

**PENGARUH PENAMBAHAN HIDROKSIAPATIT KITOSAN PADA KEKERASAAN
PERMUKAAN KOMPOSIT RESIN NANOHYBRID**

Muhammad Chair Effendi¹, Areta Padmarini¹

¹Departemen Ilmu Kedokteran Gigi Anak, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Brawijaya,
Korespondensi: Muhammad Chair Effendi, Email: chair.fk@ub.ac.id

Abstrak

Latar belakang: Hidroksiapatit kitosan (HA/Cs) memiliki komposisi dan struktur kristal apatit yang menyerupai jaringan keras manusia seperti struktur gigi dan tulang. Hidroksiapatit kitosan (HA/Cs) mempunyai kelebihan dan sering digunakan sebagai restorasi gigi karena ketahanan abrasi yang lebih baik. **Objektif:** Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbedaan kekerasan resin komposit nanohybrid dengan resin komposit nanohybrid setelah penambahan HA/Cs. **Metode:** Sampel dikelompokkan menjadi 4 kelompok berbeda yaitu kelompok kontrol resin komposit nanohybrid, dan kelompok resin komposit nanohybrid dengan penambahan kitosan masing-masing sebesar 3%, 5%, dan 7% yang kemudian diuji dengan Vickers Microhardness Tester. Sampel juga diuji dengan XRD untuk melihat karakterisasi partikel kristal dan SEM-EDX untuk melihat morfologi sampel dan mengidentifikasi unsur yang terkandung. **Hasil:** Hasil uji SEM menunjukkan ukuran rata-rata morfologi komposit nanohybrid HA/Cs adalah 1 μm , sedangkan hasil EDX rata-rata rasio Ca/P pada resin komposit nanohybrid dengan penambahan kitosan hidroksiapatit adalah 2,53. Analisis data menggunakan uji One Way Anova menunjukkan nilai signifikansi $p < 0.01$, sehingga terdapat perbedaan kekerasan permukaan pada kelompok kontrol yang memiliki nilai 63,70 HV dan kelompok perlakuan dengan penambahan HA/Cs sebanyak 3%, 5%, dan 7% yang memiliki nilai pada kelompok perlakuan berturut-turut adalah 78,15 HV, 80,9 HV dan 83,57 HV. **Kesimpulan:** Penambahan HA/Cs pada bahan restorasi gigi komposit nanohybrid dapat meningkatkan kekerasan permukaan bahan.

Kata kunci: hidroksiapatit kitosan, komposit nanohybrid, komposit nanohybrid kitosan, kekerasan permukaan

**ADDITIONAL HYDROXYAPATITE CHITOSAN EFFECT ON SURFACE HARDNESS OF
NANOHYBRID RESIN COMPOSITES**

Abstract

Background: Hydroxyapatite chitosan (HA/Cs) has a composition and crystal structure of apatite that resembles human hard tissue such as the structure of teeth and bones. Chitosan hydroxyapatite (HA/Cs) has advantages and is often used as a dental restoration because of its better abrasion resistance. **Objective:** The purpose of this study was to determine the difference between the hardness of the nanohybrid composite resin and the nanohybrid composite resin after the addition of HA/Cs. **Methods:** The samples were grouped into 4 different groups, namely the control group for the nanohybrid composite resin, and the nanohybrid composite resin group with the addition of 3%, 5%, and 7% chitosan, respectively, which were then tested with the Vickers Microhardness Tester. The samples were also tested with XRD to see the characterization of crystalline particles and SEM-EDX to see the morphology of the samples and identify the elements contained. **Results:** The results of the SEM test showed that the average morphology of the HA/Cs nanohybrid composite was 1 μm , while the average EDX results for the Ca/P ratio of the nanohybrid composite resin with the addition of chitosan hydroxyapatite was 2.53. Data analysis using the One Way Anova test showed a significance value of $p < 0.01$, so that there were differences in surface hardness in the control group which had a value of 63.70 HV and the treatment group with the addition of HA/Cs as much as 3%, 5%, and 7% which had a value of 3%, 5%, and 7%. in the treatment group were 78.15 HV, 80.9 HV and 83.57 HV, respectively. **Conclusion:** The addition of HA/Cs to nanohybrid composite dental restorative materials can increase the surface hardness of the material.

Keyword: Hydroxyapatite chitosan, composite nanohybrid, composite nanohybrid chitosan, surface hardness

PENDAHULUAN

Karies gigi pada gigi sulung atau permanen merupakan penyakit gigi yang sering ditemukan dan dapat dicegah. Karies gigi juga menyebabkan rasa nyeri dan hilangnya gigi.¹ Perawatan karies gigi salah satunya dengan restorasi gigi. Resin komposit adalah bahan restorasi gigi yang warnanya menyerupai gigi dan untuk meningkatkan estetika wajah serta relatif mudah dimanipulasi.^{2,3}

Resin komposit yang sering digunakan adalah komposit nanohybrid yang merupakan gabungan ukuran antara mikropartikel 0,1-2 μm dan dengan nanopartikel 100 nm (partikel heterogen).⁴

Proses iradiasi (proses polimerisasi light cure) selama proses filling perlu ketepatan untuk menghindari polimerisasi yang tidak sempurna dapat mempengaruhi kekerasan resin komposit dan dapat menimbulkan keretakan bahan sehingga tidak mampu menahan tekanan seperti pengunyahan dan menggigit serta lepasnya restorasi dari gigi.⁵

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ketahanan restorasi resin komposit sekitar 5 tahun dan tingkat keberhasilan 56,6%. Untuk mencegah terjadinya kegagalan faktor kekasaran dan kekerasan resin komposit merupakan faktor utama yang perlu diperhatikan.^{6,7}

Faktor kekerasan permukaan restorasi mempengaruhi ketahanan aus, yang dipengaruhi faktor mekanis seperti pada saat

makan dan menyikat gigi, Sedangkan yang mempengaruhi kekerasan resin komposit adalah sifat fisik dan kimia. Makanan dan minuman yang bersifat asam dapat menurunkan kekerasan bahan restorasi resin komposit.^{8,9,10}

Nanoteknologi di bidang kedokteran gigi telah menciptakan bahan nanofiller dengan ukuran partikel sangat kecil yang memiliki sifat mekanik yang menguntungkan dan salah satunya adalah nanokomposit. Nanokomposit organik-anorganik merupakan kombinasi antara biopolimer organik dan bahan anorganik yang memiliki sifat lebih baik dari masing-masing biopolimer organik dan anorganik itu sendiri.¹¹ Salah satu bahan nanokomposit berbasis polimer alam yang sedang dikembangkan adalah kitosan.¹²

Kitosan adalah polimer alam polikationik bersifat adsorpsi, biodegradable, biokompatibel, dapat membentuk film.¹³ Gugus amino yang terdapat pada kitosan sangat reaktif dan bersifat antibakteri.¹⁴ Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kekerasan permukaan komposit nanohybrid dibanding resin komposit nanohybrid setelah penambahan hidroksiapatit kitosan (HA/Cs).

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian adalah *true experimental laboratory* dengan *post test group design*. Jumlah sampel diperoleh menggunakan rumus Federer: $(t-1)(n-1) \geq 15$ (n = jumlah sampel masing-masing kelompok; t = jumlah kelompok penelitian) diperoleh 5

sampel masing-masing kelompok.¹⁵ Jumlah kelompok terdiri 1 (satu) kelompok kontrol resin komposit nanohybrid tanpa penambahan HA/Cs (0%), dan 3 (tiga) kelompok perlakuan dengan penambahan HA/Cs sebesar 3%, 5%, dan 7% sebagai filler pada resin komposit nanohybrid sehingga total 20 sampel penelitian. Pada saat uji Vickers 1 sampel rusak, sehingga sampel masing-masing kelompok menjadi 4 dan total sampel menjadi 16.

Pembuatan HA/Cs. Komposit Nanohybrid

Hidroksiapatit kitosan (HA/Cs produksi Lab Nanocenter Tangerang, Indonesia) dilarutkan ke dalam air panas secara perlahan sesuai dengan konsentrasi sampel perlakuan 3%, 5%, dan 7%. Pada sampel uji larutan digunakan perbandingan variasi massa sebanyak 0,2 gram, 0,4 gram, dan 0,6 gram. Setelah larut ditambahkan larutan polimer resin komposit nanohybrid (DX Universal, China). Kelompok perlakuan pertama adalah resin komposit nanohybrid 3,8 gram dicampur dengan 0,2 gram HA/Cs. Kelompok perlakuan kedua 3,6 gram resin komposit nanohybrid dicampur dengan 0,4 gram HA/Cs. Kelompok perlakuan ketiga resin komposit nanohybrid 3,4 gram dicampur dengan 0,6 gram HA/Cs. Masing-masing kelompok diaduk dengan pengaduk kecepatan konstan selama dua jam. Larutan kemudian disimpan dalam desikator agar gelembung udara hilang.

Pembuatan Sampel

Resin komposit dengan atau tanpa penambahan HA/Cs ditempatkan pada pelat

kaca yang telah dilapisi dengan seluloid strip. Ratakan bagian atas resin komposit menggunakan spatula semen. Resin komposit sehingga diperoleh ukuran tinggi 2 mm dan diameter 5 mm. Polimerisasi resin komposit dengan light curing LED dalam waktu 40 detik. Resin komposit yang telah dipolimerisasi kemudian ditempatkan dalam petridisk berdasarkan klasifikasinya yang dibedakan berdasarkan perbedaan konsentrasi HA/Cs, kemudian diukur kekerasannya menggunakan alat uji mikro Vickers.

Karakterisasi Nanokomposit Kitosan Hidroksiapatit

Karakterisasi dilakukan dengan X-Ray Diffraction (XRD) untuk mengetahui dan mengidentifikasi fasa kristal dari resin komposit nanohybrid, dan dicocokkan hasilnya dengan standar difraksi sinar-X di Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) untuk mengetahui dan mengidentifikasi fasa kristal yang ada di dalam bahan, dengan menentukan parameter struktur kisi dan ukuran partikel.¹⁶

Karakterisasi menggunakan energy dispersive X-ray spectroscopy (EDX) untuk mengetahui tentang komposisi unsur yang ada dalam sampel yaitu unsur Kalsium (Ca), Fosfat (P), dan Oksida (O). Scanning electron microscopes (SEM) digunakan untuk mempelajari morfologi dan topografi permukaan sampel. Pengamatan dengan EDX dan SEM dilakukan dengan perbesaran 5000, 10.000, 20.000 dan 30.000 kali untuk masing-masing sampel. Pada pengamatan EDX,

diamati yang terkandung pada masing-masing sampel.

Pengukuran Kekerasan Permukaan Resin Komposit Kitosan Hidroksiapatit Nanohibrida (Uji Kekerasan Permukaan)

Kekerasan permukaan komposit diuji menggunakan mesin Vickers Microhardness Tester. Pengujian kekerasan dilakukan dengan menggunakan alat Mitutoyo micro-Vickers, menggunakan gaya 0,05 N atau 50 gf (gram force) dengan waktu penetrasi 15 detik. Ketika uji kekerasan dilakukan dengan gaya 0,05 N, daerah lekukan berbentuk belah ketupat.

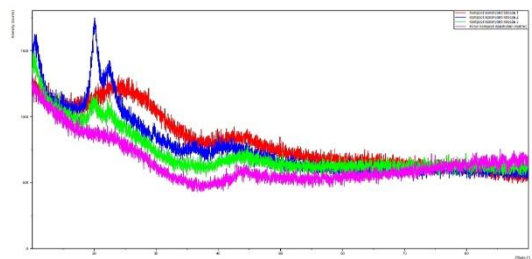
Setiap sampel diuji kekerasannya terhadap tiga titik lekukan pada tempat yang beda secara diagonal (Da, Db, Dc). Hasil dari tiga titik tersebut diambil rata-ratanya sebagai kekerasan permukaan resin.

Analisis data

Uji One-way Anova untuk melihat perbedaan kekerasan permukaan resin komposit antara kelompok perlakuan (3%, 5%, dan 7%) dengan kelompok kontrol (0%). Sebelumnya telah di uji normalitasnya dengan Saphiro Wilk dan uji homogenitas menggunakan Levene's Test. Kemudian dilakukan dilanjutkan dengan Tukey Post Uji Hoc untuk melihat signifikansi perbedaan masing-masing kelompok. Untuk mengetahui hubungan antara penambahan HA/Cs dengan kekerasan permukaan komposit nanohibrid dilakukan uji Korelasi Pearson dan Regresi Linier untuk memperkirakan penambahan HA/Cs sebagai bahan pengisi pada resin komposit nanohibrida.

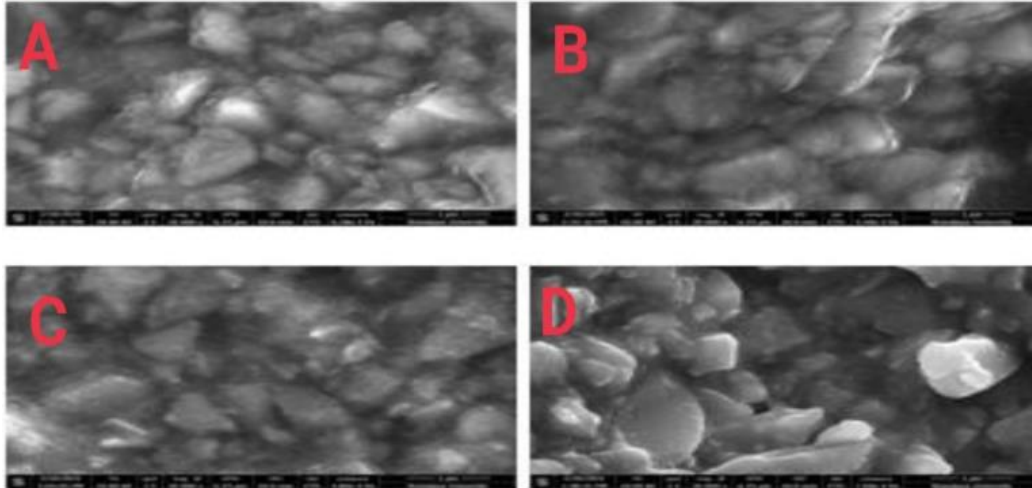
HASIL PENELITIAN

Berdasarkan hasil uji XRD pada gambar 1 didapatkan bahwa ketajaman puncak-puncak kristal HA pada sampel yang menunjukkan sampel memiliki kristalinitas yang cukup baik. Hasil yang terlihat pada citra SEM dengan perbesaran 20.000x, memiliki ukuran rata-rata morfologi komposit nanohybrid HA/Cs adalah 1 μm . Partikel berbentuk oval atau lonjong pada resin komposit nanohybrid HA/Cs yang saling mengisi antar ruang partikel (Gambar 2).

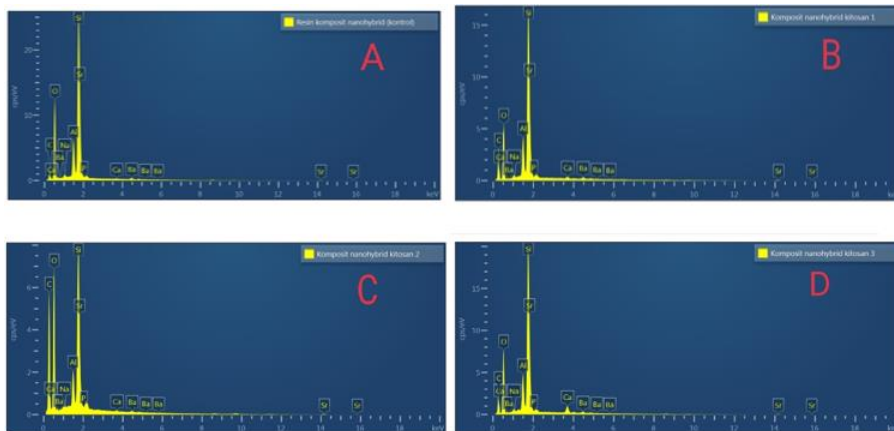


Gambar 1. Uji XRD pada empat sampel resin komposit nanohibrida hidroksiapatit kitosan

Hasil EDX rata-rata rasio Ca/P pada resin komposit nanohybrid dengan penambahan kitosan hidroksiapatit adalah 2,53, rasio Ca/P hidroksiapatit murni ideal 1,67. Hal ini bisa jadi karena larutan tersebut telah tercampur dengan material lain dalam komposit nanohybrid dan tidak lagi murni kitosan hidroksiapatit. Gambar 3 menunjukkan hasil uji EDX pada empat sampel resin komposit nanohibrida hidroksiapatit kitosan. Tabel 1 menunjukkan tiap elemen pada tiap sampel yang dihitung presentase tiap atomnya.



Gambar 2. Uji SEM pada empat sampel resin komposit nanohybrid kitosan hidroksiapatit dengan perbesaran 20.000x; a) HA/Cs 3%; b) HA/Cs 5%; c) HA/Cs 7%; d) HA/Cs 0%



Gambar 3. Uji EDX pada empat sampel resin komposit nanohibrida hidroksiapatit kitosan; a) HA/Cs 0%; b) HA/Cs 3%; c) HA/Cs 5%; d) HA/Cs 7%

Tabel 1. Uji EDX pada empat sampel resin komposit nanohybrid hidroksiapatit kitosan

Resin Komposit Nanohybrid 0%			Resin Komposit Nanohybrid 3%		
Elemen	Bobot %	% atom	Elemen	Bobot %	% atom
Ca	0,07	0,03	Ca	0,25	0,10
P	0,23	0,13	P	0,19	0,10
Resin Komposit Nanohybrid 5%			Resin Komposit Nanohybrid 7%		
Elemen	Bobot %	% atom	Elemen	Bobot %	% atom
Ca	0,07	0,02	Ca	1,12	0,47
P	0,10	0,05	P	0,20	0,11

Uji Vickers Microhardness Tester untuk mengetahui kekerasan permukaan resin

komposit nanohybrid dengan penambahan HA/Cs (kelompok perlakuan) dan tanpa

penambahan HA/Cs (kelompok kontrol). Rata-rata kekerasan permukaan pada kelompok kontrol (0%) adalah 63,70 HV, rata-rata kekerasan permukaan pada kelompok perlakuan (3%, 5%, dan 7%) adalah berturut-turut 78,15 HV, 80,90 HV, dan 83,57 HV (Tabel 2). Hasil uji One-Way Anova (Tabel 3), menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kekerasan permukaan pada resin komposit yang dihasilkan setelah penambahan kitosan

hidroksiapatit, dan hasil uji Post Hoc Tukey (Tabel 4) menunjukkan rata-rata kekerasan permukaan kelompok kontrol resin komposit nanohybrid (0%) dengan kelompok perlakuan resin komposit nanohybrid penambahan HA/Cs 3%, 5%, dan 7% bermakna ($p < 0,01$). Pada Uji Vickers menunjukkan bahwa kekerasan permukaan pada kelompok perlakuan lebih tinggi dibanding kelompok kontrol (Gambar 4).

Tabel 2. Nilai deskriptif kekerasan permukaan (Vickers)

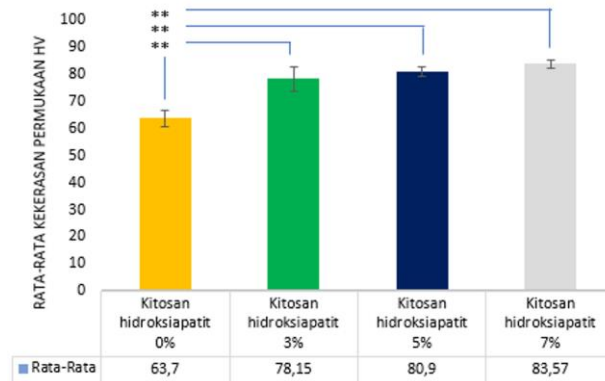
Kelompok	Mean	SD
Kitosan hidroksiapatit 0%	63.70	3.03
Kitosan hidroksiapatit 3%	78.15	4.48
Kitosan hidroksiapatit 5%	80.90	1.67
Kitosan hidroksiapatit 7%	83.57	1.62

Tabel 3. Hasil uji ANOVA

	Jumlah Kuadrat	df	Kuadrat Tengah	F	Sig.
Antar Kelompok	943.807	3	314.602	36.218	0.000
Dalam Kelompok	104.237	12	8.686		
Total	1048.044	15			

Tabel 4. Hasil uji Post Hoc Tukey

Kitosan hidroksiapatit	Sig
0%	3% 0.000
	5% 0.000
	7% 0.000
3%	5% 0.569
	7% 0.093
5%	7% 0.590



Gambar 4. Rata-rata kekerasan permukaan resin komposit nanohybrid dengan penambahan serbuk 0% - 7% HA/Cs; * $p < 0,01$

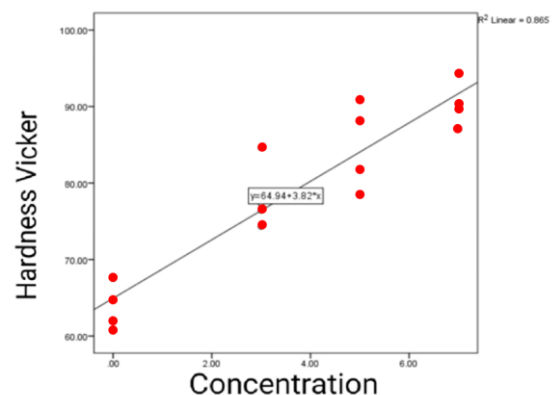
Uji korelasi Pearson diperoleh hasil bermakna ($p < 0,01$), terdaat hubungan positif antara konsentrasi HA/Cs dengan kekerasan permukaan resin komposit. Korelasi positif

menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi HA/Cs maka kekerasan permukaan resin komposit juga meningkat. Koefisien korelasi sangat kuat (Tabel 5).

Tabel 5. Hasil Uji Korelasi Pearson pada kelompok sampel resin komposit nanohybrid hidroksiapatit kitosan

Bahan Restorasi	Penambahan Hidroksiapatit (HA) Kitosan		
	HA 3%	HA 5%	HA 7%
Resin Komposit <i>Nanohybrid</i> tanpa HA (0%)	0.909 (sangat kuat) $p < 0.001$	0.971 (sangat kuat) $p < 0.001$	0.978 (sangat kuat) $p < 0.001$

Hasil uji Regresi Linier menunjukkan koefisien determinasi (Adj R Square) 0,856 atau 85,6%. Kontribusi penambahan konsentrasi hidroksiapatit kitosan (HA/Cs) meningkatkan kekerasan setelah uji Vickers adalah 85,6% sisanya 14,4% dipengaruhi variabel lain di luar penelitian ini. Perbedaan bermakna mulai dari konsentrasi 3% (Gambar 5).



Gambar 5. Grafik Hasil Uji Regresi Linier pada keempat sampel resin komposit nanohybrid HA/Cs

DISKUSI

Hasil uji XRD menunjukkan bahwa kristalinitas sampel resin komposit nanohybrid HA/Cs baik, dengan meningkatnya konsentrasi hidroksiapatit dalam sampel maka kristalinitas sampel juga meningkat. Selanjutnya dari hasil uji SEM terlihat morfologi resin komposit nanohybrid HA/Cs yang menunjukkan bahwa setiap partikel terdistribusi dengan baik dan mengisi ruang antar partikel yang dapat mempengaruhi kekuatan mekanik resin komposit. Hidroksiapatit terdiri dari Kalsium (Ca), Fosfat (P) dan Oksida (O).¹⁷

Hasil uji EDX menunjukkan bahwa rasio Ca/P adalah 2,53. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi puncak hidroksiapatit dan semakin banyak kristal yang terbentuk.¹⁸ Dengan semakin banyak kristal yang terbentuk maka sifat fisik material juga meningkat.

Diketahui bahwa rata-rata kekerasan permukaan resin komposit nanohybrid tanpa penambahan kitosan hidroksiapatit adalah 63,70 HV. Sedangkan kekerasan permukaan rata-rata komposit nanohybrid dengan penambahan kitosan hidroksiapatit 3%, 5%, dan 7% berturut-turut adalah 78,15 HV, 80,90 HV, dan 83,57 HV. Peningkatan efektif mulai terjadi dari penambahan HA/Cs sebesar 3%, 5%, dan 7% yang menunjukkan peningkatan kekerasan permukaan. Kekerasan permukaan resin komposit nanohybrid meningkat setelah penambahan hidroksiapatit (HA/Cs) disebabkan terjadinya ikatan antar partikel material nanokomposit yang mempunyai peran penting untuk memperbaiki sifat material.^{19,20} Salah satu faktor yang juga mempengaruhi perbedaan besarnya kekerasan permukaan

pada masing-masing kelompok perlakuan adalah karakteristik bioaktif, yaitu kemampuan membentuk ikatan kimia dengan jaringan di sekitar bahan yang merupakan hal penting dalam biomaterial, dimana sifat bioaktif partikel keramik dapat menempel pada matriks biodegradable polimer dengan kitosan yang merupakan biopolimer alami.^{21,22}

Apatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{Cl},\text{OH})$) adalah jenis kalsium fosfat untuk proses *bone healing* dan gigi yang memiliki sifat biocompatible, biodegradable, mempunyai komposisi sama dengan tulang asli, dan kemampuan mekaniknya baik. Sifat tersebut membuat apatit lebih baik dalam bidang rekayasa jaringan keras.²³

KESIMPULAN

Penambahan kitosan hidroksiapatit (HA/Cs) sebagai filler resin komposit nanohybrid meningkatkan kekerasan permukaan resin komposit nanohybrid secara bermakna ($p < 0,01$). Hasil uji korelasi menunjukkan korelasi positif, artinya semakin besar konsentrasi HA/Cs maka semakin tinggi rata-rata kekerasan permukaan resin komposit nanohybrid. Hasil uji regresi linier memprediksi pengaruh penambahan HA/Cs terhadap kekerasan permukaan resin komposit sebesar 85,6%.

PENGAKUAN

Terima kasih kepada staf Laboratorium Teknologi Hasil Pangan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya, staf

Laboratorium Teknik Mesin Politeknik Negeri Malang, Laboratorium Cipta Mikro Material dan Laboratorium Nanocenter di Tangerang.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yadav K, Prakash S. Dental caries: a review. *Asian J Biomed Pharm.* 2016; 6(53): 1–7.
2. Dhurohmah, Mujayanto R, Chumaeroh S. Pengaruh waktu pemolesan dan asam sitrat terhadap kebocoran mikro pada tambalan resin komposit nanofiller aktif Plight emitting diode–in vitro. *ODONTO Dent J.* 2014; 1(1): 11-5.
3. Sakaguchi R, Ferracane J, Powers J. *Craig’s Restorative Dental Materials.* 14th Ed. Philadelphia: Elsevier. 2018; 161-92.
4. Itanto BSH, Usman M, Margono A. 2017. Comparison of surface roughness of nanofilled and nanohybrid composite resins after polishing with a multi-step technique. *J Phys Conf Ser.* 2017; 884:1-7.
5. Anusavice KJ. *Philips Buku Ajar Ilmu Bahan Kedokteran Gigi.* 12th Ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2013; 275-300.
6. Velo MMDAC, Coelho LLBV, Basting RT, Amaral F, Franca FMG. Longevity of restorations in direct composite resin: literature review. *Rev Gaucha Odontol.* 2016; 64(3):320-326.
7. Aydin N, Topcu FT, Karaoglanoglu S, Oktay EA, Erdemir U. Effect of finishing and polishing systems on the surface roughness and color change of composite resins. *J Clin Exp Dent.* 2021; 13(5) :446-454.
8. Zimmer S, Kirchner G, Bizhang M, Benedix M. Influence of various acidic beverages on tooth erosion: evaluation by a new method. *PLoS One.* 2015; 10(6):1-8.
9. Powes J, Wahata J. *Dental Materials: Foundations and Applications.* Missouri: Modby Inc. 2015; 68-84.
10. Sitanggung P, Tambunan E, Wuisan J. Uji kekerasan komposit terhadap perendaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). *e-GiGi J.* 2015; 3(1):229–234.
11. Bao Y, Shi C, Ma J, Wang B, Zhang Y. Double in-situ synthesis of polyacrylate/nano-TiO₂ composite latex. *Prog Org Coat.* 2015; 85:101-108.
12. Bhuvanewari P, Shanmugavadivu T, Sabeena G, Annadurai G, Sindhuja E. Synthesis and characterization of Chitosan with Silica (CS) nanocomposite with enhanced antibacterial activity. *Int J Pharm Sci Res.* 2022; 13(1):27-34.
13. Kumar A, Kumar IA, Vijayaraghavan S, Raffi NM. Mechanical characteristics of chitosan dispersed poly lactic acid/basalt fiber hybrid composites. *J Adv Microsc Res.* 2018; 13(1):54-60.
14. Muraleedaran K, P Rahman M, Mujeeb VMA. Applications of chitosan powder with in situ synthesized nano ZnO particles as an antimicrobial agent. *Int J Biol Macromol.* 2015; 77:266-272.
15. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size animal studies? *J Pharmacol Pharmacother.* 2013; 4(4):303-306.
16. Ginting EM, Bukit N. *Karakterisasi Material.* Medan: Unimed Press. 2014; 54-85.
17. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods

for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater.* 2013; 9(8):7591-621.

18. Putri P, Fadli A, Akbar F. Pengaruh rasio Ca/P dan ph terhadap sintesis hidroksiapatit dari cangkang darah dengan metode hidrotermal suhu rendah. *JOM FTEKNIK.* 2015; 2(2):1-6.
19. Hajizadeh-Oghaz M, Razavi RS, Barekat M, Naderi M, Malekzadeh S, Rezazadeh M. Synthesis and characterization of Y_2O_3 nanoparticles by sol-gel process for transparent ceramics applications. *J Sol-Gel Sci Technol.* 2016; 78:682-691.
20. Loste J, Lopez-Cuesta JM, Billon L, Garay H, Save M. Transparent polymer nanocomposites: An overview on their synthesis and advanced properties. *Prog Polym Sci.* 2019; 89:133-158.
21. Simionescu BC, Ivanov D. Natural and synthetic polymers for designing composite materials: in *Handbook of Bioceramics and Biocomposites.* Swiss: Springer Reference. 2016
22. Pandey AR, Singh US, Momin M, Bhavsar C. Chitosan: Application in tissue engineering and skin grafting. *J Polym Res.* 2017; 24(125):1-22.
23. Rogina A, Ivankovic M, Ivankovic H. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix. *Mater Sci Eng.* 2013; 33(8):4539-4544.