

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ekperimental, dimana penelitian ini bersifat laboratoris, dimana menyangkut validasi hasil dari suatu penelitian. Penelitian eksperimental dapat diandalkan keilmiahannya, karena dari cara pengontrolan tiap variabel yang belum terdata, sehingga dilakukan proses penelitian kemudian diamati serta diukur data yang sudah diberi perlakuan yang sudah melalui pengujian hipotesis yang tepat (Jaedun, 2011).

Penelitian akan dilakukan percobaan terhadap formulasi sabun padat dengan bahan aktif ekstrak umbi bengkoang. Pengevaluasian sabun sesuai dengan yang tertera pada standart referensi jurnal dan SNI 3532:2021 serta pengujian aktivitas antibakteri sabun padat terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

3.2. Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari - Februari 2024.

3.2.2. Tempat Penelitian

Dilakukan Di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang (POLKESMA) dan Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang (POLKESMA) Malang.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah talenan, pisau, baskom, oven [merek *memmert*], grinder [merek *Rock Chuser*], *rotary evaporator* [merek *Hei-Chill250*], toples wadah maserasi, neraca analitik [merek *Ohaus*], *hotplate* [merek *Thermo Scientific*], *autoklaf*, *Laminary Air Flow*, pH meter [merek *Eutech pH 700*], corong, waterbath [merek *Memmert*], desikator, inkubator, cetakan sabun, *beaker glass* 250 ml [merek *iwaki*], spatula, batang pengaduk, gelas ukur 100 ml [merek *iwaki*], penggaris, pipet tetes, pipet ukur 10 ml [merek *pyrex*], bola pump, cawan porselen, buret 50ml [merek *pyrex*], corong pisah 500 ml [merek *pyrex*], cawan petri, kertas saring, hot plate [merek *Thermo Scientific*], kertas cakram, kapas steril, ose bulat, bunsen, erlenmeyer 500 ml [merek *Pyrex*].

3.3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah umbi bengkoang, Aquadest, etanol 70% [merek *OneMed*], etanol 96% [merek *OneMed*], minyak zaitun [merek *Botanica*], *Virgin Coconut Oil* (VCO) [merek *Botanica*], NaOH [merek *Merck*], gliserin [merek *Sumi Asih Drum USP*], Trietanolamin (TEA), parfum [apel], asam stearat [merek *Wilmar Cosmetic Grade*], NaCl [merek *Merck*], HCl [merek *Merck*], KOH [merek *Merck*], AgNO₃ [merek *Merck*], larutan Mc Farland, H₂SO₄ [merek *pa Smartlab*], bakteri *Salmonella typhi*.

3.4. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas (Independent Variabel)

Formulasi sabun padat dengan variasi konsentrasi ekstrak umbi bengkoang yaitu 0%, 4%, 8% dan 12%.

2. Variabel Terikat (Dependent Variabel)

Hasil pengujian meliputi uji kimia, fisika dan aktivitas antibakteri pada sediaan sabun padat

3.5. Definisi Oprasional

Tabel 4. Definisi Oprasional

Variabel	Definisi	Cara pengukuran	Skala pengukuran
Formula sediaan sabun mandi padat	sabun yang diformulasikan dengan penambahan ekstrak umbi bengkoang	Pengukuran menggunakan uji fisik dan kimia	Nominal
Evaluasi antibakteri terhadap <i>Salmonella typhi</i>	Hasil dari pengukuran diameter zona hambat yaitu zona bening di sekitar cakram	pengukuran uji zona hambat	Rasio

3.6. Prosedur Penelitian

3.6.1. Pengambilan Sampel

Umbi bengkoang diperoleh dari Pasar Oro-oro Dowo, Kec. Klojen, Kota Malang, Jawa Timur. Spesifikasi Umbi bengkoang yang digunakan dengan kondisi fisik yang sehat dan segar, warna kulit coklat muda dengan kategori siap panen. Tekstur umbi tidak cacat, tidak berjamur, dan tidak ada kerusakan fisik.

3.6.2. Preparasi sampel

Umbi bengkoang segar disortasi basah atau dibersihkan dari kotoran seperti tanah yang masih menempel pada umbi, dikupas kulitnya lalu dipotong-potong menjadi bagian kecil, keringkan menggunakan sinar matahari dan di oven pada suhu 60°C sampai

kering sehingga menjadi simplisia kemudian dihaluskan menggunakan grinder.

3.6.3. Pembuatan Ekstrak Umbi Bengkoang

Ekstraksi umbi bengkoang dengan cara metode maserasi serbuk simplisia bengkoang sebanyak 200 gram, direndam dengan pelarut etanol 96% ke dalam bejana maserasi sebanyak 2000 ml maserator harus terlindungi dari cahaya matahari. Campuran diaduk 12 jam sekali, selama 15-30 menit. perendaman dilakukan selama 48 jam. Hasil yang diperoleh disaring menggunakan kertas saring lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* (Kurnia et al., 2023).

3.7. Pemeriksaan Ekstrak Umbi Bengkoang

3.7.1. Organoleptik

Pengujian melihat tampilan fisik sediaan meliputi warna, aroma, tekstur.

3.7.2. Pemeriksaan pH

Pengukuran menggunakan pH meter dengan cara 1 gram ekstrak dilarutkan dalam aquadest 10 ml, dihomogenkan kemudian dilakukan pengecekan pH.

3.7.3. Rendemen

Rendemen atau massa jenis dari ekstrak yang akan diuji dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak (g)}}{\text{berat sampel awal (g)}} \times 100\%$$

3.7.4. Kelarutan

Menguji kelarutan pada ekstrak umbi bengkoang dengan menimbang 1 gram ekstrak dilarutkan dengan 10 ml aquadest, homogenkan dengan dikocok kemudian amati kelarutan. Ulangi

langkah dengan mengganti pelarut dengan etanol 96% pa dan aquadest.

3.8. Formulasi Sabun Padat

3.8.1. Formula Sabun Padat Ekstrak Umbi Bengkoang

Tabel 5. Formulasi sabun padat dengan konsentrasi 0%, 4%, 8% dan 12%.

No	Bahan yang digunakan	Formula (g)				Fungsi
		F0	F1	F2	F3	
1	Ekstrak Umbi Bengkoang	0%	4%	8%	12%	Zat Aktif
2	Asam Stearat	10	10	10	10	Pengeras sabun
3	VCO	10	10	10	10	Bahan dasar
4	Minyak zaitun	10	10	10	10	Pencegah iritasi
5	NaOH 30%	15 ml	15 ml	15 ml	15 ml	Penetralisir asam
6	Gliserin	13	13	13	13	Pengental struktur
7	Etanol 96%	15	15	15	15	Pelarut
8	TEA	4	4	4	4	Pengemulsi
9	Minyak kelapa sawit	10	10	10	10	Bahan dasar
10	Pewangi	1	1	1	1	Aroma
11	Aquadest ad	100	100	100	100	pelarut

3.8.2. Pembuatan Sabun Padat

- a. Menyiapkan bahan baku yang akan digunakan serta bahan tambahan yang diperlukan, kemudian menimbang sesuai dengan formula.
- b. Masukkan minyak zaitun, VCO dan minyak kelapa sawit kedalam beaker glass, aduk secara kontiniu selama 12-15 menit pada suhu 70°C.
- c. Setelah minyak tercampur, menambahkan NaOH 30% kedalam beaker glass mengaduk selama 10 menit, suhu diturunkan menjadi 50°C.

- d. Melebur asam stearat pada suhu 60°C didalam beaker glass di atas penangas air, hasil leburan akan berbentuk cairan, kemudian masukkan perlahan kedalam beaker glass.
- e. Tambahkan gliserin, TEA dan surfaktan, kemudian masukkan ke dalam campuran aduk hingga homogen sekitar 7-10 menit.
- f. Larutkan ekstrak umbi bengkoang dengan etanol 96%, tambahkan ke dalam campuran dan diaduk pada suhu 40°C. Tambahkan pewangi pada campuran, aduk kembali hingga homogen dan tambahkan aquadest diakhir proses pembuatan sabun.
- g. Sediaan sabun padat dimasukkan ke dalam cetakan yang telah disediakan berbahan silikon. Simpan sediaan di suhu ruang/ lemari pendingin selama satu hingga dua hari penyimpanan.
- h. Mengecek sediaan sabun dikeluarkan dari cetakan dan di evaluasi (Chan, 2017), (Wahyuni, 2018).

3.8.3. Evaluasi Sabun Padat

a. Persiapan sampel Uji

Sampel dipotong-potong sesuai kebutuhan, sampel dapat dicampur dengan pengujian menggunakan spatula, dipastikan wadah uji bersih dan kering. Sampel dapat disimpan diwadah yang tertutup bersih dan kering serta diberi label identifikasi (Oktavia Deriani, 2021).

b. Uji organoleptik

Pengamatan fisik pada sampel sabun padat terhadap aroma, bentuk dan warna. Pengujian dilakukan secara Duplo pada minggu awal dan minggu pertama (Purwani, 2008)

c. Uji pH

Menimbang 1 gram sampel sabun padat, dimasukkan kedalam beaker glass dan dilarutkan dengan aquadest 1000 ml kemudian dihomogenkan. Selanjutnya diukur dengan

menggunakan pH meter yang sebelumnya dikalibrasi, Pengujian dilakukan secara Duplo pada minggu awal dan minggu pertama (Standar Nasional Indonesia, 2021)

d. Uji Stabilitas busa

Menimbang 1 gram sampel sabun padat, masukkan kedalam gelas ukur dilarutkan dengan 10 ml aquadest, kemudian di kocok-kocok hingga terbentuk busa. Tunggu hingga 5 menit kemudian dicatat tinggi busanya, Pengujian dilakukan secara Duplo pada minggu awal dan minggu pertama (Oktavia Deriani, 2021).

e. Kadar air

Mengoven botol timbang yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit (b_0); kemudian dinginkan dan timbang dalam keadaan dingin. Menimbang 5 gram contoh uji ke dalam botol timbang(b_1); panaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam; dinginkan dalam desikator kemudian timbang kembali (b_2); mengulangi prosedur hingga mencapai bobot tetap. Pengujian dilakukan dengan 2 replikasi (Standar Nasional Indonesia, 2021).

Rumus kadar air :

$$\text{Kadar air} = \frac{b_1 - b_2}{b_1 - b_0} \times 100 \%$$

Ket :

Kadar air dalam satuan % fraksi massa, persyaratan maksimal 23%

b_0 = berat botol timbang kosong (g)

b_1 = berat sampel + botol timbang sebelum pengeringan (g)

b_2 = berat sampel + botol timbang setelah pengeringan (g)

f. Total Lemak

Menimbang 5 gram sampel sabun (b_0), larutkan dengan 100 ml aquadest dengan dipanaskan diatas penangas air pada

suhu 70-80°C; masukkan kedalam corong pisah, tambahkan 2-3 tetes methyl orange dan H₂SO₄ berlebih sebanyak 5 ml, dinginkan corong pemisah; ekstraksi sampel sebanyak 3 replikasi dengan pelarut n-heksana 100 ml, 50 ml dan 50 ml. kumpulkan ekstrak ke dalam beaker glass, uapkan pelarut n-heksana dengan penangas air dan akan terbentuk residu kemudian larutkan dalam 20 ml etanol netral 95 %; tambahkan beberapa tetes indikator PP, titrasi larutan dengan KOH alkoholis (V); larutan hasil titrasi diuapkan, residu yang terbentuk dipanaskan ke dalam oven dengan suhu 103°C selama 15 menit hingga didapatkan bobotnya (b₁), tidak melebihi 3 mg tiap penimbangan (Standar Nasional Indonesia, 2021)

Rumus :

$$\text{Total lemak} = [b_1 - (V \times N \times 0,038)] \times \frac{100}{b_0}$$

Keterangan :

Total lemak dalam % fraksi massa, persyaratan minimal 60,0%

B₀ = bobot sampel

B₁ = bobot sabun kering

V = volume KOH

N = normalitas standar KOH

g. Bahan tak larut dalam etanol

Mengoven kertas saring pada suhu pada suhu 105°C selama 30 menit, dinginkan dan ditimbang (b₀); Menimbang 5 gram sabun (b₁), dimasukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian tambahkan 200 ml etanol yang baru dipanaskan, panaskan diatas penangas air sampai sabun terlarut sepenuhnya; tuang larutan dalam kertas saring, bilas Erlenmeyer menggunakan etanol dan cuci residu pada kertas saring dengan etanol; simpan filtratnya untuk pengujian alkali bebas/asam lemak bebas; keringkan kertas saring beserta residu dalam oven pada

suhu 105°C selama 3 jam; dinginkan dalam desikator dan timbang (b2) (Standar Nasional Indonesia, 2021).

Rumus:

$$\text{Bahan tak larut dalam etanol} = \frac{b_2 - b_0}{b_1} \times 100 \%$$

Keterangan:

Persyaratan mutu maksimal 10%

B₀ = bobot kertas saring (g)

B₁ = bobot sampel (g)

B₂ = bobot kertas saring + residu (g)

h. Alkali bebas (dihitung sebagai NaOH)/asam lemak bebas (dihitung sebagai asam oleat)

Panaskan filtrat dari pengujian bahan tak larut etanol; saat hampir mendidih, masukkan 0,5 ml indikator fenolftalein 1%; Jika larutan tersebut bersifat asam (tidak berwarna merah), kemudian titrasi dengan larutan KOH, hingga timbul warna merah muda yang stabil; Jika larutan tersebut bersifat alkalis (berwarna merah), kemudian titrasi dengan larutan standar HCl, hingga warna merah tepat hilang (Standar Nasional Indonesia, 2021).

Rumus :

$$\text{Asam lemak bebas} = \frac{282 \times V \times N}{B} \times 100\%$$

Diketahui :

Persyaratan mutu maksimal 2,5%

V = KOH 0,1 N yang di gunakan (ml)

N = normalitas KOH yang digunakan

B = berat contoh (g).

282 = berat setara asam oleat.(C₁₈H₃₄O₂)

Rumus :

$$\text{Kadar alkali bebas} = \frac{V \times N \times 40}{B} \times 100 \%$$

Diketahui :

Persyaratan mutu maksimal 0,1%

V = HCl yang digunakan (ml)

N = normalitas HCl yang digunakan

B = berat contoh (g)

40 = berat ekuivalen setara NaOH.

i. Kadar Klorida

Menimbang kurang lebih 5 gram sampel sabun (b), larutkan dengan 300 ml aquadest, didihkan diatas penangas air agar larut, tambahkan larutan Magnesium Nitrat berlebih sebanyak 25 mL. larutan dititrasi dengan AgNO₃ dengan indikator K₂CrO₄ hingga terbentuk warna merah bata. Catat volume AgNO₃ yang diperlukan (v) (Standar Nasional Indonesia, 2021).

Rumus :

$$\text{Kadar klorida} = \frac{58,5 \times V \times N}{b} \times 100$$

Keterangan :

Persyaratan mutu maksimal 1,0 %

V = volume AgNO₃

N = normalitas larutan AgNO₃

58,5 = bobot ekuivalen NaCl

B = bobot sampel sabun.

j. Lemak tidak tersabunkan

Menimbang 5 gram sampel sabun dan dilarutkan dalam campuran 50 mL etanol netral dan 50 mL natrium hidrogen karbonat; Larutan sampel dipanaskan di atas penangas air tidak lebih dari 70°C lalu dinginkan; Larutan diekstraksi dengan 50 mL larutan n-heksana. Residu yang terbentuk setelah diuapkan lalu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 menit,

Sampel didinginkan dan ditimbang sampai bobot tetap; sampel dilarutkan kedalam 10 mL etanol netral 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 (Standar Nasional Indonesia, 2021).

Rumus :

$$\text{Lemak yang tidak tersabunkan} = m1 - \frac{V \times N \times 282}{1000} - m2 \times \frac{100}{M_o}$$

Diketahui :

Persyaratan mutu maksimal 0,5%

N = normalitas larutan standar KOH 0,1 N;

V = volume larutan standar KOH 0,1 N yang digunakan

282 = berat ekuivalen asam lemak dalam sabun sebagai asam oleat

M_o = bobot sampel

M₁ = bobot hasil ekstrak pertama

M₂ = bobot hasil ekstrak kedua

3.9. Uji sabun terhadap bakteri *Salmonella typhi*

3.9.1. Sterilisasi

Alat-alat yang akan digunakan dalam pengujian bakteri dicuci bersih, dikeringkan dan disterilkan terlebih dahulu. Alat yang berbahan dasar gelas seperti labu ukur dan gelas ukur, dibungkus menggunakan kertas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. alat-alat kaca seperti erlenmeyer, tabung reaksi, beaker glass ditutup mulutnya menggunakan kapas dan dibungkus dengan kertas, dapat dikeringkan menggunakan oven pada suhu 160°C-170°C selama 1–2 jam. LAF disterilkan menggunakan alkohol, secara aseptik dan pengelapan menggunakan

cara yang khusus. Sterilisasi pada LAF dilakukan sebelum dan sesudah pemakaian (Threonesia, 2017).

3.9.2. Pembuatan larutan *McFarland* dan suspensi bakteri

Pembuatan larutan *McFarland*, larutan BaCl₂ 1% 0,05 ml dicampur dengan larutan H₂SO₄ 1% 9,95 ml kemudian dihomogenkan dengan dikocok, setiap melakukan perbandingan dengan suspensi bakteri suspensi dikocok terlebih dahulu. Standar kekeruhan *McFarland* 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri 1,5 x 10⁸ CFU/mL (Threonesia, 2017).

Pembuatan suspensi bakteri dengan mengambil 1-2 ose bakteri *Salmonella typhi* dilarutkan dengan NaCl 0,9% 5 ml di dalam tabung rekasi, suspensi di bandingkan dengan *McFarland* jika belum keruh ditambahkan koloni, jika lebih keruh ditambahkan larutan NaCl 0,9 %, bandingkan hingga diperoleh kekeruhan seperti larutan *McFarland* (Oktavia Deriani, 2021; Threonesia, 2017).

3.9.3. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar

Menimbang 7,6 gram *Muller Hinton* Agar, kemudian dilarutkan dengan aquadest 200 ml aduk dan dipanaskan diatas penangas air hingga mendidih. Campuran di sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan udara 1 atm. Setelah steril dinginkan kemudian tuang ke dalam cawan petri dilakukan di LAF, lalu simpan hingga agar memadat di inkubator (Threonesia, 2017).

3.9.4. Penyiapan Larutan Uji, Larutan Kontrol dan Kertas Cakram

Sabun akan diuji aktivitas antibakteri pada konsentrasi 0%, 4%, 8% dan 12%. Masing-masing konsentrasi pada sabun padat akan dipanaskan, dengan menimbang sabun 20 gram dilarutkan dalam aquadest 10 ml sebagai larutan uji. Sebagai larutan kontrol positif

yang digunakan antibiotik amoxicillin 10 ppm dan kontrol negatifnya menggunakan aquadest (Purwati & Raharjeng, 2023).

Kertas cakram disterilisasi dengan meletakkan kertas saring yang sudah dibentuk bulat ke dalam cawan petri, di autoklaf pada 1 atm suhu 121°C selama 15 menit. kertas cakram akan direndam pada masing-masing konsentrasi larutan uji, larutan kontrol positif dan kontrol negatif. (Rahminiwati et al., 2020).

3.9.5. Uji aktivitas Antibakteri

Sabun padat akan dilakukan pengujian aktivitas antibakteri *Salmonella typhi* dengan metode difusi cakram menggunakan kontrol positif amoxicillin dimana cakram telah direndam amoxicillin, kontrol negatif menggunakan aquadest yang sudah steril dan sabun padat konsentrasi 0%, 4%, 8% dan 12%. Media MHA yang sudah memadat dituang suspensi bakteri secara merata di atas permukaan media dalam cawan petri (Suswati et al., 2009).

Cawan petri yang telah berisi media MHA yang sudah ditanami bakteri, kemudian diletakkan kertas cakram yang sudah direndam dengan konsentrasi 0%, 4%, 8% dan 12% sabun mandi padat ekstrak umbi bengkoang. Selanjutnya ditambahkan kontrol positif dan negatif dengan tujuan ada atau tidaknya pengaruh pada zona hambat pada pengujian pertumbuhan bakteri dari konsentrasi (Suswati et al., 2009).

Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu inkubasi 37°C. setelah diinkubasi dilakukan pengukuran diameter zona hambat yaitu zona bening di sekitar cakram menggunakan jangka sorong atau penggaris (Oktovia & Banjarbaru, 2017).

3.10. Pengolahan, Penyajian dan Analisa Data

3.10.1. Pengolahan Data

Data pengujian yang diperoleh dan diolah pada penelitian adalah hasil pengujian sesuai dengan parameter pengujian SNI 3532:2021 mengenai sabun mandi padat dan hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

3.10.2. Penyajian Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel, sebagai berikut :

- Hasil evaluasi sabun mandi padat sesuai SNI 3532:2021 dan uji fisik.

Tabel 6. Hasil Evaluasi Sabun

NO	Kriteria Uji	Hasil F0	Hasil F1	Hasil F2	Hasil F3	SNI
1	Organoleptik					
2	pH					
3	Stabilitas Busa					
4	Kadar Air					
5	Total lemak					
6	Alkali/asam lemak bebas					
7	Kadar klorida					
8	Lemak tidak tersabunkan					

- Hasil pengujian sabun ekstrak umbi bengkoang sebagai antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

Tabel 7. Hasil Uji Antibakteri

NO	Konsentrasi ekstrak Umbi Bengkoang	Diameter Zona Hambat
1	0%	
2	4%	
3	8%	
4	12%	

3.10.3. Analisa Data

Data pengujian sediaan sabun mandi padat ekstrak umbi bengkoang uji ektivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* menggunakan metode deskriptif, dengan penyajian data dalam bentuk tabel dan gambar sesuai dengan hasil yang diperoleh saat pengujian dengan tujuan menganalisis data hasil karakteristik pada sediaan sabun mandi padat dengan membandingkan dengan metode standar