

► Pengaruh Waktu Pengukuran Terhadap Hasil Pengukuran Jari-Jari Partikel Dengan Hamburan Cahaya Dinamis

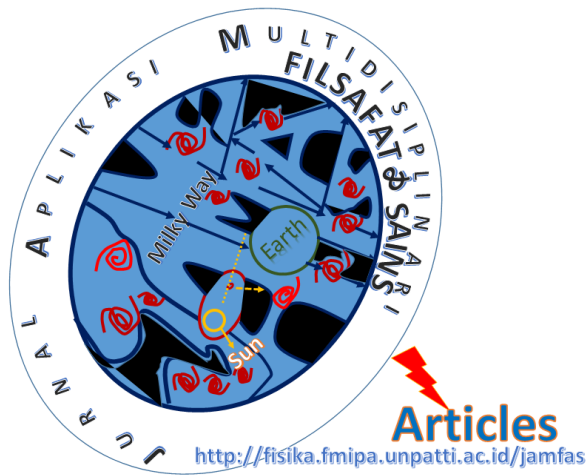
Filsafat dan Sains Bio-partikel

Philipus J. Patty ► Jurusan Fisika FMIPA Universitas Pattimura, Jl. Ir. M. Putuhena – Kampus Poka, Ambon 97233 – Indonesia. Email: p.patty@fmipa.unpatti.ac.id. Received on Saturday, 9th January 2016. Accepted on 11 January 2016 ► 1/11/2016

Abstract

Dalam studi ini, hasil karakterisasi distribusi jari-jari vesikel lipida dengan menggunakan metode hamburan cahaya dinamis (HCD) dikaji berdasarkan waktu pengukuran, yang bervariasi dari 100 sampai 10.000 detik. Distribusi jari-jari vesikel direpresentasikan oleh nilai rata-rata dari jari-jari vesikel, dan polidispersitasnya, yang didefinisikan sebagai rasio antara standar deviasi dengan nilai rata-rata jari-jari vesikel. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa terdapat waktu minimum pengukuran yang diperlukan untuk memperoleh hasil HCD yang dapat diandalkan. Dalam eksperimen ini, untuk rata-rata jari-jari vesikel 60-an nm, waktu minimum yang diperoleh adalah 500 detik. Waktu minimum ini berbeda-beda sesuai dengan besar partikel: untuk partikel yang lebih besar, diperlukan waktu yang lebih lama.

Key words: hamburan cahaya dinamis, vesikel lipida, waktu pengukuran.



Pengaruh Waktu Pengukuran Terhadap Hasil Pengukuran Jari-Jari Partikel Dengan Hamburan Cahaya Dinamis

1. Pendahuluan

Hamburan cahaya dinamis (HCD) merupakan salah satu metode yang banyak digunakan dalam mengkarakterisasi ukuran partikel dalam skala nanometer. Misalnya HCD digunakan dalam mengukur jari-jari vesikel [1-4], dan dalam pengukuran agregasi partikel [5-7]. Hamburan cahaya dinamis ini menjadi pilihan dari banyak peneliti dibandingkan dengan metode-metode lainnya seperti scanning electron microscope (SEM) atau transmission electron microscope (TEM), karena selain murah, persiapan sampel mudah, dan eksperimennya tidak merusak sampel yang digunakan.

HCD mendeteksi gerak Brownian dari partikel, dan menghubungkan gerak ini dengan besar dari partikel tersebut yang dalam hal ini direpresentasikan dengan jari-jarinya. Dalam HCD, sampel partikel diiluminasi dengan cahaya dalam hal ini laser, dan oleh

partikel cahaya dihamburkan ke segala arah, yang selanjutnya dideteksi oleh sebuah detektor pada arah tertentu. Detektor dalam HCD eksperimen merekam intensitas setiap waktu yang dihamburkan partikel untuk interval waktu yang sangat kecil yang disebut waktu tunda. Selanjutnya dari data intensitas tersebut dihitung fungsi korelasi waktu dari intensitas. Dengan menggunakan model tertentu, fungsi korelasi waktu dari intensitas dihubungkan dengan jari-jari partikel. Jadi di dalam HCD, jari-jari partikel ditentukan dari fungsi korelasi waktu dari intensitas.

Salah satu hal yang juga kurang diperhatikan oleh pengguna HCD adalah waktu pengukuran. Waktu pengukuran harusnya dibuat secukupnya sedemikian rupa sehingga secara statistik hasil pengukurannya dapat diandalkan. Jika waktunya terlalu sedikit, jumlah data tidak dapat diandalkan secara statistic. Sebaliknya, jika waktunya terlalu lama, akan menjadi tidak efisien. Sepanjang pengetahuan penulis, belum ada peneliti yang secara sistimatis mengkaji pentingnya waktu dalam pengukuran dengan HCD. Berdasarkan hal tersebut, dalam tulisan ini, akan ditampilkan hasil pengukuran distribusi jari-jari vesikel yang terbuat dari lipida yang diukur dengan waktu yang bervariasi, yang dapat memberikan pencerahan tentang pentingnya waktu dalam pengukuran dengan HCD. Tulisan ini lebih ditekankan pada aspek paedagogik, dengan maksud memperkenalkan metode HCD kepada para pembaca.

2. Hamburan Cahaya Dinamis

Pengukuran dengan HCD melibatkan analisa fungsi auto korelasi waktu dari intensitas cahaya yang dihamburkan oleh partikel yang dilakukan oleh sebuah korelator digital. Fungsi auto korelasi waktu dari intensitas

cahaya $\langle I(t)I(t + \tau) \rangle$ adalah rata-rata berdasarkan waktu dari perkalian antara $I(t)$, intensitas pada saat t , dengan $I(t + \tau)$, intensitas pada saat $t + \tau$, dimana τ adalah waktu tunda [11]. Fungsi auto korelasi waktu dari intensitas cahaya yang ternormalisasi $g^2(\tau)$ dapat ditulis sebagai

$$g^2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t)I(t) \rangle} \quad (1)$$

Fungsi auto korelasi waktu dari intensitas cahaya yang ternormalisasi $g^2(\tau)$ ini dapat ditulis dalam fungsi auto korelasi waktu dari medan listrik cahaya yang ternormalisasi $g^1(\tau)$ sebagai [8]

$$g^2(\tau) = 1 + \beta [g^1(\tau)]^2, \quad (2)$$

di mana

$$g^1(\tau) = \frac{\langle E(t)E^*(t + \tau) \rangle}{\langle E(t)E^*(t) \rangle}, \quad (3)$$

dan β bergantung pada geometri dari detektor.

Untuk sampel yang terdiri atas partikel-partikel yang berukuran sama, karena gerak Brownian dari partikel-partikel tersebut, $g^1(\tau)$ menurun dengan waktu secara eksponensial [9]

$$g^1(\tau) = \exp(-\Gamma \tau). \quad (4)$$

Dalam Pers. (4), laju penurunan $\Gamma = Dq^2$ bergantung pada koefisien difusi partikel D dan besar dari vektor gelombang hamburan q . Jadi, dalam HCD, data pertama yang diperoleh adalah $g^2(\tau)$, yang daripadanya diturunkan $g^1(\tau)$ berdasarkan Pers. (2). Dari $g^1(\tau)$ ditentukan laju penurunan $\Gamma = Dq^2$ yang daripadanya diperoleh koefisien diffuse D . Jari-jari partikel R selanjutnya dapat

ditentukan dengan menggunakan relasi Stokes-Einstein:

$$R = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}, \quad (5)$$

di mana η dan T , masing-masing adalah viskositas dan suhu dari medium partikel berdifusi, dan k_B adalah konstanta Boltzmann.

Biasanya sampel terdiri atas partikel yang mempunyai jari-jari yang berbeda-beda dengan distribusi tertentu. Untuk sampel seperti ini, terdapat distribusi dari laju penurunan, alih-alih hanya satu laju penurunan. Dengan demikian, $g^1(\tau)$ dapat ditulis sebagai

$$g^1(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma) \exp(-\Gamma \tau) d\Gamma, \quad (6)$$

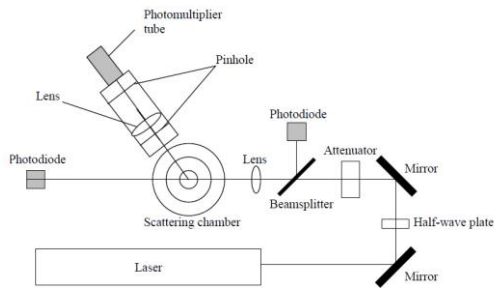
di mana $G(\Gamma)$ menggambarkan distribusi dari laju penurunan. Distribusi jari-jari partikel akan diperoleh dari distribusi laju penurunan. Proses untuk memperoleh jari-jari partikel sama seperti dijelaskan di atas, kecuali hasil yang diperoleh bukan jari-jari tunggal, tetapi distribusi jari-jari. Jadi biasanya dalam karakterisasi partikel dengan HCD hasil yang diperoleh adalah rata-rata jari-jari partikel dan standard deviasinya yang merupakan representasi dari distribusi jari-jari.

3. Metodologi

3.1. Peralatan

Peralatan yang digunakan untuk pengukuran HCD adalah ALV DLS/SLS-5000 spectrometer/goniometer (ALV-Laser GmbH of Langen, Germany). Peralatan terdiri atas laser He-Ne dengan daya 23 mW,

attenuator, pengontrol suhu, peralatan optik, dan fotodioda. Set-up peralatan ditunjukkan pada Gambar 1. Intensitas hamburan cahaya direkam oleh korelator digital ALV-5000/E Multiple Tau. Korelator ini dapat mengukur fungsi korelasi dengan waktu tunda dari 200 ns sampai beberapa jam. Semua peralatan diletakkan di atas meja optik Melles-Griot untuk menghindari vibrasi eksternal.



Gambar 1. Set-up peralatan penelitian.

3.2. Pembuatan Vesikel

Partikel yang digunakan dalam eksperimen ini adalah lipida vesikel, vesikel yang terbuat dari bahan lipida. Vesikel yang diukur jari-jarinya terbuat dari lipida 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (POPC). Prosedur pembuatan vesikel mengikuti protocol yang dideskripsikan oleh Patty dan Frisken [2]. Sampel lipida dihidrasi dengan air, kemudian dilakukan proses pemanasan dan pendinginan, yang dilanjutkan dengan ekstrusi melalui pori-pori pada polycarbonate track-etch membrane.

3.3. Analisa Data

Data fungsi korelasi waktu dari intensitas hamburan cahaya oleh sampel vesikel dianalisa dengan menggunakan metode cumulants [10]. Dalam metode cumulants, fungsi auto korelasi waktu dari intensitas cahaya yang ternormalisasi $g^2(\tau)$ ditulis sebagai

$$g^2(\tau) = B + \beta [g^1(\tau)]^2. \quad (7)$$

Pada Pers. (2) baseline dari data diasumsikan sebagai 1, sedangkan pada Pers. (7) dinyatakan sebagai B yang ditentukan dari proses fit. Demikian juga fungsi auto korelasi waktu dari medan listrik cahaya yang ternormalisasi $g^1(\tau)$ ditulis sebagai

$$g^1(\tau) = \exp(-\bar{\Gamma}\tau) + \left[1 + \frac{\mu_2}{2!} \tau^2 - \frac{\mu_3}{3!} \tau^3 + \dots \right], \quad (8)$$

di mana $\bar{\Gamma}$ adalah rata-rata dari laju penurunan fungsi korelasi, dan μ_n adalah momen ke n dari distribusi. Dengan demikian maka ekspresi fungsi korelasi waktu untuk intensitas dapat ditulis sebagai

$$g^2(\tau) = B + \beta \left[\exp(-2\bar{\Gamma}\tau) + \left[1 + \frac{\mu_2}{2!} \tau^2 \right]^2 \right]. \quad (9)$$

Dalam eksperimen ini, Fungsi korelasi waktu dari intensitas hamburan yang diekspresikan oleh Pers. (9) difit pada data fungsi korelasi waktu dari intensitas yang diukur oleh korelator. Ada 4 parameter yang ditentukan oleh proses fit ini, antara lain: B , β , $\bar{\Gamma}$, dan μ_2 . Nilai rata-rata dari jari-jari partikel diperoleh dari nilai rata-rata laju penurunan fungsi korelasi $\bar{\Gamma}$ lewat relasi Stokes-Einstein,

$$\bar{R} = \frac{k_B T q^2}{6\pi\eta\bar{\Gamma}}. \quad (10)$$

Polidispersitas dari distribusi jari-jari partikel, yang dalam hal ini didefinisikan sebagai rasio antara standard deviasi dengan nilai rata-rata dari laju penurunan fungsi korelasi didefinisikan sebagai

$$\sigma = \frac{\mu_2}{\bar{\Gamma}}. \quad (11)$$

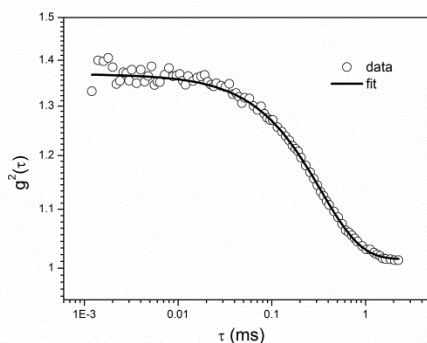
Proses fit dilakukan dengan menggunakan non-linear fungsi fit kuadrat terkecil yang ditulis dengan menggunakan bahasa pemrograman C. Program ini memetakan ekspresi Pers. (9) pada data dengan cara memvariasikan 4 parameter di atas, sampai memperoleh hasil yang cocok antara data dan model dari Pers. (9). Keandalan dari fit model pada data diindikasikan oleh

$$\chi^2 = \frac{1}{N - m} \sum \frac{(y_i - f_i)^2}{s_i^2}, \quad (12)$$

di mana y_i dan s_i masing-masing adalah data fungsi korelasi waktu dan standard deviasinya, serta f_i adalah model yang diekspresikan oleh Pers. (9). Hasil fit yang terbaik adalah fit dengan minimum χ^2 .

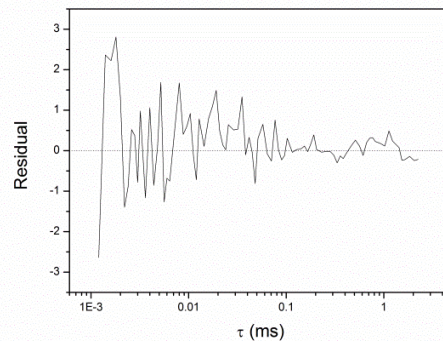
4. Hasil dan Pembahasan

Dalam studi ini, data fungsi korelasi waktu untuk intensitas hamburan cahaya yang dihamburkan oleh sampel vesikel dalam air direkam untuk waktu yang bervariasi dari 100 sampai 10.000 detik. Gambar 2 merupakan salah satu contoh data fungsi korelasi waktu dari intensitas cahaya yang ditunjukkan bersama-sama dengan hasil fit.



Gambar 2. Contoh data fungsi korelasi waktu dari intensitas cahaya yang dihamburkan oleh sampel lipida vesikel dalam air.

Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa model yang digunakan bersesuaian dengan data. Kesesuaian model dengan data juga ditunjukkan oleh residual yang merupakan selisih antara model dengan data yang ditunjukkan pada Gambar 3. Dari kesesuaian fit dengan data yang ditunjukkan pada Gambar 2, dan residual pada Gambar 3 yang berfluktuasi di sekitar angka nol, dapat dikatakan bahwa sistim analisa data dengan fit pada studi ini dapat diandalkan.

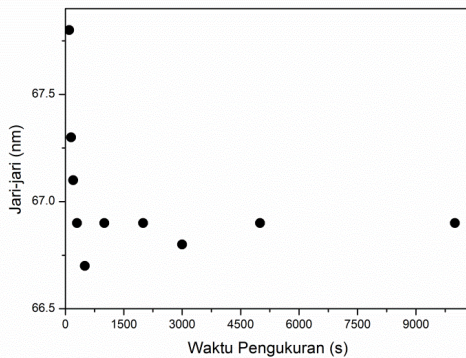


Gambar 3. Residual yang merupakan selisih antara data dengan model.

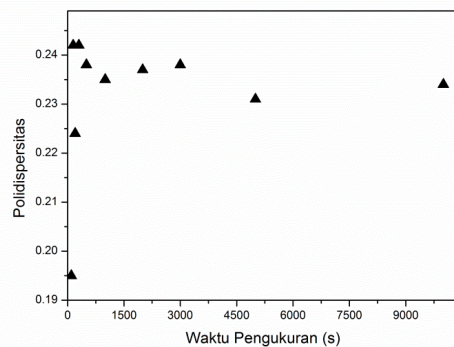
Dari hasil fit untuk data yang diambil dengan waktu pengukuran yang berbeda-beda, parameter B dan β mempunyai nilai yang sama, sedangkan rata-rata jari-jari dan polidispersitas mempunyai nilai yang berbeda-beda. Hal ini menunjukkan bahwa kedua parameter yang pertama lebih berkaitan dengan peralatan yang digunakan, sedangkan kedua parameter terakhir lebih berkaitan dengan sampel yang diukur.

Gambar 4 dan Gambar 5 masing-masing menunjukkan nilai rata-rata jari-jari vesikel dan polidispersitas distribusi jari-jari vesikel yang ditentukan lewat proses fit untuk eksperimen dengan waktu pengukuran yang bervariasi dari 100 sampai 10.000 detik. Pola yang ditunjukkan keduanya hampir sama, di mana pengukuran dengan waktu yang singkat

menunjukkan fluktuasi, dan pada waktu yang relatif lama, nilai keduanya menunjukkan suatu nilai yang stabil. Dari kedua data, dapat dikatakan bahwa waktu yang diperlukan untuk memperoleh nilai yang stabil adalah sekitar 500 detik.



Gambar 4. Jari-jari (rata-rata) vesikel yang terukur dengan HCD sebagai fungsi waktu pengukuran.



Gambar 5. Polidispersitas distribusi jari-jari vesikel yang terukur dengan HCD sebagai fungsi waktu pengukuran.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat suatu waktu minimum untuk karakterisasi ukuran partikel dengan HCD. Jika pengukuran HCD dilakukan dengan waktu pengukuran lebih kecil dari waktu minimum tersebut, maka hasil pengukurannya tidak dapat diandalkan sepenuhnya. Hasil penelitian ini mengimplikasikan bahwa setiap melakukan pengukuran HCD, waktu pengukuran harus mendapat suatu perhatian.

Walaupun hasil penelitian ini telah menunjukkan bahwa waktu pengukuran harus menjadi perhatian peneliti, hasil penelitian ini tidak dapat memberikan gambaran yang umum tentang waktu pengukuran yang diterapkan untuk tiap pengukuran. Hasil penelitian ini hanya mengimplikasikan bahwa jika jari-jari partikel sekitar 60-an nm, maka waktu minimum sekitar 500 detik. Pertanyaan penting yang muncul dari pernyataan ini adalah peneliti tidak mengetahui jari-jari partikel, bagaimana peneliti dapat menentukan waktu pengukurannya. Hal praktis yang dapat dilakukan untuk menjawab pertanyaan ini adalah dengan melakukan pengukuran singkat yang dapat memberikan gambaran kasar tentang jari-jari partikel. Penentuan waktu pengukuran dapat dilakukan dengan hasil pengukuran singkat ini.

Bahwa waktu pengukuran yang diperoleh dari hasil penelitian ini hanya berlaku untuk ukuran partikel 60-an nm saja disebabkan oleh fakta bahwa untuk partikel yang lebih besar, laju penurunan fungsi korelasinya lebih lama, sehingga diperlukan waktu pengukuran yang lebih lama dalam mengakomodasi jumlah data yang cukup secara statistik. Misalnya vesikel yang dihasilkan lewat proses ekstrusi dapat bervariasi dari jari-jari 50 sampai 200 nm [2], dan untuk vesikel yang lebih besar dalam prakteknya selalu diukur dengan waktu yang lebih lama. Hal yang sama juga dilakukan untuk agregasi partikel, misalnya untuk vesikel [5] atau partikel kompleks lainnya [6,7].

Hasil penelitian ini juga mengimplikasikan bahwa jika waktu pengukuran harus mendapat perhatian peneliti dalam eksperimen HCD, maka perlu dibuat suatu model yang dapat memprediksi waktu pengukuran untuk ukuran partikel yang berbeda-beda. Model ini dapat

diprediksi, jika dilakukan pengukuran seperti yang dilakukan di dalam penelitian ini, tetapi menggunakan partikel dengan berbagai ukuran. Dari hasil pengukuran tersebut dapat diperoleh waktu pengukuran minimum untuk sampel dengan ukuran yang berbeda-beda. Diharapkan dari informasi ini, dapat dibuat suatu model yang diinginkan.

5. Kesimpulan

Hasil studi ini menunjukkan bahwa dalam pengukuran dengan HCD diperlukan suatu waktu pengukuran minimum yang menghasilkan pengukuran yang dapat diandalkan. Waktu pengukuran yang lebih kecil dari waktu pengukuran minimum memberikan hasil pengukuran yang tidak stabil. Waktu yang lebih besar dari waktu minimum memberikan hasil yang stabil, tetapi tidak diperlukan waktu yang lebih lama, karena tidak efisien. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa untuk partikel dengan jari-jari 60-an nm, diperlukan waktu pengukuran minimum sekitar 500 detik.

Daftar Pustaka

- [1]. B.J. Frisken, C. Asman and P.J. Patty. Studies of vesicle extrusion. *Langmuir* 16:928-933, 2000.
- [2]. Patty, P.J., and Frisken, B.J., The pressure-dependence of the size of extruded vesicles. *Biophys. J.* 85, pp. 996 - 1004, 2003.
- [3]. Patty, P.J., and Frisken, B.J., Direct determination of the number-weighted mean radius and polydispersity from dynamic light-scattering data. *Applied Optics* 45, pp. 2209 - 2216, 2006.
- [4]. Palmieri V., Lucchetti D., Gatto I., Maiorana A., Marcantoni M., Maulucci G., Papi M., Pola R., De Spirito M., Sgambato A. Dynamic light scattering for the characterization and counting of extracellular vesicles: a powerful noninvasive tool. *Journal of Nanoparticle Research* 16, pp.2583, 2014.
- [5]. Taneva, S.G., Patty, P.J., Frisken, B.J., and Cornell, R.B. *CTP:Phosphocholine Cytidylyltransferase Binds Anionic Phospholipid Vesicles in a Cross-Bridging Mode.* *Biochemistry* 44, pp. 9382 – 9393, 2005
- [6]. Otter, C.A., Patty, P.J., Williams, M.A.K., Waterland, M.R., dan Telfer, S.G. Mechanically interlocked gold and silver nanoparticles using metallosupramolecular catenane chemistry. *Nanoscale* 3, pp. 941 – 944, 2011.
- [7]. Fischer, J., Hall, J.D., Patty, P.J., Williams, M.A.K., Mark R. Waterland, M.R., dan Telfer, S.G. Stereoselective aggregation of chiral complexes with threefold-symmetric pendant carboxyl groups: an example of “perfect” self-assembly not seen in the crystalline state? *RSC Adv.* 3, pp.12648 – 12654, 2013.
- [8]. Berne, B.J., dan Pecora, R. *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics.* Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [9]. P. Stepanek. Data analysis in dynamic light scattering. In W. Brown. Ed., *Dynamic Light Scattering : The Method and Some Applications*, pp.177-241. Oxford University Press, Oxford, 1993.
- [10]. B.J. Frisken. Revisiting the method of cumulants for analysis dynamic light scattering data. *J. Appl. Opt.* 40, pp.4087-4091, 2001