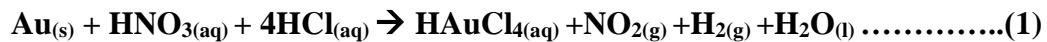


## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Optimasi Nanopartikel Emas (AuNP)

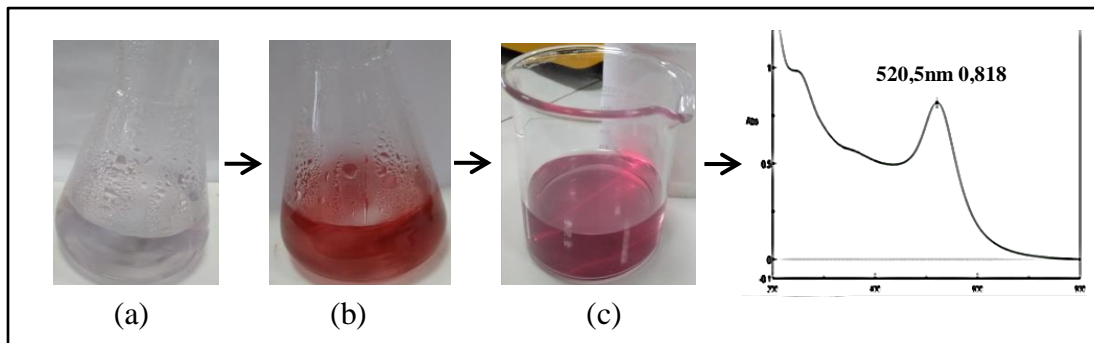
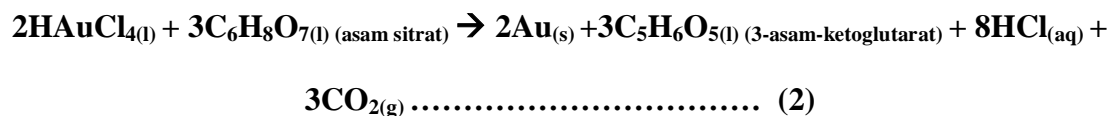
Nanopartikel emas dibuat dari larutan induk  $\text{HAuCl}_4$  yang didapat dengan mereaksikan logam emas (Au) dengan larutan asam (HCl dan  $\text{HNO}_3$ ). Reaksi kimia yang terjadi dapat digambarkan dari persamaan 1:



Pada persamaan 1, terdapat hasil reaksi yang digunakan ( $\text{HAuCl}_4$  dan  $\text{H}_2\text{O}$ ) serta senyawa yang tidak digunakan ( $\text{H}_2$  dan  $\text{NO}_2$ ). Kedua senyawa yang tidak digunakan, tidak bisa hilang dengan sendirinya, untuk itu dilakukan pemanasan untuk menghilangkannya. Selama proses pemanasan, akan terdapat letupan-letupan dari gas  $\text{H}_2$  dan terdapat gas berwarna coklat dari gas  $\text{NO}_2$ . Pemanasan yang dilakukan juga berfungsi untuk meningkatkan kelarutan logam emas, hingga didapat larutan berwarna kuning jernih. Pemanasan dilakukan hingga uap putih berbau menyengat telah hilang, uap putih tersebut adalah reaksi terbentuknya gas klorin. Sehingga hasil akhir yang akan kita dapat hanya berupa  $\text{HAuCl}_4$  dan  $\text{H}_2\text{O}$ . (Tamam & Hidajati, 2014). Larutan tetrakloroaurat (III) yang tidak langsung digunakan, dapat dibuat menjadi bentuk padatan kembali dengan beberapa proses lanjutan, yaitu menguapkan pelarut ( $\text{H}_2\text{O}$ ) yang ada.

Pembuatan nanopartikel emas dimulai dengan membuat seri kadar  $\text{HAuCl}_4$ , yaitu 0,0635; 0,127; 0,19; 0,254; 0,635; dan 1,27 (mM) dengan pelarut yang sesuai,

dalam hal ini peneliti menggunakan *Water For Injection* (WFI). Sejumlah 100 mL seri kadar  $\text{HAuCl}_4$  yang telah dibuat, dilakukan pemanasan dengan suhu dan kecepatan yang optimum, untuk membantu mereduksi ion logam  $\text{Au}^{3+}$  menjadi ion logam  $\text{Au}^0$  (tidak bermuatan). Kecepatan dan suhu yang digunakan, akan memengaruhi kestabilan dari nanopartikel yang dihasilkan nantinya. Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan suhu  $150\text{ }^\circ\text{C}$  dan kecepatan 270 rpm, karena dengan suhu dan kecepatan tersebut, akan dihasilkan nanopartikel yang stabil selama lebih dari 2 bulan (Rohiman, dkk, 2014). Selanjutnya dilakukan penambahan 2,5 mL Na-Sitrat 38,8 mM yang berfungsi untuk mereduksi ion logam Au, yang kemudian akan melapisi Au yang tidak bermuatan, sehingga terbentuk nanopartikel dengan ukuran tertentu (Persamaan 2).



**Gambar 8.** Ilustrasi Sintesis AuNP (a) Larutan induk  $\text{HAuCl}_4$  (b) Perubahan warna setelah penambahan Na-Sitrat (c) Sinar laser menembus, menandakan terdapat nanopartikel (d) Spektra hasil pengukuran dengan Spektrofotometer Uv-Vis

Pada dasarnya, ion Au akan stabil jika memiliki muatan karena akan terjadi gerakan tolak-menolak antar muatan sejenis. Namun, setelah direduksi, Au menjadi

kehilangan muatan dan bersifat netral, ion dalam keadaan netral, tidak akan stabil, dan bahkan akan kembali ke bentuk semula. Untuk itu, penambahan Na-Sitrat juga berfungsi sebagai *capping agent* (agen penstabil) yang akan melindungi nanopartikel yang telah jadi agar stabil dan tidak terjadi agregasi. Dalam hal ini, muatan negatif dari ion sitrat, akan diadsorpsi oleh permukaan nanopartikel emas, sehingga antar nanopartikel emas akan tolak-menolak karena lingkungan yang negatif, dan mencegah terjadinya agregasi dari nanopartikel emas (Wyantuti, dkk, 2017).

Pembentukan nanopartikel emas, dapat diketahui dari perubahan warna yang dihasilkan. Saat semula ion Au belum direduksi, larutan berwarna kuning (intensitas warna menyesuaikan kadar), yang menandakan larutan stabil dalam lingkungan positif. Kemudian warna mulai terbentuk, mulai dari abu, ungu, hingga merah anggur sesuai dengan konsentrasi  $\text{HAuCl}_4$  yang digunakan. Tahapan perubahan warna tersebut menunjukkan ukuran partikel yang dihasilkan, hingga didapat ukuran nano (1-100 nm). Saat warna merah anggur terbentuk, artinya proses telah berakhir dan harus segera dihentikan, karena proses pemanasan yang berlanjut, akan menyebabkan ukuran nanopartikel semakin besar, hingga terjadi agregasi dan koloid akan berganti menjadi suspensi. Namun sebaliknya, apabila pemanasan dan pengadukan yang dilakukan belum mencapai titik optimumnya, menyebabkan nanopartikel tidak terbentuk secara sempurna, atau akan terjadi agregasi akibat dari partikel yang belum mencapai kestabilan yang optimum. Hal tersebut bisa ditandai dengan nilai absorbansi yang dihasilkan saat pengukuran menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis

serta pengukuran menggunakan SEM. Berikut adalah hasil optimasi nanopartikel emas (AuNP):

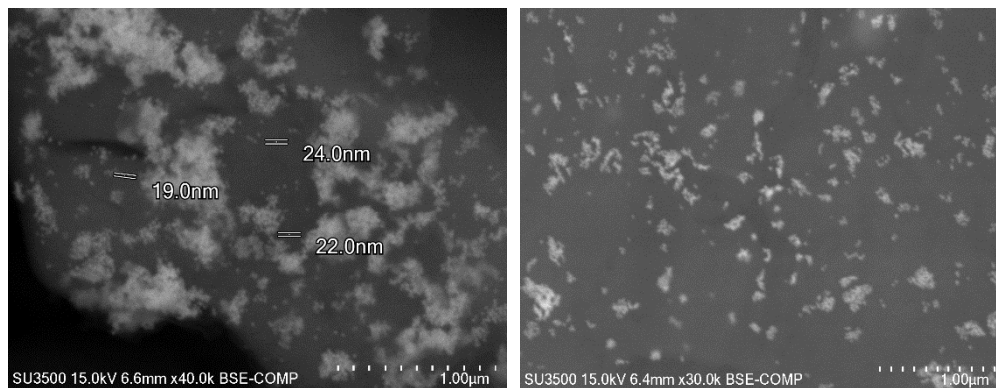
**Tabel 2.** Hasil Sintesis Nanopartikel Emas

NO	Konsentrasi (mM)	Warna	Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi (abs)
1.	1,27	Coklat keruh pekat (susu coklat) → 2 jam kemudian bening jernih	-	-
2.	0,635	Ungu Pekat	526	1,525
3.	0,254	Merah Jernih	520,5	0,818
4.	0,19(1)	Merah ke-ungu-an jernih	521	0,542
5.	0,19 (2)	Merah Jernih	521,5	0,503
6.	0,19 (3)	Merah Jernih	523,5	0,229
7.	0,127(1)	Merah Cerah Jernih	521	0,486
8.	0,127 (2)	Merah ke Ungu an	535	0,261
9.	0,127 (3)	Ungu pekat, jernih	537	0,069
10.	0,0635	Ungu sangat tipis	529	0,037

Dari tabel 2 dapat dilihat bahwa, perbedaan konsentrasi  $\text{HAuCl}_4$  yang digunakan, akan mempengaruhi warna dan intensitas warna yang dihasilkan, serta juga akan mempengaruhi panjang gelombang dan absorbansi yang dihasilkan. Pada konsentrasi 0,0635 mM, terbentuk warna ungu yang sangat tipis. Berdasarkan pengukuran secara kualitatif menggunakan sinar laser yang dilewatkan pada konsentrasi 0,0635 mM, sinar dapat diteruskan, menandakan bahwa terdapat nanopartikel didalamnya, namun absorbansi yang dihasilkan tidak masuk kedalam

rentang Hukum Lambert-Beer yaitu 0,037. Hal tersebut dapat diartikan bahwa pada konsentrasi 0,0635 mM, larutan induk sangat encer sehingga jumlah nanopartikel yang terbentuk sangat sedikit. Kemudian untuk beberapa konsentrasi yang sama {0,19(1); 0,19(2); 0,19(3); 0,127(1); 0,127(2); dan 0,127(3) mM} tetapi menghasilkan intensitas warna yang berbeda, bisa dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti rasio penambahan sitrat yang digunakan, sumber konsentrasi larutan induk yang digunakan dan stabilitas dari bahan-bahan yang digunakan, sehingga absorbansi dan panjang gelombang yang dihasilkan juga akan berbeda-beda. Untuk AuNP yang terbentuk dari  $\text{HAuCl}_4$  dengan konsentrasi 0,635 mM sangat bagus, terbukti dengan warna yang dihasilkan, mendekati warna yang disampaikan oleh Tamam & Hidajati, (2014) dalam penelitiannya, bahwa ukuran nanopartikel terbentuk saat berwarna merah anggur. Namun, dari hasil uji menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis, absorbansi yang dihasilkan sangat tinggi, yaitu 1,525, sehingga konsentrasi tersebut tidak bisa digunakan karena terlalu pekat. Selanjutnya untuk konsentrasi 1,27 mM terjadi perbedaan reaksi saat penambahan sitrat. Koloid seketika berubah menjadi berwarna coklat (tanah lumpur). Saat diuji keberadaan nanopartikel menggunakan sinar laser, tidak terdapat nanopartikel pada koloid tersebut. Setelah didiamkan sekitar 30 menit, koloid mengalami agregasi sebagian dan saat diuji menggunakan sinar laser, koloid tersebut mampu meneruskan cahaya laser. Namun, setelah didiamkan lebih lama lagi, yaitu sekitar 2 jam, koloid berubah menjadi bening, tidak dapat meneruskan cahaya laser, dan terbentuk endapan yang sangat banyak pada bagian bawah erlemeyer. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi adalah keberadaan sitrat sebagai agen pereduksi yang tidak cukup banyak untuk melapisi

$\text{Au}^0$ . Dalam keadaan tidak bermuatan,  $\text{Au}^0$  cenderung tidak stabil, sehingga menyebabkan ikatan tarik-menarik antar partikel sejenis, yang kemudian membentuk partikel yang lebih besar (terbentuk endapan). Faktor lain disebabkan karena keberadaan sitrat sebagai agen penstabil, tidak cukup baik digunakan, ditandai dengan terjadi pengendapan seluruhnya pada nanopartikel yang telah terbentuk sebelumnya. Dari enam seri kadar yang digunakan, konsentrasi 0,19 mM menunjukkan hasil yang optimum, dari hasil uji menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis, dan stabilitas penyimpanan yang tahan selama 3,5 bulan pada suhu 2 °C.



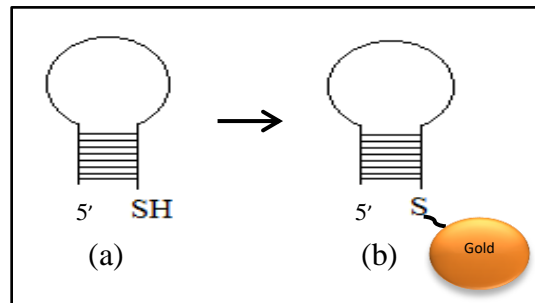
**Gambar 9.** Hasil SEM AuNP konsentrasi 0,19 mM

Pada gambar 9 disajikan data hasil SEM konsentrasi 0,19 mM berupa ukuran nanopartikel yang dihasilkan. Rentang ukuran nanopartikel emas yang dihasilkan yaitu 19-24 nm. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ali, *et al.*, (2011), ukuran nanopartikel yang optimum digunakan adalah 20 nm. Dari hasil yang didapatkan menggunakan SEM, rentang ukuran yang didapat mendekati 20 nm. Berdasarkan hasil tersebut, penggunaan AuNP konsentrasi 0,19 mM, diharapkan dapat

memberikan perubahan warna dan spektra serapan yang bagus, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Ali, *et al.*, (2011).

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

Dalam penelitian ini, imobilisasi diilustrasikan seperti pada Gambar 10. Pada gambar (a) terdapat *probe* MB yang telah termodifikasi, yaitu pada *ujung 3'* ditempel dengan gugus SH, sehingga *probe* tersebut menjadi *probe Thiolated Oligonucleutida*. Sedangkan pada gambar (b), menunjukkan hasil imobilisasi bersama dengan nanopartikel emas, yang dapat memberikan warna khas dan mengalami perubahan warna saat imobilisasi berhasil. Untuk itu, metode kolorimetri menjadi metode yang peneliti pilih.



**Gambar 10.** (a) *Probe* MB dimodifikasi menjadi *Probe Thiolated Oligonucleutida* (b) Imobilisasi *Probe* MB dengan AuNP (Kolpashchikov, 2012)

Dalam melakukan imobilisasi nanopartikel emas dengan *probe* MB, harus dilakukan pada lingkungan yang sesuai, sebab beberapa hal seperti pH, suhu dan waktu inkubasi, serta kekuatan ikatan kimia antar ikatan, merupakan hal kritis yang akan mempengaruhi keberhasilan dari proses imobilisasi (Widada, *et al.*, 2019). Penggunaan media yang sesuai juga akan mempengaruhi keberhasilan dari

imobilisasi. Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan vial sebagai media untuk imobilisasi, dan sebelum penggunaannya vial harus direndam (*soak*) terlebih dahulu. Perendaman vial dengan NaOH dimaksudkan untuk menghilangkan kontaminasi yang menempel pada vial serta mencegah penempelan nanopartikel pada permukaan vial, terutama setelah penambahan NaCl. Nanopartikel yang menempel pada vial, menyebabkan konsentrasinya menurun, sehingga akan mempengaruhi hasil imobilisasi yang dilakukan. (Liu, & Lu, 2006). Kemudian vial dibilas menggunakan WFI untuk mencegah kontaminasi oleh NaOH. Setelah media imobilisasi siap digunakan, proses imobilisasi dimulai dari pencampuran antara *probe* MB dengan DTT dan buffer asetat (500 nM, pH 5,2). *Dithiothreitol* (DTT) merupakan salah satu agen pereduksi dari 2 agen pereduksi lain, yaitu  *$\beta$ -mercaptoethanol* dan TCEP {*tris(2-carboxyl)phosphine*}, yang populer digunakan untuk protein, enzim dan DNA. Kehadiran agen pereduksi pada sampel larutan, sering dibutuhkan untuk menjaga aktivitas dan stabilitas serta mencegah sampel untuk terjadi agregasi. Diantara ketiga agen pereduksi tersebut, DTT lebih sering digunakan, karena memiliki nilai potensial redox yang negatif, yaitu -0,33V pada pH 7. Hal tersebut menjadikan DTT lebih unggul untuk mereduksi protein dibandingkan  *$\beta$ -mercaptoethanol* (Scigelova, *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini, DTT digunakan untuk mereduksi gugus SH yang ada di *probe* MB. Dijelaskan pada gambar 10 (b), gugus SH pada *probe* MB yang telah ditambah DTT, direduksi dan melepaskan atom H (hidrogen). Lepasnya atom H pada gugus SH tersebut, diikuti dengan penempelan nanopartikel emas. Imobilisasi



dipengaruhi oleh beberapa hal kritis seperti suhu, pH, dan waktu inkubasi. Dikatakan bahwa 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 sepanjang malam (Scigelova, *et al.*, 2007). Pada penelitian ini, peneliti melakukan penambahan DTT pada pH 5,2 (menggunakan buffer asetat 500 nM), suhu 25 °C dan diinkubasi selama 1 jam. Kondisi asam tidak dianjurkan dalam penggunaan DTT, sehingga hasil reduksi tidak akan maksimal. Selanjutnya penambahan nanopartikel emas. Dalam hal ini, nanopartikel emas sebagai platform pada penempelan dengan *probe* MB, yang mana gabungan keduanya akan menjadi biosensor yang akan mendeteksi saat direaksikan dengan target. Nanopartikel emas 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 dimaksudkan agar semua nanopartikel yang ada, dapat berinteraksi secara perlahan dengan gugus SH pada *probe* MB. Kemudian campuran tersebut diinkubasi selama 24 jam. Setelahnya ditambahkan NaCl dalam keadaan basa (penambahan buffer Tris-asetat 500 nM pH 8,2) dan inkubasi selama 52 jam. Keberadaan NaCl dalam reaksi, untuk memberikan efek ikatan ion yang dapat meningkatkan dan mempercepat imobilisasi antara *probe* MB dengan nanopartikel emas (Widada, *et al.*, 2019). Sumber lain menjelaskan bahwa proses imobilisasi akan berlangsung dengan baik, pada kondisi pH, keberadaan garam, dan konsentrasi buffer yang sesuai (Li & Rothberg, 2004). Penelitian dari Widada, *et al.*, (2019), menggunakan NaCl dari konsentrasi 0-100 mM. Variasi konsentrasi yang digunakan hingga konsentrasi 40 mM, akan meningkatkan hibridisasi, sedangkan diatas 40 mM hingga 100 mM, akan menurunkan hibridisasi.

Dalam penelitian ini, awalnya peneliti menggunakan NaCl dengan konsentrasi akhir 99,6 mM, dan seketika terjadi agregasi. Oleh karena itu, peneliti menurunkan konsentrasi akhir NaCl menjadi 3,8 mM. Selanjutnya diukur menggunakan Spektrofotometri Uv-Vis. Dari hasil uji tersebut didapatkan perubahan nilai absorbansi antara sebelum dan sesudah imobilisasi secara berturut-turut yaitu 0,226 dan 0,167 yang disajikan pada table 3. Menurut Firmansyah (2012), hibridisasi dikatakan berhasil saat terjadi penurunan nilai absorbansi antara sebelum dan sesudah imobilisasi. Sedangkan pada panjang gelombang maksimal yang dihasilkan, tidak terjadi perubahan yang signifikan. Pada pengukuran menggunakan SEM, rata-rata ukuran nanopartikel sebelum dilakukan imobilisasi adalah 21,7 nm. Kemudian setelah dilakukan imobilisasi, terjadi perbesaran ukuran menjadi 27,3 nm. Hal tersebut meandakan bahwa, *probe* MB berhasil menempel dengan nanopartikel, sehingga dapat dikatakan bahwa imobilisasi pada penelitian ini berhasil.

**Tabel 3.** Perbandingan hasil Uji dengan Spektrofotometer Uv-Vis dan SEM antara sebelum dan sesudah Imobilisasi

	<b>AuNP</b>	<b>AuNP-MB</b>
<b>Spektrofotometer</b>	Panjang gel : 524 nm	Panjang gel : 524,5 nm
<b>Uv-Vis</b>	Absorbansi : 0,226	Absorbansi : 0,167
<b>SEM</b>	Rata-rata ukuran : 21,7 nm	Rata-rata ukuran : 27,3 nm
	Pola distribusi : Bergerombol	Pola distribusi : Bergerombol

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

Terdapat dua sampel yang akan dikarakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM), yaitu nanopartikel emas baik sebelum dan sesudah diimobilisasi dengan *probe* MB. Secara teknis, SEM merupakan aplikasi pada kimia analisis untuk menghindari perpindahan muatan elektrostatik yang meningkat di permukaan sampel. Selain itu, metode ini juga digunakan untuk menginstal konduktivitas listrik diantara dua permukaan sampel yang keras.

Untuk menguji sampel menggunakan instrumen SEM, sampel disyaratkan harus dalam bentuk padat, sedangkan untuk sampel berupa cairan, harus dilakukan preparasi terlebih dahulu. Cara yang bisa dilakukan adalah dengan evaporasi (menguapkan) pelarut yang digunakan. Dalam penelitian ini, peneliti menggunakan WFI sebagai pelarut dalam sintesis nanopartikel dan untuk sampel imobilisasi. Untuk itu, proses evaporasi yang bisa digunakan, sama halnya ketika memanaskan air. Air akan mendidih dan teruapkan, saat dipanaskan hingga suhu 100 °C. Namun, peneliti tidak menggunakan suhu 100 °C untuk sampel yang ada, karena penggunaan suhu yang terlalu tinggi dan tidak terkontrol bisa menyebabkan *carbon* dan *aluminium tape* mengerut dan nanopartikel rusak, sehingga tidak dapat terbaca dengan baik. Untuk itu, peneliti menggunakan suhu ruang (27 °C) dan didiamkan selama 24 jam.

Karbon *tape* merupakan *tape* yang memiliki kualitas paling bagus untuk karakterisasi SEM, karena perekat karbon ini memiliki kandungan akrilik, sangat sensitif terhadap tekanan, serta dapat menghantarkan elektron pada nanopartikel emas dengan baik. Selanjutnya, sampel siap diuji menggunakan SEM.