

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Objek Penelitian

Pada objek penelitian ini yaitu Uji Aktivitas Antibakteri Sabun Nano Partikel Perak (Ag) Ekstrak Daun Turi (*sesbania grandiflora*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.2 Sampel dan Teknik Sampling

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan adalah sediaan sabun Nanopartikel perak (Ag) dari ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*). Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) di dapat dari Desa Pacul, Kecamatan Talang, Kabupaten Tegal. Sedangkan Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini adalah secara “*simple random sampling*” yaitu dengan pengambilan sampel secara acak.

3.3 Variabel Penelitian

Terdapat beberapa variabel dalam penelitian ini antara lain:

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dapat dikatakan sebagai variabel yang dapat mempengaruhi variabel lain, yang saling berhubungan dengan variable terikat. Penelitian ini variable bebasnya yaitu konsentrasi AgNO_3 (Perak Nitrat) dalam sediaan sabun Nanopartikel perak (Ag) ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*).

3.3.2 Variable Terikat

Variable terikat sendiri merupakan variabel yang dapat terikat dan dipengaruhi oleh variabel bebas. Penelitian ini menggunakan variable terikatnya yaitu sifat fisik dan diameter daya hambat antibakteri sabun Nanopartikel perak (Ag) ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variable terkendali adalah variabel yang dapat dikendalikan atau dibuat secara konstan sehingga tidak akan mempengaruhi variable lain maupun hasil dari penelitian tersebut. Variable terkendali dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri, waktu dan suhu inkubasi, metode pembuatan sabun dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.4 Teknik Pengambilan Data

3.4.1 Cara Pengumpulan Data

Pengumpulan data dalam penelitian ini menggunakan metode eksperimen di Laboratorium Politeknik Harapan Bersama Kota Tegal. Dengan data yang diambil yaitu secara kualitatif dan kuantitatif.

3.4.2 Alat dan bahan

1. Alat

Dalam penelitian ini membutuhkan alat-alat diantaranya yaitu timbangan analitik, blender, magnetic stirer, beaker glass,

gelas ukur, corong kaca, sendok tanduk, batang pengaduk, tabung reaksi, cawan petri, mortir dan stamper, pipet tetes, cawan porselin, mikropipet dan tip, mikroskop, bunsen, kaki tiga, kasa asbes, aluminium foil, labu erlenmeyer, kapas, kertas saring, kain flanel, boor prop, Ph universal, jangka sorong, kawat ose, penggaris, spektrofotometer UV-Vis, coloni counter, inkubator, autoklaf.

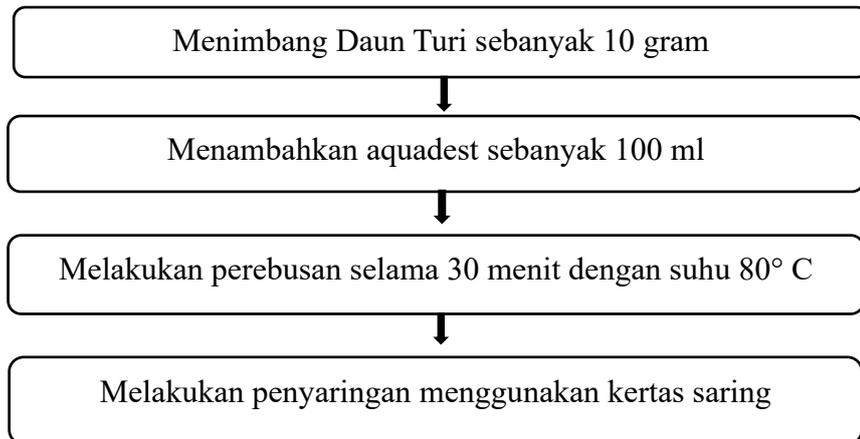
2. Bahan

Dalam penelitian ini membutuhkan bahan di antaranya yaitu daun turi (*Sesbania grandiflora*), AgNO₃ (Perak Nitrat), aquadest, SLS (Sodium Laury Sulfat), Na₂SO₃, STTP, Asam Sitrat, Foam Booster, Oleum Rosae, *Nutrient Agar* (NA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Staphylococcus aureus*.

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan Ekstraksi Daun Turi

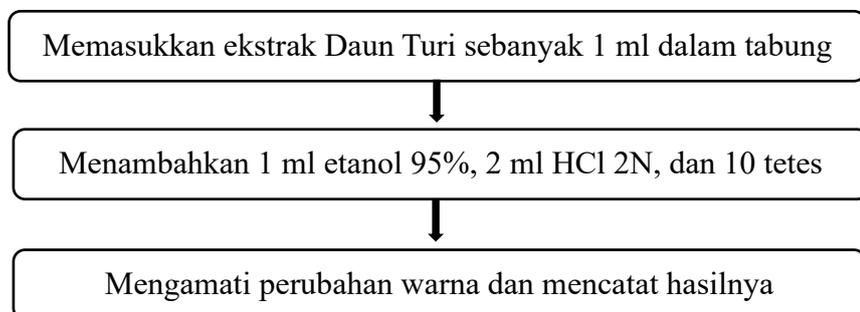
Dalam pembuatan ekstraksi Daun Turi (*Sesbania grandiflora*), dilakukan dengan menimbang sebanyak 10 gram. Kemudian tambahkan dengan aquadest sebanyak 100 ml. Perebusan dilakukan selama 30 menit dengan suhu 80° C dan sesekali sambil dilakukan pengaduk. Setelah itu tunggu hingga suhu turun dan mulai dingin, lalu saring menggunakan kertas saring (Rama et al., 2023).



Gambar 3. 1 Skema Pembuatan Ekstraksi Daun Turi

3.5.2 Uji Senyawa Flavonoid

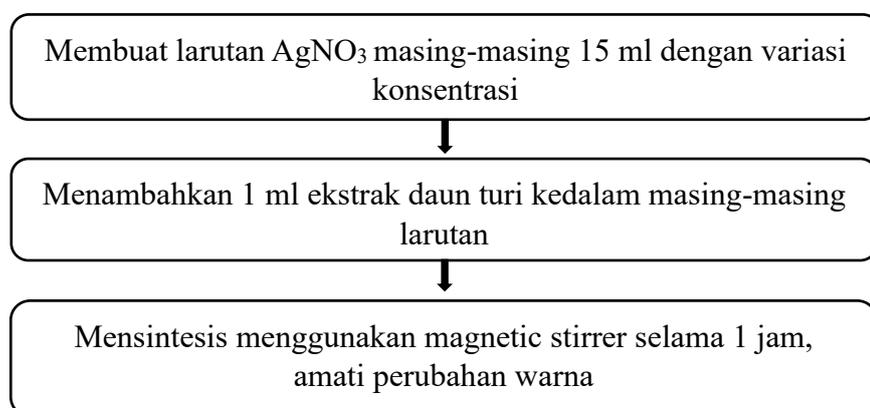
Dalam uji golongan senyawa flavonoid pada ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) dilakukan dengan cara mengukur sebanyak 2 ml ekstrak, kemudian masukkan kedalam tabung reaksi. Menambahkan sebanyak 1 ml etanol 95% dan 2 ml HCl 2N, selanjutnya tambahkan sebanyak 10 tetes HCl pekat. Apabila terjadi perubahan warna merah, kuning, jingga, ungu atau biru maka dapat menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung senyawa golongan flavonoid (Sativareza, 2021).



Gambar 3. 2 Skema Uji Senyawa Flavonoid

3.5.3 Sintesis dan Karakteristik Nanopartikel Perak (Ag)

Dalam perlakuan sintesis Nanopartikel perak ini mengacu pada prosedur dari (Sari et al., 2017) yang berhasil dikembangkan. Sintesis larutan AgNO₃ penambahan ekstrak daun turi sebagai zat pereduksi dengan perbandingan 1:15 (Nalawati et al., 2021). Sebanyak 1 ml ekstrak direaksikan kedalam 15 ml larutan AgNO₃ dengan variasi konsentrasi 1 mM, 2 mM, 3 mM. Kemudian disintesis dengan menggunakan magnetic stirrer selama 1 jam sampai terjadinya perubahan warna pada larutan. Apabila terbentuk warna larutan yang berubah menjadi kuning kecoklatan, maka dapat dikatakan terbentuknya nanopartikel perak.

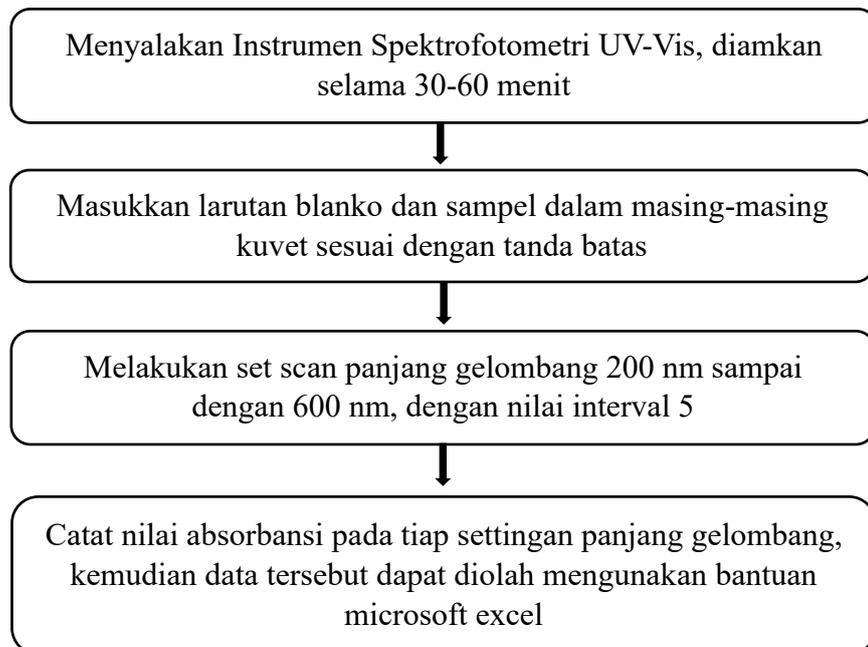


Gambar 3. 3 Skema Sintetis dan Karakteristik Nanopartikel Perak (Ag)

3.5.4 Pengukuran Spetrofotometri UV-Vis

Dalam Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menentukan nilai absorbansi dan λ_{max} pada variasi konsentrasi Nanopartikel perak (Ag) yang terdiri dari 1 mM, 2 mM, dan 3 mM. Memasukkan larutan blanko kedalam kuvet dan larutan sampel dengan konsentrasi 1mM pada sampel 1. Pembacaan panjang

gelombang pertama menggunakan sampel 1 terlebih dahulu, kemudian dilanjutkan dengan sampel berikutnya dan menggunakan larutan blanko yang sama. Nyalakan alat spektrofotometri UV-Vis sesuai dengan SOP nya, yang harus didiamkan sekitar 30-60 menit. Selanjutnya untuk mendapatkan nilai absorbansi, tentukan terlebih dahulu range panjang gelombang dan interval yang dipilih. Range panjang gelombang yang dipilih adalah 200-600 nm dengan nilai interval 5. Filter Holmium oxide digunakan untuk pengukuran akurasi panjang gelombang. Memilih menu “spectrum” pada instrumen, setting panjang gelombang yang akan ditentukan. Kemudian catat nilai absorbansi yang muncul dilayar instrumen. Pengolahan data nilai absorbansi dan penentuan λ_{max} dengan menggunakan bantuan microsoft excel.



Gambar 3. 4 Skema Spektrofotometri UV-Vis

3.5.5 Formulasi Sabun Nanopartikel perak (Ag)

Tabel 3. 1 Formula Modifikasi Sediaan Sabun Nanopartikel Perak (Ag)

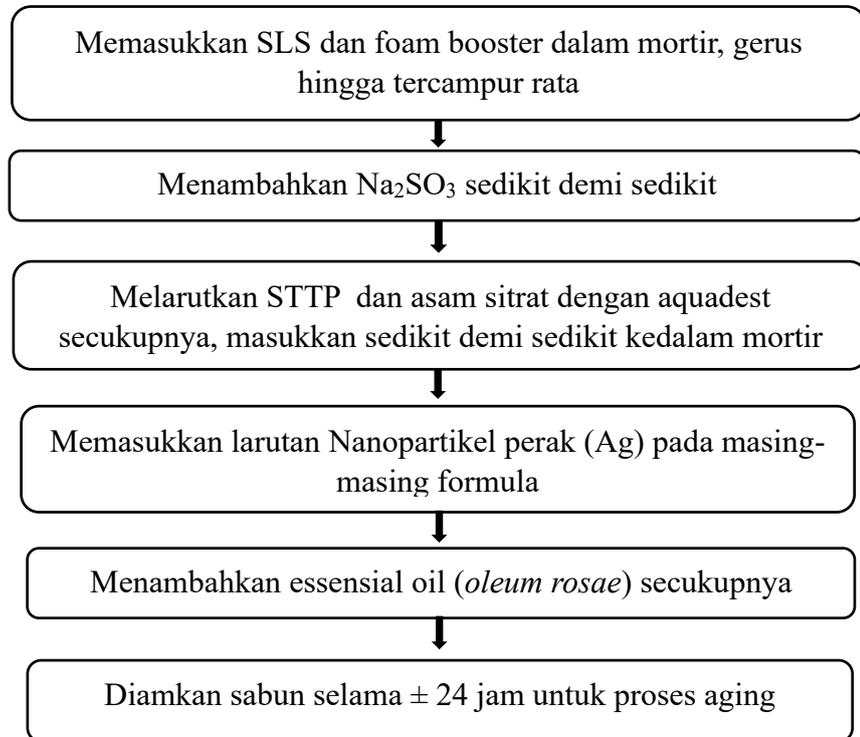
Bahan	Satuan	Fungsi bahan	Formula			Standar	Sumber
			I	II	III		
Nanopartikel Perak (Ag)	ml	Bahan aktif antibakteri	2	2	2	1-2	(Rufaidah, 2021)
SLS	gram	Surfaktan	9	9	9	9-20	(Sriyana et al., 2023)
Na ₂ SO ₃	gram	Pembentuk sabun	6	6	6	6-10	(Sriyana et al., 2023)
STTP	gram	Pengkelat	3	3	3	3-6	(Sriyana et al., 2023)
Asam sitrat	gram	Penetral pH	0,15	0,15	0,15	0,1-2,0	(Rowe dkk, 2009)
Essensial oil	tetes	Pengharum	q.s	q.s	q.s	q.s	(Depkes RI, 2014)
Foam booster	gram	Pembangkit busa	1,4	1,4	1,4	1-7	(Sriyana et al., 2023)
Aquadest	mL	Pelarut	Ad 100	Ad 100	Ad 100	100	Depkes RI, 2014)

Keterangan:

- 1) **FI**= Formula sabun dengan konsentrasi AgNO₃ 1mM
- 2) **FII**= Formula sabun dengan konsentrasi AgNO₃ 2mM
- 3) **FIII**= Formula sabun dengan konsentrasi AgNO₃ 3mM

3.5.6 Pembuatan Sabun Cair

Menyiapkan alat dan bahan, serta menimbang semua bahan yang digunakan. Langkah awal mencampurkan SLS dan Foam booster di dalam mortir gerus sampai tercampur rata. Menambahkan Na_2SO_3 sedikit demi sedikit sambil di gerus hingga rata. Larutkan STTP dengan aquadest secukupnya aduk hingga larut, kemudian campurkan kedalam mortir sedikit demi sedikit sambil di aduk perlahan. Larutkan asam sitrat dengan aquadest aduk hingga larut ,lalu tambahkan kedalam mortir aduk sampai homogen. Memasukkan Larutan AgNO_3 yang sudah di sintesis dengan ekstrak daun turi sebelumnya dengan variasi konsentrasi di setiap formulanya, aduk kembali hingga Larutan Nanopartikel perak (Ag) dapat tercampur dengan semua basis sabun. Langkah terakhir menambahkan essensial oil (*oleum rosae*) secukupnya, aduk hingga essenses dapat tercampur rata. Setelah itu, sediaan sabun dapat disimpan terlebih dahulu atau didiamkan selama ± 24 jam hingga di dapat masa sabun yang bening dan kental.

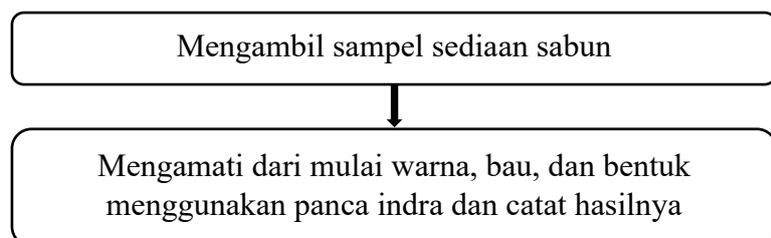


Gambar 3. 5 Skema Pembuatan Sabun Cair

3.5.7 Evaluasi Fisik Sabun Cair

a. Uji Organoleptis

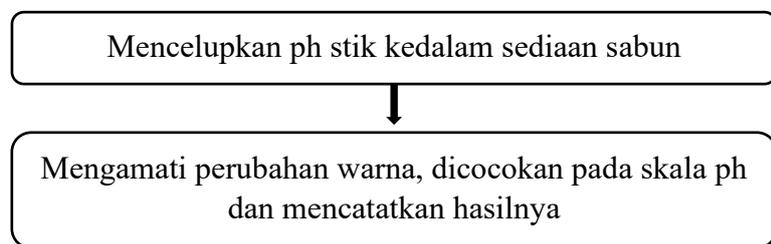
Pada pengujian organoleptis merupakan pemeriksaan secara langsung sabun cair dengan panca indra. Pemeriksaan tersebut meliputi warna, bau, dan bentuk sediaan sabun tersebut.



Gambar 3. 6 Skema Uji Organoleptis

b. Uji Ph

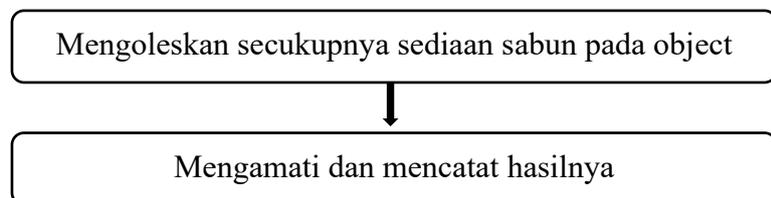
Dengan cara mencelupkan Ph stik kedalam sediaan sabun. Kemudian tunggu beberapa saat hingga terjadi perubahan warna pada indikator ph tersebut. Setelah itu indikator ph dapat dicocokkan pada label skala ph sesuai dengan warna yang ditunjukkan.



Gambar 3. 7 Skema Uji pH

c. Uji Homogenitas

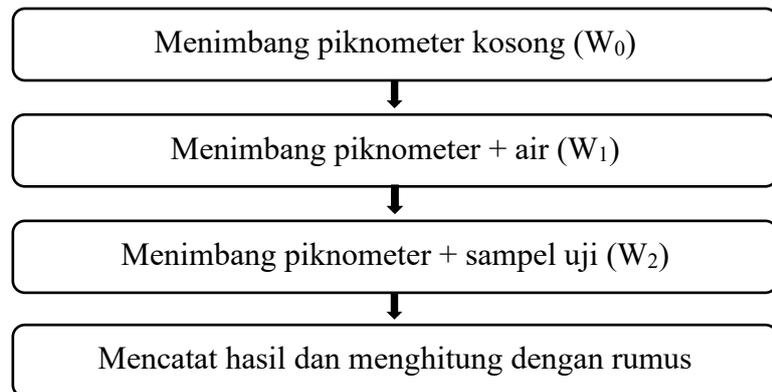
Dengan cara mengoleskan sediaan sabun secukupnya pada objek glass, kemudian ratakan sedikit. Mengamati apakah terdapat partikel-partikel yang belum rata. Apabila menimbulkan susunan sediaan sabun yang homogen dan tidak ada partikel yang mengganggu, maka dapat dikatakan sediaan tersebut sudah homogen.



Gambar 3. 8 Skema Uji Homogenitas

d. Uji Bobot Jenis

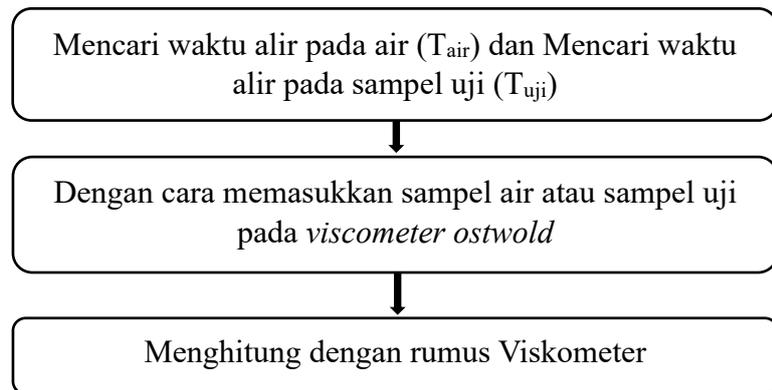
Pada pengujian bobot jenis dilakukan dengan mempersiapkan piknometer kosong sebagai berat pikno kosong (W_0). Kemudian dilakukan kalibrasi pada piknometer tersebut dengan air, lalu timbang berat piknometer berisi air sebagai nilai (W_1). Setelah itu pikometer diisi dengan sampel uji dan ditimbang sebagai nilai (W_2).



Gambar 3. 9 Skema Uji Bobot Jenis

e. Uji Viskositas

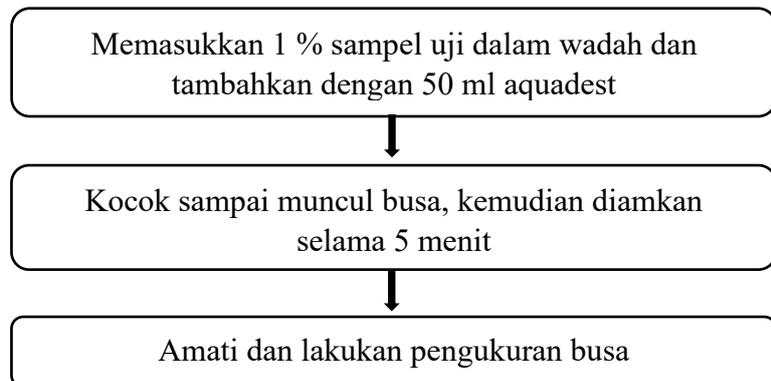
Dengan cara mencari waktu alir air terlebih dahulu sebagai nilai T_{air} , kemudian mencari waktu alir sampel uji sebagai nilai (T_{uji}). Setelah itu, hasil yang diperoleh dapat diperhitungkan dengan menggunakan rumus dibawah ini.



Gambar 3. 10 Skema Uji Viskositas
(Rufaidah, 2021)

f. Uji Tinggi busa

Sekitar 1% sampel uji dimasukkan kedalam wadah, lalu ditambahkan dengan 50 ml aquadest. Kemudian dikocok sampai muncul busa, diamkan selama 5 menit. Setelah itu amati kembali dan lakukan pengukuran pada busa.

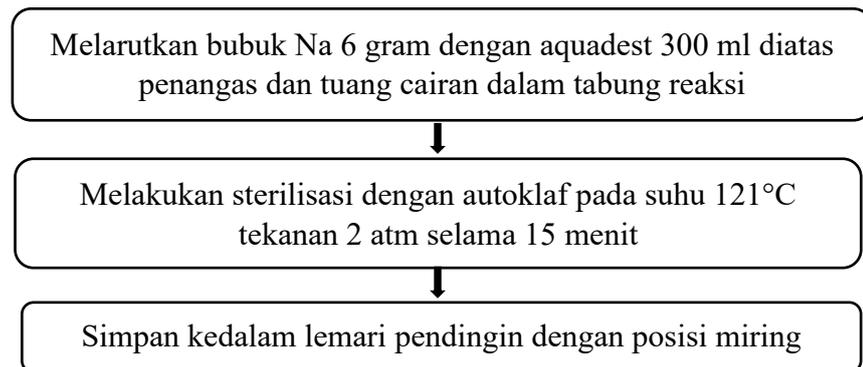


Gambar 3. 11 Skema Uji Tinggi Busa

3.5.8 Pembuatan media NA (*Nutrient agar*)

Bubuk NA sebanyak 6 gram dimasukkan kedalam labu erlenmeyer, tambahkan aquadest sebanyak 300 ml. Panaskan diatas api bunsen sambil mengecek Ph (6,8-7,0). Setelah itu, tuangkan

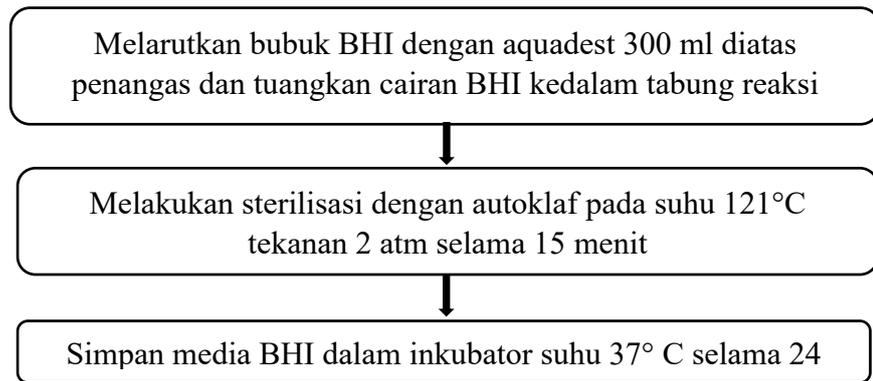
cairan media NA ± sebanyak 10 ml kedalam tabung reaksi. Selanjutnya lakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekan 2 atm. Menyimpan media NA dalam lemari pendingin dalam keadaan miring.



Gambar 3. 12 Skema Pembuatan Media NA
(Tarasti, 2020)

3.5.9 Pembuatan media BHI (*Brain heart infusion*)

Bubuk BHI sebanyak 11,1 gram dimasukkan dalam beaker glass dengan menambahkan aquadest sebanyak 300 ml. Kemudian panaskan diatas api bunsen sambil mengecek Ph (6,8-7,0). Setelah itu, tuangkan cairan media BHI ± sebanyak 10 ml kedalam tabung reaksi. Selanjutnya dilakukan sterilisasi media NA menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekan 2 atm. Menyimpan media BHI kedalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

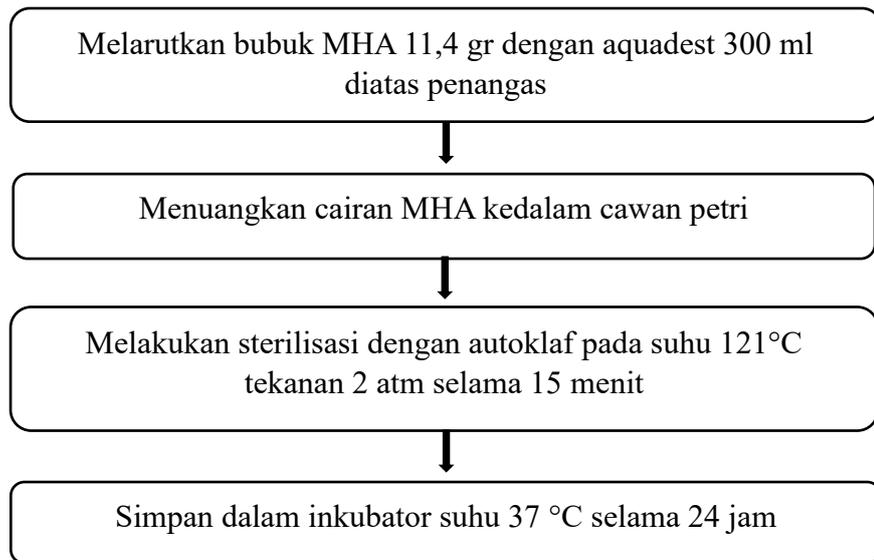


Gambar 3. 13 Skema Pembuatan Media BHI

(Tarasti, 2020)

3.5.10 Pembuatan media MHA(*Muller Hinton Agar*)

Bubuk MHA yang sudah ditimbang sebanyak 11,4 gram, dimasukkan kedalam beaker glass dengan menambahkan aquadest sebanyak 300 ml. Kemudian pemasakan diatas api bunsen sambil mengecek Ph (6,8-7,0). Setelah itu, tuangkan cairan media MHA ± sebanyak 10 ml kedalam Cawan petri sekitar setengah dari cawan porselin. Selanjutnya dilakukan sterilisasi media MHA menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekan 2 atm. Menyimpan media MHA yang sudah padat kedalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.

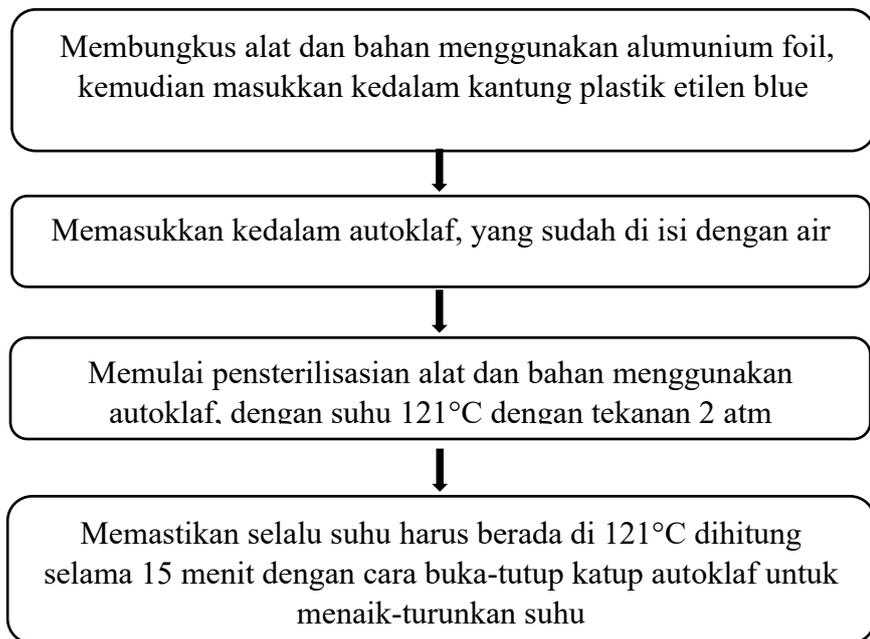


Gambar 3. 14 Skema Pembuatan Media MHA

(Tivani & Perwitasari, 2021)

3.5.11 Proses Sterilisasi Alat

Dalam proses pensterilisasi alat-alat dan media tanam yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri. Dilakukan sterilisasi akhir menggunakan autoklaf dengan metode uap panas bertekanan tinggi sekitar 2 atm pada suhu stabil 121°C selama 15 menit. Peralatan yang disterilisasi diantaranya yaitu: jarum ose, penjepit kayu, dan cotton but. Sedangkan media yang disterilisasi yaitu media NA, media BHI, dan media MHA. Selanjutnya semua alat dan bahan dibungkus dengan aluminium foil dimasukkan kedalam kantong plastik etilen blue untuk proses sterilisasi diautoklaf.

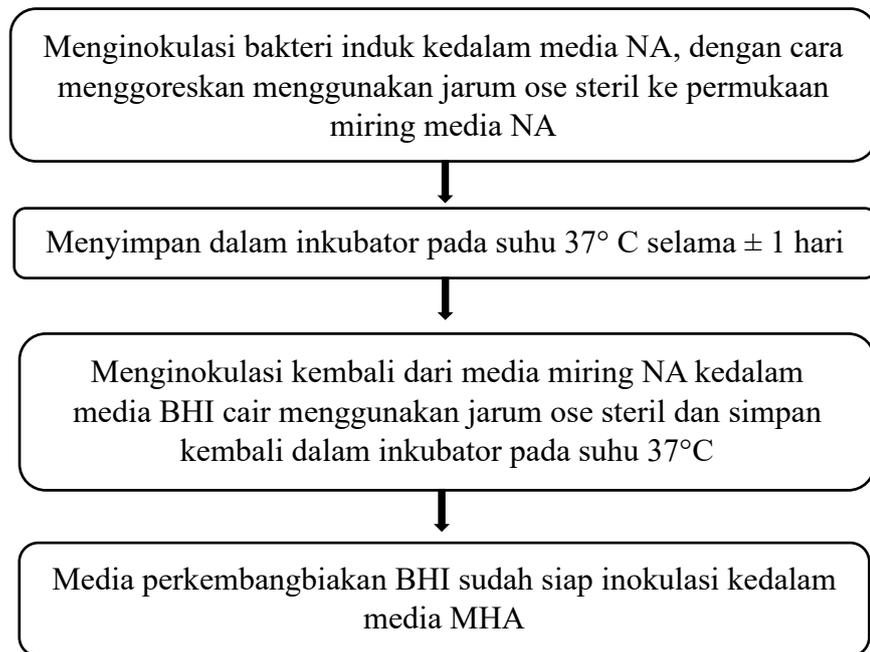


Gambar 3. 15 Skema Proses Sterilisasi Alat (Tivani & Perwitasari, 2021)

3.5.12 Pembuatan Inokulum

Langkah pertama adalah menyiapkan bakteri induk yaitu *Staphylococcus aureus* dan media NA yang sudah disterilisasikan. Proses pengerjaan pembuatan inokulum harus berada dalam keadaan aseptis yaitu di dalam ruangan LAF (*Laminar Air Flow*) yang sebelumnya sudah disterilkan menggunakan alkohol 70 % diseluruh bagian ruangan dan nyalakan api bunsen. Kemudian mengambil bakteri induk menggunakan jarum ose yang sudah disterilkan dengan bara api untuk dipindahkan kedalam media NA, dilakukan dengan cara menggores bakteri induk pada media NA miring. Setelah itu, media NA miring yang sudah diinokulasi dengan bakteri induk diinkubasi selama 24 jam pada suhu stabil 37° C. Langkah selanjutnya, proses pemindahan kembali dari media miring

NA yang sudah ditanami bakteri *Staphylococcus aureus* kedalam media BHI untuk perkembangbiakan. Pengambilan bakteri menggunakan jarum ose steril, kemudian dimasukkan kedalam media BHI. Dilanjutkan dengan disimpan didalam inkubator kembali selama ± 2 hari pada suhu 37°C .

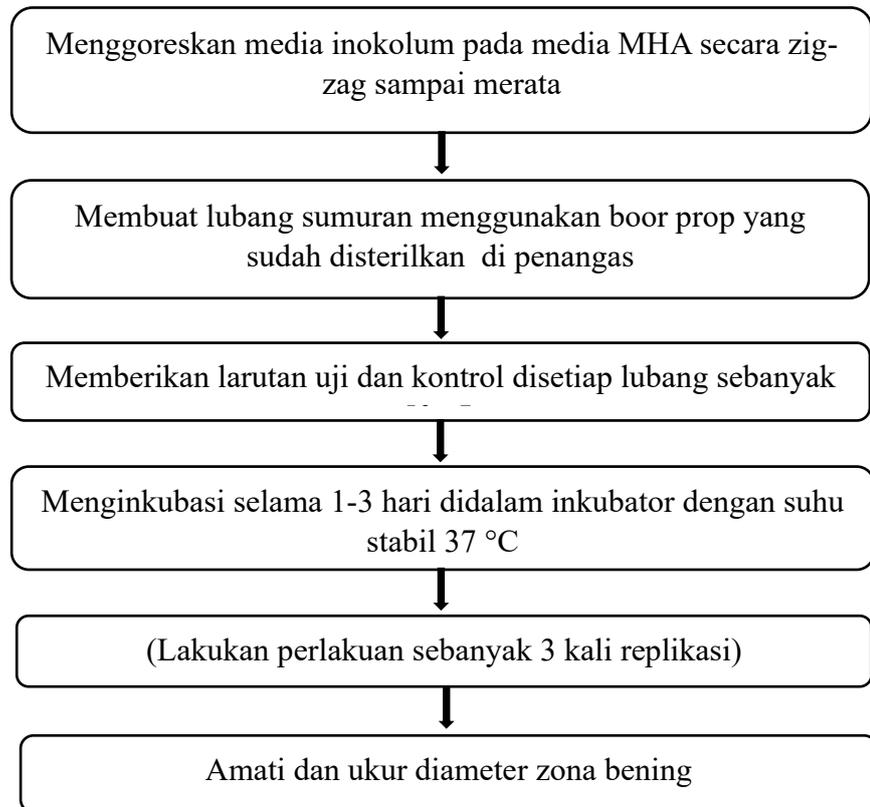


Gambar 3. 16 Skema Pembuatan Inokulum

3.5.13 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dipilih dengan menggunakan metode difusi sumuran, kemudian menyiapkan sampel uji dengan 3 variasi konsentrasi nanopartikel Ag yang berbeda sebagai kontrol uji masing-masing konsentrasi sebesar 10%. Pemindahan bakteri inokulum dengan cara mengoleskan disetiap permukaan media MHA menggunakan kapas steril dan diamkan ± 3 menit. Membuat lubang sumuran menggunakan *boor prop* steril untuk di masukkan

kontrol uji dengan variasi konsentrasi nanopartikel Ag, kontrol negatif yaitu aquadest dan kontrol positif yaitu antibiotik amoxicilin 50 µg. Jumlah yang akan dimasukkan kedalam lubang sumuran sebanyak 50 µL menggunakan mikropipet. Pengujian aktivitas antibakteri direplikasi sebanyak 3 kali untuk dapat memberikan hasil yang maksimal. Setelah perlakuan tersebut, media MHA di simpan didalam inkubator dengan suhu 37° C selama 1-3 hari tergantung muncul tidaknya zona bening (zona hambat). Selanjutnya dilakukan pembacaan hasil daerah hambat dari sabun nanopartikel Ag ekstrak Daun Turi (*Sesbania grandiflora*) dengan cara mengukur diameter zona bening yang timbul menggunakan jangka sorong.



Gambar 3. 17 Skema Uji Aktivitas Antibakteri
(Tivani et al., 2021)

3.6 Analisis Data

Dalam penelitian ini menggunakan jenis analisis data kuantitatif dan kualitatif yang akan dibandingkan dengan literatur dan persyaratan yang ada.