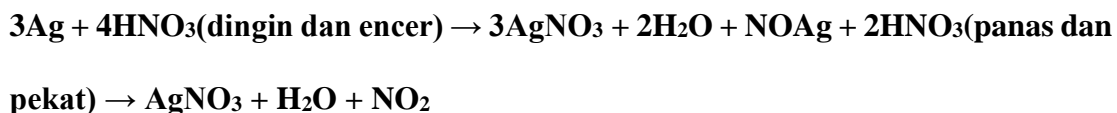


BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Optimasi Sintesis Nanopartikel Perak

Nanopartikel perak dibuat dari larutan perak nitrat (AgNO_3) yang diperoleh dengan mereaksikan logam perak (Ag) dan asam nitrat (HNO_3) yang dapat digambarkan dengan persamaan berikut (Vogel *et al.*, 1990)



Reaksi diatas menghasilkan tiga senyawa yaitu perak nitrat, air dan oksida nitrogen. Senyawa yang akan digunakan adalah perak nitrat sedangkan dua senyawa lain yaitu air dan nitrogen oksida yang tidak digunakan. Dalam tahap ini perak yang merupakan logam reaktif yang sukar larut dalam asam berkonsentrasi rendah direaksikan dengan asam nitrat yang merupakan oksidator kuat. Asam nitrat sebagai oksidator mampu mengoksidasi perak menjadi ion-ion perak melalui pemanasan pada suhu 90°C . Setelah melalui tahap pemanasan dengan asam nitrat yang panas dan encer maka diuapkan dan dikristalkan menjadi kristal putih. Pemanasan dilakukan karena asam nitrat dalam suhu ruang memiliki energi yang rendah dibandingkan asam nitrat yang telah dipanaskan (Vogel *et al.*, 1990). Sintesis perak nitrat dilakukan di bawah lemari asam karena selama reaksi ini berlangsung konsentrasi nitrogen oksida meningkat secara cepat. Perak nitrat memiliki sifat yang korosif dan berbahaya jika terpapar dalam jangka waktu yang lama. Penggunaan dalam waktu singkat jika tidak

memakai *handglove* akan menimbulkan noda kehitaman pada tangan.

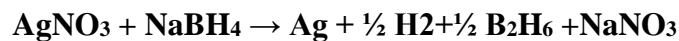
Pembuatan nanopartikel perak (AgNP) menggunakan larutan baku perak nitrat (AgNO_3). Larutan baku AgNO_3 dibuat dengan berbagai macam konsentrasi yaitu 2 mM; 1,5 mM; 1 mM; dan 0,5 mM. Selain larutan baku AgNO_3 , peneliti juga membuat larutan baku Na Sitrat, larutan NaBH_4 dan larutan PVP. Perhitungan larutan baku dapat dilihat di lampiran 3. Peneliti membuat seri kadar larutan baku AgNO_3 tersebut menggunakan pelarut yang sesuai yaitu *Water for Injection* (WFI). Cara pembuatan AgNP dalam penelitian ini mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Zhao (2016) dengan metode reduksi kimia.

Pada penelitian ini sintesis nanopartikel perak 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 (Polivinylpirolidon). 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).

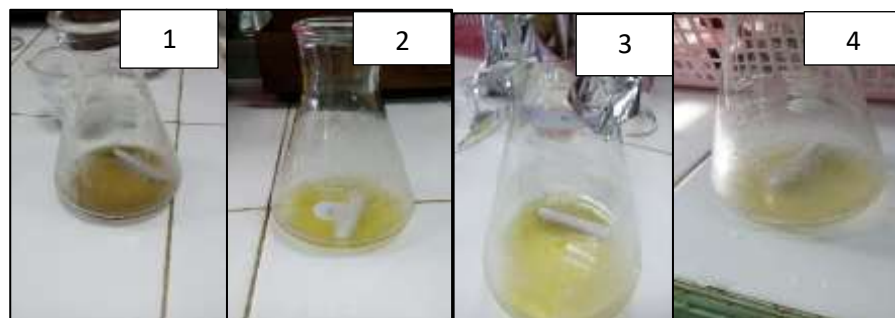
Proses sintesis AgNP dilakukan dengan mencampurkan 2 ml larutan PVP 5% dan 10 ml larutan NaBH_4 dalam elenmeyer yang diletakkan didalam *icebath*. Proses pencampuran menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 520 rpm. Kemudian diteteskan 10 ml larutan AgNO_3 , perubahan warna kuning pucat terbentuk sesaat setelah menambahkan tetes demi tetes (*drop wise*) larutan AgNO_3 , larutan AgNP 1 telah

terbentuk. Setelah itu 10 ml larutan Na Sitrat, 10 ml larutan PVP 6% dan 10 ml larutan AgNP 1 ditambahkan dan diaduk lagi selama 5 menit lalu ditambahkan 10 ml larutan AgNO₃ dan diaduk dengan kecepatan 520 rpm selama 1 jam. Pengadukan dapat menghomogenkan larutan dan mempercepat reaksi pembentukan nanopartikel. Proses ini juga mencegah terjadinya agregasi antarpartikel.

Dalam proses pembentukan AgNP ini hal yang paling berpengaruh dalam keberhasilan metode reduksi kimia adalah kecepatan dan temperatur yang digunakan. Suhu dan kecepatan yang sesuai akan membantu mereduksi ion Ag⁺ menjadi Ag⁰. Reaksi pembentukan dapat digambarkan sebagai berikut:



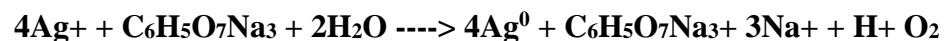
Pembuatan nanopartikel perak dilakukan dengan dua tahap, tahap pertama dengan mencampur perak nitrat dan natrium borohidrat. Reaksi di atas merupakan reaksi yang terjadi ditahap pertama dengan hasil warna larutan yang berwarna kuning pucat disetiap variasi konsentrasi, larutan tersebut dinamakan AgNP 1. Hasil dapat dilihat pada gambar 12.



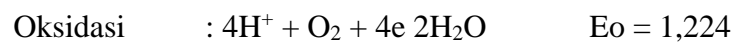
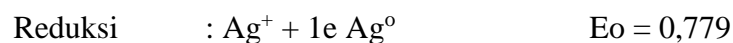
Gambar 12. Warna Koloid AgNP 1: 1 (konsentrasi 0,5 mM); 2 (konsentrasi 1 mM); 3 (konsentrasi 1,5 mM) dan 4 (konsentrasi 2 mM).

Warna kuning pucat tepat terbentuk sesaat setelah AgNO_3 diteteskan kedalam larutan NaBH_4 yang sebelumnya telah dicampur dengan PVP 5%. Penambahan PVP 5% bertujuan untuk mencegah agregasi nanopartikel yang ditandai dengan perubahan warna dari kuning pucat menjadi kuning keabuan. Proses pembuatan dalam tahap ini dilakukan dalam kondisi dingin, penulis menggunakan *ice bath* agar kondisi dingin terjadi mengikuti waktu perubahan warna larutan. Temperatur dingin membantu memperlambat reaksi pembentukan dan mengontrol hasil akhir nanopartikel yang terbentuk dari segi bentuk dan ukuran (Nordeens *et al.*, 2013).

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:

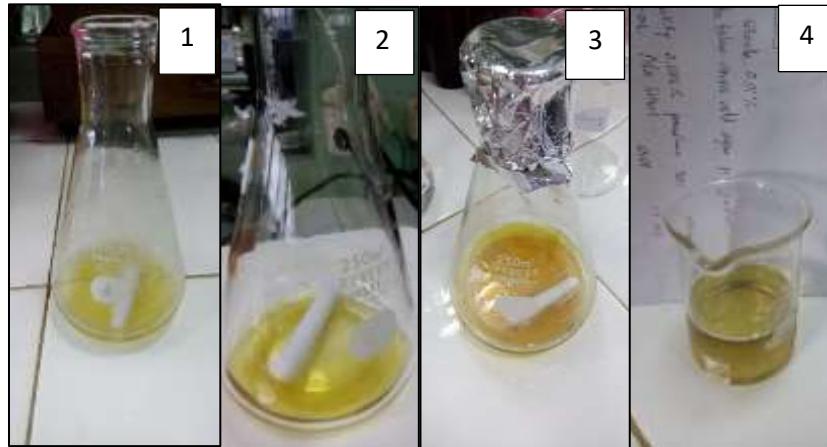


Reaksi diatas dapat digambarkan dengan energi potensialnya sebagai berikut:



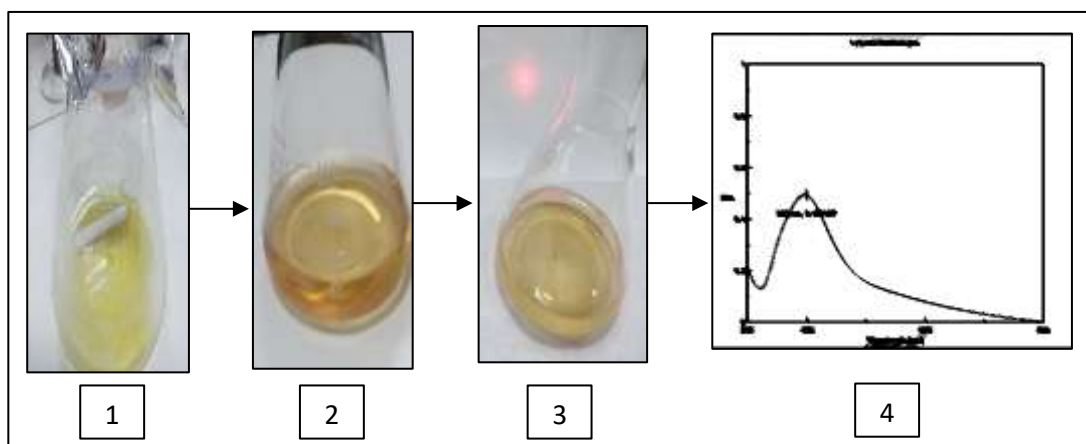
Dalam reaksi diatas ion Ag^+ akan berikatan dengan ion $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^-$ dan membentuk sebuah kompleks, yaitu kompleks $[\text{Ag}_3 \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{n}+1]3\text{n}^-$. Kompleks tersebut berperan penting dalam proses reduksi untuk menghasilkan larutan AgNP dengan warna 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% (gambar 13).



Gambar 13. Warna Koloid AgNP 2: 1 (konsentrasi 1 mM); 2 (konsentrasi 1,5 mM) dan 3 (konsentrasi 2 mM)

Pembentukan nanopartikel perak dapat juga dilihat dengan melewatkan sinar laser pada larutan AgNP 2, dari semua variasi konsentrasi yang telah dicoba peneliti sinar laser selalu dapat menembus larutan AgNP yang artinya terdapat partikel dengan ukuran nano. Ilustrasi alur sintesis AgNP dapat dilihat di gambar 14.

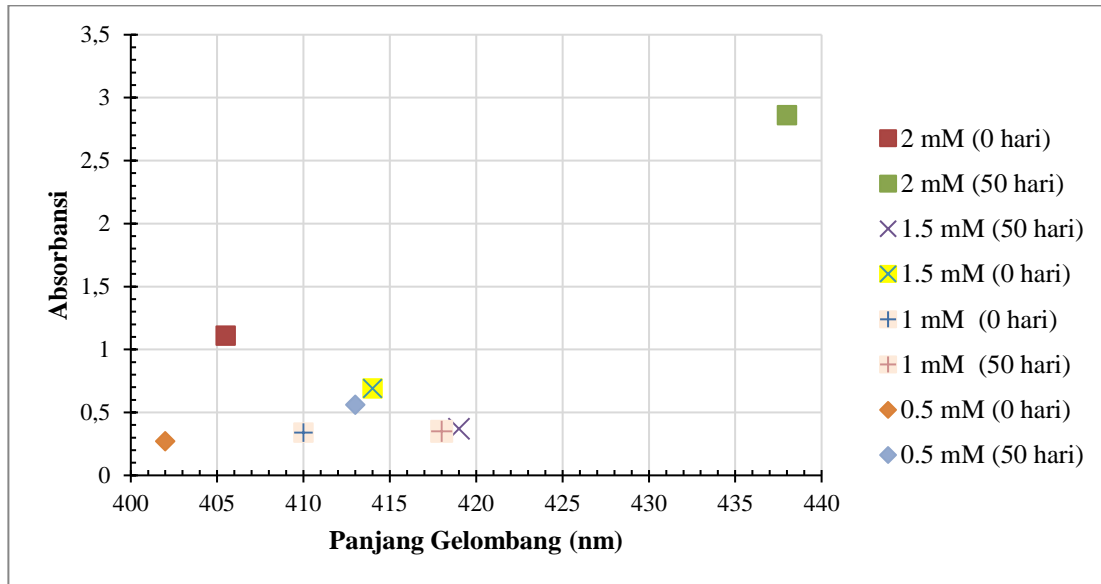


Gambar 14. Alur Sintesis dan Pengukuran AgNP.: 1 (tahap awal pembentukan AgNP); 2 (AgNP terbentuk); 3 (Sinar laser yang menembus menandakan ada nanopartikel yang terbentuk) dan 4 (Pengukuran dengan Spektrofotometri UV-Vis)

B. Sifat dan Kestabilan Nanopartikel Perak

Sifat dan kestabilan AgNP dapat diukur dengan melihat panjang gelombang serapan maksimal dan absorbansi AgNP menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Pengukuran tersebut dilakukan pada rentang panjang gelombang 300-500 nm. Reduksi kimia ion perak yang terjadi saat pembuatan nanopartikel terlihat secara fisik dengan perubahan warna kuning pucat ke kuning cerah sehingga panjang gelombang yang terdeteksi berada dipanjang gelombang khas serapan nanopartikel perak yaitu 410 nm.

Ketidakstabilan AgNP dapat dilihat dengan mengukur puncak serapan menggunakan spektrofometri UV-Vis sesaat setelah pembentukan dan selang beberapa waktu setelah disimpan. Suhu yang ideal dalam penyimpanan nanopartikel adalah berkisar 2-8°C serta terlindung dari sinar matahari, nanopartikel tidak dapat disimpan didalam *freezer* karena akan mengakibatkan agregrasi yang sifatnya *irreversible* (Wang *et al.*, 2010). Agregrasi atau bisa disebut pula aglomerasi ditandai dengan perubahan puncak serapan dalam pengukuran (Wahyudi dkk, 2011). Perubahan akibat aglomerasi menunjukkan panjang gelombang yang lebih besar dari pengukuran sebelumnya dan warna larutan yang lebih pekat dari sebelumnya. Selanjutnya hasil pengukuran panjang gelombang dan absorbansi larutan nanopartikel perak pada rentang panjang gelombang 300-50 nm hari ke 0 dan 50 dapat dilihat pada gambar 15.



Gambar 15 Hasil Pengukuran dengan Spektrofotometri UV-Vis

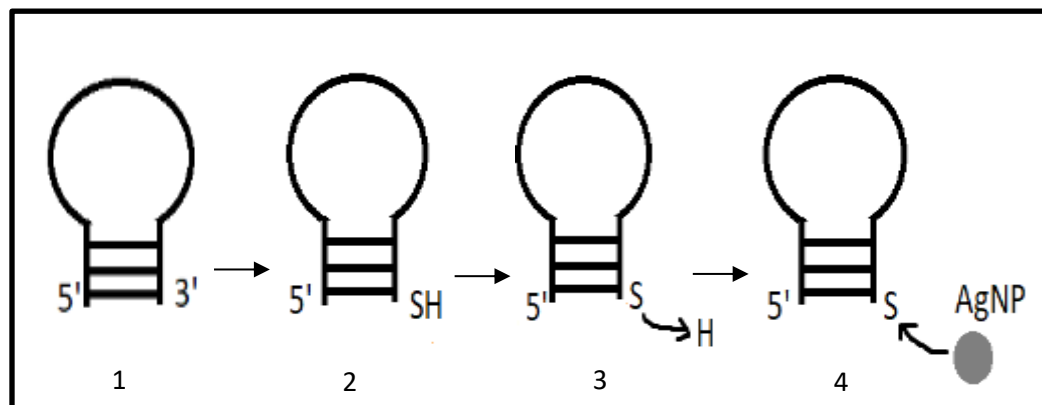
Hasil pengukuran yang ditunjukkan di gambar 15 dari empat variasi konsentrasi larutan nanopartikel perak yang telah dibuat oleh peneliti perubahan panjang gelombang tidak signifikan. Perubahan panjang gelombang berkisar di 410-430 nm yang merupakan panjang gelombang serapan khas nanopartikel perak. Keadaan 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.

Selanjutnya dilihat dari nilai absorbansi dalam dua waktu pengukuran larutan AgNP dengan konsentrasi 2 mM menunjukkan hasil sebesar 1,11 dan 2,86. Hal itu tidak sesuai dengan teori Lambert-Beer yaitu nilai absorbansi berada pada rentang 0,2-0,8. Namun, tiga konsentrasi yang lain menunjukkan angka yang sesuai dengan teori tersebut. Ketidakstabilan nanopartikel dalam penelitian ini terutama oleh kondisi suhu

lemari pendingin yang tidak bisa diprediksi dari waktu ke waktu. Perubahan suhu yang fluktuatif berpengaruh besar terhadap terjadinya agregasi yang mengakibatkan perubahan serapan panjang gelombang. Perbandingan antara warna larutan dan hasil pengukuran spektrofotometri UV-Vis dapat dilihat di lampiran 5.

C. Imobilisasi *Probe Molecular Beacon (Probe MB)*-AgNP

Proses Imobilisasi *Probe MB* dan AgNP dilakukan dengan bahan utama adalah *Probe MB* gambar 16 (A) yang telah dimodifikasi salah satu ujungnya dengan gugus SH (thiol) seperti pada gambar 16 (B). Tujuan penggunaan *Probe MB* yang merupakan DNA modifikasi babi dalam penelitian ini adalah hasil penelitian akan dikembangkan untuk autentikasi halal. Pada *Probe MB* yang peneliti gunakan kedua ujung *loop* tidak terdapat *fluorophore* dan *quencher*, tetapi menggunakan ujung 3' dan 5'. Ujung 3' tersebut ditemplei dengan gugus SH (thiol). Penempelen dengan gugus SH bertujuan membantu proses fungsionalisasi *Probe MB*. Keseluruhan proses imobilisasi diilustrasikan dengan gambar 16.



Gambar 16. Ilustrasi Alur Imobilisasi MB Probe dan AgNP.

Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan vial sebagai wadah untuk mencampur bahan-bahan yang dibutuhkan selama proses imobilisasi. Vial harus direndam (*soak*) dengan NaOH 12 M selama 1 jam sebelum digunakan perendaman tersebut bertujuan untuk menghilangkan partikel-partikel kontaminan yang masih menempel pada dinding vial. Kemudian dengan *milipore water* vial dibilas agar bersih dari NaOH dan siap digunakan.

Proses imobilisasi diawali dengan mencampur *Probe MB* dan DTT serta buffer asetat (500 nM, pH 5,2). Dithiothreitol (DTT) merupakan salah satu jenis reduktor yang sering digunakan untuk analisis dengan menggunakan DNA selain TCEP (*tris(2-carboxyl) phosphine*) dan β *mercaptoethanol*. Penggunaan reduktor dalam proses ini untuk menjaga aktivitas dan stabilitas serta mencegah agregasi yang dapat terjadi pada. DTT lebih sering digunakan dibanding dua reduktor lain karena memiliki keunggulan berupa salah satu reduktor kuat dengan nilai potensial redoks yang negatif, yaitu -0,33V pada pH 7.

Pada penelitian ini, DTT digunakan untuk mereduksi gugus SH yang ada di *Probe MB*. Dijelaskan pada gambar 16 (C), gugus SH pada *Probe MB* yang telah ditambah DTT akan melepaskan atom H (hidrogen). Lepasnya atom H pada gugus SH tersebut, diikuti dengan penempelan nanopartikel perak seperti pada gambar 16 (D). Dalam melakukan imobilisasi *Probe MB* dan nanopartikel perak penyesuaian lingkungan sangat diperlukan, karena beberapa hal seperti waktu inkubasi, kekuatan ikatan kimia antar ikatan pH dan suhu merupakan hal kritis yang akan mempengaruhi keberhasilan dari proses imobilisasi (Widada, dkk, 2019). Dalam penelitian Scigelova

(2001) menyatakan suhu yang bisa digunakan antara suhu ruang (25 °C) hingga suhu air mendidih (100 °C), pH pada rentang 7-9, dan diinkubasi selama 30 menit hingga semalaman penuh.

Setelah menambahkan DTT pada buffer asetat (pH 5,2; 500 mM) peneliti melakukan inkubasi pada suhu 25 °C di *General Incubator*. Kondisi asam tidak dianjurkan dalam penggunaan DTT karena hasil reduksi tidak akan optimal. Selanjutnya penambahan nanopartikel perak. Dalam hal ini, nanopartikel perak sebagai platform untuk penempelan dengan *Probe MB*. Hasil penggabungan tersebut menjadi sebuah biosensor yang akan bereaksi dengan target sehingga dapat mendeteksi kandungan suatu bahan. Nanopartikel perak berikatan pada gugus SH yang telah kehilangan atom H. Proses dilanjutkan dengan pengadukan otomatis secara terus menerus selama 4,5 jam menggunakan *Shaking Incubator*. Hal ini bertujuan agar semua nanopartikel yang ada, dapat menempel sempurna pada *Probe MB*. Kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 24 jam.

Kemudian ditambahkan NaCl dalam keadaan basa (penambahan buffer Tris-asetat 500 mM pH 8,2) dan inkubasi selama 52 jam. 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). Namun, penambahan NaCl dapat mengakibatkan menempelnya nanopartikel pada dinding vial. Nanopartikel yang menempel pada vial, menyebabkan konsentrasinya menurun,

sehingga akan mempengaruhi hasil imobilisasi yang dilakukan. (Liu & Lu, 2006). Dalam penelitian hal itu sudah dicegah dengan merendam vial menggunakan NaOH.

Penelitian Widada (2019) menggunakan NaCl dari konsentrasi 0-100 mM. Variasi konsentrasi yang digunakan hingga konsentrasi 40 mM, akan mempercepat imobilisasi, sedangkan diatas 40 mM hingga 100 mM, akan memperlambat imobilisasi. Dalam penelitian ini, awalnya peneliti menggunakan NaCl dengan konsentrasi akhir 99,6 mM, perubahan warna yang signifikan menjadi kuning pucat menandakan terjadi agregasi. Oleh karena itu, peneliti menurunkan konsentrasi akhir NaCl menjadi 3,8 mM. Keberadaan ion Na^+ sebagai ion monovalen yang memberikan pengaruh terhadap hibridisasi (Spinger *et al.*, 2010). Setelah diinkubasi dilakukan pengukuran dengan Spektrofotometri Uv-Vis dan *Scanning Electron Microscope*.

D. Penentuan Ukuran Nanopartikel sebelum dan sesudah Imobilisasi *Probe*

***Molecular Beacon* -AgNP**

Dalam penentuan ukuran nanopartikel perak peneliti menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* (SEM). Pengukuran dilakukan terhadap dua jenis sampel, yaitu sampel larutan koloid nanopartikel perak konsentrasi 1,5 mM dan larutan hasil imobilisasi antara *probe molecular beacon* dengan nanopartikel perak terselubung thiol. Pemilihan dua jenis sampel tersebut berdasarkan kemampuan hibridisasi dalam proses imobilisasi.

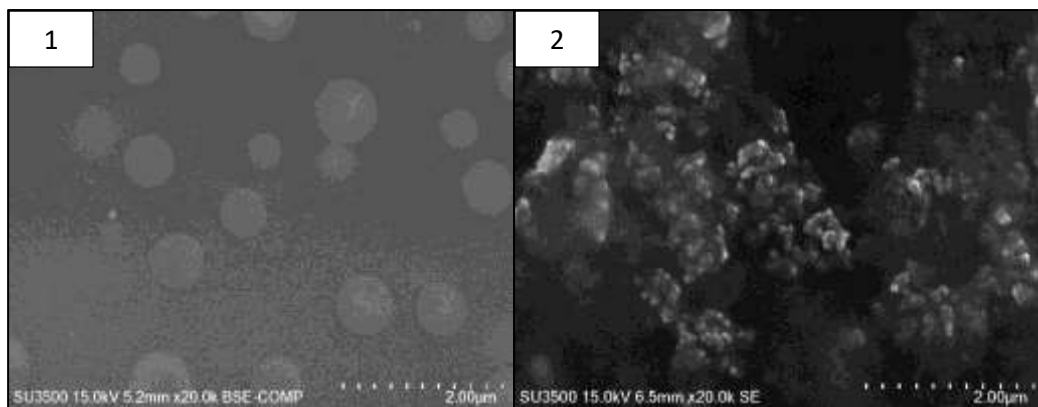
Sebelum melakukan pengukuran terhadap dua sampel tersebut, terlebih dahulu dilakukan preparasi. Sampel yang dapat diukur dengan SEM adalah sampel dengan

bentuk padat. Sampel yang berbentuk cairan merupakan konduktor yang buruk dan sangat rentan terhadap kerusakan akibat radiasi (Echlin, 2009). Untuk itu dilakukan proses evaporasi atau penguapan terhadap kedua larutan sampel tersebut. Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan WFI sebagai pelarut dalam sintesis nanopartikel dan preparasi sampel imobilisasi. Pada penelitian evaporasi dilakukan disuhu ruang (27 °C) dan didiamkan selama 24 jam. Hal ini dikarenakan penggunaan suhu yang terlalu tinggi dan tidak terkontrol bisa menyebabkan karbon dan aluminium tape mengerut dan nanopartikel rusak, sehingga sampel nanopartikel yang sudah diuapkan tidak dapat terbaca dengan baik. Sampel yang mengalami proses evaporasi diletakkan diatas *carbon tape* dan *aluminium tape*. Karbon tape merupakan tape yang memiliki kualitas paling bagus untuk karakterisasi SEM, karena menghantarkan elektron pada nanopartikel perak dengan baik (Rimmer, 2010). Selanjutnya, sampel siap diuji menggunakan SEM. Hasil pengukuran menggunakan SEM dan Spektrofotometri UV-Vis dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengukuran dengan SEM dan Spektrofotometri UV-Vis

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

Dari hasil uji 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.

Gambar 17 Hasil Uji dengan SEM : 1 (Sampel koloid AgNP sebelum Imobilisasi);
2 (Sampel koloid AgNP sesudah Imobilisasi)

Namun, dalam penelitian ini gambar yang dihasilkan pada alat SEM untuk koloid AgNP sebelum imobilisasi pada gambar 17 (1) menunjukkan partikel yang

tersebar namun AgNP tidak terlihat jelas sedangkan koloid AgNP setelah imobilisasi pada gambar 17 (2) cenderung terlihat jelas dengan partikel yang terlihat menyatu. Proses preparasi berpengaruh besar dalam pengamatan sampel dengan menggunakan SEM. Diduga proses preparasi dengan evaporasi yang dilakukan tidak sempurna sehingga dalam pengamatan AgNP tidak terlihat secara jelas pada gambar 17 (1). Ketika air dilepaskan larutan garam terlarut menjadi lebih terkonsentrasi sehingga dapat terendapkan. Hal itu mengakibatkan perubahan pH, memicu agregasi dan perubahan konformasi (Echlin, 2009). Diduga hasil yang terlihat pada gambar 17 (1) adalah molekul-molekul lain yang ikut terendapkan akibat proses evaporasi.