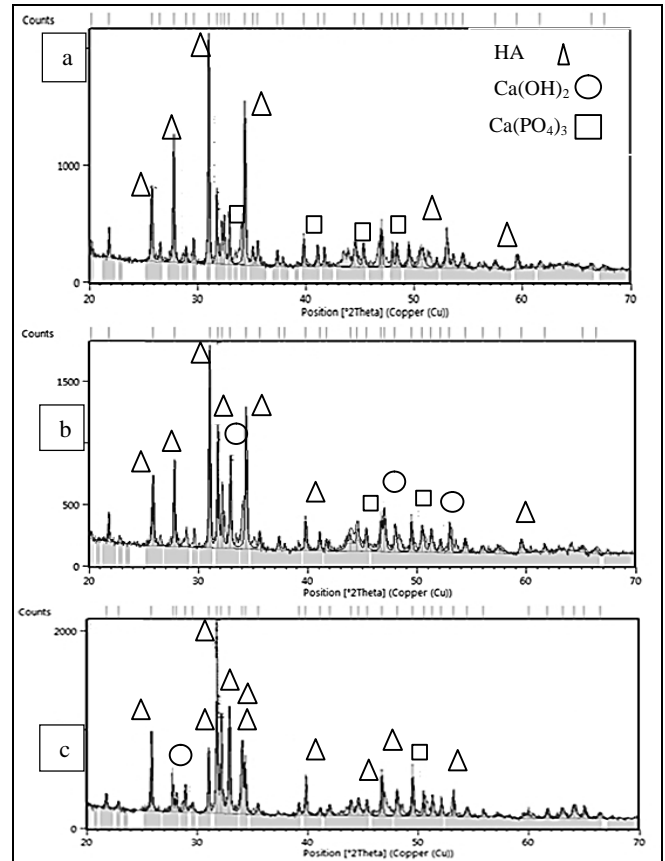


Figure 4 : FTIR spectra of HAP at reaction temperature of (a) 70°C (b) 80°C and (c) 90°C

The sample has a monoclinic and hexagonal crystalline structure. A monoclinic crystalline structure that has an axis that is tilted from its three axes. A axis perpendicular to the axis b; b perpendicular to c, but not c-axis perpendicular to the axis a. All three axes are unequal in length, generally the longest c axis and the shortest axis b. While a hexagonal crystalline structure that has 4 axes of symmetry with the symmetry axis lies in the 3 1 field, which is horizontal. The third axis of symmetry makes an angle of 60° between the horizontal axis and the fourth axis is the vertical axis is cut perpendicular to the axis of symmetry horizontal third. The fourth axis is usually longer than the third horizontal axis. Results of SEM for the results of the synthesis of hydroxyapatite with reaction temperature of 70°C, 80°C and 90°C is shown in Figure 5.

Samples with the SEM observation results using 7500x magnification can be seen in Figure 5. The results of observation samples with reaction temperature of 70°C, 80°C and 90°C (Figure 5) looks like a group of small dense particles. Grain size

of the 90°C reaction temperature sample looks smaller than the 70°C and 80°C samples. This is reinforced by the results of the calculation of the size of the crystals from the XRD pattern. Defined as an individual crystal grains. The size of the crystal sample is 63.43 nm where as 70°C reaction temperature sample, 80°C and 90°C samples are 52.85 nm and 52.48 nm. The increase in temperature resulted in an increased thermal vibration energy, which then accelerates the diffusion of atoms through the grain boundaries, small droplets into larger ones. From Figure 5 it can be seen that the distance between the particles are initially very tight show tenuous when the heating temperature is lower.

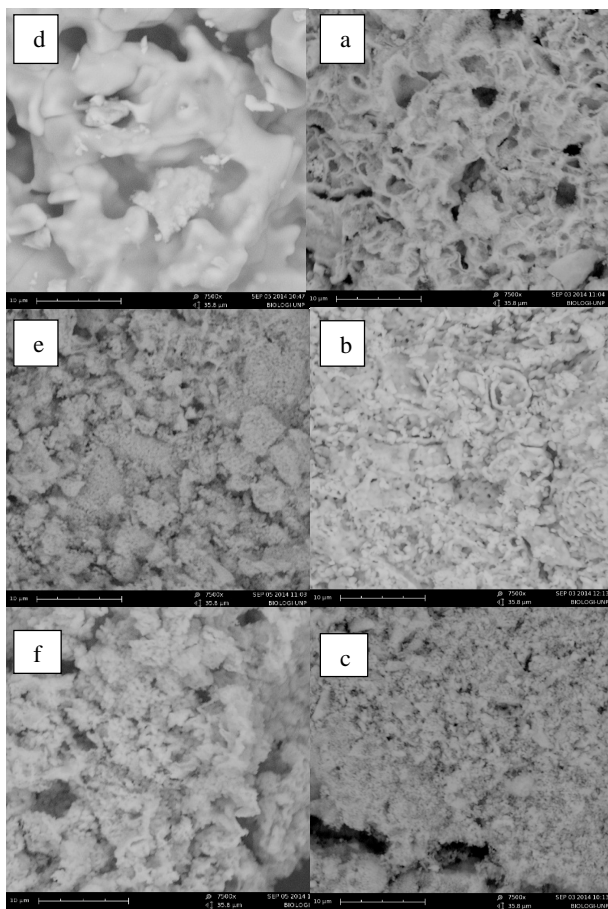


Figure 5: SEM results for sample with reaction temperature of (a) 70°C (b) 80°C, (c) 90°C and Ca/P ratio of (a) 0,67 (e) 1,67 (f) 2,67

Figure 5 shows the results of the samples with variation of the ratio Ca/P. In sample with the Ca/P ratio of 0.67 is shown in Figure 5 d has a larger size than the other samples (1.67 and 2.67 Ca/P ratio samples), this is caused by the presence of some other apatite compounds contained in the sample as has been seen in the results of XRD and FTIR analysis. SEM results also showed that the synthesis of the ratio of Ca/P of 0.67 in both immature hydroxyapatite. SEM result for sample with the ratio Ca/P of 1.67 is shown in Figure 5 e. From the results of SEM photograph looks morphology with finer grains. It is also caused by the presence of other compounds such as tricalcium phosphate apatite were also

seen in the results of XRD analysis. For sample with the ratio Ca/P of 2.67 is shown in Figure 5 f. From the results of SEM morphology of the grains appear smoother and more uniform compare to 0.67 and 1.67 Ca/P ratio samples. In accordance with the X-ray diffraction pattern showed that the synthesis of the ratio of 2.67 Ca/P ratio produce hydroxyapatite peaks more than 0.67 and 1.67 Ca/P ratio samples.

#### 4.0 CONCLUSION

Effect of Ca/P ratio and reaction temperature on chemical properties of hydroxyapatite powder from sea shell using low temperature hydrothermal method has been presented the paper. The crystal diameter of HAP at Ca/P ratio of 0.67, 1.67 and 2.67 were 53.38, 52.37 and 52.32 respectively. HAP phase at Ca/P ratio of 2.67 and 90°C temperature reaction was found predominant.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to convey a great appreciation to DIKTI for supporting this research through Hibah Kompetensi 2014..

#### REFERENCE

- Gosain, A. K., & Persing, J. A. (1999). Biomaterials in The Face: Benefits and Risks. *Journal of Craniofacial Surgical* 10: 404-14.
- Kuo, T. C., Lee B. S., Kang, S. H., Lin, F. H., & Lin, C. P. (2007). Cytotoxicity of DP-bioglass paste used for treatment of dentin hypersensitivity. *Journal of Endodontics* 33: 451-454.
- Hench, L. L. (1991). Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of The American Ceramic Society* 74: 1487-510
- Mobasherpur, I., Heshajin, M. S., Kazemzadeh, A., & Zakeri, M. (2007). Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. *Journal of Alloys and Compounds* 430(1-2): 330-333.
- Fahami A., Ebrahimi-Kahrizsangi R., & Nasiri-Tabrizi, B. (2011). Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite/titanium nanocomposite. *Solid State Sciences* 13: 135-141.
- Rhee, S.-H. (2002). Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment. *Biomaterials* 23(4): 1147-1152.
- Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.-T., & Jamshidi, A. (2012). Hydrothermal processing of hydroxyapatite nanoparticles—a taguchi experimental design approach. *Journal of Crystal Growth* 361: 73-84.
- Zhang, X., & Vecchio, K. S. (2006). Creation of dense hydroxyapatite (synthetic bone) by hydrothermal conversion of seashells. *Materials Science and Engineering C* 26: 1445-1450
- Alqap A. S. F., & Sopyan, I. (2009). Low temperature hydrothermal synthesis of calcium phosphate ceramics: effect of excess Ca precursor on phase behaviour. *Indian Journal of Chemistry* 48: 1492-1500.
- Sadat-Shojai, M., Atai, M. & Nodehi, A. (2011). Design of experiments (DOE) for the optimization of hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanoparticles. *Journal of Brazilian Chemical* 22: 571-582.
- Zhang, X., Vecchio, K. S., Massie J. B., Wang m., & Kim, C. W. (2007). Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implants. *Acta Biomaterialia* 3:



910-918.

12. Sopyan, I., Mel, M., Ramesh, S., & Khalid, K. A. (2007). Porous hydroxyapatite for artificial bone applications. *Science and Technology of Advanced Materials* 8: 116-123
13. Zhang, H., & Darvell, B. W. (2011). Morphology and structural characteristics of hydroxyapatite whiskers: effect of the initial Ca concentration, Ca/P ratio and pH. *Acta Biomaterialia* 7: 2960-2968.
14. Wu, S.-C., Tsou, H.-K., Hsu, H.-C., & Liou, S.-P. (2013). A hydrothermal synthesis of eggshell and fruit waste extract to produce nanosized hydroxyapatite. *Ceramics International* 39: 8183-8188.
15. Moore, W. R., Graves, S. E. & Bain, G. I. 2001. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ Journal of Surgery* 71: 354-361.

