

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Desain penelitian ini, termasuk dalam jenis eksperimental karena bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi ekstrak buah lerak sebagai surfaktan terhadap mutu fisik dan aktivitas antibakteri sabun padat berbasis dasar minyak sereh. Penelitian ini menggunakan pendekatan kuantitatif, dengan variabel bebas berupa konsentrasi ekstrak buah lerak sebanyak 5%, 10%, dan 15%. Sementara itu, variabel terikatnya mencakup mutu fisik sabun seperti organoleptik, pH, tinggi busa, kestabilan busa, serta efektivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### **B. Lokasi Penelitian**

##### 1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi, Laboratorium Fitokimia dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo

##### 2. Waktu penelitian ini dilakukan ± 6 bulan (Bulan Januari- Juli 2025)

#### **C. Subjek Penelitian**

Penelitian ini menggunakan sampel berupa buah lerak sebanyak 2 kg, dengan kriteria buah yang telah tua, berwarna coklat kehitaman, serta memiliki permukaan yang licin dan tampak lengkap (Fitria *et al.*, 2020).

#### **D. Defenisis Operasional**

Definisi operasional pada penelitian ini yaitu :

1. Sampel buah lerak (*Sapindus rarak* DC.) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari *market place* (Hidayah Herbal Coffee)
2. Minyak sereh sebagai bahan aktif yang diperoleh dari *ecomers* (Murni\_Minyak)
3. Konsentrasi ekstrak buah lerak (*Sapindus rarak* DC.) dalam sediaan sabun padat ditetapkan sebesar 5%, 10%, dan 15%
4. Uji aktivitas antibakteri (*Staphylococcus aureus*) pada sediaan sabun menggunakan metode difusi cakram
5. Pembuatan ekstrak menggunakan metode maserasi dan pelarutnya menggunakan etanol 96%

#### **E. Evaluasi Penelitian**

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak buah lerak (*Sapindus rarak* DC.) yang digunakan dalam formula, yaitu sebesar 5%, 10%, dan 15% yang berperan sebagai faktor yang memengaruhi variabel lain.

2. Variabel terikat merupakan hasil yang diamati dalam penelitian, yaitu mutu fisik dan aktivitas antibakteri sabun padat minyak sereh. Mutu fisik meliputi parameter organoleptik, pH, tinggi busa, dan kestabilan busa, sedangkan parameter aktivitas antibakteri diukur berdasarkan diameter zona hambat

(mm) terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* menggunakan metode difusi cakram.

### 3. Variabel terkontrol

Variabel terkontrol dalam penelitian ini meliputi suhu, lama proses, metode ekstraksi, dan volume pelarut yang digunakan selama proses ekstraksi, yang dijaga agar tidak memengaruhi hasil penelitian.

### 4. Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik (*Ohaus*), wadah untuk maserasi, aluminium foil, batang pengaduk, cetakan sabun, pH meter (*Ohaus*), sendok tanduk, cawan, kertas cakram, autoklaf (*Hirayama Meg Corp*), oven (*Binder*), inkubator (*Memmert*), Laminar air flow (*Calibrated*) cawan petri, tabung reaksi, pipet tetes, buret, *beaker glass* (*Iwaki*), gelas ukur (*Iwaki*), *Erlenmeyer* (*Herma*), pipet ukur, jarum ose, lemari pendingin (*Aquos*), kain kasa, corong kaca, kertas saring, *hand blender* (*Dealife*), *water bath*, *moisture analyzer* (*Ohaus*), cangkang sorong (*Donwori*), *fortex* (*DLAB*), Sedangkan bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain buah lerak, minyak sereh, minyak kelapa, minyak zaitun, natrium hidroksida (NaOH) (*Pro analysis*), cocamid DEA (kosmetik grade), dan aquadest (*Aqua destilata*).

### 5. Prosedur Penelitian

#### a. Pembuatan Simplisia Buah Lerak

##### 1) Pengumpulan Bahan

Buah lerak yang digunakan sebagai bahan baku ekstrak diperoleh melalui *market place*. Tahap awal yang dilakukan adalah

memisahkan bagian daging buah tersebut dipotong menjadi bagian-bagian yang lebih kecil (Fitria *et al.*, 2020).

## 2) Pembuatan ekstrak

Sebanyak 500 gram simplisia buah lerak kering (*Sapindus rarak* DC.) dimaserasi dengan merendamnya dalam 2500 mL etanol 96% menggunakan perbandingan 1:5 di dalam toples kaca. Proses ini melibatkan pengadukan 4 jam sekali selama 5 hari, sambil disimpan dalam wadah tertutup dan terlindung dari cahaya matahari. Setelah itu, larutkan disaring dan diperas untuk memperoleh maserat pertama. Ampas hasil penyaringan dimasukkan ke dalam wadah tertutup untuk dilakukan remaserasi menggunakan etanol 96% secukupnya hingga seluruh ampas terendam selama 2 hari dalam wadah tertutup. Selanjutnya, kedua maserat diuapkan menggunakan *water bath* hingga diperoleh ekstrak kental.

## 3) Uji Standarisasi Parameter Non Spesifik Pada Simplisia Dan Ekstrak

### a) Uji Kadar Air Pada Simplisia Dan Ekstrak

Pengukuran kadar air yang dikeringkan dalam oven 600°C selama 3 jam kemudian ditempatkan di desikator selama 1 jam. Setelah itu ditimbang dengan neraca sartorius. Lalu didalam cawan ditambahkan sebanyak 2 gram ekstrak buah lerak (*Sapindus rarak* DC.). Cawan yang berisi sampel ditempatkan dalam desikator selama 1 jam (Marsell *et al.*, 2021).

b) Uji Kadar Abu Pada Simplisia Dan Ekstrak

Penetapan kadar abu dilakukan dengan menggunakan cawan tahan panas yang terlebih dahulu dikeringkan di dalam tanur listrik (*Furnace*) pada suhu 600°C selama 3 jam. Setelah itu, sebanyak 2 gram sampel hasil preparasi dimasukkan ke dalam cawan tersebut. Cawan yang berisi sampel kemudian dipijar selama 3 jam. Abu yang dihasilkan selanjutnya didinginkan ke dalam desikator selama 1 jam sebelum dilakukan penimbangan (Marsell *et al.*, 2021).

c) Skrining Fitokimia Ekstrak Buah Lerak

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak tanaman, yang meliputi senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, dan saponin (Yulianti *et al.*, 2016).

1. Uji flavanoid

Sebanyak 1 gram ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,2 gram magnesium (Mg) dan 3 tetes asam klorida (HCl) ke dalam setiap pereaksi. Campuran tersebut kemudian dipanaskan selama 15 menit. Perubahan warna menjadi jingga hingga merah keunguan menandakan adanya kandungan flavonoid (Yulianti *et al.*, 2016)

## 2. Uji Alkaloid

Sebanyak 2 gram ekstrak sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dicampurkan dengan 5 mL kloroform dan 5 mL amonia. Campuran tersebut dipanaskan, dikocok, dan disaring. Kemudian, masing-masing filtrat ditambahkan 5 tetes asam sulfat, dikocok kembali, dan didiamkan. Selanjutnya, setiap tabung diberi pereaksi yang berbeda. Penambahan pereaksi Mayer menunjukkan hasil positif terhadap alkaloid apabila terbentuk endapan berwarna putih. Sementara itu, jika menggunakan pereaksi Wagner, pembentukan endapan coklat menandakan adanya alkaloid. Sedangkan dengan pereaksi Dragendorff, terbentuknya endapan jingga juga menunjukkan adanya kandungan alkaloid (Yulianti *et al.*, 2016)

## 3. Uji Tanin

Sebanyak 1 gram ekstrak sampel di masukkan ke dalam tabung reaksi 1 dan 2. Pada tabung 1, ditambahkan 2-3 tetes larutan  $FeCl_3$ . Reaksi positif ditandai dengan munculnya warna biru tua atau hitam kehijauan. Sementara itu, pada tabung 2 ditambahkan beberapa tetes larutan gelatin 2%. Adanya endapan putih menunjukkan hasil positif (Yulianti *et al.*, 2016)

#### 4. Uji Saponin

Sebanyak 1 gram ekstrak sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL aquadest dan dikocok kuat selama 10 detik. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih setinggi 1-10 cm yang stabil selama 10 menit. Setelah ditambahkan 1 tetes HCl 2 N, busa yang tidak menghilang menandakan hasil positif (Yulianti *et al.*, 2016)

#### b. Formula Sabun Padat Minyak Sereh

Formula sabun padat minyak sereh yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil modifikasi dari penelitian yang telah dilakukan oleh (Nurrosyidah *et al.*, 2023) dan (Betna *et al.*, 2020), dengan penyesuaian konsentrasi bahan aktif untuk memperoleh hasil yang optimal. Komposisi lengkap dari masing-masing formula sabun padat minyak sereh yang digunakan dalam penelitian ini dapat di lihat pada Tabel 3.1.

**Tabel 3.1 Formula Sabun Padat Minyak Sereh**

<b>Bahan</b>	<b>Formula (%)</b>		
	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
Ekstrak buah lerak	5	10	15
Minyak sereh wangi	5	5	5
Minyak kelapa murni	22	22	22
Minyak zaitun	15	15	15
NaOH	8,9	8,9	8,9
Cocomid DEA	0,1	0,1	0,1
Pewarna	0,2	0,2	0,2
Aquadest ad	100	100	100

Sumber (Nurrosyidah *et al.*, 2023) dan (Betna *et al.*, 2020)

c. Cara Pembuatan

Pembuatan sabun padat dimulai dengan melarutkan 8,9 gram NaOH ke dalam aquadest untuk membentuk campuran pertama. Selanjutnya, fase minyak disiapkan dengan mencampurkan minyak kepala, minyak zaitun, dan minyak serih ke dalam *beaker glass* 250 mL, kemudian diaduk hingga merata dan homogen menggunakan homogenizer (campuran kedua). Setelah itu, campuran pertama dicampurkan dengan cocamid DEA, lalu diaduk hingga tercampur merata sebelum dimasukkan ke dalam campuran kedua. Campuran ini kemudian diaduk kembali menggunakan homogenizer hingga terbentuk campuran ketiga yang homogen. Ekstrak buah lerak kemudian ditambahkan ke dalam campuran tersebut dengan konsentrasi masing-masing sebesar 5% (F1), 10% (F2), dan 15% (F3), lalu diaduk hingga homogen. Tahap akhir, pewarna yang telah dilarutkan dalam aquadest ditambahkan ke dalam campuran, di aduk hingga merata, lalu dituangkan ke dalam cetakan sabun dan didiamkan selama 24 jam hingga mengeras (Amelia *et al.*, 2021).

d. Evaluasi sediaan sabun padat ekstrak buah lerak

1) Uji organoleptik

Uji organoleptik ini meliputi bentuk, warna, dan aroma dari sabun yang telah dibuat (Tati *et al.*, 2024).

## 2) Uji pH

Pengujian yang dilakukan sebanyak tiga kali dengan cara melarutkan 1 gram sabun ke dalam 10 mL aquadest di dalam *beaker glass*. Elektroda pH meter yang sebelumnya telah dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 4,0; 7,0; 9,0, kemudian dicelupkan ke dalam larutan sampel untuk mengukur nilai pH yang stabil (Amelia *et al.*, 2021).

## 3) Uji Tinggi Busa

Pengujian tinggi busa dilakukan dengan mengambil 1 gram sabun, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 10 mL aquadest. Larutan tersebut dikocok selama 1 menit hingga terbentuk busa. Selanjutnya, tinggi busa yang dihasilkan diukur menggunakan penggaris (Tati *et al.*, 2024).

## 4) Stabilitas Busa

Sebanyak 1 gram sabun dimasukkan ke dalam gelas ukur yang telah berisi 10 mL aquadest, lalu dikocok selama 30 detik. Busa yang terbentuk diukur tinggi awalnya menggunakan penggaris. Setelah didiamkan selama 5 menit, tinggi busa diukur kembali (tinggi akhir). Stabilitas busa kemudian dihitung berdasarkan persentase busa yang menghilang, kemudian stabilitas busa dihitung dengan rumus :

% Busa yang Hilang =

$$\frac{\text{Tinggi busa awal} - \text{Tinggi busa akhir}}{\text{Tinggi busa awal}} \times 100\%$$

(Choviya *et al.*, 2023)

#### 5) Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas bakteri menggunakan metode difusi cakram. Media nutrisi agar disiapkan dengan melarutkan 11 gram NA 400 mL aquadest di dalam erlenmeyer, diaduk hingga merata, dan dipanaskan di atas kompor. Setelah larut, erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil. Larutan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Setelah proses sterilisasi, biarkan media NA selama 15 menit hingga suhunya menurun. Selanjutnya jarum ose yang telah disterilkan dipakai untuk mengambil kultur bakteri. Setelah itu, bakteri dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 mL larutan NaCl 0,9% dan diinkubasi hingga kekeruhannya sesuai dengan standar McFarland No. 0,5, yang menunjukkan konsentrasi bakteri sebesar  $10^8$  CFU/mL.

Selanjutnya pengujian antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, kertas cakram ditempatkan di atas media *nutrient agar* yang telah dibagi menjadi 11 bagian, yaitu kontrol negatif basis sabun 0%, sabun dengan ekstrak 3 kali replikasi dengan konsentrasi 5%, sabun dengan ekstrak 3 kali replikasi konsentrasi 10%, 3 kali replikasi dengan konsentrasi 15% , serta sabun batang detol menjadi kontrol

positif. Setiap sampel dilarutkan dengan mencampurkan 1 gram sampel ke dalam 10 mL aquadest. Selanjutnya, dilarutkan *Nutrient Agar* sesuai dengan pembagian konsentrasi. Media *Nutrien Agar*, kertas cakram dan alat-alat yang akan digunakan di simpan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah proses inkubasi, dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri uji serta pengukuran diameter zona hambat. Pengukuran dilakukan menggunakan jangka sorong dengan mengamati area bening yang terbentuk di sekitar cakram yang telah diberi larutan uji (Putra *et al.*, 2024).

#### **F. Analisis Data**

Data diameter zona hambat dianalisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan efektivitas antibakteri dengan menggunakan program SPSS. Uji normalisasi dilakukan menggunakan metode Kolmogorov-Smirnov, sedangkan uji homogenitas variasi menggunakan uji, Levene. Apabila data menunjukkan distribusi normal dan variasi yang homogen ( $p > 0,05$ ), maka dilanjutkan dengan uji Analysis of Variance (ANOVA). Jika hasil Anova menunjukkan adanya perbendaan yang signifikan antar perlakuan ( $p < 0,05$ ), maka pengujian dilanjutkan dengan uji Duncan. Namun, apabila data tidak terdistribusi normal atau variansinya tidak homogen ( $p < 0,05$ ), maka digunakan metode analisis non-parametri yaitu uji Kursal-Wallis. Jika hasilnya menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok ( $p < 0,05$ ), maka dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney.