BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penetlitian

Jenis penelitian ini dilakukan menggunakan metode ekperimental pada laboratorium dengan analisis penelitian deskriptif yakni percobaan untuk mengetahui adanya pengaruh yang ada. Pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap formulasi sabun padat berbahan *Spirulina sp* dan madu. Pengujian dilakukan sesuai parameter SNI 3532:2021 dan sensitivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*.

3.2 Waktu dan Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktoer hingga Desember 2024 yang bertempat di Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang.

3.3 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah sabun berbahan *Spirulina sp* dan madu dengan konsentrasi formulasi 0%, 0,10%, 0,25%, dan 0,50%. Dengan sabun pasaran antibakteri.

3.3.1 Alat

Labu ukur (Iwaki), corong, pipet ukur (Iwaki) steril, pH meter (Eutech *Instruments*), batang pengaduk steril, Erlenmayer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex) steril, sendok steril, spatula, pemantik, bunsen, mikropipet (Dumo) 1000 mikroliter, kaca arloji, gelas beaker (Duran), pipet tetes, *magnetic strirer*, *hotplate* (*Thermo Scientific*), neraca analitik (Radwag), vortex (DLAB MX- S), LAF (*LaminarAir Flow)*, inkubator (Memmert IN55), loyang, bulb, *waterbath* (Memmert), rak tabung, tabung reaksi, ose bulat, autoklaf, Cork Borer, oven (*Thermo Scientific*), termometer (GEA), Lemari asam.

3.3.2 Bahan

Nutrient Agar (NA) ,Media *Potato Dextrose Agar* (PDA), Media *Muller Hinton Agar* (MHA), akuadest, kapas, Alumunium foil, kultur Bakteri *Eschericia Coli*, kultur Jamur *Candida albicans*, KOH, HCL, Etanol 95%, n-heksana, NaCl 90, Sabun antibakteri, Obat antibiotik, dan sabun *Spirulina sp* dan madu dengan Formulasi F0,F1,F2,dan F3, fenolftalein 1%.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah formulasi sabun padat *Spirulina sp* dan madu dengan konsentrasi 0%, 0,10%, 0,25%, dan 0,50% untuk melihat sensitivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*.

3.4.2 Variabel terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah hasil uji meliputi evaluasi uji fisika, kimia, dan mikrobiologi terhadap sediaan sabun padat konsentrasi 0%, 0,10%, 0,25%, dan 0,50% diukur melalui zona hambat.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Fisik

Pengujian fisik mengandalkan indera manusia sebagai alat utama. Penilaian ini mencakup berbagai aspek seperti tampilan, aroma, tekstur (Lestari et al., 2020)

3.5.2 Tinggi Busa

Sabun sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 mL Akuades. Dikocok dengan baik hingga terbentuk busa didiamkan selama 5 menit lalu ukur dan dicatat ketinggian busa yang terbentuk. Dilakukan pengujian ini sebanyak tiga kali untuk memastikan hasil yang akurat (Lestari et al., 2020).

3.5.3 pH

Sabun sebanyak 1 gram ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 1000 mL dan diencerkaan hingga tanda batas, kemudian dihomogenkan dan diukur menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi menggunakan larutan buffer 4,7,10. Nilai pH yang terbaca diamati dan hasil pengukuran di catat. pH dianggap memenuhi syarat jika memiliki nilai pH 6,0 hingga 11,0 (BSN, 2021).

3.5.4 Bahan Tidak Larut Dalam Etanol

Kertas saring dioven pada suhu 105°C selama 30 menit, didinginkan dalam desikator, dan ditimbang (b0) sehingga mencapai bobot tetap. Sebanyak 5 gram sampel (b1) di timbang, di masukkan ke dalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan 200 mL etanol yang telah dipanaskan. Campuran dipanaskan diatas penangas air hingga sabun terlarut sepenuhnya. Larutan dituangkan ke dalam kertas saring, Erlenmeyer dibilas dengan etanol dan residu pada kertas saring di cuci dengan etanol. Filtrat disimpan untuk pengujian alkali bebas/asam lemak bebas. Kertas saring beserta residu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam, didinginkan dalam desikator, dan ditimbang (b2). Prosedur di ulang hingga mencapai bobot tetap. Pengujian dilakukan dengan 3 replikasi (BSN, 2021).

Rumus :

$$\text{Bahan tak larut dalam etanol} = \frac{b1-b2}{b1} x100$$

Keterangan :

Persyaratan mutu maksimal 10%

b_0 = bobot kertas saring (g)

b_1 = bobot sampel (g)

b_2 = bobot kertas saring + residu (g)

3.5.5. Asam Lemak Bebas

Filtrat dari penentuan bahan tak larut dalam etanol dipanaskan, kemudian 0,5 ml indikator fenolftalein 1% dimasukkan. Jika larutan tersebut bersifat asam (ditunjukkan dengan fenolftalein yang tidak berwarna), maka larutan tersebut dititrasi dengan larutan standar KOH 0,1 N hingga timbul warna merah muda yang stabil. Jika larutan tersebut bersifat alkali (berwarna merah), maka larutan tersebut dititrasi dengan larutan standar HCl 0,1 N hingga warna merah tepat hilang. Pengujian tersebut dilakukan dengan 3 replikasi (BSN, 2021).

Rumus:

asam lemak bebas = $\frac{282xVxN}{B}$ x 100%

Persyaratan mutu maksimal 2,5%

V = KOH 0,1 N yang digunakan (ml)

N= Normalitas

KOH yang digunakan

B = Berat contoh uji (g)

282= berat setara asam oleat ($C_{18}H_{34}O_2$)

3.5.6. Kadar Air

Botol timbang yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu (105±2)°C selama 30 menit (bo) ditimbang. Sebanyak 5 gram contoh uji ditimbang ke dalam botol timbang yang telah dioven (b1). Sampel dipanaskan dalam oven pada suhu (105±2)°C selama 1 jam. Setelah itu, didinginkan dalam desikator lalu ditimbang kembali (b2). Prosedur diulang hingga bobot tetap tercapai. Pengujian dilakukan dengan 3 replikasi (BSN, 2021).

Rumus :

kadar air = $\frac{b1-b2}{b1-b0} x100$

Keterangan :

Kadar air dalam satuan %fraksi massa, persyaratan maksimal 23%

b_o = berat botol timbang kosong (g)

b_1 = berat sampel + botol timbang sebelum pengeringan (g)

b_2 = berat sampel + botol timbang setelah pengeringan (g).

3.5.7. Sterilisasi Alat

Alat yang akan digunakan untuk penelitian ini dilakukan sterilisasi terlebih dahulu. Prosedur sterilisasi yaitu alat-alat tersebut dibungkus menggunakan alumunium foil sedangkan untuk sterilisasi alat dengan atasnya berlubang dapat diberi kapas kemudian dibungkus menggunakan alumunium foil. Sterilisasi dilakukan ke dalam oven pada suhu 170°C selama 1 jam 30 menit.

3.5.8. Pembuatan Media *Muller Hinton Agar*

Media MHA (*Mueller Hinton Agar*) Sebanyak 7,03 gram kemudian dilarutkan ke dalam 185 mL akuades, dan di panaskan di atas hot plate sambil di aduk dengan menggunakan stirer hingga mendidih. Setelah mendidih, kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121º C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.5.9. Pembuatan Media *Nutrient Agar*

Media NA (*Nutrient Agar*) Sebanyak 3,36 gram kemudian dilarutkan ke dalam 120 mL aquades, dan dipanaskan diatas penangas sambil diaduk dengan menggunakan stirer hingga mendidih. Setelah mendidih, kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121º C selamsa 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.5.10. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar*

Media PDA (*Potato Dextrose Agar*) Sebanyak 1,5 gram kemudian dilarutkan ke dalam 60 mL akuades, dan dipanaskan diatas penangas sambil diaduk dengan menggunakan stirer hingga mendidih. Setelah mendidih, kemudian media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121º C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.5.11. Pembuatan Inokulasi Bakteri

3.5.11.1. Bakteri Escherichia coli

Sebanyak satu ose dari kultur murni kemudian ambil media NA padat untuk dilakukan inokulasi dengan menggunakan metode gores dengan cara mengores dari ujung hingga ujung dan diinkubasi dengan suhu 37° selama 1x 24 jam pada bakteri *Escherichia coli.*

3.5.11.2. Jamur Candida Albicans

Sebanyak satu ose dari kultur murni kemudian ambil media PDA padat untuk dilakukan inokulasi dengan metode gores dengan cara mengores dari ujung hingga ujung dan di inkubasi dengan suhu 35° selama 2 x 24 jam pada jamur *Candida albicans.*

3.5.12. Pembuatan Suspensi Setara MC.Farland

Diambil satu tabung yang berisi NaCl 0,9%. Dihomogenkan dan dibandingkan dengan standar kekeruhan Mc.Farland 0,5 (Nuria et al., 2010).

3.5.13. Uji Daya Hambat

Diambil satu suspense bakteri dengan menggunakan catton swab kemudian dibuat 4 lubang pada media, dipipet masing- masing sabun sebanyak 50 mikro liter (dengan sampel 5 gram dalam 10 mL akuades). Dimasukan kedalam masing-masing lubang yang telah di buat dan Inkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C (tanpa di balik), diamati dan ukur diameter.

3.5.14. Metode Sumuran

Pada zona hambat di tandai dengan terbentuknya zona bening pada lubang media dan diukur menggunakan penggaris dan dicatat hasilnya.

3.6. Pengolahan, Penyajian dan Data

3.6.1. Pengolahan Data

Data pengujian yang di dapat pada penelitian adalah hasil dari pengujian dengan parameter SNI 3532:2021 sabun mandi padat serta hasil uji sensitivitas bakteri *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans.*

3.6.2. Penyajian Data

Tabel 3. 1 Hasil evaluasi sabun mandi padat SNI 3532:2021 dan Uji Fisik

No	Kriteria Uji	F0	F1	F2	F3	Standar SNI
1.	Organoleptik					
2.	Stabilitas Busa					
3.	pH					
4.	Bahan tak larut dalam etanol					
5.	Alkali/Asam Lemak Bebas					
6.	Kadar air					

Tabel 3. 2 Hasil Uji Sensitivitas terhadap bakteri Escherichia coli dan jamur Candida Albicans

No	Konsentrasi *Spirulina Sp* Dan Madu	Diameter Zona Hambat
1	0%	
2	0,10%	
3	0,25%	
4	0,50%	

3.6.3. Analisis Data

Data hasil pengujian aktivitas antibakteri *spirulina sp* dan madu dalam sediaan sabun padat terhadap bakteri bakteri *Escherichia coli* dan jamur *Candida albicans*. Setara statistic dengan one way ANOVA menggunakan SPSS. Hasil yang didapat akan bermakna bila terdapat perbedaan yang signifikan apabila perbandingan daya hambat antar formulasi menunjukkan perbedaan nyata secara statistik.