

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Adapun jenis penelitian pada penelitian kali ini adalah Penelitian Eksperimen. Penelitian eksperimen adalah suatu kegiatan pengumpulan data, pengolahan data, analisis, dan penyajian yang dilakukan dengan metode percobaan yang bersistem dan terencana untuk membuktikan kebenaran suatu teori dan lain sebagainya. Peneliti memanipulasi stimuli, keadaan / kondisi eksperimental, serta mengobservasi pengaruh akibat perlakuan. Secara garis besar tujuan penelitian ini; pertama menguji hipotesis yang diajukan; kedua memprediksi kejadian dalam eksperimental; ketiga menarik generalisasi hubungan antarvariabel (Winarni & Endang, 2018).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Adapun waktu penelitian yang digunakan oleh peneliti adalah dimulai pada tanggal 4 Januari 2024 sampai 9 Februari 2024.

3.2.2 Tempat Penelitian

Adapun tempat penelitian yang digunakan adalah Laboratorium Farmakologi dan Fitokimia dan Laboratorium Mikrobiologi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Neraca analitik (Radwag AS 220.R2), kaca arloji, gelas ukur 100ml (Iwaki Asahi), beaker glass 400ml (Pyrex), beaker glass 100ml (Iwaki Asahi), toples kaca, grinder (Getra 1C-06 B), oven (Memmert UN110), corong, pipet ukur, tabung reaksi, pipet tetes, hot plate (Thermo scientific SP888 57107), batang pengaduk, magnetic stirer, labu ukur 100ml (Duran), pH meter

(Eutech), erlenmeyer 300ml (Iwaki), penangas air (Mammert), pendingin tegak, cawan porselen, desikator, corong pemisah 250ml (Duran), buret (Pyrex), statif dan klem, rak tabung, penggaris, cawan petri, ose, autoclaf, pinset, inkubator, kertas saring, alumunium foil.

3.3.2 Bahan

Simplisia bunga rosella, aquades (Hydrobatt), Larutan buffer 4, Larutan buffer 7, Larutan buffer 10, Pelarut petroleum, Larutan KOH 1N, Larutan H₂SO₄ 0,25 N, Indikator Fenofthalein, Metil Orange, Aseton, Larutan magnesium nitrat, Asam stearate, Cocomid-DEA, Propilen glikol, larutan kalium kromat, Larutan perak nitrat 0,1N, Media MHA (Himedia), NA (Himedia), Bakteri Salmonella typhi, NaCl 0,9%, Cakram steril, Minyak sawit (Hemat), NaOH, Gliserin, antibiotik Cloramphenicol.

3.4 Variabel Penelitian

Tabel 3. 1. Variabel Penelitian

No.	Bentuk Variabel	Pengertian	Variabel dalam Penelitian
1.	Variabel bebas	Variabel yang bertanggung jawab terhadap terjadinya variabel terikat	Konsentrasi ekstrak bunga rosella
2.	Variabel terikat	Variabel yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas	Aktivitas antibakteri

3.5 Definisi Operasional Variabel

Tabel 3. 2. Definisi Operasional

Variabel	Definisi	Cara pengukuran	Skala pengukuran
Formula sediaan sabun padat	Ekstrak kelopak bunga rosella sebagai formulasi sabun padat	Uji fisik dan uji kimia	Nominal
Hasil dari uji sabun terhadap bakteri <i>Salmonella typhi</i>	Hasil dari uji daerah disekeliling kertas cakram dari media pertumbuhan bakteri uji yang tidak ditumbuhi bakteri pada formulasi sabun padat ekstrak kelopak bunga rosella	Uji zona hambat	Rasio

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Ekstraksi Sampel

Timbang 500 gram serbuk simplisia kelopak bunga rosella, lalu rendam dengan etanol dengan perbandingan 1:2 dan didiamkan selama 3 x 24 jam. Ekstrak kemudian difiltrasi hingga benar-benar terbebas dari sisa serbuk simplisia yang tidak larut, waterbath hingga dirasa sudah mengental. Ekstrak yang sudah mengental disimpan dalam suhu 4°C (Sari D. P., 2021)

3.6.2 Pengujian Ekstrak

1. Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mengamati bentuk, warna dan bau pada ekstrak bunga rosella (Hatauruk, Paulina, & Wiyono, 2020).

3.6.3 Formulasi Sabun

Pada penelitian ini menggunakan formulasi dari Widya Pangestika, 2021 yang telah disesuaikan.

Tabel 3. 3. Formulasi Sabun

Bahan	Formulasi				Keterangan	Satuan
	F0	F1	F2	F3		
Minyak sawit	25	25	25	25	Basis sabun	g
NaOH 30%	15	15	15	15	Alkali	ml
Gliserin	14	14	14	14	Pelembab	g
Asam stearat	8,5	8,5	8,5	8,5	Pengeras	ml
TEA	4	4	4	4	Surfaktan	ml
Propilen glikol	1	1	1	1	Pengawet	ml
Ethanol 96%	19	19	19	19	Pelarut	ml
Ekstrak rosella	0	3	6	9	Bahan aktif	g
Aquades	110	110	110	110	Pelarut	ad

Selama lima belas menit, panaskan minyak sawit pada suhu 60° C. Setelah suhu mencapai $70-80^{\circ}$ C, masukkan NaOH yang telah dilarutkan dengan aquades. Diaduk selama 3–5 menit hingga padatan sabun terbentuk. Tambahkan asam stearat yang telah dilelehkan, campurkan gliserin, TEA dan propilen glikol hingga terbentuk sabun dasar. Setelah itu tambahkan ekstrak bunga rosella dan aduk dengan baik. Setelah itu tambahkan ethanol, lalu tambahkan aquades secukupnya dan aduk kembali hingga rata. Tuangkan ke dalam cetakan dan simpan selama satu hari dingin sampai sabun padat (Maulana, 2013).

3.6.4 Uji Tinggi dan Kestabilan Busa

Timbang 1 g sampel sabun padat masukkan ke dalam gelas ukur larutkan dengan 10 ml aquades lalu tutup. Tabung dikocok selama 10 detik lalu ukur tinggi busa yang terbentuk diamkan selama 5 menit lalu amati (Hatauruk et al., 2020).

3.6.5 Uji pH

1. Persiapan larutan uji

Timbang lebih kurang 1 g sampel sabun padat, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 1000 ml. Isi sebagian labu dengan air bebas CO₂ lalu homogenkan hingga semua sampel larut dengan sempurna. Tambahkan kembali air bebas CO₂ hingga tanda batas dan homogenkan kembali. Tuangkan larutan kedalam beaker glass dan dimkan larutan hingga mencapai kesetimbangan pada suhu ruang 25°C (BSN, 2021)

2. Prosedur uji pH

Kalibrasi alat pH meter menggunakan larutan buffer, lakukan hal tersebut pada setiap saat akan melakukan pengukuran. Bersihkan sisa larutan buffer dengan menggunakan air bebas CO₂ dan di lap menggunakan tisu. Celupkan elektroda yang sudah dibersihkan ke dalam larutan sampel sabun padat ekstrak bunga rosella dengan suhu larutan 25°C. Tunggu pH meter hingga pada layar pH meter menunjukkan kata ready lalu catat hasil pengukuran tersebut dan bandingkan pada ketentuan maksimal pH yang terkandung dalam sabun padat (BSN, 2021) .

3.6.6 Total Lemak

Timbang ($5 \pm 0,05$) gram sampel sabun padat, masukkan ke dalam gelas piala, dan tambahkan 100ml aquades panas pada suhu 70–80⁰ C. Selanjutnya masukkan sampel uji ke dalam corong pemisah. Setelah menambahkan beberapa tetes methyl orange, kocok. Titrasi dengan H₂SO₄ hingga indikator berubah warna. Tambahkan 10ml berlebih ke dalam corong pisah dan ekstrak

sampel tiga kali dengan pelarut petroleum 100ml dan 50ml. Kumpulkan ekstrak, kemudian cuci ekstrak sebanyak tiga kali dengan 25ml aquades. Setelah pelarut petroleum diuapkan, tambahkan 20ml etanol 95% dan beberapa tetes indikator fenofthalein ditambahkan ke residu. Lakukan titrasi menggunakan KOH alkoholis sampai terbentuk warna merah muda. Setelah itu, larutan alkohol yang dihasilkan dari titrasi diuapkan. Setelah terbentuk, sisasianya dipanaskan dalam oven selama 15 menit dan ditimbang hingga beratnya tetap.

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

3.6.7 Kadar air

Timbang cawan porselen yang telah dikeringkan selama 30 menit pada suhu $(105 \pm 2)^{\circ}\text{C}$. Kemudian tambahkan $(5 \pm 0,05)$ g sampel sabun padat ke dalam cawan porselen dan panaskan kembali dalam oven pada suhu $(105 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ selama satu jam. Dinginkan pada desikator sampai suhu ruang, lalu timbang hingga bobot tetap (BSN, 2021)

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

3.6.8 Bahan tak larut dalam etanol

Untuk menghasilkan sampel sabun yang larut, campurkan ($5 \pm 0,01$) g sampel sabun padat dengan 200 ml etanol yang baru dipanaskan. Kemudian masukkan tutup asah ke dalam Erlenmeyer dan pasang pendingin tegak. Panaskan hingga sabun larut. Potong kertas saring kemudian keringkan dalam oven pada suhu 100–105 derajat Celcius selama tiga puluh menit. Setelah itu dingin, timbang kertas saring hingga beratnya tetap. letakkan kertas saring di atas labu Erlenmeyer yang sudah dirangkai. Tuang sabun yang sudah larut di atas kertas saring. Tuang bahan yang tidak larut ke dalam Erlenmeyer dengan etanol, kemudian tuang bahan yang tidak larut di atas kertas saring. Cuci residu dengan etanol pada kertas saring sampai semuanya bebas sabun. Keringkan kertas saring dengan residu dalam oven selama tiga jam, dinginkan, dan timbang hingga bobotnya tetap (BSN, 2021)

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

3.6.9 Alkali bebas

Untuk mengidentifikasi bahan tidak larut alkohol, panaskan filtrat sampai hampir mendidih. Kemudian tambahkan indikator fenoftalein 1%. Jika larutan bersifat asam (fenoftalein tidak berwarna), titrasi dengan larutan standar KOH sampai terdapat warna merah muda stabil; jika larutan bersifat alkali (fenoftalein berwarna merah), titrasi dengan larutan standar HCl sampai warna merah hilang (BSN, 2021)

$$\text{Alkali bebas} = \frac{282 \times V \times N}{b} \times 100\%$$

3.6.10 Kadar klorida

Larutkan (5±0,01)g sampel sabun padat dengan 300ml aquades. Lalu tambahkan larutan Magnesium Nitrat berlebih, dinginkan atau disaring. Setelah itu titrasi dengan AgNO₃ dengan indikator K₂CrO₄ sampai terbentuk warna merah bata (BSN, 2021)

$$\text{Kadar klorida} = \frac{585 \times V \times N}{b} \times 100\%$$

3.6.11 Lemak tidak tersabunkan

Timbang (5 ± 0,01)g sampel sabun padat masukkan pada gelas piala 250ml kemudian tambahkan dengan 50ml etanol netral dan 50ml larutan natrium hydrogen karbonat. Larutkan dengan pemanasan pada suhu 70⁰C, setelah larut biarkan dingin. Bilas gelas piala dengan larutan etanol : natrium hydrogen karbonat (1:1). Ekstraksi sebanyak tiga kali dengan n-heksana 50ml. Hasil ekstraksi kemudian diuapkan menggunakan labu didih lalu dikeringkan selama 5 menit dalam oven, dinginkan dan timbang hingga bobot tetep. Tambahkan beberapa ml etanol dan beberapa tetes indikator fenofhtalein pada residu. Kemudian titrasi dengan larutan KOH 0,1N. setelah titrasi, tambahkan larutan KOH 2N sebanyak 10ml. Didihkan selama 30 menit. Tambahkan aquades dengan jumlah yang seimbang dengan volume larutan. Ekstraksi kembali menggunakan 10ml n-heksana. Setelah itu uapkan hasil ekstraksi dan keringkan lalu ditimbang hingga bobot tetap (BSN, 2021)

$$\text{Lemak tak tersabunkan} = \left(m_1 - \frac{V \times N \times 282}{b} - m_2 \right) \times \frac{100}{m_0}$$

3.6.12 Uji cemaran mikroba

- Pembuatan suspensi bakteri

1x ose bakteri *Salmonella typhi* dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi NaCl 0,9% (Amelia, 2022). Setelah itu diamati kekeruhan yang diperoleh dengan membandingkan kekeruhan standar menggunakan Mc Farland 0,5 (Zeniusa, 2019)

- Pembuatan kontrol positif

Larutan kontrol positif dibuat dengan cara ditimbang chloramphenicol 500 mg sebanyak 3 g, kemudian dilarutkan dengan akuades dan dicukupkan volumenya hingga 10 mL (Tanauma, et all., 2016).

- Pembuatan media

Dilakukan proses pembuatan media Mueller Hinton Agar (MHA) yang akan digunakan sebagai media pengaplikasian. Proses ini dilakukan dengan menimbang 7,6 gram serbuk MHA lalu dilarutkan dengan 200 ml akuades pada tabung Erlenmeyer dan diaduk hingga larut. Pembuatan dilanjutkan dengan memanaskan di atas hotplate agar larutan homogen, kemudian disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit dengan tekanan udara 1 atm suhu 121oC. Media MHA yang sudah steril, dituang kedalam cawan petri steril masing-masing 20 ml dan dibiarkan memadat. Kemudian menggunakan lidi kapas steril, ambil suspensi bakteri yang sudah distandarkan kekeruhannya dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5. Lalu oleskan/swab secara merata pada MHA yang sudah padat. Tunggu sampai 10 menit (Zeniusa et all., 2019).

- Uji daya hambat bakteri

Uji daya hambat sabun cair dengan menggunakan ekstrak bunga rosella terhadap *Salmonella typhi* secara in vitro. Larutkan 1g sampel pada 10ml aquades. Kertas cakram direndam dalam sampel pada masing-masing konsentrasi yaitu konsentrasi 0%, 3%, 6%, dan 9% . Kertas cakram juga direndam pada antibiotik sebagai kontrol (+). Proses perendaman kertas cakram ini dilakukan selama \pm 15 menit. Kemudian dengan menggunakan pinset steril, letakkan kertas cakram yang sudah direndam sampel pada MHA yang sudah diinokulasi bakteri dengan 2 kuadran. Media agar lalu diinkubasi pada suhu kamar 37o C selama 24 jam. Diukur zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan penggaris (Zeniusa et all., 2019).

3.7 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

Adapun pengolahan, penyajian dan analisis data yang terdapat pada tabel berikut:

- Hasil pengujian organoleptik

Tabel 3. 4. Pengolahan, Penyajian, dan analisis Data

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

- Hasil evaluasi pengujian sabun cair

Tabel 3. 5. Pengolahan, penyajian, dan Analisis Data

No.	Kriteria uji	Satuan	Standar	Hasil			
				F0	F1	F2	F3
1.	Ph	-	6,0-11,0				
2.	Total lemak	% fraksi massa	min, 60,0				
3.	Alkali bebas (dihitung sebagai NaOH)	% fraksi massa	maks, 0,1				
4.	Asam lemak bebas (dihitung sebagai asam oleat)	% fraksi massa	maks, 2,5				
5.	Kadar air		maks, 23				
6.	Bahan tak larut ethanol	fraksi massa, %	maks, 10,0				

7.	Kadar klorida	fraksi massa %	maks, 1,0				
8.	Lemak tidak tersabunkan	fraksi massa %	maks, 0,5				

- Hasil pengujian sabun cair ekstrak kelopak bunga rosella sebagai efektifitan antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*

Tabel 3. 6. Pengolahan, Penyajian dan Analisis Data

No.	Konsentrasi ekstrak kelopak bunga rosella pada sabun	Hasil zona hambat
1.	F0	
2.	F1	
3.	F2	
4.	F3	
5.	Kontrol positif	