

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui tahap sintesis dan karakterisasi. Sintesis NPCS-CuO dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, Departemen Pendidikan Kimia, FPMIPA UPI. Tahap karakterisasi meliputi uji PSA yang dilakukan di Laboratorium Loka Penelitian Teknologi Bersih Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LPTB LIPI) Bandung dan Uji FTIR dilakukan di Laboratorium Departemen Pendidikan Kimia, FPMIPA UPI. Pola difraksi sinar X dan aktivitas antibakteri dilakukan melalui kajian literatur. Penelitian dimulai pada bulan Maret 2021 sampai Juli 2021.

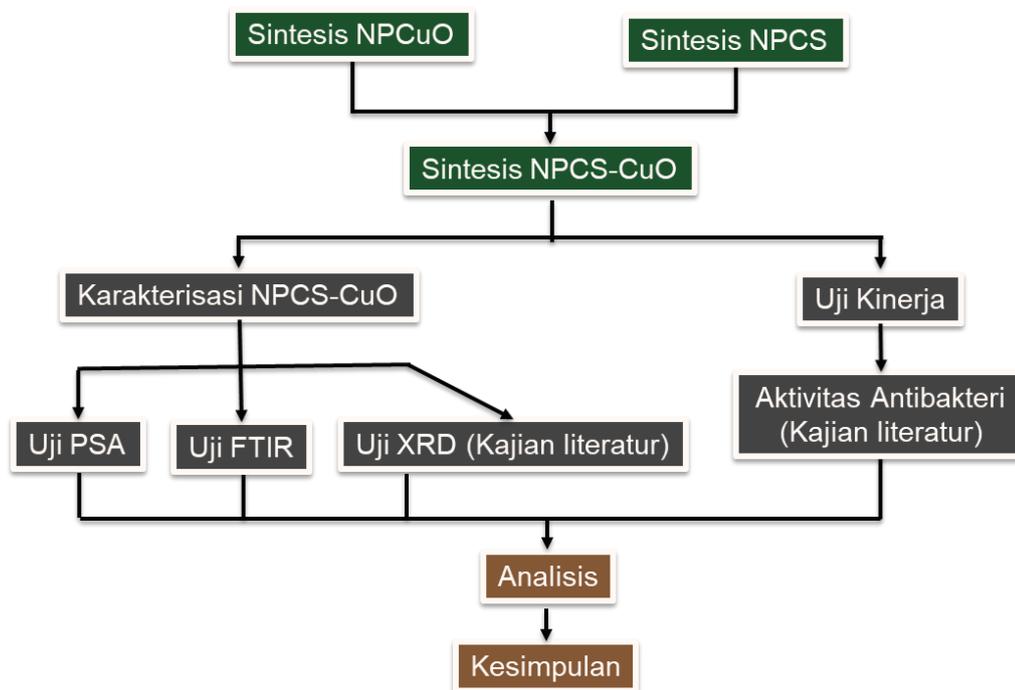
3.2. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan untuk sintesis NPCS-CuO adalah serbuk CS (DD 87,5%), tembaga sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), asam asetat glasial 100%, sodium sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), natrium hidroksida (NaOH), etanol, air deionisasi, dan akuabides. Pada pengujian antibakteri digunakan bakteri gram negatif (*Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*) dan gram positif (*Staphylococcus aureus*), serta bahan *mueller hinton broth* segar, dan *phospat buffered saline* (PBS).

Alat-alat yang digunakan pada tahap sintesis berupa alat-alat gelas standar meliputi gelas kimia (50, 100, dan 250 mL), gelas ukur (10 dan 50 mL), kaca arloji, batang pengaduk, spatula, botol semprot, pH meter, stirrer, pipet tetes, pipet seukuran (10 mL), neraca analitik, desikator, statif, klem, labu takar 100 dan 250 mL, alat sentrifugasi, oven, *muffle furnace*, dan *bath ultrasonication*. Karakterisasi NPCS-CuO dilakukan menggunakan instrumentasi *Particle Size Analyzer* (PSA) menggunakan Zetasizer Nano ZS Malvern, *Fourier Transform Infra-Red* (FTIR) menggunakan Thermo Fisher FTIR, dan *X-Ray Diffraction* (XRD). Alat yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri ialah cawan petri kaca, tabung ulir, jarum ose, inkubator, pelat mikrotiter polistiren sumur 96, pembakar spirtus, *autoclave*, laminar, dan spektrofotometer UV-VIS.

3.3. Diagram Alir Penelitian

Diagram alir dari penelitian ini disajikan dalam Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

3.4. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terbagi menjadi tahap sintesis NPCuO, sintesis NPCS, sintesis NPCS-CuO, serta karakterisasinya.

a. Sintesis NPCuO

- Pembuatan Larutan NaOH 0,5 M

2 g NaOH dilarutkan dalam akuabides. Larutan NaOH dimasukkan dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan akuabides sampai tanda batas dan dihomogenkan.

- Pembuatan Larutan Etanol:Air (10:90)

10 mL etanol dicampurkan ke dalam 90 mL akuabides dan dihomogenkan.

- Proses Sintesis NPCuO

Sebanyak 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 50 mL air deionisasi, kemudian ditambahkan NaOH 0,1 M tetes demi tetes dengan pengadukan yang kuat hingga pH larutan mencapai 14. Pada tahap ini, terbentuk endapan berwarna hitam

yang dipisahkan dengan sentrifugasi dan dicuci dengan campuran larutan etanol:air (10:90). Sentrifugasi lebih lanjut menghasilkan pembentukan endapan yang kemudian dikumpulkan dan dikeringkan dalam oven pada suhu 110°C dan disimpan dalam *muffle furnace* pada 600°C selama 8 jam.

b. Sintesis NPCS

- Pembuatan Larutan Asam Asetat 1%

Asam asetat glasial dipipet sebanyak 1 mL dalam labu takar 100 mL, kemudian ditambahkan akuabides hingga tanda batas dan dihomogenkan.

- Pembuatan Larutan CS konsentrasi 0,6 mg/mL

CS ditimbang sebanyak 0,03 g dan dilarutkan dalam 50 mL asam asetat 1%, pH diatur menjadi 3,5 dengan menambahkan NaOH 0,5 M tetes demi tetes. Larutan diaduk menggunakan *stirrer* dengan kecepatan 500 rpm pada suhu ruang selama 1 jam.

- Pembuatan Larutan SS 0,6 mg/mL

Sebanyak 0,009 g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ditimbang dan dilarutkan dalam air deionisasi sebanyak 15 mL, diaduk sampai homogen.

- Proses Sintesis NPCS

NPCS secara spontan diperoleh dengan cara penambahan 15 mL larutan SS 0,6 mg/mL tetes demi tetes ke dalam 50 mL larutan CS 0,6 mg/mL. Larutan diaduk pada 700 rpm selama 1,5 jam pada suhu kamar.

c. Sintesis NPCS-CuO

- Pembuatan Suspensi NPCuO 0,01; 0,00017; dan 0.00015 mg/mL

Sebanyak 0,0001 g CuO didispersikan dalam 10 mL akuabides dengan sonikasi selama 3 jam. Sementara untuk suspensi CuO 0,00017 dan 0.00015 mg/mL dilakukan dengan pengenceran dari suspensi CuO 0,01 mg/mL dan disonikasi sampai stabil. Proses sonikasi berlangsung dalam suhu ruangan dengan power 200 W dan frekuensi 40 kHz.

- Proses Sintesis NPCS-CuO

NPCS-CuO dibuat dengan menambahkan 1 mL suspensi CuO 0,01; 0,00017; dan 0.00015 mg/mL masing-masing ke dalam 50 mL larutan CS-SS 0,6 mg/mL,

kemudian disonikasi sampai stabil (1,5 jam). Suspensi yang telah terbentuk disentrifugasi pada 4800 rpm (jari-jari rotor = 15 cm) selama 2 jam, lalu diukur ukuran partikelnya dengan PSA. Untuk mendapatkan NPCS-CuO, suspensinya dikeringkan dengan metode *freeze-dry*.

d. Karakterisasi NPCS-CuO

- Particle Size Analyzer (PSA)

Suspensi NPCS-CuO yang terbentuk diukur ukuran partikelnya tanpa preparasi lanjutan. Sampel yang diukur adalah kondisi optimum sintesis. Instrumen yang digunakan adalah Zetasizer Nano ZS Malvern dengan menggunakan *glass cuvet* pada temperatur pengukuran 25°C. PSA menggunakan prinsip *dynamic light scattering* (DLS).

- Fourier Transform Infrared (FTIR)

Spektrum FTIR CS, C₆H₅Na₃O₇.2H₂O, NPCS, CuSO₄.5H₂O, NPCuO, dan NPCS-CuO diukur pada rentang bilangan gelombang 4000-400 cm⁻¹ dengan pellet KBr pada suhu kamar menggunakan instrumen Thermo Fisher FTIR.

- X-Ray Diffraction (XRD)

Sehubungan dengan kondisi pandemi yang tidak memungkinkan dilakukannya pengujian, maka kajian kristalinitas NPCS-CuO ini dilakukan melalui kajian literatur dengan membandingkan difraktogram XRD antara CS (Yolanda et al., 2020), NPCS (Taghizadeh et al., 2019), NPCuO (Narayanan et al., 2020), dan NPCS-CuO (Javed et al., 2021) pada posisi $2\theta = 5^\circ - 80^\circ$ menggunakan radiasi Cu-K α monokromatis, dengan panjang gelombang 1,54Å.

e. Aktivitas Antibakteri NPCS-CuO

Sehubungan dengan kondisi pandemi yang tidak memungkinkan dilakukannya pengujian, maka kajian aktivitas antibakteri NPCS-CuO ini dilakukan melalui kajian literatur dengan membandingkan nilai MIC antara NPCS (Divya et al., 2017; Khoerunnisa et al., 2021) dan NPCS-CuO (Assadi et al., 2018; Karthikeyan et al., 2021) terhadap 2 jenis bakteri yaitu bakteri gram negatif (*Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*) dan gram positif (*Staphylococcus aureus*) melalui metode mikrodilusi dalam kondisi aseptik.

Pada metode mikrodilusi, MIC dilakukan berdasarkan CLSI (Lembaga Standar Klinik & Laboratorium) di pelat mikrotiter polistiren sumur 96. Secara singkat, 100 μL *Mueller Hinton Broth* segar dituangkan ke dalam setiap sumur. Kemudian 100 μL agen antibakteri 4x konsentrasi ditambahkan ke dalam sumur pertama, dicampur dan 100 μL dan dipindahkan ke sumur berikutnya dan diulang. 100 μL dari sumur akhir dibuang dan 100 μL medium segar ditambahkan ke setiap sumur. Suspensi bakteri yang didiamkan dalam media yang sesuai diencerkan dalam PBS menjadi $\text{OD}_{600} = 0,08$ ($\sim 10^7$ CFUml^{-1}) dan 20 μL nya dimasukkan ke dalam sumur sehingga masing-masing sumur berisi sekitar 3×10^4 CFU (5×10^5 CFUml^{-1}). Setelah waktu inkubasi (37°C selama 24 jam), konsentrasi dari sumur pertama yang tidak menunjukkan pertumbuhan yang terlihat dilaporkan sebagai nilai MIC (Assadi et al., 2018).