

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan menggunakan metode eksperimental, membandingkan pengaruh peningkatan kadar *Cocamide DEA* terhadap karakteristik fisikokimia dan uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* pada sabun minyak atsiri sereh wangi dengan konsentrasi 1% dengan metode yang digunakan yaitu difusi teknik sumuran.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penggunaan kadar surfaktan *Cocamide DEA* dengan konsentrasi 2%, 4% dan 6%.

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah hasil karakteristik fisikokimia serta diameter zona hambat dari *Staphylococcus aureus*.

4.2.3 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini meliputi:

- a. Sabun mandi cair adalah bentuk sediaan pembersih kulit berbentuk cair yang dibuat dari bahan dasar sabun atau deterjen dengan penambahan bahan lain yang diijinkan dan digunakan untuk mandi tanpa menimbulkan iritasi pada kulit (Anggi, 2017).
- b. Sabun cair sereh wangi adalah sediaan semi padat berupa sabun cair yang menggunakan surfaktan *Cocamide DEA* dan SLS sebagai basis serta bahan lain yang diformulasikan dengan penambahan minyak atsiri sereh wangi sebagai bahan aktif.
- c. Surfaktan adalah molekul yang mengurangi tegangan permukaan air. Bahan ini memiliki ekor hidrofobik (non-polar, "suka lemak") dan kepala hidrofilik (kutub, "suka air"). Bekerja sebagai bahan pembusa, pengemulsi dan dispersan (Quant K, 2010).

- d. Kontrol positif adalah kelompok perlakuan yang besar kemungkinannya menghasilkan efek atau perubahan pada variabel tergantung. Kelompok kontrol positif bertujuan untuk membuktikan bahwa eksperimen yang digunakan sudah tepat dan dapat menghasilkan perubahan. Adapun kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah sabun cair X yang beredar di pasaran.
- e. Uji karakteristik fisikokimia meliputi Organoleptis, pH, bj, viskositas, dan stabilitas busa.
- f. Zona inhibisi, yaitu daerah jernih disekitar cakram yang tidak ditumbuhi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1 Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.

4.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2023 sampai bulan Agustus 2023.

4.4 Bahan

Bahan penelitian yang digunakan untuk formulasi sabun cair:

Minyak atsiri sereh wangi, TEA, Karbomer, *Cocamide DEA*, PEG 400, Propilenglikol, Asam laktat, Natrium benzoat, Dinatrium EDTA dan Aquadest.

Bahan Uji Antibakteri:

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji antibakteri sediaan sabun cair minyak atsiri sereh wangi dengan surfaktan *Cocamide DEA* sebagai kelompok uji, media untuk menumbuhkan bakteri NAP (*Nutrient Agar Plate*), bahan pembuatan suspense bakteri. *Choloroxylonon* 4,8% sebagai kontrol positif, kontrol negatif aquades dan bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Sediaan Steril Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.

4.5 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebagai berikut. Cawan petri, kawat ose steril, autoklaf, Inkubator, LAF (*Laminar Air Flow*), beerglass, gelas ukur, tabung reaksi, batang pengaduk, sendok penyusut, pH meter, timbangan digital, viskometer *brookfield*, hot plate, pipet volume, piknometer.

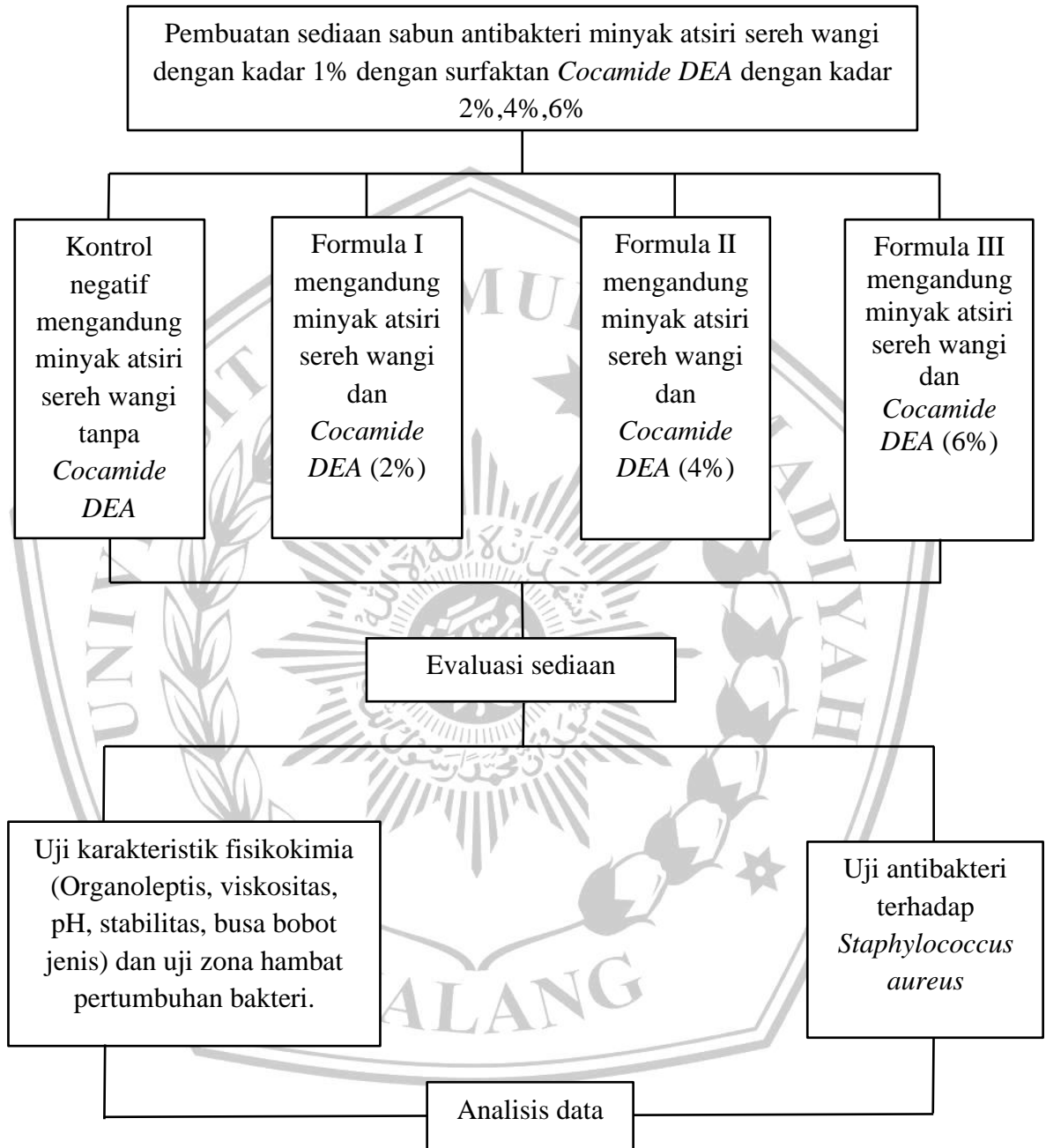
4.6 Alur Kerja

Pada penelitian ini diawali dengan pembuatan sediaan sabun minyak atsiri serah wangi dengan kadar 1% dan dengan penambahan surfaktan *Cocamide DEA* (2%, 4% dan 6%). Terdapat 3 formula sabun antibakteri dan 1 formula sebagai kontrol negatif. Yang akan diuji karakteristik fisikokimia (organoleptis dan homogenitas, viskositas, bj, pH dan stabilitas busa) dulu kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus*. Formula I (F1) mengandung *Cocamide DEA* (2%), Formula II (F2) mengandung *Cocamide DEA* (4%), Formula III (F3) mengandung *Cocamide DEA* (6%) dan formula kontrol negatif (F0) tidak ditambahkan *Cocamide DEA*. Semua formula direplikasi 3 kali dan uji dilakukan replikasi 3 kali dengan volume masing-masing sebanyak 100ml.



4.7 Rancangan Formula

Dalam penelitian ini terdapat 3 formula sabun minyak atsiri sereh wangi dengan *Cocamide DEA* berbagai konsentrasi.



Gambar 4. 1 Rancangan Formula

4.8 Formulasi Sabun Antibakteri

Tabel formula sabun minyak atsiri kayu manis dengan kadar 1% terdiri dari 4 formula yaitu kontrol negatif (kontrol negatif), Formula 1 (formula yang mengandung *Cocamide DEA* dengan kadar 2%), Formula 2 (formula yang mengandung *Cocamide DEA* 4%) dan Formula 3 (formula yang mengandung *Cocamide DEA* dengan kadar 6%).

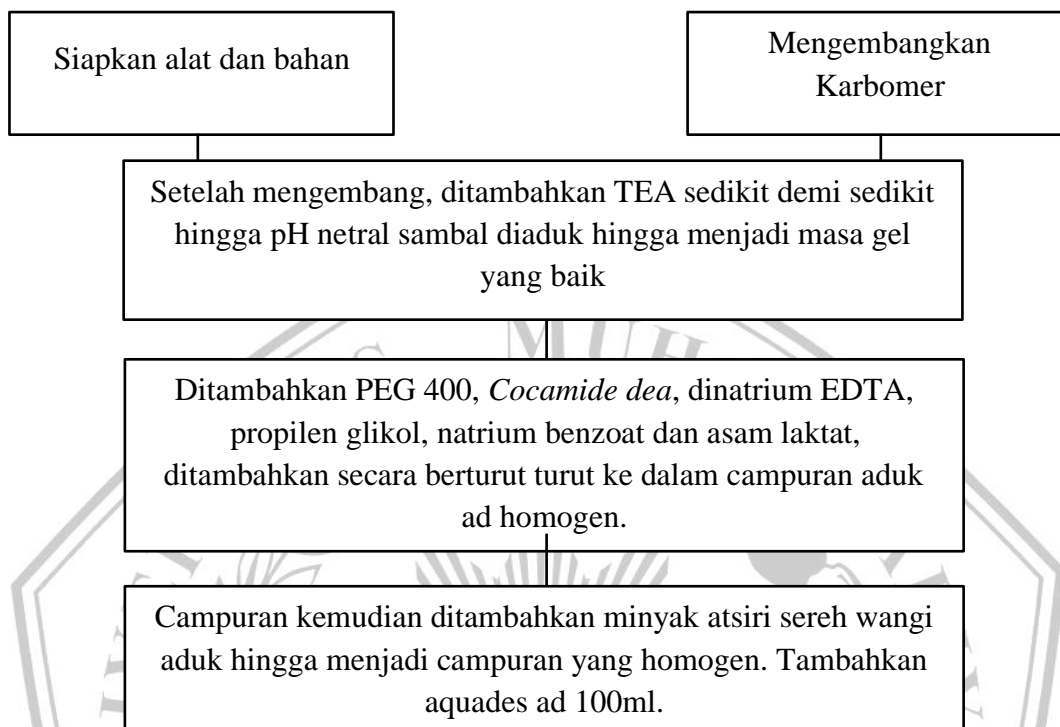
Tabel IV. 1 Formulasi Sabun Anti Bakteri

Bahan	Fungsi	Satuan	Blanko	F1	F2	F3
Minyak atsiri sereh wangi	Bahan aktif	%	1	1	1	1
TEA	<i>Alkalizing agent</i>	%	1	1	1	1
Karbomer	<i>Gelling agent</i>	%	1	1	1	1
<i>Cocamide DEA</i>	Surfaktan	%	-	2	4	6
PEG 400	<i>Co Surfactant</i>	%	20	20	20	20
Propilenglikol	Moisturizer	%	10	10	10	10
Asam laktat	<i>Whitening agent</i>	%	1,4	1,4	1,4	1,4
Natrium benzoat	Pengawet	%	0,2	0,2	0,2	0,2
Dinatrium EDTA	<i>Chelating agent</i>	%	0,1	0,1	0,1	0,1
Aquades	kosolven		Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

4.9 Cara Pembuatan

Karbomer berfungsi sebagai *thickening agent* dilarutkan dengan aquadest hingga mengembang. TEA berfungsi sebagai *alkalizing agent* yang baik kemudian di tambahkan *Cocamide DEA* berfungsi sebagai surfaktan, PEG 400 sebagai co surfaktan, ditambahkan dinatrium EDTA sebagai *chelating agent* dan juga dapat mencegah terjadinya oksidasi, ditambahkan propilen glikol sebagai pelembut agar ketika sediaan digunakan memberikan kesan nyaman dan memberikan kesan lembab pada kulit, ditambahkan natrium benzoat sebagai pengawet agar sediaan tidak terkontaminasi oleh mikroorganisme, ditambahkan asam laktat sebagai

pengatur pH ke dalam beaker glass kemudian aduk ad homogen. Minyak atsiri sereh wangi ditambahkan di aduk hingga membentuk campuran yang homogen, kemudian di ad kan sampai 100ml menggunakan aquadest.



Gambar 4. 2 Cara Pembuatan

4.9.1 Evaluasi Fisikokimia Sediaan

1. Organoleptis

Pengamatan organoleptis dapat di nilai dari tekstur sediaan yang stabil meliputi perubahan warna dan bau sabun serta tekstur. Sediaan harus menunjukkan sediaan yang homogen. Pengujian homogenitas ini dilakukan dengan cara mengoleskan sabun sebanyak 0,1 gram yang telah dibuat pada objek glass, kemudian dilihat apakah basis tersebut homogen dan apakah permukaannya halus merata. Apabila sediaan halus merata dapat disimpulkan bahwa sediaan tersebut homogen (Depkes RI, 1985).

2. Pemeriksaan pH

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan alat pH meter basic 20+. Dicuci elektroda dengan aquadest dan dikeringkan dengan tisu, kemudian dilakukan kalibrasi dengan larutan buffer standart pH 4.0 dan pH 7.0, elektroda dicuci dan dikeringkan kembali. Ditimbang sediaan sabun

sebanyak 5 gram, kemudian diencerkan dengan aquadest sampai 50 ml. Lalu dilakukan pengukuan pH sediaan dengan cara elektroda dimasukkan kedalam sediaan sabun dan dilihat angka yang tertera pada alat (Depkes RI, 1995). Nilai pH sabun cair yang ditetapkan SNI 4085:2017 adalah 6-8.

3. Viskositas

Pengukuran viskositas sabun diukur menggunakan alat viskometer *Brookfield*. Viskometer *Brookfield* adalah salah satu viskometer yang menggunakan kumparan atau gasing yang dicelupkan ke dalam zat uji dan mengukur tahanan gerak dari bagian yang berputar. Tersedia kumparan yang berbeda untuk rentang kekentalan tertentu, dan umumnya dilengkapi dengan kecepatan rotasi (FI IV, 1995). Sebanyak 80 ml sample dimasukkan kedalam beerglass, kemudian memasang spindle ukuran 62 dan rotor dijalankan dengan kecepatan 60 rpm. Setelah viskometer menunjukkan angka yang stabil, hasilnya dicatat kemudian dikalikan dengan faktor pengkali. Berdasarkan persyaratan SNI 06-4085-1996 tentang rentang viskositas sediaan sabun cair yang memenuhi persyaratan yaitu 500- 20000 cPs.

4. Stabilitas busa

Sampel ditimbang sebanyak 1g dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest sampai 10ml, dikocok selama 20 detik lalu ukur tinggi busa yang dihasilkan. Pembentukan busa dihitung dengan mengukur tinggi busa dan stabilitas busa dengan didiamkan selama 5 menit, kemudian diukur tinggi busanya (Yuniarsih dkk,2020). Berdasarkan SNI persyaratan tinggi busa dari sabun cair yaitu 13-220mm.

5. Bobot jenis

Bersihkan piknometer, keringkan piknometer dan timbang. Masukkan sampel ke dalam piknometer sampai diatas garis tera. Tutup kemudian masukkan piknometer ke dalam rendaman air es sampai suhu 20°C. Permukaan air es harus lebih tinggi daripada permukaan dalam piknometer, sehingga semua isi piknometer terendam. Biarkan piknometer terendam hingga suhunya menjadi 20°C kemudian bersihkan bagian luar piknometer dengan tisu dan timbang piknometer yang berisi sampel. Ulangi pengerjaan

tersebut dengan memakai air suling sebagai pengganti sampel replikasi sebanyak 3 kali.

Perhitungan:

$$\text{Bobot jenis, } 20^{\circ}\text{C} = \frac{W_1 - W}{V}$$

Keterangan: W = Bobot pikno kosong
 W₁ = Bobot piknometer dan sampel
 V = Volume piknometer

4.10 Uji Aktivitas Antibakteri

4.10.1 Pembuatan Media *Nutrient Agar Plate* (NAP)

Pembuatan media *Nutrient Agar Plate* dengan cara menimbang agar nutrien sebanyak 4,5 gram, lalu masukkan dalam gelas ukur. Tambahkan aquades sampai volume menjadi 225 ml. Larutan yang sudah larut disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan agar nutrien yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak 15 ml (Nazhifa, 2013).

4.10.2 Peremajaan Biakan Bakteri

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, kemudian ditanamkan pada media nutrient agar dengan cara menggores, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Mpila, 2014).

4.10.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Larutan *Mc Farland* sebagai pembanding suspensi bakteri pembuatan dimana konsentrasi bakteri adalah 10⁸ CFU/ml. dipipet 0,1 ml dari larutan tersebut kemudian masukkan ke dalam labu ukur 10 ml ditambahkan NaCl 0,9% ad tanda dimana konsentrasi menjadi 10⁶ CFU/ml (Arimbi, 2017). Larutan *Mc Farland* 0,5 digunakan dengan membandingkan kekeruhan biakan bakteri pada media cair dengan kepadatan 6 x 10⁸ sel/ml dengan langkah sebagai berikut:

- 1) Mengambil 0,05 ml larutan *Barium Chlorida* (BaCl₂) 1%.
- 2) Mengambil 9,95 ml larutan Asam Sulfat (H₂SO₄) 1%.
- 3) Mencampurkan larutan pada tabung reaksi, dengan perbandingan diatas.

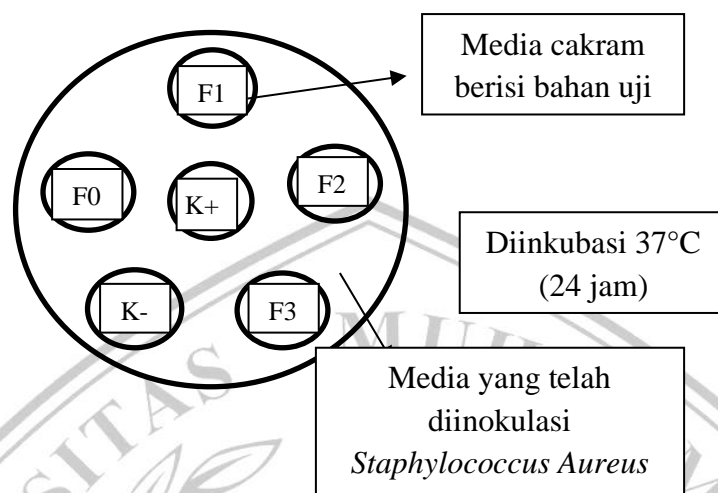
- 4) Menyimpan larutan dalam suhu kamar dan tempat gelap serta tidak terkena matahari secara langsung.
- 5) Mengambil 3-5 koloni biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan diencerkan dengan aquades sampai dengan tercapai larutan homogen untuk mendapatkan kepadatan 6×10^8 .
- 6) Membandingkan dengan larutan standar *Mc. Farland* 0,5. Jika biakan bakteri *Staphylococcus aureus* belum sama dengan Larutan pembanding, maka ditambahkan aquades. Jika terlalu keruh, dapat ditambahkan bakteri dengan menggunakan jarum ose.

4.11 Uji Daya Hambat Bakteri

1. Siapkan sediaan sabun yang akan di uji F1, F2, F3, K (-), dan K (+).
2. Membuka bungkus media *Nutrient Agar Plate* (NAP).
3. Dan memberi label penutup masing-masing cawan agar dengan nama organisme uji yang akan diinokulasi.
4. Larutan agar dengan aquadest menggunakan *stirrer hot plate*.
5. Sterilisasikan media menggunakan instrument autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C .
6. Menggunakan media ke dalam cawan agar sebanyak $\pm 15\text{ml}$ dan menunggunya hingga memadat ± 10 menit.
7. Menggunakan Teknik steril, menginokulasi semua cawan agar dengan masing-masing organisme uji sebagai berikut: Mencelupkan kapas steril ke dalam kultur (saline + mikroba) dan buang kelebihan inoculum dengan menekan *cotton swab* ke dinding bagian dalam tabung kultur. Dengan menggunakan swab, steak seluruh permukaan agar secara horizontal, vertikal, dan sekitar tepi luar cawan untuk memastikan pertumbuhan di atas seluruh permukaan.
8. Membuat lubang tegak lurus.
9. Isi lubang dengan sampel menggunakan mikropipet.
10. Inkubasi semua kultur cawan pada suhu 37°C selama 24 jam. Amati zona inhibisi (daerah jernih sekitar lubang sumuran yang tidak ditumbuhi bakteri). Perhitungan diameter zona inhibisi diukur dari penjumlahan 2 sisi dari daerah jernih yang tampak menggunakan penggaris atau jangka sorong dalam satuan milimeter (Darson, 2003).

4.12 Zona Hambat

Zona hambat bisa diamati dengan menghitung diameter area bersih (dan diameter cakram) di sekitar setiap sumur dengan jangka sorong.



Gambar 4. 3 Zona Hambat

Keterangan:

- K+ = Produk sabun antibakteri dipasaran yang mengandung *Choloxyleneol*
- K- = Aquadest
- F0 = Tanpa *Cocamide DEA*
- F1 = Dengan *Cocamide DEA* 2%
- F2 = Dengan *Cocamide DEA* 4%
- F3 = Dengan *Cocamide DEA* 6%

4.13 Analisis Data

Analisis data pada pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan cara visual yaitu megamati sediaan secara langsung meliputi bau, rasa, warna dan tekstur yang dilakukan satu hari setelah pembuatan. Untuk sediaan uji karakteristik fisikokimia sediaan dan uji antibakteri menggunakan *software* SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Analisis *One Way Anova* merupakan jenis analisis statistik parametrik yang digunakan untuk menguji perbedaan antara tiga kelompok (pengamatan) atau lebih. Dari data yang didapatkan dilakukan analisis statistik dengan derajat kepercayaan $\alpha = 0,05$. Untuk dapat mengetahui formula mana yang terdapat perbedaan yang bermakna yaitu dilihat dari harga $P < \alpha = 0.05$. Ketika hasil

yang diperoleh $P < \alpha = 0,05$ maka menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna, dengan dilanjutkan uji *tukey* untuk mengetahui data mana yang berbeda.

Kategorisasi zona hambat *Staphylococcus aureus* dalam sediaan sabun menurut (Rumlus dkk, 2022)

Tabel IV. 2 Kategorisasi Zona Hambat

Zona hambat	Kategori hambatan
< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat

