

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang akan dilaksanakan adalah eksperimental laboratorium dengan menggunakan metode optimasi nanopartikel perak sebagai platform imobilisasi probe *molecular beacon* untuk autentikasi halal dengan metode kolorimetri.

B. Tempat dan Waktu

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY, *Molecular Medicine and Therapy Research Laboratory* RSGM UMY, dan Balai Penelitian Teknologi Bahan Alam Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Gunungkidul. Kemudian waktu penelitian ini dilakukan mulai bulan Juli 2018 sampai Mei 2019.

C. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Variabel Penelitian

a) Optimasi Nanopartikel Perak

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi AgNO_3

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah ukuran partikel, pola distribusi partikel, panjang gelombang dan absorbansi.

b) Imobilisasi MB Probe

Variabel bebas dari penelitian ini adalah konsentrasi probe, suhu, dan *operating time*.

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah nilai absorbansi imobilisasi probe dan AgNP..

2. Definisi Operasional

Dalam penelitian ini ditetapkan batasan operasional variabel sebagai berikut:

a) Ukuran AgNP adalah ukuran yang didapat setelah dilakukan optimasi nanopartikel perak yaitu dibawah 90 nm (Wahyudi dkk., 2011)

b) Pola Sebaran AgNP adalah gambar pola yang didapat dari hasil scanning SEM.

c) Nilai absorbansi imobilisasi probe dan AgNP adalah nilai absorbansi hasil imobilisasi probe dan AgNP yang terbaca di spektrofotometri UV Vis.

D. Instrumen Penelitian

1. 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.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah AgNO₃ (Sigma-Aldrich), Sodium Citrate, NaBH₄ (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).

E. Cara Kerja

1. Preparasi dan Optimasi (Nanopartikel Perak)

Tahap awal preparasi dan optimasi nanopartikel perak adalah larutan 10 ml mengandung 0,01 gr AgNO₃ (2 mM) ditambahkan dalam larutan 20 ml NaBH₄ (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.

Optimasi AgNP dilakukan dengan membuat larutan nanopartikel berbagai konsentrasi, selain membuat AgNP konsentrasi 2 mM, dibuat juga AgNP

konsentrasi 1,5 mM, AgNP konsentrasi 1 mM dan AgNP konsentrasi 0,5 mM. Larutan AgNP yang telah terbentuk kemudian diamati dengan Spektrofotometer UV-Vis untuk melihat panjang gelombang maksimum dan absorbansinya.

Untuk melihat pola sebaran partikel larutan hasil optimasi dianalisis dengan menggunakan SEM. Preparasi dilakukan sebelum menguji larutan AgNP dengan memakai SEM. Pertama-tama disediakan cawan petri yang telah bersih dan diusap dengan alkohol 70%. *Carbon tape* yang telah dilepas mikanya diletakkan diatas cawan petri dengan menggunakan pinset. Kemudian larutan AgNP di ambil dengan pipet tetes dan diteteskan diatas *carbon tape*. Selanjutnya *carbon tape* ditutup dengan aluminium *foil* dan diletakkan di suhu ruang sampai kering.

2. Imobilisasi MB Probe

Pada tahap imobilisasi *molecular beacon* (MB) *probe* dan AgNP, vial yang akan digunakan sebagai wadah untuk imobilisasi direndam dalam NaOH 12 M selama 1 jam, kemudian dibilas menggunakan aquabidest dan dikeringkan. Kemudian 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, larutan tersebut ditambahkan 3.000 µl larutan AgNP, terbentuk larutan 2.

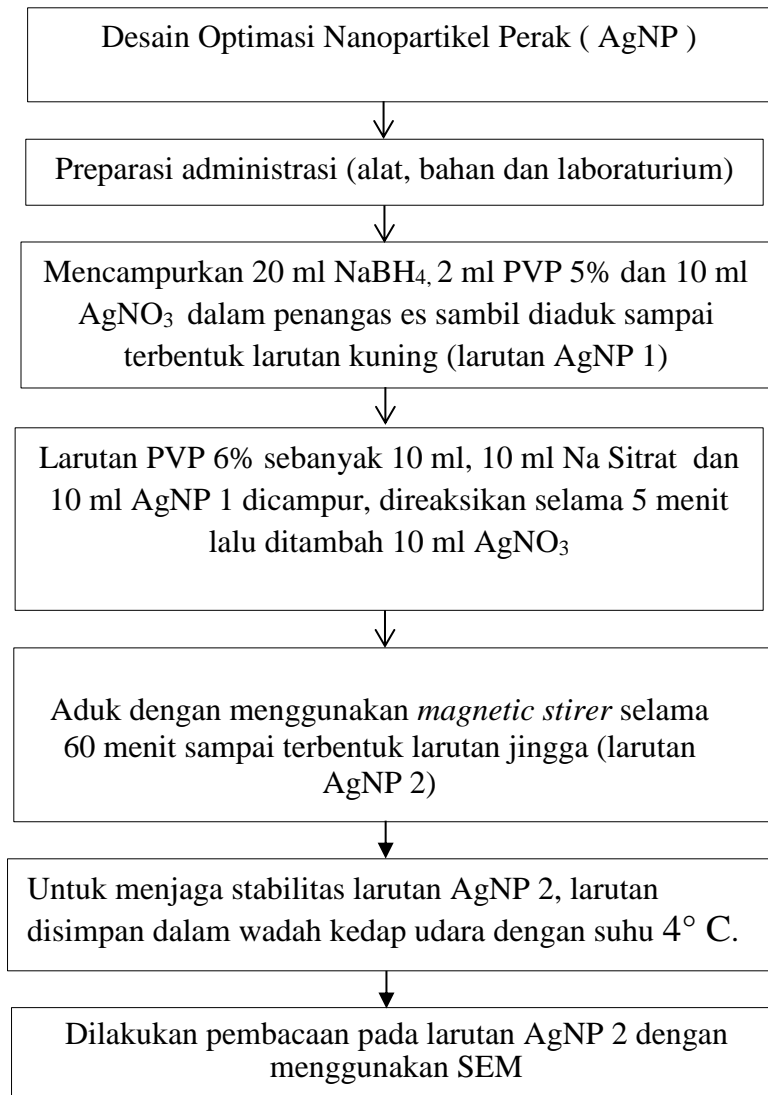
Tahapan berikutnya adalah larutan 2 dilakukan pengadukan dengan *shaking incubator* kecepatan 120 rpm selama 4,5 jam kemudian diinkubasi lagi dalam *general incubator* selama 24 jam. Ke dalam larutan tersebut selanjutnya ditambahkan 175,6 µl

larutan buffer tris asetat mM pH dan 123 μ l NaCl 100 mM sambil digojog pelan, terbentuk larutan 3. Selanjutnya dilakukan kembali inkubasi di *general incubator* selama kurang lebih 52 jam dengan temperatur 25°C. Hasil imobilisasi dianalisis dengan menggunakan Spektrofotometri UV-Vis. Dari hasil pengamatan menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh data *lamda* (λ) maksimum dan absorbansi.

Setelah inkubasi selesai dilakukan pula preparasi sampel larutan yang telah diimobilisasi tadi dengan menggunakan *carbon tape*. Preparasi ini dilakukan untuk menguji larutan imobilisasi AgNP-MB Probe dengan memakai SEM. Pertama-tama disediakan cawan petri yang telah bersih dan diusap dengan alcohol 70%. *Carbon tape* yang telah dilepas mikanya diletakkan diatas cawan petri dengan menggunakan pinset. Kemudian larutan imobilisasi AgNP-MB Probe diambil dengan pipet tetes dan diteteskan diatas *carbon tape*. Selanjutnya carbon tape ditutup dengan aluminium foil dan diletakkan pada suhu ruang sampai kering. Setelah sampel telah siap kemudian dilihat persebaran dan ukuran nanopartikel perak dengan SEM.

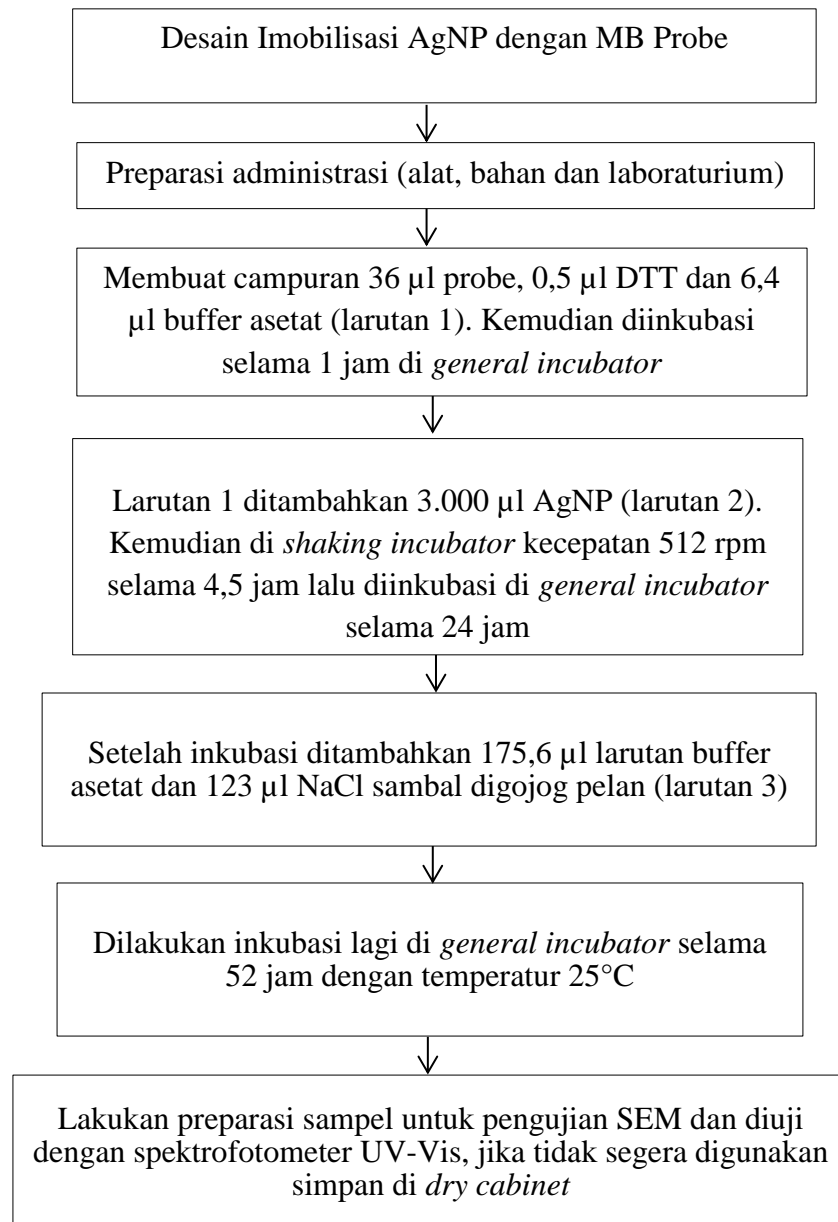
F. Skema Langkah Kerja

1. Preparasi dan Optimasi (Nanopartikel Perak)



Gambar 10 Langkah kerja preparasi dan optimisasi

2. Imobilisasi MB Probe



Gambar 11. Langkah kerja imobilisasi MB Probe