

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Desain Penelitian**

Eksperimen dengan metode maserasi bertujuan mengetahui aktivitas antibakteri sabun kertas ekstrak biji pinang (*Areca catechu L*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Dilakukan juga uji karakteristik fisik sediaan sabun kertas yaitu organoleptis, pH, tinggi busa, waktu tercuci dan uji antibakteri menggunakan metode sumuran menggunakan konsentrasi 2,5% b/v, 3,5% b/v, dan 4,5% b/v.

#### **3.2 Lokasi Penelitian**

1. Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Universitas Ngudi Waluyo.
2. Determinasi tanaman dilakukan di Fakultas MIPA Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

#### **3.3 Sampel dan Teknik Sampling**

Sampel biji pinang diperoleh dengan teknik *random sampling*, yaitu dilakukan oleh peneliti diambil sampel secara acak.

### 3.4 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas adalah sabun ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) dengan konsentrasi 2,5%, 3,5%, 4,5%.
2. Variabel terikat adalah karakteristik fisik sabun dan aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* adanya zona bening sekitar sumuran dan diukur dengan menggunakan jangka sorong.
3. Variabel kontrol pada penelitian ini :
  - a. Ekstraksi menggunakan etanol 70%.
  - b. Pembuatan sabun menggunakan basis minyak VCO, KOH, Gliserin, Propilenglikol, dan Cocamide-DEA.
  - c. Jenis bakteri adalah *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.
  - d. Media MSA (*Manitol Salt Agar*) dan NB (*Nutrient Brooth*).
  - e. Suhu inkubasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* yaitu 37<sup>0</sup>C lama inkubasi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* yaitu 1x24 jam.

### 3.5 Pengumpulan Data

#### 3.5.1. Alat

Beaker glass, batang pengaduk, *waterbath*, kain kolla, tutup plastik, pot. tabung reaksi, penjepit tabung, bunsen, corong kaca, kertas saring, pipet tetes, dan gelas ukur. chamber, plat tetes, pipa kapiler, pinset, gelas ukur, corong kaca, lampu UV 254 nm, alat penyemprot bercak, penampak bercak, Mortir, stamper,

obyek glass, statif klem, kaca, kertas hvs, anak timbang, kertas saring, tempat sabun. cawan petri steril, labu takar, mikropipet, ose, tabung reaksi, erlenmeyer, bunset, incubator, pinset, jangka sorong, autoklaf, kasa, filler, *cylinder cup*.

### **3.5.2. Bahan**

Serbuk biji pinang kering, cairan penyari etanol 70%. aquadest, serbuk Mg, HCL p, HCL 1%, amyl alkohol, FeCl<sub>3</sub> 1%, formaldehid 30%, natrium asetat, eter, asam asetat anhidrat, kloroform, ammonia, NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*), VCO (Brataco), KOH 30% (Brataco), gliserin (Brataco), cocamide-DEA (Brataco), *essential oil* lavender(Young Living) dan aquadest. bakteri *Staphylococcus aureus*, bakteri *Eschericia coli* medium MSA (*Manitol Salt Agar*), medium NB (*Nutrient Brooth*), sabun Dettol (kontrol positif), larutan Mc Ferland, basis sabun (kontrol negatif).

### **3.5.3. Determinasi Tanaman**

Determinasi dilakukan di Fakultas MIPA Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

Determinasi bertujuan memastikan bahan yang digunakan dalam penelitian ini sesuai dan tidak terjadi kesalahan pengumpulan bahan untuk penelitian.

### **3.5.4. Pengumpulan Bahan dan Penyiapan Bahan**

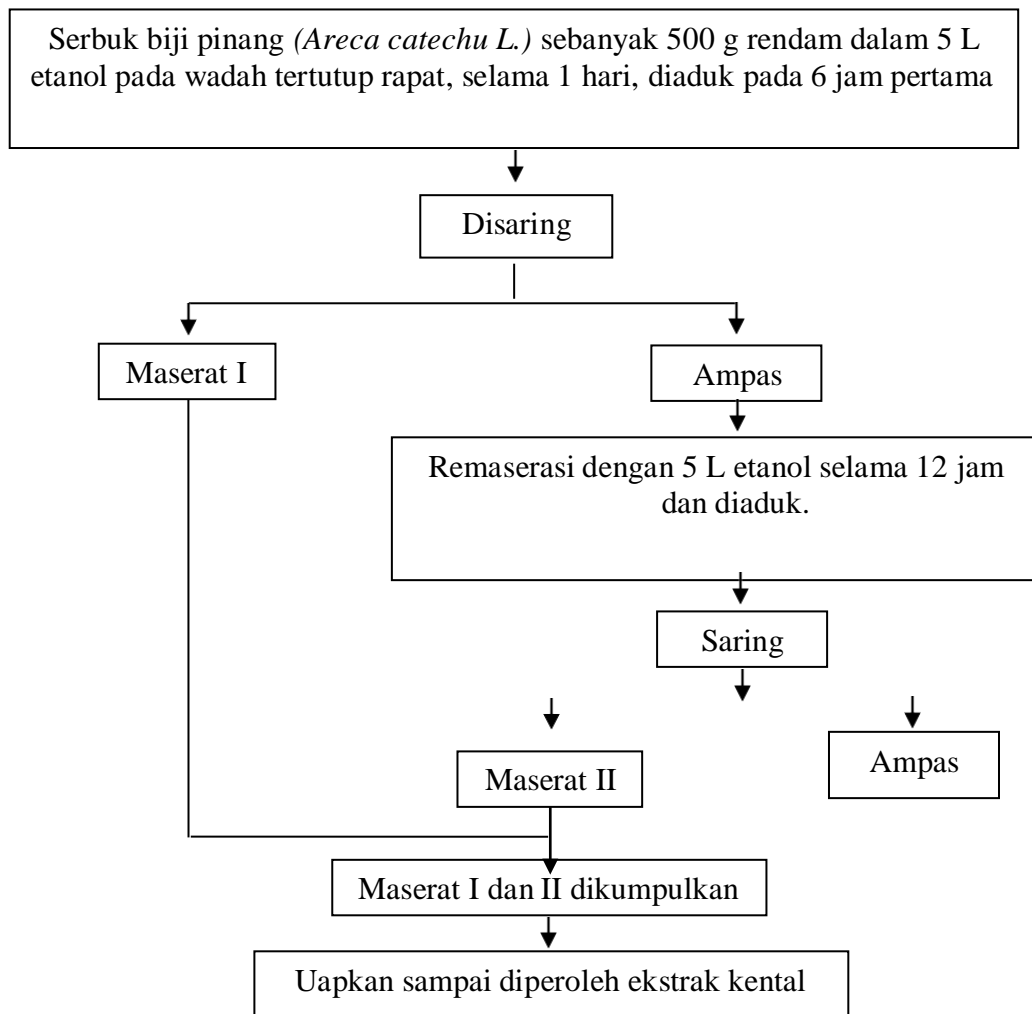
Dilakukan sortasi tanaman pinang untuk memisahkan antara kulit buah dan biji lalu dibersihkan, dikeringkan dan ditutup dengan plastik hitam agar tidak terpapar langsung dengan cahaya matahari yang akan merusak bahan aktif, lalu

disortasi kering agar yang rusak atau kotor terpisah, kemudian di haluskan menggunakan alat giling atau blender lalu diayak.

### **3.5.5. Ekstraksi Biji Pinang Dengan Cara Ekstraksi**

Dalam pembuatan ekstrak biji pinang melihat dari peneliti sebelumnya (Handayani, 2016) dengan cara mengupas buah pinang kemudian bijinya diambil, lalu dilakukan pembersihan, pemotongan, dan pengeringan agar kadar airnya hilang. Kemudian dilakukan penghalusan dan pengayakan menggunakan ukuran 40 mesh, timbang serbuk halus sebanyak 1:10, ekstraksi maserasi, yaitu ditimbang 500 g serbuk masukkan dalam wadah kaca dan tambahkan 5 L etanol 70% ditutup rapat dan simpan di tempat tanpa cahaya matahari. Diamkan 24 jam, pada 6 jam pertama sesekali diaduk. Kemudian disaring, ampasnya kembali ditambah etanol sebanyak 5 L diamkan 12 jam kembali disaring. Hasil digabungkan, lalu diuapkan dengan penangas air hingga diperoleh ekstraksi kental biji pinang. Ekstrak kental yang didapat lalu ditimbang untuk menghitung randemen (Kurniawati dkk., 2021).

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$



**Gambar 6. Pembuatan Ekstrak Biji Pinang**

### 3.5.6. Uji Bebas Etanol

Ekstrak ditambahkan 2 ml  $K_2Cr_2O_7$  dan 5 tetes  $H_2SO_4$  kedalam ekstrak biji pinang jika terbentuk warna dari jingga ke hijau biruan menunjukkan adanya kandungan etanol pada ekstrak (Jamaliah, 2011).

### 3.5.7. Uji Pendahuluan Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu L.*)

#### 1. Identifikasi Flavonoid

Sampel sebanyak 2 g dengan 5 ml etanol dimasukkan dalam tabung reaksi. Panaskan campuran 5 menit, lalu tambahkan beberapa tetes HCl p dan serbuk Mg sebanyak 0,2 g. Hasil Positif jika terjadi warna kuning/ jingga/ merah (Harborne, 1987).

#### 2. Identifikasi senyawa Alkaloid

Ditimbang sampel 2 g dimasukkan dalam tabung reaksi, tambahkan air suling dan didihkan. Kemudian dibagi dua tabung. Yang pertama ditambahkan dragendrof, jika positif akan menunjukkan terjadinya endapan merah bata. Tabung yang kedua ditambahkan mayer, jika positif akan menunjukkan terbentuknya endapan putih (Harborne, 1987).

#### 3. Identifikasi senyawa Saponin

Sampel sebanyak 2 g masukkan pada tabung reaksi tambahkan air suling. Campuran dididihkan 2-3 menit, selanjutnya didinginkan dan ditambahkan HCl 1% lalu dikocok. Saponin positif jika terbentuknya buih yang stabil (Madduluri, 2013)

#### 4. Identifikasi senyawa Tanin

Sampel sebanyak 2 g ditambahkan etanol, kemudian larutan dibagi menjadi dua bagian. Tabung pertama tambah 2-3 tetes FeCl<sub>3</sub> 1%. Ditunjukkan hasil positif terbentuknya warna hitam kebiruan atau hijau (Depkes RI, 1986). Tabung kedua ditambahkan gelatin dan NaCl, jika terdapat endapan putih berarti adanya tanin galat (Mangunwardoyo dkk., 2009).

### 3.5.8. Formula

Setelah dilakukan uji bebas etanol dan uji pendahuluan. Kemudian untuk melanjutkan penelitian ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) diformulasikan menjadi sabun mengacu penelitian (Widyasanti, 2017)

Disajikan pada tabel 1.

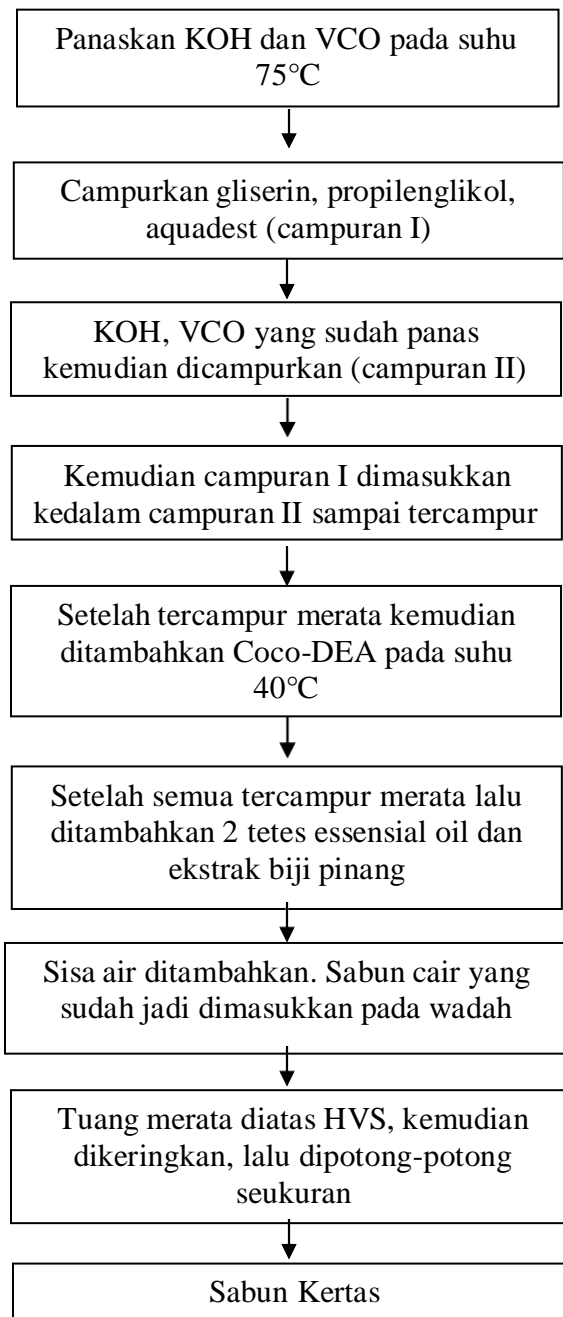
**Tabel 1. Formulasi Sediaan Sabun Kertas Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu L.*)**

Bahan	Formula				Fungsi
	Kontrol (Basis)	I 2,5%	II 3,5%	III 4,5%	
Ekstrak Biji Pinang (g)	0	5	7	9	Bahan Aktif
Minyak VCO (g)	50	50	50	50	Surfaktan
KOH (g)	35	35	35	35	<i>Saponification agent</i>
Gliserin (g)	6,83	6,83	6,83	6,83	Humektan
Propilenglikol (g)	15	15	15	15	Humektan
Cocamide-DEA (g)	3,64	3,64	3,64	3,64	Surfaktan
Essential Oil (g)	0,2	0,2	0,2	0,2	Pewangi
Aquadest (g)	200	200	200	200	

### 3.5.9. Pembuatan Sabun Kertas Ekstak Biji Pinang

Tahap awal dengan memanaskan bahan KOH dan VCO pada suhu 75°C, setelah itu campurkan KOH dengan VCO, kemudian dimasukkan gliserin, propilenglikol dan aquadest yang telah dicampur terlebih dulu. Setelah semua tercampur kemudian Coco-DEA dimasukkan pada suhu 40°C, lalu ditambah 2 tetes essensial oil dan dimasukkan ekstrak biji pinang. Tambahkan sisa air dan sediaan sabun dimasukkan kedalam wadah. Kemudian dibuat sabun kertas dengan

cara menuang diatas kertas HVS secara merata. kemudian dikeringkan, lalu dipotong seukuran (Widyasanti, 2017)



**Gambar 7. Pembuatan Sediaan Sabun Kertas**



### 3.5.10. Uji Karakteristik Sabun

#### 1. Uji organoleptis

Dilakukan uji untuk mengatur spesifikasi salep itu meliputi : warna, bentuk, dan bau (Wenny, 2012).

#### 2. Uji pH

Dilakukan uji pH meter. 1 sabun kertas di campur ke air. Pada suhu 25°C elektroda pH meter yang sudah dibilas dicelupkan kedalam sampel. Lalu dibaca nilai pada pH meter setelah angka menjadi stabil (Verawaty, 2019).

#### 3. Tinggi busa

Diambil 1 sampel, tambahkan aquadest ad 10 mL dalam tabung reaksi, dikocok sampai berbusa, lalu dilakukan pengukuran tinggi busa dan didiamkan 5 menit, kemudian diukur kembali tinggi busa yang dihasilkan.

$$\text{Uji Tinggi Busa} = \frac{\text{Tinggi Busa Awal}}{\text{Tinggi Busa Akhir}}$$

#### 4. Uji waktu tercuci

Diambil 1 sampel usapkan pada kedua telapak tangan dengan air sedikit sampai berbusa dengan dihitung berapa lama waktu tercucu sabun kertas (SNI 2588:2017).

### 3.5.11. Pembuatan Media

#### 1. Pembuatan media MSA (*Manitol Salt Agar*)

Ditimbang 11,1 g serbuk MSA (*Manitol Salt Agar*) dalam beaker glass, tambahkan dengan 100 ml aquadest. Larutan MSA dipanaskan diatas *waterbath* sambil terus diaduk hingga larutan jernih, lalu dipindahkan ke dalam Erlenmeyer. Sterilisasi larutan menggunakan autoklaf dengan suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit (Safitri dan Novel, 2010)

#### 2. Pembuatan Media NB (*Nutrient Broth*)

Ditimbang 1,3 g serbuk NB (*Nutrient Broth*) dan dimasukkan ke beaker glass. larutkan menggunakan 100 ml aquadest aduk hingga homogen. Larutan kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit (Suryadi, 2013).

### 3.5.12. Pembuatan Suspensi Bakteri

Media NB (*Nutrient Broth*) yang sudah disterilkan dipipet 10 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Biakan murni *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* diambil 1 ose dan dimasukkan kedalam NB (*Nutrient Broth*) ditabung reaksi, digojok sampai homogen, inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 24 jam. Suspensi diukur serapannya pada panjang gelombang 625 nm disetarakan absorbansinya dengan larutan 1/2 Mc Farland.

Pembuatan larutan 1/2 Mc Farland :

- a. Pembuatan Larutan BaCl<sub>2</sub> 1%. Ditimbang 1 gram BaCl<sub>2</sub> larutkan dengan 100 ml aquadest kedalam labu ukur sampai homogen. Kemudian dipindahkan

kedalam botol yang tertutup rapat dan gelap. Penyimpanan di dalam kulkas diberi label  $BaCl_2$  pada botol.

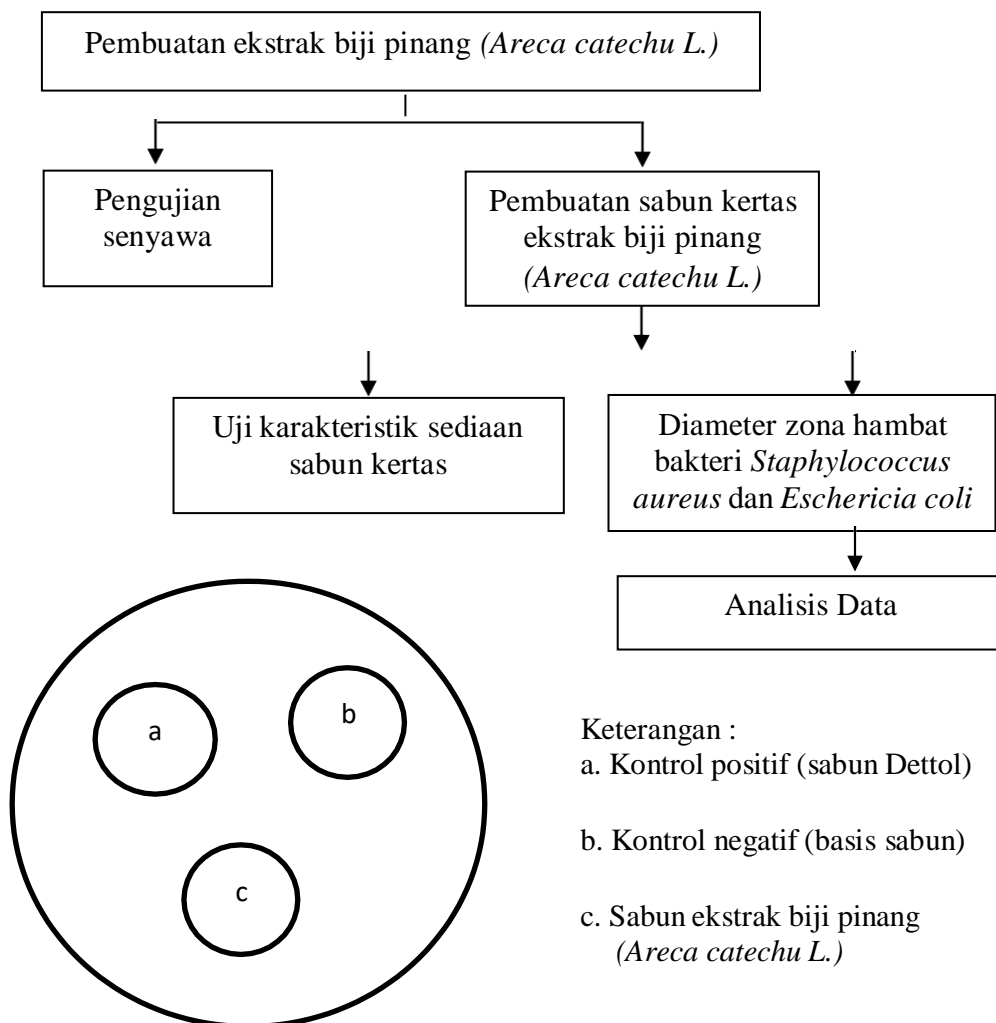
- b. Pembuatan Larutan  $H_2SO_4$  1%. Disiapkan labu ukur 100 ml berisi aquadest sebanyak 50 ml. Pipet 1,02 ml, dimasukkan kedalam labu ukur melalui dinding labu secara perlahan agar mengalir. Lalu tambahkan aquadest sampai batas labu ukur. Pindahkan larutan kedalam botol yang tertutup rapat dan gelap. Diberi label  $H_2SO_4$  dan disimpan pada suhu ruang.
- c. Pembuatan Larutan  $\frac{1}{2}$  Mc. Farland. Dipipet 0,05 ml  $BaCl_2$  1% dimasukkan ke tabung reaksi. Lalu dipipet 9,95 ml  $H_2SO_4$  1% dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi larutan  $BaCl_2$  1%. Kedua larutan di vortex sampai tercampur semua. Penyimpanan dalam kulkas (Rosmania dan Yanti, 2020).

### 3.5.13. Uji Antibakteri

*Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* ditumbuhkan dengan diambil biakan bakteri diinokulasikan pada media NB (*Nutrient Broth*) cair menginokulasi pada temperature  $37^{\circ}C$  selama 24 jam. Media MSA (*Manitol Salt Agar*) dituang 10 ml pada cawan petri lalu biarkan sampai memadat yang merupakan lapisan 1. *Cylinder cup* diletakkan diatas media yang telah memadat. Pada lapisan kedua ditambahkan 10 ml media MSA (*Manitol Salt Agar*) yang dicampur dengan 5  $\mu$ l suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* lapisan tersebut dituang di atas lapisan 1, dibiarkan memadat kemudian *cylinder cup* dicabut. Masing-masing sumuran diisi dengan sabun yang mengandung ekstrak, kontrol positif dan negatif dilakukan secara aseptis. Diinkubasi dengan temperature  $37^{\circ}C$  selama 24 jam. Kemudian zona hambat diukur sampai ketelitian 0,5 mm dengan

jangka sorong. Menurut Davis dan Stout (1971) terdapat beberapa kategori zona hambat yaitu 5 mm atau kurang dikategorikan lemah, 5-10 mm dikategorikan sedang, 10-20 mm dikategorikan kuat dan 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat.

### 3.6. Alur Penelitian



**Gambar 8. Skema Alur Penelitian**

### 3.7. Analisis Data

Analisis data diameter zona hambat bakteri menggunakan SPSS yang memiliki kepercayaan 95%. Pengujian normalitas digunakan uji *Saphiro Wilk* dikarenakan sampel yang digunakan kurang dari 50 sampel. Pengujian homogenitas digunakan uji *Levene test*. Ketika yang ditunjukkan terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan pengujian parametik anava satu arah. Apabila hasil parametik anava satu arah signifikansi  $<0,05$  yang berarti adanya perbedaan, sehingga dilakukan uji LSD. Jika hasil terdistribusi normal dan tidak homogen atau tidak terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan uji non parametik yaitu dengan uji *Kruskal Walls* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.