



## Penentuan Kadar Asam Folat dalam Konjugat Folat Termodifikasi Silan dengan Spektrofotometer UV

Cindy Florencia Sutanto<sup>1</sup>, Launa Silky Karenindra Rokhmat<sup>1</sup>, Sahlaa Alifah Zahra<sup>1</sup>, Ari Hardianto<sup>1</sup>, Santhy Wyantuti<sup>1,2</sup>, Retna Putri Fauzia<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Sumedang 45363, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Studi Sensor dan Kimia Hijau, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran, Bandung 40132, Indonesia

\*Alamat email penulis koresponden: retna.fauzia@unpad.ac.id

### Abstrak

Konjugasi asam folat (FA) termodifikasi silan merupakan pendekatan yang banyak digunakan untuk meningkatkan spesifisitas sistem penghantaran obat, terutama dalam menargetkan sel kanker yang mengekspresikan reseptor folat secara berlebihan. Dalam penelitian ini, dilakukan sintesis, karakterisasi, dan penentuan kadar FA dalam konjugat aminopropil trimetoksisilana–polietilen glikol–asam folat (APTMS-PEG-FA) menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Konjugasi dilakukan melalui aktivasi gugus karboksilat FA menggunakan EDC dan NHS, dilanjutkan dengan pengikatan terhadap NH<sub>2</sub>-PEG-COOH dan APTMS dalam pelarut DMSO. Karakterisasi UV-Vis menunjukkan puncak serapan khas asam folat pada panjang gelombang 288 nm ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) dan 358 nm ( $n \rightarrow \pi^*$ ), mengindikasikan keberhasilan konjugasi. Kurva kalibrasi asam folat dibuat pada rentang konsentrasi 0,002–0,010 mM dengan hubungan linear yang sangat baik ( $R^2 = 0,99933$ ). Nilai LOD dan LOQ masing-masing sebesar 0,000270 mM dan 0,000820 mM menunjukkan sensitivitas metode yang tinggi. Berdasarkan kurva ini, kadar FA dalam APTMS-PEG-FA diperoleh sebesar  $0,33 \pm 0,05$  mM. Hasil ini menunjukkan bahwa pendekatan konjugasi yang digunakan efektif dalam menghasilkan konjugat dengan integritas kimia dan kuantitatif yang baik, serta berpotensi untuk digunakan dalam aplikasi biomedis, khususnya dalam sistem penghantaran nanopartikel bertarget untuk terapi dan pencitraan kanker.

**Kata kunci:** Asam folat, APTMS-PEG-FA, EDC/NHS, spektrofotometri UV-Vis, konjugasi silan

### PENDAHULUAN

Sistem penghantar obat selektif telah menjadi salah satu pendekatan strategis dalam pengembangan terapi yang lebih efektif dan terarah, khususnya dalam bidang onkologi (Chaudhari *et al.*, 2024). Salah satu strategi yang banyak dikembangkan adalah fungsionalisasi permukaan nanopartikel dengan ligan spesifik yang dapat mengenali dan berikatan dengan reseptor yang diekspresikan secara berlebihan pada permukaan sel kanker. Di antara berbagai ligan yang digunakan, asam folat (FA) menjadi kandidat unggulan karena memiliki afinitas tinggi terhadap reseptor folat, yang terekspresi secara dominan pada berbagai jenis kanker seperti ovarium, paru-paru, payudara, dan kolorektal (Lu & Low, 2002; Sudimack & Lee, 2000). Konjugasi asam folat ke permukaan nanopartikel diketahui mampu meningkatkan proses endositosis yang dimediasi reseptor, sehingga memungkinkan internalisasi selektif nanokarier ke dalam sel tumor dengan meminimalkan efek terhadap jaringan sehat (Kamen & Smith, 2004).

Untuk mendukung fungsionalisasi tersebut, polietilen glikol (PEG) digunakan sebagai penghubung karena kemampuannya dalam meningkatkan kelarutan, biokompatibilitas, dan stabilitas sirkulasi nanopartikel di dalam sistem biologis (Jokerst & Gambhir, 2011). Selain itu, PEG menyediakan gugus fungsional yang memungkinkan modifikasi kimia lebih lanjut, seperti penambahan ligan penarget atau agen pencitraan. Penambahan (3-aminopropil)trimetoksisilan (APTMS) ke dalam sistem memungkinkan introduksi gugus amina reaktif yang penting untuk pembentukan ikatan kovalen stabil, terutama dalam modifikasi permukaan nanopartikel berbasis silika (Cueto-Díaz *et al.*, 2021). Kombinasi ketiga komponen ini menghasilkan konjugat APTMS-PEG-FA, sebuah molekul bifungsional yang mampu menjalankan fungsi modifikasi permukaan sekaligus memberikan kemampuan penargetan melalui pengenalan reseptor folat.

Sintesis konjugat ini umumnya dilakukan melalui reaksi kimia berbasis karbodiimida, yakni 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC) digunakan untuk mengaktivasi gugus karboksilat pada asam folat, membentuk intermediat reaktif yang kemudian distabilkan oleh N-hidroksisuksinimida (NHS) menjadi ester aktif. Ester ini kemudian bereaksi dengan gugus amina terminal pada PEG atau APTMS, membentuk ikatan amida yang stabil dan menghubungkan asam folat dengan backbone polimer secara efisien (Selvaraj & Chen, 2023). Reaksi konjugasi yang dimediasi oleh EDC/NHS ini telah banyak diterapkan dalam bidang biomedis, terutama untuk keperluan biokonjugasi obat, antibodi, peptida, maupun agen pencitraan (Kaymaz *et al.*, 2023).

Meskipun berbagai penelitian telah melaporkan sintesis material yang difungsionalisasi dengan asam folat, studi khusus yang berfokus pada analisis kuantitatif dan karakterisasi spektrofotometri UV-Vis terhadap produk akhir masih terbatas. Padahal, aspek ini sangat penting untuk menjamin reproduksibilitas sintesis dan pengendalian dosis dalam aplikasi biomedis. Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode yang sederhana, cepat, dan andal untuk memantau efisiensi konjugasi, khususnya pada senyawa seperti asam folat yang memiliki puncak serapan khas akibat transisi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$  dan  $n \rightarrow \pi^*$  (Elkhazain *et al.*, 2022). Dalam penelitian ini, dilakukan kuantifikasi dan karakterisasi konjugat APTMS-PEG-FA menggunakan pendekatan spektrofotometri UV-Vis. Konjugat disintesis melalui reaksi yang dimediasi oleh EDC/NHS, dan dirancang sebagai agen modifikasi permukaan nanopartikel yang menggabungkan kemampuan penargetan dari asam folat, efek peningkatan kelarutan dari PEG, serta gugus silan reaktif dari APTMS. Analisis kuantitatif dilakukan untuk memastikan keberhasilan proses konjugasi sekaligus menentukan kadar asam folat berdasarkan kurva kalibrasi yang telah divalidasi. Studi ini diharapkan memberikan kontribusi awal yang signifikan dalam pengembangan sistem penghantar berbasis nanopartikel untuk aplikasi diagnostik maupun terapeutik yang lebih selektif dan efisien.

## **METODE PENELITIAN**

### **Alat dan Bahan**

Pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis Genesys 10S setelah larutan diencerkan dalam pelarut DMSO. Bahan yang digunakan dalam

penelitian adalah 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida hidroklorida (EDC), (3-aminopropil)trimetoksisilana (APTMS), asam folat,  $\text{NH}_2\text{-PEG-COOH}$ , N-hidroksisuksinimida (NHS), dan Tetrazine-PEG<sub>5</sub>-NHS ester, yang seluruhnya diperoleh dari Sigma-Aldrich. Asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) dan dimetilsulfoksida (DMSO) diperoleh dari Merck.

### **Preparasi Silan Terkonjugasi Polietilen Glikol Asam Folat (APTMS-PEG-FA)**

Padatan asam folat sebanyak 44,1 mg (0,1 mmol) dilarutkan dalam 1 mL DMSO kering pada suhu 50 °C hingga larut sempurna. Kemudian, 0,2 mmol 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimida (EDC) ditambahkan ke dalam larutan, yang diaduk selama 3 jam. Selanjutnya, 11,5 mg (0,1 mmol) N-hidroksisuksinimida (NHS) ditambahkan, dan campuran diaduk selama 24 jam. Asam folat teraktivasi NHS (NHS-FA) yang dihasilkan dikuantifikasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan konsentrasinya. Sebanyak 1 mL alikuot larutan NHS-FA ini disimpan sebagai stok untuk sintesis APTMS-PEG-FA. Selanjutnya, 5,3 mg PEG-COOH dilarutkan dalam 1 mL DMSO kering, dicampur dengan 50  $\mu\text{L}$  stok NHS-FA, dan diaduk selama 24 jam. Campuran tersebut kemudian didialisis selama dua hari dan dikeringkan beku. FA-PEG-COOH kering dilarutkan kembali dalam 0,5 mL DMSO kering, dicampur dengan 1,8  $\mu\text{L}$  (3-Aminopropil) trimetoksisilana (APTMS), dan diaduk pada suhu ruang selama 24 jam. Akhirnya, produk APTMS-PEG-FA dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Fauzia *et al.*, 2025).

### **Kurva Kalibrasi Asam Folat**

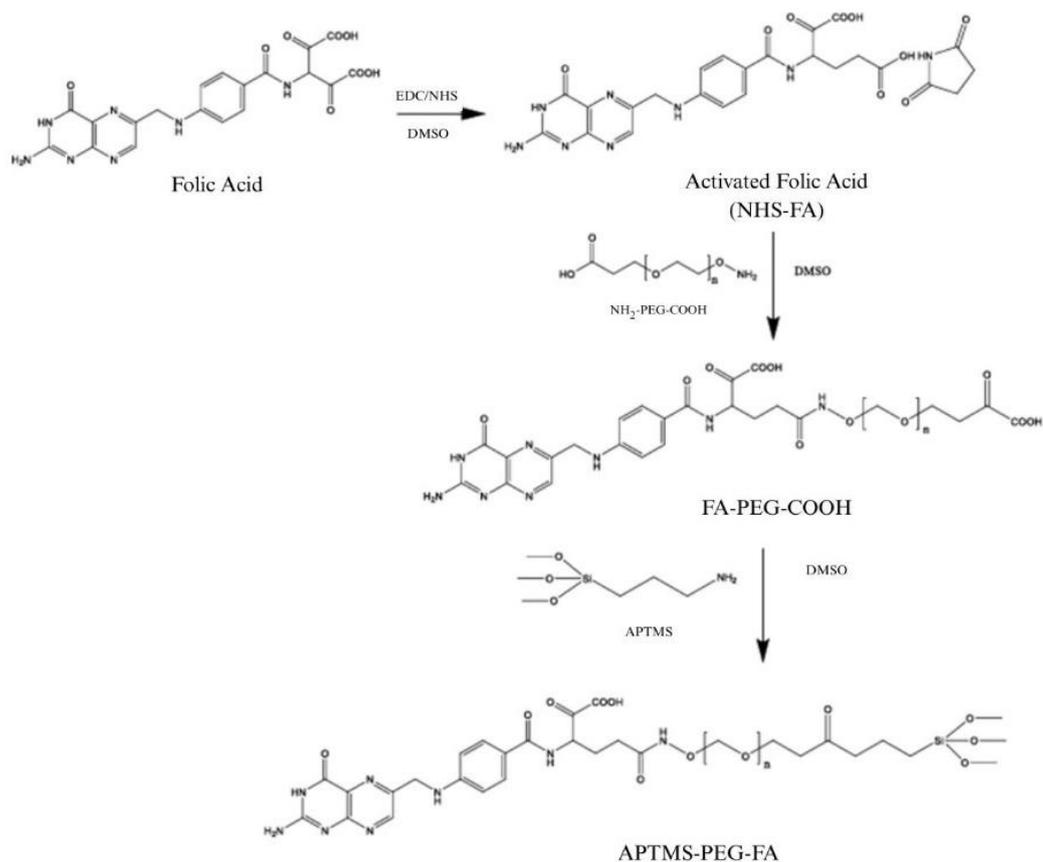
Sebanyak 44,1 mg asam folat ditimbang dan dilarutkan dalam 1 mL DMSO kering sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 50°C hingga larut sempurna. Setelah larut, 10  $\mu\text{L}$  larutan diambil dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan DMSO biasa hingga tanda batas dan dihomogenkan untuk menghasilkan larutan stok. Dari larutan stok dipipet 200, 400, 600, 800, dan 1000  $\mu\text{L}$  ke dalam lima labu ukur 10 mL yang berbeda, kemudian masing-masing diencerkan hingga volume 10 mL dengan DMSO biasa dan dihomogenkan, sehingga diperoleh lima larutan standar dengan konsentrasi yang berbeda (0,002; 0,004; 0,006; 0,008; dan 0,010 mM) untuk pembuatan kurva kalibrasi.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Silan Terkonjugasi Polietilen Glikol Asam Folat (APTMS-PEG-FA)**

Dalam penelitian ini, asam folat yang tergabung dalam APTMS-PEG-FA bertindak sebagai ligan target yang secara selektif mengikat sel kanker yang mengekspresikan reseptor folat berlebih. Jika ligan ini ditambahkan kedalam agen kontras, identifikasi sel kanker dapat dilakukan lebih presisi selama pemindaian MRI, sehingga meningkatkan spesifisitas deteksi kanker. Untuk penempelan asam folat, pertama-tama asam folat diikatkan pada senyawa silan (3-Aminopropil) trimetoksisilana (APTMS). Pengikatan ini dicapai melalui reaksi esterifikasi EDC/NHS, di mana asam folat diubah menjadi ester

NHS dan kemudian bereaksi dengan gugus amina pada APTMS. Gugus amina pada APTMS sering digunakan dalam modifikasi permukaan nanopartikel karena kecenderungannya yang kuat untuk membentuk ikatan kovalen dengan berbagai molekul (Fauzia & Bahti, 2023).



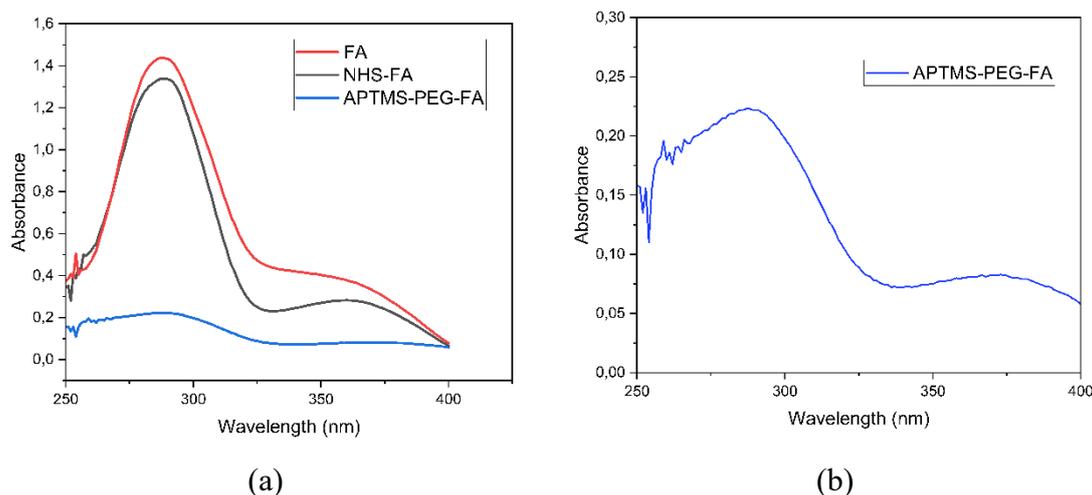
**Gambar 1.** Skema dugaan sintesis APTMS-PEG-FA dari asam folat, PEG dan APTMS melalui reaksi EDC/NHS

Sintesis APTMS-PEG-FA dimulai dengan mengaktifkan gugus karboksil (-COOH) pada posisi  $\gamma$  asam folat menggunakan metode EDC/NHS, ditunjukkan pada Gambar 1. Langkah aktivasi ini memungkinkan gugus  $\gamma$ -karboksil bereaksi dengan gugus amina dari H<sub>2</sub>N-PEG-COOH, menghasilkan pembentukan FA-PEG-COOH. Selanjutnya, FA-PEG-COOH digabungkan dengan (3-Aminopropil) trimetoksisilana (APTMS) untuk menghasilkan APTMS-PEG-FA. Pembentukan ester NHS dari asam folat (NHS-FA) berfungsi untuk melindungi gugus  $\gamma$ -karboksil, yang lebih reaktif daripada posisi  $\alpha$ . Reaksi EDC/NHS umumnya digunakan untuk menempelkan asam folat ke nanopartikel untuk penggunaan biomedis (Fauzia dkk., 2016). Umumnya, konjugasi molekul atau biomolekul target ke permukaan nanopartikel melibatkan pembentukan ikatan amida antara gugus amino pada nanopartikel dan gugus karboksil pada molekul target, atau sebaliknya (Rana *et al.*, 2016). Dalam proses ini, gugus karboksil bereaksi dengan EDC membentuk zat antara o-asilisourea yang tidak stabil, yang kemudian distabilkan oleh

NHS, menghasilkan ester NHS aktif dari asam folat. Ester NHS yang teraktivasi ini kemudian dapat bereaksi secara efisien dengan gugus amina pada APTMS karena reaktivitasnya yang tinggi (Smith *et al.*, 2020).

### Karakterisasi APTMS-PEG-FA

Hasil APTMS-PEG-FA kemudian dikarakterisasi dengan spektrofotometer UV. Dalam karakterisasi dengan spektrofotometer UV, kandungan asam folat dibandingkan dengan spektrum UV-Vis FA dan NHS-FA.



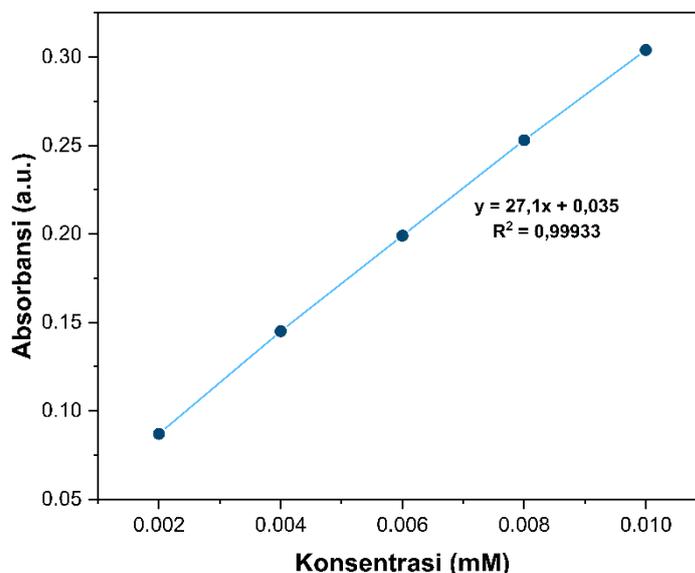
**Gambar 2.** Spektrum UV-Vis untuk a) FA (0,1 mmol), NHS-FA (0,02 mmol), APTMS-PEG-FA; dan b) perbesaran APTMS-PEG-FA.

Asam folat menunjukkan puncak serapan pada spektrum UV-Vis, ditunjukkan pada Gambar 2. Puncak ini muncul sekitar 288 dan 358 nm. Puncak pada 288 nm disebabkan oleh transisi elektronik dari  $\pi \rightarrow \pi^*$  yang berasal dari ikatan C=C pada cincin benzena dalam molekul asam folat. Sementara itu, puncak pada 358 nm berasal dari transisi elektronik dari  $n \rightarrow \pi^*$  yang berasal dari ikatan C=O pada gugus karboksilat dalam struktur asam folat (Fauzia & Bahti, 2023).

### Kurva Kalibrasi

Pembuatan kurva kalibrasi asam folat diawali dengan melarutkan senyawa tersebut dalam DMSO kering pada suhu 50°C, suatu langkah krusial untuk memastikan larutan homogen dan kelarutan optimal. Hal ini diperlukan karena asam folat diketahui memiliki kelarutan yang sangat rendah dalam air, sekitar 1,6 mg/L pada suhu 25°C (Batinić *et al.*, 2020), sehingga pelarut polar seperti air atau alkohol tidak efektif dalam melarutkannya secara sempurna. Proses pelarutan dilakukan pada suhu 50°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* untuk mempercepat pelarutan, namun tetap pada suhu sedang untuk mencegah kerusakan struktur kimia asam folat akibat panas berlebih. DMSO dipilih sebagai pelarut karena mampu melarutkan senyawa polar maupun nonpolar serta memiliki stabilitas terhadap suhu dan cahaya, sehingga ideal untuk

pembuatan larutan asam folat (Olmo *et al.*, 2022). Setelah larutan stok disiapkan, pengenceran bertahap dilakukan untuk menghasilkan larutan standar dengan konsentrasi berbeda, yang digunakan untuk membuat kurva kalibrasi dengan memplotkan absorbansi terhadap konsentrasi.



**Gambar 3.** Kurva kalibrasi asam folat dengan spektrofotometri UV-Vis pada rentang konsentrasi 0,002–0,010 mM

Kurva kalibrasi asam folat yang diperoleh menunjukkan hubungan linear yang sangat baik antara konsentrasi dan absorbansi, dengan persamaan regresi  $y = 27,1x + 0,035$  dan koefisien determinasi  $R^2$  sebesar 0,99933 (Gambar 3). Nilai  $R^2$  yang mendekati 1 menunjukkan bahwa hampir seluruh variasi dalam nilai absorbansi dapat dijelaskan oleh perubahan konsentrasi dalam rentang 0,002–0,010 mM. Kemiringan kurva sebesar 27,1 mencerminkan sensitivitas alat yang tinggi terhadap perubahan konsentrasi asam folat, sedangkan intersep sebesar 0,035 kemungkinan berasal dari absorbansi dasar pelarut atau gangguan sistemik ringan pada *baseline* (Matias *et al.*, 2014). Metode ini memiliki kemampuan deteksi yang sangat baik, ditunjukkan oleh batas deteksi (LOD) sebesar 0,000270 mM dan batas kuantifikasi (LOQ) sebesar 0,000820 mM, yang memungkinkan pengukuran asam folat pada konsentrasi yang sangat rendah, bahkan di bawah 1  $\mu\text{M}$ . Dengan linearitas yang tinggi dan batas deteksi rendah, kurva kalibrasi ini dapat diandalkan untuk analisis kuantitatif asam folat dalam aplikasi lanjutan seperti terapi target atau pencitraan kanker. Berdasarkan kurva kalibrasi tersebut, konsentrasi APTMS-PEG-FA yang terukur adalah  $0,33 \pm 0,05$  mM.

## KESIMPULAN

APTMS-PEG-FA berhasil disintesis dan dikarakterisasi menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis. Spektrum UV-Vis produk menunjukkan puncak serapan karakteristik pada 288 nm dan 358 nm, yang masing-masing disebabkan oleh transisi  $\pi$

→  $\pi^*$  dari cincin benzena dan transisi  $n \rightarrow \pi^*$  dari gugus karboksilat asam folat. Kurva kalibrasi asam folat pada rentang konsentrasi 0,002–0,010 mM menunjukkan linearitas sangat baik dengan persamaan regresi  $y = 27,1x + 0,035$  dan koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,99933. Metode ini menunjukkan sensitivitas tinggi dengan batas deteksi (LOD) sebesar 0,000270 mM dan batas kuantifikasi (LOQ) sebesar 0,000820 mM. Berdasarkan kurva kalibrasi, konsentrasi asam folat dalam konjugat APTMS-PEG-FA ditentukan sebesar  $0,33 \pm 0,05$  mM. Hasil ini menegaskan bahwa strategi konjugasi yang dimediasi EDC/NHS efektif, dan APTMS-PEG-FA hasil sintesis memiliki integritas kuantitatif yang tinggi. Dengan keberhasilan penggabungan asam folat ke dalam struktur konjugat, APTMS-PEG-FA berpotensi digunakan untuk penghantaran nanopartikel secara tertarget ke sel kanker yang mengekspresikan reseptor folat secara berlebihan, serta menawarkan prospek aplikasi dalam terapi kanker dan pencitraan diagnostik.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Padjadjaran atas dukungan akademik dan fasilitas penelitian yang diberikan selama pelaksanaan studi ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Batinić, P.M., Đorđević, V.B., Stevanović, S.I., Balanč, B.D., Marković, S.B., Luković, N.D., Mijin, D. & Bugarski, B.M. 2020. Formulation and characterization of novel liposomes containing histidine for encapsulation of a poorly soluble vitamin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 59: 101920.
- Chaudhari, R., Patel, V. & Kumar, A. 2024. Cutting-edge approaches for targeted drug delivery in breast cancer: beyond conventional therapies. *Nanoscale Advances*. 6(9): 2270–2286.
- Cueto-Díaz, E.J., Castro-Muñiz, A., Suárez-García, F., Gálvez-Martínez, S., Torquemada-Vico, M.C., Valles-González, M.P. & Mateo-Martí, E. 2021. APTES-based silica nanoparticles as a potential modifier for the selective sequestration of CO<sub>2</sub> gas molecules. *Nanomaterials*. 11(11): 2893.
- Elkhazein, T.A., Abdeljabar, T.A., Abdelrahman, A.N., Adam, M.E. & Shantier, S.W. 2022. Development and validation of UV-spectrophotometric method for the determination of folic acid in bulk and tablet dosage forms. *Journal of Applied Pharmaceutical Research*. 10(2): 19–23.
- Fauzia, R.P., & Bahti, H.H. (2023). Sintesis dan karakterisasi (3-aminopropil)-trimetoksisilan terkonjugasi asam folat untuk fungsionalisasi nanopartikel. *Chimica et Natura Acta*. 11(1): 36–40.
- Fauzia, R.P., Mutalib, A., Sodjanaatmadja, U.M.S., Anggraeni, A. & Bahti, H.H. 2016. Modifikasi metode sintesis gadolinium dietilentriaminpentaasetat sebagai senyawa pengontras magnetic resonance imaging. *Chimica et Natura Acta*. 4(1): 7–15.
- Fauzia, R.P., Sinambela, A.J., Afriani, Z., Jia, Q., Bahti, H.H. & Wyantuti, S. 2025. Synthesis and characterization of folic acid-modified polyethylene glycol-coated holmium nanoparticles as targeted magnetic resonance imaging agent candidate. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 53(1): 100478.
- Jokerst, J.V. & Gambhir, S.S. 2011. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*. 44(10): 1050–1060.

- Kamen, B.A., & Smith, A.K. 2004. A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models *in vitro*. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56(8): 1085–1097.
- Kaymaz, S.V., Nobar, H.M., Sarigül, H., Soyulkan, C., Akyüz, L. & Yüce, M. 2023. Nanomaterial surface modification toolkit: Principles, components, recipes, and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 322: 103035.
- Lu, Y. & Low, P.S. 2002. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 54(5): 675–693.
- Matias, R., Ribeiro, P.R.S., Sarraguça, M.C., & Lopes, J.A. 2014. A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests. *Analytical Methods*. 6(9): 3065–3071.
- Olmo, F., Rodriguez, A., Colina, A., & Heras, A. 2022. UV/Vis absorption spectroelectrochemistry of folic acid. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 26(1): 29–37.
- Rana, S., Shetake, N.G., Barick, K.C., Pandey, B.N., Salunke, H.G., & Hassan, P.A. 2016. Folic acid conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Dalton Transactions*. 45(43): 17401–17408.
- Selvaraj, S.P., & Chen, J.Y. 2023. Conjugation of antimicrobial peptides to enhance therapeutic efficacy. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 259: 115680.
- Smith, S., Goodge, K., Delaney, M., Struzyk, A., Tansey, N. & Frey, M. 2020. A comprehensive review of the covalent immobilization of biomolecules onto electrospun nanofibers. *Nanomaterials*. 10(11): 2142.
- Sudimack, J., & Lee, R.J. 2000. Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 41(2): 147–162.