

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan metode eksperimental, dengan membandingkan konsentrasi jumlah ekstrak bunga telang pada sediaan sabun cair bunga telang terhadap aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus*. Analisis data menggunakan uji statistic *one way* ANOVA.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Pada penelitian ini variabel bebas yaitu penggunaan ekstrak bunga telang dengan jumlah konsentrasi yang berbeda.

4.2.2 Variabel Tergantung

Pada penelitian ini variabel tergantung yaitu diameter zona hambat aktivitas antibakteri sabun cair ekstrak bunga telang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.3 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu :

- a. Sabun cair adalah sediaan berbentuk cair yang ditujukan untuk membersihkan kulit, dibuat dari bahan dasar sabun yang ditambahkan surfaktan, pengawet, penstabil busa, pewangi dan pewarna yang diperbolehkan, dan dapat digunakan untuk mandi tanpa menimbulkan iritasi pada kulit (SNI, 2016).
- b. Sabun cair bunga telang adalah sediaan semi padat berupa sabun cair yang menggunakan surfaktan *cocamide dea* dan SLES sebagai basis serta bahan lain yang diformulasikan dengan penambahan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) sebagai bahan aktif.
- c. Uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Prodi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.

4.4.2 Waktu Penelitian

Waktu pelaksanaan penelitian ini pada bulan Agustus 2023 – Oktober 2023.

4.5 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu : Ekstrak bunga telang, Gliserin, DMDM *hydantoin*, cocamide DEA, disodium EDTA, *sodium laureth sulfate* (SLES), natrium klorida, CMC-Na, *aquadest*, sodium metabisulfit, *Mueller hinton agar*, larutan *Mc Farland*, sabun cair Detol, dan bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Steril Universitas Muhammadiyah Malang,.

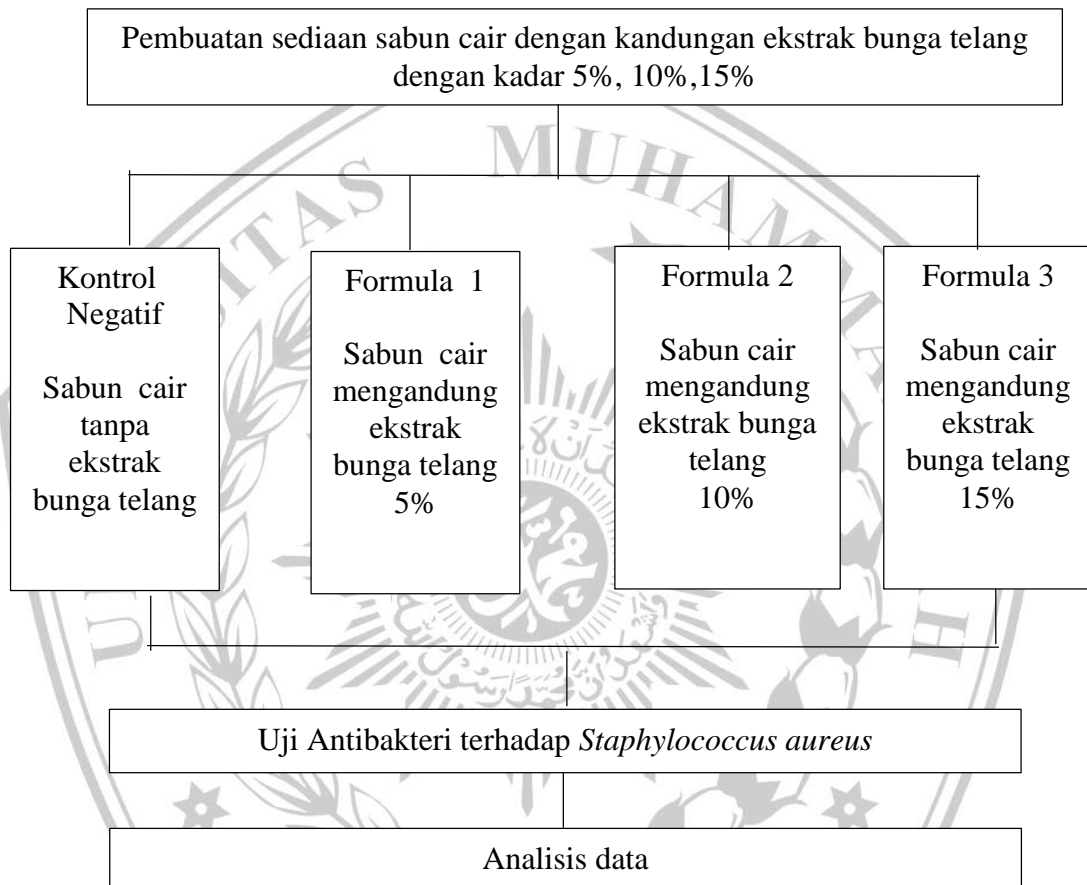
4.6 Alat

- Alat-alat yang digunakan pada penelitian sediaan sabun cair yaitu timbangan analitik, cawan Petri, piknometer, cawan porselin, gelas arloji, *handblander*, beaker glass, gelas ukur, batang pengaduk, sudip, pipet tetes, termometer, pH meter, neraca analitik digital (*metler toledo*), viscometer *brookfield*,
- Alat yang digunakan pada pengujian antibakteri yaitu *Steroglass hot plate*, timbangan analitik, kawat ose steril, tabung reaksi, erlenmeyer, corong gelas, incubator, autoklaf, cawan petri, mikro pipet, rak tabung reaksi kayu, aluminium foil, tisu, cork borer, pinset, benang kasur, gunting, label, pembakar bunsen, wadah sabun cair, lemari pendingin, laminar air flow (LAF), jangka sorong.

4.7 Metode Kerja

Pada penelitian ini diawali dengan pembuatan sediaan sabun cair ekstrak bunga telang telang (*Clitoria ternatea L.*) dengan kadar 5%, 10%, dan 15%. Terdapat 3 formula sabun antibakteri dan 1 formula sebagai

kontrol negatif. Yang akan diuji aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus*. Formula 1 (F1) mengandung ekstrak bunga telang (5%) dan formula II (F2) mengandung ekstrak bunga telang (10%), formula III (F3) mengandung ekstrak bunga telang (15%) dan formula tanpa ekstrak bunga telang (F0). Semua formula direplikasi 3 kali dan uji dilakukan replikasi 3 kali dengan volume masing-masing sediaan sebanyak 100ml.



Gambar 4.1. Skema Kerja Penelitian

4.8 Formulasi Sabun Cair

4.8.1 Formulasi Sabun Cair

Pada penelitian ini, ada tiga formula sabun cair yang mengandung ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dalam jumlah konsentrasi yang berbeda, dengan satu formula yang berfungsi sebagai kontrol negatif. Berikut tabel formula pembuatan sabun cair dengan ekstrak bunga telang sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* :

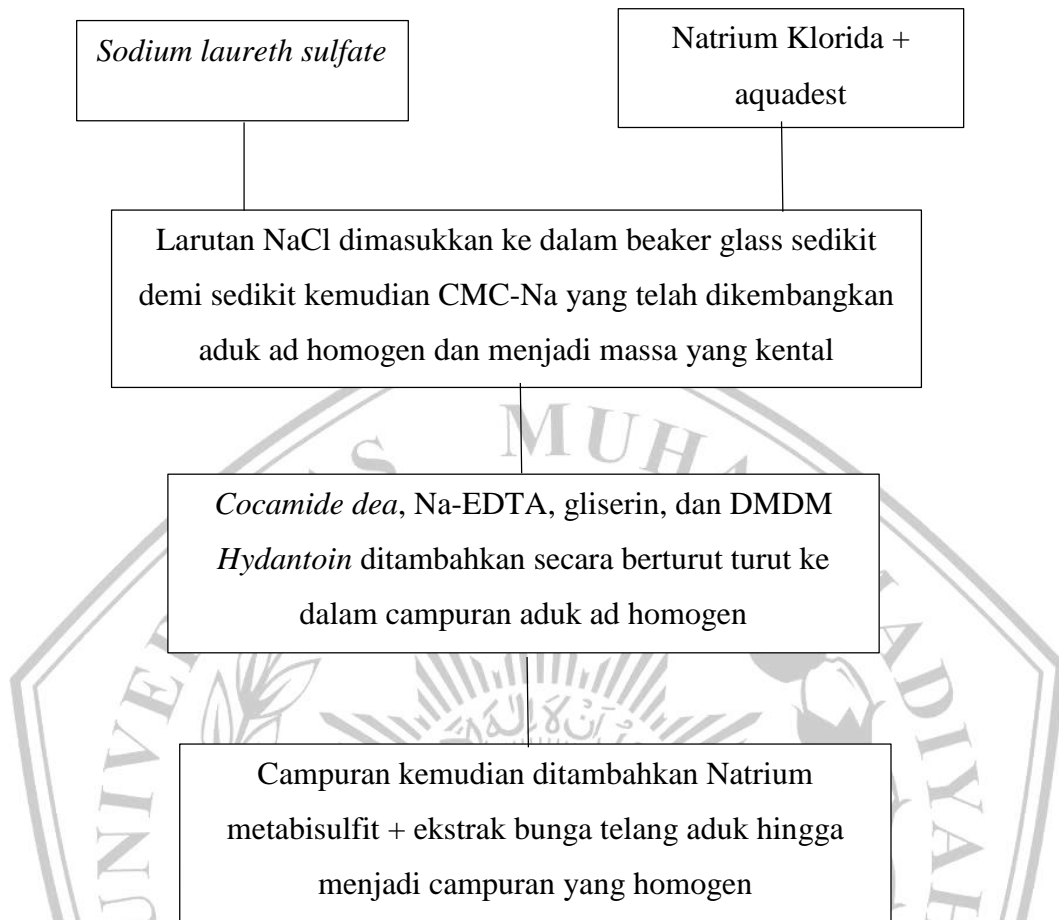
Tabel 4.1 Formula Sabun Cair Ekstrak Bunga Telang

Bahan	Fungsi	F0	F1	F2	F3
Ekstrak bunga telang (<i>Clitoria ternatea</i> L.)	Bahan aktif	-	5%	10%	15%
<i>Cocamide dea</i>	Basis/ surfaktan	2%	2%	2%	2%
<i>Sodium Lauret Eter Sulfat/SLES</i>	Basis/ surfaktan	4%	4%	4%	4%
NaCl	<i>Thickening agent</i>	7%	7%	7%	7%
Gliserin	<i>Thickening agent</i>	10%	10%	10%	10%
<i>DMDM hydantoin</i>	Pengawet	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
Na ₂ - EDTA	<i>Chelating agent</i>	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
Natrium metabisulfid	Antioksidan	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
CMC Na	Pengental	1%	1%	1%	1%
Aquadest	Pelarut	ad 100%	ad 100%	ad 100%	ad 100%

4.8.2 Pembuatan Sabun Cair

Pembuatan sediaan sabun dimulai dengan membuat basis sabun cair. *Sodium laureth sulfate* pada beaker glass kemudian di beaker glass yang berbeda NaCl dilarutkan dengan sedikit aquadest ad larut, kemudian masukkan larutan NaCl sedikit demi sedikit ke dalam beaker glass yang berisi SLES ad terbentuk masa yang kental dan homogen kemudian dimasukkan Na-CMC yang telah dikembangkan (selama 24 jam) ke dalam beaker glass aduk ad homogen, di tambahkan *cocamide dea*, masukkan gliserin, Na-EDTA, natrium metabisulfid dan pengawet ditambahkan secara berturut turut yakni ke dalam beaker glass kemudian aduk ad homogen. Kemudian ekstrak bunga telang ditambahkan aduk hingga membentuk campuran yang homogen.

Skema cara pembuatan sabun cair dapat dilihat pada gambar 4.2 :



Gambar 4.2 Skema Kerja

4.8.3 Spesifikasi Sediaan

Tabel 4.2 Spesifikasi Sediaan

Organoleptis	Warna : Biru tua Bau : Khas Tekstur : cair agak kental, licin
Homogenitas	Homogen
pH	4-7 (4-10 SNI 4085 : 2017)
Viskositas	400-4000 Cps
Tinggi Busa	60-100%
Bobot Jenis	1,01-1,1 g/mL
Stabilitas	Stabil

4.9 Uji Aktivitas Antibakteri Metode Sumuran

4.9.1 Pembuatan Agar Miring

Nutrient Agar (NA) sebanyak 0,4 gram dilarutkan dalam 20 ml aquades (20 g/1000 ml) menggunakan erlenmeyer. Setelah itu dihomogenkan dengan stirer diatas penangas air sampai mendidih. Sebanyak 5 ml dituangkan masing-masing pada 2 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama \pm 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°. Media Agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Dima & Astuty, 2016).

4.9.2 Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA (*Muller Hinton Agar*) dibuat dengan menimbang sebanyak 3,04 gram sesuai dengan komposisi pada kemasan (2g *beef extract*; 17,5 g *casein hydrolysate*; 1,5 g *starch*; 17 g *agar*) dilarutkan dalam 80 ml aquades (38 g/1000 ml) menggunakan erlenmeyer. Setelah itu, dihomogenkan dengan stirer di atas penangas air sampai mendidih hingga homogen ad larut. Media yang sudah dihomogenkan ini disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan sampai suhu \pm 45-50°C. Media MHA dituangkan pada cawan petri steril, didiamkan pada suhu kamar hingga memadat (Utomo *et al.*, 2018).

4.9.3 Inokulasi Bakteri Pada Media Agar Miring

Peremajaan bakteri *staphylococcus aureus* dengan cara mengisolasi isolat bakteri yang terdapat di Laboratorium Steril. Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji (Dima & Astuty, 2016).

4.9.4 Pembuatan Standar Kekeruhan Larutan Mc. Farland

Larutan H₂SO₄ 0,36 N sebanyak 9,95 ml dicampurkan dengan larutan BaCl₂.2H₂O 1,175% sebanyak 0,05 ml dalam erlenmeyer.

Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Afnizar *et al.*, 2016).

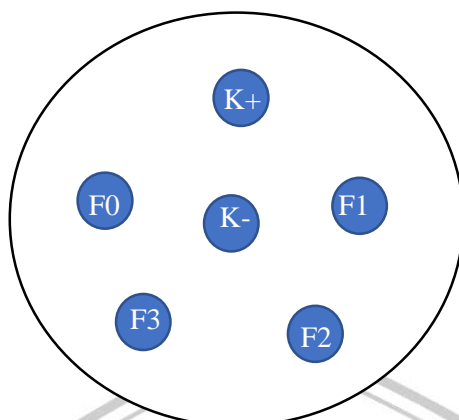
4.9.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Bakteri uji yang telah diinokulasi diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji (Dima & Astuty, 2016).

4.9.6 Uji Daya Hambat Bakteri Pembuatan Media Pengujian

- a. Sediaan sabun yang akan diuji disiapkan F0, F1, F2, F3, K (-) dan K (+) dan media uji dibuat menggunakan metode difusi agar
- b. Bakteri uji *Staphylococcus aureus* yang telah disuspensikan dengan standar Mc farland 10^8 diambil menggunakan mikropipet sebanyak 100 μ l dimasukkan ke dalam cawan petri steril.
- c. Dituangkan media *muller hinton agar* yang telah dibuat sebanyak 20 ml ke dalam cawan petri yang berisi bakteri tadi secara aseptik, homogenkan sengan cara menggoyang membentuk angka 8.
- d. Cawan petri didinginkan sampai mengeras.
- e. Kemudian media MHA dibuat 6 sumuran dengan diameter 3 mm, menggunakan pelubang sumuran (*cork borer*), sediaan kemudian diambil menggunakan mikropipet dimasukkan pada lubang sumuran yang telah dibuat.
- f. Pada masing-masing sumuran F1 kandungan ekstrak bunga telang 5%, F2 kandungan ekstrak bunga telang 10%, F3 kandungan ekstrak bunga telang 15%, F0 tanpa ekstrak bunga telang, aquadest sebagai kontrol negatif, dan sabun cair detol yang digunakan sebagai kontrol positif.
- g. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Dima & Astuty, 2016).

Gambar 10 Cawan petri metode sumuran



Keterangan :

K+ = Kontrol positif (sabun Dettol)

K- = Kontrol negatif (Aquadest)

F0 = Formula 0 tanpa ekstrak bunga telang

F1 = Formula 1 (5% ekstrak bunga telang)

F2 = Formula 2 (10% ekstrak bunga telang)

F3 = Formula 3 (15% ekstrak bunga telang)

4.9.7 Pengamatan dan Pengukuran

Pengamatan dilakukan setelah 1x24 jam masa inkubasi. Daerah bening merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap antibiotik atau bahan antibakteri lainnya yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan lebar diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dalam satuan milimeter (mm) menggunakan jangka sorong dengan cara diameter keseluruhan dikurangi diameter sumuran 3 mm. Kemudian diameter zona hambat tersebut dikategorikan kekuatan daya antibakterinya berdasarkan penggolongan Davis and Stout (1971).

4.10 Analisis Data

Analisis data pada pengamatan uji aktivitas antibakteri sediaan dilakukan dengan cara visual yaitu mengamati sediaan secara langsung meliputi besaran zona hambat dan zona inhibisi untuk uji antibakteri. Pengamatan pada uji mutu fisik meliputi pemeriksaan organoleptis sediaan secara visual dengan mengamati bentuk, bau, rasa, dan tekstur sediaan sehari setelah pembuatan. Untuk uji

karakteristik fisik mutu sediaan dan uji antibakteri menggunakan uji *one-way Anova*. Analisis *one-way Anova* yaitu jenis analisis statistik parametrik digunakan untuk menguji perbedaan antara tiga kelompok (pengamatan) atau lebih. Dari data yang didapatkan dilakukan analisis statistik dengan derajat kepercayaan $\alpha = 0,05$. Untuk mengetahui formula mana yang terdapat perbedaan bermakna dilihat dari harga F tabel. Apabila hasil F diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel}$ menunjukkan adanya perbedaan bermakna, sehingga dilanjutkan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui data mana yang berbeda.

