

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan menggunakan metode eksperimental yaitu penelitian yang mencari hubungan sebab akibat antara variabel bebas dengan variabel terikat, dimana variabel bebas dikontrol dan dikendalikan untuk dapat menentukan pengaruh yang ditimbulkan pada variable terikat. Pada penelitian ini dilakukan percobaan terhadap formulasi sabun padat dengan bahan aktif ekstrak kemangi (Ratminingsih, 2010).

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari - Februari 2024

2. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan dilaboratorium Farmakologi Fitokimia dan laboratorium Mikrobiologi

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu

3.3.1 Alat

Neraca analitik merek Redwag, tabung reaksi, pipet tetes, hotplate merk taffware, batang pengaduk, beaker glass 50ml merek pyrex, beaker glass 100ml merek pyrex, beaker glass 250ml merek pyrex, beaker glass 300ml merek pyrex, beaker glass 1000ml merek pyrex, cetakan sabun, pisau, baki, talenan, cawan petri, oven merek memmert, desikator, gelas ukur 100ml merek iwaki, corong pisah 500ml merek Iwaki, buret 50ml merek Pyrex, autoklaf, statif & klem, pH meter merek Eutech, labu ukur 25ml merek pyrex, labu ukur 50ml merek pyrex, labu ukur 100ml merek pyrex, toples maserasi, waterbath merek memmert, labu alas bulat 250ml merek Iwaki, erlenmeyer 300ml merek Iwaki, erlenmeyer 250ml

merek Iwaki, kertas saring, pendingin tegak, penggaris, *cotton swab*, ose bulat, rotary evaporator merek Heidolph, grinder merek Getra, LAF, inkubator, dan lemari asam

3.3.2 Bahan

Daun Kemangi, Etanol 96%, aquades merek Hydrobatt, larutan buffer 4, larutan buffer 7, larutan buffer 10, larutan KOH 1N, N-Heksana *grade* teknis, larutan H₂SO₄ 0,25N *grade* teknis, indikator fenofthalein, indikator methyl orange, aseton, larutan Magnesium nitrat, Asam stearate, ekstrak kemangi, propilen glikol, larutan Kalium kromat, larutan perak nitrat 0,1N, media MHA merek Himedia, bakteri *salmonella typhi*, NaCl 0,9% steril, *chloramfemnikol*, cakram steril, gliserin, minyak sawit merek tropical, NaOH, dan TEA

3.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas (independen)

Variable bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahan pada variabel terikat (dependen) (Ulfa, 2021). Pada penelitian ini yang menjadi variabel bebas adalah ekstrak kemangi yang ditambahkan pada formulasi sabun mandi padat.

2. Variabel terikat (dependen)

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas (Ulfa, 2021). Pada penelitian ini yang menjadi variabel terikat adalah efektivitas antibakteri *Salmonella typhi*.

3.5 Definisi Operasional Variabel

Definisi oprasional variabel merupakan suatu atribut atau sifat atau nilai dari objek atau kegiatan yang mempunyai variasi tertentu yang telah ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya.

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat Pengukuran	Skala Pengukuran
----------	----------	-----------------	------------------

Formulasi sediaan sabun padat	Ekstrak kemangi sebagai formulasi sabun padat	Uji fisik dan uji kimia	Nominal
Hasil uji sabun terhadap bakteri <i>Salmonella typhi</i>	Hasil uji zona hambat pada formulasi sabun padat ekstrak kemangi	Uji zona hambat	Rasio

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Preparasi Sampel

Daun kemangi sebanyak 2,5kg disortasi basah kemudian dipotong dengan ukuran kecil. Setelah itu dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 60°C. Setelah itu dilakukan penghalusan sampel menggunakan grinder. Setelah itu diperoleh serbuk simplisia daun kemangi (Wijaya, 2022).

3.6.2 Ekstraksi Sampel

Ekstraksi sampel dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk simplisia kemangi ditambahkan dengan etanol 96% kemudian diaduk dan dimaserasi selama 3 hari. Setelah itu disaring dan filtrate yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak kental daun kemangi (Ornary, 2017).

3.6.3 Uji Pendahuluan Ekstrak

1. Uji organoleptik

Uji organoleptik yang dilakukan merupakan uji fisik dari ekstrak yang meliputi warna, bau, dan bentuk (Rusli, 2019).

2. Uji kelarutan ekstrak

Ekstrak kemangi sebanyak 1gram dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan beberapa tetes kloroform.

Kemudian ulangi pengujian dengan mengganti kloroform dengan aseton (Kido, 2021).

3.6.4 Formulasi Sabun

Tabel 3. 2 Formulasi sabun padat

Bahan	Formulasi				Keterangan
	F0	F1	F2	F3	
Minyak kelapa	25	25	25	25	Basis sabun
NaOH 30% (ml)	15	15	15	15	Alkali
Asam stearate (g)	8,5	8,5	8,5	8,5	Pengeras sabun
Gliserin (ml)	14	14	14	14	Pelembap
Etanol 96%	19	19	19	19	Pelarut
TEA (ml)	4	4	4	4	Surfaktan
Propilen glikol	1	1	1	1	Pengawet
Ekstrak kemangi (%)	0	5	9	13	Bahan aktif
Aquades ad	110	110	110	110	Pelarut

3.6.5 Pembuatan Media Sabun

Panaskan minyak sawit pada suhu 60⁰C selama 15 menit. Jika suhu sudah mencapai 70-80⁰C, tambahkan NaOH yang telah dilarutkan dengan aquades, kemudian diaduk selama 3-5 menit hingga terbentuk padatan sabun. Tambahkan asam stearate yang telah dilelehkan terlebih dahulu lalu ditambahkan gliserin dan cocamid DEA hingga terbentuk sabun dasar. Kemudian ditambahkan ekstrak kemangi dan diaduk hingga homogen. Kemudian tambahkan aquades secukupnya lalu aduk kembali hingga homogen. Tuangkan ke dalam cetakan dan dinginkan selama 24 jam sampai sabun mengeras (Maulana, 2013).

3.6.6 Evaluasi Sabun

1. Persiapan contoh uji

Sabun dipotong halus kemudian dicampurkan dan dimasukkan ke dalam wadah kering dan bersih. Simpan sabun di tempat kering, tutup rapat dan beri label identifikasi (Nasional, 2021).

2. Uji organoleptic

Uji organoleptik yang dilakukan merupakan uji fisik dari sabun padat yang meliputi warna, bau, dan bentuk (Rusli, 2019).

3. Kadar air

Timbang cawan petri yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu $(105\pm 2)^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. Timbang $(5\pm 0,05)\text{g}$ contoh uji ke dalam cawan petri. Panaskan dalam oven pada suhu $(105\pm 2)^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Dinginkan pada desikator sampai suhu ruang lalu ditimbang hingga bobot (Nasional, 2021).

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

4. Total lemak

Timbang $(5\pm 0,05)\text{g}$ sampel uji kemudian masukkan dalam gelas piala dan tambahkan 100ml aquades panas dengan suhu $70-80^{\circ}\text{C}$ kemudian masukkan dalam corong pemisah. Tambahkan beberapa tetes methyl orange, setelah itu kocok. Titrasi menggunakan H_2SO_4 (hingga indicator berubah warna) tambahkan berlebih 10ml. Masukkan ke dalam corong pisah kemudian ekstrak sampel sebanyak 3 kali dengan pelarut petroleum 100ml dan 50ml. Kumpulkan ekstrak kemudian cuci ekstrak sebanyak 3 kali dengan 25ml aquades. Uapkan pelarut petroleum kemudian residu yang terbentuk ditambahkan dengan 20ml etanol 95% dan beberapa tetes indicator fenofthalein. Lakukan titrasi menggunakan KOH alkoholis sampai terbentuk warna merah muda. Larutan alkoholis yang diperoleh dari proses titrasi diuapkan. Residu yang terbentuk dipanaskan menggunakan oven dan ditimbang hingga bobot tetap (Nasional, 2021). Rumus perhitungan :

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

5. Bahan tak larut dalam etanol

Larutkan $(5\pm 0,01)\text{g}$ sampel sabun dengan 200ml etanol yang baru dididihkan kemudian dimasukkan dalam Erlenmeyer tutup asah dan pasang pendingin tegak, panaskan hingga sabun larut. Potong kertas saring kemudian keringkan menggunakan oven pada suhu $(100-105)^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. Setelah itu kertas saring di dinginkan dan ditimbang hingga bobot tetap. Letakkan kertas saring diatas labu Erlenmeyer yang sudah dirangkai dengan pompa vakum. Tuang sabun yang sudah larut diatas

kertas saring. Cuci bahan yang tidak larut dengan etanol pada Erlenmeyer kemudian tuang diatas kertas saring. Cuci residu pada kertas saring dengan etanol sampai seluruhnya bebas sabun. Keringkan kertas saring dengan residu dalam oven dengan suhu (100-105)⁰C selama 3 jam, dinginkan dan timbang hingga bobot tetap (Nasional, 2021). Rumus perhitungan :

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

6. Alkali bebas

Panaskan filtrat hasil penentuan bahan tidak larut alkohol sampai hampir mendidih. Kemudian tambahkan dengan indikator fenoftalein 1%. Apabila larutan bersifat asam (fenoftalein tidak berwarna), maka titrasi dengan larutan standar KOH sampai terdapat warna merah muda stabil. Namun jika larutan tersebut bersifat alkali (fenoftalein berwarna merah), maka titrasi dengan larutan standar HCl sampai warna merah hilang (Nasional, 2021). Rumus perhitungan : Alkali bebas = $\frac{282 \times V \times N}{b} \times 100\%$

7. Kadar klorida

Larutkan (5±0,01)g sampel dengan 300ml aquades. Setelah itu tambahkan larutan Magnesium Nitrat berlebih kemudian dinginkan atau disaring. Setelah itu titrasi dengan AgNO₃ dengan indikator K₂CrO₄ sampai terbentuk warna merah bata (Nasional, 2021). Rumus perhitungan :

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

8. Lemak tidak tersabunkan

Timbang (5 ± 0,01)g sampel 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 setelah itu dikeringkan selama 5 menit dalam oven, dinginkan dan timbang hingga bobot teteap. 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 10 n-heksana. Setelah itu uapkan hasil ekstraksi dan keringkan lalu ditimbang hingga bobot tetap (Nasional, 2021). Rumus perhitungan :

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

9. Uji derajat keasaman (pH)

Timbang 1g contoh kemudian masukkan ke dalam labu ukur 1000ml. isi sebagian dengan air bebas karbon, kocok hingga larut. Tambahkan kembali air bebas karbon hingga tanda batas. Tuang secukupnya menggunakan gelas piala (Nasional, 2021).

10. Uji stabilitas busa

Ditimbang sabun sebanyak 1g kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 9ml aquades, kocok dengan vortex selama 1 menit. Ukur tinggi busa menggunakan penggaris untuk memperoleh tinggi busa awal. Untuk mengetahui stabilitas busa pada sabun dilakukan pengukuran tinggi bias 1 jam setelah busa terbentuk (nilai busa akhir). Nilai stabilitas busa yaitu 60-70% apabila didiamkan selama 5 menit (Widya Pangestika, 2021). Perhitungan stabilitas busa :

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

$$\text{Stabilitas busa} = 100\% - \text{persentase busa yang hilang} (\%)$$

3.6.7 Uji Sabun Terhadap Bakteri

1. Preparasi Sampel

Timbang masing-masing 20 gram sabun padat konsentrasi 0%, 5%, 10%, dan 15% larutkan dalam 10ml aquades (Purwati, 2023).

2. Pembuatan Suspensi Bakteri

1 ose bakteri *Salmonella typhi* dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi NaCl 0,9% sebanyak 10ml (Rizki A.S, 2021). Setelah itu dihomogenkan hingga kekeruhannya setara dengan kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 (Nuria, 2010).

3. Uji Efektivitas Bakteri

Timbang sebanyak 3,4gram media MHA kemudian dilarutkan dengan 80ml aquades. Tuang 20ml media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang akan digunakan, biarkan memadat. Kemudian ambil suspensi bakteri yang telah dibuat menggunakan cotton swab. Oleskan pada media MHA secara merata. Setelah itu kertas cakram direndam dalam sampel sabun dengan perbedaan konsentrasi. Kertas cakram juga direndam pada control positif dan control negative. Setelah itu ambil kertas cakram menggunakan pinset steril. Letakkan kertas cakram yang sudah steril pada media MHA dengan 2 kuadran. Setelah itu media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C (Zeniusa, 2019).

3.7 Pengolahan, Penyajian, dan Analisis Data

3.7.1 Pengolahan Data

Pengolahan data pada penelitian ini menggunakan metode menguraikan data dalam bentuk kalimat efektif.

3.7.2 Penyajian Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel :

Tabel 3. 3 Hasil evaluasi sabun padat

No.	Kriteria Uji	Hasil Formulasi				Keterangan
		F0	F1	F2	F3	
1.	Uji Organoleptik					
2.	Stabilitas busa					
3.	Kadar air					
4.	Alkali bebas					
5.	Kadar klorida					
6.	Lemak tak tersabunkan					
7.	Bahan tak larut etanol					
8.	Total lemak					
9.	Uji pH					

Tabel 3. 4 Hasil uji antibakteri

No.	Konsentrasi Ekstrak	Diameter Daya Hambat
1.	0%	
2.	5%	

3.	10%	
4.	15%	
5.	Kontrol positif	

3.7.3 Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis deskriptif, dimana data yang diperoleh dianalisis dengan cara mendeskripsikan atau menggambarkan tanpa bermaksud untuk membuat kesimpulan yang berlaku untuk umum.