

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah kuantitatif yang menggunakan metode penelitian secara eksperimental dengan konsep true eksperimental. Metode eksperimental yaitu suatu tahap penelitian dengan melakukan kegiatan percobaan untuk mengetahui pengaruh dari akibat adanya perlakuan tertentu atau penelitian yang dilakukan. Eksperimen ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui efektivitas antibakteri sabun cair terhadap *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode difusi cakram yang berisi agen sabun cair dengan konsentrasi bahan aktif 10%, 15, dan 20%.

3.2 Populasi dan sampel

Pada penelitian ini digunakan populasi dari tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang diambil dari Desa Pujiharjo Kec. Tirtoyudo Kab. Malang. Sampel yang digunakan adalah bagian daun ciplukan (*Physalis angulata* L.).

3.3 Definisi Operasional Variabel

3.3.1 Definisi operasional

1. Ciplukan merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai pengobatan tradisional dan modern. Kandungan tanaman ciplukan pada bagian daun memiliki senyawa flavonoid dan alkaloid yang dapat digunakan sebagai antibakteri.
2. Antibakteri adalah zat yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri penyebab infeksi. Sediaan antibakteri dibuat dalam sediaan sabun cair yang dapat berinteraksi langsung terhadap kulit.
3. Sediaan sabun cair adalah bahan pembersih yang dibuat dengan mencampurkan minyak nabati dan air yang dibentuk menjadi cairan. Sabun cair dibuat dengan menambahkan ekstrak daun ciplukan sebagai zat aktif dengan konsentrasi berbeda – beda yaitu 10%, 15%, dan 20%.
4. Ekstrak adalah suatu senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Bagian tanaman ciplukan yang digunakan

sebagai sampel yaitu daun segar yang akan diekstrak dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70% dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C.

5. Formulasi sabun cair ekstrak daun ciplukan yaitu proses pencampuran ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) dengan bahan tambahan eksipien seperti KOH, Na-CMC, dan asam stearat untuk menghasilkan sediaan sabun cair yang sesuai dengan standart BSN tahun 2017.
6. Bakteri *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif yang banyak ditemukan pada bagian kulit, perineum, faring, saluran pencernaan, vagina dan aksila pada manusia yang dapat menyebabkan infeksi.
7. Difusi cakram adalah metode yang menggunakan kertas cakram yang berisi agen antibakteri sabun cair ekstrak daun ciplukan dan kontrol positif dan negatif sebagai pembanding. Kemudian diletakkan pada media agar yang sebelumnya telah ditanam bakteri sehingga agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar tersebut.
8. Diameter zona hambat adalah daerah jernih di sekitar cakram yang menandakan bahwa area sekitar cakram terdapat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong.

3.3.2 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah formulasi sediaan sabun cair.

3.3.3 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas. Variabel dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- Erlenmeyer
- Tabung reaksi
- Gelas ukur
- *Beaker glass*
- Cawan petri
- Jarum ose
- *Incubator*
- Spiritus
- *Autoclave*
- *Laminar air flow*
- pH meter
- Pipet tetes
- Spatel
- Tabung reaksi
- Blender serbuk
- *Rotary evaporator*
- *Waterbath*

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah

- Daun ciplukan (*Physalis angulata* L.)
- Media natrium agar (NA)
- Kultur murni *Staphylococcus aureus*
- Etanol 70%
- KOH 40%
- HCl 0,1N
- Na-CMC
- Asam stearat
- NaCl 0,9%
- *Aquadest*
- Eritromisin
- Indikator pp

3.5 Tempat dan waktu penelitian

3.5.1 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium mikrobiologi Stikes Panti Waluya Malang

3.5.2 Waktu Penelitian

Tabel 3. 1 Waktu dan Jadwal Penelitian

Rencana Kegiatan	Bulan					
	Februari	Maret	April	Mei	Juni	Juli
Seminar proposal						
Penelitian						
Pengumpulan data						
Analisis data						
Penyusunan laporan						
Seminar hasil						

3.6 Prosedur penelitian

3.6.1 Pengolahan sampel daun ciplukan (*Physalis angulata* L.)

1. Pengelolaan simplisia meliputi pencucian dan pengeringan daun ciplukan.

Pencucian dilakukan dengan cara dicuci bersih dibawah air mengalir, dikeringkan tanpa terkena sinar matahari langsung dengan menggunakan oven $\pm 50^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. kemudian diserbukkan menggunakan penggiling halus hingga menjadi serbuk simplisia.

2. Pembuatan ekstrak daun ciplukan

Pada penelitian ini sampel daun ciplukan diekstraksi menggunakan metode maserasi. Langkah pertama yaitu timbang serbuk simplisia sebanyak 1000 gram dan dimasukkan kedalam wadah maserasi lalu ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:8 (serbuk simplisia 1000 gram : pelarut 8000ml). Selanjutnya dimaserasi dengan waktu 48 jam dengan dilakukan sesekali pengadukan. Hasil maserasi disaring, bagian filtrat diambil sedangkan ampasnya direndam kembali dan dilakukan remaserasi sebanyak 2 x 24jam. Ekstrak cair yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$ dengan kecepatan 75 rpm selama 1 jam dan diuapkan kembali menggunakan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental.

3.6.2 Rancangan formulasi sediaan sabun cair ekstrak daun ciplukan

(*Physalis angulata* L.)

Tabel 3. 2 Rancangan Formulasi Sediaan Sabun Cair Ekstrak Daun Ciplukan (*Physalis angulata* L.)

No.	Bahan	Fungsi	Formula		
			F1	F2	F3
1.	Ekstrak daun ciplukan (<i>Physalis angulate</i> L.)	Bahan aktif	10%	15%	20%
2.	KOH 40%	Alkali	13 gram	13 gram	13 gram
3.	Na – CMC	Pengental	1 gram	1 gram	1 gram
4.	Asam stearate	surfaktan	0,75 gram	0,75 gram	0,75 gram

5.	aquadest	Pelarut	Ad 100ml	Ad 100ml	Ad 100ml
----	----------	---------	-------------	-------------	-------------

Keterangan :

F1 = Formulasi sabun cair dengan konsentrasi daun ciplukan 10%

F2 = Formulasi sabun cair dengan konsentrasi daun ciplukan 15%

F3 = Formulasi sabun cair dengan konsentrasi daun ciplukan 20%

3.6.3 Pembuatan sabun cair ekstrak daun ciplukan

- Proses pembuatan sabun cair ekstrak daun ciplukan yaitu menyiapkan bahan yang diperlukan terlebih dahulu seperti ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.), KOH, Na-CMC, asam stearate, dan *aquadest*. Semua bahan yang akan digunakan ditimbang sesuai tabel 3.1
- Pada tahap pertama siapkan KOH 40% sebanyak 13 ml
- Ambil Na-CMC sebanyak 1 gram Kemudian dikentalkan didalam mortir hangat berisi *aquadest* panas.
- Tambahkan KOH kedalam Na-CMC yang sudah dikentalkan dan sudah sedikit dingin, kemudian aduk hingga homogen.
- Tambahkan asam stearate sebanyak 0,75 gram, diaduk hingga homogen.
- Tambahkan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) pada masing – masing formula, pada formula F1 10%, formula F2 15%, dan formula F3 20% diaduk hingga homogen.
- Masukkan sediaan sabun cair ke dalam wadah botol bersih yang telah disiapkan dan tambah *aquadest* ad 100ml.

3.6.4 Pemeriksaan sediaan sabun cair ekstrak daun ciplukan

1. Evaluasi karakteristik fisikokimia sediaan sabun cair

a. Uji organoleptik

Uji organoleptik yang perlu diamati dalam sediaan sabun cair yaitu bentuk sediaan, bau dan warna dari sabun cair.

b. Uji pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Tahap awal yang dilakukan adalah mengambil sampel sebanyak 3 ml kemudian diencerkan menggunakan *aquadest* sebanyak 10 ml kemudian cek menggunakan pH meter. Setelah itu diamati dan dicatat hasil pH apakah sudah sesuai dengan pH kulit. Rentan pH menurut SNI 8-11.

c. Uji busa

Uji busa dilakukan dengan cara dimasukan sabun cair secara berskala kedalam tabung reaksi yang berisi 10ml *aquadest* dan kemudian ditutup. Lalu tabung dikocok selama 20 detik dan diukur tinggi busa yang terbentuk. Kemudian sediaan sabun cair didiamkan selama 5 menit kemudian diukur kembali tinggi busa sediaan sabun cair untuk memperoleh nilai akhir sediaan sabun cair dan dihitung kestabilan busa.

d. Uji alkali bebas

Metode ini sampel sabun cair ditimbang sebanyak 5 gram, kemudian dimasukkan kedalam gelas piala 250ml. selanjutnya ditambahkan *aquadest* 30ml dan 3 tetes larutan indikator fenofthalin. Bila larutan berwarna merah muda kemudian dititrasi dengan larutan HCl 0,1 N dalam alcohol sampai warna merah muda hilang.

3.6.5 Uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Pembuatan media

- Ditimbang NA sebanyak 20 gram, kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer, ditambahkan aquades sebanyak 1000 ml kemudian dilarutkan menggunakan hot plate *magnetic stirrer*. Setelah media larut disterilkan ke dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dan ditunggu dingin antara $\pm 40^{\circ}\text{C}$.
- Setelah media NA dingin dimasukkan kedalam *Petridish*, masing – masing 20ml.

- Dan buat media agar miring dalam tabung reaksi masing – masing 10ml yang akan digunakan sebagai pembuatan kultur bakteri. Tunggu sampai memadat kemudian dibungkus dengan kertas payung disimpan dalam kulkas sebelum digunakan.

2. Pemiakan bakteri

Satu koloni bakteri *Staphylococcus aureus* diambil menggunakan jarum ose steril lalu ditanam pada media NA miring dengan teknik goresan (*streak plate*), setelah itu diinkubasi selama 18 – 24 jam pada suhu 37 °C.

3. Pembuatan kultur bakteri *Staphylococcus aureus*

Siapkan media agar miring yang sudah memadat. Kemudian ambil bakteri Biakan *Staphylococcus aureus* menggunakan jarum ose yang telah dipanaskan pada api bunsen dan dimasukkan pada media agar miring secara aseptik dengan metode zig zag. Kemudian bungkus bagian atas tabung reaksi dengan *clingwrap* dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2x24 jam.

4. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Siapkan tabung reaksi steril dan larutan NaCl 0,9%, kemudian ditambahkan biakan bakteri yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebanyak 1-2 ose sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standart McFarland 0,5 (kepadatan antara 1×10^7 sel/ml – 1×10^8 sel/ml).

5. Uji aktivitas antibakteri

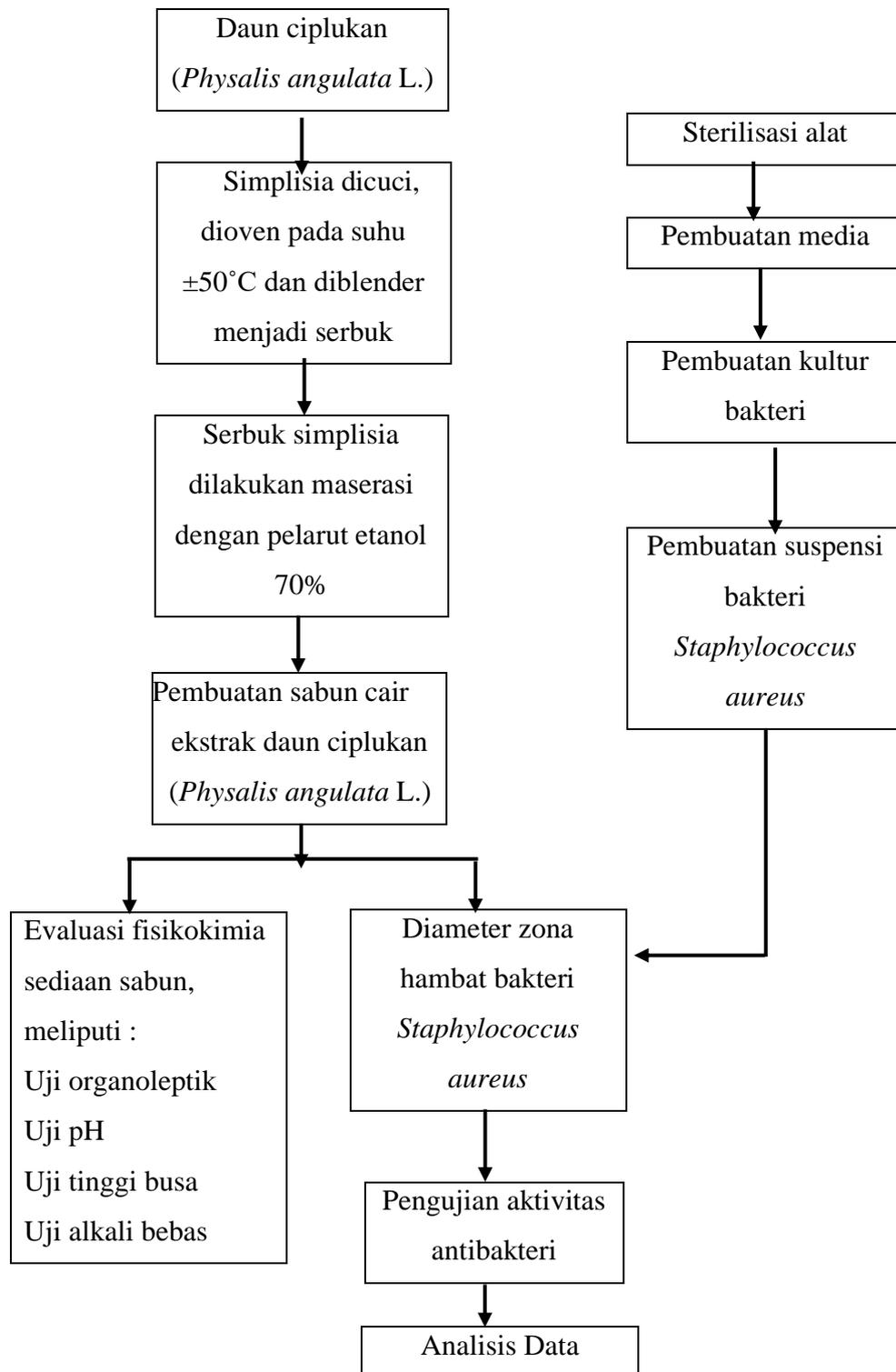
Media yang sudah dibuat ditambahkan suspense bakteri secara merata menggunakan *spreader* setelah itu dibiarkan agar suspense terserap pada media. Kemudian di dalam cawan petri tersebut diletakkan cakram disk yang sebelumnya sudah direndam selama 1 jam dengan kontrol positif 1 (ekstrak daun ciplukan), kontrol positif 2 (formulasi sabun cair tanpa ekstrak) dan kontrol positif 3 (eritromisin), kontrol negatif (*aquadest*), dan sampel uji (formula sabun cair ekstrak daun ciplukan) pada F1, F2, dan F3 menggunakan pinset steril. Perlakuan dilakukan sebanyak 3x untuk validasi hasil yang didapat. Setelah itu semua media diinkubasi ke dalam

inkubator suhu 37°C selama 18 - 24 jam. Kemudian diukur diameter zona bening yang terbentuk dengan menggunakan jangka sorong.

3.7 Analisis data

Analisa data pada penelitian ini dilakukan secara kuantitatif menggunakan *One sample T test* yang bertujuan untuk menilai perbedaan antara nilai tertentu dengan rata-rata kelompok konsentrasi sediaan sabun cair ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Pengujian awal yang dilakukan adalah uji normalitas dari data yang didapatkan untuk mengetahui data sampel terdistribusi normal. Langkah selanjutnya uji *One sample T test* dengan menggunakan SPSS 16.0 *for windows* karena tingkat kepercayaan 95%.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 3. 1 Alur Penelitian