

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan menggunakan metode secara eksperimental laboratorium dengan analisis deskriptif yaitu suatu penelitian yang dilakukan dengan percobaan untuk mengetahui pengaruh yang ada, sebagai akibat dari adanya perlakuan tertentu atau eksperimen dilakukan dengan meneliti percobaan yang dilakukan terhadap uji variabel terikat (Ratminingsih, 2010). Pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap formulasi sabun padat dengan bahan aktif *spirulina* *Sp* dan madu. Sabun dievaluasi sesuai dengan SNI serta mengetahui efektivitas terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *staphylococcus aureus*.

3.2. Waktu dan tempat penelitian

3.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober sampai Desember pada Tahun 2024

3.2.2. Tempat Penelitian

Tempat penelitian ini dilakukan di laboratorium mikrobiologi dan laboratorium farmakognosi dan fitokimia Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Malang.

3.3. Alat dan bahan

Alat :

Neraca analitik, pipet tetes, hotplat, pipet tetes, batang pengaduk, beaker glass 50 ml, beaker glass 100 ml, beaker glass 250 ml, cawan petri, oven, desikator, gelas ukur 100 ml, buret 50 ml, autoklaf, statif dan klem, pH meter, labu ukur 100 ml, labu ukur 1000 ml, waterbath, erlenmeyer tutup asah 250 ml, erlenmeyer 100 ml, erlenmeyer 250 ml, kertas saring, pendingin tegak, penggaris, ose bulat, Laminar Air Flow, incubator, lemari asam, stirer, bunsen spatula, desikator, kaca timbang, bola hisap, botol semprot, dan pipet ukur.

Bahan :

Media Nutrient Agar (NA), Media MHA, Aquades, NaCl 0,9%, Kultur bakteri, Sabun antibakteri, Obat antibiotik, salep, etanol 96%, larutan

buffer 4, larutan buffer 7, larutan buffer 10, larutan KOH 1N, indikator phenolphthalein 1%, dan Sabun *spirulina sp* dan madu dengan konsentrasi 0%, 0,10%, 0,25% dan 0,50%.

3.4. Variabel penelitian

3.4.1 Variabel Independen (Bebas)

Variabel bebas pada penelitian ini adalah formulasi sabun padat dengan variasi konsentrasi *spirulina sp* yaitu 0%, 0,10%, 0,25% dan 0,50% dan madu yaitu 0,5% untuk melihat efektivitas terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*.

3.4.2. Variabel Dependen (Terikat)

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil uji karakteristik meliputi uji fisika, kimia, dan mikrobiologi terhadap sediaan sabun padat.

3.5. Prosedur penelitian

3.5.1. Preparasi Sampel

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

3.5.2. Evaluasi sabun Padat

Evaluasi sabun padat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Pemeriksaan Organoleptik Sediaan Sabun

Pengamatan dilakukan terhadap bentuk, warna, dan aroma (Mubarak et al., 2022).

2. Uji Derajat Keasaman (pH)

Pengujian pH sabun dilakukan dengan menimbang sabun sebanyak 1 gram lalu di masukan ke dalam labu ukur 1000 ml dan di cukupkan sampai tanda batas lalu di homogenkan. Selanjutnya diukur dengan menggunakan pH meter yang sebelumnya dikalibrasi, pengujian dilakukan secara triplo. Sabun dapat memenuhi kriteria apabila memiliki pH 6,0 – 11,0 (BSN, 2021).

3. Uji Tinggi Busa

Sabun ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml aquades, Kemudian dikocok hingga terbentuk busa. Tunggu hingga 5 menit kemudian dicatat tinggi busanya, pengujian dilakukan secara triplo (Oktavia, 2021).

4. Kadar Air

Ditimbang botol timbang yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ selama 30 menit (b_0); menimbang sebanyak 5 gram contoh uji ke dalam botol timbang yang telah di oven (b_1). Panaskan dalam oven pada suhu $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$ selama 1 jam; Dinginkan dalam desikator lalu timbang kembali (b_2); Ulangi prosedur hingga mencapai bobot tetap. Pengujian dilakukan dengan 3 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)

5. Bahan Tak Larut Dalam Etanol

Kertas saring di oven pada suhu 105°C selama 30 menit, dinginkan dalam desikator dan timbang (b_0) hingga mencapai bobot tetap; menimbng 5 gram sampel (b_1), dimasukkan kedalam erlenmeyer kemudian tambahkan 200 ml etanol yang baru dipanaskan, dipanaskan 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 105⁰C selama 3 jam; dinginkan dalam desikator dan timbang (b_2); Ulangi prosedur hingga mencapai bobot tetap. Pengujian dilakukan dengan 3 replikasi (Standar Nasional Indonesia, 2021).

Rumus :

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

Keterangan :

Persyaratan mutu maksimal 10%

b_0 = bobot kertas saring (g)

b_1 = bobot sampel (g)

b_2 = bobot kertas saring + residu (g)

6. Alkali Bebas (Dihitung Sebagai NaOH/ Asam Lemak Bebas Dihitung Sebagai Asam Oleat)

Panaskan Filtrat dari penentuan bahan tak larut dalam etanol; masukkan 0,5 ml indikator pp 1%; Jika larutan tersebut bersifat asam (penunjuk fenolftalein tidak berwarna), kemudian titrasi dengan larutan standar KOH 0,1 N sampai timbul warna merah muda yang stabil; Jika larutan tersebut bersifat alkali (berwarna merah) titrasi dengan larutan standar HCl 0,1 N sampai warna merah tepat hilang; Pengujian tersebut dilakukan dengan 3 replikasi (Standar Nasional Indonesia, 2021).

Rumus :

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

Keterangan :

Persyaratan mutu maksimal 2,5%

V = KOH 0,1 N yang digunakan (ml)

N = Normalitas KOH yang digunakan

B = Berat contoh uji (g)

282 = berat setara asam oleat ($C_{18}H_{34}O_2$)

Rumus :

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

Keterangan :

Persyaratan mutu maksimal 0,1%

V = HCL yang digunakan (ml)

N = Normalitas HCL yang digunakan

B = Berat contoh uji (g)

40 = berat ekuivalen setara (NaOH)

3.5.2. Pengujian Terhadap Bakteri

1. Sterilisasi Alat Dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, sebelum digunakan disterilisasi terlebih dahulu untuk menghindari terjadinya kontaminasi bakteri dengan menggunakan oven selama 90 menit pada suhu 170°C.

2. Pembuatan media NA

Media NA ditimbang sebanyak 3,36 gram kemudian dilarutkan kedalam 120 mL aquades, dan dipanaskan di atas hot plat sambil di aduk dengan menggunakan stirer hingga mendidih. Setelah mendidih, kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3. Pembuatan Media MHA

Media MHA (Mueller Hinton Agar) ditimbang sebanyak 7,03 gram kemudian dilarutkan ke dalam 185 mL aquades, dan dipanaskan di atas hot plate sambil di aduk dengan menggunakan stirer hingga mendidih. Setelah mendidih, kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

4. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri dengan melarutkan 1 ose biakan bakteri ke dalam 10 mL NaCL 0,9% steril (Ayuditiawati et al., 2021).

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Sabun padat akan dilakukan pengujian aktivitas antibakteri *Pseudomonas Aeruginosa* dan *Staphylococcus Aureus* dengan metode difusi sumur. Bakteri uji masing-masing diinokulasikan pada media Mueller-Hinton Agar (MHA). Pada media dibuat sebanyak 4 lubang dengan diameter 0,6 cm, kemudian sampel sabun mandi padat *spirulina sp* dan madu dengan variasi konsentrasi yaitu F0 (0%), F1 (0,10%), F2 (0,25%), dan F3 (0,50%) diteteskan masing-masing 0,5 – 1 mL. Kontrol positif (Holly dan Asepso) diteteskan sebanyak 0,5 – 1 mL, di setiap lubang. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam kemudian diamati zona hambat yang terbentuk yang diinterpretasikan dengan melihat daerah bening disekitar sumuran yang menunjukkan bahwa tidak adanya pertumbuhan bakteri.

3.6. Pengolahan, Penyajian Dan Analisis Data

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 *Pseudomonas Aeruginosa* dan *Staphylococcus Aureus*.

2. Penyajian Data

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel, sebagai berikut :

2.1. Tabel hasil evaluasi sabun mandi padat SNI 3532:2021 dan uji fisik

NO	Kriteria Uji	Hasil F0	Hasil F1	Hasil F2	Hasil F3	SNI
1.	Organoleptik					
2.	Stabilitas Busa					
3.	pH 0,1%					
4.	Bahan tak larut dalam etanol					

5.	Kadar Air					
6.	Alkali/Asam Lemak Bebas					

2.2. Tabel hasil pengujian sabun *spirulina sp* dan madu sebagai antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* dan *Staphylococcus Aureus*.

No	Formulasi sabun padat <i>Spirulina Sp</i> Dan Madu	Diameter Zona Hambat
1	0%	
2	0,10%	
3	0,25%	
4	0,50%	

3. Analisis data

Data hasil pengujian aktivitas antibakteri *spirulina sp* dan madu dalam sediaan sabun padat terhadap bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* dan *Staphylococcus Aureus* secara statistic dengan one way ANOVA menggunakan SPSS. Hasil yang didapat akan berarti bila perbandingan daya hambat pada formulasi memberikan perbedaan yang nyata dan bermakna secara statistika.