

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini dilakukan secara eksperimental dengan rancangan acak lengkap, yaitu menggunakan penelitian laboratorium dengan melakukan suatu rancangan sederhana untuk mengetahui efektivitas sabun cair cuci tangan ekstrak jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli*.

#### 3.2 Waktu tempat Penelitian

##### 3.2.1 Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada rentan bulan Januari-Februari 2023

##### 3.2.2 Tempat penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

#### 3.3 Alat dan Bahan

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini ialah sebagai berikut.

Tabel 3.1 Alat dan bahan

Alat	Bahan
Corong pisah	Asam stearat
Cawan porselin	NaCL
Batang pengaduk	NaOH
Erlemeyer	Gliserin
Gelas beaker	EDTA
Pipet tetes	Aquades
Kaca arloji	Mueller hiton agar (MHA)
Gelas ukur	Kertas saring
Penangas air	Kertas perkamen
Piknometer	
Labu ukur	
Pipet ukur	
Bola hisap	
oven	
Ph meter	
Neraca analitik	
Hot plate	

### **3.4 Kriteria penelitian**

#### ➤ **Kriteria Inklusi**

1. Buah jeruk nipis yang berwarna hijau kekuningan
2. Buah jeruk nipis yang tidak keras pada bagian bawahnya empuk jika dipegang
3. Dipetik 7-8 bulan setelah berbunga

#### ➤ **Kriteria Ekslusi**

1. Buah jeruk nipis yang busuk
2. Buah jeruk nipis yang dimakan serangga
3. Tanaman buah belum mencapai masa panen

### **3.5 Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas : variabel bebas dalam penelitian ini adalah formula sediaan sabun cair cuci tangan dengan variasi ekstrak jeruk nipis
2. Variabel terikat : variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil uji mutu fisik, uji kimia dan hasil uji efektivitas terhadap bakteri bakteri *Escherichia coli*.

### 3.6 Definisi Oprasional

Tabel 3.2 Definisi oprasional

Variabel	Definisi	Cara Pengukuran	Skala pengukuran
Formula sediaan sabun cair cuci Tangan	Ekstrak buah jeruk nipis sebagai formulasi sabun cair cuci tangan	Uji fisik dan uji kimia	Nominal
Evaluasi antibakteri terhadap <i>Escherichiacoli</i> .	Hasil dari uji daerah jernih di sekeliling sumur dari media pertumbuhan bakteri uji yang tidak di tumbuhi bakteri pada sebagai formulasi sabun cair cuci tangan ekstrak buah jeruk nipis.	Uji zona hambat	Rasio

### 3.7 Prosedur penelitian

#### 2.7.1. Preparasi sampel

Sampel jeruk nipis diperoleh dari perkebunan yang berada di daerah bululawang kabupaten Malang, kemudian simplisia yang didapatkan dibersihkan dengan air yang mengalir setelah itu keringkan menggunakan tisu atau kain kering, kemudian buah jeruk nipis yang sudah bersih dapat dipotong menjadi beberapa bagian agar mempermudah saat pemerasan yang dilakukan secara manual untuk diambil air perasan murni dari jeruk nipis tersebut menggunakan corong dan kertas saring, kemudian dilakukan penyaringan dan ulangi sampai benar-benar tidak ada residu yang masih tertinggal, setelah itu disimpan dalam suatu wadah dan ditutup menggunakan aluminium foil kemudian disisihkan.

### 2.7.2. Formulasi sabun

Menurut formulasi Wau et al., 2019 sabun cair cuci tangan dengan modifikasi sebagai berikut.

Tabel 3.3 Formulasi sabun cair

Komposisi	formulasi				fungsi
	F0	F1	F2	F3	
Perasan jeruk nipis	0ml	10 ml	20 ml	30 ml	bahan aktif
Asam stearate	3g	3g	3g	3g	pengemulsi
NaCl	1g	1g	1g	1g	pengental
NaOH	1,5g	1,5g	1,5g	1,5g	pengemulsi
Gliserin	10g	10g	10g	10g	penjaga kelembaban
EDTA	0,5g	0,5g	0,5g	0,5g	pengawet
Aquades	Ad 150ml	Ad 150ml	Ad 150ml	Ad 150ml	pelarut
Essential oil jeruk	q.s	q.s	q.s	q.s	pewangi

### 2.7.3. Pembuatan sediaan sabun cair

Persiapkan alat dan bahan yang akan digunakan, ditimbang asam stearat sebanyak 3g dan dimasukkan kedalam beaker glass kemudian timbang NaCl 1g dan NaOH 1,5g masukan kedalam beaker berisi asam stearat lalu larutkan dengan aquades sebanyak 20ml diatas penangas air dan aduk ad homogen. Langkah selanjutnya yaitu timbang EDTA sebanyak 0,5g dan gliserin sebanyak 10g kemudia masukan kedalam beaker glas dan tambahkan ekstrak buah jeruk nipis sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan, jika sudah tercampur tambahkan aquades hingga volume mencapai 150ml(Wau, 2019).

### 2.7.4. Evaluasi sabun cair cuci tangan

#### 1. Uji organoleptik

Pengujian organoleptik dilakukan dengan mengamati bentuk, bau serta warna sediaan sabun cair cuci tangan ekstrak buah jeruk nipis.

## 2. Uji pH

- **Peralatan**

pH meter, beaker glass, neraca analitik, larutan standar buffer 4,7,10, air suling bebas CO<sub>2</sub>

- **Persiapan contoh uji**

Timbang 1g contoh dan pindahkan kedalam labu ukur kemudian tambahkan aquades dan aduk hingga larut, tambahkan aquades hingga tanda batas kemudian gojog hingga homogen kemudian tuangkan dalam beaker glass dan diamkan larutan hingga mencapai suhu ruang (20-25°C).

- **Cara kerja**

- 1) Kalibrasi pH meter dengan larutan buffer
- 2) Bilas dengan air suling bebas CO<sub>2</sub> dan keringkan elektroda dengan tisuatau lap kering
- 3) kemudian celupkan elektroda kedalam contoh uji sambil diaduk
- 4) Catat hasil pembacaan pada tampilan pH meter.

## 3. Uji bobot jenis

Uji bobot jenis dengan cara ditetapkan dengan menggunakan alat piknometer

- 1) Piknometer dibersihkan dan dikeringkan terlebih dahulu
- 2) Timbang piknometer kosong dan catat hasilnya
- 3) Isi piknometer dengan air sampai penuh kemudian timbang dan catat hasilnya
- 4) Keluarkan air dan keringkan piknometer
- 5) Kemudian masukan sampel kedalam piknometer sampai penuh untuk ditimbang dan catat hasilnya
- 6) Hitung dan tetapkan bobot jenis sampel

#### 4. Uji total bahan aktif

Total bahan aktif =  $C_{et} - C_{pe}$

Keterangan :

Total bahan aktif % fraksi massa

$C_{et}$  : bahan yang larut dalam etanol % fraksi massa

$C_{pe}$  : bahan yang larut dalam petroleum eter,% fraksi massa

- **Bahan yang larut dalam etanol**

- **Alat**

Etanol 95% dan etanol 99,5%

- **Bahan**

Erlemeyer 300ml, kondesor, neraca analitik, penangas air, penyaring gelas, beaker glas 200ml, labu ukur 250ml, pipet volum 100ml, oven  $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ .

- **Cara kerja**

- 1) Timbang  $(5 \pm 0,001)\text{g}$  sampel dan masukan kedalam erlemeyer 300ml
- 2) Kemudian tambahkan 100ml etanol 99,5% hubungkan dengan kondesor kemudian mpanaskan selama 30 menit diatas penangas air dengan sesekali diaduk
- 3) Saring larutan dengan penyaring gelas dan bilas sisa larutan yang menempel di erlemeyer dengan 50ml etanol 95%
- 4) Dinginkan filtrat sampai suhu ruang
- 5) Kemudian pindahkan filtrat kedalam labu ukur 250ml dan tambahkan etanol 95% sampai tanda batas
- 6) Ambil pipet volum 100ml dan pindahkan kedalam beaker glas 200ml yang telah di catat bobot kosong.

- 7) Panaskan diatas penangas air untuk menghilangkan etanolnya
- 8) Kemudian keringkan dalam oven  $(105\pm 2)^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam
- 9) Dinginkan dalam desikator sampai bobot seimbang dan ditimbang
- 10) Hitung kadar bahan yang larut dalam etanol dengan menggunakan persamaan :

$$Cet = \frac{A}{s \times \left(\frac{100}{250}\right)} \times 100 = \frac{250 \times A}{s}$$

Keterangan :

Cet : bahan yang larut dalam etanol,% fraksi massa

A : sisa bahan setelah pengeringan (g)

S : bobot sampel

$$\left(\frac{100}{250}\right) : \frac{\text{volume filtrat yang didapat}}{\text{volume ahir contoh}}$$

- **Bahan yang larut dalam petroleum eter**

- **Pereaksi**

Petroleum eter yang didestilasi pada suhu  $(30-60)^{\circ}\text{C}$ , larutan campuran etanol dan air dalam jumlah yang sama, natrium sulfat anhidrat, larutan sodium hidrosida  $0,5\text{mol/l}$ , indikator fenofentalein  $1\%/volume$   $1\text{g}$  fenofentalein dilarutkan dalam etanol  $100\text{ml}$ .

- **Alat**

Erlemeyer, neraca analitik, corong pisah, penangas air, kertas saring  $20\ \mu\text{m}$ .

- **Cara kerja**

1) Timbang  $(10 \pm 0.001)\text{g}$  sampel dan masukan kedalam erlemeyer.

- 2) Larutkan dalam 200ml larutan campuran etanol – air
- 3) Saring jika ada bahan yang tidak larut
- 4) Tambahkan 5ml larutan natrium hidroksida 0,5 mol/l tambahkan beberapa tetes larutan indikator fenolfentalein untuk memastikan bahwa larutan telah basa
- 5) Pindahkan kecorong pisah 500ml, ekstrak tiga kali dengan masing masing 50ml petroleum eter. Jika emulsi semakin banyak tambahkan sedikit demi sedikit etanol untuk meghilangkannya
- 6) Pada lapisan petroleum eter dicuci tiga kali dengan masing – masing 30 ml larutan campuran air-etanol dan dicuci 30 ml aquades
- 7) Keringkan dengan natrium sulfat anhirat samapai ada lapisan air
- 8) Saring menggunakan kerta saring kering ke dalam erlemenyer 300ml yang telah diketahui bobotnya , bilas kertas saring dengan sedikit petroleum eter
- 9) Panaskan larutan dalam penganas air untuk menguapkan petroleum eter biarkan erlemenyer didalam desikator sampai suhu ruang
- 10) Alirkan udara kering kedalam erlenmenyer untuk menghilangkan sisa petroleum eter hilang
- 11) Timbang sampai bobot tetap
- 12) Hitung kadar bahan yang larut dalam petroleum eter menggunakan persamaan :

$$C_{pe} = \frac{A}{S} \times 100$$

Keterangan :



C<sub>pe</sub> : bahan yang larut dalam petroleum eter,% fraksi massa

A : jumlah yang terektraksi dalam petroleum eter

S : bobot sampel

## 5. Uji bahan yang tidak larut dalam etanol

- **Pereaksi**

Etanol netral, Etanol 95% atau lebih ,dipanaskan dan netral terhadap fenolftalein dengan penambahan koh 0,1 n.

- **Alat**

Neraca analitik, Oven, Pompa vakum, Penganas air, Erlenmeyer tutup asam, Kertas saring dengan porositas 20 µm atau cawan gooch (g4), kondesor.

- **Cara kerja**

- 1) Larutkan 5 g sampel uji (*b*<sub>1</sub>) dengan 200ml etanol netral kedalam erlenmeyer tutup basa dan pasangkan kondesor,panaskan diatas penganas air sampai sabun terlarut sepenuhnya
- 2) Keringkan kertas saring dalam oven pada suhu (100-105)<sup>o</sup>c selama 30 menit
- 3) Biarkan kerta ssaring dingin
- 4) Timbang kertas saring cawan gooch
- 5) Ulangi cara kerja 2 samapai 4 sampai bobot tetap
- 6) Tempatkan kertas saring atau cawan gooch pada corong diatas labu erlenmeyer yang sudah dirangkai dengan pompa vakum
- 7) Saat sabun terlarut seluruhnya tuang cairan kekertas saring atau cawan gooch
- 8) Lindungi larutan dari karbodioksida dan asap asam selama proses dengan menutupnya menggunakan kondesor

- 9) Cuci bahan yang tak larut dalam erlenmeyer pertama dan cuci dengan etanol netral
- 10) Tuang cairan cucian tadi ke kertas saring atau gooch
- 11) Cuci residu kertas saring atau cawan gooch dengan etanol netral sampai seluruhnya bebas sabun
- 12) Simpan filtratnya untuk menguji alkali bebas
- 13) Keringkan kertas saring atau cawan gooch serta residu dalam oven pada suhu (100-105)<sup>o</sup>c selama 3 jam
- 14) Biarkan dingin
- 15) Timbang kertas saring atau cawan gooch tersebut
- 16) Bahan tak larut dalam etanol =  $\frac{b_2 - b_0}{b_1} \times 100$

Keterangan :

B<sub>0</sub> : bobot kertas saring atau cawan gooch kosong

B<sub>1</sub> : bobot sampel

B<sub>2</sub> : bobot kertas saring atau cawan gooch kosong dan residu

## 6. Uji alkali bebas (dihitung sebagai NaOH)

- **Pereaksi**

Larutan standar KOH 0,1 N alkoholis, Larutan standar hcl 0.1 N alkoholis, Indikator fenolftalein

- **Alat**

Erlenmeyer 250 ml, Penganas air

- **Cara kerja**

- 1) Panaskan filtrat dari penentuan bahan tak larut dalam etanol

- 2) Saat hampir mendidih masukan 0,5ml indikator fenolftalein 1%
- 3) Jika larutan tersebut bersifat asam (petunjuk fenolftalein tidak berwarna) titrasi larutan standar koh sampai timbul warna merah muda yang stabil
- 4) Jika larutan tersebut bersifat alkali (petunjuk fenolftalein berwarna merah) titrasi larutan hcl sampai warna merah tepat hilang
- 5) Hitung menjadi naoh jika alkali atau menjadi asam oleat jika asam

$$\text{Alkali bebas} = \frac{40x \ vx \ n}{b} \times 100$$

Keterangan :

v : volume HCl yang digunakan ml

n: normalitas HCl yang digunakan

b: bobot contoh uji mg

40: berat ekuivalen NaOH

## 7. Uji asam lemak bebas (dihitung sebagai asam oleat)

- **Pereaksi**

Larutan standar KOH 0,1 N alkoholis, Larutan standar hcl 0.1 N alkoholis, Indikator fenolftalein

- **Alat**

Erlenmeyer 250 ml, Penganas air

- **Cara kerja**

- 1) Panaskan filtrat dari penentuan bahan tak larut dalam etanol
- 2) Saat hampir mendidih masukan 0,5 indikator fenolfentalein 1%

- 3) Jika larutan tersebut bersifat asam (petunjuk fenolftalein tidak berwarna) titrasi larutan standar koh sampai timbul warna merah muda yang stabil
- 4) Jika larutan tersebut bersifat alkali (petunjuk fenolftalein berwarna merah) titrasi larutan hcl sampai warna merah tepat hilang
- 5) Hitung menjadi naoh jika alkali atau menjadi asam oleat jika asam

$$\text{Asam lemak bebas} = \frac{282x vx n}{b} \times 100$$

Keterangan :

v : volume KOH yang digunakan ml

n: normalitas KOH yang digunakan

b: bobot contoh uji mg

282 : berat asam ekuivalen asam asetat  $C_{18}H_{34}O_2$

### 2.7.5. Pengujian terhadap bakteri

Metode yang digunakan dalam penelitian ini ialah metode difusi sumuran, metode difusi sumuran merupakan metode dalam efektivitas antimikroba dengan mengukur zona hambat dengan cara siapkan sabun dengan formulasi yang berbeda, kemudian siapkan sabun cair cuci tangan merek x sebagai kontrol positif dan siapkan bakteri *Escherichia coli*.

Langkah berikutnya membandingkan larutan standar McFarland 0,5 dengan larutan pengenceran bakteri dengan cara mengambil bakteri E.coli menggunakan ose steril dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9% steril 2 mL. Kemudian dihomogenkan dan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Langkah selanjutnya ialah pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA), Sebanyak 1,9g media Mueller Hinton Agar(MHA) (38 g/1000 mL) dilarutkan dalam 50ml aquadest dipanaskan sampai larut. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

Dinginkan sampai suhu  $\pm 50^{\circ}\text{C}$ . Media MHA dituang kedalam cawan petri dan biarkan memadat. Bakteri E. coli di goreskan ke dalam media MHA, kemudian buat lubang sebanyak yang diperlukan menggunakan cork borer. Pada masing-masing lubang masukan formulasi dengan berbagai konsentrasi, kontrol positif, dan kontrol negatif.formulasi sabun cair cuci tangan dengan bermacam konsentrasi dimasukan ke dalam sumuran pada media MHA sebanyak 100  $\mu\text{l}$  menggunakan mikropipet dengan pengerjaan secara steril.

Media yang sudah dilakukan pengujian dibungkus dengan aluminium foil. Selanjutnya cawan petri yang berisi bakteri dengan berbagai konsentrasi ekstrak dimasukkan inkubator dengan suhu 37°C selama 2 kali 24 jam. Setelah zona hambat terbentuk ukur diameter zona hambat dan pengerjaan diatas dilakukan secara duplo (Basir, 2017)

Pengukuran aktivitas antibakteri adalah untuk menentukan potensi suatu zat yang diduga atau telah memiliki aktivitas sebagai antibakteri dalam larutan terhadap suatu bakteri. Pada zona hambat terdapat beberapa artian yang dimana luas zona hambat berdiameter  $< 5\text{ mm}$  : daya hambat kurang ; daya hambat 5 - 10 mm : daya hambat cukup/medium ; diameter 10 - 20 mm : daya hambat kuat ; Diameter  $>20\text{ mm}$  : daya hambat sangat kuat (Jawetz , 2001).

### 2.7.6. Pengolahan, penyajian dan analisis data

Terdapat pengolahan, penyajian serta analisis data yang terdapat pada tabel berikut.

- a. Hasil pengujian organoleptik sabun cair cuci tangan

Tabel 3.4 Pengujian organoleptik

No.	Kriteria uji	Hasil pengujian			
		F0	F1	F2	F3
1	Warna				
2	Bentuk				
3	Bau				

- b. Hasil evaluasi pengujian sabun cair cuci tangan

Tabel 3.5 Evaluasi sabun cair cuci tangan

No.	Kriteria uji	Satuan	Standar	Hasil			
				F0	F1	F2	F3
1	pH	% fraksi massa	4 - 10				
2	Bobot jenis	% fraksi massa	1,01 – 1,1 g/ml				
3	Uji total bahan aktif	% fraksi massa	Min 10				
4	Bahan yang tidak larut dalam etanol	% fraksi massa	Maks 0,5				

5	Alkali bebas (dihitung sebagai NaOH)	% fraksi massa	Maks 0,5				
6	Asam lemak bebas (dihitung sebagai asam oleat)	% fraksi massa	Maks 1				

- a. Hasil pengujian sabun cair cuci tangan ekstrak jeruk nipis sebagai efektivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Tabel 3.6 Pengujian terhadap bakteri *Escherichia coli*

No.	Konsentrasi jeruk nipis pada sabun	Hasil zona hambat	
		A	B
1	F0		
2	F1		
3	F2		
4	F3		
5	Kontrol positif		