**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

* 1. **Jenis dan Rancangan Penelitian**

Jenispenelitianiniadalahpenelitianeksperimental yang dilakukan di laboratorium.Variable bebasdalampenelitianiniadalahsintesisnanopartikelperakdenganberbagaikonsentrasipadaekstrakdaunseledrisedangkanvariabelterikatdalampenelitianiniadalahujiaktivitasantibakteriterhadapbakteri*Staphylococcus aureus.*Rancanganpenelitianinimeliputipengambilandanidentifikasisampel, preparasidanpembuatanekstrakdaunseledri, pembuatanlarutan AgNO3Variasikonsentrasi 4 mM, 3mM, 2mM, 1Mm, Optimasikonsentrasilarutan AgNO3, Sintesisnanopartikelperakdenganmenggunakanspektrofotometeruv-visdanpsa, danujiaktivitasantibakteriterhadapbakteri*Staphylococcus aureus* yang dilakukansecara in vitro menggunakanmetode Kirby-Bauer denganmengamatidanmengukurzonahambatnanopartikelperakdariekstrakdaunseledri.

### VariabelPenelitian

Variabel penelitian ini dibagi menjadi tiga macam yaitu :

1. **Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi antara ekstrak daun seledridankonsentrasi AgNO3 dengan variasi (1 mM, 2 mM, 3 mM, dan 4 mM) sertawaktureaksi (1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari, 5 hari, dan 6 hari) dalam pembentukan nanopartikel perak (AgNPs)yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.
2. **Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nanopartikelperak yang terbentukdarisintesismenggunakanekstrakdaun seledri(*Apiumgraveolens*L.) sertaujiaktivitasantibakterinanopartikelperakterhadapbakteri*Staphylococcus aureus*.

1. **Variabel Kontrol**

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu, waktu, dankecepatanpengadukanpada proses pembentukannanopartikelperakmenggunakanekstrakdaunseledrisebagaibioreduktor. Faktorluar yang dapatmempengaruhivariabelbebasdanvariabelterikatpadaujiaktivitasantibakteriadalah media pertumbuhanantibakteri, bakteri*Staphylococcus aureus,* waktudansuhuinkubasi.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalahdiawalidenganoptimasi parameter sintesisberupakonsentrasiekstrak air tanamandaunSeledridansuhusintesis yang digunakan. Komponen parameter yang diukurdalam proses optimasiiniadalah parameter organoleptisberupawarnaperak yang dihasilkandarimasingmasingkombinasikonsentrasiekstrakdaunSeledri, ukurannanopartikel yang dihasilkandarisintesisnanopartikelperakmenggunakan AgNO3, dan parameter dayahambatdalamujiaktivitasantibakteri*Staphyloccocusaureus.*

## LokasidanJadwalPenelitian

## 3.2.1 LokasiPenelitian

Penelitianinidilakukan di LaboratoriumFarmasiTerpaduUniversitas Muslim Nusantara (UMN) Al-Washliyah Medan.

### 3.2.2 JadwalPenelitian

Penelitiandilaksanakanpadabulanfebruari2023 sampaibulanJuni 2023

## 3.3 Bahan

Bahanbahan yang digunakanpadapenelitianiniadalahdaunseledri, aquabidest, AgNO3, Muller Hinton Agar (MHA), suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, vial, kertas perkamen, kertas saring, kertas whatman No.42, aluminium foil, kertas label, *tissue,* kertas cakram.

## 3.4 Alat

Alatalat yang digunakanadalahAlat-alat yang digunakanmeliputi : beaker glass (pyrex®), gelas ukur (pyrex®), labu ukur (pyrex®), spatula, blender, pipet tentu ukur (pyrex®), erlenmeyer (pyrex®), ball pipet, batang pengaduk, corong (pyrex®), timbangan analitik, magnetik stirer (IKA), hot plate, sentrifugator, cawan petri, jarum ose, kapas, pipet mikro, pinset, bunsen, gunting, jangka sorong, spektrofotometer UV-Vis (*shimadzu*), *Particle Size Analyzer* (PSA) (Malvern), inkubator, autoklaf.

## 3.5 PenyiapanSampel

### 3.5.1 PengumpulanSampelDaunSeledri

Sampel yang diujidalampenelitianiniadalahdaunseledri(*Apiumgraveolens*L.).Sampel yang diambiladalahdaunseledri (*Apiumgraveolens*L.) dengankondisibaikdansegar yang di belidaripajaksimpanglimunjalanM. NawiHarahap No.48, Sitirejo III, Kecamatan Medan Amplas Kota Medan Provinsi Sumatera Utara.

### 3.5.2 DeterminasiTumbuhan

Determinasitumbuhandilakukan di Herbarium Medanese (MEDA) DepartemenBiologi FMIPA Universitas Sumatera Utara JalanBioteknologi No.1 Kampus USU Medan.

### 3.5.3 PembuatanSimplisia

 Daunseledri yang telahdikumpulkan, dicucibersihdengan air mengalir, laludaunseledridipotong tipis-tipis laluditimbangberatbasah, kemudiandikeringkankedalamlemaripengeringdengansuhu 40- 50˚C.Sampeldianggapkeringbiladapatdiremasrapuhdanhancur, laluditimbangberatkering.Kemudiandiserbukkandenganmenggunakan blender laludisimpan di dalamwadahkeringdanterlindungdaricahayamatahari.

## 3.6 PreparasidanPembuatanEkstrakDaunSeledri

Dicucidaunseledri(*Apiumgraveolens*L.) hinggabersih, dikeringkandandipotongpotonghinggahalus, laluditimbangsebanyak 5 g daunseledri yang sudahkeringdimasukkankedalamgelaskimia 250 mL danditambahkan 100 mL akuabideslaludipanaskanhinggamendidihselama 15 menitkemudiandidinginkan. Apabilasudahmencapaisuhuruang, air rebusandituangdandisaringmenggunakankertassaringwhatman no.42. Air rebusannyadapatdigunakanlangsunguntuk proses sintesisnanopartikelperak. (Taba et al., 2019)

## 3.7 PembuatanLarutan AgNO3VariasiKonsentrasi 4 mM, 3mM, 2mM, dan 1 mM

 Sebanyak 0,085 g serbuk AgNO3dilarrutkankedalamaquabidessampai volume 250 mL kemudiandicampurkansampaihomogenuntukmembuatlarutan AgNO3 4 mM.Selanjutnyadipipetsebanyak 37,5; 25; dan 12,5 mL darilarutan AgNO3 4 mMkedalamlabuukur 50 mL danditambahkanakuabideshinggatandabatasuntukmembuatkonsentrasi AgNO3 3; 2; dan 1 mM.( Taba et al., 2019)

## 3.8 SintesisNanopartikel Perak

Larutan AgNO3 4; 3; 2 dan 1 mMdipipetsebanyak 40 mL danmasingmasinglarutandimasukkankedalam Erlenmeyer 250 mL, kemudian 1 mL ekstrakdaunseledriditambahkankedalamerlenmeyertersebut. Campurandiadukdenganpengadukmagnetikselama 15 menitdengankecepatan 150 rpm padasuhu 50˚C, kemudiandianalisismenggunakan UV-Vis dan*Particle Size Analizer*(PSA) untuk di cekukurannanopartikelperak ( Taba et al., 2019)

Karakteristik larutan yang berupa warna, spektrum serapan UV-Vis pada waktu ke 1, 2, 3, 4, 5, dan 6 hari dilakukan untuk mendapatkan waktu optimum.Larutannya dianalisis dengan PSA dan diuji sifat antibakterinya.

## 3.9 Karakterisasi Nanopartikel Perak

### 3.9.1 Spektrofotometer UV-Vis

 Pada pengujian karakterisasi nanopartikel perak menggunakan spektrofotometer UV – Vis, sampel yang digunakan yaitu hasil biosintesis daun seledri dengan konsentrasi 1 mM, 2 mM, 3 Mm, dan 4 mM setelah bereaksi dan mengalami perubahan warna, kemudian dilakukan uji di laboratorium penelitian Fakultas Farmasi jurusan Farmasi UMN Al-Washliyah. Karakterisasi hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-2600 Shimadzu yang telah distandarisasi dengan menggunakan larutan blanko, yang merupakan larutan AgNO3 tanpa sampel daunseledri. Larutan yang mengandung nanopartikel perak dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dilakukan pengukuran pada panjang gelombang 200–800 nm. Pengujian ini digunakan untuk mengetahui pembentukan nanopartikel perak yang terjadi dengan adanya tanda peak (puncak) pada nilai absorbansi.

Analisis spektrum UV-Vis dilakukan untuk mengetahui pita resonansi plasmon menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan resolusi panjang gelombang 200 – 800 nm. Koloid nanopartikel perak terbentuk dengan puncak resonansi plasmon kisaran rentang antara 400 nm- 450 nm. Pembentukan AgNPs pada ekstrak ditandai oleh spectrum UV-Vis dari medium reaksi.

### 3.9.2 Particle Size Analyzer (PSA)

Nanopartikel perak yang terbentuk dikarakterisasi dengan PSA bertujuan untuk menentukan ukuran partikel yang diawali dengan larutan biosintesis yang sudah berubah warna dilakukan sentrifugasi. Kemudian sampel dihomogenkan dengan vortex. Sampel larutan nanopartikel dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 3 mL. Kemudian kuvet dimasukkan ke dalam instrumen dan ditembakkan dengan sinar tampak sehingga terjadi difraksi. Analisa distribusi ukuran pada partikel berdasarkan pada ukuran maksimum yang dihasilkan dalam persentase volume sampel tertentu. Data hasil pengujian distribusi partikel tercatat dalam komputer yang terhubung pada alat.

## 3.10 PengujianAktivitasAntibakteri dengan Metode Cakram Disk (Kirby-Bauer)

### 3.10.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat sebelum digunakan harus dicuci bersih dan dibilas dengan aquadest. Alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus dengan kertas HVS putih dan disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180˚selama 2 jam. Alat-alat yang terbuat dari logam disterilkan dengan panas lampu spiritus selama30 detik. Alat-alat karet dan plastik yang tidak tahan pemanasan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121˚C selama 15 menit (Wahyuningsih, et al., 2020).

### 3.10.2 Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)

Media Mueller Hinton Agar (MHA) dibuat dengan cara ditimbang MHA sebanyak 38 gram, lalu dilarutkan dengan 1000 mL aquadest dalam beaker glass.Kemudian dipanaskan sampai mendidih untuk melarutkan media. Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121˚C selama 15 menit. Setelah itu media didiamkan sampai sekitar suhu 45-50˚, dan dituangkan media ke dalam cawan petri steril dan disimpan pada suhu 2-8˚C.

### 3.10.3 Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Sebanyak 0,9 gram Natrium Klorida (NaCl) dilarutkan dengan 100 mL aquadest ke dalam labu ukur 100 mL sampai homogen, dimasukkan dalamerlenmeyer dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 1210selama 1 menit.

### 3.10.4 Pembuatan Standar Kekeruhan Mac Farland 0,5

Larutan Barium Klorida (BaCl2) 1% sebanyak 0,05 mL. Campurkandengan larutan Asam Sulfat (H2SO4) 1% sebanyak 9,95 mL. Kocok larutanhingga homogen dan terlihat keruh (Retnaningsih, et al., 2019).

### 3.10.5 PreparasidanBiakanBakteri

Diambilbiakanmurnibakteriyakni Staphylococcus aureusmasingmasingbakterimenggunakanosesterilsebanyak 1-3 kali.Laludigoreskansecaraaseptispada media MHA yang sudahpadatpadacawanyaitudenganmendekatkancawanpadanyalaapisaatmenggoreskanjarumose. Kemudiancawan petri ditutupkembalidandiinkubasiselama 24 jam padasuhu 37˚dalaminkubator. Bakteri yang sudahdiremajakanselama 24 jam diambil 1-2 osekemudiandimasukkankedalamtabungreaksi. Pembuatansuspensibakteri Staphylococcus aureusdilakukandengancaramenambahkanlarutanNaCl 0,9% di dalamtabungsampaididapatkankekeruhan yang sesuaidenganstandarkekeruhan McFarland 0.5 untukmendapatkanbakterisebanyak 1,5 x 108 CFU/mL.

Cara pengukurantingkatkekeruhandengancaramembandingkansecaraberdampingan. Kekeruhandinilaidengancaradibandingkandenganlatarbelakangkertasputihdengangarishitamkontras yang dilakukanolehduapengamat di ruangan yang terang. Jikakurangkeruh, suspensidapatditambahkankolonibakteri, danjikaterlalukeruh, suspensidapatditambahkanNaCl 0,9% sampaididapattingkatkekeruhan yang samaantaraduapengamat.

### 3.10.6 PembuatanSuspensiAntibakteriKontrolPositif

ditimbangsebanyak 300 mg, kemudianditambahdengan 10 ml aquadeststerildandivortexsehinggadidapatkankonsentrasi 30 mg/ml. Pengenceranselanjutnyadilakukandengancaramengambil 1 ml larutankloramfenikolkonsentrasi 30 mg/ml ditambah 9 ml aquadeslaludivortexselama 60 detiksehinggadidapatkankonsentrasi 3 mg/ml. Konsentrasikloramfenikol 3 mg/mL, kemudianditeteskanpada disk sebanyak 10 µl sehinggadidapatkankonsentrasikloramfenikol 30 µg/disk (WHO, 2003).

3.10.7 UjiDayaHambatdenganMetode Kirby Bauer Disk Diffusion Konsenrasiekstraknanopartikeldaunseledri yang digunakanialah 4 konsentrasiyaitu 1 mM, 2 mM, 5 mM, dan 10 mM, danditambah 1 kelompokkontrolpositifbakteridan 1 kelompokkontrolnegatifbakteri. Langkahpertama yang dilakukanyaitubakteriuji Staphylococcus aureusdisuspensikandalamNaCl 0,9% kemudiandiinokulasikansecaramerata di ataslempeng MHA, kemudiankertascakram yang telahberisi 10µL darimasing-masingkonsentrasisediaanujiditempatkan di ataslempeng MHA padacawanpertama, sertakontrolpositifdankontrolnegatifpadacawankedua. Sebagaikontrolpositifuntukbakteri Staphylococcus aureusdigunakankertascakramkloramfenikoldan 37 sebagaikontrolnegatifdigunakankertascakram yang direndamdalamaquabidestselama ±2 jam.Selanjutnya media diinkubasipadasuhu 37˚selama 24 jam.Zonahambat yang terbentukdiukurdenganmenggunakanjangkasorong.Prosedurdiulangsebanyak 3 kali pengulangan di atas media MHA.

## 3.11Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini meliputi karakteristik nanopartikel perak yang disintesis dengan ekstrak daun Seledri(*Apiumgraveolens*L.) sebagai bioreduktor dan data pengujian aktivitas antibakteri. Nanopartikel perak dianalisis menggunakan Spektroskopi UV-Vis, dan PSA. Uji antibakteri nanopartikel perak meliputi uji kualitatif dengan pengamatan zona hambat.