

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental laboratorium untuk menghasilkan AuNP teroptimasi, sebagai platform biosensor dengan metode kolorimetri-spektrofotometri untuk Autentikasi Halal produk olahan daging. Dalam penelitian ini, dilakukan imobilisasi nanopartikel emas dengan *probe Molecular Beacon* (MB), untuk kemudian siap divalidasi terhadap target spesifik maupun nonspesifik. Namun, pada penelitian ini, peneliti hanya melakukan sampai tahap imobilisasi nanopartikel dengan *probe* MB. Hasil yang diharapkan berupa sebaran dan ukuran AuNP dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) serta data berupa absorbansi dan panjang gelombang maksimum dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

Tempat :

1. Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY
2. *Molecular Medicine and Therapy Research Laboratory* FKIK UMY
3. Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam Lembaga Ilmu Pengetahuan  
Indonesia (LIPI) Gunungkidul

Waktu : Juli 2018 - Mei 2019

## C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

### 1. Variabel Penelitian

- a. Optimasi Nanopartikel Emas
  - Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi Asam Tertakloroaurat ( $\text{HAuCl}_4$ ) dan volume Natrium Sitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ).
  - Variabel tergantung dari penelitian ini adalah ukuran partikel, pola distribusi partikel, panjang gelombang dan absorbansi.
- b. Imobilisasi Nanopartikel Emas dengan *Probe Molecular Beacon* (MB)
  - Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi *probe* MB dan NaCl, suhu, serta waktu inkubasi.
  - Variabel tergantung dari penelitian ini adalah nilai absorbansi dan panjang gelombang maksimum dari imobilisasi AuNP dengan *probe* MB serta pola distribusi partikel dan ukurannya.

### 2. Definisi Operasional

Dalam penelitian ini terdapat batasan operasional variabel, yaitu:

- a. Ukuran AuNP adalah ukuran yang didapat setelah dilakukan optimasi nanopartikel emas, yaitu sekitar 20-27 nm (Rohiman, dkk, 2014).
- b. Pola sebaran AuNP adalah gambaran hasil dari dengan perbesaran 6300 kali (Aprilia, 2018).

- c. Absorbansi imobilisasi merupakan serapan yang dibaca oleh Spektrofotometri UV-Vis, terkait penempelan *probe* MB dengan AuNP tersebut dengan  $\lambda$ -maksimum (Panjang gelombang maksimum) 500-550 nm.
- d. Imobilisasi AuNP-MB ialah proses penempelan antara *probe* MB dengan AuNP.

#### **D. Bahan dan Alat Penelitian**

##### **1. Bahan untuk Optimasi Nanopartikel Emas (AuNP)**

Asam tetrakloroaurat ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) dari Sigma-Aldrich, Co. LLC., USA, Natrium Sitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ ), dan *Water For Injection* (WFI).

##### **2. Bahan untuk Imobilisasi AuNP dengan *Probe Molecular Beacon* (MB)**

*Probe* MB (IDT Genetika), Tris-HCl (pH 7,2), NaCl, AuNP (Sigma-Aldrich, Co. LLC., USA), Natrium Hidroksia (NaOH), *Dithiothreitol* (DTT), buffer asetat (pH 5,2), buffer Tris-asetat (pH 8,2).

##### **3. Peralatan**

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beker gelas berbagai ukuran, pipet volume berbagai ukuran, mikropipet berbagai ukuran, timbangan analitik Metler Toledo Al 204, *Barnstead Thermolyne Cimarec Hot Plate Magnetic Stirrer* SP131325 7x7, *Scanning Electron Microscope* (SEM) Hitachi SU 3500, *Shaking Incubator* FS-50B, *General Incubator* LIB-030M, pH meter OMEGA PHH222, dan Spektrofotometri UV-Vis Jasco V-730.

## E. Cara Kerja

### 1. Optimasi Nanopartikel Emas (AuNP)

Tahapan awal dalam mengoptimasi AuNP adalah dengan mereduksi H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> dalam larutan aqua 100 mL dengan natrium sitrat. Dilakukan pembuatan larutan H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub> dengan seri kadar 0,0635; 0,127; 0,19; 0,254; 0,635; dan 1,27 (mM) (Jingyue & Bernd, 2015). Dilakukan penambahan 2,5 mL natrium sitrat dengan konsentrasi 38,8 mM secara cepat ke dalam H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>, dilakukan pengadukan dan pemanasan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 270 rpm dengan suhu 150 °C hingga terbentuk perubahan warna dari kuning pucat menjadi *red wine*. Selanjutnya dilakukan untuk seri kadar lainnya. Larutan siap digunakan dan apabila belum digunakan, disimpan ditempat yang kedap cahaya dengan suhu 4 °C. Untuk melihat sebaran ukuran partikel AuNP yang dihasilkan, larutan tersebut dibaca dengan menggunakan SEM dan untuk melihat absorbansi dan panjang gelombang yang dihasilkan, diukur menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis.

### 2. Imobilisasi AuNP dengan *Probe Molecular Beacon* (MB)

Dalam melakukan penempelan (imobilisasi) antara AuNP dengan *probe* MB, harus dilakukan pada lingkungan yang sesuai. Oleh karena itu, untuk menjaga agar lingkungan tetap sesuai, maka dibutuhkan beberapa reagen pendukung yang dilakukan pencampuran secara bertahap. Langkah pertama menyiapkan wadah yang sesuai, yaitu dengan cara *soak* (merendam) vial dengan NaOH 12 M selama 1 jam. Kemudian vial di bilas dengan WFI dan dikeringkan. Selanjutnya campur 3 bahan ke dalam vial secara berurutan: 36 µL *probe* MB,

0,5  $\mu\text{L}$  DTT (100 mM) dan 6,4  $\mu\text{L}$  buffer asetat (500 nM pH 5,2). Campuran ketiganya diinkubasi selama 1 jam pada suhu 25 °C di *General Incubator* (Larutan 1). Kemudian Larutan 1 ditambah dengan 3000  $\mu\text{L}$  AuNP (Larutan 2). Selanjutnya dilakukan pengadukan menggunakan *Shaking Incubator* dengan kecepatan 512 rpm selama 4,5 jam kemudian diinkubasi selama 24 jam. Kemudian larutan 2 yang telah di inkubasi 24 jam ditambah dengan 175,6  $\mu\text{L}$  buffer tris asetat (500 nM pH 8,2) dan 123  $\mu\text{L}$  NaCl 100 mM, selanjutnya digojog perlahan (Larutan 3). Larutan 3 kemudian diinkubasi kembali di *General Incubator* selama 52 jam. Setelah 52 jam, larutan siap untuk dilakukan pengujian tahap selanjutnya, yaitu dengan Spektrofotometri Uv-Vis dan *Scanning Electron Microscope* (SEM).

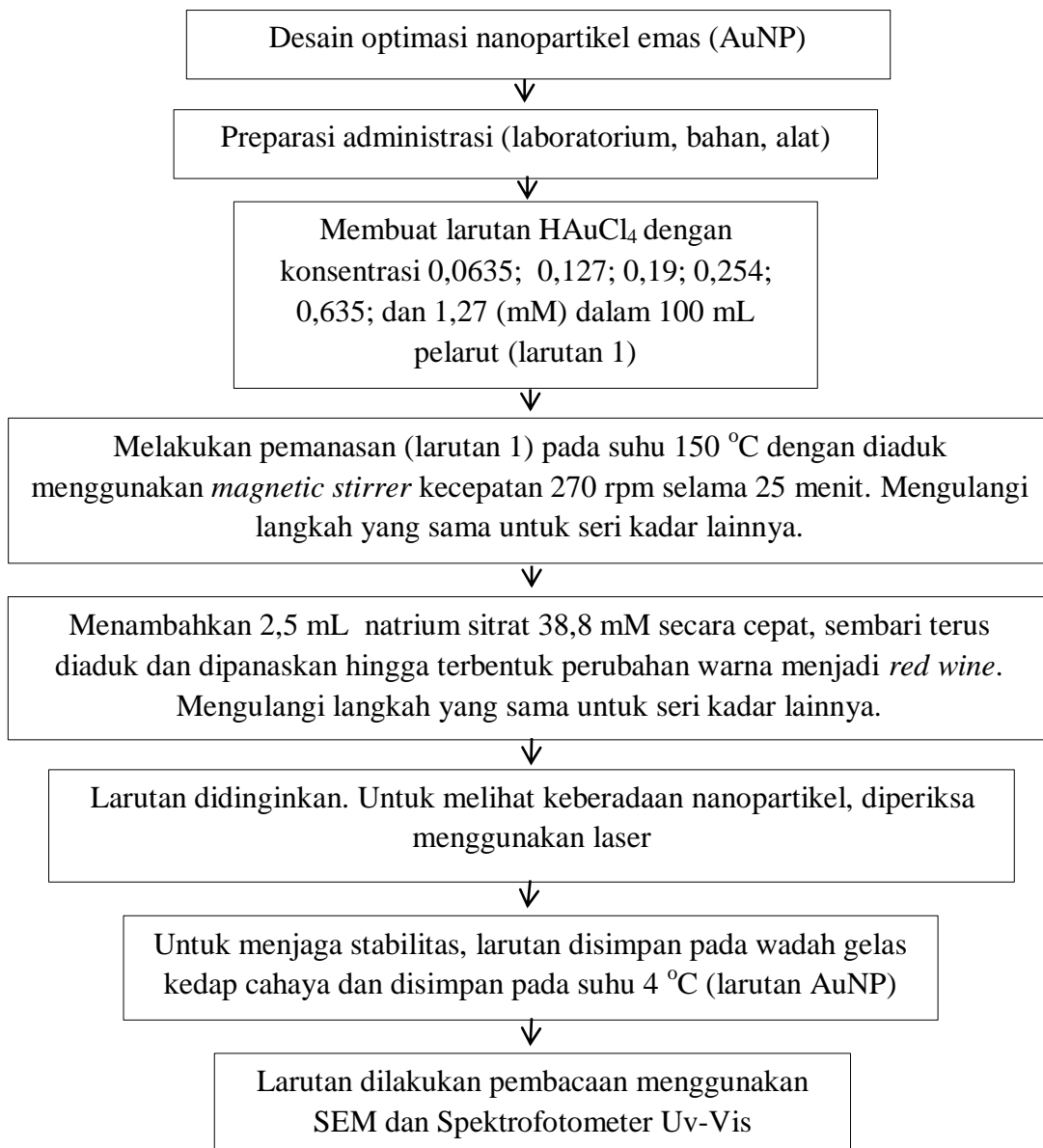
### **3. Preparasi Sampel untuk *Scanning Electron Microscope* (SEM)**

Terdapat 2 sampel yang akan dilakukan pengujian menggunakan SEM, yaitu sampel AuNP dengan konsentrasi 0,19 mM dan sampel imobilisasi AuNP dengan *probe* MB. Dalam pengujian menggunakan SEM, hanya diperbolehkan sampel dalam wujud padat. Oleh karena itu, sampel yang berbentuk larutan tersebut harus dipreparasi sedemikian rupa, sehingga dapat dilakukan pengukuran dengan SEM. Kedua Sampel tersebut dipreparasi dengan cara evaporasi, untuk menghilangkan kandungan pelarut dalam sampel. Sampel ditetesi menggunakan pipet tetes pada *Carbon tape* dan *Aluminium tape*. Tujuannya agar dapat langsung ditempalkan pada *sample holder*, dan keberadaan nanopartikel dapat melekat serta dapat menghantarkan elektron pada

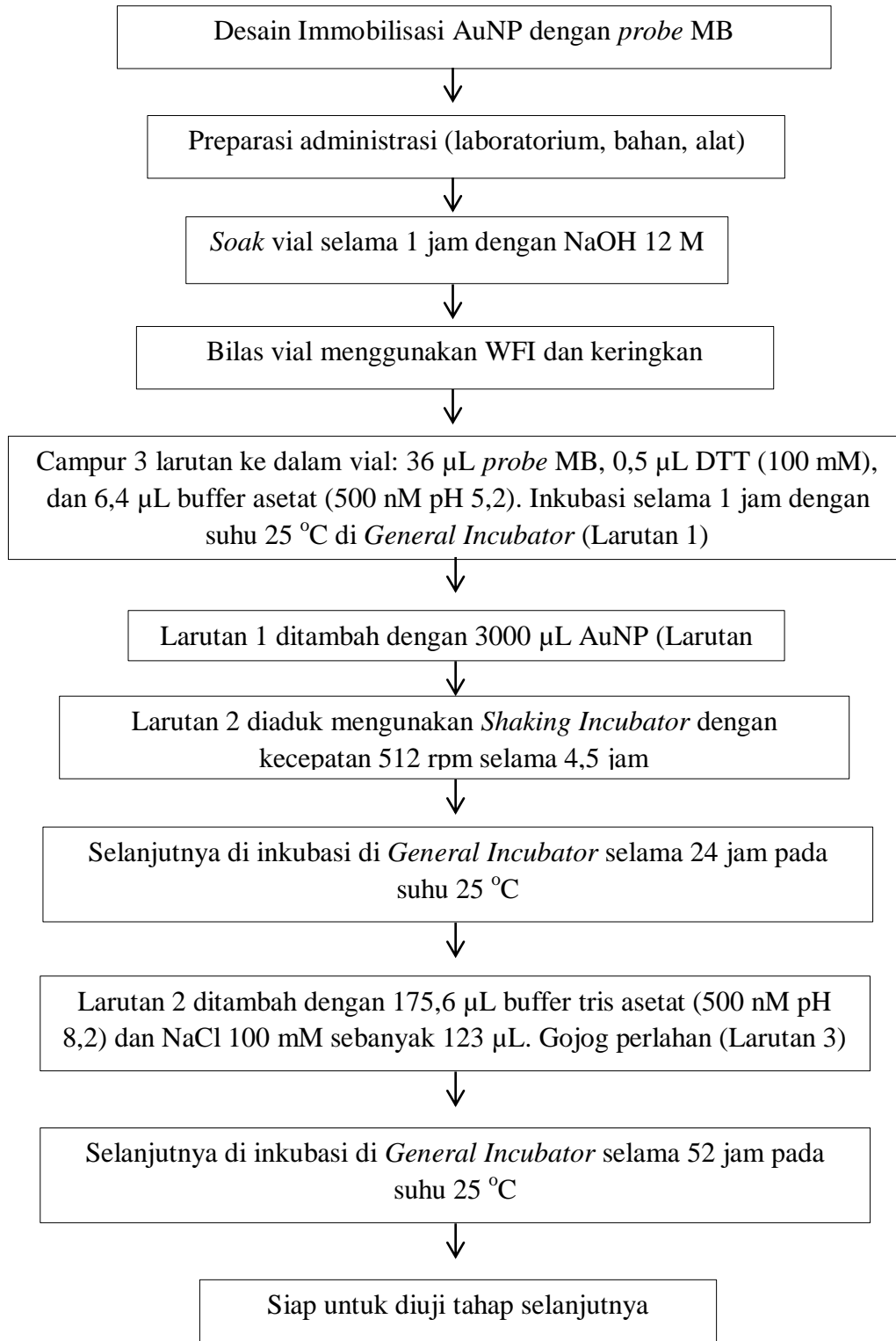
nanopartikel dengan baik. Kemudian sampel dievaporasi menggunakan *General Incubator* pada suhu 25-27 °C selama 24 jam. Penggunaan suhu yang terlalu tinggi dihindari, agar tape tidak mengkerut dan nanopartikel dapat terbaca dengan baik.

## G. Skema Langkah Kerja

### 1. Optimasi Nanopartikel Emas (AuNP)



## 2. Imobilisasi AuNP dengan *Probe Molecular Beacon* (MB)



### 3. Preparasi Sampel untuk SEM (*Scanning Electron Microscope*)

