BAB III
METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitan ini adalah Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diperoleh dari daerah Kebakkramat, Karanganyar, Jawa tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) muda segar, dan berwarna ungu yang dipetik pada bulan Juli hingga oktober di daerah Kebakkramat, Karanganyar, Jawa tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama penelitian ini adalah pengujian mutu fisik dan stabilitas terhadap sabun kertas (*papersoap*) ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dan aktivitas antibakteri dari ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap bakteri *Staphylococus aureus.*

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi digolongkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diubah-ubah dengan tujuan untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel lainnya. Variabel bebas dari penelitian ini adalah variasi konsentrasi Na-CMC dalam sediaan sabun kertas ekstrak bunga telang.

Variabel tergantung adalah variabel yang diamati untuk mengukur pengaruh yang disebabkan oleh variabel bebas. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri ekstrak bunga telang terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan uji mutu fisik sediaan sabun kertas (Organoleptik, pH, homogenitas, tinggi busa, dan viskositas), serta stabilitas sediaan sabun kertas.

Variabel terikat adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya supaya hasil yang diperoleh tidak tersebar dan tidak dapat diulang oleh peneliti lain secara lengkap. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah

Staphylococcus aureus, bunga telang (*Clitoria ternatea* L.), dan kertas larut dalam air.

3. Definisi operasional variabel utama

Bunga telang merupakan bunga berwarna biru cerah dan ungu yang khas, kelopak berbentuk corong, serta mahkota berbentuk kupu-kupu yang didapatkan didaerah Kebakkramat, Karanganyar, Jawa tengah.

Ekstraksi bunga telang adalah proses penyarian simplisia dengan menggunakan metode meserasi dengan pelarut etanol 96% pada suhu ruang atau suhu kamar.

Sediaan sabun kertas merupakan sediaan sabun cair yang dioleskan kedalam kertas larut dalam air dengan bentuk lapisan film tipis berukuran kurang lebih 7X8 yang berfungsi sebagai sabun cuci tangan penghilang dan pembunuh bakteri dari ekstrak bunga telang.

Mutu fisik dan stabilitas adalah parameter yang dilakukan untuk mengamati mutu fisik (organoleptik, pH, tinggi busa, viskositas, homogenitas) dan stabilitas sabun.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 adalah bakteri berbentuk bulat atau lonjong dan memiliki diameter sebesar 0,8-0,9 µm yang didapatkan dari laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sabun kertas ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) menggunakan metode difusi. Metode difusi merupakan proses uji yang dilakukan dengan cara penanaman benih bakteri menggunakan cawan yang berliang renik yang menggunakan obat dalam jumlah tertentu. Ukuran daya tahan terhadap bakteri yang akan diuji terletak pada zona hambat jernih yang mengelilingi.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk ekstraksi meserasi dan uji fitokimia adalah botol maserasi, saringan, neraca analitik, erlenmeyer, jar kaca, *beakerglass*, tabung reaksi, toples, vacum *rotary evaporator*, oven, *waterbatt*, gelas ukur, pipet tetes, desikator, *ayakan mesh no.60, blender*, *moisture balance.*

Alat untuk membuatan sediaan sabun kertas dan uji mutu fisik sabun kertas meliputi cawan porselin, batang pengadung, loyang ukuran 20X20, *ayakan mesh no.60, beakerglass*, gelas ukur,

erlenmeyer, oven, pipet tetes kaca arloji, viskometer Brookfield tipe DV-E menggunakan spindle no. 2, pH meter, tabung reaksi dan rak, *Sterling-Bidwell, vacuum rotary evaporator,* dan seperangkat KLT.

Alat untuk pengujian aktivitas antibakteri adalah cawan petri, tabung reaksi dan rak, jarum ose, kapas lidi, *autoclave*, inokulasi, *object glass*, mikroskop, *boorprop.*

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) segar berwarna biru dan ungu yang didapatkan dari perkebunan daerah kebakkramat, karanganyar, Jawa tengah.

Bahan ekstraksi dan pengujian ekstrak bunga telang antara lain, pelarut etanol 96% untuk meserasi, reagen dragendroff, etil asetat, H_2SO_4, HCl pekat, *aquadest*, $FeCl_3$, n-heksana, pereaksi mayer.

Bahan untuk formulasi dan uji mutu fisik sediaan sabun kertas adalah minyak zaitun, kalium hidroksida (KOH), asam stearat, Na CMC, *sodium lauryl sulfat* (SLS), *butyl hidroksi anisol* (BHA), *aquadest,* pengaroma *mint, watter solubel* .

Bahan untuk uji antibakteri media MSA (*manitol salt agar*), MHA(*muller hinton agar),* NA(*Nutrient agar),* eksrak bunga telang yang sudah diencerkan.

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari Universitas Setia Budi. Bahan lain yang digunakan meliputi asam stearat, NaCl, KOH, gliserin, EDTA, akuades, dan bahan tambahan kertas *watter soluble*.

D. Jalannya Penelitian

Determinasi tanaman, preparasi sampel, pembuatan serbuk, ekstraksi serbuk bunga telang, pembuatan sabun kertas, pemeriksaan mutu fisik sabun kertas ekstrak bunga telang, pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi telah dilibatkan dalam tahap penelitian ini.

1. Determinasi tanaman

Determinasi tumbuhan digunakan untuk mengetahui keaslian sampel bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan memilih lalu membandingkan karakteristik bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) melalui pengenalan yang dikerjakan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Preparasi sampel

Pada proses pembuatan simplisia dilakukan dengan cara mengumpulkan bunga telang yang masih segar diletakkan pada loyang dan dikeringkan dibawah sinar matahari langsung hingga kering. Tujuan dari pengeringan adalah supaya dapat menghasilkan simplisia yang tahan lama untuk digunakan, tidak hancur, tidak rusak, dan bisa digunakan dalam jangka waktu yang lama. Proses pengeringan dilakukan dengan dijemur pada sinar matahari.

3. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk simplisia merupakan proses awal pembuatan ekstrak serbuk simplisia dibuat dari simplisia utuh atau potongan-potongan halus simplisia yang sudah dikeringkan melalui proses pembuatan serbuk dengan suatu alat tanpa menyebabkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan dan diayak menggunakan ayakan No.40 yang didalam 1 inchi terdapat 40 lubang, hingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan tertentu. Derajat kehalusan serbuk simplisia terdiri dari serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus, dan sangat halus (DepKes RI, 2017).

4. Pembuatan ekstrak

Simplisia ekstraksi bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dibuat dengan metode meserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan satu bagian serbuk kering simplisia dan 10 bagian pelarut. Memasukkan serbuk kering simplisia sebanyak 600 gram kedalam botol kaca gelap, menambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 6000 ml kemudian direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali digojoc. Mendiamkan selama 18 jam. Pisahkan meserat dengan cara penyarian, ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah dari jumlah volume pelarut pada penyarian pertama.

Ketika proses perendaman selesai, selanjutnya mengumpulkan semua filtrat lalu diuapkan menggunakan evaporator vakum (*evaporator* bertekan rendah) atau gunakan *rotary evaporator* dengan suhu 45°C sampai memperoleh ekstrak yang kental. Selanjutnya menghitung nilai rendemen yang didapatkan antara persen berat dan rendemen berat serbuk simplisia yang dipakai untuk menimbang dan menghitung nilai rendemen. Nilai rendemen minimal harus mencapai angka yang ditentukan dalam setiap ekstrak monografi (DepKes RI, 2017).

5. Penetapan organoleptik ekstrak bunga telang

Penetapan organoleptik dapat ditentukan dengan melihat warna, rasa, bau, dan perubahan konsistensi setelah disimpan pada suhu kamar (Shintia *et al*., 2021).

6. Uji bebas etanol ekstrak bunga telang

Pengujian bebas etanol dengan menambahkan ekstak kental bunga telang dengan 2 tetes H_2SO_4 pekat dan 1 ml kalium dikromat. Uji dikatakan bebas etanol jika hasil ekstrak tidak tercium bau etanol (Adiningsih *et al.,* 2006).

7. Uji kadar air serbuk bunga telang

Uji kadar air pada serbuk bunga telang memakai *sterling-bidwell* dengan reagen toluen yang dijenuhkan menggunakan air dan dikocok dengan air kemudian dipisahkan dan dihilangkan lapisan lainnya. Dimasukkan 20 gram sempel serbuk bunga telang. Dimasukkan 200 ml toluen jenuh air kedalam labu dan rakit alat tersebut. Ditambahkan toluen jenuh air kedalam tabung penerima melalui pendinginan ke leher alat penampung. Dipanaskan labu selama 15 menit dengan hati-hati. Ditunggu hingga toluen mendidih, lalu sesuaikan laju penyulingan menjadi sekitar dua tetes per detik sampai sebagian besar air tersuling lalu naikkan laju destilasi secara perlahan sebanyak 4 tetes per detik. Melihat jumlah air setelah air dan toluen benar-benar terpisah. Hitung kadar air dalam % (v/b) dan lakukan pengujian sebanyak 3 kali (Kemenkes RI, 2017).

8. Uji susut pengeringan ekstrak bunga telang

Dimasukkan 2 gram ekstrak bunga telang kedalam alat *moisture balance* menggunakan wadah berlapis *aluminium foil* yang telah ditandai, kemudian diamati susut pengeringannya pada suhu 105°C hingga alat secara otomatis menunjukkan angka konstan dan lakukan pengujian sebanyak 3 kali (DepKes RI, 2017).

9. Uji kandungan kimia ekstrak bunga telang

Identifikasi dilakukan dengan tujuan memastikan senyawa kimia dalam ekstrak bunga telang.

9.1 Identifikasi flavonoid. Mencampurkan ekstrak bunga telang dengan aquadest hingga 5 gram. Memanaskan dalam waktu lima menit dan saring 0,1 gram serbuk magnesium, 1 ml HCl pekat (hidroksida), dan 5 ml amil alkohol ditambahkan kedalam total 5 ml filtrat ekstrak bunga telang, kemudian diaduk dan dipisahkan. Bila terbentuk warna kuning, merah, atau jingga pada lapisan amil alkohol, bahwa positif terkandung flavonoid (Maslahat, 2017).

9.2 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 0,5 g ekstrak ditambahkan beberapa tetes HCl 1%, setelah larut kemudian ditambahkan 1 ml pereaksi mayer. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya endapan atau larutan yang berubah menjadi keruh (Sudjarwo, 2017).

9.3 Identifikasi triterpenoid. Sebanyak 0,5 mg ekstrak ditimbang kemudian dilarutkan dengan menggunakan air sebanyak 10 ml. Selanjutnya ekstrak yang sudah larut diambil sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan dengan 3 tetes HCl pekat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau ungu (Septianingsih *et al*., 2014).

9.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 500 mg ekstrak dilarutkan dengan 4 ml air, selanjutnya ekstrak yang sudah larut diambil sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan 1 ml $FeCl_3$ 10%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan (Robinson *et al*., 2014).

9.5 Identifikasi saponin. Dimasukkan 0,5 g ekstrak kedalam tabung reaksi, tambahkan 10 ml air panas, dikocok kuat-kuat selama 10 detik setelah pendinginan. Jika campuran membentuk busa dengan tinggi 1-10, campuran akan tetap stabil setidaknya selama 10 menit dan dengan penambahan 1 tetes HCl 2N tidak hilang maka hasil positif saponin (Depkes RI, 1995).

9.6 Identifikasi steroid. Ditimbang sebanyak 1 g sampel dilakukan uji maserasi selama 2 jam dengan 20 ml *n*-heksan dan disaring. Uapkan filtrat dalam cawan penguap. Residu ditambahkan dengan pereaksi *Liebermann-Burchad* yang berisi anhidrida asetat dan asam sulfat pekat (2:1) beberapa tetes. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru atau biru hijau (Hasborne, 1987).

10. Uji aktivitas antibakteri ekstrak bunga telang metode sumuran

Ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) yang diperoleh diuji aktivitas antibakteri terlebih dahulu dengan metode difusi sumuran. Hasil pengujian didasarkan pada pengukuran diameter zona bening. Konsentrasi ekstrak bunga telang yang digunakan adalah 15%, ekstrak bunga telang dicampurkan dengan *dimetilsulphoxide* (DMSO) pada konsentrasi 100 mg/ml. DMSO digunakan sebagai kontrol negatif pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak bunga telang dan kontrol positif menggunakan ciprofloxacin. Tahapan prosedur pengujian meliputi sterilisasi peralatan, penyiapan sampel dan pemeliharaan biakan murni

bakteri uji, pembuatan media dan inokulasi. Dibuat tiga sumuran dengan menggunakan *boorprof* pada media MHA yang berisi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan diameter 6 mm. Sebanyak 50µl larutan ekstrak dipipetkan menggunakan mikropipet dan masukkan ke dalam lubang sumuran yang sudah *boor*, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan dilakukan pengamatan lalu ukur diameter zona hambat (Alhuda, 2020).

11. Formula sabun cair ekstrak bunga telang

Pembuatan sabun cair ekstrak bunga telang diawali dengan menentukan suatu formulasi yang akan digunakan Perencanaan formula yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Rancangan Formula Sabun Cair Ekstrak Bunga Telang

Bahan	Satuan	Formula			
		Kontrol Negatif	I	II	III
Ekstrak bunga telang	%	-	15%	15%	15%
Minyak zaitun	ml	10	10	10	10
KOH 10%	ml	5	5	5	5
Na CMC	g	3%	3%	4%	5%
SLS	g	1	1	1	1
Asam stearat	g	0,25	0,25	0,25	0,25
BHA	g	0,5	0,5	0,5	0,5
Pengaroma *mint*	ml	1	1	1	1
Aquades ad	ml	100	100	100	100

Keterangan:
F1: *papersoap* ekstrak bunga telang dengan Na-CMC 3%
F2: *papersoap* ekstrak bunga telang dengan Na-CMC 4%
F3: *papersoap* ekstrak bunga telang dengan Na-CMC 5%
Kontrol -: *papersoap* tanpa ektrak bunga telang
Kontrol +: Sabun cair "dettol "

12. Pembuatan sabun cair ekstrak bunga telang

Siapkan bahan yang akan digunakan untuk membuat sabun cair, kemudian timbang masing-masing bahan sesuai dengan formula yang ditetapkan. Setelah itu minyak zaitun dimasukkan kedalam gelas kimia dan ditambahkan KOH10% sedikit demi sedikit sambil terus diberikan pemanasan pada suhu 50-70°C hingga didapat sabun pasta. Sabun pasta yang telah terbentuk kemudian ditambahkan *aquadest* 15 ml, setelah itu ditambahkan Na-CMC yang sebelumnya telah dikembangkan dengan akuades panas, aduk ad homogen dan tambahkan (SLS) aduk ad homogen. Kemudian ditambahkan asam stearat, aduk ad homogen, ditambahkan BHA, aduk hingga homogen. Dimasukkan ekstrak bunga telang, diaduk hingga homogen. Sabun cair ditambahkan hingga volumenya 100 ml, setelah itu diberikan pengaroma *mint* dan diaduk hingga homogen. Selanjutnya siapkan loyang ukuran 20X20 tambahkan selembar *waterr*

soluble paper dan oleskan sabun cair yang sudah homogen tadi, kemudian oven selama 5-10 menit dengan suhu 30°C. Keluarkan dari oven, diamkan hingga dingin kemudian potong menjadi kurang lebih ukuran 4X7 cm. Pembuatan sabun cair ekstrak bunga telang disesuaikan untuk masing-masing formula (Ering *et al*., 2020) .

13. Pengujian mutu fisik sediaan sabun

Pengujian mutu fisik sediaan sabun kertas meliputi organoleptis, pH, tinggi busa, viskositas, homogenitas.

13.1 Pengujian organoleptis. Sediaan yang sudah selesai diformulasikan setelah itu dilakukan pengamatan organoleptis dengan panca indra antara lain warna, bau, dan bentuk sediaan (SNI, 1996).

13.2 Pengujian pH, Diambil 1 lembar sabun kertas yang akan dilakukan pemeriksaan kemudian ditambahkan akuades hingga 10 ml kocok ad larut. Kalibrasi pH meter, setelah itu pH meter dimasukkan kedalam larutan sabun kertas yang telah diencerkan. Tunggu sampai indikator pH atau elektroda pH meter memperlihatkan nilai pH yang stabil (Korompis *et al*., 2020).

13.3 Pengujian tinggi busa. Pemeriksaan tinggi busa dilakukan dengan metode yang sederhana, yaitu dengan memasukkan 1 lembar sabun kertas kedalam tabung berskala 10 ml, lalu tambahkan akuades dan tabung ditutup. Kocok selama 20 detik dan hitung tinggi busa yang terbentuk (Korompis *et al*., 2020).

13.4 Pengujian viskositas. Pemeriksaan viskositas sediaan sabun kertas dilakukan menggunakan alat viskometer (Rasyadi *et al*.,2019). Dilakukan dengan mengambil 3 lembar sabun kertas, dilarutkan dengan 200 ml air dan aduk ad larut. Pemeriksaan menggunakan viskometer Brookfield tipe DV-E menggunakan spindle no. 2 pada kecepatan 100 rpm dan shear rates yang sama dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Adjenng *et al*.,2019)..

13.5 Pengujian homogenitas. Pengujian homogenitas dilakukan dengan mengambil 1 lembar sabun kertas diletakkan pada *object glass* kemudian diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 100 kali untuk dapat melihat ada tidaknya partikel-partikel pada sediaan (Setiawan, 2021).

14. Pengujian stabilitas

Stabilitas sabun kertas diperiksa dengan metode *cycling test*, menggunakan metode ini uji stabilitas dilakukan sebanyak 6 siklus dengan cara menyimpan sampel sediaan sabun kertas ekstrak bunga telang pada loyang dengan suhu ± 4°C dan 40°C selama 24 jam, proses

tersebut adalah 1 kali siklus dan diulangi sebanyak 6 kali (Suryani *et al*., 2017).

15. Penyiapan sterilisasi

15.1 Sterilisasi alat. Semua alat yang akan dipergunakan pada penelitian dicuci bersih kemudian dikeringkan dan dibungkus menggunakan kertas perkamen. Alat-alat seperti tabung reaksi dan erlenmeyer terlebih dahulu disumbat atau ditutup dengan kapas. Alat yang akan digunakan disterilisasikan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Akuades yang digunakan harus steril, pembuatan akuades steril dilakukan dengan *autoclave* selama pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm (Panglinan *et al*.,2015) .

15.2 Sterilisasi media. Media yang akan digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu dibungkus dengan kertas. Setelah itu buka tutup *autoclav* dan aluminiumnya kemudian media dimasukkan kedalam *autoclav*, *autoclav* ditutup rapat, lalu dikunci rapat dan disambungkan pada stok kontak, ditunggu hingga *autoclave* mencapai suhu 121°C selama 15 menit, kemudian setelah itu dibuka tutup *autoclave* dan uap dikeluarkan, dan didinginkan hingga media siap digunakan (Lolok *et al*., 2020).

16. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

16.1 Identifikasi secara makroskopis dengan VJA. Digoreskan sampel *S.aureus* pada media VJA (*Vogel Johnson Agar*) menggunakan jarum ose lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif menujukkan dengan adanya koloni berwarna hitam, permukaan cembung, dan disekitar terbentung warna kuning (Bela *et al*.,2018)

16.2 Uji dengan pewarnaan gram. Dari bahan pemeriksaan akan dibuat sediaan dari bahan *object glass*, kemudian diwarnai dengan prinsip perwarnaan gram, dan amati dibawah mikroskop. Bakteri gram positif terlihat dengan warna ungu sedangkan bakteri gram negatif terlihat merah muda (Jawetz *et al*.,2010).

16.3 Uji biokimia. Untuk bakteri gram positif akan dilakukan uji biokimia antara lain :

16.3.1 Uji katalase.Uji ini dilakukan dengan bakteri 1 ose diatas *object glass*, setelah itu ditetesi dengan H_2O_2 untuk melihat terbentuknya gelembung-gelembung udara. Gelembung tersebut menandakan hasil positif katalase (SNI, 2011).

16.3.2 Uji koagulase. Uji ini dilakukan dengan menginokulasi 2 ml BHI (*Brain heart infusion*) dengan *Staphylococcus aureus*, setelah

itu dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Inokulasi dipindahkan sebanyak 0,3 ml kedalam tabung reaksi steril, ditambahkan koagulase plasma sebanyak 0,5 ml kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati tiap jam hingga 4 jam pertama dan dilanjutkan hingga 24 jam untuk melihat terbentuknya koagulan. Koagulan yang terbentuk secara padat dan apabila tabung dibalik tidak jatuh maka dinyatakan positif (SNI, 2011).

17. Pengujian aktivitas antibakteri

17.1 Pembuatan media *Muller Hinton Agar* (MHA). Menimbang 3,8 gram serbuk MHA lalu dilarutkan dengan 100 ml akuades kemudian panaskan hingga mendidih. Tuangkan media kedalam tabung reaksi. Lakukan sterilisasi larutan dengan menggunakan autoclav pada suhu 121 °C (Nofita, 2020).

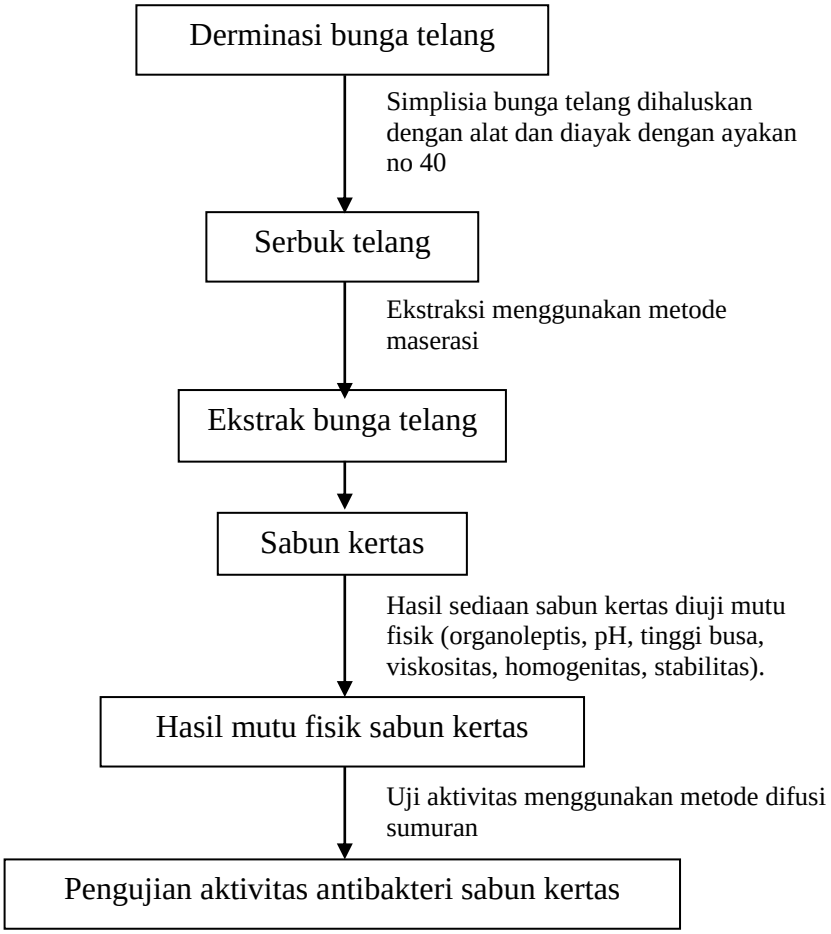
17.2 Peremajaan bakteri. Bakteri *Staphylococcus aureus* ditanam diatas media agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose steril lalu digoreskan pada media agar miring. Diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 37 °C (Retnaningsih *et al*., 2019).

17.3 Pembuatan suspense bakteri. Pembuatan suspense bakteri *S.aureus* dengan cara diambil 1 ose bakteri menggunakan ose steril dan dimasukkan dalam tabung berisi larutan NaCl 0,9% sebanyak 10 ml dikocok sampai homogen, kemudian kekeruhannya disamakan dengan standar *Mc.Farland* 0,5 (Misna *et al.,* 2016*)*).

17.4 Pengujian aktivitas antibakteri sabun cair. Pengujian aktivitas Antibakteri dilakukan terhadap sabun kertas eksrak bunga telang dengan metode difusi sumuran. Tahapan dilakukan dengan cara melarutkan 1 lembar sabun kertas dengan 20 ml akuades, kocok ad larut. Kemudian diinokulasi suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah distandarkan menggunakan kapas lidi steril pada cawan berisi media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan diamkan selama 15 menit tujuannya agar bakteri tersuspensi. Membuat lima sumuran menggunakan alat *boorprop* pada media MHA yang terdapat bakteri uji yang sudah meresap. Masing-masing sumuran diisi sebanyak 50µl formula 1, formula 2, formula 3, kontrol positif dan kontrol negatif. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi kemudian diinkubasi dengan suhu 37 ^{o}C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekeliling sumuran (Anggraeni, 2020).

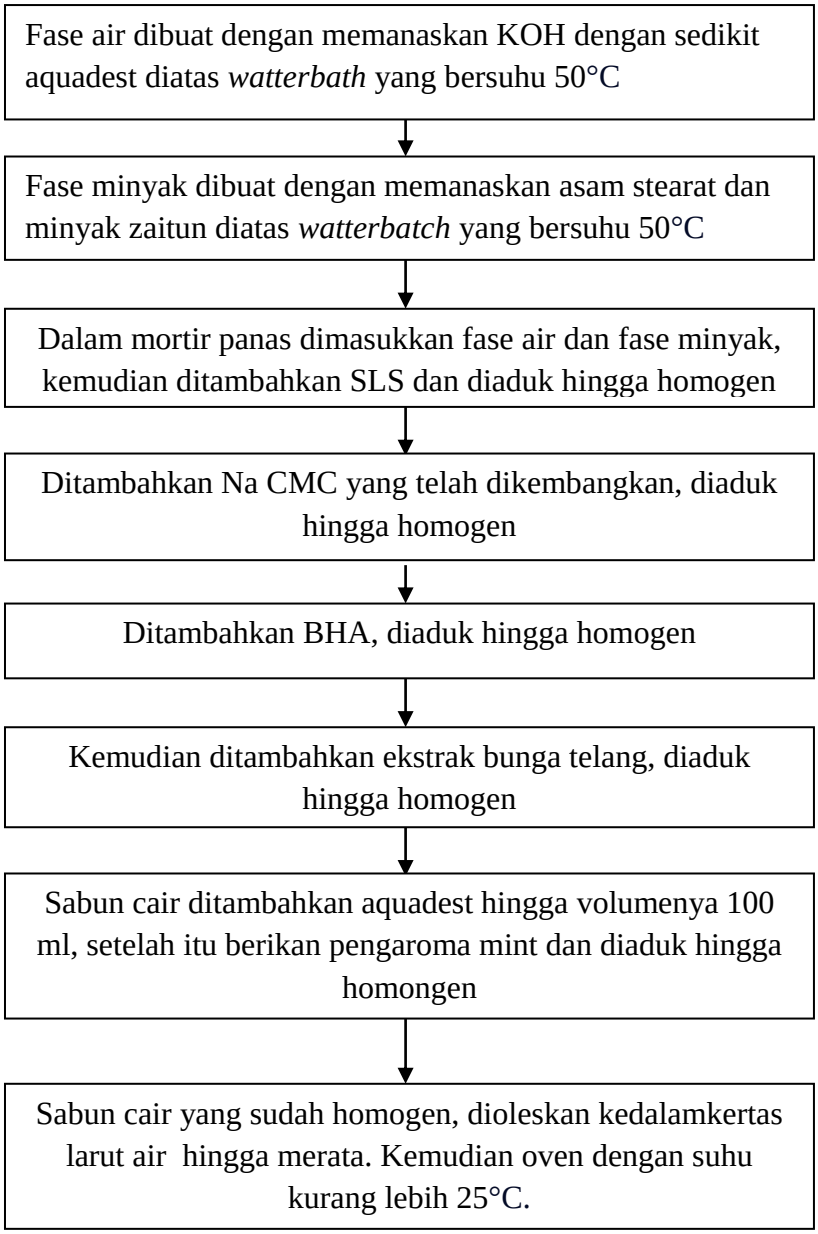
E. Skema Penelitian

1. Skema penelitian



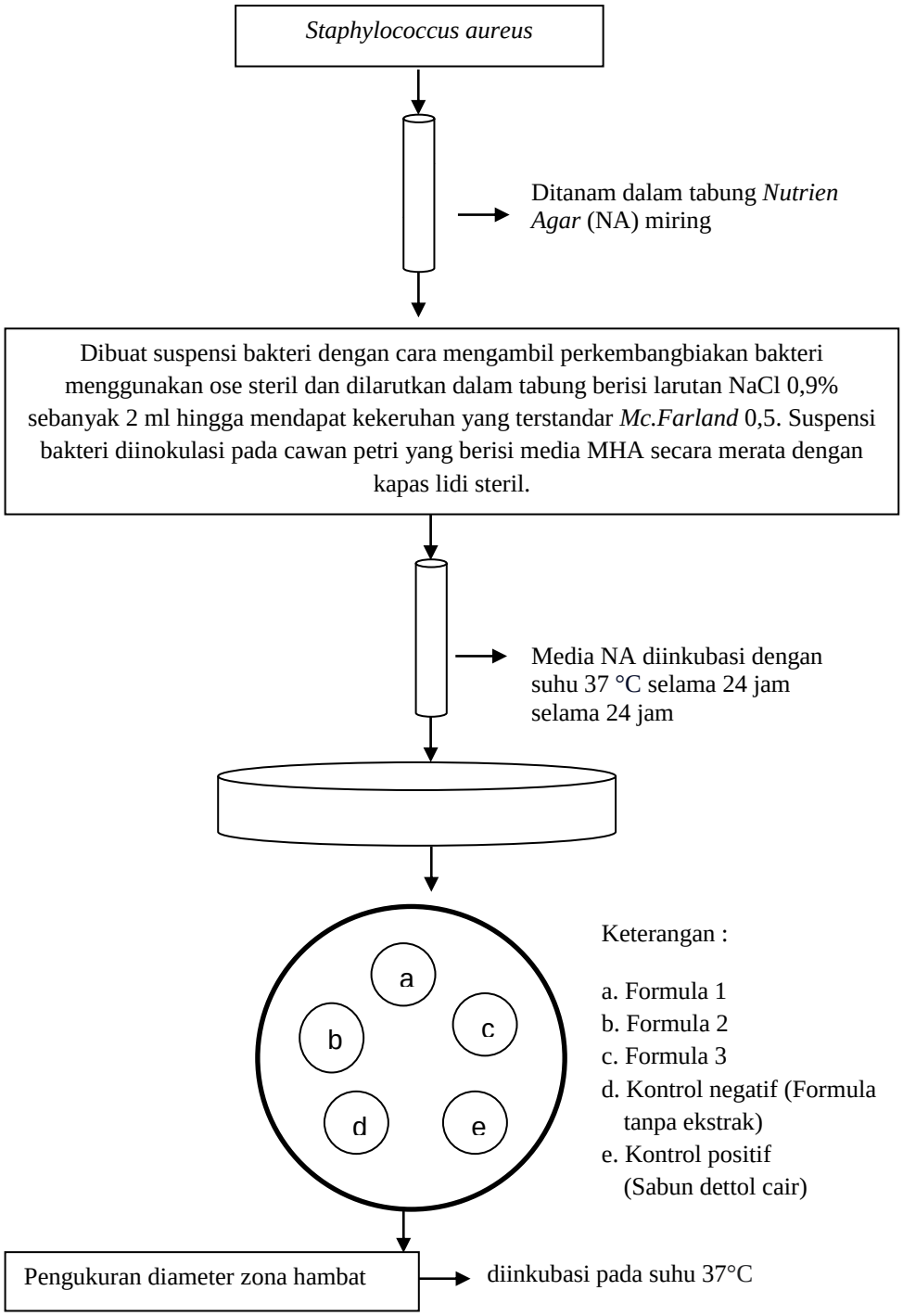
Gambar 8. Skema jalannya penelitian

2. Skema pembuatan sabun kertas



Gambar 9. Skema pembuatan sabun kertas

3. Skema pengujian aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi



Gambar 10. Skema pengujian aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi

F. Analisis Hasil

Sabun kertas dari setiap formula diuji mutu fisik meliputi organoleptis, pH, ketinggian busa, viskositas, dan stabilitas sabun. Stabilitas sabun kertas terdahap suhu dilakukan dengan metode *cycling test* . Sabun kertas yang memiliki karakteristik fisik baik diujikan aktivitas antibakteri dengan metode difusi, sehingga dapat diketahui konsentrasi terbaik dari sediaan sabun kertas. Analisis hasil data dilakukan dengan pendekatan statistic menggunakan aplikasi SPSS *(Statistical Package for the sosial Sciences)* . Hasil data yang diperoleh dianalisis dengan *Kohmogorov-smirnov/Saphiro-wilk,* jika data yang didapat menyatakan distribusi normal maka langkah berikutnya dilakukan analisis dengan *one way anova* atau uji *kruskall walis* jika data tidak terdistribusi normal, untuk melihat apakah terdapat perbedaan antara formula. Analisis dilanjutkan dengan *paired test/Wilcoxon*.