

**OPTIMASI NANOPARTIKEL PERAK (AgNP) SEBAGAI PLATFORM IMOBILISASI
PROBE MOLECULAR BEACON (MB) UNTUK APLIKASI AUTENTIKASI HALAL
DENGAN METODE KOLORIMETRI.**

**OPTIMIZATION of SILVER NANOPARTICLES (AgNPs) AS THE PLATFORM of
MOLECULAR BEACON PROBE FOR APPLICATION of HALAL
AUTHENTICATION BY COLORIMETRIC METHOD**

*Amirah Haerani ** Hari Widada, M.Sc., Apt.

*Mahasiswa S1, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY

** Dosen, Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UMY

haeraniamirah@gmail.com

INTISARI

Halal merupakan aspek penting bagi umat Islam. Segala hal harus halal tidak terkecuali makanan. Menurut sensus nasional tahun 2010 sebesar 87% dari 237 juta penduduk Indonesia adalah muslim. Sedangkan sebanyak 73,89% produk Indonesia untuk kategori makanan, obat-obatan dan kosmetik belum bersertifikasi halal. Saat ini penggunaan nanopartikel dalam bidang kesehatan sedang marak digunakan termasuk nanopartikel perak (AgNP). Nanopartikel adalah partikel yang berukuran 10–100 nm. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kondisi optimum sintesis nanopartikel perak yang dapat diimobilisasi dengan *Probe Molecular Beacon* sebagai platform dalam pengembangan sistem autentikasi halal berbasis kolorimetri. Penelitian dilakukan secara eksperimental laboratorium dengan metode kolorimetri menggunakan hasil optimasi sintesis nanopartikel perak. Sintesis AgNP dibuat dalam empat variasi konsentrasi yaitu konsentrasi 2 mM; 1,5 mM; 1 mM; 0,5 mM. Empat konsentrasi menunjukkan warna jingga ketika AgNP telah terbentuk. Pengujian dilakukan dengan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM) dan Spektrofotometri UV-Vis sebelum dan sesudah imobilisasi. Data yang diperoleh adalah nilai absorbansi, panjang gelombang, rata-rata ukuran AgNP dan pola persebarannya. Hasil menunjukkan optimasi sintesis AgNP konsentrasi 1,5 mM yang paling stabil sehingga dapat diimobilisasi dengan *Probe Molecular Beacon*. Kestabilan AgNP bertahan selama kurang lebih 3 bulan. Hasil imobilisasi pada *Probe MB* ditandai dengan penurunan nilai absorbansi dari 0,69 menjadi 0,27 masing-masing sebelum dan sesudah imobilisasi. Panjang gelombang dan rata-rata ukuran yang didapat adalah 420 nm dan 70 nm, menunjukkan tidak ada agregasi nanopartikel. Pola persebaran partikel sebelum imobilisasi terlihat tersebar namun AgNP tidak terlihat secara jelas lewat pengujian dengan SEM. Kesimpulannya, AgNP-MB *Probe* terbukti dapat menjadi biosensor dalam aplikasi autentikasi halal dengan metode kolorimetri.

Kata Kunci: AgNP, kolorimetri, *Probe Molecular Beacon*, biosensor, imobilisasi

ABSTRACT

Halal is an important aspect for Muslims. All things to be halal is not an exception to food. According to the National Census in 2010 about 87% of 237 million Indonesian are Muslims. While in fact about 73,89% of Indonesia product, such as food, medicines, and cosmetics are not certified. In other side, nanoparticles including silver nanoparticles (AgNPs) use in the health analysis. Nanoparticles size is about 10-100 nm. The aim of this study is to determine the optimum condition synthesis of AgNPs and Molecular Beacon Probe as a platform of development in halal authentication based on Colorimetric method.

The study was conducted in experimental laboratories with Colorimetry method using the results of the optimization AgNPs. There are several solution concentrations like 2 mM; 1,5 mM; 1 mM; 0,5 mM. The solution show orange when AgNPs has formed. Testing with Scanning Electron Microscope (SEM) and Spectrophotometry UV-Vis before and after immobilization. The data obtained with absorbancy value, wavelengths, the average size of AgNPs and the pattern of the spread.

The result shows the most stable optimization of AgNP synthesis is 1, 5 mM concentrations so it can be immobilized with Probe Molecular Beacon. The stability of AgNP lasts for approximately 3 months. The wavelength and average size is 420 nm and 70 nm, indicating there is no aggregation of nanoparticles. The pattern of particle distribution before immobilization is seen scattered but AgNP is not clearly visible through testing with SEM. In conclusion AgNPs-MB Probe suitable to be a biosensor in halal authentication application with Colorimetry method,

Keywords: AgNPs, Colorimetry, Molecular Beacon Probe, biosensors, immobilization.

PENDAHULUAN

Makanan yang halal berarti makanan yang tidak terkontaminasi oleh bahan-bahan yang diharamkan seperti babi. Data pada sebuah kajian yang membahas pertanian dan peternakan

menunjukkan bahwa penggunaan daging babi di Pulau Jawa mencapai 13.661.059 ekor pertahun (AMI, 2015). Banyaknya jumlah konsumsi daging babi tersebut dikhawatirkan tidak hanya dalam bentuk segar seperti yag

dijual di pasar. Diduga daging babi tersebut juga terdapat pada olahan yang tidak mudah diidentifikasi seperti bakso, sosis, gelatin dan produk olahan lainnya (Maulana, 2016). Nanopartikel logam, seperti emas, perak, besi, zinc, dan oksida logam memiliki peluang besar dalam aplikasi biomedis karena luas permukaan yang besar dan rasio volumenya (Prasad *et al.*, 2013). Nanopartikel perak diketahui memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan nanopartikel emas, diantaranya sifat optisnya yang lebih baik dari nanopartikel emas (Caro *et al.*, 2010). Penelitian ini menggunakan metode reduksi kimia dalam sintesis nanopartikel perak (AgNP). AgNP akan digabungkan dengan *Probe Molecular Beacon* (MB). Probe MB adalah oligonukleotida spesifik yang digunakan sebagai sensor dan akan berpasangan dengan DNA target agar

menghasilkan fluoresensi sebagai indikator *Probe* MB dan DNA target adalah sekuens yang spesifik.

Pengembangan metode ini didasarkan pada metode kolorimetri. Metode Kolorimetri adalah suatu metode analisa kimia berdasarkan perbandingan intensitas warna larutan antara satu dengan yang lainnya. Prinsip dari indikator kolorimetri menggunakan nanopartikel berdasarkan pada sifat unik dari SPR (*Surface Plasmon Resonance*) suatu nanopartikel logam dan kemampuannya beragregasi (saling berikatan) dengan probe yang spesifik⁶. Kemudian diamati dengan Spektrofotometer UV-Vis dan SEM (*Scanning Electron Microscope*) untuk melihat morfologi hasil agregasi probe dan gen target.

Berdasarkan uraian diatas dilakukan optimasi dan pengembangan

terhadap metode analisis kehalalan produk daging dengan berbasis kolorimetri menggunakan nanopartikel perak dan *Molecular Beacon*.

METODE

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah beker gelas berbagai ukuran, pipet volum berbagai ukuran, mikropipet berbagai ukuran, timbangan analitik Metler Toledo Al 204, *Barnstead Thermolyne Cimarec Hot Plate Magnetic Stirrer* SP131325 7x7, *ice bath*, *Scanning Electron Microscope* (SEM) Hitachi SU 3500, *refrigerated centrifuge* BIOCEN 22 R, *Shaking Incubator* FS-50B, *General Incubator* LIB-030M, PH meter OMEGA PHH222, dan Spektrofotometri UV-Vis Jasco V-730.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah AgNO_3 (Sigma-Aldrich), Sodium Citrate, NaBH_4 (Sodium Borohydride), PVP (Polyvinylpyrrolidone) 6% dan 5%, NaCl dan Tris-HCl (pH 7,2) dari Sigma-Aldrich, Co. LLC., USA, larutan MB Probe dari IDT Genetika, larutan AgNP, larutan DTT (Dithiothreitol), larutan NaOH (Natrium Hidroksida).

Langkah Penelitian

1. Preparasi dan Optimasi (Nanopartikel Perak)

Tahap awal preparasi dan optimasi nanopartikel perak adalah larutan 10 ml mengandung 0,01 gr AgNO_3 (2 mM) ditambahkan dalam larutan 20 ml NaBH_4 (3 mM) yang sebelumnya telah dicampur dengan 2 ml PVP 5% dalam penangas es. Setelah bereaksi akan

diperoleh larutan kuning AgNP 1. Kemudian larutan 10 ml AgNP 1 dicampur dengan 10 ml sodium sitrat dan 10 ml PVP 6% direaksikan selama 5 menit kemudian ditambahkan 10 ml AgNO₃ dalam campuran, diaduk selama 60 menit untuk mendapatkan larutan oranye AgNP 2. Setelah itu larutan sudah dapat digunakan, apabila tidak langsung digunakan disimpan ditempat kedap cahaya bersuhu 4°C. Cara yang sama digunakan untuk membuat larutan AgNP konsentrasi 1,5 mM, 1 mM dan 0,5 mM.

2. Imobilisasi *Probe MB*

Pada tahap imobilisasi *probe molecular beacon* (MB) dan AgNP, vial yang akan digunakan sebagai wadah untuk imobilisasi direndam dalam NaOH 12 M selama 1 jam,

kemudian dibilas menggunakan aquabidest dan dikeringkan. Lalu dilakukan pencampuran 36 µl larutan MB Probe, 0,5 µl larutan DTT dan 6,4 µl larutan buffer asetat pH, terbentuk larutan 1. Larutan 1 selanjutnya diinkubasi dalam *general incubator* selama 1 jam dan ditambahkan 3.000 µl larutan AgNP, terbentuk larutan 2. Larutan 2 dilakukan pengadukan dengan *shaking incubator* kecepatan 120 rpm selama 4,5 jam kemudian diinkubasi dalam *general incubator* selama 24 jam. Kemudian ditambahkan 175,6 µl larutan buffer tris asetat mM pH dan 123 µl NaCl 100 mM sambil digojog pelan, terbentuk larutan 3. Selanjutnya inkubasi di *general incubator* selama kurang lebih 52 jam dengan temperatur 25°C. Hasil imobilisasi dianalisis dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan SEM. Dari hasil pengamatan

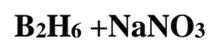
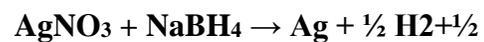
menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh data *lamda* (λ) maksimum dan absorbansi sedangkan pada SEM didapatkan data rata-rata ukuran dan pola persebaran partikel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

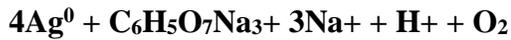
Optimasi Sintesis AgNP

Sintesis nanopartikel perak di penelitian ini menggunakan metode reduksi kimia, yaitu menggunakan larutan Na Sitrat dan larutan NaBH_4 untuk mereduksi AgNO_3 . Selain reduktor dibutuhkan juga senyawa lain sebagai stabilisator yaitu PVP (Polivynilpirolidon). Agen penstabil ini diperlukan untuk mencegah terjadinya aglomerasi antar nanopartikel yang terbentuk. Kecenderungan partikel yang berukuran nano untuk beraglomerasi dengan sesamanya dikarenakan area permukaan spesifik

yang besar. Area permukaan besar menghasilkan ikatan kimia yang membentuk dipol listrik yang sangat kuat sehingga aglomerasi lebih mudah terjadi (Ristiani, 2013). Pembuatan nanopartikel perak dilakukan dengan dua tahap, tahap pertama dengan mencampur perak nitrat dan natrium borohidrat. Reaksi berikut merupakan reaksi yang terjadi ditahap pertama dengan hasil warna larutan yang berwarna kuning pucat disetiap variasi konsentrasi.



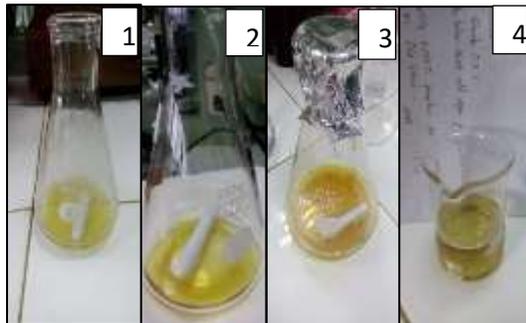
Tahap kedua pembuatan nanopartikel perak (AgNP) merupakan tahap yang membutuhkan natrium sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$) sebagai agen pereduksi untuk membantu reaksi pembentukan yang sebelumnya terjadi. Reaksinya dapat digambarkan sebagai berikut:



Dalam reaksi diatas ion Ag^+ akan berikatan dengan ion $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^-$ dan membentuk sebuah kompleks, yaitu kompleks $[\text{Ag}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{n}+1]3\text{n}-$. Kompleks tersebut berperan penting dalam proses reduksi untuk menghasilkan larutan AgNP dengan

warna kuning cerah yang dinamakan AgNP 2. Kompleks ini membantu perubahan Ag^+ menjadi Ag^0 secara lambat. Perubahan ini terjadi disuhu ruang dengan bantuan agen penstabil yaitu PVP 6% ditandai dengan perubahan warna menjadi kuning cerah dan semakin tinggi konsentrasi semakin pekat warna larutan.

Kestabilan Nanopartikel Perak



Gambar 1. Warna Koloid AgNP 2: 1 (konsentrasi 1 mM); 2 (konsentrasi 1,5 mM) dan 3 (konsentrasi 2 mM)

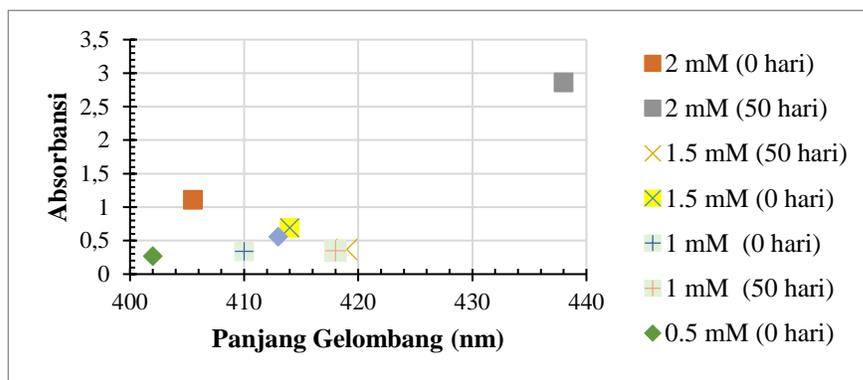
Ketidakstabilan AgNP dapat dilihat dengan mengukur puncak serapan menggunakan spektrofometri UV-Vis sesaat setelah pembentukan dan selang beberapa waktu setelah disimpan.

Agregasi atau bisa disebut pula aglomerasi ditandai dengan perubahan puncak serapan dalam pengukuran (Wahyudi dkk, 2011). Proses agregasi

menjadi indikator dalam kestabilan AgNP.

Hasil pengukuran yang ditunjukkan di gambar 2 dari empat variasi konsentrasi larutan nanopartikel perak yang telah dibuat oleh peneliti perubahan panjang gelombang tidak signifikan. Perubahan panjang gelombang berkisar di 410-430 nm yang merupakan panjang gelombang serapan khas nanopartikel perak. Keadaan ini menunjukkan

bahwa nanopartikel perak yang terbentuk relatif stabil sampai 50 hari setelah pembentukan. Namun, diantara semua sampel dengan konsentrasi berbeda keadaan yang lebih stabil ditunjukkan oleh konsentrasi 1,5 mM. Oleh karena itu konsentrasi 1,5 mM di anggap paling optimal.



Gambar 2. Hasil Pengukuran dengan Spektrofotometri UV-Vis

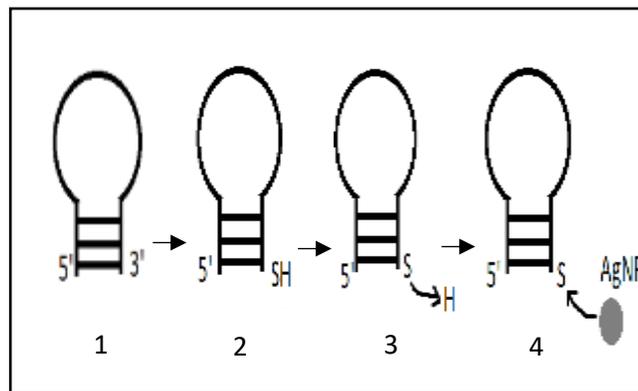
Imobilisasi *Probe* MB dan AgNP

Proses Imobilisasi *Probe* MB dan AgNP dilakukan dengan bahan utama adalah *Probe* MB gambar 3 (A) yang telah dimodifikasi salah satu ujungnya

dengan gugus SH (thiol) seperti pada gambar 3 (B). Proses imobilisasi sesuai dengan ilustrasi pada gambar 3 dilakukan dengan menggunakan DTT,

buffer tris asetat, buffer asetat dan NaCl. Keberadaan NaCl dalam reaksi, untuk memberikan efek ikatan ion yang dapat meningkatkan dan mempercepat hibridisasi antara *Probe* MB dengan nanopartikel (Widada, 2019). Sumber lain menjelaskan bahwa proses

imobilisasi akan berlangsung dengan baik, pada kondisi pH, keberadaan garam, dan konsentrasi buffer yang sesuai (Li & Rothberg, 2004). Setelah imobilisasi sampel dibaca dengan menggunakan SEM.



Gambar 3. Ilustrasi Alur Imobilisasi MB Probe dan AgNP.

	AgNP	AgNP-MB Probe
SEM	Rata-rata ukuran: 50 nm Pola Distribusi: tersebar	Rata-rata ukuran: 93 nm Pola Distribusi: menyatu
Spektrofotometri UV-	Panjang gel: 405 nm	Panjang gel: 423,5 nm
Vis	Absorbansi: 0,69	Absorbansi: 0,27

Tabel 1 Hasil Pengukuran dengan SEM dan Spektrofometri UV-Vis

Dari hasil uji pada tabel 1 tersebut dapat dikatakan bahwa imobilisasi pada penelitian ini berhasil karena penurunan nilai absorbansi antara sebelum dan sesudah imobilisasi secara berturut-turut yaitu 0,69 dan 0,27. Firmansyah (2012) menyatakan bahwa indikator keberhasilan imobilisasi dilihat dari penurunan nilai absorbansi. Selain itu data panjang gelombang menunjukkan kenaikan yang berarti larutan semakin pekat. Namun panjang serapan gelombang masih menunjukkan serapan khas

AgNP yaitu berada pada rentang 400-420 nm (Ristiani, 2013). Hal yang perlu diperhatikan pada proses imobilisasi agar berhasil adalah interaksi antara permukaan AgNP dan permukaan ikatan gugus fungsi oligonukleotida (*Probe* MB) yang dipengaruhi oleh jumlah gugus yang mengikat (Lee *et al.*, 2011). Pada penelitian oleh Li (2002) dilaporkan bahwa gugus thiol meningkatkan afinitas pengikatan oligonukleotida terhadap permukaan AgNP.

KESIMPULAN

1. Kondisi optimum dalam sintesis nanopartikel berada di konsentrasi 1,5 mM dengan kestabilan diatas 100 hari. Selain itu, hasil pengukuran SEM berupa nilai rata-rata ukuran nanopartikel yaitu 50 nm.
2. Proses imobilisasi dapat dikatakan berhasil karena terjadi penurunan nilai absorbansi dari 0,69 menjadi 0,27 sebelum dan sesudah imobilisasi. Selain itu, panjang gelombang sebelum dan sesudah imobilisasi berada pada rentang 410-430 nm yang merupakan panjang gelombang serapan khas untuk AgNP sesuai dengan penelitian Ristiani (2013).

SARAN

1. Peneliti selanjutnya dapat melanjutkan penelitian hingga proses autentikasi halal
2. Peneliti selanjutnya memperhatikan faktor-faktor yang mempengaruhi proses sintesis AgNP dan imobilisasi

DAFTAR PUSTAKA

- AMI. (2015). Data Konsumsi dan Populasi Babi di Indonesia. <http://puskapena.fapet.ugm.ac.id/2016/08/27/populasi-vs-konsumsi-daging-babi-kemanakah-larinya/>. Diakses tanggal 1 Juli 2019.
- Caro, C., M., P., Klippstein, R., Pozo, D., & P., A. (2010). Silver Nanoparticles: Sensing and Imaging Applications. *Silver Nanoparticles*. 210-213.
- Echlin, P. (2009). *Handbook of Sample Preparation for Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Springer. Berlin.
- Firmansyah, M. A. (2012). Perancangan Probe DNA Biosensor berbasis UV Spektrofometri Aplikasi pada *Salmonella* dan *E. Coli*. *Skripsi*.

- Fakultas Teknobiologi
Universitas Surabaya. Surabaya.
- Lee, J., S., Abigail K. R. Lytton-Jean, Sarah J. Hurst, and C. A. M. (2011). Silver Nanoparticle Oligonucleotide Conjugates Based on DNA with Triple Cyclic Disulfide Moieties. *NIH Public Access* 7(7), 2112–2115.
- Li, H., & Rothberg, L. (2004). Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(39), 14036–14039.
- Li, Z. Jin, R. Mirkin C, A. Letsinger R, L. (2002). Multiple thiol- anchor capped DNA-gold nanoparticle conjugates. *Nucleic Acids Research*, 30(7), 1558–1562.
- Maulana. (2016). Populasi vs Konsumsi Daging Babi kemanakah larinya? <http://puskapena.fapet.ugm.ac.id/2016/08/27/populasi-vs-konsumsi-daging-babi-kemanakah-larinya/>. Diakses tanggal 29 Juni 2019.
- Prasad, N., Yang, B., Kong, K. W., Khoo, H. E., Sun, J., Azlan, A., Romli, Z. Bin. (2013). Phytochemicals and Antioxidant Capacity from *Nypa fruticans* Wurmb. Fruit. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–9.
- Ristiani, Ina. (2013). Kajian Pengaruh Konsentrasi Perak Nitrat (AgNO_3). *Skripsi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang. Semarang.
- Wang. Y., Yang, F., Yang, Z. (2010). Colorimetric Detection of Mercury (II) Ion Using Unmodified Silver Nanoparticle and Mercury-Specific Oligonucleotides. *Applied Material and Interfaces*. 2 (2) 339-34