BAB III
METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian eksperimental sebagai jenis penelitian yang digunakan untuk mengoptimasi formula sabun cair ekstrak daun kersen dengan kombinasi VCO (minyak kelapa murni) atau *virgin coconut oil* dan minyak zaitun *(Olive Oil).*

B. Lokasi dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta selama Juni sampai Agustus 2022.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Perbandingan komposisi sabun cair dengan basis *Virgin Coconut Oil* (VCO) dan minyak zaitun *(Olive Oil)* sabun cair dari ekstrak daun kersen.
2. Variabel terikat : pH, viskositas, alkali bebas, stabilitas busa, bobot jenis, bahan aktif dan cemaran mikroba.
3. Variabel terkendali : Kecepatan pengadukan dan suhu yang digunakan.

D. Definisi Operasional

1. Sabun cair dari ekstrak daun kersen yaitu produk sabun cair yang diperoleh melalui kombinasi minyak kelapa murni (VCO) dan minyak zaitun yang memiliki bahan aktif dari ekstrak daun kersen.
2. Ekstrak kersen yaitu ekstrak kental yang diperoleh dari maserasi serbuk daun kersen dengan pelarut etanol 70%.
3. *Simplex Lattice Design* (SLD) yakni metode yang dapat dimanfaatkan untuk mengetahui pengaruh faktor dan interaksi secara bersamaan.

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

E. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah oven (Memmert), timbangan analitik (Ohaus), *hotplate* (Ika® C-MAG HS7), viskometer *Brookfield* tipe DV-E, pH-meter (Hanna), *moisture analyzer* (Ohaus), grinder, bejana maserasi, mortir, stamper, ayakan 40 mesh, kompor listrik dan alat-alat gelas laboratorium (*iwaki pyrex*).

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun kersen, *Virgin Coconut Oil* (farmasetis), minyak zaitun (farmasetis), CMC-Na (farmasetis), asam stearate (farmasetis), *citrus oil*, butilhidroksi toluene BHT (farmasetis), KOH (farmasetis), asam sitrat (farmasetis), gliserin (farmasetis), etanol 70% (teknis), etanol 96% (teknis), metil paraben (farmasetis), $FeCl_3$ *(p.a)*, magnesium (farmasetis), HCl *(p.a)*, dan akuades.

F. Pelaksanaan Penelitian

1. Pengambilan bahan

Daun kersen (*Muntingia calabura L.*) yang dipanen adalah bagian daun sesuai kriteria, antara lain daun harus mendatar, helaian daun simetris, tepi bergerigi, ujung runcing, serta daun yang petik yaitu daun yang terletak pada tangkai nomor 3, 4, 5 dan 6 dari pucuk, dipanen dari Desa Gamping Kecamatan Ngotirto, kabupaten Bantul, Yogyakarta. Daun kersen dicuci hingga bersih dan dikeringkan. Selanjutnya daun kersen dikeringkan kembali menggunakan oven selama 4 hari, dan dihaluskan dengan grinder. Kemudian serbuk diayak menggunakan ayakan 40 mesh sampai didapat serbuk sebanyak 1 kg.

2. Ekstraksi daun kersen

Sebanyak 1 kg serbuk daun kersen dimaserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 dan direndam selama 4 hari. Hasil maserasi disaring dan filtratnya disimpan. Filtrat hasil maserasi kemudian dipekatkan diatas

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

kompor listrik menggunakan wajan pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental. Hasil ekstrak kental yang diperoleh, dihitung rendemennya.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobok serbuk simplisa}} \text{x}100\ \% \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(2)$$

3. Karakterisasi ekstrak etanol daun kersen
   a. Uji Organoleptis

      Ekstrak daun kersen dilakukan pengujian organoleptis melalui observasi fisik secara langsung untuk mengetahu warna, bau, dan teksturnya.
   b. Uji pH

      1 gram ekstrak daun kersen dilarutkan dalam 10 ml akuades dan diukur menggunakan alat pH-meter.
   c. Penetapan *moisture content*

      1 gram ekstrak daun kersen dimasukkan ke dalam cawan *moisture analyzer*. Sampel diratakan dan dinyalakan alat *moisture analyzer* pada suhu 105°C. Hasil kadar air yang diperoleh dicatat (Eka *et al*., 2017).
   d. Skrining Fitokimia
      1. Uji kandungan flavonoid

         0,5 g ekstrak etanol daun kersen dilarutkan dalam 1 ml etanol 96%. Selanjutnya 0,1 g serbuk Mg dan 10 ml HCl pekat ditambahkan. Ekstrak positif mengandung flavonoid jika hasil reaksi memberikan warna merah jingga atau merah bata.
      2. Uji kandungan saponin

         0,5 gram ekstrak etanol daun kersen dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya 10 ml air panas ditambahkan. Lalu tabung reaksi didinginkan dan dikocok selama 10 detik sehingga terbentuk buih sekitar 10 menit. Apabila buih tersebut tidak hilang setelah ditambahkan setetes HCl 2N, maka ekstrak tersebut mengandung saponin.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

3. Uji kandungan tanin

   Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun kersen diencerkan dengan 10 ml air suling sampai tidak berwarna. Kemudian 2 ml sampel diambil dan ditambahkan 2 tetes $FeCl_3$ 10%. Perubahan wara biru-hijau menunjukkan ekstrak tersebut mengandung tanin.

4. Uji kandungan terpenoid

   Ekstrak dilarutkan dalam kloroform kemudian ditambahkan 5 tetes pereaksi Liebermann-Bouchard (asam asetat anhidrat-H_2SO_4) dan digojok hingga homogen. Hasil positif ditunjukan dengan adanya warna hijau sampai kehitaman.

5. Uji kandungan alkaloid

   Ekstrak daun kersen dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3-4 tetes pereaksi meyer dan digojok sampai homogen. Hasil positif alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan putih.

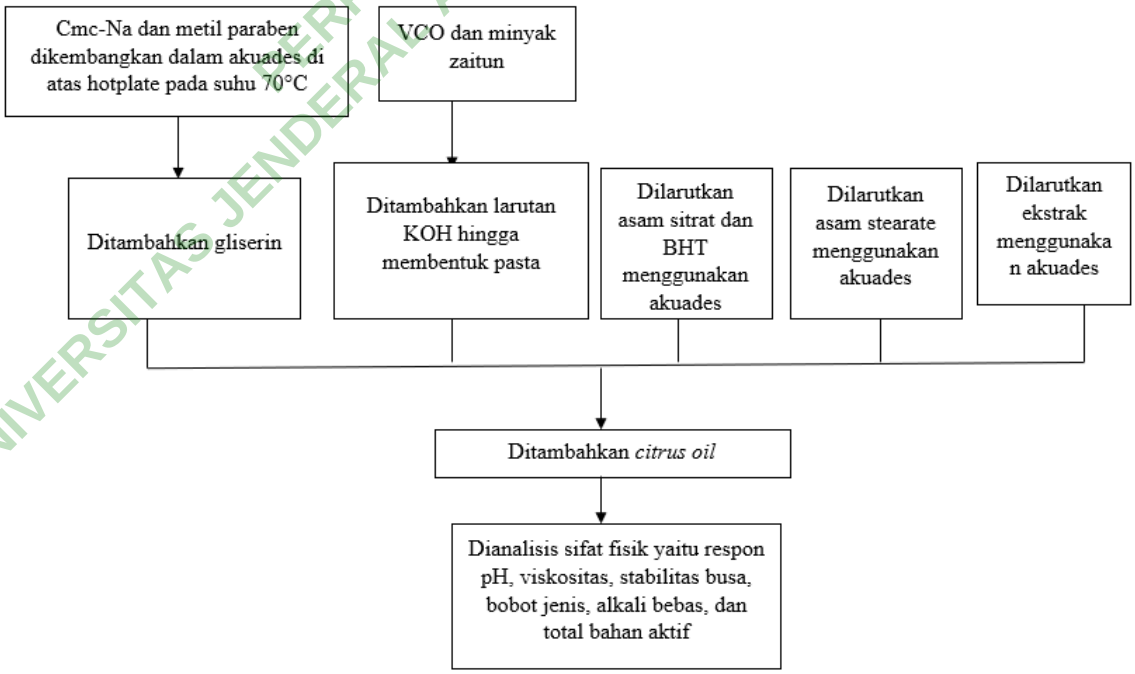
4. Optimasi formula sabun dari ekstrak daun kersen kombinasi VCO dan minyak zaitun.

   Formula yang digunakan pada penelitian ini merupakan hasil modifikasi dari formula sabun cair yang dibuat oleh Brigitta (2020). Formula yang diganti yaitu ekstrak daun kersen sebagai zat aktif dan basis yang digunakan yaitu variasi VCO dan minyak zaitun. Optimasi sabun cair ekstrak daun kersen dilakukan dengan menggunakan metode *Simplex lattice design* dengan variasi konsentrasi kedua komponen yang dioptimasi yaitu VCO dan minyak zaitun. Tahap pertama dalam pembuatan sabun cair yaitu ditimbang semua bahan terlebih dahulu, sesuai dengan rancangan run sabun cair yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 8 run yang dapat dilihat pada tabel 3. Tahap selanjutnya yaitu proses pembuatan sabun cair dapat dilihat pada gambar 6. Untuk hasil rata-rata dari respon pengujian yang diperoleh akan diolah menggunakkan sofware design expert yntuk menentukan formula optimum.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Tabel 3. Optimasi Formula Sabun Cair Ekstrak Daun Kersen kombinasi VCO dan minyak zaitun menggunakan *Simplex Lattice Design* (Brigitta, 2020)

Bahan	Run							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ekstrak daun kersen (g)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Virgin coconut oil (VCO) (g)	30	22,5	7,5	0	15	0	30	15
Minyak zaitun (g)	0	7,5	22,5	30	15	30	0	15
KOH 20% (ml)	18	18	18	18	18	18	18	18
Asam stearat (g)	9	9	9	9	9	9	9	9
CMC-Na (g)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Asam sitrat (g)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Gliserin (g)	10	10	10	10	10	10	10	10
BHT (g)	1	1	1	1	1	1	1	1
Metil paraben (g)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Citrus oil (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2
Akuades (ml)	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100



Gambar 6. Skema Kerja Pembuatan Sabun Cair

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN

5. Evaluasi sediaan sabun cair ekstrak daun kersen

a. Uji organoleptik

Pengamatan fisik sampel dilakukan secara langsung untuk mengetahui warna, bau, dan tekstur dari sabun cair (Murti *et al.*, 2018).

b. Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara menempelkan sampel yang akan diuji pada kaca yang sesuai guna mengetahui tingkat homogenitas sabun cair (Murti *et al*., 2018).

c. Uji pH

Uji ini dilakukan dengan menimbang 1 gram sampel sabun cair dan diencerkan dengan 10 ml akuades. pH diukur menggunakan alat pH-meter (Paramita *et al*., 2014)

d. Uji viskositas

Pengujian viskositas sampel sabun cair ditentukan menggunakan viskometer *Brookfield* tipe DV-E dengan *spindle* nomor 4 pada kecepatan 100 rpm dan direplikasi sebanyak 3 kali (Laksana *et al*., 2017).

e. Uji stabilitas busa

1 gram sampel sediaan dilarutkan dalam 30 ml akuades. Kemudian 10 ml larutan dimasukan ke dalam tabung reaksi melalui dinding tabung reaksi. Tabung reaksi tersebut ditutup dan di-vortex selama 2 menit. Kemudian tinggi busa diukur pada menit pertama dan kelima. Stabilitas busa dapat dihitung pada persamaan 3 dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Stabilitas busa} = \frac{H}{Ho} x100\% \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (3)$$

Dimana Ho adalah pengukuran ketinggian busa awal pada menit ke 1 dan H adalah pengukuran dari tinggi busa setelah 5 menit (Murti *et al*., 2018).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

f. Uji bobot jenis

Bobot piknometer kering dan kosong ditimbang. Air dimasukkan ke dalam piknometer dan didiamkan pada suhu 25°C selama 10 menit. Piknometer diangkat dan ditimbang bobot setelah penambahan air. Cara kerja diulangi dengan menggunakan sampel sabun cair sebagai pengganti air (Hutauruk *et al*., 2020).

g. Uji alkali bebas

Sebanyak 5 g sampel sabun cair di timbang dan dimasukkan ke dalam beaker gelas 250 ml Kemudian 100 mL alkohol 96% dan beberapa tetes larutan indikator fenolftalein di tambahkan. Lalu campuran dipanaskan di atas hotplate selama 25-30 menit hingga mendidih. Bila larutan berwarna ungu kemudian dititrasi dengan larutan HCL 0,1 N sampai warna ungu tepat hilang dan di catat volume titrasi (Korompis *et al*., 2020).

h. Uji total bahan aktif

Uji total bahan aktif dilakukan dengan menghitung selisih antara bahan yang larut dalam etanol dengan bahan yang larut dalam n-Heksana. Untuk mengetahui bahan yang larut dalam etanol, sebanyak (1 ± 0,001) g sampel sabun dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 ml. Ke dalamnya, 20 mL etanol 95% ditambahkan dan dipanaskan selama 30 menit. Setelah itu, larutan sampel disaring dan untuk larutan yang tertinggal dibilas menggunakan etanol 95%. Setelah mencapai suhu ruang, filtrat larutan sampel dipindahkan ke dalam labu ukur 50 ml dan etanol 95% ditambahkan hingga tanda batas. Selanjutnya larutan sampel dipipet sebanyak 20 ml dan dipindahkan ke dalam cawan porselen yang sudah diketahui bobotnya. Larutan etanol dalam sampel diuapkan dan sampel dikeringkan di oven pada suhu 105ºC selama 1 jam. Sampel yang sudah dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam desikator dan ditimbang massanya. Selanjutnya dihitung kadarnya etanol menggunakan persamaan 4:

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

$$C_{et} = \frac{A}{s x (\frac{20}{50})} x\ 100 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(4)$$

Keterangan:

C_{et} : zat larut dalam etanol % fraksi massa

A : sisa zat setelah pengeringan (g)

S: bobot contoh (g)

Untuk mengetahui zat yang larut dalam n-heksana. 2 ± 0,001 g sabun ditimbang dan dimasukkan didalam erlenmeyer 250 ml. 40 ml campuran air-etanol ditambahkan dan disaring. Kemudian 1 ml larutan NaOH 0,5 M dan beberapa tetes larutan indikator fenolftalein ditambahkan hingga larutan bersifat basa. Selanjutnya larutan sampel dicuci sebanyak 3 kali dengan 10 ml larutan n-Heksana. Lapisan n-Heksana dicuci dengan 6 ml larutan campuran air-etanol sebanyak 3 kali dan 6 mL akuades sebanyak 2 kali. Jika terdapat lapisan air, maka natrium sulfat anhidrat ditambahkan. Selanjutnya larutan n-Heksana disaring dan ditampung di dalam labu erlenmeyer 250 mL yang sudah diketahui bobotnya. Larutan diuapkan diatas penangas air dan ditimbang hingga bobotnya tetap. Perhitungan dilakukan menggunakan persamaan 5.

$$C_{n\text{-}hek} = \frac{A}{S} x \frac{1}{5} x100 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots..\ldots(5)$$

Keterangan:

$C_{n\text{-}hek}$: zat yang larut dalam n-Heksana (% fraksi massa)

A : jumlah yang terekstraksi dalam n-Heksana (g)

S : bobot contoh (g)

$\frac{1}{5}$: perbandingan resep dalam prosedur analisis.

Berdasarkan data yang diperoleh dari dua percobaan di atas, kandungan total bahan aktif dapat diolah menggunakan persamaan 6.

$$\text{Total bahan aktif} = (C_{et}) - (C_{n\text{-}hek}) \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(6)$$

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Keterangan

C_{et} : Zat larut etanol (%fraksi massa)

$C_{n\text{-}hek}$: Zat larut n-heksana (%fraksi massa) (Annisa *et al* 2021).

6. Penentuan Formula Optimum

Respon bobot jenis, pH, stabilitas busa, dan total bahan aktif yang signifikan dimasukkan dan dianalisis menggunakan *sofware Design Expert* untuk memprediksi formula optimum dari setiap respon. Kombinasi optimal dari kedua minyak dalam sabun cair ditentukan dari nilai *desirability* yang paling besar.

7. Verifikasi formula optimum

Verifikasi dianalisis menggunakan uji *one sample t-test.* Verifikasi dilakukan dengan membandingkan hasil pengujian sifat fisik pada formula optimum dengan hasil respon optimum yang diprediksi oleh *Design Expert* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil uji dengan hasil prediksi *Design Expert.*

8. Uji cemaran mikroba pada formula optimum

a. Sterilisasi alat

Alat dibersihkan dengan air kemudian dikeringkan. Mulut dari tabung reaksi ditutup menggunakan kapas yang telah dilapisi kain kasa. Kemudian tabung reaksi dibungkus menggunakan kertas payung. Semua dimasukkan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 170°C selama 60 menit.

b. Proses pembuatan BPW

20 gram BPW dilarutkan dengan 1 liter akuades ke dalam elenmeyer yang steril dan dipanaskan di atas *hotplate* hingga larut. Mulut erlemeyer ditutup dan dibungkus kembali menggunakan kertas payung untuk proses sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

c. Pembuatan media PCA

3,6 gram media PCA ditimbang dan dimasukkan media ke dalam erlenmeyer 250 ml. PCA dilarutkan dengan 160 ml akuades dan di panaskan diatas *hotplate* sambil diaduk hingga homogen. Mulut erlenmeyer ditutup dan dibungkus kembali media PCA dengan kertas payung. Media disterilisasi berbarengan dengan BPW dan *blue tip* di autoklaf pada suhu 121°C sampai 15 menit

d. Penyiapan sampel

10 gram sampel sabun cair dimasukkan ke dalam erlemeyer 250 ml. Ditambahkan BPW 90 ml ke dalam sampel dan dikocok sampai homogen. Kemudian pengenceran 10^{-1} diberi label. 6 buah tabung reaksi disiapkan. 1 ml suspensi pengenceran 10^{-1} ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml BPW. Tabung reaksi dikocok hingga homogen sampai didapat pengenceran 10^{-2}. Setelah itu pengenceran bertingkat diulangi sampai pengenceran 10^{-6} . Pengenceran dilakukan secara aseptis.

e. Pengujian sampel ALT

1 ml suspensi diambil pada tiap pengenceran dan dimasukkan dalam cawan petri steril. Masing-masing cawan petri dituangkan 15 ml media PCA kemudian digoyang secara perlahan agar sampel dapat tersebar merata dan didiamkan hingga memadat. Uji kontrol dilakukan untuk mengetahui sterillitas dari setiap media dan pengencer. 15 ml media PCA dan 1 ml pengencer BPW dituangkan dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Cawan petri diinkubasi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni bakteri dihitung menggunakan rumus pada persamaan 7.

$$\text{Koloni per ml atau per gram} = \text{jumlah koloni setiap cawan X} \frac{1}{\text{faktor pengenceran}} \quad \text{.....(7)}$$

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN