**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

**3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian**

 Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium. Variable bebas dalam penelitian ini adalah sintesis nanopartikel perak dengan berbagai konsentrasi pada ekstrak daun jarak pagar sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Rancangan penelitian ini meliputi pengambilan dan identifikasi sampel, preparasi dan pembuatan ekstrak daun jarak pagar pembuatan larutan AgNO₃ Variasi konsentrasi 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1mM, Optimasi konsentrasi larutan AgNO₃, Sintesis nanopartikel perak dengan menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dan PSA,  dan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang dilakukan secara in vitro menggunakan metode *Kirby-Bauer* dengan mengamati dan mengukur zona hambat nanopartikel perak dari ekstrak daun jarak pagar.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Variabel penelitian ini dibagi menjadi tiga macam, yaitu :

1. **Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah daun jarak pagar dan konsentrasi AgNO3 dengan variasi (1 mM, 2 mM, 3 mM dan 4 mM) serta waktu reaksi (1 hari, 2 hari, 3 hari, 4 hari, 5 hari, dan 6 hari) dalam pembentukan nanopartikel perak yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphyloccocus aureus*.

1. **Variabel Terikat**

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah nanopartikel perak yang terbentuk dari sintesis menggunakan ekstrak daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L*.)* serta uji aktivitas antibakteri nanopartikel perak dari ekstrak daun jarak pagar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

1. **Variabel Kontrol**

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah suhu, waktu, dan kecepatan pengadukan pada proses pembentukan nanopartikel perak menggunakan ekstrak daun jarak pagar sebagai bioreduktor. Faktor luar yang dapat mempengaruhi variable bebas dan variable terikat pada uji aktivitas antibakteri adalah media pertumbuhan bakteri, bakteri *Staphylococcus aureus*, waktu, dan suhu inkubasi.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ukuran nanopartikel yang dihasilkan dari sintesis nanopartikel perak menggunakan bioreduktor ekstrak daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L*.)* pada variasi konsentrasi AgNO3 dan zona hambat bakteri yang terbentuk dalam uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi cakram *Kirby-Bauer*

## 3.2 Lokasi dan Jadwal Penelitian

**3.2.1 Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara (UMN) Al-Washliyah Medan**.**

### 3.2.2 Jadwal Penelitian

### Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2022 sampai April 2023

### 3.3 Bahan

###  Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun Jarak Pagar, aquabidest. AgNO3, Mueller Hinton Agar (MHA) , NaCl 9%, suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*, vial, kertas perkamen, kertas saring whatmann No.42, aluminium foil, kertas label, tisu, dan kertas cakram.

### 3.4 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : beaker glass (pyrex®), gelas ukur (pyrex®), labu ukur (pyrex®), spatula, blender, pipet, labu tentukur (pyrex®), erlenmeyer (pyrex®), ball pipet, batang pengaduk, corong (pyrex®), timbangan analitik, magnetik stirer (IKA), hot plate, cawan petri, jarum ose, kapas, pipet mikro, pinset, bunsen, gunting, jangka sorong, spektrofotometer Uv-Vis (shimadzu), Particle Size Analyzer (PSA) (Fritsch), inkubator, dan autoklaf.

**3.5 Prosedur Penelitian**

**3.5.1 Pengumpulan dan Pengolahan Sampel Daun Jarak Pagar**

Daun jarak pagar yang telah dikumpulkan, dicuci bersih dengan air mengalir, lalu daun jarak pagar dipotong tipis-tipis lalu ditimbang berat basah, kemudian dikeringkan didalam lemari pengering dengan suhu 40-50ºC. Sampel dianggap kering bila diremas rapuh dan hancur, lalu ditimbang berat kering, kemudian diserbukkan dengan menggunakan blender lalu disimpan didalam wadah kering dan terlindung dari cahaya matahari.

**3.5.2 Determinasi Sampel**

Determinasi tumbuhan dilakukan di Herbarium Medanense (MEDA) Departemen Biologi FMIPA Universitas Sumatera Utara Jalan Bioteknologi No.1 Kampus USU Medan.

**3.5.3 Ekstraksi Sampel**

Dicuci daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L*.*) hingga bersih, dikeringkan dan dipotong potong hingga halus, lalu ditimbang serbuk simplisia sebanyak 5 gram daun jarak pagar yang sudah kering dimasukkan kedalam beaker glass 250 mL dan ditambahkan 100 mL aquabidest lalu dipanaskan dengan suhu 50ºC selama 15 menit kemudian didinginkan. Apabila sudah mencapai suhu ruang, air rebusan dituang dan disaring menggunakan kertas saring Whattman No.42. Air rebusannya dapat digunakan langsung untuk proses sintesis nanopartikel perak. (Taba et al., 2019)

**3.5.4 Pembuatan Larutan AgNO₃ Variasi Konsentrasi 4 mM, 3mM, 2mM, dan 1 mM**

Sebanyak 0,085 gram serbuk AgNO₃ dilarutkan ke dalam aquabidest sampai volume 250 mL kemudian dicampurkan sampai homogen untuk membuat larutan AgNO3 4 mM. Selanjutnya dipipet sebanyak 37,5; 25; dan 12,5 mL dari larutan AgNO₃ 4 mM ke dalam labu ukur 50 mL digojrok lalu ditambahkan aquabidest hingga tanda batas untuk membuat konsentrasi AgNO₃ 3; 2; dan 1 mM. ( Taba et al., 2019).

**3.5.5 Sintesis Nanopartikel Perak**

Proses biosintesis untuk mengetahui pembentukan nanopartikel perak.

Proses ini dilakukan dengan pencampuran larutan AgNO3 variasi konsentrasi 4, 3, 2, dan 1 mM yang dipipet sebanyak 40 mL dan masing-masing larutan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, kemudian 1 mL ekstrak daun jarak pagar ditambahkan ke dalam erlenmeyer hingga berwarna kuning keruh. Campuran diaduk dengan pengaduk magnetik stirer selama 15 menit dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 50°C dan berubah warna menjadi kuning kecoklatan, kemudian didinginkan dan dimasukkan ke dalam botol vial.

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 pada absorbansi panjang gelombang 400-450 nm hingga terbentuk nanopartikel perak. Setelah nanopartikel terbentuk, ekstrak larutan konsentrasi 1 mM, 2 mM, 3 mM, dan 4 mM tersebut dianalisis dengan PSA.

**3.6 Karakterisasi Nanopartikel Perak**

**3.6.1 Spektrofotometer Uv- Vis**

Pada pengujian karakterisasi nanopartikel perak yang menggunakan spektrofotometer Uv-Vis sampel yang digunakan yaitu hasil biosintesis daun jarak pagar dengan konsentrasi 1 mM, 2 mM, 3 mM, dan 4 mM setelah bereaksi dan mengalami perubahan warna dengan pengukuran absorbansi maksimum selama 6 hari, kemudian dilakukan uji di Laboratorium Penelitian Fakultas Farmasi UMN Al-Washliyah.

Karakterisasi hasil sintesis dilakukan dengan menggunakan instrumen Spektrofotomer Uv-2600 Shidmazu yang telah distandarisasi dengan menggunakan larutan blanko, yang merupakan AgNO3 tanpa sampel daun jarak pagar. Larutan yang mengandung nanopartikel perak dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dilakukan pengukuran pada panjang gelombang 200-700 nm. Pengujian ini digunakan untuk mengetahui pembentukan nanopartikel perak yang terjadi dengan adanya tanda puncak pada nilai absorbansi. Koloid nanopartikel perak terbentuk dengan puncak resonansi plasmon kisaran rentang antara 400 nm- 450 nm. Pembentukan AgNPs pada ekstrak ditandai oleh spektrum Uv-Vis dari medium reaksi.

**3.6.2 Ukuran Nanopartikel Perak dengan *Particle Size Analyzer (PSA)***

 Nanopartikel perak yang terbentuk dikarakterisasi dengan PSA bertujuan

 untuk menentukan ukuran partikel dari sediaan. Sampel larutan nanopartikel dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 10 mL. Kemudian kuvet dimasukkan ke dalam instrument dan ditembakkan dengan sinar tampak sehingga terjadi difraksi. Analisis distribusi ukuran pada partikel berdasarkan ukuran maksimum yang dihasilkan dalam persentase volume sampel tertentu. Data hasil pengujian distribusi partikel tercatat dalam komputer yang terhubung pada alat.

 **3.7 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Cakram Disk (Kirby-Bauer)**

**3.7.1 Sterilisasi Alat**

Alat-alat yang 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 180ºC selama 2 jam. Alat-alat yang terbuat dari logam disterilkan dengan panas lampu spiritus selama 30 detik. Alat-alat karet dan plastic yang tidak tahan pemanasan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 ºC selama 15 menit (Wahyuningsih, *et al*., 2020).

**3.7.2 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 121ºC selama 15 menit. Setelah itu media didiamkan sampai sekitar suhu 45-50 ºC, dan dituangkan media ke dalam wadah cawan petri steril dan disimpan pada suhu 2-8ºC .

**3.7.3 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 dalam Erlenmeyer dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121ºC selama 1 menit.

 **3.7.4 Pembuatan Standar Kekeruhan Mc Farland 0.5**

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

 **3.7.5 Preparasi dan Biakan Bakteri**

Diambil biakan murni bakteri yakni *Staphylococcus aureus* masing- masing bakteri menggunakan ose steril sebanyak 1-3 kali. Lalu digoreskan secara aseptis pada media MHA yang sudah padat pada cawan yaitu dengan mendekatkan cawan pada nyala api saat menggoreskan jarum ose. Kemudian cawan petri ditutup kembali dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.

 Bakteri yang sudah diremajakan selama 24 jam diambil 1-2 ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan cara menambahkan larutan NaCl 0,9% di dalam tabung sampai didapatkan kekeruhan yang sesuai dengan standar kekeruhan McFarland 0.5 untuk mendapatkan bakteri sebanyak 1,5 x 108 CFU/mL.

 Cara pengukuran tingkat kekeruhan dengan cara membandingkan secara berdampingan. Kekeruhan dinilai dengan cara dibandingkan dengan latar belakang kertas putih dengan garis hitam kontras yang dilakukan oleh dua pengamat di ruangan yang terang. Jika kurang keruh, suspensi dapat ditambahkan koloni bakteri, dan jika terlalu keruh, suspensi dapat ditambahkan NaCl 0,9% sampai didapat tingkat kekeruhan yang sama antara dua pengamat.

**3.7.6 Pembuatan Suspensi Kontrol Positif Kloramfenikol**

 Kloramfenikol ditimbang sebanyak 300 mg, kemudian ditambah dengan 10 mL aquadest steril dan divortex sehingga didapatkan konsentrasi 30 mg/ml. Konsentrasi kloramfenikol 3 mg/mL, kemudian diteteskan pada disk sebanyak 10 μl sehingga didapatkan konsentrasi kloramfenikol 30 μg/disk (WHO, 2003).

 **3.7.7 Uji Daya Hambat dengan Metode Kirby Bauer Disk Diffusion**

 Konsentrasi ekstrak nanopartikel daun Jarak Pagar yang digunakan ialah 4 konsentrasi yaitu 1 mM, 2 mM, 3 mM, dan 4 mM, dan ditambah 1 kelompok kontrol positif bakteri dan 1 kelompok kontrol negatif bakteri. Langkah pertama yang dilakukan yaitu bakteri uji *Staphylococcus aureus* disuspensikan dalam NaCl 0,9 % kemudian diinokulasikan secara merata di atas lempeng MHA, kemudian kertas cakram yang telah berisi 10 μL dari masing-masing konsentrasi sediaan uji ditempatkan di atas lempeng MHA pada cawan pertama, serta kontrol positif dan kontrol negatif pada cawan kedua. Sebagai kontrol positif untuk bakteri *Staphylococcus aureus* digunakan kertas cakram kloramfenikol dan sebagai kontrol negatif digunakan kertas cakram yang direndam dalam aquabidest selama ±2 jam. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong. Prosedur diulang sebanyak 3 kali pengulangan di atas media MHA.

**3.8 Analisis Data**

 Analisis data dalam penelitian ini meliputi karakteristik nanopartikel perak yang disintesis dengan ekstrak daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L*.)* sebagai bioreduktor dan data pengujian aktivitas antibakteri. Nanopartikel perak dianalisis menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, dan PSA. Uji antibakteri nanopartikel perak meliputi uji kualitatif dengan pengamatan zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus.*