

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan model penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental bertujuan untuk mengamati fenomena atau efek yang ditimbulkan oleh suatu faktor atau perlakuan tertentu. Dalam konteks ini, penelitian dilakukan untuk membandingkan aktivitas antibakteri dalam minyak bunga cengkeh dengan variasi konsentrasi minyak yang digunakan, sedangkan pengujian antibakteri dilakukan melalui metode difusi cakram.

B. Lokasi Penelitian

1. Pembuatan *hand wash* yang mengandung minyak bunga cengkeh dan pengujian mutu fisik dilakukan di Laboratorium Teknologi, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.
2. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Program Studi Farmasi, Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek Penelitian

1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dengan volume sebanyak 100 mL, dari Toko Kuning, Kudus.

D. Definisi Operasional

1. Minyak bunga cengkeh yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Toko Kuning, Kabupaten Kudus, Jawa Tengah.
2. *Hand wash* antibakteri minyak bunga cengkeh merupakan sabun cuci tangan yang

diformulasikan dengan variasi konsentrasi minyak bunga cengkeh sebesar 0%, 2%, 3%, dan 4%.

3. Uji mutu fisik yang dilakukan pada sediaan *hand wash* yang meliputi uji organoleptis, pH, tinggi busa, viskositas, bobot jenis.
4. Aktivitas antibakteri pada sediaan *hand wash* minyak bunga cengkeh menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi cakram.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel independen (bebas)

Variabel bebas dalam penelitian adalah konsentrasi minyak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) yang bervariasi pada 0%, 2%, 3%, dan 4%.

2. Variabel dependen (terikat)

Variabel terikat dalam penelitian ini meliputi aktivitas antibakteri dari sediaan *hand wash* yang menggunakan minyak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) serta mutu fisik sediaan *hand wash* tersebut, yang mencakup uji organoleptis, pH, tinggi busa, bobot jenis, viskositas, dan aktivitas antibakteri.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi komposisi, konsentrasi bahan, dan metode pengujian antibakteri.

F. Pengumpulan Bahan

1. Alat dan bahan

Dalam penelitian ini, alat-alat yang digunakan meliputi aluminium foil, kertas saring, gelas beker, gelas ukur, erlenmeyer, piknometer, timbangan analitik (ohaus), inkubator, autoklaf, tabung reaksi (*iwaki*), lampu spiritus, corong pisah, cawan petri, jangka sorong, *blank disc* steril, pH meter (*Hanna*), pinset, jarum ose, wadah sabun cair, mikropipet, *laminar air flow*, pipet, batang pengaduk, dan *viscometer brookfield*.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi minyak bunga cengkeh, bakteri *Staphylococcus aureus*, etanol 96%, cocamide DEA, NaCl, *sodium lauryl sulfat*, DMDM *hydantoin*, propilenglikol, aquadest *grade II*, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, $FeCl_3$, serbuk Magnesium, HCl, aquadest steril, DMSO, H_2SO_4 , $BaCl_2$, NaCl 0,9%, media *Nutrient Agar* (NA) dan kertas cakram antibiotik amoxicillin

2. Skrining fitokimia minyak bunga cengkeh

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 10 mg sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 dan dikocok hingga tercampur merata. Campuran kemudian disaring, setiap hasil ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer dan Dragendorff. Adanya endapan putih dan endapan jingga pada masing-masing pereaksi menandakan bahwa sampel mengandung senyawa alkaloid (Suhendar & Fathurrahman, 2019).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 10 mg sampel dicampur dengan 0,05 mg serbuk Magnesium, kemudian ditambahkan 3 tetes HCl. Uji dianggap positif jika larutan berubah warna menjadi merah, kuning atau jingga (Suhendar & Fathurrahman, 2019).

c. Uji Tanin

Sebanyak 10 mg masing-masing minyak ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi $FeCl_3$ 1%. Perubahan warna menjadi coklat kehijauan atau ungu kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Suhendar & Fathurrahman, 2019).

d. Uji Saponin

Sebanyak 10 mg dari masing-masing minyak dicampur dengan 10 mL aquadest, lalu dipanaskan dalam penangas air. Larutan dikocok secara kuat hingga

terbentuk busa yang stabil, menandakan adanya kandungan saponin (Suhendar & Fathurrahman, 2019).

3. Pembuatan *hand wash* minyak bunga cengkeh

a. Rancangan formula

Formula yang digunakan dalam penelitian sediaan *hand wash* minyak bunga cengkeh mengacu pada penelitian (Sapra et al., 2021).

Tabel 3.1 Formula Sediaan *Hand Wash* Minyak Bunga Cengkeh

Bahan	Konsentrasi %				Fungsi
	F1	F2	F3	F4	
Minyak Bunga Cengkeh	0	2	3	4	Zat aktif
<i>Sodium Lauril Sulfat</i>	2,5	2,5	2,5	2,5	Surfaktan
Propilenglikol	10	10	10	10	Humektan
Asam stearat	2	2	2	2	Surfaktan
<i>Cocamide Dietanolamin</i>	5	5	5	5	<i>Foaming agent</i>
Natrium Klorida	3	3	3	3	Surfaktan
<i>Dimethylol-Dimethyl Hydantoin</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	Pengawet
Aquadest	Add 100	Add 100	Add 100	Add 100	Pelarut

Penelitian ini dibuat sediaan *hand wash* dengan konsentrasi minyak bunga cengkeh yang bervariasi yaitu 0%, 2%, 3% dan 4% dengan kontrol positif menggunakan antibiotik amoxicillin. Kontrol negatif menggunakan DMSO. Sediaan sabun cair dibuat dalam berat 100 mL, tiap formulasi dibuat menjadi 1 mL untuk dimencelupkan kertas cakram dan diberi perlakuan pada 3 cawan petri.

b. Metode Pembuatan *Hand Wash*

Pembuatan *hand wash* dilakukan dengan memodifikasi penelitian (Sapra et al., 2021). Semua bahan yang akan digunakan ditimbang terlebih dahulu sesuai dengan perhitungan bahan. Asam stearat dilelehkan diatas penangas air. *Cocamide* DEA dicampurkan *sodium lauryl sulfat*, kemudian ditambahkan propilenglikol dan

DMDM *hydantoin* sambil diaduk perlahan hingga homogen. NaCl dilarutkan dalam aquadest 10 mL. Kemudian, bahan tersebut ditambahkan ke dalam campuran sambil diaduk hingga homogen. Kemudian ditambahkan minyak bunga cengkeh sesuai dengan formula dan diaduk hingga homogen. Campuran akhir dicukupkan volumenya dengan aquadest hingga 100 mL. Sediaan selanjutnya, dilakukan uji mutu fisik dan uji aktivitas antibakteri.

4. Uji Mutu Fisik

a. Uji Organoleptis

Pengamatan organoleptis dilakukan secara visual pada sediaan yang telah dibuat meliputi warna, bentuk dan bau.

b. Uji pH

Pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter. Sebelum pemakaian, pH meter dihidupkan selama 15–30 menit untuk memastikan kestabilannya. Kemudian, pH meter dikalibrasi dengan mencelupkan ke dalam larutan buffer pH, dan proses ini dilakukan setiap kali akan melakukan pengukuran. Setelah kalibrasi, elektroda yang telah dibersihkan ke dalam sampel tanpa perlu pengenceran. Terakhir, amati nilai pH yang ditampilkan pada pH meter (Suhendar & Fathurrahman, 2019).

c. Uji Tinggi Busa

Sebanyak 1 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL aquadest. Tabung dikocok selama 2 menit, setelah itu stabilitas busa yang terbentuk diukur. Setelah didiamkan selama 5 menit, stabilitas busa diukur kembali dan hasilnya dicatat setelah observasi (Andries *et al.*, 2014). Rumus perhitungan stabilitas busa yaitu sebagai berikut :

$$\% \text{ Busa yang hilang} = \frac{H}{H_0} \times 100\%$$

Stabilitas Busa (5 menit) = $100\% - \% \text{ Busa yang hilang}$

Keterangan :

H = Tinggi busa setelah 5 menit

Ho = Tinggi busa awal

d. Uji Viskositas

Viskositas dari formulasi *hand wash*, masing-masing dengan volume yang sama yaitu 100 mL, diukur menggunakan viskometer Brookfield dengan spindle no. 3 pada kecepatan 50 rpm (Isya Syamsu et al., 2022)

e. Uji Bobot Jenis

Uji bobot jenis pada *hand wash* dilakukan menggunakan alat piknometer dengan volume 25 mL. Prosedur pengukuran ini dimulai dengan menimbang piknometer yang kosong, bersih, dan kering. Setelah itu, aquadest dimasukkan ke dalam piknometer dan ditimbang. Setelah piknometer kembali dibersihkan dan dikeringkan, sediaan *hand wash* dimasukkan ke dalam piknometer dan ditimbang untuk menentukan bobot jenisnya (Sukeksi, L., Sidabutar, A., Sitorus, 2017). Rumus yang digunakan adalah :

- Bobot air = $a - b = c$

- $V_p = \frac{c}{d} = e$

- Berat sampel = $f - b = g$

- Kerapatan sampel = $\frac{g}{e} = h$

- Berat jenis sampel = $\frac{h}{d} = i$

Keterangan :

a = Piknometer + Aquadest

b = Piknometer kosong

c = Berat Bobot Air

d = Kerapatan Air

e = Hasil Kerapatan Air (mL)

f = Piknometer + Sampel
g = Berat Sampel (gr)
h = Hasil Kerapatan Sampel (g/mL)
i = Hasil Bobot Jenis

5. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji Antibakteri menggunakan metode difusi cakram. Langkah-langkah dalam aktivitas antibakteri meliputi :

a. Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan dicuci bersih dan dikeringkan. Alat-alat gelas seperti cawan petri, gelas beker, batang pengaduk, jarum ose, erlenmeyer, dan tabung reaksi dibungkus dengan kertas dan disterilkan di oven selama pada suhu 180°C selama 1 jam.

b. Pembuatan Media

Media Nutrient Agar (NA) dibuat dengan menimbang 5 gram serbuk NA dan menambahkannya dengan 250 mL aquadest, kemudian larutan NA dilarutkan diatas penangas air agar dapat homogen. Larutan NA disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan tersebut dituang ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan memadat dalam keadaan miring di ruang LAF.

c. Peremajaan Bakteri di Agar Miring

Agar miring disiapkan untuk menumbuhkan bakteri dalam tabung reaksi yang berisi NA yang telah padat. Kultur bakteri *Staphylococcus aureus* digoreskan 1-2 ose dengan pola zig-zag dari bawah ke atas pada media agar miring. Kemudian agar miring diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24jam.

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dibuat dengan mengambil 3 ose dari bakteri *Staphylococcus*

aureus dan memasukkannya ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl fisiologi 0,9%. Tabung tersebut dikocok menggunakan vortex hingga homogen, kemudian disesuaikan dengan larutan standar MC Farland 0,5 atau setara dengan konsentrasi bakteri sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Jika kekeruhan suspensi bakteri belum sesuai, bakteri akan ditambahkan menggunakan kawat ose.

e. Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri diuji dengan menuangkan media NA ke dalam cawan petri, kemudian suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dimasukkan dengan mikropipet menggunakan metode *pour plate* (metode tuang) dan diratakan dengan memutar cawan petri mengikuti pola angka delapan. Setiap cawan petri dibagi menjadi 6 sektor dan dilabeli. *Paper disk* direndam dalam masing-masing sediaan *hand wash* dengan konsentrasi minyak bunga cengkeh (0%, 2%, 3% dan 4%), amoxicilin, dan DMSO selama 1 menit, kemudian proses ini diulang sebanyak 3 kali. Setelah itu, cawan petri ditutup, dipanaskan cawan di atas api bunsen sambil diputar untuk menjaga sterilisasi, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dengan posisi cawan petri terbalik.

G. Analisis Data

Data dari uji mutu fisik *hand wash*, termasuk uji organoleptik, pH, bobot jenis, viskositas, tinggi busa dan aktivitas antibakteri, akan diolah secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk narasi, tabel, dan grafik. Untuk uji pH, bobot jenis, kestabilan busa dan aktivitas antibakteri *hand wash* terhadap *Staphylococcus Aureus*, digunakan metode *One Way ANOVA*. ANOVA bertujuan untuk mengidentifikasi perbedaan antar kelompok uji. Jika terdapat perbedaan signifikan dari uji ANOVA, dilanjutkan dengan uji Tukey untuk menentukan perbedaan signifikan antar formula.