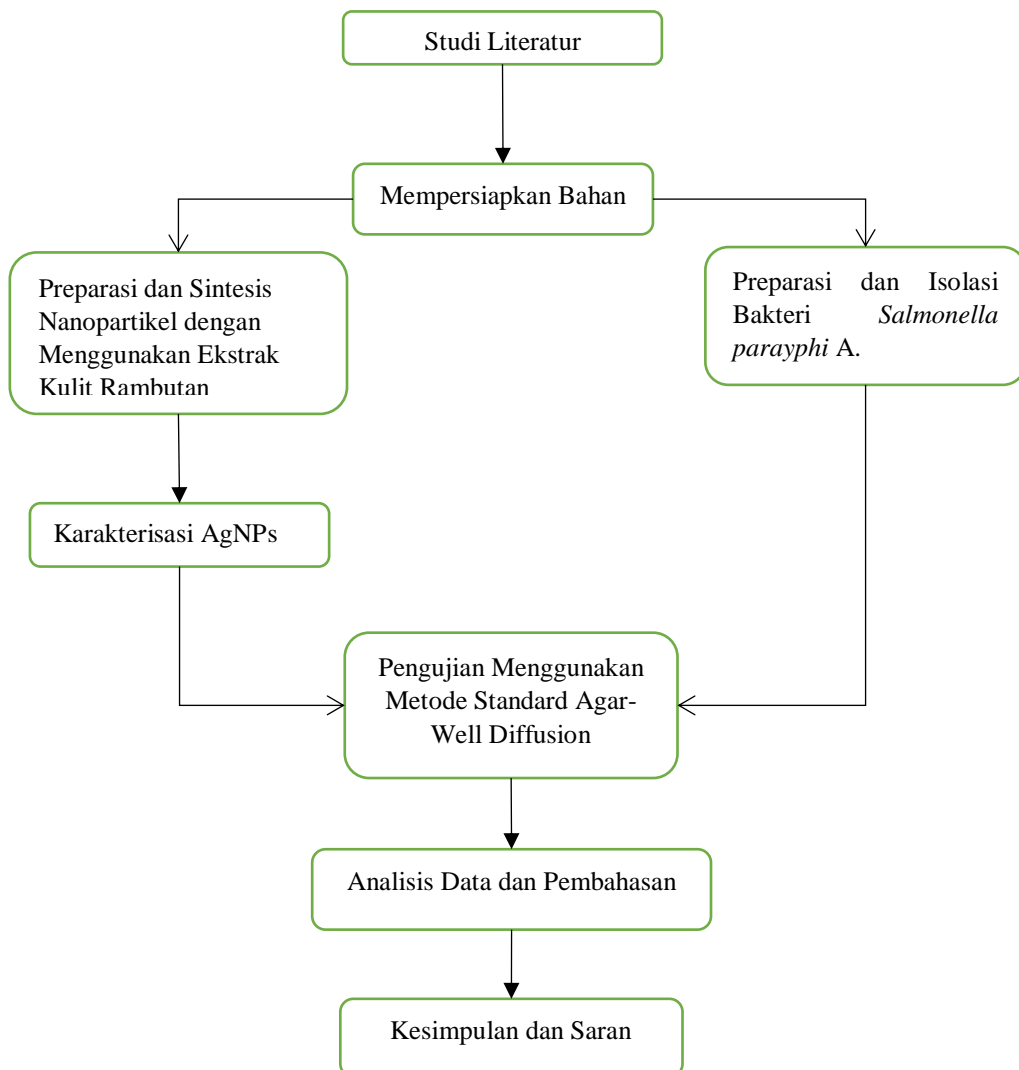


### BAB III

## METODE PENELITIAN

### 3.1. Diagram Alir Penelitian

Berikut ini merupakan gambaran umum penelitian yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan nanopartikel perak yang disintesis menggunakan ekstrak kulit rambutan sebagai antibakteri *Salmonella paratyphi A.*:



Gambar 3.1 Kerangka Penelitian Tugas Akhir

### **3.2. Metode Pengumpulan Data**

Metode penelitian ini terdiri dari dua yaitu metode pengumpulan data dan pengolahan data. Metode pengumpulan data didapat dari pengujian laboratorium yaitu dengan preparasi dan karakterisasi nanopartikel perak dari kulit rambutan serta preparasi isolat bakteri dan pengujian menggunakan Metode *Standard Agar-Well Diffusion*. Metode sintesis nanopartikel perak dari kulit rambutan mengacu pada Kumar *et.al* (2015) yang melakukan sintesis nanopartikel menggunakan bahan yang sama dan dilakukan karakterisasi nanopartikel perak kulit rambutan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, SEM (*Scanning Electronic Microscopy*) dan FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*). Sementara metode pengujian antibakteri *Salmonella paratyphi A* dengan isolasi bakteri mengacu pada Raja *et.al* (2017) yang menguji nanopartikel perak dari bahan ekstrak daun *Calliandra haematocephala* sebagai antibakteri *E.coli*. menggunakan Metode *Standard Agar-Well Diffusion*. Sedangkan untuk metode pengolahan data didapat dengan melihat grafik absorbansi yang dihasilkan oleh Spektrofotometer UV-Vis dan hasil karakterisasi nanopartikel perak kulit rambutan menggunakan SEM dan FT-IR serta melihat aktivitas antibakteri *Salmonella paratyphi A* yang dapat dilihat saat pengujian dengan metode *Standard Agar-Well Diffusion*.

### **3.3. Lokasi Penelitian**

Lokasi pengambilan data dilakukan di Laboratorium Kualitas Air Program Studi Teknik Lingkungan Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Universitas Islam Indonesia untuk sintesis nanopartikel perak menggunakan kulit rambutan dan karakterisasi menggunakan SEM (*Scanning Electronic Microscopy*) dan FT-IR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) serta pembacaan serapan absorbansi nanopartikel perak kulit rambutan menggunakan UV-Vis *Spectrophotometry*. Isolasi bakteri *Salmonella paratyphi A*. dan pengujian dengan menggunakan metode *Standard Agar-Well Diffusion* dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi Lingkungan Program Studi Teknik Lingkungan Fakultas Teknik Sipil dan Perencanaan Universitas Islam Indonesia dan

karakterisasi nanopartikel perak kulit rambutan menggunakan FT-IR dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Islam Indonesia.

### **3.4. Alat dan Bahan**

#### **3.4.1. Alat**

Alat yang digunakan dalam percobaan ini adalah Labu Erlenmeyer, Gelas Beaker 100 ml, Gelas beaker 250 ml, Gelas beaker 500 ml, Botol winkler, Kaca Arloji, Termometer, *Hot plate*, *Magnetic stirrer*, Corong Kaca, Sendok Sungsu, *Stopwatch*, *FTIR spectrophotometry*, SEM (*Scanning Electron Microscopy*), *UV-Vis Spectrophotometry*, Lemari Pendingin, pH Meter, Timbangan Analitik, Cawan Petri, Inkubator, Oven Listrik, Sarung Tangan Oven, Sedotan Diameter 6 mm, Blender, Pembakar Bunsen, Jarum Ose Bulat, Jarum Ose Lurus, *Laminar Air Flow* (LAF), Pipet Ukur 10 ml, Pipet Ukur 1 ml, Karet Hisap, Mikropipet, Tutup Mikropipet, Gelas Ukur, Kertas Jagung, Karet Gelang, Autoklaf, Kapas, Pengaduk Kaca.

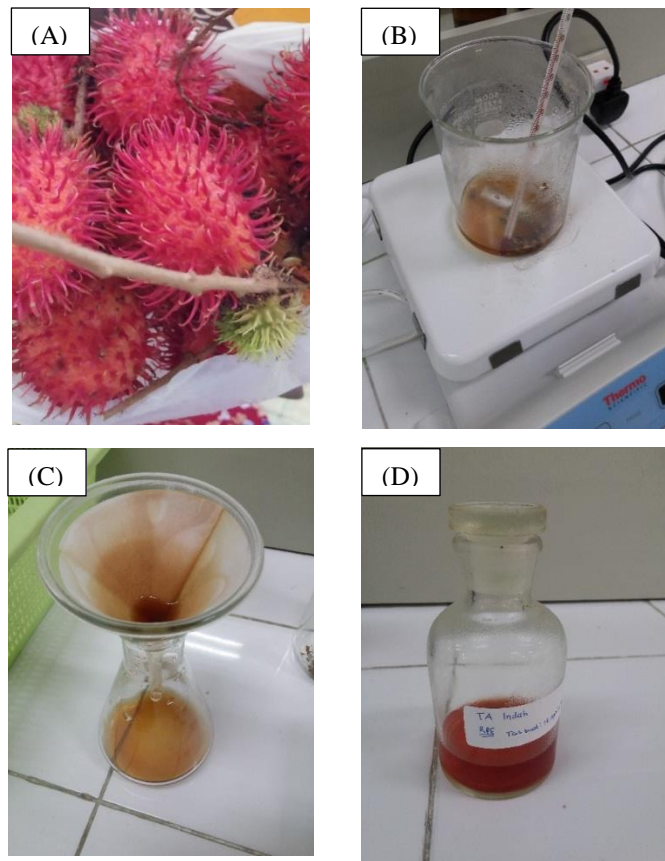
#### **3.4.2. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah Kulit buah rambutan, *Aquadest*, Kertas Whatman No. 42, Kristal AgNO<sub>3</sub>, Bakteri *Salmonella paratyphi* A, Chloramphenicol, BGLB (*Brilliant Green Lactosa Broth*), *Nutrient Agar* (NA).

### **3.5 Preparasi Ekstrak Kulit Rambutan**

Preparasi ekstrak kulit rambutan dimulai dengan menyiapkan kulit rambutan kemudian dicuci bersih dengan air mengalir. Kemudian kulit rambutan ditiriskan dan disimpan di dalam lemari pendingin untuk digunakan setelah musim buah rambutan telah selesai. Kemudian kulit rambutan yang akan digunakan ditimbang dan dicuci kembali. Kulit rambutan dipotong kecil-kecil dan dimasukkan kedalam gelas beaker. *Aquadest* sebanyak 50 ml dimasukkan juga ke dalam gelas beaker, kemudian dipanaskan menggunakan hotplate (suhu termometer 65°C - 70°C) selama 60 menit dan dihomogenkan dengan *magnetic stirrer*. Ekstrak kulit

rambutan yang telah terbentuk didinginkan terlebih dahulu sebelum dilakukan penyaringan dengan kertas Whatzman No.42. Hasil ekstraksi yang telah disaring kemudian dimasukkan ke dalam gelas winkler bening dan disimpan di lemari pendingin suhu 4°C untuk digunakan kembali (lihat Gambar 3.2). Sebagian ekstrak kulit rambutan digunakan untuk uji karakterisasi UV-Vis, SEM dan bubuk kulit rambutan untuk uji karakterisasi FTIR.

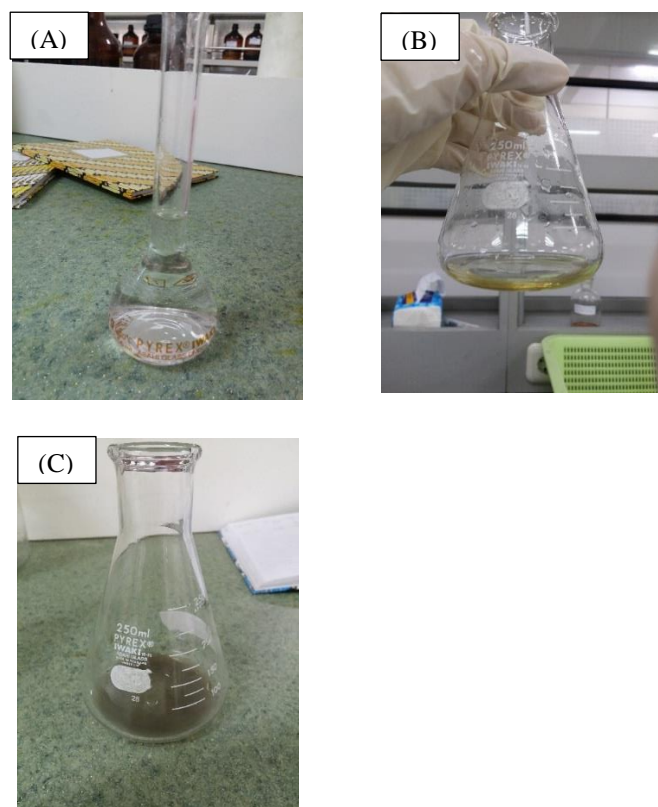


Gambar 3.2. Preparasi Ekstrak Kulit Rambutan: (A) Buah Rambutan; (B) Proses Ekstraksi Kulit Rambutan dengan Pemantauan Suhu; (C) Proses Penyaringan Ekstrak Kulit Rambutan; (D) Ekstrak Kulit Rambutan yang Telah Disaring

*Sumber: Data Primer, (2017)*

### 3.6 Pembuatan dan Karakterisasi AgNPs

Untuk membuat larutan AgNPs, hal yang dilakukan yaitu larutan  $\text{AgNO}_3$  1 mM sebanyak 10 ml dan 1 ml ekstrak kulit rambutan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Kemudian larutan tersebut dihomogenkan hingga tercampur rata. Untuk menjadi larutan nanopartikel perak yang sudah tersintesis, ditunggu selama  $\pm 3$  jam (perubahan warna dari merah menyala ke warna coklat) (lihat Gambar 3.3). Lalu uji pH larutan AgNPs dengan indikator pH. Sebagian larutan AgNPs digunakan untuk uji karakterisasi UV-Vis, FTIR dan SEM.



Gambar 3.3. Pembuatan AgNPs: (A) Larutan  $\text{AgNO}_3$  1 mM; (B) Larutan AgNPs yang Sudah Dihomogenkan; (C) Larutan AgNPs yang Terbentuk Setelah  $\pm 3$  jam

### 3.7 Pembuatan Media Isolat dan Isolasi Bakteri

#### 3.7.1. Pembuatan Media Isolat NA (*Nutrient Agar*)

Hal pertama yang dilakukan dalam pembuatan media ini adalah NA ditimbang sebanyak 10 gram, kemudian memanaskan *aquadest* dalam gelas

beaker sebanyak 500 ml. Masukkan NA kedalam gelas beaker dan menghomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah tercampur rata, memasukan masing - masing media ke tabung reaksi sebanyak 10 ml dan tutup menggunakan kapas dan kertas jagung. Selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit. Kemudian mendinginkan media hingga suhu 37 °C – 40 °C untuk selanjutnya siap digunakan.

### **3.7.2. Pembuatan Media Isolat BGA (*Brilliant Green Agar*)**

Pada pembuatan media ini hal pertama yang dilakukan adalah menimbang NA sebanyak 2 gram dan BGLB (*Brilliant Green Lactosa Broth*) sebanyak 4 gram, kemudian memanaskan *aquadest* dalam gelas beaker sebanyak 100 ml. Masukkan NA dan BGLB ke dalam gelas beaker dan menghomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah tercampur rata, memasukan masing - masing media ke tabung reaksi sebanyak 10 ml dan tutup menggunakan kapas dan kertas jagung. Selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit. Kemudian mendinginkan media hingga suhu ruang dan memasukkannya ke dalam cawan petri steril kemudian dibungkus menggunakan kertas jagung (lihat Gambar 3.4).



Gambar 3.4. Media BGA (*Brilliant Green Agar*)

### 3.7.3. Pembuatan Media Isolat NB (*Nutrient Broth*)

Hal yang dilakukan pada pembuatan media isolat NB yaitu menimbang dan memasukkan NB sebanyak 0,4 gram ke dalam gelas beaker. Memasukkan *aquadest* sebanyak 50 ml ke dalam gelas beaker dan aduk hingga larut. Kemudian memasukkan media NB ke dalam labu erlenmeyer dan menutupnya dengan kapas lalu kertas jagung. Setelah itu disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit, mendinginkannya sesuai suhu ruang dan siap digunakan.

### 3.7.4. Pembuatan Isolasi Bakteri untuk Stok

Pada pembuatan isolasi bakteri untuk stok, mengambil 1 oase stok murni bakteri kemudian diisolasi pada media BGA di cawan petri. Isolasi ini dilakukan dengan teknik gores. Pada Gambar 3.5 menunjukkan media BGA yang telah diisolasi Bakteri *Salmonella paratyphi A*.



Gambar 3.5. Media BGA (*Brilliant Green Agar*) yang Sudah Terisolasi Bakteri *Salmonella paratyphi A*.

### 3.7.5. Pembuatan Isolasi Bakteri untuk Media NB (*Nutrient Broth*)

Pembuatan isolat bakteri untuk media NB ini akan digunakan untuk suspensi bakteri yang akan ditanam pada media NA yang akan digunakan. Tahapannya yaitu mengambil 1 oase bakteri dari stok bakteri diisolasi ke dalam

media NB dengan cara diaduk hingga bakteri terlarut ke dalam media NB. Kemudian tutup labu erlenmeyer dengan kapas dan kertas jagung. Selanjutnya dihomogenkan dengan cara di *shaker* selama  $\pm$  24 jam.

### **3.8 Pengujian Aktivitas Antibakteri**

Hal pertama yang dilakukan dalam pengujian ini yaitu menuangkan media NA sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri steril. Pengujian ini dilakukan secara duplo untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat. Kemudian menunggu media hingga semi padat. Selanjutnya mengambil stok bakteri media NB sebanyak 40  $\mu$ L dan diisolasi ke media NA dengan teknik *spread plate*. Menunggu  $\pm$  30 menit untuk memastikan bakteri meresap ke dalam media NA. Tahap selanjutnya, membuat 4 sumuran dengan sedotan berdiameter 6 mm yang sudah disterilkan dengan alkohol 70%. Metode ini biasa disebut *Standard Agar Well diffusion*. Masing – masing sumuran antara lain Sumuran A dibuat tanpa perlakuan, Sumuran B diisi dengan ekstrak kulit rambut sebanyak 50  $\mu$ L, Sumuran C diisi dengan larutan AgNPs sebanyak 50  $\mu$ L dan Sumuran D diisi dengan larutan Chloramphenicol 40 ppm sebanyak 50  $\mu$ L. Mendinginkan beberapa saat hingga sedikit meresap dan membungkus dengan kertas jagung. Selanjutnya diinkubasi selama 20 jam. Setelah itu mengamati dan mencatat diameter hambatan yaitu diameter pengukuran – diameter sumuran. Antibakteri dinyatakan positif (bersifat resisten terhadap bakteri) yaitu apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening.