

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

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

#### 4.2 Variabel Penelitian

##### 4.2.1. Variabel Bebas

Variable bebas dalam penelitian ini adalah penggunaan kadar surfaktan *cocamidoprophyl betaine* dengan konsentrasi 5%, 7% dan 9%.

##### 4.2.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah dengan mengukur karakteristik fisikokimia dan zona hambat bakteri pada masing-masing formula dengan konsentrasi yang berbeda.

#### 4.3 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini:

- a. Sabun mandi cair adalah bentuk sediaan pembersih kulit berbentuk cair yang dibuat dari bahan dasar sabun atau deterjen dengan penambahan bahan lain yang diizinkan dan digunakan untuk mandi tanpa menimbulkan iritasi pada kulit (SNI, 2017).
- b. Sabun cair minyak atsiri sereh wangi adalah sediaan larutan berupa sabun cair yang menggunakan surfaktan *cocamidopropyl betaine* sebagai basis serta bahan lain yang diformulasikan dengan penambahan minyak atsiri sereh wangi sebagai antibakteri.
- c. 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 positif.

- d. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah produk sabun mandi cair merek x yang beredar dipasaran.
- e. F0 adalah formula tanpa surfaktan *cocamidopropyl betaine* (sebagai variabel bebas)
- f. Uji karakteristik fisikokimia meliputi organoleptis, pH, bobot jenis, viskositas, homogenitas dan stabilitas busa.
- g. Zona inhibisi yaitu daerah jernih disekitar sumuran yang tidak ditumbuhi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### **4.4 Tempat dan Waktu penelitian**

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

##### **4.4.1. Waktu penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2023 sampai bulan Agustus 2023

#### **4.5 Bahan**

##### **4.5.1. Bahan penelitian**

Bahan-bahan yang digunakan dalam formulasi sabun cair ini meliputi: minyak atsiri sereh wangi, TEA, *Cocamidopropyl betaine*, gliserin, Propilenglikol, asam laktat, natrium benzoate, dinatrium EDTA, *xanthan gum*, aquadest.

##### **4.5.2. Bahan uji antibakteri**

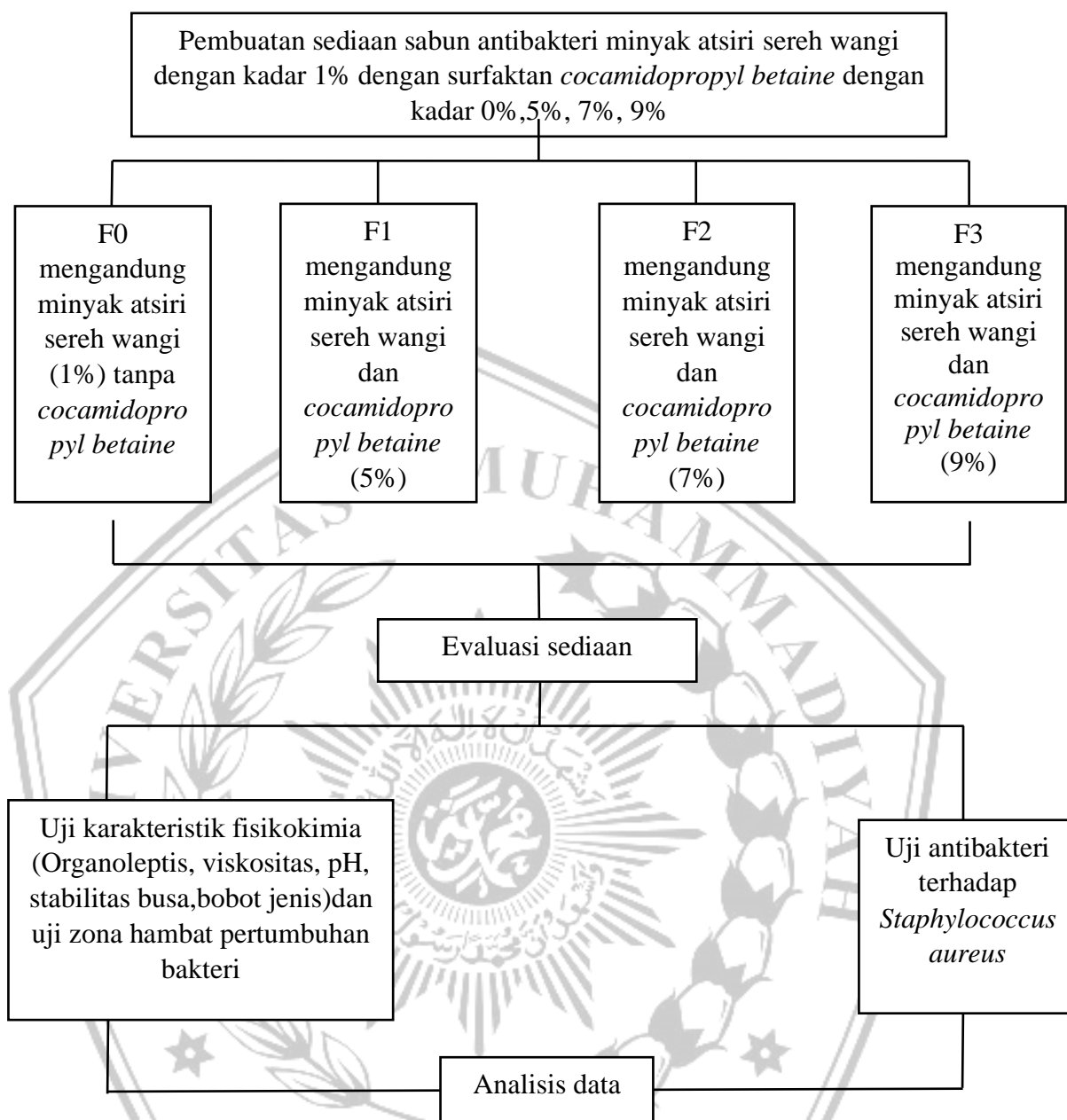
Bahan-bahan yang digunakan untuk uji antibakteri sediaan sabun cair minyak atsiri sereh wangi dengan surfaktan *cocamidopropyl betaine* sebagai kelompok uji, media untuk menumbuhkan bakteri NAP (*nutrient agar plate*), bahan pembuatan *suspense* bakteri. Produk sabun mandi cair merek x sebagai kontrol positif, kontrol negatif aquadest dan bakteri *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Sediaan Steril Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang.

#### 4.6 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, kawat ose, mikropipet, erlenmeyer, sendok penyusut, inkubator, autoklaf, *laminar air flow* (LAF), *stirrer hot plate*, piknometer, tabung reaksi, gelas ukur, beaker glass, pipet tetes, pH meter, timbangan digital, viskometer *brookfield*, batang pengaduk.

#### 4.7 Alur kerja

Pada penelitian ini dimulai dengan pembuatan minyak atsiri sereh wangi dengan kadar 1% sebagai bahan aktif yang digunakan, selanjutnya dengan penambahan surfaktan *Cocamidopropyl betaine* dengan konsentrasi kadar 5%, 7%, dan 9% dan beberapa bahan tambahan lain. Penelitian ini menggunakan 3 formula sabun yang akan diuji karakteristik fisikokimia (organoleptis, viskositas, bobot jenis, pH dan stabilitas busa) kemudian dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus aureus*. Formula I (F1) mengandung *cocamidopropyl betaine* (5%), formula II (F2) mengandung *cocamidopropyl betaine* (7%), formula III (F3) mengandung *cocamidopropyl betaine* (9%) dan (F0) tidak ditambahkan *cocamidopropyl betaine*. Semua formula dan uji dilakukan replikasi 3 kali dengan volume masing-masing sediaan sebanyak 100 ml.



**Gambar 4. 1** Rancangan formula

#### 4.8 Rancangan Formula

Dalam penelitian ini terdapat 3 formula sabun minyak atsiri sereh wangi 1% dengan *Cocamidopropyl betaine* berbagai konsentrasi dan satu formula sebagai kontrol negatif.

##### 4.8.1. Komposisi sabun antibakteri

Pada tabel formula sabun minyak atsiri ekstrak sereh wangi 1% terdiri dari 4 formula yaitu F0 (formula tanpa *cocamidopropyl betaine*), formula 1 (formula

yang mengandung *Cocamidopropyl betaine* 5%), formula 2 (formula yang mengandung *Cocamidopropyl betaine* 7%) dan formula 3 (formula yang mengandung *Cocamidopropyl betaine* 9%).

**Tabel IV. 1** Rancangan formula

Bahan	fungsi	F0	F1	F2	F3
<b>Minyak atsiri sereh wangi</b>	Bahan aktif	1%	1%	1%	1%
<b>TEA</b>	Alkalizing agent	2%	2%	2%	2%
<b>Cocamidopropyl betaine</b>	Surfaktan	-	5%	7%	9%
<b>Gliserin</b>	Humektan	20%	20%	20%	20%
<b>Propilenglikol</b>	Moisturizer	10%	10%	10%	10%
<b>Asam laktat</b>	Whitening agent	1,4%	1,4%	1,4%	1,4%
<b>Natrium benzoate</b>	Pengawet	0,2%	0,2%	0,2%	0,2%
<b>Dinatrium EDTA</b>	Cleathing agent	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
<b>Xantan gum</b>	Thickening agent	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%
<b>Aquadest</b>	solven	62,3%	57,3%	55,3%	53,3%

#### 4.9 Cara pembuatan sabun antibakteri

Alat yang digunakan dicuci bersih dan disterilkan agar terhindar dari mikroba yang menempel pada alat-alat tersebut. Disiapkan beaker (1) masukkan asam laktat, natrium benzoate, dinatrium EDTA dan aquadest lalu aduk hingga homogen/bening, air pada beaker (1) digunakan untuk mengembangkan xanthan gum. Selanjutnya minyak atsiri dimasukkan ke dalam beakerglass (2) ditambahkan *cocamidopropyl betaine*, gliserin, propilenglikol dan TEA kemudian diaduk menggunakan magnetic stirrer sampai homogen.. Masukkan beaker (2) ke dalam

beaker (1) dan diaduk menggunakan magnetic stirrer secara perlahan sampai terbentuk campuran yang homogen.

#### **4.10 Evaluasi Sediaan**

##### **4.10.1. Evaluasi sediaan fisik**

###### 1. Uji Organoleptis

Pengamatan organoleptis dapat di nilai dari tekstur sediaan yang stabil meliputi perubahan warna dan bau sabun serta bentuk. Sediaan harus menunjukkan sediaan yang homogen (SNI, 2017). 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. Uji Penetapan pH

Pengukuran pH sediaan dilakukan dengan alat pH meter. Dicuci *electrode* dengan aquadest dan keringkan menggunakan tisu, dilakukan kalibrasi dengan larutan buffer standar pH 4 dan pH 7, elektrode dicuci dan keringkan kembali menggunakan tisu. Ditimbang sediaan sabun sebanyak 5 gram, kemudian diencerkan dengan aquadest bebas CO<sub>2</sub> sampai 50 ml. Lalu dilakukan pengukuran pH sediaan dengan cara elektrode 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. Uji Viskositas

Viskometer Brookfield merupakan salah satu viskometer yang menggunakan gasing atau kumparan 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 100 g sabun dimasukkan kedalam beaker glass, kemudian memasang spindle ukuran 64 dan rotor dijalankan dengan kecepatan 60 rpm. Setelah viskometer menunjukkan angka yang stabil, hasilnya dicatat kemudian dikalikan dengan faktor (1000). Tujuan pengukuran viskositas untuk menentukan nilai resistensi zat cair untuk mengalir. Nilai viskositas yang

tinggi akan mengurangi frekuensi tumbukan antara partikel didalam sabun sehingga sediaan lebih stabil (Rosmainar, 2021). Berdasarkan persyaratan SNI 06-4085-1996 tentang rentang viskositas sediaan sabun cair yang memenuhi persyaratan yaitu 500-20000 cPs.

#### 4. Uji Stabilitas busa

Sebanyak 2 gram sediaan dilarutkan dalam 20 ml aquadest kemudian 10 ml larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi berskala melalui dinding. tabung reaksi tersebut ditutup kemudian di kocok kuat selama 20 detik. Tinggi busa yang terbentuk di catat pada menit ke-0 dan menit ke-5. Standar stabilitas busa sabun cair yang baik dalam 5 menit busa harus dapat bertahan 60-70% dari volume awal (Rinaldi *et al.*, 2021). Menurut SNI persyaratan stabilitas busa sabun cair yaitu 13-220 mm (Bayti *et al.*, 2021).

#### 5. Uji Bobot jenis

Pengujian bobot jenis dilakukan untuk mengetahui pengaruh bahan-bahan yang digunakan dalam formulasi sabun cair terhadap bobot jenis sabun yang dihasilkan. Nilai bobot jenis dipengaruhi suatu bahan yakni penyusunnya dan sifat fisiknya. Uji bobot jenis bertujuan untuk mengetahui kekentalan sabun cair (Dimpudus *et al.*, 2017). Berdasarkan SNI, standar bobot jenis pada sabun cair yaitu 1,01 – 1,1 g/ml. Bersihkan piknometer, keringkan piknometer dan timbang. Dinginkan contoh lebih rendah dari suhu penetapan. Masukkan aquadest ke dalam piknometer yang terendam air es, biarkan sampai suhu 20°C dan tetapkan sampai garis tera. Angkat piknometer dari dalam air es, diamkan pada suhu kamar dan timbang.

Perhitungan:

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

Keterangan : W = Bobot contoh

W1 = Bobot air

## 4.11 Uji Aktivitas Antibakteri

### 4.11.1. Pembuatan Media *Nutrient Agar Plate* (NAP)

Pembuatan media *Nutrient Agar Plate* dengan cara menimbang agar nutrisi sebanyak 15 gram, lalu masukkan dalam erlenmeyer. Tambahkan aquades sampai volume menjadi 500 ml kemudian tutup dengan aluminium foil. Panaskan sambil diaduk menggunakan batang pengaduk di atas hot plate hingga mendidih. Larutan yang sudah larut dibiarkan hingga kembali ke suhu ruang lalu disterilisasi dalam autoklaf dengan tekanan 15 Psi pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan agar nutrisi yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri (Manus *et al.*, 2016).

### 4.11.2. Peremajaan Bakteri (Inokulasi)

Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, kemudian ditanamkan pada media nutrisi agar dengan cara menggores, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Arimbi, 2017).

### 4.11.3. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri uji yang telah diremajakan pada media nutrisi agar diambil dengan kawat ose steril, kemudian disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 10 ml NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland (Arimbi, 2017).

### 4.11.4. Pembuatan standart MC Farland

Larutan Mc Farland sebagai pembanding suspensi bakteri pembuatan dimana konsentrasi bakteri adalah  $10^8$  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  $10^6$  CFU/ml (Arimbi, 2017). Larutan Mc. Farland  $0,5$  digunakan dengan membandingkan kekeruhan biakan bakteri pada media cair dengan kepadatan  $6 \times 10^8$  sel/ml dengan langkah sebagai berikut:

- 1) Mengambil 0,05 ml larutan *Barium Chlorida* ( $\text{BaCl}_2$ ) 1%.
- 2) Mengambil 9,95 ml larutan Asam Sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 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  $6 \times 10^8$ .
- 6) Membandingkan dengan larutan standar Mc. Farland <sup>0,5</sup>. Jika biakan bakteri *Staphylococcus aureus* belum sama dengan Larutan pembanding, maka ditambahkan aquades. Jika terlalu keruh, dapat ditambahkan bakteri dengan menggunakan jarum ose.

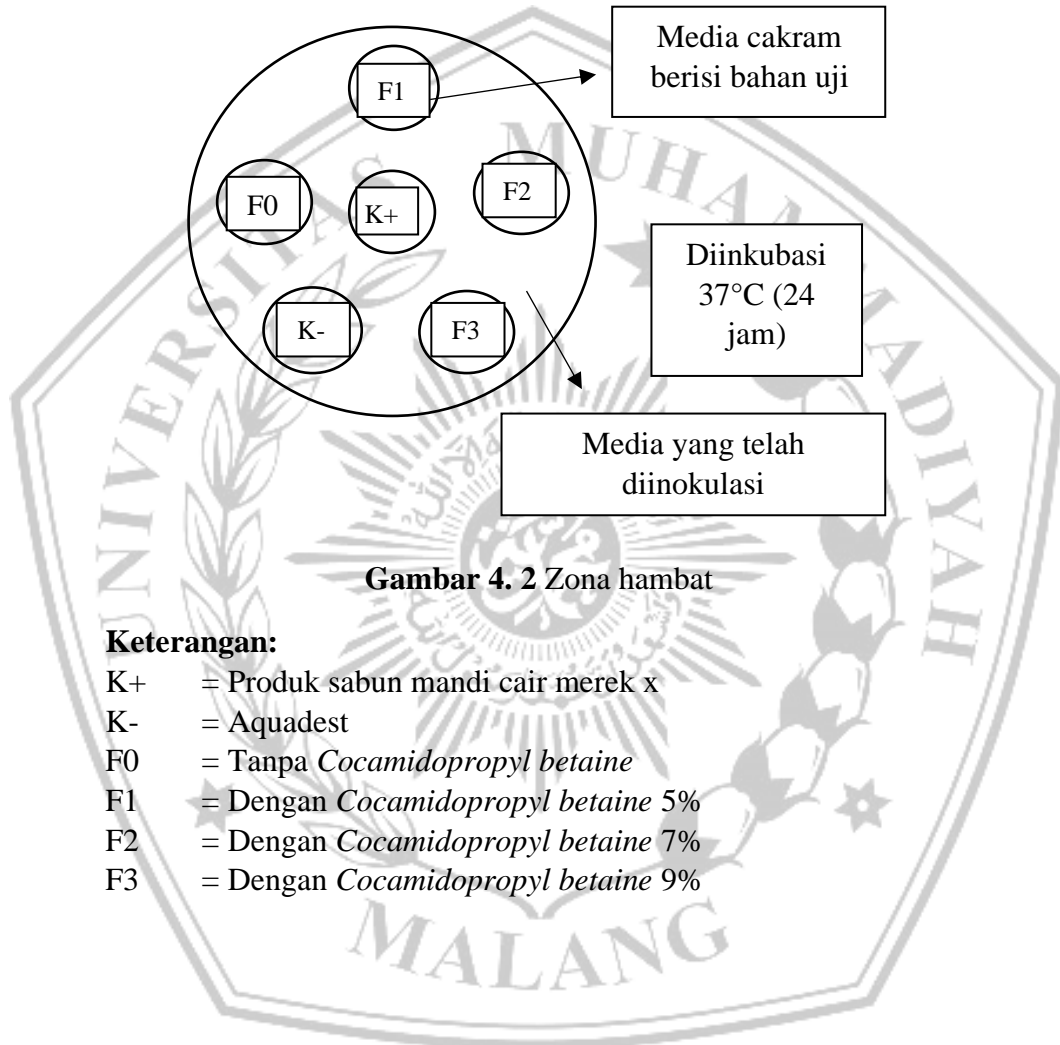
#### 4.11.5. Uji Daya Hambat Bakteri

- a. Siapkan sediaan sabun yang akan di uji F0, F1, F2, F3, K (-), dan K (+).
- b. Membuka bungkus media *Nutrient Agar Plate* (NAP).
- c. dan memberi label penutup masing-masing cawan agar dengan nama organisme uji yang akan diinokulasi
- d. Larutkan agar dengan aquadest menggunakan *stirrer hot plate*
- e. Sterilisasikan media menggunakan instrument autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C
- f. Menuangkan media ke dalam cawan agar sebanyak  $\pm 15$  ml dan menunggunya hingga memadat  $\pm 10$  menit.
- g. 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 inokulum dengan menekan *cotton swab* ke dinding bagian dalam tabung kultur. Dengan menggunakan swab, streak seluruh permukaan agar secara horizontal, vertikal, dan sekitar tepi luar cawan untuk memastikan pertumbuhan di atas seluruh permukaan.
- h. Membuat lubang tegak lurus
- i. Isi lubang dengan sampel menggunakan mikropipet
- j. Inkubasi semua kultur cawan dalam posisi terbalik 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 sisi daerah jernih yang tampak menggunakan penggaris atau jangka sorong dalam satuan millimeter (Darson, 2003).

#### 4.12 Zona hambat

Zona hambat bisa diamati dengan menghitung diameter area bersih di sekitar sumuran dengan jangka sorong.



**Gambar 4. 2** Zona hambat

**Keterangan:**

- K+ = Produk sabun mandi cair merek x
- K- = Aquadest
- F0 = Tanpa *Cocamidopropyl betaine*
- F1 = Dengan *Cocamidopropyl betaine* 5%
- F2 = Dengan *Cocamidopropyl betaine* 7%
- F3 = Dengan *Cocamidopropyl betaine* 9%

### 4.13 Analisis Data

Analisis data pada pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan cara visual yaitu megamati sediaan secara langsung meliputi bau, 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, untuk uji antibakteri dilanjutkan uji tukey untuk mengetahui data mana yang berbeda.

Kategorisasi zona hambat *staphylococcus aureus* dalam sediaan sabun menurut (Rumlus *et al.*, 2022)

**Tabel IV. 2** Kategorisasi zona hambat

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