

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan tujuan utama untuk melihat aktivitas antibakteri sabun cair ekstrak terpurifikasi biji pinang (*Areca catechu L*) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Pada penelitian untuk uji antibakteri menggunakan metode Sumuran dengan konsentrasi 1,5%, 3%, dan 4,5% b/v.

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

1. Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biologi Universitas Ngudi Waluyo. Waktu penelitian dilaksanakan bulan November 2019.
2. Determinasi tanaman dilakukan di Fakultas MIPA Laboratorium Biologi Universitas Diponegoro Semarang.

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

Pada penelitian ini digunakan populasi dan sampel pinang (*Areca catechu L.*) yang diambil dari Desa Pringapus Kec. Ungaran Timur Kab. Semarang. Bagian yang digunakan adalah biji pinang (*Areca catechu L.*).

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang bersama variabel lain dan variabel ini dapat berubah dalam variasinya. Variabel bebas pada

penelitian ini adalah antibakteri sabun cair ekstrak terpurifikasi biji pinang (*Areca catechu L*) dengan konsentrasi 1,5%b/v, 3%b/v, 4,5%b/v.

## 2. Variabel tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang dapat berubah karena adanya variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kestabilan fisik sabun cair yang meliputi uji organoleptis, uji pH, uji daya busa, uji homogenitas, uji viskositas, dan uji adanya zona hambatan pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne* akibat pemberian formulasi antibakteri sabun cair ekstrak terpurifikasi biji pinang (*Areca catechu L*) ditandai dengan adanya daerah bening di sekeliling lubang sumuran yang pengukurannya dengan mengukur diameter hambatan, hasil pengukurannya adalah mm serta skalanya adalah rasio.

## 3. Variabel terkendali

Variabel terkendali merupakan variabel yang dapat dikendalikan atau dibuat konstan sehingga hubungan variabel bebas dan variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti.

Variabel terkendali dalam penelitian ini merupakan:

- a. Tanaman didapatkan dari tempat yang sama (biji pinang).
- b. Waktu perlakuan secara bersamaan.
- c. Media, sterilisasi alat, suhu, dan waktu inkubasi.

## E. Pengumpulan Data

### 1. Alat dan bahan

#### a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (Vertical Type Autoclave), batang pengaduk, beker gelas (Pyrex), cawan petri (pyrex/Iwaki), erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), inkubator (Ecocell MMM Group), bunsen spiritus, jarum ose, laminar air flow, pH meter (Consort), pipet tetes, spatel, sudip, tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, thermometer, obyek gelas, kertas cakram, timbangan analitik (matrik), stopwatch, jangka sorong, kain flanel, corong pisah, desikator, timbangan gram, hot plate (Fisons), spektrofotometri (Shimadzu), mikroskop, blender (Cosmos), ayakan nomor 30 mesh, kassa steril, dan rotary evaporator (Buchi R-3000), waterbath (Nesco Lab).

#### b. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain biji pinang (*Areca catechu* L), kalium dikroma (Bratachem) t, suspensi bakteri *Propionibacterium acne*, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, n-heksan, Kalium hidroksida (PT. Bratachem), sodium lauril sulfat, Gliserin (PT. Bratachem), minyak jarak (Bratachem), minyak zaitun (Bratachem), asam stearat, BHT (PT. Bratachem), HPMC (PT. Bratachem), terpurifikasi (PT. Bratachem), kapas steril, alumunium steril, aquadest, media nutien agar (Oxoid), asam asetat, butanol, ammonia, silika gel GF 254.

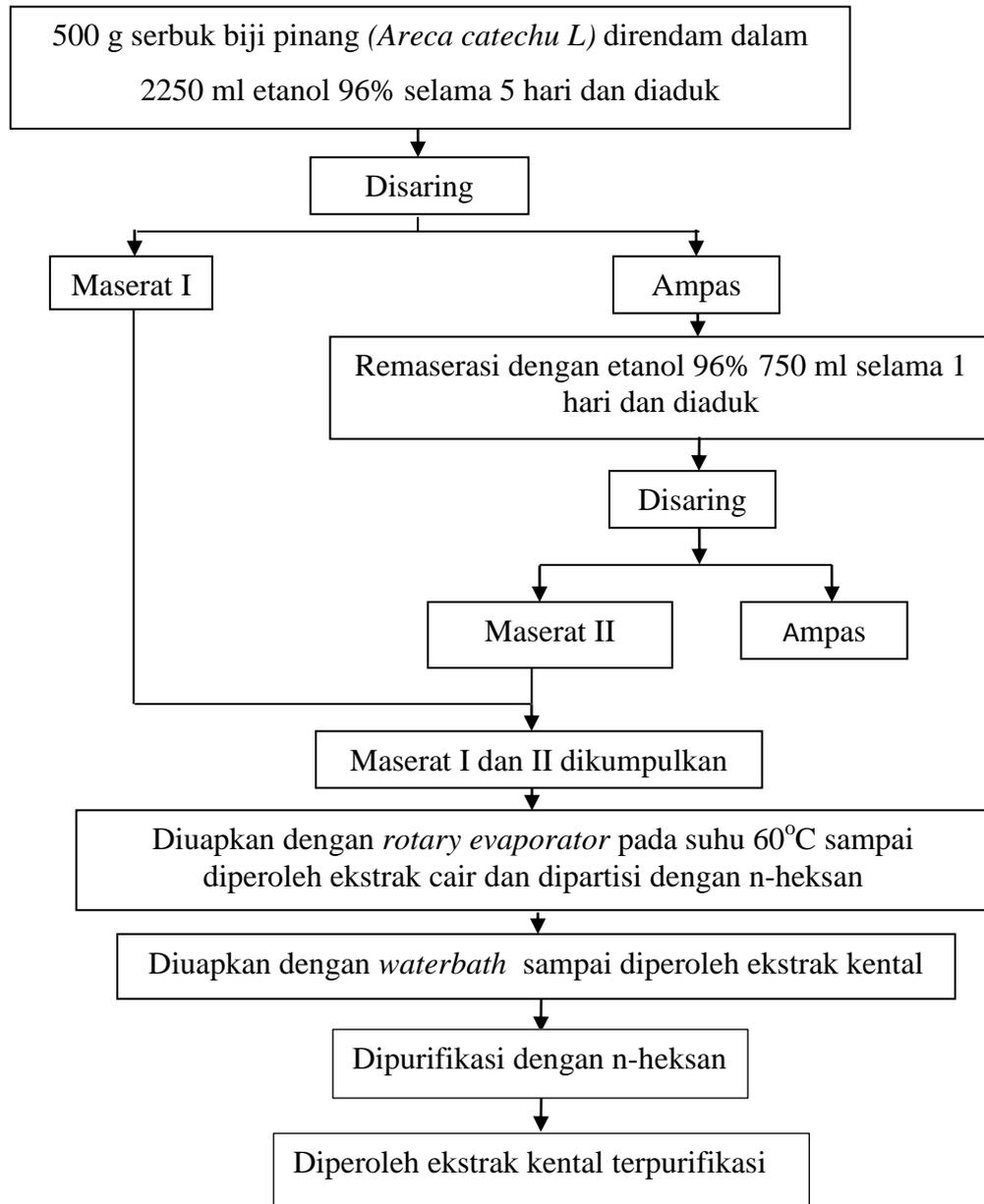
## 2. Persiapan bahan

Tanaman pinang yang segar dikumpulkan dan dilakukan sortasi dengan cara memisahkan kulit pinang dengan bijinya. Setelah itu dilakukan pengeringan. Pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari dengan ditutupi kain hitam hingga kering kemudian dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan bahan yang rusak atau kotor. Pengeringan secara tidak langsung bertujuan untuk menghindari kerusakan bahan aktif. Biji pinang yang kering kemudian diserbuk dengan cara diblender dan serbuk yang didapatkan lalu diayak.

## 3. Pembuatan Ekstrak Biji Pinang dengan Metode Maserasi

Ekstrak Biji Pinang (*Areca catechu L*) diperoleh dengan cara maserasi yaitu diambil sebanyak 500 gr serbuk Biji Pinang kemudian ditambah 2500 mL pelarut etanol 96%, kemudian direndam selama 2 hari dengan pengadukan 2 kali setiap 24 jam kemudian diremaserasi dengan etanol 1400 ml selama 1 hari, disaring dan dipisahkan ekstrak etanol 96%, kemudian di uapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 60°C. Kemudian ekstrak dikentalkan dengan waterbath pada suhu 60°C. Filtrat yang dihasilkan kemudian dipurifikasi dengan menggunakan corong pisah dengan pelarut n-heksan perbandingan 1:2 dengan digojok, lalu didiamkan hingga memisah menjadi 2 lapisan dan diambil yang bagian etanol. Kemudian ekstrak dikentalkan dengan waterbath pada suhu 60°C untuk mendapat ekstrak kental.

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$



Bagan 3.1 Skema pembuatan ekstrak biji pinang

#### 4. Skrining fitokimia

##### a. Uji kualitatif

Uji fitokimia flavonoid dilakukan dengan 0,1 Gram sampel ditambahkan etanol sampai terendam lalu dipanaskan. Filtratnya ditambahkan  $H_2SO_4$ , terbentuknya warna merah karena penambahan  $H_2SO_4$  menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Harborne, 2006).

b. Uji kuantitatif

Uji kuantitatif kadar flavonoid total dilakukan di Universitas Ngudi waluyo dengan menggunakan pembanding quersetin. Flavonoid total dinyatakan sebagai quersetin equivalen per 100 gram bahan (mg QE/100 g) (Sudarmanto I. & Suhartati T, 2015).

5. Uji bebas etanol 96% ekstrak biji pinang (*Areca catechu L*)

Ekstrak biji pinang (*Areca catechu L*) diuji bebas etanol 96% dengan menggunakan uji kualitatif yaitu ekstrak ditambahkan 2 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat, tidak adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Harbone, J.B. 2006).

## F. Pengolahan Data

### 1. Formulasi Sabun Cair

Formula yang digunakan dalam penelitian ini mengacu pada penelitian (Sari & Ferdinan, 2017).

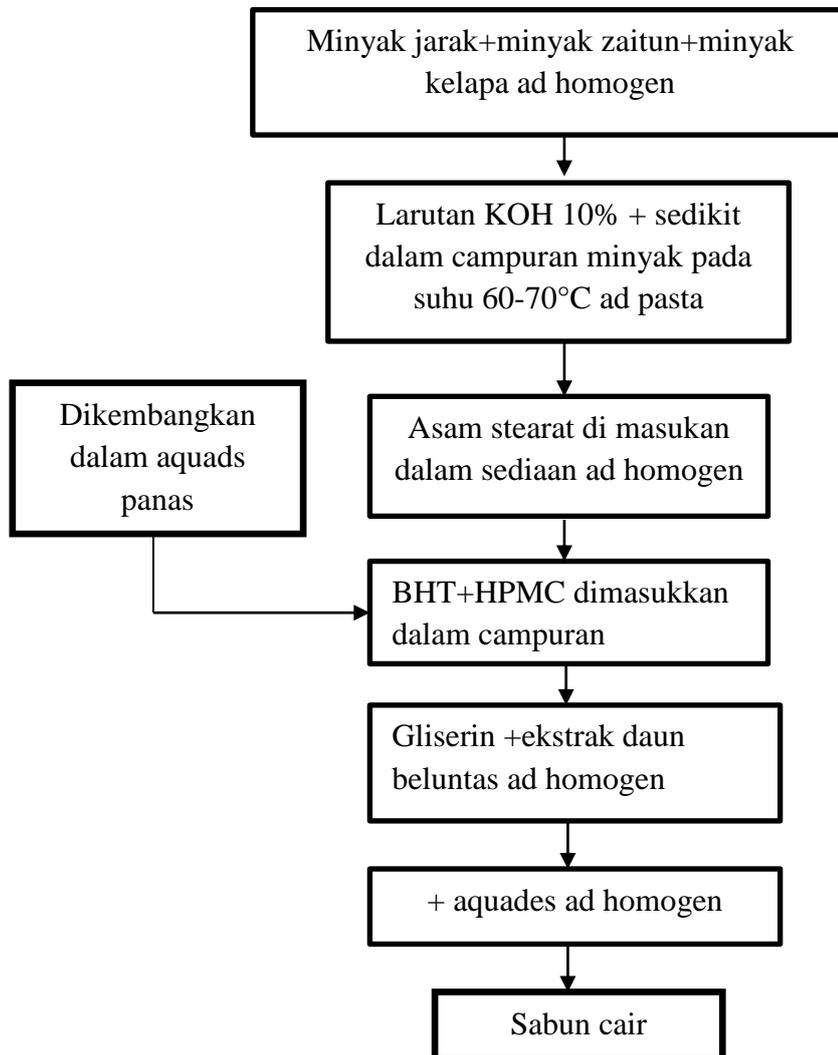
Tabel 3.1 Formulasi sabun cair ekstrak biji pinang

Bahan	Formula			Fungsi
	F1 (1%)	F2 3%)	F3 5%)	
Ekstrak biji pinang	1 g	3 g	5 g	Bahan aktif
Minyak jarak	10 g	10 g	10 g	Emolien
Larutan KOH 10%	4,5g	4,5g	4,5 g	Pengemulsi/pengental
Minyak zaitun	15 g	15 g	15 g	Pelarut/sabun transparan
Minyak kelapa	10 g	10 g	10 g	Meningkatkan kualitas busa
Gliserin	18,75 g	18,75 g	18,75 g	Emolien
Asam stearate	1,5g	1,5 g	1,5g	Pengemulsi
BHT	0,02 g	0,02 g	0,02 g	Pembentuk busa
HPMC	3 g	3 g	3 g	Surfaktan
Oleum Rosae	Qs	Qs	Qs	Pewangi
Aquadest	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100ml	Pelarut

Penelitian ini dibuat sediaan sabun cair dengan konsentrasi ekstrak biji pinang (*Areca catechu L*) yang bervariasi yaitu 1,5% b/v, 3% b/v, dan 4,5% b/v dengan kontrol positif menggunakan sabun Sereh Pompia. Kontrol negatif menggunakan formula basis sabun tanpa ekstrak biji pinang (*Areca catechu L*). Sediaan sabun cair dibuat dalam berat 100 ml, tiap formulasi dibuat menjadi 10 ml yang diteteskan dalam lubang yang telah dibuat pada media dan diberi perlakuan pada 3 cawan petri.

## **2. Pembuatan Sabun Cair**

Pembuatan sabun cair dilakukan dengan memodifikasi penelitian Sari & Ferdinan, (2017) yaitu minyak jarak dicampur dengan minyak zaitun dan minyak kelapa, diaduk perlahan hingga homogen. Larutan KOH dengan konsentrasi 10% ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam campuran minyak pada suhu 50-70°C hingga terbentuk pasta. Lalu, asam stearat, yang sebelumnya telah dilelehkan, dimasukkan dan diaduk hingga homogen. BHT dan HPMC, yang telah dikembangkan dalam akuades panas, dimasukkan ke dalam campuran. Kemudian, gliserin dan ekstrak ditambahkan ke dalam beaker glass 500 mL lalu dipanaskan di atas hot plate dengan suhu 50-70°C dengan kecepatan 125-360 rpm. Selanjutnya adonan sabun cair dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalamnya. Setelah 2-3 jam proses pengadukan, sabun mandi cair diaduk hingga semua campuran menjadi homogen. Selanjutnya, akuades ditambahkan hingga 100 ml lalu diaduk hingga homogen dan dimasukan ke dalam wadah.



Bagan 3.2. Skema pembuatan sabun cair

### 3. Evaluasi Stabilitas Sabun Cair

Evaluasi stabilitas sabun akan dilakukan selama 2 minggu dengan 3 kali pengamatan, yaitu hari 0, 7, 14, 21 dan 28.

Meliputi pemeriksaan sebagai berikut:

#### a. Uji organoleptis

Pengujian organoleptis meliputi pemeriksaan perubahan warna, bentuk dan bau dari sediaan sabun.

b. Uji pH

Pemeriksaan ini dilakukan dengan pH meter. Alat dikalibrasi terlebih dahulu dengan menggunakan larutan standar setiap akan dilakukan pengukuran yang berfungsi untuk menjaga keakuratan dalam pengukuran, yaitu pH 4,7 dan 11. Elektroda dibilas dengan air suling dan dikeringkan. Pengukuran pH sediaan ini dilakukan dengan cara: satu gram sabun dilarutkan dengan air suling panas hingga 10 mililiter. Elektroda dicelupkan dalam wadah tersebut, biarkan jarum bergerak sampai posisi konstan. Angka yang ditunjukkan oleh pH meter merupakan nilai pH sediaan tersebut. Umumnya pH sabun mandi berkisar antara 8-11 (Badan Standarisasi Nasional, 2009). Jika pH terlalu besar maka dapat menyebabkan kulit menjadi bersisik, sedangkan apabila terlalu asam maka akan terjadi iritasi kulit (Djajadisastra, 2004).

c. Uji daya busa

Uji daya busa terhadap air suling dilakukan dengan cara: sampel ditimbang sebanyak satu gram, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan aquadest sampai 10 ml, dikocok dengan membolak-balikkan tabung reaksi selama 5 detik, lalu segera diukur tinggi busa yang dihasilkan. Kemudian, tabung didiamkan selama 5 menit, kemudian diukur lagi tinggi busa yang dihasilkan setelah 5 menit. Menurut (Pradipto, 2009). Kriteria stabilitas busa yang baik

yaitu, apabila dalam 5 menit diperoleh kisaran stabilitas busa lebih dari 60% dari volume awal.

d. Uji viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan alat *Viscometer Brookfield DV2T* menggunakan spindel no 4 karena sediaan sabun cair dari formula agak kental, dan kecepatan 200 rpm dengan cara menuangkan sediaan ke dalam gelas viskometer dan nilai viskositas diketahui dengan membaca angka pada skala yang sesuai. Viskositas merupakan tahanan dari suatu cairan untuk mengalir, dimana semakin besar viskositas maka akan semakin besar pula tahananannya (Sinko P.J, 2011). Viskositas sabun cair ikut berpengaruh terhadap daya penerimaan produk terhadap konsumen, adanya viskositas sediaan yang tinggi akan mengurangi frekuensi tumbukan antar partikel sehingga sediaan menjadi lebih stabil. Satuan internasional untuk viskositas adalah pascal-second (pa.s) atau cukup dengan satuan poise (P) (Sinko P.J, 2011).

e. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah sediaan yang telah dibuat homogen atau tidak. Cara uji homogenitas dengan dioleskan sediaan sabun cair diatas plat kaca, diraba dan saat digosokkan massa sabun cair harus menunjukkan susunan homogen yaitu tidak terasa adanya bahan padat kaca (Voight ,1995).

#### 4. Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*

##### a. Sterilisasi Alat

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri disterilkan dengan autoclave pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit dan alat - alat gelas yang akan digunakan disterilkan dengan oven ,pada suhu 180-200<sup>0</sup>C selama 30 menit dan jarum ose dibakar dengan nyala bunsen (U.H,2005).

##### b. Pembuatan Medium

Untuk penanaman bakteri, diambil serbuk Nutrient agar sebanyak 9,66 gram dilarutkan dalam 420 ml air suling, kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 10-15 menit sampai terbentuk larutan utama.

##### c. Pewarnaan Gram

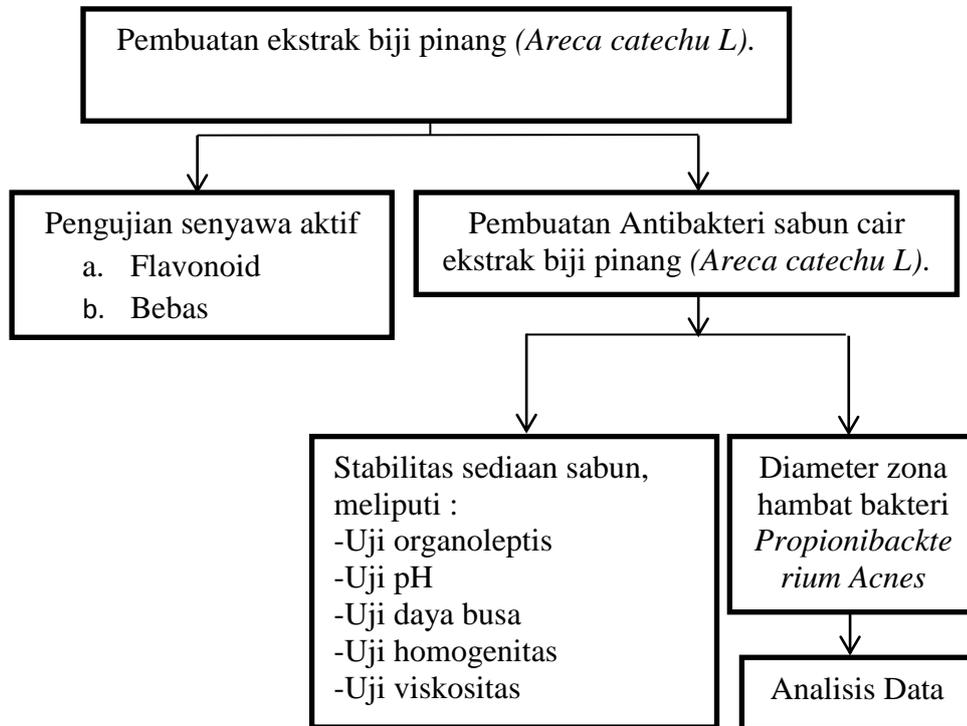
Kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan lewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, kemudian diambil bakteri dengan jarum ose secara aseptik dan oleskan pada kaca lalu di tetesi dengan ungu violet dan di biarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Bakteri tersebut ditetesi lagi dengan dengan larutan iodine dan di biarkan selama 1 menit, di cuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Selanjutnya ditetesi alkohol 95<sup>0</sup>/<sub>0</sub> selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir dianginkan dan dikeringkan dengan kertas penghisap, setelah itu dilakukan pengamatan dibawah mikroskop. Bakteri Gram positif akan

terlihat dengan warna ungu sedangkan bakteri Gram negatif akan terlihat dengan warna merah (Jawetz., Melnick., 2008).

d. Uji Daya Antibakteri Pada Sediaan Sabun

Cawan petri steril diisi media Na lalu ditunggu memadat. Setelah media padat digunakan pipet pasteur steril yang telah dimodifikasi dengan dibuat diameternya menjadi 5 mm, untuk membuat sumur pada media agar. Pada sumuran ini akan diisi tiap konsentrasi 1,5%, 3%, 4,5% yang akan diuji. Penempatan sumur pada media agar memiliki syarat tersendiri seperti, setiap sumur harus memiliki jarak yang sama, yaitu 2 cm dari tepi cawan dan jarak antar sumur yaitu 3 cm serta kedalamannya 4 mm. Setelah seluruh proses selesai, semua cawan petri tersebut dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37<sup>0</sup>C selama 18-24 jam. Zona hambat yang tampak pada setiap agar, kemudian diukur dengan menggunakan jangka sorong.

## 5. Alur Penelitian



**Bagan 3.3. Skema Alur Penelitian**

## G. Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan analisa deskriptif melalui uji stabilitas sabun selama 4 minggu yang meliputi uji organoleptis, uji pH dan uji daya busa, uji homogenitas, uji aktivitas. Pada diameter zona hambat bakteri dianalisis menggunakan SPSS 16.0 *for windows* dengan taraf kepercayaan 95%. Uji normalitas data menggunakan uji *Saphiro Wilk* karena jumlah sampel kurang dari 50 sampel. Uji homogenitas data menggunakan uji *Levene test*. Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan bahwa data yang diuji terdistribusi normal dan homogen sehingga dilanjutkan uji parametik anava satu arah. Hasil uji parametik anava satu arah memiliki nilai signifikansi  $<0,05$  artinya

terdapat perbedaan, sehingga dilanjutkan dengan uji LSD. Jika pada hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan bahwa data yang diuji terdistribusi normal dan tidak homogen atau tidak terdistribusi normal dan homogen maka dilanjutkan dengan uji non parametik yaitu dengan uji *Kruskal Walls* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.