

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Bahan Penelitian

Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Mueller Hinton Agar* (MHA), NaCl 0,9%, ciprofloxacin, alkohol 96%, ekstrak etanol daun jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels), etanol 70%, kloroform, amoniak, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (asam sulfat), pereaksi meyer, Mg, HCl, FeCl<sub>3</sub> (ferri klorida), pereaksi Lb (asam antridat asetat dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), NaOH, aquadest (PT BRATACO), C<sub>18</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (asam stearat), C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub> (gliserin), C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (asam sitrat), NaCl, minyak kelapa, pewarna dan *Oleum rosae*.

### 3.2 Alat Penelitian

Timbangan analitik, wadah maserasi, aluminium foil, batang pengaduk, pH meter (ISTEX), cawan uap, kertas cakram, autoklaf, inkubator, Laminar Air Flow (LAF), cawan petri, tabung reaksi, *rotary evaporator* (EYELA), piknometer (PYREX), pipet tetes, buret, *beaker glass* (IWAKI, BOMEX), jangka sorong (KENMASTER) bunsen, gelas ukur (PYREX), lampu spiritus, mikropipet serta tip 1000 $\mu$ l dan 100 $\mu$ l (FisherBrand), pinset, jarum ose, lemari pendingin, kain kasa, *erlemeyer* (PYREX), corong kaca, kertas saring, oven, dan cetakan sabun.

### 3.3 Lokasi Penelitian dan Waktu Penelitian

#### 3.3.1 Tempat Penelitian

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Semi Solid Universitas Buana Perjuangan Karawang

#### 3.3.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Januari-Juni 2023

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang digunakan pada penelitian.

Identifikasi tanaman dilakukan di B2P2TOOT, Tawangmangu, Jawa Tengah.

#### **3.4.2 Pembuatan Simplisia Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)**

Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang segar dilakukan pencucian terlebih dahulu untuk menghilangkan kontaminasi pengotor serta benda asing lain yang tidak diinginkan. Kemudian di tiriskan dan dikeringkan dengan cara dioven dengan suhu 50°C selama 4 jam sampai daun jamblang tersebut kering, selanjutnya daun jamblang yang sudah kering diblender hingga berbentuk serbuk (Febriana *et al.*, 2021).

#### **3.4.3 Pembuatan Ekstraksi Etanol Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)**

Ekstraksi Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dilakukan dengan cara serbuk kering daun jamblang dimasukkan ke dalam maserator yang telah berisi cairan etanol 70% direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk, kemudian di diamkan selama 18 jam. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan corong kaca yang dilapisi dengan kertas saring. Proses maserasi dilakukan 2 kali remaserasi dengan menggunakan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Hasil maserat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C kemudian dipekatkan kembali di atas *waterbath* pada suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kental (Febriana *et al.*, 2021).

#### **3.4.4 Skrining Fitokimia**

Skrining fitokimia dilakukan dengan menguji simplisia Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) untuk melihat ada atau tidaknya senyawa fitokimia, dalam penelitian ini dilakukan pengujian Alkaloid, Flavonoid dan Fenolik, Steroid dan Terponoid, dan Saponin dan Tannin.

##### **a. Alkaloid**

Uji alkaloid yang dilakukan dengan melarutkan ekstrak ke dalam 10 mL kloroform amoniak, ditambah 0,5mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kemudian dihomogenkan dan didiamkan sampai terbentuk dua lapisan, diambil

bagian lapisan atas kemudian ditetesi pereaksi Meyer sebanyak 1 tetes. Apabila terbentuk endapan maka ekstrak tersebut dinyatakan positif mengandung alkaloid (Sudarmi *et al*, 2017).

b. Flavonoid dan Fenolik

Uji fenolik dan flavonoid yaitu dilarutkan ekstrak ke dalam etanol 70% dan dipanaskan, kemudian disaring. Hasil filtrat tersebut diletakkan pada plat tetes kemudian ditambahkan Mg dan HCl untuk identifikasi flavonoid dan ditambahkan  $\text{FeCl}_3$  untuk identifikasi fenolik. Apabila terjadi perubahan warna menjadi kemerahan maka ini menunjukkan hasil positif adanya kandungan senyawa flavonoid pada ekstrak tersebut, sedangkan hasil positif fenolik ditandai dengan terbentuknya cincin hijau sampai keunguan (Sudarmi *et al*, 2017).

c. Steroid dan Terpenoid

Uji steroid dan terpenoid yaitu sampel ekstrak daun juwet ditambahkan kloroform kemudian dipanaskan selama 10 menit, setelah panas sampel diletakkan pada plat tetes kemudian ditambahkan pereaksi I<sub>b</sub> (asam antridat asetat +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat). Apabila terjadi perubahan warna menjadi merah, pink atau violet menandakan ekstrak positif mengandung terpenoid dan apabila warnanya berubah menjadi hijau atau ungu maka sampel dinyatakan positif mengandung steroid (Sudarmi *et al*, 2017).

d. Saponin dan Tannin

Uji saponin yaitu ekstrak daun juwet diambil sebanyak 0,1 gram, kemudian dilarutkan dalam 5mL aquades panas, selanjutnya dikocok kurang lebih 10 detik. Apabila terbentuk buih atau busa yang stabil kurang lebih 10 menit ini menandakan bahwa ekstrak tersebut positif mengandung senyawa saponin (Sudarmi *et al*, 2017).

Uji tannin yaitu sejumlah ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan aquadest lalu dipanaskan diatas penangas air kemudian disaring, ditambahkan beberapa tetes ferri klorida. Jika

terbentuk warna hijau kecoklatan atau biru kehitaman maka menunjukkan adanya kandungan tannin. (Rajendra *et al.*, 2015)

#### **3.4.5 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Etanol Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)**

Proses penentuan KHM ekstrak etanol daun jambalang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yaitu dengan melakukan sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pada pembuatan suspensi bakteri dengan memasukan 1 ose suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl dan telah disetarakan kekeruhannya dengan konsentrasi 0,5 Mcfarland. Kemudian media agar dituangkan ke dalam cawan petri dengan menambahkan suspensi bakteri lalu di diamkan sampai memadat, dilakukan pengenceran ekstrak dengan seri konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,6%, 0,3% dan 0,1%. Setelah media agar sudah memadat dan sudah diinokulasikan dengan bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian diberi label sesuai dengan konsentrasi yang akan diujikan serta memberi tanda kontrol positif dan negatif (kontrol positif yang digunakan yaitu ciprofloxacin, sedangkan kontrol negatif Aquadest steril 10%). Ekstrak etanol daun jambalang kontrol positif dan negatif dimasukkan kedalam cawan petri, kemudian cawan petri segera ditutup dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, diameter daya hambat ditunjukkan pada area zona bening yang terbentuk. Diameter daya hambat kemudian diukur menggunakan jangka sorong.

#### **3.4.6 Formulasi Sediaan**

Formulasi sediaan sabun mandi padat ekstrak etanol daun jambalang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) dikutip dari penelitian Nuryati dan Lestari 2021 dapat dilihat pada tabel dibawah ini :

**Tabel 3.1** Formulasi Sediaan Sabun Mandi Padat Ekstrak Etanol Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Nama Bahan	Formula (b/v) %				Fungsi
	F0	F1	F2	F3	
Ekstrak Etanol	-	-	-	-	Zat Aktif
Daun Jamblang					
NaOH	4	4	4	4	Pembentuk Sabun Padat
Aquadest	ad 100mL	ad 100mL	ad 100mL	ad 100mL	Pelarut
Asam Stearat	5	5	5	5	Penstabil Basa
Gliserin	3	3	3	3	Humektan
Asam Sitrat	1	1	1	1	Pengawet dan Mengadjust pH
NaCl	1	1	1	1	Pengental
Minyak Kelapa	20	20	20	20	Pelembut
Pewarna	qs	qs	qs	qs	Pewarna
<i>Oleum Rosae</i>	qs	qs	qs	qs	Pewangi

### 3.4.7 Formulasi Sediaan Sabun Mandi Padat Ekstrak Etanol Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Proses pembuatan sabun padat dilakukan dalam beberapa tahap pencampuran. Pencampuran bahan pertama yaitu dipanaskan minyak kelapa dan asam stearate yang ditempatkan di dalam beaker glass dengan menggunakan hot plate sampai suhu 60-70°C hingga homogen, kemudian dibuat larutan NaOH dengan aquadest, setelah itu ditambahkan ekstrak etanol daun jamblang, kemudian ditunggu sampai suhu 60°C. Setelah itu pencampuran bahan kedua yaitu masukkan secara perlahan larutan NaOH kedalam minyak asam stearate yang masih di panaskan di atas *hot plate* dengan suhu 70°C dan diaduk secara terus menerus hingga homogen. Dimasukkan bahan-bahan lain seperti gliserin, asam sitrat, NaCl secara perlahan dan diaduk terus dengan suhu 60-70°C hingga homogen, selanjutnya dicetak menggunakan cetakan sabun. Campuran

didiamkan selama 1 minggu, kemudian lakukan analisis uji terhadap sabun yang dihasilkan (Nuryati dan Lestari 2021).

#### **3.4.8 Uji Efektivitas Sediaan Sabun Mandi Padat Ekstrak Etanol Daun Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) terhadap *Staphylococcus aureus***

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram. Suspensi bakteri uji dipipet lalu ditetaskan ke atas cawan petri yang telah berisi media MHA. Suspensi bakteri diratakan dengan batang L agar tersebar merata di permukaan agar. Kertas cakram yang telah mengandung sediaan beserta kertas cakram yang mengandung kontrol positif, dan kontrol negatif diletakkan di atas media yang telah mengandung suspensi bakteri tersebut, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik ciprofloxacin disuspensikan dengan cara 5 gram sabun dilarutkan dalam 10mL air kemudian diambil 50µl ekstrak dari masing-masing konsentrasi, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah basis sabun tanpa ekstrak yang telah dilarutkan dengan aquadest. Setelah diinkubasi, kemudian diamati adanya pertumbuhan bakteri uji dan diukur diameter daya hambatnya. Pengamatan diameter daya hambat dilakukan dengan mengamati zona bening yang dihasilkan pada sekitar cakram yang berisi larutan uji dan diukur menggunakan jangka sorong (Febriana *et al.*, 2021).

#### **3.4.9 Evaluasi Fisik Sediaan Sabun Mandi Padat**

Evaluasi fisik sediaan sabun mandi padat yang dilakukan meliputi uji organoleptik, pH, kadar air, asam lemak bebas dan alkali bebas, tinggi busa, dan hedonik.

##### **a. Uji Organoleptik**

Uji organoleptik dilakukan dengan cara mengamati warna, bentuk dan bau sabun yang telah dibuat sabun pada minggu ke-4 (Febriani *et al.*, 2021).

b. Uji pH

Uji pH dilakukan tiga kali dengan cara memasukan sebanyak 1 gram sabun ke dalam gelas kimia dan dilarutkan dengan 10ml aquadest. Elektroda yang sebelumnya telah dikalibrasi pada pH 4,0; 7,0; 9,0, dimasukkan ke dalam larutan sampel pH yang tetap (Febriani *et al.*, 2021).

c. Uji Kadar Air

Uji kadar air dilakukan tiga kali menggunakan oven dengan menimbang kurs porselen yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 30 menit. Sampel ditimbang dan dimasukkan ke dalam kurs porselen yang telah di keringkan, kemudian dipanaskan dalam oven pada suhu 105°C selama 1 jam. Lalu di dinginkan dalam desikator sampai suhu ruang lalu ditimbang.

d. Uji Asam Lemak dan Alkali Bebas

Uji asam lemak bebas dan alkali bebas dilakukan tiga kali dengan mendidihkan 100mL alkohol 95% atau lebih dalam erlenmeyer 250 mL, ditambahkan 0,5mL indikator phenolptalein 1% dan didinginkan sampai 70°C kemudian dinetralkan dengan KOH 0,1 N dalam alkohol. Sebanyak 5 gram sabun ditimbang dan dimasukkan ke dalam alkohol netral dan dipanaskan pada suhu 100°C dan dididihkan selama 30 menit. Apabila larutan bersifat asam (penunjuk phenolphtalein tidak berwarna merah) dititrasi dengan larutan KOH 0,1 N dalam alkohol sampai timbul warna merah muda yang stabil. Sebaliknya apabila larutan tersebut bersifat alkali menunjukkan warna merah maka dititrasi dengan HCl 0.1 N dalam alkohol sampai warna merah hilang. Jika larutan bersifat alkali maka dihitung menjadi NaOH dan sebaliknya jika bersifat asam maka dihitung menjadi asam oleat (Febriani *et al.*, 2021).

e. Uji Tinggi Busa

Sebanyak 1 gram sabun dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml aquadest, kemudian dihomogenkan dengan vortex

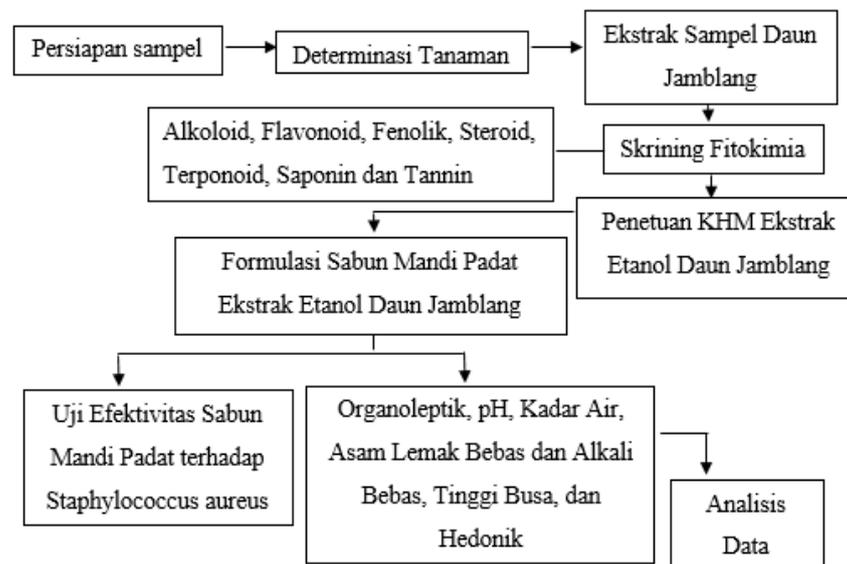
selama 1 menit. Busa yang terbentuk diukur tingginya menggunakan penggaris (tinggi busa awal). Tinggi busa diukur kembali setelah 1 jam (tinggi busa akhir) (Febriani *et al.*, 2021).

f. Uji Hedonik

Uji hedonik dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan dari sediaan sabun padat. Pengujian ini menggunakan 20 orang responden dewasa, dimana pengujian parameter warna, bentuk dan aroma dari sediaan. Kemudian responden diberikan kuesioner dan mengisi kuesioner berdasarkan pengamatan yang dilakukan dengan skala sangat suka, suka, kurang suka, tidak suka dan sangat tidak suka (Fadillah dan Dalimunthe., 2023).

### 3.4.10 Alur Penelitian

Alur penelitian dijelaskan pada gambar dibawah ini :



**Gambar 3.1** Skema Alur Penelitian

### 3.5 Analisis Data

Data evaluasi sifat fisik sabun padat meliputi organoleptik, pH, kadar air, asam lemak dan alkali bebas, tinggi busa, dan hedonik dianalisis secara deskriptif, sedangkan data hasil evaluasi sabun padat berupa pengujian aktivitas antibakteri pada sediaan sabun padat dianalisis secara statistik menggunakan ANOVA.