

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental dengan tujuan utama untuk melihat aktivitas antibakteri sabun cair ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dengan metode *disc diffusion* terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

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

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang berada bersama variabel lain dan variabel ini dapat berubah dalam variasinya. Variabel bebas pada penelitian ini adalah antibakteri sabun cair ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dengan konsentrasi 1% b/v, 3% b/v, 5% b/v

2. 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 *Staphylococcus epidermidis* akibat pemberian formulasi antibakterisabun cair ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) ditandai dengan adanya daerah bening disekeliling cakram 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 terhadap variabel terikat tidak dipengaruhi oleh faktor luar yang tidak diteliti.

Variabel terkendali dalam penelitian ini meliputi :

- a. Tanaman didapatkan dari tempat yang sama (daun beluntas) di Temanggung, Provinsi Jawa Tengah.
- b. Waktu saat perlakuan dilakukan secara bersamaan.
- c. Media, sterilisasi alat, suhu dan waktu inkubasi.
- d. Kontrol positif sabun cair JF sulfure family body wash

D. Prosedur Penelitian

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, batang pengaduk, beker gelas, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, inkubator, bunsen spiritus, jarum ose, *laminar air flow*, pH meter, pipet tetes, spatel, sudip, tabung reaksi, rak tabung reaksi,

thermometer,obyek glass, kertas cakram, timbangan analitik, *stopwatch*, jangka sorong, kain flanel, stirrer, corong pisah, desikator, timbangan gram, hot plate, spektrofotometri, mikroskop, *blender*, ayakan nomor 30 mesh, kassa steril, dan *rotary evaporator*, *waterbath*.

b. Bahan

Bahan yang digunakan antara lain daun beluntas (*Pluchea indica* L.), kalium dikromat, suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*, H₂SO₄, n-heksan, Kalium hidroksida, Sodium lauril sulfat, Gliserin, Minyak jarak, minyak zaitun, Asam stearat, BHT (Butil HidroksiToluena), HPMC (Hydroxypropyl Methylcellulose), Etanol 96%, Kapas steril, aquadest, media nutrien agar (Merck®) asam asetat, butanol, ammonia, silika gel GF 254 nm, dan sabun Jf sulfurfamily *body wash* (sabun *antibakterial* yang beredar dipasaran).

2. Persiapan Bahan

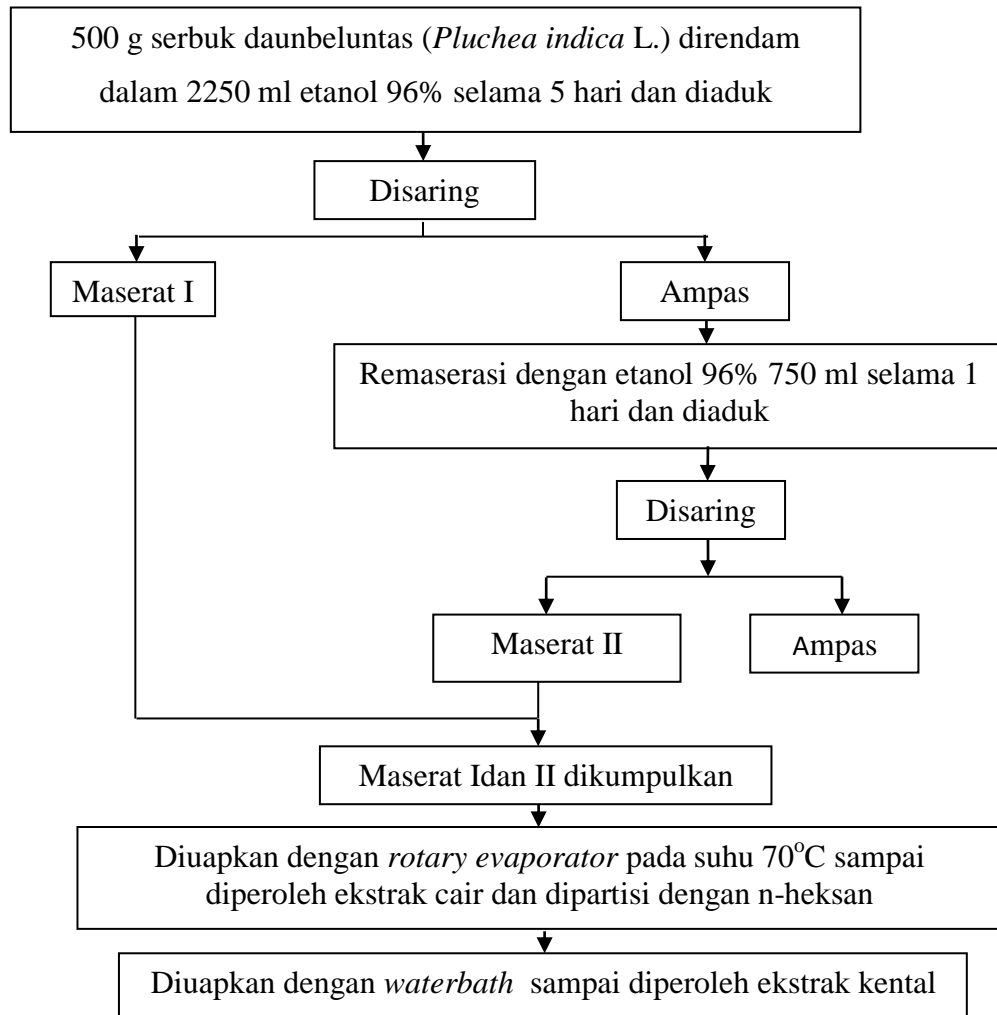
Daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Temanggung. Daun beluntas yang segar dikumpulkan dan dilakukan sortasi basah dengan cara memisahkan bahan-bahan asing seperti kerikil, dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel dengan cara dicuci di bawah air mengalir kemudian ditiriskan, lalu dipotong kecil-kecil dengan tujuan mempermudah 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. Daun beluntas yang kering kemudian diserbuk dengan cara diblender dan serbuk yang didapatkan lalu diayak.

3. Pembuatan Ekstrak Daun Beluntas dengan Metode Maserasi

Ekstrak daun beluntas diperoleh dengan cara maserasi yaitu diambil sebanyak 600 gr serbuk daun beluntas (*Pluchea indica* L.) kemudian ditambah 2500 mL pelarut etanol 96%, kemudian direndam selama 2 hari dengan pengadukan 2 kali setiap 24 jam kemudian diremaserasi dengan etanol 1400ml selama 1 hari, disaring dan dipisahkan ekstrak etanol 96%, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 70°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.

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



Gambar 3.1 Skema pembuatan ekstrak daun beluntas

4. Skrining Fitokimia

a. Uji kualitatif

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan metode KLT menggunakan fase diam silika gel GF 254 nm dan fase gerak butanol: asam asetat : air (4:1:5). Ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) ditotolkan pada fase diam kemudian dimasukkan dalam *chamber* yang berisi fase gerak yang sudah dijenuhkan. Dielusi kemudian dikeringkan dan diamati pada cahaya tampak UV 254 nm dan 366

nm. Selanjutnya plat disemprot dengan amonia, dikeringkan dan diamati kembali pada cahaya tampak UV 254 nm dan 366 nm. Hasil positif ditunjukkan dengan Rf 0,69 warna noda hijau muda, Rf 0,78 warna noda merah muda dan Rf 0,89 warna noda hijau (Koirewoa, Fatimawali, & Wiyono, 2012).

b. Uji flavonoid menggunakan uji tabung

Uji fitokimia flavonoid dilakukan dengan 0,1 Gram sampel ditambahkan metanol sampai terendam lalu dipanaskan. Filtratnya ditambahkan H₂SO₄, terbentuknya warna merah karena penambahan H₂SO₄ menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Harborne, 2006).

c. Uji kuantitatif

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

5. Uji bebas Etanol 96% Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.)

Ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) diuji bebas etanol 96% dengan menggunakan uji kualitatif yaitu ekstrak ditambahkan 2 tetes H₂SO₄ pekat dan 1 ml larutan kalium dikromat, adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan(Harbone, 2006).

E. Formulasi Sabun Cair

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

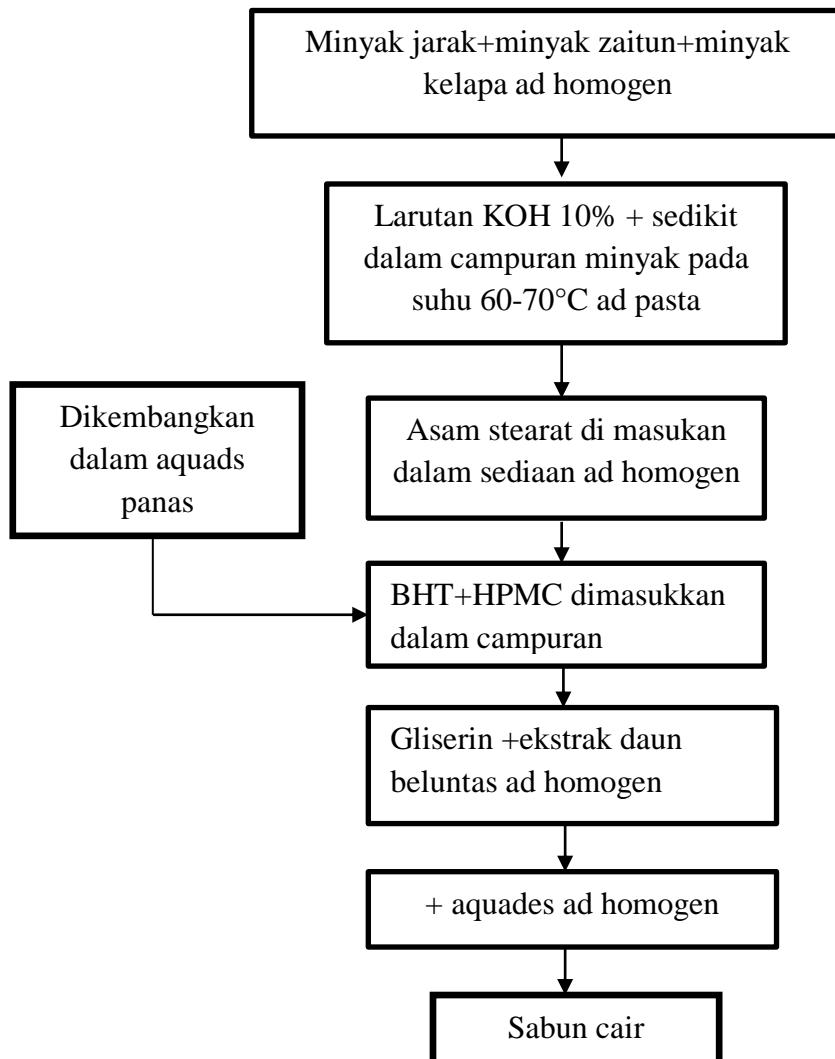
Tabel 3.1 Formulasabun cair ekstrak daun beluntas

Bahan	Formula			Fungsi
	F1 (1%)	F2 (3%)	F3 (5%)	
Ekstrak daun Beluntas	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 stearat	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 sabuncair dengan konsentrasi ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang bervariasi yaitu 1% b/v, 3% b/v, dan 5% b/v dengan kontrol positif menggunakan sabun JF sulfur *family body wash*. Kontrol negatif menggunakan formula basis sabun tanpa ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.). Sediaan sabuncair dibuat dalam berat 100 ml, tiap formulasi dibuat menjadi 10 ml yang ditetaskan dalam kertas cakram dan diberi perlakuan pada 3 cawan petri.

F. Pembuatan Sabun Cair

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 dimasukkan ke dalam wadah (Sari & Ferdinan, 2017).



Gambar3.2. Skemapembuatan sabun cair

G. Evaluasi Stabilitas Sabun Cair

Evaluasi stabilitassabun akan dilakukan selama 4 minggu, yaitu pada hari 0, hari ke-7,14,21 dan ke-28

Meliputipemeriksaansebagai berikut :

1. Uji Organoleptis

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

2. 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: 1 Gram sabun dilarutkan dengan aquades hingga 10 ml. 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 (BSN, 1996). Jika pH terlalu besar maka dapat menyebabkan kulit menjadi bersisik, sedangkan apabila terlalu asam maka akan terjadi iritasi kulit (Djajadisastra, 2004).

3. Uji Daya Busa

Uji daya busa terhadap air suling dilakukan dengan cara: sampel ditimbang sebanyak 1 Gram, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan aquadest sampai 10 ml, dikocok dengan membolak-balikan 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 waktu 5 menit diperoleh kisaran stabilitas busa lebih dari 60%.

4. Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan alat *Viscometer BrookfieldDV2T* menggunakan spindel no 4 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 tahanannya (Sinko,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. Perubahan temperatur juga dapat mempengaruhi viskositas, yang mana semakin tinggi temperatur, maka viskositas akan menurun. Satuan internasional untuk viskositas adalah *pascal-second* (pa.s) atau cukup dengan satuan poise (P) (Sinko,2011)

5. 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).

H. Uji Aktivitas Antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*

1. Sterilisasi Alat

Bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri disterilkan dengan autoclave pada suhu 121⁰C selama 15 menit dan alat-alat gelas yang akan digunakan disterilkan dengan oven, pada suhu 180-200⁰C selama 30 menit dan jarum ose dibakar dengan nyala bunsen (U.H, 2005)

2. Pembuatan Medium NA

Untuk penanaman bakteri, diambil serbuk Nutrient Agar sebanyak 20 gram dilarutkan dalam 1000 ml air suling, kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 10–15 menit sampai terbentuk larutan sempurna (Jawetz, and Melnick, 1996).

3. Pewarnaan Gram

Kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, kemudian diambil bakteri dengan jarum ose secara aseptik dan dioleskan pada kaca objek lalu ditetesi dengan ungu violet dan dibiarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Bakteri tersebut ditetesi lagi dengan larutan iodine dan dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Selanjutnya ditetesi alkohol 95% selama 30 detik dan dialiri air lalu dianginkan hingga kering kemudian ditetesi safranin 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, 2008).

4. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembiakan bakteri diambil sebanyak 1-2 ose dan disuspensikan kedalam 5 mL NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 McFarland atau sebanding dengan jumlah bakteri 10^8 (CFU)/ml. Suspensi bakteri diteteskan sebanyak 50 μ L kemudian diratakan pada media dan didiamkan selama 30 menit (Wardhani, 2012).

5. Uji Daya Antibakteri Sediaan Sabun

Medium NA sebelum digunakan dipanaskan terlebih dahulu hingga larut. Medium yang telah larut disterilisasikan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian medium yang telah steril didinginkan, lalu dituangkan sebanyak 20 mL kedalam cawan petri namun diusahakan jangan sampai memadat. Setelah itu, suspensi bakteri sebanyak 30 μ L dimasukkan dan dicampur dalam medium NA hingga homogen. Untuk pembuatan kontrol media, medium yang sudah disterilisasi didinginkan lalu dituangkan kedalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Plat agar yang dipergunakan berukuran 100 mm. Plat agar dengan ukuran 100 mm tidak boleh berisi lebih dari 5 cakram dalam setiap plat agar. Cakram yang diletakkan pada plat agar harus memiliki jarak minimal 24 mm dari masing-masing pusat cakram (Cockerill, Patel, Alder, Bradford, & Dudley, 2013). Kertas cakram ditetesi sediaan *sabun cair* ekstrak daun beluntas sebanyak 50 μ L.

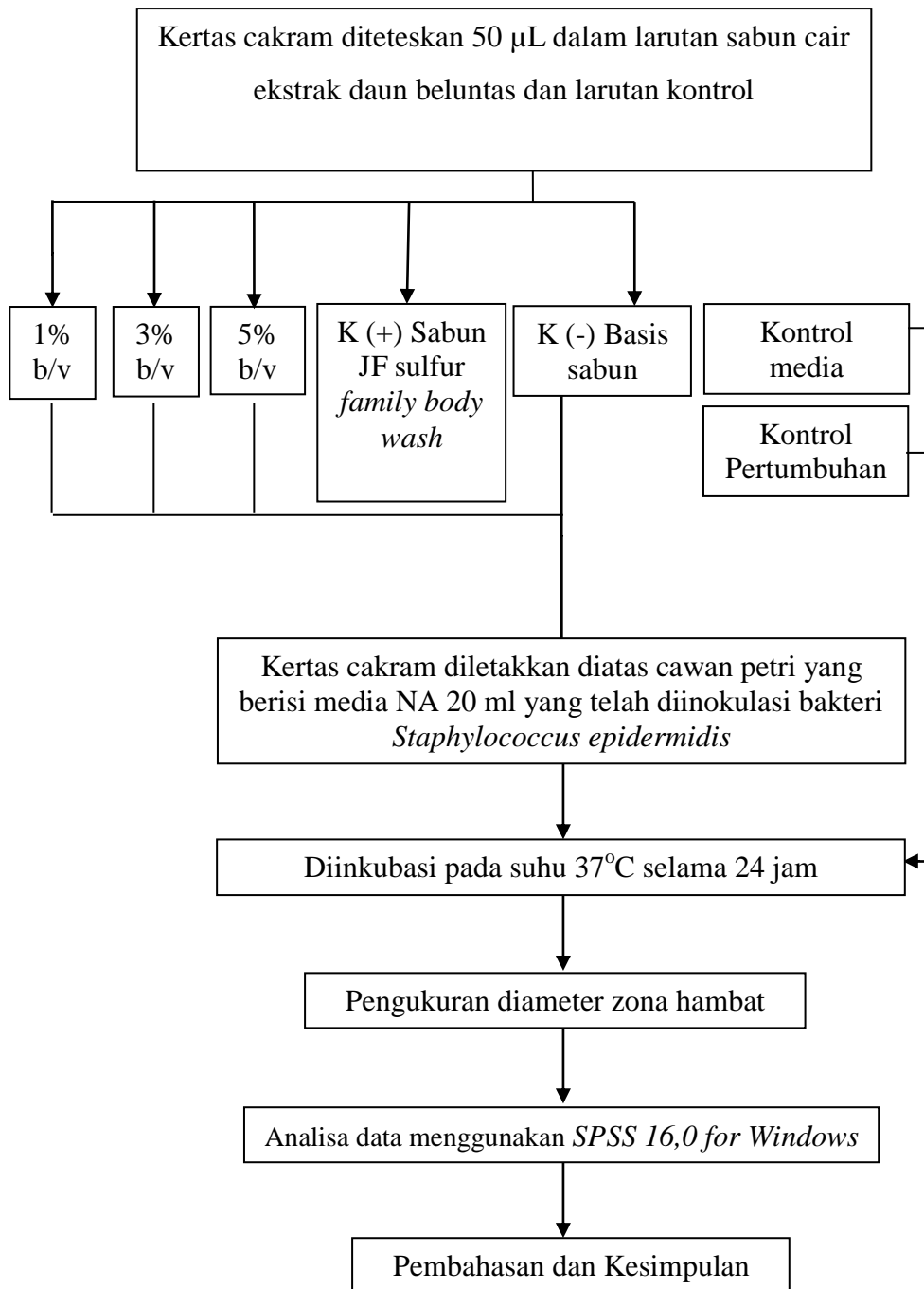
Kemudian kertas cakram diletakkan diatas media dan ditekan dengan menggunakan pipet supaya menempel sempurna. Pengulangan ini dilakukan hingga 3 kali. Setelah selesai diberi label, lalu diinkubasi secara terbalik selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil inkubasi berupa daerah bening di sekitar cakram menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri diinterpretasikan sebagai zona hambat (Brooks *et al.*, 2013)

Uji daya hambat antibakteri sabun ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dalam penelitian ini menggunakan metode difusi cakram. Media yang telah dituangi suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* diratakan sampai sedikit padat. Kemudian kertas cakram diteteskan 50 µL pada masing-masing kelompok perlakuan konsentrasi formulasi sabun cair ekstrak daun beluntas yang telah dilakukan pengenceran 1 Gram sabun cair dalam 10 ml aquadest selama 20 menit.

- a. Kelompok I : Cawan petri berisi media sebagai kontrol media.
- b. Kelompok II : Cawan petri berisi media dan bakteri *Staphylococcus Epidermidis* sebagai kontrol pertumbuhan.
- c. Kelompok III : Cawan petri berisi media dan bakteri *Staphylococcus Epidermidis* terhadap sabun JF sulfur *family body wash* sebagai pengujian kontrol positif.
- d. Kelompok IV : Cawan petri berisi media dan bakteri *Staphylococcus epidermidis* + basis sabun sebagai pengujian kontrol negatif.

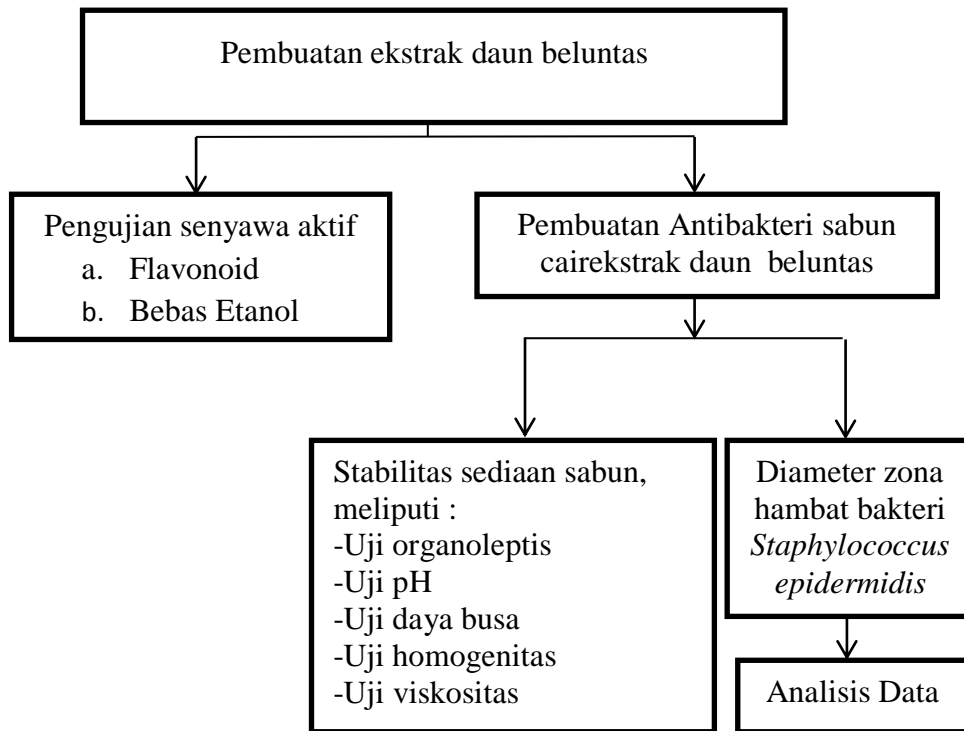
- e. Kelompok V : Cawan petri berisi media dan bakteri *Staphylococcus Epidermidis*+formulasi sabun ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dengan konsentrasi 1% b/v.
- f. Kelompok VI : Cawan petri berisi media dan bakteri *Staphylococcus Epidermidis*+ formulasi sabun ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dengan konsentrasi 3% b/v.
- g. Kelompok VII: Cawan petri berisi media dan bakteri *Staphylococcus epidermidis*+ formulasi sabun ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dengan konsentrasi 5% b/v.

Setelah itu medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan posisi terbalik. Pada tiap perlakuan dilakukan perulangan sebanyak 3 kali. Hasilnya diperoleh dengan mengukur diameter zona hambat/zona bening disekeliling kertas cakram yang menunjukkan daerah hambatan pertumbuhan bakteri. Kemudian untuk tiap konsentrasi dihitung setiap rata-rata dari hasil yang diperoleh



Gambar3.3. Skema pengujian antibakteri

I. Alur Penelitian



Gambar 3.4. Skema alur penelitian

J. 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 viskositas

Sedangkan untuk 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 normalitas digunakan untuk mengetahui apakah data yang ada terdistribusi normal atau tidak, jika nilai sigifikansinya $<0,05$ maka data tidak terdistribusi normal dan sebaliknya bilai nilai signifkansinya $>0,05$

maka terdistribusi normal. Uji homogenitas data menggunakan uji *Levene test*. Uji homogenitas untuk mengetahui apakah data diperoleh dari populasi yang sama, jika nilai signifikansinya $<0,05$ maka data berasal dari populasi yang mempunyai varian tidak sama, dan bila nilai signifikansinya $>0,05$ berarti data berasal dari populasi yang mempunyai varian sama. Berdasarkan hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan bahwa data yang diuji terdistribusi normal dan homogen sehingga dilanjutkan uji parametrik anava satu arah. Hasil uji parametrik 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 parametrik yaitu dengan uji *Kruskal Walls* dan dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*.