

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan menggunakan metode penelitian eksperimental. Metode eksperimental merupakan suatu metode yang dilakukan terhadap variabel dengan suatu perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati. Penelitian eksperimen yang paling sederhana biasanya melibatkan 2 kelompok yaitu kelompok eksperimen yaitu kelompok yang dikenai perlakuan tertentu, dan kelompok 2 kontrol atau kelompok pembanding yaitu kelompok yang tidak dikenai perlakuan (Jaedun dkk., 2011).

Pada penelitian ini dilakukan percobaan terhadap formulasi sabun padat dengan bahan aktif ekstrak daun kersen. Sabun yang telah dibuat kemudian dievaluasi sesuai dengan SNI 3532:2021 serta mengetahui efektivitas terhadap bakteri *Escherichia coli*.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan maret – mei 2023

3.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium kimia dan laboratorium mikrobiologi di Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

- | | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| - Nampan atau wadah | - Corong pisah merk Iwaki |
| - Pisau | - Erlenmeyer 250 ml merk Iwaki |
| - Timbangan analitik merk osuka | - Corong gelas |
| - Beaker glass 250 ml merk Iwaki | - Alat refluks |
| - Beaker glass 100 ml merk Iwaki | - Buret 50ml merk pyrex |
| - Beaker glass 50 ml merk Iwaki | - Statif |
| - Batang pengaduk | - Kapas |

- Rotary evaporator merk Buchi
- Cawan penguap
- Kompor listrik
- Cetakan sabun
- Pipet tetes
- Gelas ukur 250 ml merk Iwaki
- Gelas ukur 50 ml merk Iwaki
- pH meter EutechpH 700
- Cawan petri
- Oven
- Autoklaf merk PBI
- Waterbath merk memmert
- Tabung reaksi
- Mikropipet
- Kertas saring
- Rak tabung reaksi
- Jangka sorong
- Kertas saring whatmaan 41
- Alumunium foil

3.3.2 Bahan

- Daun kersen tua
- Etanol 96% merk Onemed
- Aquadest
- Minyak kelapa merk Barco
- NaOH 30% merk Merck
- Asam stearat merk Merck
- Gliserin merk Onemed
- Natrium Lauryl Sulfate merk KAO
- Nacl merk Merck
- Indikator fenolftalein merk Merck
- Indikator Methyl Orange merk Merck
- n-Heksan
- AgNO₃ merk merck
- K₂CrO₄ merk merck
- HCl merk merck
- Na₂SO₄ merk merck
- NaHCO₂ merk merck
- KOH merk merck
- Nutrien Agar merk merck
- NaCl fisiologis merk merck

3.4 Variabel Penelitian

Variable yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut :

1. Variabel bebas : variabel bebas yang ada pada penelitian ini yaitu pembuatan sabun padat menggunakan ekstrak daun kersen dengan berbagai konsentrasi yaitu 0%, 6%, dan 12% untuk melihat efektivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*.
2. Variabel terikat : variable terikat pada penelitian ini adalah pengujian hasil berupa uji fisika, uji kimia dan uji biologi pada sabun padat ekstrak daun kersen.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Table 1 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional
1.	Uji pendahuluan ekstrak	Uji yang dilakukan untuk melihat tekstur, aroma (organoleptik) , randemen serta kelarutan ekstrak tersebut.
2.	Ekstrak daun kersen (Muntingia calabura)	Ekstrak yang diperoleh dari daun kersen segar di Kecamatan Gedangan, Sidoarjo yang di ekstrak dengan etanol
3.	Formulasi sediaan sabun	Proses pencampuran basis sabun padat dan beberapa bahan pendukung lainnya.
4.	Evaluasi sabun	Pengujian terhadap sabun yang telah diformulasikan dengan varian ekstrak daun kersen (<i>Muntingia calabura</i>) menggunakan SNI 3532:2021
5.	Bakteri <i>Escherichia coli</i>	Bakteri yang diujikan terhadap sabun padat yang mengandung bahan aktif ekstrak daun kersen (<i>Muntingia calabura</i>)

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi sampel

Sampel merupakan daun kersen yang sudah tua, yang ada di Kabupaten Sidoarjo. Simplicia yang sudah diperoleh kemudian disortasi basah, kemudian dicuci dengan air mengalir, lalu ditiriskan. Simplicia yang telah ditiriskan dikeringkan di bawah sinar matahari lalu disortasi kering. Simplicia yang telah kering kemudian dihaluskan dengan grinder (Alfilaili et al., 2022).

3.6.2 Ekstraksi sampel

Metode ekstraksi daun kersen yang digunakan adalah metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Timbang simplicia daun kersen (*Muntingia calabura*) sebanyak 300 gram setelah itu pindahkan dalam sebuah bejana lalu tambahkan dengan etanol 96% maserasi selama 3

x 24 jam dengan pengadukan 1 x 24 jam. Maserat disaring lalu filtrat di uapkan menggunakan *vaccum rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental (Alfilaili et al., 2022).

3.6.3 Uji pendahuluan ekstrak

1. Uji organoleptik

Menurut (Fizriani dkk., 2021) uji organoleptik meliputi uji warna, rasa, aroma dan tekstur.

2. Penentuan randemen ekstrak

Randemen ekstrak dihitung dengan cara membandingkan berat ekstrak kental yang didapat dengan berat rimpang awal (W. P. Putri, 2020).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\%$$

3. Uji kelarutan

Menurut (W. P. Putri, 2020) pemeriksaan dilakukan dengan menimbang 1 gram ekstrak kental dilarutkan kedalam *aqua destilata* dan dalam etanol 96%.

3.6.4 Formulasi sabun

Formulasi sediaan sabun diperoleh (Yulia dkk., 2022) dengan modifikasi. Adapun formulasi dasar sabun adalah sebagai berikut dan dibuat 3 formulasi sediaan sabun padat dengan menambahkan ekstrak daun kersen dan 1 kontrol negatif yang tidak ditambahkan dengan daun kersen. Formulasi sediaan sabun padat sebagai berikut :

Table 2 Formulasi Sabun Padat Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*)

Bahan	Formulasi (g)		
	F0	F6	F12
Ekstrak daun kersen	0	6	12
Minyak kelapa	35	35	35
NaOH 30% (ml)	9	9	9
Asam stearat	3	3	3

Bahan	Formulasi (g)		
	F0	F6	F12
Gliseril	10	10	10
Natirum Lauril Sulfate	1	1	1
NaCl	0,2	0,2	0,2
Akuades	Ad 100	Ad 100	Ad 100

3.6.5 Pembuatan sediaan sabun padat

Proses pembuatan sabun diawali dengan mencampurkan fraksi lemak, yaitu asam stearat dan minyak VCO (minyak kelapa) dengan alkali yaitu NaOH 30% pada suhu 35°C. Pada saat penambahan NaOH ini, adonan akan menjadi keras dan lengket yang menunjukkan terbentuknya stok sabun. Kemudian ke dalam stok sabun ditambahkan bahan tambahan lainnya seperti gliseril, SLS, NaCl, akuades dan ekstrak daun kersen. Adonan diaduk hingga menjadi homogen. Lalu cetak kedalam cetakan sabun (Susanah Rita dkk., 2018).

3.6.6 Evaluasi sabun

Evaluasi sabun padat dilakukan dengan sebagai berikut:

1. Persiapan contoh uji

- a. Sampel sabun dipotong halus.
- b. Sampel dicampur dengan menggunakan spatula dengan seluruh contoh uji dimasukkan ke dalam wadah yang bersih, kering, dan tidak menyerap.
- c. Sampel uji disimpan di tempat yang bersih dan kering.
- d. Ditunggalkan rapat dan diberi label yaitu identifikasi.

2. Pemeriksaan organoleptis sediaan sabun

Pengamatan dilakukan terhadap bentuk, warna, aroma dan tekstur (Fizriani dkk., 2021).

3. Uji Derajat Keasaman (pH)

Pengujian pH sabun dilakukan dengan menimbang sabun sebanyak 1 gram dan dimasukkan dalam 10 mL aquadest lalu homogenkan, masukkan campuran kedalam indikator pH. Amati, catat, serta bandingkan dengan

skala yang tertera untuk mengukur derajat keasaman. Sabun dapat memenuhi kriteria apabila pH mencapai 9-10 (Muthmainna B, 2022).

4. Uji Stabilitas Busa

Menurut (Muthmainna B, 2022) ditimbang sabun sebanyak 1 gram lalu masukkan ke dalam 10 mL aquadest lalu homogenkan. Tuangkan ke gelas ukur dan dilakukan pengocokan hingga berbusa. Pengukuran dilakukan menggunakan penggaris kemudian di catat ketinggian busa yang terbentuk.

Stabilitas busa dihitung dengan rumus berikut:

Stabilitas busa (1 jam) = 100% - % busa yang hilang

$$\% \text{ Busa yang hilang} = \frac{\text{Tinggi busa awal} - \text{Tinggi busa akhir}}{\text{Tinggi busa awal}} \times 100\%$$

5. Kadar air

Timbang cawan petri yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu 105 ± 2 °C selama 30 menit, setelah itu timbang $5 \pm 0,05$ g contoh uji kedalam cawan petri yang telah dipanaskan. Panaskan dalam oven pada suhu 105 ± 2 °C selama 1 jam. Dinginkan dalam desikator sampai suhu ruang lalu timbang. (SNI 3532:2021).

6. Total Lemak

Sejumlah 5 gram contoh uji sabun padat dilarutkan kedalam 100 ml aquadest panas pada suhu 70-80 °C lalu dimasukkan kedalam corong pisah. Tambahkan kedalam corong pisah indikator *methyl orange* sambil mengocok corong pisah tambahkan dengan H₂SO₄ sampai indikator berubah warna (kurang lebih 5 ml). ekstraksi sampel menggunakan n-heksan sebanyak 3 kali dengan volume berturut-turut 100 ml, 50 ml, 50 ml. Ekstrak dikumpulkan didalam beaker glass setelah itu dicuci dengan aquades sebanyak 3 kali pencucian. Pelarut n-heksan diuapkan lalu residu yang terbentuk dilarutkan kedalam 20 ml etanol 95%. Larutan residu ditambahkan dengan indikator PP titrasikan dengan larutan KOH alkoholis lalu catat volume titrasi yang digunakan. Larutan hasil titrasi diuapkan pada oven suhu 103 ± 2 °C kemudian ditimbang hingga bobot tetap. (SNI 3532:2021)

7. Bahan tak larut dalam etanol

Timbang contoh uji sebanyak $5 \pm 0,05$ g lalu masukkan kedalam Erlenmeyer tutup asah tambahkan sebanyak 200 ml etanol yang baru dididihkan, hubungkan dengan pendingin tegak kemudia panaskan diatas penangas air hingga contoh uji terlarut sempurna.

Keringkan kertas saring dalam oven suhu 103 ± 2 °C selama 30 menit, masukkan kedalam desikator lalu timbang sampai bobot tetap. Tuang larutan sabun dalam kertas saring lindungi larutan dari karbon dioksida dengan menutupnya menggunakan kaca arloji. Bilas bahan yang tak larut dalam Erlenmeyer dengan menggunakan etanol netral panas. Cuci residu pada kertas saring dengan etanol panas sampai bebas sabun.

Simpan filtrat untuk pengujian alkali bebas atau asam lemak bebas. Keringkan kertas saring dalam oven suhu 103 ± 2 °C selama 3 jam. Dinginkan dalam desikator lalu timbang sampai bobot tetap (SNI 3532:2021).

8. Alkali bebas atau asam lemak bebas

filtrat dari penentuan bahan tak larut dalam etanol yang telah dipanaskan, ditambahkan larutan indikator fenolftalein sebanyak 0,5 ml. jika larutan bersifat asam indikator fenolftalein tidak berwarna maka larutan di titrasi menggunakan larutan standar KOH sampai timbul warna merah muda stabil. Jika larutan bersifat basa indikator fenolftalein berwarna merah maka larutan di titrasi menggunakan larutan standar HCl sampai warna merah tepat hilang. Catat volume titrasi masing-masing larutan (SNI 3532:2021).

9. Kadar klorida

Sampel uji ditimbang sebanyak $5 \pm 0,05$ g tambahkan dengan aquadest sebanyak 300 ml. Didihkan untuk penyempurnaan pelarutan. Lalu tambahkan larutan magnesium nitrat berlebih (± 25 ml). Tanpa didinginkan titrasi menggunakan AgNO_3 dengan indikator K_2CrO_4 hingga berbentuk warna merah bata. Catat volume hasil titrasi (SNI 3532:2021).

10. lemak tidak tersabunkan

Timbang sampel sebanyak 5 gam dan larutkan dalam campuran 50 ml etanol dan 50 ml natrium hydrogen karbonat. Larutan sampel lalu dipanaskan diatas penangas air tidak lebih dari 70 °C lalu dinginkan. Larutan diekstrasi dengan 50 ml larutan n-heksan. Residu yang terbentuk setelah diuapkan lalu dikeringkan dalam oven selama 5 menit. Sampel didinginkan dan ditimbang sampai bobot tetap. Kedalam 10 mL etanol netral sampel dilarutkan lalu ditambahkan beberapa tetes indikator PP kemudian dititrasi dengan larutan standar KOH 0,1N. Setelah titrasi, tambahkan 10 mL larutan standar KOH 2 N. Kemudian dipanaskan selama 30 menit. Sampel diekstraksi dengan n- heksana. Residu hasil penguapan pelarut dikeringkan lalu ditimbang sampai bobot tetap (Fanani dkk., 2020).

11. Uji sabun terhadap bakteri *Escherichia coli*

1. Sterilisasi alat : alat-alat gelas yang tidak berskala disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Sedangkan alat-alat gelas yang berskala disterilkan di autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit.
2. Pembuatan Media NA : timbang semua bahan sesuai dengan kebutuhan kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer, larutkan dengan menggunakan aquadest, atur pH medium hingga 7, setelah itu panaskan hingga larut. Setelah larut sterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah di autoklaf, siapkan cawan petri lalu ratakan tunggu hingga menjadi agar (Wahyuni, 2018).
3. Preparasi sampel sabun : potong masing-masing sabun dengan beberapa konsentrasi sebanyak 0,250 gram. Setelah itu dilarutkan dalam aquadest steril 10 mL. Panaskan diatas waterbath hingga sabun mencair dan tutupi dengan alumunium foil (Fariani & Advinda, 2019).
4. Pengenceran suspensi bakteri : siapkan tabung reaksi steril dan NaCl fisiologis. Masukkan NaCl fisiologis sebanyak 5 ml kedalam tabung reaksi, ambil satu ose biakan bakteri *Escherichia coli* dari media agar miring lalu masukkan kedalam tabung reaksi yang sudah terisi larutan NaCl fisiologis. Homogenkan lalu bandingkan dengan larutan standatr

Mc Farland 0,5 (Fariani & Advina, 2019).

5. Pengujian Antibakteri : uji aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan menggunakan difusi cakram. Suspensi bakteri yang telah sama kekeruhannya dengan *Mc, Farland's* 0,5 diinokulasi pada permukaan agar NA. Kertas cakram ditaruh di atas cawan petri steril dan ditetaskan dengan larutan sabun sebanyak 0,1 mL menggunakan mikropipet. Letakkan kertas cakram yang sudah direndam larutan sabun ke atas media yang telah mengandung suspensi bakteri. Inkubasi selama 2 x 24 jam pada suhu 37C.(Fariani & Advinda, 2019)

Menurut (Fariani & Advinda, 2019) pengukuran zona hambat bakteri dilakukan dengan menggunakan jangka sorong. Jika zona hambat tidak berbentuk bulat penuh maka diameter didapatkan dengan menghitung rerata diameternya. zona hambat (halo zone) dihitung menggunakan rumus :

$$\text{diameter zona hambat} = \frac{(d1 + d2 + \dots + dn)}{n}$$

D = zona hambat

D1 = zona hambat 1

D2 = zona hambat 2

N = jumlah pengukuran

Kategori antibakteri berdasarkan zona hambat menurut (Tampongangoy dkk., 2016) jika pengukuran dari zona hambat 2-5 mm maka dikatakan antibakteri tersebut sangat lemah, pengukuran dengan diameter 5-10 mm dikatakan antibakteri tersebut sedang, pengukuran 10-20 maka antibakteri tersebut dikatakan kuat dan jika pengukuran yang dihasilkan yaitu ≥ 20 maka antibakteri tersebut sangat kuat