

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini diantaranya *autoclave* (HL-36Ae), Colony Counter Scan 500 (inter science), corong buchner, inkubator (*Memmert*[®]), *Laminar Air Flow* (LAF) (*airtech*), magnetic stirer, mikropipet (Transferpette), pH meter D-71 (LAQUA act), rotary evaporator, Spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik (Metler Toledo X5 205, Dual Range), viskometer brookfield, vortex (Ika[®]MS 3 Digital), waterbath (memmert), dan peralatan gelas lainnya (pyrex).

3.1.2 Bahan

Pada penelitian ini digunakan bahan diantaranya serbuk daun ubi jalar ungu yang diperoleh dari Temu Kencono Semarang yang kemudian diekstraksi dengan pelarut etanol 70% (Brataco) di Laboratorium Biologi Farmasi, Aquadest, Asam Klorida Pekat (Merck), Asam Stearat (Brataco), BHT (*Butil Hidroksi Toluena*) (Brataco), CMC (*Carboxymethyl Cellulose*) (Brataco), *Dey/Engley Neutralizing* (Himedia), DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) (Xiangnan), FeCl₃, HCL 2N (Merck), KOH (*Kalium Hidroksida*) (Brataco), Minyak Zaitun (Brataco), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Oxoid), *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid), *Nutrient Broth* (NB) (Oxoid), *Paper Disk Blank* (Oxoid), Propilenglikol (Brataco), Serbuk Mg (*Magnesium*) (Brataco), SLS (*Sodium lauryl sulfate*) (Brataco), Oleum Strawberry (Lansida), *Yellow dan Blue Tip*. Semua bahan diperoleh dari Laboratorium Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dengan kualitas farmasetis.

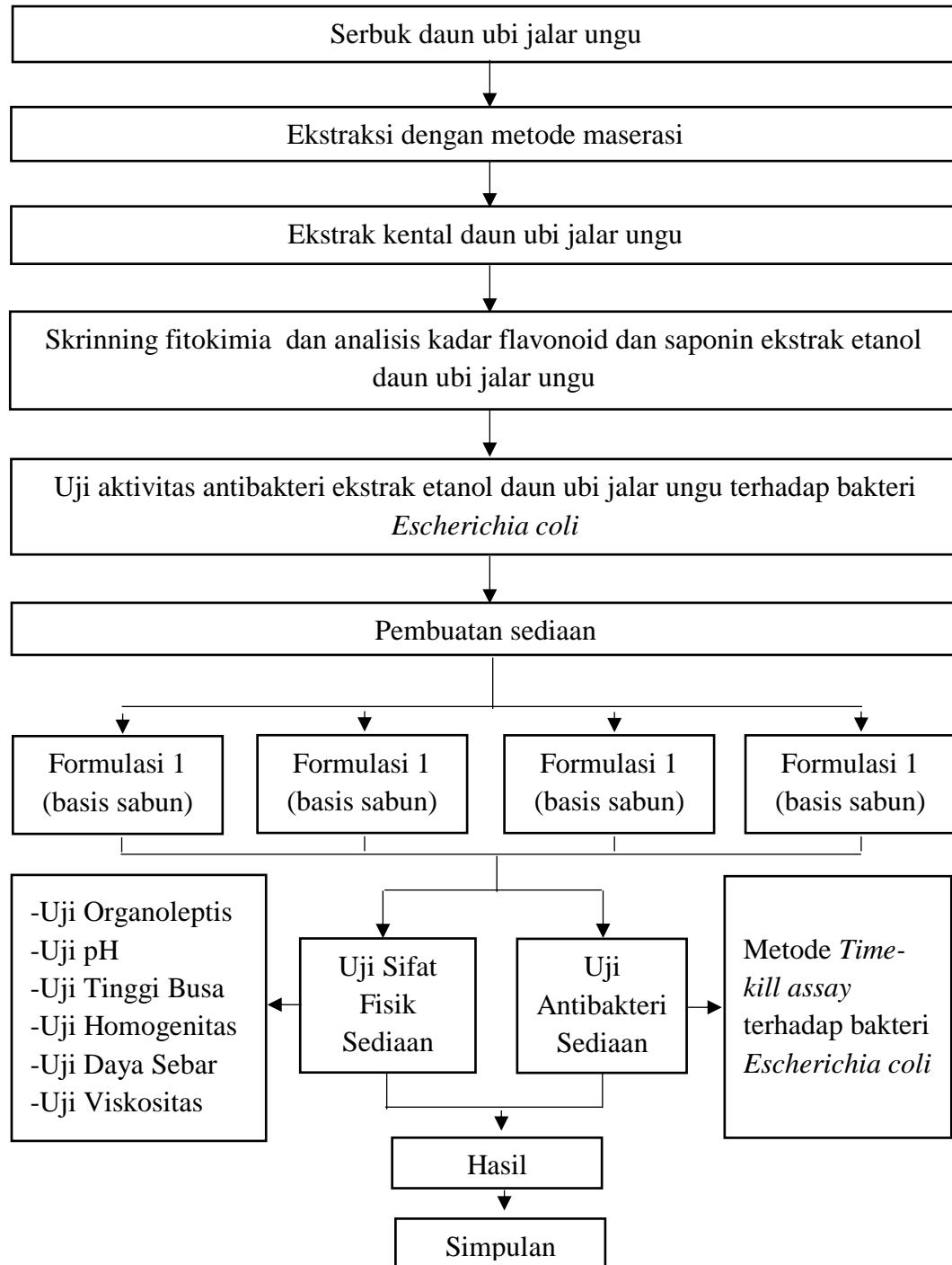
Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli*, yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta yang telah lulus uji dibuktikan dengan sertifikat lulus pengujian.

3.2 Cara Penelitian

Sistematika kerja pada penelitian ini berisi urutan proses mulai dari pembuatan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu, uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun ubi jalar ungu terhadap bakteri *Escherichia coli*, pembuatan sabun

mandi cair sebanyak 4 formulasi, dan evaluasi sediaan sabun mandi cair berupa uji fisik sediaan, serta uji antibakteri sediaan sabun mandi cair ekstrak etanol daun ubi jalar ungu terhadap bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode *Time-Kill Assay*.

3.2.1 Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian

3.2.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu

Proses pembuatan ekstrak daun ubi jalar ungu dilakukan dengan cara maserasi. Maserasi pertama menggunakan perbandingan 1 : 5, sebanyak 200 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah, kemudian direndam dengan larutan etanol 70 % sebanyak 1000 ml, wadah ditutup selama 5 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, sampel yang direndam tersebut kemudian disaring menggunakan corong buchner, menghasilkan filtrat 1 dan ampas 1. Dengan perbandingan 1:3, ampas 1 tersebut kemudian direndam kembali dengan larutan etanol 70%, ditutup dengan penutup wadah dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 2 hari, dilakukan penyaringan kembali dengan menggunakan corong buchner sehingga menghasilkan filtrat 2 dan ampas 2. Kemudian Filtrat 1 dan 2 dicampurkan menjadi satu dan disaring kembali dengan menggunakan kertas saring untuk memastikan tidak ada ampas pada filtrat tersebut. Lalu, selanjutnya filtrat dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C, tekanan 174 atm, dan kecepatan 600 rpm sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan disimpan dalam desikator untuk menjaga kestabilan ekstrak daun ubi jalar ungu (Rangotwat *et al.*, 2016).

3.2.3 Uji Skrinning Fitokimia dan Analisis Kadar Flavonoid dan Saponin Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu

Skrinning fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa secara cepat yang terkandung dalam suatu tanaman. Metode skrinning fitokimia dilakukan dengan melihat perubahan warna setelah ditambahkan pereaksi warna (Minarno, 2015).

Pengujian skrinning fitokimia ini untuk mengetahui atau membuktikan kebenaran adanya senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang bekerja sebagai antibakteri. Uji skrinning fitokimia yang dilakukan diantaranya:

3.2.3.1 Uji Flavonoid

Pengujian ini dilakukan untuk membuktikan kebenaran adanya senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun ubi jalar ungu sebagai antibakteri. Sebanyak 2 gram ekstrak daun ubi jalar ungu ditambahkan air panas sebanyak 10 ml kemudian dipanaskan lagi kurang lebih selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan sedikit serbuk Magnesium dan 1 ml Asam Klorida pekat kemudian dikocok. Apabila

terjadi perubahan warna menjadi merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Kaseng *et al.*, 2016).

3.2.3.2 Uji Polifenol

Pengujian ini dilakukan untuk membuktikan kebenaran adanya senyawa saponin, dilakukan dengan cara sebanyak 2 ml larutan ekstrak etanol daun ubi jalar ungu ditambahkan dengan beberapa tetes FeCl_3 . Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa polifenol (Lestari *et al.*, 2015).

3.2.3.3 Uji Saponin

Pengujian ini dilakukan untuk membuktikan kebenaran adanya senyawa saponin, dilakukan dengan cara sebanyak 10 ml larutan uji dalam tabung reaksi dikocok vertikal selama 10 detik kemudian dibiarkan selama 10 detik. Pembentukan busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, dan pada penambahan 1 tetes HCl 2N, busa tidak hilang (Nirwana *et al.*, 2015).

3.2.3.4 Analisis Kadar Flavonoid dan Saponin

Pengujian flavonoid total equivalen standar rutin dan pengujian saponin total menggunakan spektrofotometri UV-Vis yang dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.2.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu terhadap Bakteri *Escherichia coli*

3.2.4.1 Pembuatan Media Tumbuh Bakteri *Escherichia coli*

Media tumbuh untuk bakteri *Escherichia coli* dibuat dalam 2 macam. Media tumbuh bakteri yang mampu bertahan lama yaitu *Nutrient Agar Slant* (media agar miring). Sebanyak 1,68 gram media *Nutrient Agar* dilarutkan dalam 60 ml aquadest, kemudian dipanaskan di *microwave* hingga larut. Selanjutnya dimasukkan dalam tabung reaksi masing-masing 7 ml dan ditutup dengan kapas, lalu disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 2 jam. Kemudian media dimiringkan 45° hingga mengeras. Penggunaan media ini dilakukan untuk pengembangbiakkan bakteri, dengan cara menggoreskan bakteri *Escherichia coli* secara zig-zag menggunakan ose dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Fahri *et al.*, 2015).

Media tumbuh lain yang digunakan yaitu *Nutrient Broth*. Sebanyak 0,26 gram *Nutrient Broth* dilarutkan 20 ml aquadest yang dipanaskan menggunakan *microwave* hingga bening. Kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml kemudian ditutup dengan kapas dan disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 2 jam. Pengembangbiakan bakteri menggunakan media ini dilakukan dengan cara memindahkan bakteri *Escherichia coli* secara diaduk perlahan pada media menggunakan ose dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Fahri *et al.*, 2015).

3.2.4.2 Pengujian Ekstrak terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Ekstrak kental daun ubi jalar ungu dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%, kemudian dilarutkan menggunakan DMSO 10% dalam labu ukur 10 ml. Kemudian *paper disk blank* diinjekkan 20µL dari masing masing konsentrasi yang telah dibuat. Dibiarkan kurang lebih selama 15 menit. *Paper disk blank* yang telah diinjekkan dengan berbagai konsentrasi, diletakkan pada petri disk yang telah berisi media dan bakteri. Pada masing-masing petri disk diberi kontrol negatif (DMSO 10%) sebagai pembanding (Astuti, 2015).

Penentuan kadar hambat minimal (KHM) dari masing-masing seri kadar dilihat dari kejernihan yang terbentuk pada petri disk yang telah diisi dengan paper disk ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yang diukur diameter kejernihannya menggunakan *Colony Counter Scan 500* (Angelina *et al.*, 2015).

3.2.5 Pembuatan Sediaan Sabun Cair Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu

Formulasi sediaan sabun cair yang akan dibuat berbeda konsentrasi, yaitu 4%, 6%, dan 8% (Kasenda, 2016). Dapat dilihat pada tabel 3.1. Pertama-tama minyak zaitun ditambahkan dengan strawberry oil, diaduk hingga homogen menggunakan magnetik stirer pada suhu 50-60°C dengan kecepatan 500 rpm. Ditambahkan asam stearat dan BHT yang telah dilelehkan. Kemudian ditambahkan propilenglikol, diaduk hingga homogen. Ditambahkan KOH 10% ditunggu hingga homogen dan mendapatkan sabun pasta. Sabun pasta kemudian ditambahkan CMC yang telah dikembangkan menggunakan aquadest panas. Ditambahkan SLS yang telah dilarutkan dengan aquadest. Ditambahkan ekstrak daun ubi jalar ungu sebagai

zat aktif sesuai dengan masing-masing konsentrasi pada formulasi. Ditambah aquades hingga volume 50 ml.

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Sabun Mandi Cair

Bahan	F1 (basis)	F2 (4%)	F3 (6%)	F4 (8%)
Ekstrak Daun Ubi	0	2 g	3 g	4 g
Jalar Ungu				
Minyak Zaitun	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
KOH 10%	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
CMC	1 g	1 g	1 g	1 g
SLS	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Asam Stearat	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
Propilenglikol	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml
BHT	0,01 g	0,01 g	0,01 g	0,01 g
Strawberry Oil	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Aquadest	Hingga 50 ml	Hingga 50 ml	Hingga 50 ml	Hingga 50 ml

Keterangan : F1 : Formula sediaan sabun mandi cair tanpa zat aktif
 F2 : Formula sediaan sabun mandi cair dengan zat aktif 4%
 F3 : Formula sediaan sabun mandi cair dengan zat aktif 6%
 F4 : Formula sediaan sabun mandi cair dengan zat aktif 8%

3.2.6 Pengujian Sifat Fisik Sediaan Sabun Mandi Cair Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu

Pengujian sifat fisik dari sediaan sabun mandi cair ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dilakukan untuk mengetahui kualitas sediaan yang bagus menurut SNI (Standar Nasional Indonesia) nomor 06-4085-1996 tentang sabun mandi cair. Adapun sifat fisik yang diujikan yaitu:

3.2.6.1 Pengujian Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati perubahan bentuk, bau, dan warna dari sediaan dilakukan dengan tiga formulasi (Mutmainah and Franyoto, 2015).

3.2.6.2 Pengujian pH

Nilai pH merupakan nilai yang menunjukkan derajat keasaman suatu bahan. Uji pH sabun mandi cair dilakukan dengan menggunakan pH meter dengan pH sabun mandi cair yang diharapkan masuk ke dalam rentang standar pH pada SNI 06-4085-1996, yaitu pH 8-11. Cara pengujian pH sangat sederhana, yaitu dengan memastikan terlebih dahulu apakah pH meter telah dikalibrasi, selanjutnya elektroda yang telah dibersihkan dengan aquadest dicelupkan kedalam sampel sabun mandi cair yang akan diperiksa pada suhu ruang (Kasenda *et al.*, 2016).

3.2.6.3 Pengujian Tinggi Busa

Dimasukkan aquades dan sabun mandi cair dengan perbandingan 9:1 kedalam tabung reaksi. Diputar menggunakan vortex mixer selama 5 menit. Diukur tinggi busa yang terdapat pada tabung reaksi, selanjutnya tabung didiamkan selama 1 jam. Kemudian diukur kembali tinggi busa yang masih tertinggal dan dihitung persentase kestabilan busa (Nauli *et al.*, 2015).

3.2.6.4 Pengujian Homogenitas

Tiap formula sabun mandi cair ekstrak etanol daun ubi jalar ungu ditimbang sebanyak 0,1 gram. Diletakkan pada *object glass*, kemudian diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 100 kali (Mutmainah and Dwi Franyoto, 2015).

3.2.6.5 Uji Daya Sebar

Tiap formula sabun mandi cair ekstrak etanol daun ubi jalar ungu ditimbang sebanyak 0,5 gram diletakkan diatas kaca objek berskala kemudiaan diatas sediaan diletakkan kaca arloji lain dan pemberat 150 gram, selanjutnya didiamkan selama 1 menit. Dicatat diameter penyebaran dan hitung luas penyebaran. Hasil yang baik daya sebar berkisar dari 5,5 - 6,5 cm (Abu *et al.*, 2015).

3.2.6.6 Uji Viskositas

Pengukuran dilakukan dengan alat viskometer Brookfield LV dengan spindle nomor 64. Kekentalan larutan diukur pada kecepatan pengadukan 20, 30, 50, dan 100 rpm. Hasil yang baik berkisar dari 400 sampai 4000 (Nauli *et al.*, 2015; Yulianti *et al.*, 2015).

3.2.7 Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Sabun Mandi Cair Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar Ungu terhadap Bakteri *Escherichia coli*

Sediaan yang telah dibuat sesuai dengan formulasi diujikan terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan metode *Time-Kill*. *Time-kill* adalah metode yang digunakan untuk melihat waktu mati bakteri. Metode ini menggunakan media *Dey/Engley Neutralizing* yang berfungsi sebagai penetralisir atau sebagai penghenti aktivitas dari kerja sabun.

Sesuai penelitian oleh Wijana 2011, waktu kontak sabun terhadap kulit manusia berkisar antara 5-10 menit. Sehingga pada penelitian ini, kami menggunakan parameter waktu dari 1, 2, 3, 5, dan 7 menit.

Sediaan sabun mandi cair pada formulasi 1 sebanyak 900 μL ditambahkan dengan 100 μL bakteri, dihitung 1, 2, 3, 5 dan 7 menit sejak kontak awal sediaan dengan bakteri. Kemudian dilakukan pengambilan sampel sebanyak 10 μL dari masing-masing menit tersebut dan dimasukkan kedalam masing-masing 90 μL *D/E Neutralizing*. Didiamkan selama 30 menit kemudian digoreskan menggunakan ose kedalam media *Mueller Hinton Agar*. Semua perlakuan tersebut dilakukan di dalam LAF. Selanjutnya diinkubasi 24-48 jam pada inkubator. Dilihat bakteri yang mati pada media tersebut. Selanjutnya dilakukan pada formulasi 2, 3, dan 4 (Kim *et al.*, 2015).

3.3 Analisis Hasil

Analisis hasil dilakukan secara deskriptif. Data yang diperoleh dari hasil penelitian yaitu pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun ubi jalar ungu diperoleh diameter zona hambat yang digunakan untuk menentukan dosis dari ekstrak etanol daun ubi jalar ungu untuk pembuatan sabun. Selanjutnya pengujian sifat fisik sediaan sabun mandi cair ekstrak etanol daun ubi jalar ungu yaitu pengujian organoleptis, pengujian pH, pengujian tinggi busa, pengujian homogenitas, pengujian daya sebar, dan pengujian viskositas sediaan sabun mandi cair ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dibandingkan dengan acuan. Pengujian aktivitas antibakteri sediaan sabun mandi cair ekstrak etanol daun ubi jalar ungu dengan metode *Time-Kill Assay* dilakukan dengan pengamatan secara visual dan dibandingkan dengan jurnal.