

SENSOR KOLORIMETRIK BERBASIS AGREGASI NANOPARTIKEL EMAS DAN POLIMER RESPONSIF pH POLI(ASAM AKRILAT)

Erindyah R Wikantyasning*, Fika Rizqiyana, Broto Santoso, Suprpto
Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
email: erindyah.rw@ums.ac.id

Abstract

The synthesis and pH-sensitive behavior of poly(acrylic acid) (PAA) and gold nanoparticles (AuNPs) are presented. Gold nanoparticles was synthesized by Turkevich method and analyzed by TEM and UV-Vis spectrophotometer to determine particle size and optical properties, respectively. Synthesis of PAA was conducted in two steps, first by synthesizing of RAFT agent, and the second step is polymerization of acrylic acid using RAFT agents. The pH-responsive polymer was then characterize using H-NMR. AuNPs was succesfully synthesized, resulted particle size of about 14 nm in diameter. The solution containing PAA cross-linked by AuNPs showed color change from blue to red when pH was increased, due to the swelling of PAA in the higher pH. It was found that the color change was reversible, and the pH transition point was at pH 4-5.

Keywords: gold nanoparticles, poly(acrylic acid), colorimetric sensors, pH-responsive polymer

1. PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial adalah infeksi yang didapat oleh pasien setelah mendapat perawatan di rumah sakit atau unit kesehatan lainnya. Infeksi ini dapat terjadi jika dokter, perawat atau tenaga kesehatan lainnya menderita infeksi bakteri tertentu dan menularkannya melalui kontak dengan pasien yang sedang dalam perawatan. Penyebab lainnya bisa juga berasal dari pasien lainnya melalui kontak tangan, alat-alat kesehatan, atau air dan lingkungan di sarana kesehatan. Infeksi nosokomial dapat disebabkan antara lain oleh spesies *Candida*, *Escherichia coli*, *P aeruginosa*, MRSA, *C. diffile*, *S. pneumonia*, dll. Berbagai jenis bakteri tersebut dapat menginfeksi berbagai area tubuh seperti saluran cerna (20,6%, saluran kemih (19,9%), tempat pembedahan (14,5%), paru-paru (14,1%), kulit dan jaringan lunak (10,4%) dan aliran darah (7,0%) (Duerden, 2008).

Data dari Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) menunjukkan bahwa prevalensi infeksi nosokomial mencapai 10% dari seluruh pasien rawat inap dan menyebabkan kematian hingga 1,4 juta setiap hari di seluruh dunia (WHO, 2002). Di Indonesia,

prevalensinya mencapai 9,8%. Pada tingkat tersebut, infeksi ini menyebabkan problema tersendiri dalam bidang kesehatan, terkait dengan keselamatan pasien dan juga membengkaknya biaya kesehatan. Pasien dengan infeksi nosokomial akan mengalami perpanjangan durasi tinggal di rumah sakit, penurunan kualitas hidup, dan dalam beberapa kasus akan mengakibatkan cacat permanen maupun kematian (Coello *et al.*, 2011, Sarma and Ahmed, 2010).

Metode yang cepat dan efisien untuk deteksi dan identifikasi bakteri sangat diperlukan untuk mencegah dan mengatasi infeksi nosokomial. Selain itu, alat uji yang baik akan sangat membantu dokter untuk meresepkan antibiotik sesuai dengan infeksi yang diderita, untuk memonitor penggunaan antibiotik dan mencegah meluasnya resistensi antibiotik.

Metode yang biasa digunakan untuk mengidentifikasi bakteri adalah dengan teknik kultur. Teknik ini mempunyai beberapa kekurangan, antara lain memerlukan waktu yang lama dan harus dikerjakan oleh staf yang terlatih di laboratorium. Teknik PCR memungkinkan identifikasi yang lebih cepat, namun

membutuhkan peralatan yang mahal dan biaya yang tinggi (Francois *et al.*, 2003).

Pembuatan alat sensor bakteri dengan metode kolorimetrik dapat digunakan untuk memonitor infeksi nosokomial. Dibandingkan dengan teknik kultur, sensor kolorimetrik lebih sensitif, cepat, dan dapat digunakan pada *point-of-care* (tempat pelayanan kesehatan), atau tempat-tempat yang jauh dari sarana kesehatan, misalnya di daerah bencana atau daerah terpencil, tanpa memerlukan peralatan yang kompleks. Sensor ini dapat diformulasikan menjadi *hand gel*, plester, atau *portable kit* untuk mendeteksi patogenik bakteri.

Penelitian terdahulu telah dilakukan menggunakan polimer termoresponsif dan nanopartikel sebagai basis pembuatan sensor. Polimer termoresponsif dapat mengembang dan mengerut dengan adanya induksi perubahan suhu lingkungan. Perubahan fase ini akan mempengaruhi distribusi nanopartikel yang terdispersi di dalamnya, menjadi teragregasi pada saat polimer mengerut, dan terdeagregasi pada saat polimer mengembang. Agregasi dan deagregasi nanopartikel tersebut akan mengakibatkan perubahan warna yang dapat terbaca dengan mata telanjang (Wikantyasning, 2013).

Penggunaan polimer termoresponsif dalam sistem sensor tersebut mempunyai beberapa kekurangan, antara lain sangat dipengaruhi oleh suhu ruangan secara umum. Untuk mengatasi hal tersebut, direncanakan untuk menggunakan polimer responsif pH yang dikombinasi dengan nanopartikel. Penggunaan polimer responsif pH akan lebih menguntungkan karena patologis beberapa penyakit atau infeksi biasanya menyebabkan perubahan pH pada jaringan terinfeksi, disebabkan oleh metabolit yang dikeluarkan oleh bakteri patogenik (Alarcon *et al.*, 2005).

Berdasarkan uraian di atas, dalam penelitian ini akan dipelajari tentang sintesis kolorimetrik sensor berbasis polimer pH responsif yaitu poli(asam akrilat) dan nanopartikel, karakterisasi dan responnya terhadap perubahan pH.

2. KAJIAN LITERATUR

A. Nanopartikel Au

Nanopartikel metal dan semikonduktor mempunyai beberapa karakteristik yang unik dan berguna yaitu sifat-sifat elektronik, optikal maupun kimia. Nanopartikel Au (AuNPs) merupakan salah satu yang paling banyak diteliti karena kemudahannya dalam sintesis dan fungsionalisasi, stabilitas kimia, biokompatibilitas (toksisitas rendah) dan sifat optik dan elektronik yang mudah diatur. Sifat khusus nanopartikel metal adalah adanya *surface plasmon resonance* (SPR) pada spektra absorpsi visibel. SPR adalah interaksi resonan dari *band* elektron di permukaan nanopartikel saat dikenai sinar. Absorpsi ini tampak pada nanopartikel emas, perak maupun tembaga, namun tidak pada larutan bulknya (Kvasnicka *and* Homola, 2008).

Pada spektra absorpsi sinar tampak, SPR AuNPs secara spesifik muncul pada panjang gelombang ~ 520 nm. Hal inilah yang menyebabkan larutan AuNPs tampak berwarna merah. Namun absorpsi pada panjang gelombang tersebut dapat mengalami pergeseran merah atau biru, tergantung pada bentuk, ukuran, orientasi nanopartikel, jarak antar nanopartikel, dan juga kondisi dielektrik di sekitarnya. Perubahan warna koloid AuNPs dalam air dari merah menjadi biru dapat diamati jika terjadi agregasi yang signifikan hingga terbentuk klaster Au (Ishikawa *et al.*, 1996).

B. Nanosensor Kolorimetrik

Salah satu aplikasi dari SPR nanopartikel yaitu penggunaannya sebagai sensor kolorimetrik, berdasarkan agregasi dan deagregasi AuNPs ketika target spesifik terdeteksi. Penurunan jarak antar partikel akan memicu terjadinya agregasi yang selanjutnya akan mengubah sifat optik dari nanopartikel tersebut. Terjadinya pergeseran merah dari *plasmon band* akan menampakkan perubahan warna dari merah menjadi biru-keunguan yang dapat divisualisasi dengan mata telanjang (Zhou *et al.*, 2012).

Deteksi visual berdasarkan transisi warna AuNPs sangat berguna untuk deteksi yang cepat di rumah sakit atau sarana kesehatan,

dan dapat dilakukan oleh siapa saja, tanpa peralatan yang kompleks (He *et al.*, 2011).

C. Polimer responsifpH

Biopolimer seperti asam nukleat, protein atau polisakarida merupakan komponen dasar dalam makhluk hidup. *Smart material* dapat didesain menyerupai biopolimer dan menunjukkan respon terhadap perubahan lingkungan, sehingga menarik perhatian banyak peneliti, terutama dalam bidang biomedikal. Beberapa polimer sintesis dapat digolongkan dalam polimer responsif, karena kepekaannya terhadap suhu, pH, kekuatan ionik, cahaya, medan magnet atau senyawa biologis tertentu. Adanya kepekaan terhadap berbagai rangsangan tersebut menyebabkan perubahan fase atau konformasi, yang memungkinkan aplikasinya dalam sistem penghantaran obat, *tissue engineering* maupun sensor (Cabane *et al.*, 2012, Shim and Kwon, 2012).

pH adalah signal yang penting, yang dapat dideteksi oleh material responsifpH. Polimer yang dapat terionisasi dengan harga pKa antara 3 dan 10 merupakan kandidat yang baik untuk sistem responsifpH. Asam lemah dan basa lemah seperti asam karboksilat, asam fosfat dan amina menunjukkan perubahan dalam keadaan terion dengan adanya stimuli berupa perubahan pH. Hal ini akan menyebabkan perubahan konformasi dari polimer yang terlarut dan perubahan pada derajat pengembangan (*swelling degree*) dari hidrogel ketika gugus-gugus tersebut terikat pada struktur polimer. Beberapa monomer yang menunjukkan responsif pH antara lain: asam akrilat, asam metakrilat, anhidrat maleat dan dimetil amino etil metakrilat (Schoener *et al.*, 2012, Rabito *et al.*, 2012).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa sistem AuNPs/sisteamin/CMC menunjukkan sensitivitas terhadap perubahan pH, yang teramati dengan adanya agregasi/disagregasi AuNPs. Hal tersebut disebabkan karena aksi kombinasi antara perubahan struktur rantai CMC dan interaksi elektrostatis antara sisteamin dan CMC pada pH yang berbeda (Tan *et al.*, 2010).

3. METODE PENELITIAN

A. Bahan

Bahan utama: Kecuali dinyatakan lain, semua bahan dibeli dari Sigma: asam akrilat, $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, sodium sitrat tribasik, propanthiol, karbon disulfida, diklorometana, trietilamina, 1,4-bisklorometil benzena, MgSO_4 , Al_2O_3 , tetrahidrofuran, AIBN, gas argon, nitrogen cair, aseton, dietil eter, HCl, NaOH.

B. Alat

Hot plate stirrer, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10), kolom, rotary evaporator, NMR, TEM (JEOL JEM 1400).

C. Metode Penelitian

1. Sintesis AuNPs dengan metode reduksi sitrat

Nanopartikel Au disintesis dengan metode Turkevich (Turkevich *et al.*, 1953). Larutan $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (1,0 mM, 40,0 ml) dimasukkan dalam labu alas bulat dan dipanaskan hingga mendidih dengan disertai pengadukan. Larutan sodium sitrat (38,8 mM, 14,0 ml) ditambahkan dengan cepat. Campuran larutan tersebut dididihkan selama lebih kurang 5 menit, hingga terbentuk warna merah anggur. Selanjutnya larutan didinginkan pada suhu kamar dan disimpan di lemari pendingin. AuNPs dikarakterisasi dengan spektrofotometer UV-Vis dan TEM.

2. Sintesis polimer pH responsif

Sintesis polimer pH responsif dibuat dalam 2 tahap, yaitu sintesis agen RAFT dan polimerisasi monomer dengan metode RAFT.

a. Sintesis agen RAFT

Agen RAFT disintesis sesuai dengan penelitian sebelumnya (Bivigou-Koumba *et al.*, 2009). Senyawa sintesis selanjutnya dikarakterisasi dengan NMR.

b. Sintesis polimer pH responsif

Asam akrilat (244 mmol) dan AIBN (27,6 μmol) dilarutkan dalam tetrahidrofuran (3 mL), agen RAFT (276 μmol) dilarutkan dalam THF, dicampurkan, dialiri nitrogen gas selama 1 jam. Campuran tersebut direaksikan pada suhu 70°C selama 24 jam, Kemudian hasil dievaporasi untuk menghilangkan pelarut. Karakterisasi dilakukan dengan NMR.

3. Sintesis Poli(asam akrilat)-AuNPs

1,0 ml larutan AuNPs dicampur dengan larutan polimer responsif pH (5 mg/ml, 10-100 μ l).

4. Teknik analisis

a. Spektroskopi UV-Vis larutan AuNPs

Koloid AuNPs dimasukkan ke dalam kuvet. Absorbansi direkam dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm.

b. Analisis ukuran dan morfologi partikel dengan TEM

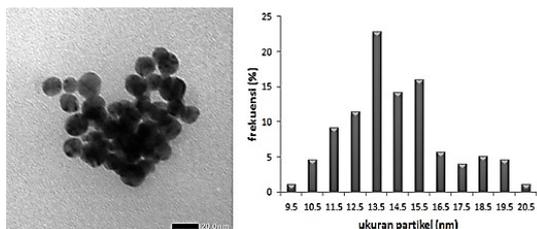
20 μ l sampel ditetaskan pada TEM copper grid yang dilapisi carbon. Selanjutnya grid dikeringkan pada suhu kamar. Data dianalisis dengan software *ImageJ*. Uji dilakukan dengan sampel Au-PMA pada berbagai pH, untuk melihat morfologi dan distribusi AuNPs pada berbagai pH tersebut.

c. Penentuan *pH transition point*

Larutan nanopartikel emas dibuat berbagai pH (pH 1-12) dengan penambahan HCl atau NaOH. PAA dimasukkan ke dalamnya dan diaduk hingga homogen. Diamati adanya perubahan warnanya dengan mata telanjang dan dengan mengukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 530 nm dan 680 nm.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

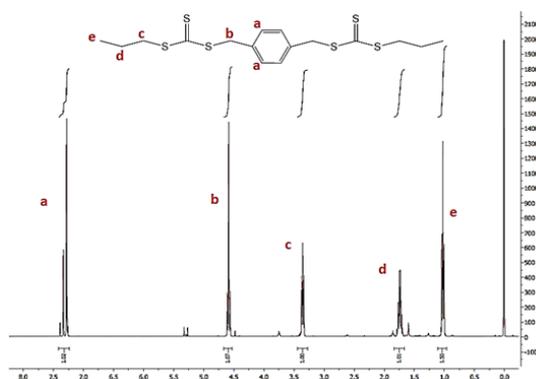
AuNPs disintesis dengan metode Turkevich. Reduksi $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ dengan sodium sitrat menghasilkan nanopartikel emas dengan diameter 10-100 nm yang stabil, dikarenakan adanya muatan negatif dari anion sitrat pada permukaan nanopartikel tersebut (Turkevich et al., 1953). Hasil sintesis AuNPs menunjukkan diameter (14.4 ± 2.35) nm, seperti ditunjukkan pada hasil uji TEM pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji TEM sintesis AuNPs dengan metode Turkevich dan distribusi ukuran partikelnya

Spektra UV-Vis nanopartikel emas menunjukkan karakteristik band SPR (*surface plasmon resonance*) dengan panjang gelombang yang menunjukkan absorbansi maksimum (λ_{max}) pada 532 nm. Poly(acrylic acid) (PAA) adalah polimer responsif pH.

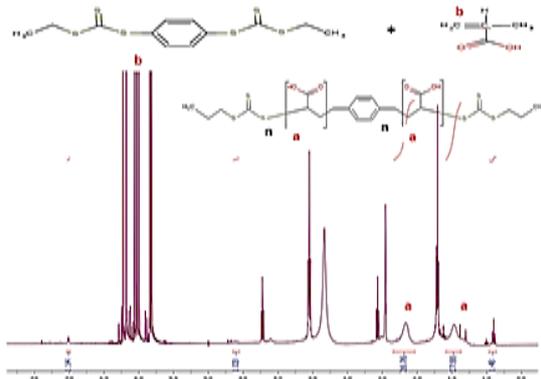
Dalam percobaan ini, PAA merupakan hasil polimerisasi asam akrilat dengan metode RAFT (*reversible addition-fragmentation chain transfer*) dengan menggunakan suatu agen RAFT bifungsional yaitu CTA2 yang disintesis sebelumnya. CTA2 merupakan agen RAFT dengan gugus tritrikarbonat di kedua sisinya, sehingga bisa mempolimerisasi monomer pada kedua sisi secara simetris. Hasil sintesis agen RAFT CTA2 ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Spektra H-NMR hasil sintesis agen RAFT, CTA2

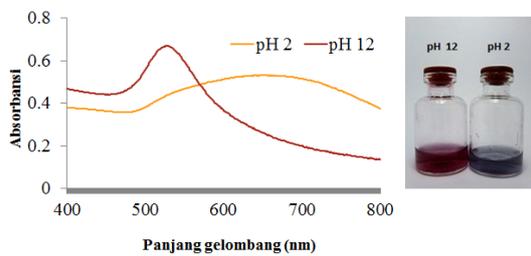
Reaksi sintesis memberikan hasil sebanyak 91% (12.24 gram). Spektra $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz dalam CDCl_3 , δ dalam ppm) adalah sebagai berikut: 7.30 (m, 4H, CH-aromatic); 4.62 (t, 4H, -CH₂); 3.38 (t, 4H, -CH₂); 1.77 (m, 4H, -CH₂); 1.05 (t, 6H, -CH₃).

Keuntungan dari penggunaan agen RAFT tersebut yaitu akan didapatkan polimer dengan gugus tritrikarbonat atau gugus tiol di kedua sisinya, sehingga kedua sisi polimer dapat mengikat nanopartikel emas, dan terjadilah crosslinking. Hasil polimerisasi asam metakrilat dengan metode RAFT dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Spektra H-NMR hasil polimerisasi poli(asam akrilat) dengan metode RAFT.

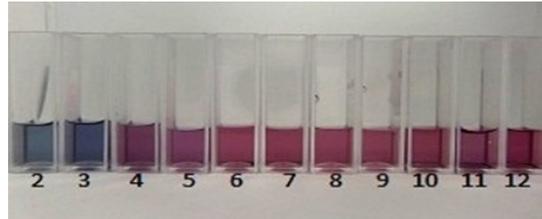
Larutan Au-PAA (crosslink antara AuNPs dengan PAA) dihasilkan dari pencampuran AuNPs dan PAA dengan perbandingan yang sesuai. Larutan Au-PAA pada pH 2 memiliki warna biru, dan pada pH 12 memiliki warna merah keunguan yang dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektra UV-Vis yang menunjukkan respon AuNPs-PAA terhadap perubahan pH (kiri), dan gambar larutan AuNPs-PAA yang berubah warna dari biru (pH 2) dan merah (pH 12) (kanan).

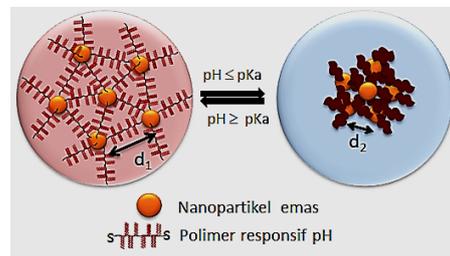
Gambar 5 menunjukkan mulai adanya perubahan warna dari biru (pH 2-3) menjadi ungu kemerahan (pH 4-5) dan akhirnya menjadi merah (pH \geq 6). Hal ini sesuai dengan penelitian lain yang menyatakan bahwa pKa asam akrilat adalah 4,2 (Charman et al., 1991).

Pada pH rendah ($<4,2$), poli (asam akrilat) akan berada dalam bentuk tak terion, sehingga kelarutannya rendah. Polimer tersebut akan mengkerut (*shrinking*), yang menyebabkan jarak antar nanopartikel emas menjadi lebih dekat hingga akhirnya teragregasi.



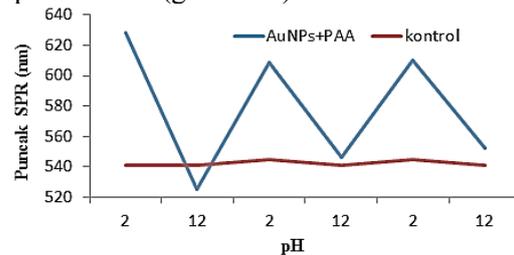
Gambar 5. Perubahan warna larutan AuNPs-PAA sebagai respon terhadap perubahan pH.

Agregasi nanopartikel emas ini menyebabkan larutan emas tampak berwarna biru. Sebaliknya, pada pH $>4,2$, polimer akan berada dalam bentuk terion yang larut dan mengembang (*swelling*). Hal ini menyebabkan jarak antar nanopartikel emas menjadi lebih lebar, terjadi deagregasi nanopartikel emas sehingga larutan tampak berwarna merah. Perubahan mengkerut dan mengembangnya polimer yang menyebabkan agregasi dan deagregasi nanopartikel dapat digambarkan dalam bagan pada gambar 6.



Gambar 6. Skema representasi crosslink AuNPs-PAA yang menunjukkan perubahan warna dengan adanya perubahan pH.

Perubahan warna Au-PAA bersifat reversibel ketika adanya pengaruh dari pH lingkungan. Reversibilitas tersebut dapat diamati dengan mata telanjang dan tampak dalam spektra UV-Vis, di mana pergeseran puncak SPR dapat teramati (gambar 7).



Gambar 7. Reversibilitas AuNPs-PAA ditunjukkan oleh pergeseran peak SPR pada larutan asam dan basa berulang kali.

Gambar 7 menunjukkan perubahan warna AuNPs-PAA dari merah menjadi biru berulang kali, saat pH dinaikkan atau diturunkan melewati harga pKa. Hal ini menunjukkan bahwa peristiwa agregasi/deagregasi nanopartikel merupakan akibat dari reversibilitas polimer responsif pH, yang dapat mengembang dan mengerut berulang kali sesuai dengan pH lingkungannya.

5. SIMPULAN

Dari hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa sintesis poli(asam akrilat) sebagai polimer responsif pH telah berhasil dilakukan. PAA hasil sintesis dapat dicrosslink dengan nanopartikel emas, untuk menghasilkan sensor kolorimetrik. Sensor kolorimetrik tersebut mampu mendeteksi perubahan pH dengan menunjukkan perubahan warna dari biru menjadi merah pada pH4-5.

Hasil penelitian ini selanjutnya akan diaplikasikan secara *in vitro*, dengan mengkonjugasikan suatu senyawa target pada polimer pendant, yang diharapkan dapat digunakan untuk mendeteksi senyawa-senyawa biologis maupun bakteri berdasarkan adanya perubahan pH.

6. REFERENSI

- Alarcon, C. D. H., Pennadam, S. & Alexander, C. 2005. Stimuli Responsive Polymers For Biomedical Applications. *Chemical Society Reviews*, 34, 276-285.
- Bivigou-Koumba, A. M., Kristen, J., Laschewsky, A., Muller-Buschbaum, P. & Papadakis, C. M. 2009. Synthesis Of Symmetrical Triblock Copolymers Of Styrene And N-Isopropylacrylamide Using Bifunctional Bis(Trithiocarbonate)S As Raft Agents. *Macromolecular Chemistry And Physics*, 210, 565-578.
- Cabane, E., Zhang, X., Langowska, K., Palivan, C. G. & Meier, W. 2012. Stimuli-Responsive Polymers And Their Applications in Nanomedicine. *Biointerphases*, 7.
- Charman, W., Christy, D., Geunin, E. & Monkhouse, D. 1991. Interaction Between Calcium, A Model Divalent Cation, and A Range Of Poly (Acrylic Acid) Resins As A Function Of Solution pH. *Drug Development And Industrial Pharmacy*, 17, 271-280.
- Coello, R., Brannigan, E., Lawson, W., Wickens, H. & Holmes, A. 2011. Prevalence Of Healthcare Device-Associated Infection Using Point Prevalence Surveys Of Antimicrobial Prescribing And Existing Electronic Data. *Journal Of Hospital Infection*, 78, 264-268.
- Duerden, B. 2008. Controlling Healthcare-Associated Infections In The NHS. *Clinical Medicine*, 8.
- Francois, P., Pittet, D., Bento, M., Pepey, B., Vaudaux, P., Lew, D. & Schrenzel, J. 2003. Rapid Detection Of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Directly From Sterile Or Nonsterile Clinical Samples By A New Molecular Assay. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41.
- He, S., Liu, D., Wang, Z., Cai, K. & Jiang, X. 2011. Utilization Of Unmodified Gold Nanoparticles In Colorimetric Detection. *Science China-Physics Mechanics & Astronomy*, 54.
- Ishikawa, H., Ida, T. & Kimura, K. 1996. Plasmon Absorption of Gold Nanoparticles and Their Morphologies Observed By AFM. *Surface Review And Letters*, 3, 1153-1156.
- Kvasnicka, P. & Homola, J. 2008. Optical Sensors Based on Spectroscopy Of Localized Surface Plasmons On Metallic Nanoparticles: Sensitivity Considerations. *Biointerphases*, 3, Fd4-Fd11.
- Rabito, M. F., Reis, A. V., Freitas, A. D. R., Tambourgi, E. B. & Cavalcanti, O. A. 2012. A pH/Enzyme-Responsive Polymer Film Consisting Of Eudragit (R) Fs 30 D And Arabinoxylane As A Potential Material Formulation For Colon-Specific Drug Delivery System.

- Pharmaceutical Development And Technology*, 17.
- Sarma, J. B. & Ahmed, G. U. 2010. Infection Control With Limited Resources: Why And How To Make It Possible. *Indian Journal Of Medical Microbiology*, 28.
- Schoener, C. A., Hutson, H. N. & Peppas, N. A. 2012. pH-Responsive Hydrogels With Dispersed Hydrophobic Nanoparticles For The Delivery Of Hydrophobic Therapeutic Agents. *Polymer International*, 61.
- Shim, M. S. & Kwon, Y. J. 2012. Stimuli-Responsive Polymers And Nanomaterials For Gene Delivery And Imaging Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64.
- Tan, J. J., Liu, R. G., Wang, W., Liu, W. Y., Tian, Y., Wu, M. & Huang, Y. 2010. Controllable Aggregation And Reversible Ph Sensitivity Of Aunps Regulated By Carboxymethyl Cellulose. *Langmuir*, 26, 2093-2098.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. 1953. The Formation Of Colloidal Gold. *Journal Of Physical Chemistry*, 57, 670-673.
- Wikantyasning, E. D. R. 2013. *Responsive Gels Incorporating Nanoparticles for Biomedical Analyses*. University Of Nottingham.
- Zhou, Y. L., Yang, Z. C. & Xu, M. T. 2012. Colorimetric Detection of Lysine Using Gold Nanoparticles Aggregation. *Analytical Methods*, 4, 2711-2714.