

## KARAKTERISASI GUGUS FOSFAT DAN KARBONAT DALAM TULANG TIKUS DENGAN *FOURIER TRANSFORM INFRARED (FT-IR) SPECTROSCOPY*

K. Dahlan<sup>1</sup>, Y.W. Sari<sup>1,2</sup>, E. Yuniarti<sup>2</sup> dan D.S. Soejoko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Fisika FMIPA - IPB

Kampus Darmaga, Bogor 16680

<sup>2</sup>Departemen Fisika FMIPA - UI

Kampus UI, Depok 16424

### ABSTRAK

**KARAKTERISASI GUGUS FOSFAT DAN KARBONAT DALAM TULANG TIKUS DENGAN *FOURIER TRANSFORM INFRARED (FT-IR) SPECTROSCOPY*.** Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui karakteristik kalsium fosfat dalam tulang tikus menggunakan spektroskopi *FT-IR*. Sampel tulang femur dan tibia diperoleh dari tikus jenis Sprague-Dawley. Variasi umur yang diambil yaitu 1 bulan hingga 8 bulan. Untuk menghilangkan komponen organik, sampel diberi perlakuan menggunakan hidrazin. Maksimal pita absorpsi  $\nu_3$  fosfat spektrum *FT-IR* tulang tikus berada disekitar  $1036\text{ cm}^{-1}$ . Pita absorpsi  $\nu_4$  fosfat dalam mineral tulang tikus terpecah dengan puncak sekitar  $566\text{ cm}^{-1}$  dan  $599\text{ cm}^{-1}$ . Keberadaan pita absorpsi  $\nu_1$ ,  $\nu_3$ , dan  $\nu_4$  karbonat menunjukkan kalsium fosfat mineral tulang hadir dalam bentuk apatit karbonat. Peningkatan umur mengakibatkan penurunan kandungan fosfat dan karbonat dalam mineral tulang tikus.

**Kata kunci :** Mineral tulang, hidroksiapatit, apatit karbonat

### ABSTRACT

**CHARACTERIZATION OF PHOSPHATE AND CARBONAT IN MICE BONE USING *FOURIER TRANSFORM INFRARED (FT-IR) SPECTROSCOPY*.** Research has been performed to examine the characteristics of calcium phosphate of mice bone using FT-IR Spectroscopy. The bone sample of femur and tibiae was obtained from mice of Sprague-Dawley type. Age variation was 1 month until 8 months. To exclude the organic components, samples were treated by using hydrazine. The maxima of  $\nu_3$  phosphate absorption band was around  $1036\text{ cm}^{-1}$ .  $\nu_4$  phosphate absorption band was divided into two peaks of about  $566\text{ cm}^{-1}$  and  $599\text{ cm}^{-1}$ . The presence of  $\nu_1$ ,  $\nu_3$ , and  $\nu_4$  carbonate absorption band indicates that the bone mineral calcium phosphate was in the form of carbonate apatite. The growing of age resulted in the reducing of carbonate and phosphate content in mice bone mineral.

**Key words :** Bone mineral, hydroxyapatite, carbonate apatite

### PENDAHULUAN

Ditinjau dari komponen pembentuknya, tulang dimasukkan dalam kelompok jaringan keras. Tulang sebagai jaringan dicirikan dengan kehadiran sel-sel osteoblas, osteoklas, dan osteosit. Pertumbuhan dan perkembangan tulang dikontrol oleh ketiga sel tersebut. Ciri tulang sebagai jaringan keras diberikan oleh kemampuannya mengalami osifikasi, yaitu deposisi garam-garam mineral di dalam jaringan [1]. Tulang terdiri dari 25 % berat matriks, berupa kolagen tipe I, 50 % berat mineral, dan 25 % berat air [2].

Mineral tulang berupa senyawa kalsium fosfat. Kalsium fosfat merupakan golongan mineral apatit.

Secara umum mineral apatit dapat dinyatakan dalam  $M_{10}(ZO_4)_6X_2$ . Kalsium fosfat dalam tulang mendekati senyawa hidroksiapatit,  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . Kehadiran berbagai ion, selain ion kalsium, fosfat, dan hidroksil, mengakibatkan mineral pembentuk tulang tidak dapat dinyatakan secara stokiometri dengan  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$  [3]. Salah satu ion yang banyak menggantikan gugus penyusun hidroksiapatit adalah ion karbonat. Terdapat dua mekanisme substitusi gugus karbonat dalam senyawa hidroksiapatit, yaitu menggantikan gugus pospat, menghasilkan apatit karbonat tipe B, dan

menggantikan gugus karboksil, menghasilkan apatit karbonat tipe A [4].

Tulang merupakan jaringan yang dinamis. Pertumbuhan dan perkembangan tulang sangat terkait erat dengan metabolisme tubuh. Kenaikan umur dapat mempengaruhi kandungan mineral dan struktur tulang. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui karakter kalsium fosfat dalam tulang femur dan tibia sebagai variasi umur. Tulang diperoleh dari bagian femur dan tibia. Hasil yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan *Fourier Transform Infra Red (FT-IR) Spectroscopy*.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Tulang femur dan tibia tikus *Sprague-Dawley*, dengan variasi umur yang diambil yaitu 1 bulan sampai dengan 8 bulan., larutan garam normal, hidrazin, etanol, dan akuades.

### Peralatan

Pisau bedah, *beaker glass*, *crucible*, *incubator*, *furnace*, spektrofotometer *infrared*, difraktometer sinar-X.

### Cara Kerja

Preparasi sampel diawali dengan eliminasi sisa daging dan sumsum tulang menggunakan larutan garam normal. Eliminasi kandungan organik pada tulang dilakukan dengan deproteinasi menggunakan hidrazin.

Deproteinasi dilakukan dalam empat tahap, dua tahap pertama dilakukan dalam suhu ruang, sedangkan dua tahap berikutnya dilakukan dalam inkubator dengan suhu 60 °C. Dilakukan penggantian hidrazin pada tiap tahap. Deproteinasi tahap pertama dan kedua masing-masing dilakukan selama 1 jam dan 2 jam. Deproteinasi tahap ketiga dan keempat dilakukan selama 1 jam dan 24 jam. Sampel dibilas menggunakan etanol berbagai variasi konsentrasi dan *aquades*, dilanjutkan dengan pemanasan dalam *furnace* selama 10 jam dan suhu 110 °C. Sampel yang telah dipreparasi kemudian dicampur dengan KBr, dengan rasio sampel: KBr sebesar 1:50. Analisis *Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy* dilakukan menggunakan spektrometer *FT-IR Bio Rad Excalibur Series* pada bilangan gelombang 4000  $m^{-1}$  sampai dengan 400  $cm^{-1}$ , dan dilakukan analisis difraksi sinar-X.

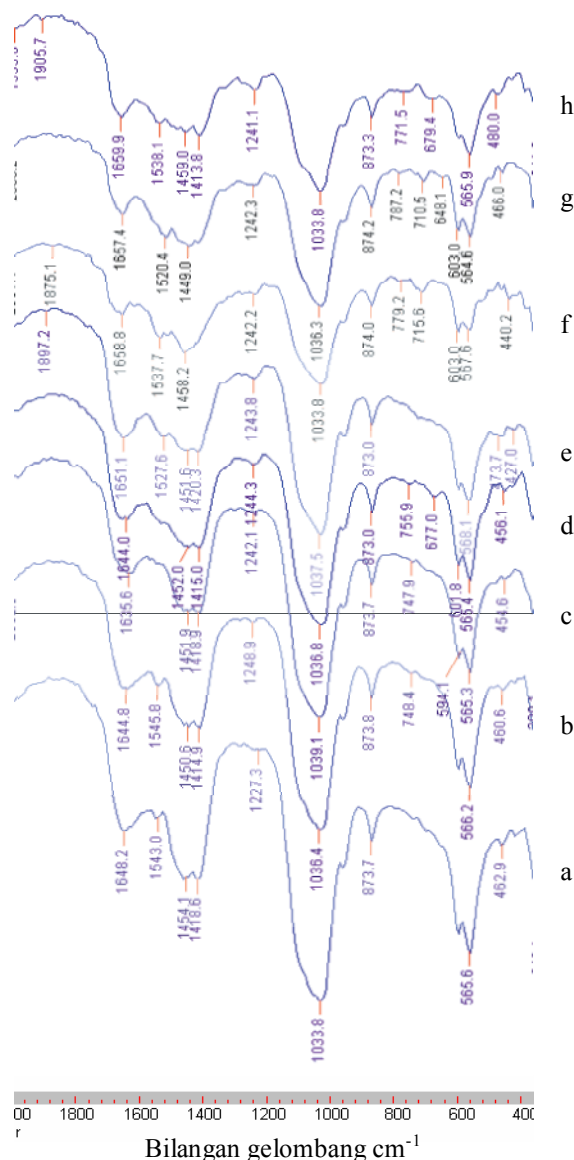
## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil spektroskopi infra merah sampel tulang tikus berbagai umur menunjukkan adanya gugus fosfat dan karbonat. Hasil ini memperkuat pernyataan kalsium fosfat dalam tulang hadir dalam bentuk apatit karbonat. Spektrum yang diperoleh menunjukkan adanya 3 mode

pita absorpsi fosfat dan 3 mode absorpsi karbonat. Pita absorpsi fosfat terdiri dari mode *stretching* simetri ( $v_1$ ), *stretching* asimetri ( $v_2$ ), dan vibrasi *bending* ( $v_4$ ), sedangkan pita absorpsi karbonat terdiri dari mode *stretching* simetri ( $v_1$ ), *stretching* terdegenerasi dua ( $v_3$ ), dan *bending* ( $v_4$ ). Diskusi akan dilakukan pada gugus fosfat dan karbonat. Kedua gugus ini sebagian besar berada pada jangkauan 2000  $cm^{-1}$  sampai 400  $m^{-1}$ .

Gambar 1 menunjukkan spektrum *FT-IR* apatit tulang tikus berbagai umur pada jangkauan 2000  $cm^{-1}$  sampai 400  $cm^{-1}$ . Lokasi maksimum pita absorpsi  $v_3$  dan  $v_4$  fosfat serta  $v_2$ ,  $v_3$  dan  $v_4$  karbonat pada spektrum *FT-IR* tulang tikus dengan variasi umur dapat diamati pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Spektrum yang diperoleh dapat digunakan untuk menganalisis derajat kristalinitas kalsium fosfat. Amorfus kalsium fosfat sintesis memiliki pita absorpsi  $v_3$  fosfat



Gambar 1. Spektrum *FT-IR* apatit tulang tikus berbagai umur: a) 1 bulan, b) 2 bulan, c) 3 bulan, d) 4 bulan, e) 5 bulan, f) 6 bulan, g) 7 bulan, dan h) 8 bulan.

berbentuk pita simetri dengan maksimal berada pada bilangan gelombang 1052  $\text{cm}^{-1}$ . Kristalin kalsium fosfat sintetis memiliki pita absorpsi  $\nu_3$  fosfat dengan maksima di sekitar 1030  $\text{cm}^{-1}$  dan bahu disekitar 1090  $\text{cm}^{-1}$ . Hasil penelitian menunjukkan bahwa maksimal pita absorpsi  $\nu_3$  fosfat spektrum FTIR tulang tikus berada disekitar 1036  $\text{cm}^{-1}$ . Adanya perbedaan bilangan gelombang  $\nu_3$  fosfat pada kalsium fosfat tikus dan sintetis menunjukkan bahwa kalsium fosfat dalam tulang tikus tidak hadir dalam satu fasa, yaitu amorfus atau kristalin saja, melainkan campuran keduanya.

**Tabel 1.** Lokasi maksimum pita absorpsi  $\nu_3$  dan  $\nu_4$  fosfat pada spektrum FT-IR tulang tikus dengan variasi umur.

Umur Tikus (bulan)	Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )		
	$\nu_3$	$\nu_4$	
1	1033,8	602,0	565,6
2	1036,4	603,0	566,2
3	1039,1	594,1	565,3
4	1036,8	601,8	565,4
5	1037,5	602,0	568,1
6	1033,8	603,0	567,6
7	1036,3	603,0	564,6
8	1033,8	603,3	565,9

**Tabel 2.** Lokasi maksimum pita absorpsi  $\nu_2$ ,  $\nu_3$  dan  $\nu_4$  karbonat pada spektrum FT-IR tulang tikus dengan variasi umur.

Umur Tikus (Bulan)	Bilangan gelombang ( $\text{cm}^{-1}$ )				
	$\nu_2$	$\nu_3$			$\nu_4$
1	873,7	1418,6	1454,1	1543,0	-
2	873,8	1414,9	1450,6	1545,8	-
3	873,7	1418,9	1451,9	-	-
4	873,0	1415,0	1452,0	-	677,0
5	873,0	1420,3	1451,6	1527,6	-
6	874,0	-	1458,2	1537,7	715,6
7	874,2	-	1449,0	1520,4	710,5
8	873,3	1413,8	1459,0	1538,1	679,4

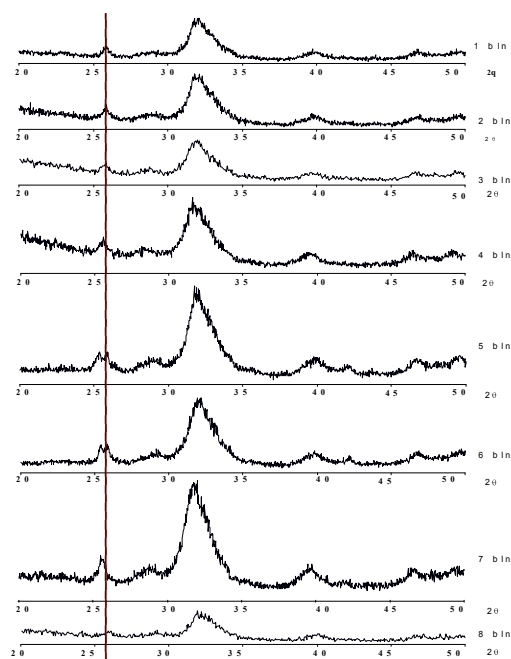
Analisis derajat kristalinitas kalsium fosfat dapat pula dilakukan dengan mengevaluasi derajat pecah pita absorpsi  $\nu_4$  fosfat. Derajat belah pita absorpsi  $\nu_4$  fosfat berbanding lurus terhadap derajat kristalinitas. Kristalin kalsium fosfat dicirikan dengan kehadiran pita absorpsi  $\nu_4$  fosfat dalam bentuk belah dengan maksima pada 564  $\text{cm}^{-1}$  dan 602  $\text{cm}^{-1}$ . Amorfus kalsium fosfat dicirikan dengan bentuk pita kontinu dengan maksimal disekitar 563  $\text{cm}^{-1}$ . Pita absorpsi  $\nu_4$  fosfat dalam mineral tulang tikus terpecah dengan puncak sekitar 566  $\text{cm}^{-1}$  dan 599  $\text{cm}^{-1}$ . Hasil ini menunjukkan adanya kalsium fosfat kristalin dalam mineral tulang tikus.

Keberadaan pita absorpsi  $\nu_1$ , pita absorpsi  $\nu_3$ , dan pita absorpsi  $\nu_4$  karbonat menunjukkan kalsium fosfat mineral tulang hadir dalam bentuk apatit karbonat. Spektrum infra merah apatit tipe A dan apatit tipe B ditandai oleh pita absorpsi dengan puncak berturut-turut

di sekitar 1545  $\text{cm}^{-1}$  dan 1450  $\text{cm}^{-1}$ , serta 1465  $\text{cm}^{-1}$  dan 1412  $\text{cm}^{-1}$ . Tabel 2 menunjukkan bahwa pita absorpsi karbonat pada mineral tulang tikus memiliki maksima di daerah apatit karbonat tipe A maupun apatit karbonat tipe B. Adanya tiga puncak ini tidak dapat memastikan secara langsung jenis apatit karbonat yang terkandung pada mineral tulang tikus. Namun demikian, jika dilihat dari kecenderungannya, dapat dikatakan bahwa mineral tulang tikus mayoritas berada dalam bentuk apatit karbonat tipe B.

Hasil ini sesuai dengan beberapa penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa apatit biologis mayoritas terdiri dari apatit karbonat tipe B dan apatit karbonat tipe B sintesis diperoleh dari reaksi basah [6,7]. Kondisi ini sesuai dengan pembentukan apatit dalam tubuh, yaitu dalam suasana basah.

Perubahan nilai intensitas spektrum pita absorpsi fosfat dan karbonat dapat digunakan untuk analisa kandungan fosfat dan karbonat secara kualitatif. Spektrum menunjukkan adanya penurunan intensitas pada pita absorpsi  $\nu_3$  dan  $\nu_4$  fosfat serta  $\nu_4$  karbonat. Terjadi penurunan kandungan fosfat dan karbonat seiring bertambahnya umur tikus. Tidak adanya puncak baru pada bilangan gelombang yang lain menunjukkan bahwa penurunan kandungan fosfat dan karbonat tidak disebabkan adanya substitusi oleh gugus lainnya. Diperkirakan penurunan kandungan tersebut terkait dengan adanya penyerapan mineral tulang yang diperlukan oleh metabolisme tubuh.



**Gambar 2.** Profil XRD sampel tulang tikus umur 1 bulan sampai 8 bulan

Keberadaan mineral tulang tikus dalam fasa amorfus dan kristalin didukung oleh hasil difraksi sinar-X pada femur dan tibia tikus (Gambar 2). Deklinasi spektra pada  $2\theta$  sebesar  $20^\circ$  hingga  $25^\circ$  menunjukkan

adanya amorfus sedangkan puncak pada  $2\theta$  sebesar  $30^\circ$  sampai dengan  $35^\circ$ . Diperoleh pula informasi bahwa kristal mineral tulang tikus memiliki partikel berukuran kecil, yaitu dalam skala nano [8].

## **KESIMPULAN**

Mineral tulang tikus hadir dalam bentuk apatit karbonat tipe B. Kandungan fosfat dan karbonat dipengaruhi oleh umur. Peningkatan umur tikus berakibat pada penurunan kandungan fosfat dan karbonat.

## **DAFTARACUAN**

- [1]. YASZEMSKI M.J., RICHARD G.P., WILSON C.H., ROBERT L., ANTONIOS G.M., *Biomaterials*, **17** (1996) 175-185
- [2]. JONATHAN B., GARTH H., *Handbook of Biomaterial Properties*, Chapman and Hall, (1998)
- [3]. SOEJOKO D.S., SRI W., *Makara Seri Sains*, **6** (2002) 117-120
- [4]. BIGIA., et. al., *Calc. Tiss. Int.*, **50** (1992) 439-444
- [5]. TERMINE J.D., LUNDY D.R., *Calc. Tiss. Res.*, **15** (1973) 55-70
- [6]. AHMIARTI S., DJARWANI S.S., *Makara Seri Sains*, **6** (2002) 55-58
- [7]. AOKI H., *Science and Medical Applications of Hydroxyapatite*, JAAS. Tokyo (1991)
- [8]. SARI Y.W., DJARWANI S.S., KIAGUS D., *Jurnal Biofisika*, **1** (2005) 99-107