Fauzia & Bahti. (2023) Vol. 11 No. 1: 36-40

Chimica et Natura Acta

p-ISSN: 2355-0864 e-ISSN: 2541-2574

Homepage: http://jurnal.unpad.ac.id/jcena

Sintesis dan Karakterisasi (3-Aminopropil)-Trimetoksisilan Terkonjugasi Asam Folat untuk Fungsionalisasi Nanopartikel

Retna Putri Fauzia*, Husein H. Bahti

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Jl. Raya Bandung-Sumedang km 21, Jatinangor, 45363, Jawa Barat, Indonesia.
*Penulis korespondensi: retna.fauzia@unpad.ac.id

DOI: https://doi.org/10.24198/cna.v11.n1.45884

Abstrak: Asam folat diketahui memiliki afinitas yang cukup tinggi pada reseptor folat (Kd=10^{-10}) yang diekspresikan berlebih di permukaan sel-sel kanker tertentu (seperti sel kanker ovarium dan serviks). Oleh karena, itu asam folat sering digunakan sebagai suatu pentarget aktif untuk membawa obat atau dalam hal ini nanopartikel, sehingga secara spesifik menuju sel kanker yang diinginkan, baik untuk tujuan diagnosis maupun penyembuhan penyakit kanker. Pada penelitian ini, asam folat akan dikonjugasikan pada aminopropyl trimetoksisilan (APTMS) melalui pembentukan N-hidroksisuksinimida (NHS) ester asam folat (NHS-FA) terlebih dahulu dan selanjutnya direaksikan dengan APTMS melalui pendekatan reaksi 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida (EDC) dan NHS (EDC/NHS) Ester. APTMS termodifikasi gugus asam folat (APTMS-FA) selanjutnya dikarakterisasi dengan spektroskopi ultraviolet dan inframerah. Pada spektrum ultraviolet yang dihasilkan oleh NHS-FA dan APTMS-FA menunjukkan puncak yang sangat khas yang dimiliki oleh asam folat, yaitu pada panjang gelombang sekitar 280 dan 360 nm. Hasil karakterisasi dengan spektroskopi inframerah juga menunjukkan terbentuknya pita baru yang khas sekitar 2995 dan 2912 cm^{-1} yang berasal dari dari gugus alkil APTMS. Sebagai tambahan, bentuk khas pita di daerah 1047 cm^{-1} juga terlihat menunjukkan keberadaan gugus Si-O dari APTMS-FA yang tidak ada pada asam folat maupun NHS-FA. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, asam folat telah terkonjugasi pada APTMS melalui pendekatan reaksi EDC/NHS Ester dan telah dikonfirmasi pada hasil karakterisasi dengan spektroskopi ultraviolet dan inframerah. APTMS-FA dapat digunakan lebih lanjut untuk fungsionalisasi nanopartikel.

Kata kunci: asam folat, aminopropiltrimetoksisilan, nanopartikel, fungsionalisasi

***Abstract*:** *Folic acid has been known to have a high affinity to folic acid receptors (Kd = 10^{-10}) which are overexpressed on certain cancers (e.g. ovarian and cervix). Thus, folic acid is common to be utilized as an active targ eting agent to deliver drugs or nanoparticles (in this research) specifically bind the cancer of interest for the theranostics purposes. In this research, aminopropyltrimetoxysilane (APTMS) was modified with folic acid through the formation of N-hydroxisuccinimide (NHS) esther folic acid (NHS-FA) and subsequently, reacted with APTMS via 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and NHS (EDC/NHS) esther approach. APTMS-modified folic acid molecule (APTMS-FA) was then characterized with ultraviolet and infrared spectroscopies. From the result, it can be seen that two typical peaks of folic acid around 280 and 360 nm were also appeared on NHS-FA and APTMS-FA UV spectra. Which can prove the folic acid structure on APTMS. In addition, the infrared spectroscopy was also showed the appearance of new bands at 2995 and 2912 cm^{-1} corresponding to alkyl in APTMS and at 1047 cm^{-1} originated from Si-O group of APTMS-FA which did not present on FA or NHS-FA FTIR spectra. It can be concluded that FA molecule has been conjugated to APTMS via EDC/NHS esther approach and also confirmed by UV and FTIR spectra. Therefore, APTMS-FA can be further applied for nanoparticles' functionalization.*

Keywords: *folic acid, aminopropyltrimetoxysilane, nanoparticles, functionalization*

PENDAHULUAN

Asam folat merupakan suatu ligan/molekul yang mempunyai afinitas tinggi terhadap reseptor folat (Kd = 10^{-10}) (Haller *et al.* 2015) yang terdapat pada permukaan berbagai jenis kanker sehingga dapat digunakan sebagai suatu pentarget untuk membawa suatu senyawa, misalnya dalam hal ini pada nanopartikel, langsung menuju pada sel kanker target (Cheung *et al.* 2016). Hal tersebut dikarenakan ekspresi reseptor folat yang berlebih pada beberapa kanker, seperti ovarium, payudara dan endometrium

dibandingkan pada sel normal yang terbatas (Bandara *et al.* 2014).

Oleh karena itu asam folat juga banyak digunakan baik sebagai pembawa suatu senyawa, dalam hal ini nanopartikel menuju sel kanker. Selanjutnya diharapkan nanopartikel akan masuk ke dalam sel kanker melalui mekanisme *folate mediated endocytosis* (Zwicke *et al.* 2012). Penggunaan lebih lanjut dapat diaplikasikan untuk tujuan diagnosis (sebagai senyawa pengontras pada alat *Magnetic Resonance Imaging*) atau untuk tujuan terapi dalam pengobatan dan penyembuhan kanker (Low *et al.* 2008).

Pada penelitian ini, asam folat dimodifikasi pada molekul (3-Aminopropil)-trimetoksisilan (APTMS) untuk penggunaan lebih lanjut pada fungsionalisasi nanopartikel untuk tujuan diagnosis maupun terapi kanker. Nanopartikel yang sudah terfungsionalisasi asam folat diharapkan memiliki keuntungan ganda jika diaplikasikan sebagai suatu pentarget kanker, tidak hanya sebagai pentarget aktif (karena adanya asam folat pada permukaan nanopartikel), tetapi juga sebagai pentarget pasif karena efek EPR (*enhanced permeability and retention)* yang dimiliki oleh nanopartikel (Maeda *et al.* 2001; Acharya & Sahoo 2011).

Sintesis APTMS terkonjugasi asam folat dilakukan dengan menggunakan metode pendekatan 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida hidroklorida (EDC) dan N-hidroksisuksinimida (NHS). Metode EDC/NHS ini biasanya digunakan untuk menempelkan senyawa konjugat pada persiapan senyawa-senyawa biomolekul atau protein yang berhubungan dengan aplikasi biomedis (Fischer 2010)

Gugus amina primer dan asam karboksilat merupakan gugus yang umum ditarget untuk dimodifikasi misalnya pada fungsionalisasi nanopartikel. Sebagai tambahan, salah satu senyawa yang memiliki gugus amina untuk modifikasi dan paling umum digunakan untuk pelapisan pada permukaan nanopartikel adalah senyawa-senyawa aminosilan seperti, (3-Aminopropil)-trimetoksisilan (APTMS) atau (3-Aminopropil)-trietoksilan (APTES) (Liu *et al.* 2020).

EDC merupakan pereaksi penting untuk membantu penempelan secara kovalen suatu senyawa (misalnya asam folat) pada suatu material permukaan khususnya pada permukaan nanopartikel (Bartczak & Kanaras 2011). EDC bereaksi dengan gugus karboksilat yang ada pada asam folat, dan terbentuk intermediet *O-acylisourea* ester aktif asam folat yang bersifat tidak stabil. N-hidroksisuksinimida (NHS) juga digunakan dalam penelitian ini untuk meningkatkan efisiensi dan membantu pembentukan intermediet amina yang reaktif dalam hal ini NHS ester asam folat, yang bersifat lebih stabil daripada intermediet *O-acylisourea* yang sebelumnya dihasilkan . Setelah itu NHS ester aktif dengan mudah bereaksi dengan amina primer pada kondisi pH fisiologis.

Produk APTMS-FA yang sudah disintesis pada penelitian ini, selanjutnya dikarakterisasi dengan menggunakan beberapa metode spektroskopi. Pada penelitian pendahuluan ini spektroskopi ultraviolet dan inframerah digunakan untuk mengkonfirmasi keberadaan gugus asam folat pada APTMS-FA dan membandingkan strukturnya dengan struktur produk awal dan produk intermediet nya, dalam hal ini asam folat dan NHS ester asam folat.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Semua pereaksi dan pelarut yang digunakan adalah untuk sintesis dan analisis. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida hidroklorida (EDC), (3-Aminopropil)-trimetoksisilan (APTMS) 97%, dimetil sufooksida (DMSO), asam folat (FA), N-hidroksisuksinimida (NHS), kalium bromida (KBr) dibeli dari Sigma-Aldrich.

Sintesis APTMS--FA

Sebanyak 2 mmol asam folat dilarutkan dalam 10 mL DMSO kering. Selanjutnya 4 mmol 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida (EDC) ditambahkan ke dalam larutan dan diaduk selama 3 jam. Lalu, 2 mmol N-hidroksisuksinimida (NHS) ditambahkan ke dalam campuran larutan dan diaduk selama 24 jam pada suhu ruang dan kondisi gelap.

Selanjutnya, sebanyak 1 mmol (3-Aminopropil)-trimetoksisilan (APTMS) 97% ditambahkan ke dalam 1 mmol NHS-FA di dalam DMSO kering yang disintesis sebelumnya. Campuran larutan diaduk selama 24 jam pada suhu ruang. Larutan APTMS terkonjugasi asam folat (APTMS-FA) yang terbentuk juga selanjutnya diliofilisasi hingga terbentuk padatan dengan alat *freeze dryer* untuk sintesis dan karakterisasi lebih lanjut dengan spektroskopi ultraviolet dan inframerah.

Karakterisasi APTMS-FA

Untuk karaktersisasi senyawa APTMS-FA hasil sintesis dilakukan dengan metode spektroskopi ultraviolet dan inframerah. Persiapan untuk spektroskopi ultraviolet sampel, dilakukan dengan pelarutan menggunakan DMSO, baik APTMS-FA, NHS-FA dan asam folat, masing-masing dengan konsentrasi yang sama dilarutkan dalam pelarut DMSO dan selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet untuk pengukuran dengan alat spektrofotometer ultraviolet.

Karakterisasi gugus fungsi pada APTMS-FA dilakukan dengan mencampurkan APTMS-FA dengan kalium bromida yang sudah dipanaskan dalam oven pada suhu 100ºC. Campuran padatan selanjutnya digerus menggunakan mortar-agate dan dibuat dalam pellet menggunakan penekan hidrolik. Sampel selanjutnya diidentifikasi dengan spektrofotometer inframerah. Prosedur yang sama

juga dilakukan pada asam folat dan NHS-folat untuk melihat perbedaan keberadaan gugus fungsi-gugus fungsinya pada spektroskopi inframerah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

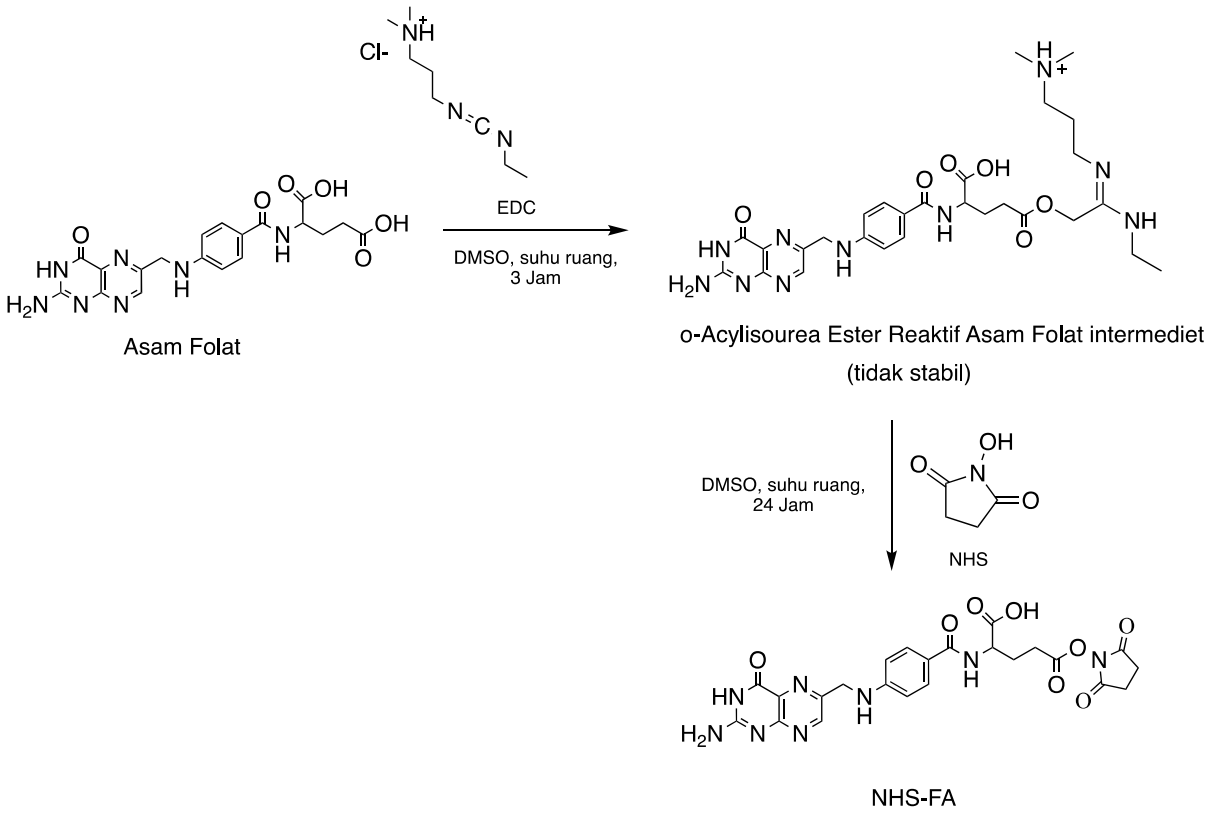
Pembentukan NHS-FA

Asam folat merupakan suatu ligan yang mempunyai afinitas tinggi terhadap reseptor folat yang ekspresinya sangat terbatas pada sel-sel normal dibandingkan dengan sel kanker yang sangat berlebih. Asam folat umum digunakan sebagai suatu pengantar/pembawa (dalam hal ini nanopartikel) untuk menuju pada sel kanker yang diinginkan untuk tujuan diagnosis maupun penyembukan kanker (Haller *et al.* 2015) Pada penelitian ini, asam folat dikonjugasikan pada molekul (3-Aminopropil)-trimetoksisilan (APTMS) melalui pembentukan NHS ester asam folat (NHS-FA) terlebih dahulu. Pendekatan EDC/NHS umum untuk digunakan untuk mengubah gugus asam karboksilat pada suatu senyawa menjadi suatu NHS ester yang sangat reaktif pada gugus amina, dimana pertama-tama terbentuk terlebih dahulu suatu intermediet *o-acylisourea* ester yang bersifat sangat reaktif tapi cenderung tidak stabil (Gambar 1).

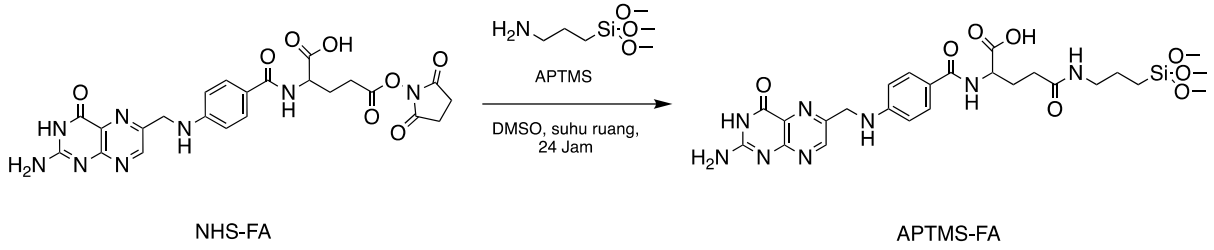
Dalam hal ini, salah satu gugus asam karboksilat pada asam folat (khususnya pada posisi (γ)) diaktivasi terlebih dahulu dengan menggunakan pendekatan reaksi EDC/NHS untuk menghasilkan NHS ester asam folat (NHS-FA). Bentuk NHS ester dari asam folat ini memiliki reaktivitas yang tinggi, sehingga sangat mudah bereaksi dengan gugus amina yang ada pada APTMS.

Akan tetapi, kemungkinan terbentuknya NHS ester pada posisi (α) juga bisa terjadi dan berpengaruh pada rendemen yang dihasilkan. Oleh karena itu, sebagai alternatif pengaktifan gugus karboksilat (γ) pada asam folat juga dapat dilakukan dengan menggunakan metode secara tidak langsung (Fauzia dkk. 2017).

Menurut Fauzia dkk. (2017) perolehan hasil karakterisasi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dari ligan pengompleks yang dimodifikasi dengan gugus asam folat yang dihasilkan pada penelitian tersebut, baik secara langsung maupun tidak langsung. Sehingga pada penelitian ini, pembentukan NHS ester asam folat dilakukan secara langsung menggunakan pendekatan reaksi EDC/NHS.



Gambar 1. Skema dugaan reaksi pembentukan NHS ester asam folat (NHS-FA) dari asam folat dengan menggunakan pendekatan reaksi EDC/NHS.



Gambar 2. Skema dugaan reaksi pembentukan APTMS-FA dari reaksi NHS -FA dan APTMS

Modifikasi FA pada APTMS

(3-Aminopropil)-trimetoksisilan (APTMS) selanjutnya direaksikan dengan NHS-FA yang telah dihasilkan pada prosedur sebelumnya selama 24 jam. Bentuk NHS ester asam folat ini bersifat sangat reaktif terhadap gugus amina primer yang ada pada struktur APTMS (Gambar 2).

APTMS-FA yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai molekul silan terkonjugasi asam folat, sehingga dapat sangat mudah melakukan fungsionalisasi asam folat pada permukaan nanopartikel melalui penempelan silika pada kulit nanopartikel terlebih dahulu. Sebagai lebih lanjut, nanopartikel terfungsionalisasi asam folat ini diharapkan menuju sel target secara spesifik, khususnya sel kanker yang mengekspresikan reseptor folat berlebih, karena adanya asam folat sebagai pembawa nanopartikel (Low *et al.* 2008).

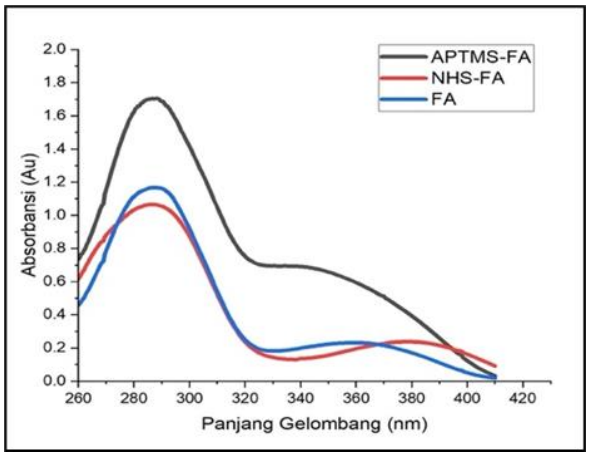
Sebagai tambahan, fungsionalisasi asam folat melalui modifikasi APTMS-FA yang dihasilkan pada penelitian ini dapat digunakan pada gadolinium (Gd) dan/atau besi (Fe) dalam bentuk nanopartikelnya, sehingga dapat digunakan lebih lanjut untuk tujuan diagnosis dengan alat *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) baik sebagai senyawa pengotras berbasis pencitraan T1 dan/atau T2 karena adanya logam paramagnetic Gd dan/atau Fe dalam hal ini (Fauzia *et al.* 2019; Fauzia *et al.* 2015; Caspani *et al*. 2020).

Karakterisasi APTMS-FA

Produk APTMS-FA yang dihasilkan selanjutnya dikarakterisasi dengan metode spektroskopi. Sebagai pembanding, pada proses karakterisasi ini asam folat dan NHS-FA juga dikarakterisasi menggunakan kondisi yang sama seperti produk akhir APTMS-FA.

Dari hasil spektrum ultraviolet yang dihasilkan, kemunculan puncak-puncak khas dari asam folat yaitu pada sekitar 280 dan 360 nm yang berasal dari transisi elektronik dari π ke π* dan n ke π* dari gugus-gugus fungsi benzena dan asam karboksilat terlihat sangat jelas baik pada spektrum UV molekul NHS-FA maupun produk akhir APTMS-FA (Gambar 3).

Hasil analisis dengan spektroskopi inframerah juga menunjukkan modifikasi asam folat pada APTMS juga dapat dikonfirmasi dengan ditandai kemunculan puncak pada bilangan gelombang 2995 dan 2912 cm^{-1} yang berasal dari gugus alkil dari APTMS (Tabel 1).



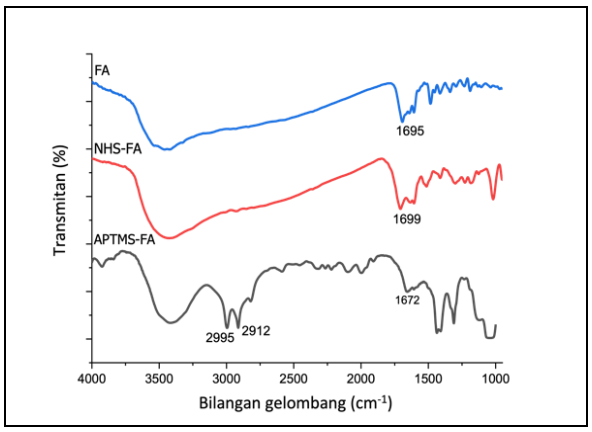
Gambar 3. Spektrum ultraviolet dari APTMS-FA. Asam folat (FA) dan NHS-FA digunakan sebagai pembanding.

Tabel 1. Tabel bilangan gelombang spektrum inframerah asam folat, NHS-FA dan APTMS-FA.

No	Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang (cm^{-1})		
		Asam Folat	NHS-FA	APTMS-FA
1	O-H	3490	3485	3480
2	CH_2	-	-	2995
3	CH_3	-	-	2912
4	C=O	1695	1699	1672
5	Si-O	-	-	1047

Selain itu, puncak baru lain juga muncul pada bilangan gelombang 1047 cm^{-1} yang menandakan keberadaan gugus Si-O yang berasal dari silika APTMS yang tidak dapat ditemukan pada spektrum inframerah asam folat maupun NHS folat. Adapun keberadaan gugus C=O (pada 1600-an cm^{-1}) dan O-H

(pada 3400-an cm^{-1}) yang berasal dari gugus karboksilat asam folat masih terlihat, baik pada NHS-FA maupun produk akhir APTMS-FA (Tabel 1). Spektrum inframerah untuk asam folat, NHS-FA dan APTMS-FA ditampilkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektrum inframerah untuk asam folat (biru), NHS-FA (merah) dan APTMS-FA (hitam).

KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, gugus asam folat telah terkonjugasi pada APTMS melalui pendekatan reaksi EDC/NHS Ester. Dengan ditunjukkan pada hasil karakterisasi dengan menggunakan metode spektroskopi ultraviolet dan inframerah. Puncak khas dari asam folat terlihat pada pada panjang gelombang sekitar 280 dan 360 nm pada spektrum ultraviolet APTMS-FA hasil sintesis. Gugus alkil dan Si-O baru yang berasal dari APTMS juga terlihat sangat jelas pada spada pektrum ultraviolet APTMS-FA, dan tidak ditemukan baik pada asam folat maupun NHS ester asam folat. Hal ini menunjukkan, keberhasilan sintesis APTMS-FA yang selanjutnya akan digunakan untuk tujuan fungsionalisasi nanopartikel.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada hibah penelitian Riset Percepatan Lektor Kepala (RPLK) 1549/UN6.3.1/PT.00/2023 dan *Academic Leadership Grant* (ALG) 1549/UN6.3.1/PT.00/2023 Universitas Padjadjaran Tahun 2023.

DAFTAR PUSTAKA

Acharya, S. & Sahoo, S.K. (2011). PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **63(3)**: 170–183.

Bandara, N.A., Hansen, M.J. & Low, P.S. (2014). Effect of receptor occupancy on folate receptor internalization. *Molecular Pharmaceutics*. **11(3)**: 1007–1013.

Bartczak, D. & Kanaras, A.G. (2011) Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/Sulfo-NHS coupling. *Langmuir*. **27(16)**: 10119–10123.

Caspani, S., Magalhães, R., Araújo, J.P. & Sousa, C.T. (2020). Magnetic nanomaterials as contrast agents for MRI. *Materials*. **13(11)**: 2586.

Cheung, A., Bax, H.J., Josephs, D.H., Ilieva, K.M., Pellizzari, G., Opzoomer, J., Bloomfield, J., Fittall, M., Grigoriadis, A., Figini, M., Canevari, S., Spicer, J.F., Tutt, A.N. & Karagiannis, S.N. (2016). Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget*. **7(32)**: 52553.

Fauzia, R.P., Denkova, A.G. & Djanashvili, K. (2019). Potential of MRI in radiotherapy mediated by small conjugates and nanosystems. *Inorganics*. **7(5)**: 59.

Fauzia, R.P., Mutalib, A., Soedjanaatmadja, R.U.M.S., Bahti, H.H., Anggraeni, A., Gunawan, A.H., Pujiastuti, H. & Hidayati, Y. (2015). Synthesis and characterization of gadolinium diethylenetriamine pentaacetate-folate. *Procedia Chemistry*. **17**, 139–146.

Fauzia, R. P., Mutalib, A., Soedjanaatmadja, R. U. M., Anggraeni, A., Nafisah, Z., Yusuf, M., & Bahti, H. H. (2017). Perbandingan metode sintesis dan karakterisasi etilendiamin-folat sebagai prekursor pembuatan senyawa pengontras mri gadolinium dietilentriaminpentaasetat-folat. *Jurnal Berkala Ilmiah Sains dan Terapan Kimia*. **11(1)**: 6-14.

Fischer, M. J. (2010). Amine coupling through EDC/NHS: a practical approach. In Mol, N., Fischer, M. (eds). *Methods in Molecular Biology-Surface Plasmon Resonance: Methods And Protocols*. **627**: 55-73. Humana Press.

Haller, S., Reber, J., Brandt, S., Bernhardt, P., Groehn, V., Schibli, R. & Müller, C. (2015). Folate receptor-targeted radionuclide therapy: Preclinical investigation of anti-tumor effects and potential radionephropathy. *Nuclear Medicine and Biology*. **42(10)**, 770–779.

Liu, S., Yu, B., Wang, S., Shen, Y. & Cong, H. (2020). Preparation, surface functionalization and application of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. **281**: 102165.

Low, P.S., Henne, W.A. & Doorneweerd, D.D. (2008). Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Accounts of Chemical Research*. **41(1)**: 120–129.

Maeda, H., Sawa, T. & Konno, T. (2001). Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS. *Journal of Controlled Release*. **74**: 47-61.

Zwicke, G.L., Ali Mansoori, G. & Jeffery, C.J. (2012). Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Reviews*. **3(1)**: 18496.