

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental yakni dengan membuat formulasi sediaan sampo menggunakan zat aktif bunga mawar (*Rosa damascena P. Mill*). Tahap awal dilakukan dengan membuat simplisia dari kelopak bunga mawar, kemudian kelopak tersebut direbus menggunakan air panas untuk memperoleh infusa herbal bunga mawar. Metabolit sekunder yang di uji menggunakan metode skrining fitokimia mencakup flavonoid sebagai antibakteri, dan tanin sebagai antimikroba (Pasril & Okasari, 2020)

Pembuatan sediaan sampo menggunakan konsentrasi 10, 20, dan 30%. Karakteristik fisik sediaan sampo infusa bunga mawar dianalisis melalui uji organoleptis, pH, homogenitas, viskositas dan stabilitas busa. Uji stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test* selama 14 hari yang terdiri dari 6 siklus. Analisis karakteristik fisik dilakukan pada awal dan akhir siklus uji *cycling test* (Auliah et al., 2020).

B. Lokasi penelitian

1. Uji determinasi tanaman dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistemik jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro.
2. Sediaan cair infusa dan uji skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Ngudi Waluyo.
3. Formulasi sediaan gel, uji karakteristik fisik, dan uji stabilitas fisik antibakteri di lab mikrobiologi pada sediaan sampo infusa bunga mawar (*Rosa damascena P. Mill*) dilakukan di Laboratorium Teknologi Universitas Ngudi Waluyo.

C. Subjek penelitian

1. Populasi

Sediaan sampo berbahan infusa bunga mawar yang dapat di formulasikan (*Rosa damascena P. Mill*) dan di peroleh di wilayah bandungan .

2. Sampel

Sediaan sampo bunga mawar dengan variasi konsentrasi 10,20, dan 30% serta aktivitas uji antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

D. Definisi operasional

| Variabel | Definisi operasional | Indikator | Skala pengukuran | Alat ukur |
|---|---|--|---|---|
| Simplisia bunga mawar (<i>Rosa damascena P. Mill</i>) | Bunga mawar segar yang telah dipanen dari kebun. | Warna, bau, bentuk, | Nominal (identitas bentuk, warna, bau), | Lembar observasi organoleptik dantimbangan analitik. |
| Infusa bunga mawar | Larutan hasil penyarian simplisia kelopak bunga mawar dengan metode infusa menggunakan pelarut air panas bersuhu $\pm 90^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit | Warna, bau, rasa, rendemen ekstrak. | Nominal (warna, bau, rasa), Rasio (rendemen). | Lembar observasi organoleptik , gelas ukur, timbangan analitik. |
| Konsentrasi infusa bunga mawar dalam sediaan | Persentase infusa bunga mawar yang ditambahkan ke dalam formula sediaan sampo, dinyatakan | Konsentrasi infusa dalam formula (10, 20, 30%) | Rasio | Timbangan, gelas ukur |

| dalam % b/b. | | | | | |
|-------------------------------|---|--|---|---|--|
| Karakteristik fisik sampo | Uji fisik yang mencakup organoleptis, ph, homogenitas, viskositas ,uji stabilitas busa yang mengacu pada standar kosmetika. | Warna, bau, rasa, homogenitas , viskositas,uji stabilitas busa | pH skala ordinal (1-5) | (angka) ordinal | Alat uji ph, alat uji viskositas, alat uji homogenitas |
| Stabilitas fisik sampo | Kemampuan sediaan sampo mempertahankan karakteristk fisik selama penyimpanan tertentu, diuji melalui <i>cycling test</i> | Perubahan fisik gel (warna, bau, tekstur) selama penyimpanan | Skala ordinal (1-5), kategori (warna, bau, tekstur) | Chamber suhu, alat observasi visual | |
| Uji antibakteri sediaan sampo | Uji dengan metode difusi cakram dan diinkubasi selama 16-24 jam | Diameter hambat (mm) | Rasio | Cawan petri, media MHA, jangka sorong, mikropipet, inkubator. | |

E. Variabel penelitian

Variabel dalam penelitian ini di bagi menjadi tiga bagian yaitu:

1. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang hadir bersamaan dengan variabel lain dan berperan dalam memengaruhi atau menyebabkan terjadinya perubahan pada variabel tersebut. Dalam penelitian ini, variabel bebasnya adalah sediaan sampo infusa bunga mawar dengan variasi konsentrasi 10, 20 dan 30%.

2. Variabel tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang mengalami perubahan sebagai akibat dari pengaruh variabel bebas. Dalam penelitian ini, variabel tergantung ada 3: Karakteristik fisik sampo (termasuk viskositas, pH, bau, warna, homogenitas, dan busa), stabilitas fisik sediaan (Meliputi perubahan warna, bau, pH, viskositas setelah penyimpanan pada suhu $\pm 90^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit), dan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (diukur dari daya hambat zona bening atau diameter hambatan zona hambat). Stabilitas fisik sediaan diuji menggunakan metode *cycling test*, uji antibakteri dengan metode difusi cakram.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang perlu dijaga atau dikendalikan agar pengaruh variabel bebas terhadap variabel tergantung dapat diamati secara akurat. Dalam penelitian ini, variabel yang dikendalikan meliputi formulasi basis sampo, metode, suhu, dan waktu pengamatan dan kontaminasi bakteri uji serta volume, jenis media kultur, suhu inkubasi, dan waktu penyimpanan sediaan sampo.

F. Pengumpulan Data

1. Alat Dan Bahan

a. Alat

Alat pH meter (*ohaus*), timbangan analitik (*ohaus px 224 E*), viskometer (*brookfield DV2T*), rak tabung, tabung reaksi (*iwaki*), sendok tanduk, batang pengaduk (*iwaki*), spatula, cawan porselin (*ika*),

mortir dan stamper (*iwaki*), sudip, corong kaca 90mm (*pyrex*), jangka sorong (*vernier calipers*), pipet tetes, aluminium foil, wadah gel, label, kompor listrik (*maspion S300*), kertas perkamen, beaker glass 100 ml, 250 ml, dan 500 ml (*iwaki*). Gelas ukur 10 ml dan 100 ml (*iwaki*), oven, pipet ukur 1 ml, pipet ukur 5 ml, labu ukur 5 ml, pinball, cawan petri, pinset steril, incubator, *laminar air flow*, *colony counter*, *autoclaf*, difusi cakram, *ose*, api bunsen, panci infusa.

b. Bahan

Bunga mawar segar (diperoleh di wilayah bandungan). Tea tree oil, gliserin, nipagin (metil paraben), *sodium lauryl sulfate*, sodium benzoate, asam sitrat, *coconut oil* (cocamide DEA), *cocamidopropylbetane* (CPBA), etanol 70%, aquadest, bakteri *staphylococcus aureus*, *nutrient agar*, Nacl infus.

G. Prosedur penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik, Jurusan Biologi, Fakultas Sains, Universitas Diponegoro Semarang Jawa Tengah, untuk memastikan kebenaran dan keaslian dari tanaman bunga mawar (*Rosa Damascena P.Mill*).

2. Tahapan pembuatan infusa bunga mawar

Bunga mawar (*Rosa damascena P. Mill*) yang diperoleh dari daerah Bandungan, Jawa Tengah, dipetik dalam kondisi segar dengan warna merah cerah. Bunga-bunga tersebut kemudian dikumpulkan dalam satu wadah, lalu disortasi dengan memisahkan tangkai dari bunganya.

Setelah itu, bunga mawar dicuci hingga bersih menggunakan air mengalir. Selanjutnya, bunga dipipil hingga kelopaknya terpisah-pisah. Bunga mawar yang digunakan sebanyak 20gr dan aquades 200ml. Digunakan 2 panci, panci 1 berisi aquades yang nantinya akan dididihkan, panci 2 (ukuran lebih kecil dari panci 1) dengan 200ml aquades diletakkan diatas panci 1 yang nantinya akan diukur suhunya hingga $\pm 90^{\circ}\text{C}$. Kelopak bunga kemudian dimasukkan ke dalam panci 2 setelah aquades dalam panci 2 mencapai suhu $\pm 90^{\circ}\text{C}$ dan direbus selama 15 menit. Panci ditutup rapat selama perebusan agar aroma bunga tidak menguap. Setelah 15 menit, siapkan wadah bening atau toples untuk menampung air rebusan. Infusa bunga mawar disaring agar kelopak dan air terpisah. Jika tidak langsung digunakan, air rebusan disimpan di dalam lemari es atau lemari pendingin.

3. Skrining fitokimia

a. Uji flavonoid

Uji keberadaan flavonoid dilakukan dengan mengukur 2 ml infusa bunga. Setelah itu, ditambahkan serbuk magnesium dan lima tetes asam klorida (HCl) pekat. Apabila terbentuk warna merah atau jingga, maka uji menunjukkan hasil positif yang menandakan adanya senyawa flavonoid (Aljanah *et al.*, 2022).

b. Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan mengukur sebanyak 2 ml infusa bunga, dilarutkan dalam 10 ml aquades, kemudian disaring. Infusa yang dihasilkan diencerkan kembali dengan aquades hingga tidak berwarna. Setelah itu, diambil 2 ml larutan dan ditambahkan 1-2 tetes

larutan besi (III) klorida. Jika muncul warna biru atau hijau kehitaman menandakan adanya kandungan tanin (Aljanah *et al.*, 2022).

4. Formulasi gel

Formulasi sediaan gel sampo anti bakteri merupakan tahap penting dalam proses pembuatan produk, karena komposisi bahan yang digunakan akan memengaruhi karakteristik fisik, stabilitas, serta efektivitas sediaan. Pada penelitian ini, digunakan beberapa formula dengan variasi konsentrasi infusa bunga mawar (*Rosa Damascena P. Mill*) sebagai zat aktif utama, yaitu sebesar 10, 20, dan 30%, yang masing-masing ditandai sebagai F1, FII, dan FIII. Berikut formulasi sediaan gel (sampo) anti bakteri infusa bunga mawar (*Rosa Damascena P. Mill*) yang disajikan pada tabel 3.1.

Tabel 3. 1 Formulasi sediaan sampo anti bakteri infusa bunga mawar (*Rosa Damascena P. Mill*)

| Nama bahan | F0 (%) | FI (%) | FII (%) | FIII (%) | Peran |
|-------------------------------------|--------|--------|---------|----------|---------------------|
| Infusa bunga mawar | - | 10 | 20 | 30 | Zat aktif |
| Tea tree oil | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | Zat alkali |
| Gliserin | 5 | 5 | 5 | 5 | Emolien |
| <i>Sodium lauryl sulfate (SLES)</i> | 10 | 10 | 10 | 10 | Deterjen anionik |
| <i>Cocamidoprphyl betaine</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | <i>Foam booster</i> |
| Cocomono DEA | 4 | 4 | 4 | 4 | Emolien |
| Nipagin | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | Pengawet |
| Natrium benzoate | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | Pengawet |
| Asam sitrat | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | Zat alkali |
| Aquadest ad | 100 | 100 | 100 | 100 | pelarut |

Ket :

K- : Basis sampo

K+ :Kloramfeniko

FI : Sediaan mengandung bunga mawar 10%

F2 : Sediaan mengandung bunga mawar 20%

F3 : Sediaan mengandung bunga mawar 30%

5. Pembuatan sampo infusa bunga mawar (*Rosa Damascena P, Mill*)

Pada pembuatan gel infusa bunga mawar sediaan sampo ini dibagi

menjadi tiga formulasi yaitu F1, FII, dan FIII dengan masing masing konsentrasi menggunakan 10, 20, dan 30. Langkah pertama yaitu menimbang semua bahan yang telah di formulasikan. Nipagin dan gliserin di larutkan secara bersamaan, setelah itu rebus air panas untuk melarutkan SLES agar tercampur dengan merata, campurkan cocamid DEA dan *cocamidopropyl betaine* secara bertahap kemudian aduk hingga homogen. Selanjutnya nipagin dan gliserin yang telah larut di tambahkan ke sediaan SLES, cocamid DEA dan *cocamidopropyl betaine* yang telah di campur dengan homogen. Ditambahkan Infusa bunga mawar, kemudian di tambahkan dengan dispersi, diaduk hingga homogen. Sisa aquadest ditambahkan ke dalam sediaan lalu diaduk hingga homogen (Nafisah *et al.*, 2023).

6. Karakteristik Fisik

a. Uji organoleptis

Pengujian organoleptis dilakukan dengan cara mengamati karakteristik fisik sediaan gel. Karakteristik yang diamati meliputi tekstur, warna, aroma, dan bentuk. Selain itu, bentuk gel diamati saat di aplikasikan pada kulit (Hidayati *et al.*, 2021).

b. Uji pH

Sebanyak 2 gram sediaan dilarutkan dalam aquadest. Kemudian pH-nya diukur menggunakan pH meter. Setelah pH meter dibiarkan beberapa saat, nilai pH dicatat (Permata Wijaya *et al.*, 2021).

c. Uji Homogenitas

Analisis homogenitas gel dilakukan dengan melihat tekstur

dari sediaan. Pengamatan dilakukan untuk melihat adanya partikel padat atau gumpalan. Sediaan gel dikatakan homogen apabila tidak mengandung partikel padat dan tidak menunjukkan adanya gumpalan gel (Permata Wijaya *et al.*, 2021).

d. Uji viskositas

Uji viskositas sampo gel infusa bunga mawar dilakukan menggunakan *Viskometer Brookfield*. Sebanyak 200 mL sampo dimasukkan ke dalam beaker gelas, kemudian spindle dipasang dan diturunkan hingga mencapai tanda batas. Viskositas sampo diukur dengan kecepatan spindle sebesar 20 rpm (Permata Wijaya *et al.*, 2021).

e. Uji stabilitas busa

Sebanyak 2 gram di larutkan dalam 10 ml. Kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dan di kocok. Pengamatan di lakukan dengan mengukur volume busa selama 1 menit (Lestari *et al.*, 2021).

7. Stabilitas fisik

Uji stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test* selama 14 hari yang terdiri dari 6 siklus. Sediaan sampo disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke suhu 40°C selama 24 jam, proses tersebut dihitung sebagai 1 siklus. Analisis dilakukan pada awal dan akhir siklus (Azzahra & Qatrunnada, 2023).

8. Uji antibakteri

Sebelum dilakukan uji antibakteri, bakteri uji perlu diregenerasi

terlebih dahulu. Proses ini diawali dengan pembuatan biakan agar miring, yaitu dengan menggoreskan masing-masing satu ose biakan *Staphylococcus aureus* ke media agar miring baru, kemudian diinokulasi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembuatan media agar dilakukan dengan melarutkan 6 gram nutrient agar ke dalam 200 ml aquadest dalam erlenmeyer. Campuran tersebut dipanaskan di atas *hot plate* hingga homogen dan mendidih selama kurang lebih 40 menit. Selanjutnya, media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi, media didinginkan hingga mencapai suhu 45°C sebelum dituangkan sebanyak 20 ml ke dalam masing-masing cawan petri. Media nutrient agar yang telah dituangkan kemudian dibiarkan hingga mengeras (Pelealu *et al.*, 2021).

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram (*disc diffusion*) dengan kertas cakram. Infusa yang digunakan memiliki konsentrasi 10, 20, dan 30%, sementara kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif (K⁺) aquadest sebagai kontrol negatif (K⁻). Uji yang dilakukan pada empat cawan petri yang masing-masing mendapatkan empat perlakuan sebelum digunakan, cawan petri yang telah disterilkan dipanaskan di bagian pinggirnya menggunakan api bunsen. Sebanyak 20 ml media Nutrient Agar (NA) dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri. Selanjutnya, sebanyak 50 µL suspensi bakteri ditambahkan menggunakan mikropipet dan dioleskan secara merata ke seluruh permukaan media menggunakan ose. Setelah itu, media dibiarkan selama 1 hingga 5 menit agar suspensi bakteri dapat meresap ke dalam nutrient agar. Kertas cakram ditempatkan di atas permukaan media Nutrient Agar. Cakram kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif

dikarenakan merupakan antibiotik dengan spektrum luas yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, bahkan mematikan bakteri gram positif dan gram negatif, sedangkan aquadest steril digunakan sebagai kontrol negatif. Kemudian cawan petri diinkubasi dalam inkubator selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri ditetapkan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong (Adella, 2022).

9. Analisis data

Pada penelitian ini, data yang diperoleh di analisis secara deskriptif yaitu hasil uji karakteristik fisik awal diantaranya pengamatan organoleptis, pH, homogenitas, stabilitas busa dan viskositas. Dari hasil karakteristik fisik tersebut, dibandingkan dengan karakteristik fisik setelah dilakukan uji stabilitas fisik menggunakan metode *cycling test* dengan variasi konsentrasi dari infusa bunga mawar. Perbandingan antara kondisi awal dan akhir dari uji *cycling test* mengacu pada kriteria fisik sediaan sampo menggunakan metode Uji Paired Sample T-Test, yang meliputi parameter pH, tekstur, warna, aroma, bentuk, dan homogenitas.. data hasil uji aktivitas penghambatan bakteri pada FI – FIII dianalisis menggunakan metode One Way Anova.