# BAB III METODE PENELITIAN

# Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental yang dilaksanakan di dalam laboratorium. Rancangan penelitian mencakup langkah- langkah seperti pengambilan dan identifikasi sampel, persiapan serta pembuatan ekstrak etanol dedak padi (*Oryza sativa* L.), dan uji aktivitas antibakteri terhadap E*scherichia coli* dengan metode *Cakram Disk*, di mana zona hambat dari ekstrak dan sediaan *paper soap* yang mengandung ekstrak dedak padi (*Oryza sativa* L.) diamati dan diukur sebagai hasil dari uji aktivitas antibakteri tersebut.

# Lokasi dan Jadwal Penelitian

# Lokasi penelitian

Penelitian Ini dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al – Washliyah Medan dan Laboratorium Kesehatan Daerah Sumatera Utara.

# Jadwal penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret-Juni 2024

# Alat dan bahan yang digunakan

# Alat-alat yang digunakan

Alat alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas (*Pyrex*, IWAKI), *autoclave* (Hiraya), *hot plate* (Maspion), *laminar air flow* (Robust), lemari asam (Fume), oven (Memmert), pH meter (Milwaukee), penangas air (B-

40

one), *rotary evaporator* (Ika), timbangan analitik (Mettler Toledo), *vortex*

(Thermo).

# Bahan-bahan yang digunakan

Bahan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akuades, akuades pro injeksi, amil alkohol, asam asetat anhidrida, asam klorida (p), asam klorida 0,1 N asam nitrat, asam sulfat (p), alpha naptol, besi (III) klorida, *Butylated Hidroxytoluene* (BHT), dinatrium EDTA, etanol 96%, Gliserin, *Hidroxy Methyl Cellulose* (HPMC), kloroform, Media agar *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid), Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Oxoid), natrium hidroksida (NaOH), Serbuk magnesium, *sodium lauryl sulfate* (SLS), Timbal (II) asetat, dan VCO (*Virgin Coconat Oil*) (El Medinah).

# Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan di laboratorium *Herbarium Medanense*

(MEDAN) Universitas Sumatra Utara.

# Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan adalah dedak padi (*Oryza sativa.* L*)* yang diambil dari kilang padi di desa Sunggal.

# Pemeriksaan Karakterisasi Simplisia

Pemeriksaan karakterisasi simplisia meliputi pemeriksaan makroskopik, mikroskopik penetapan kadar air, penetapan kadar sari yang larut dalam air, penetapan kadar sari yang larut dalam etanol, penetapan kadar abu total dan penetapan kadar abu yang tidak larut dalam asam (DepKes RI, 1995).

# Pemeriksaan makroskopik

Pemeriksaan makroskopik dilakukan pada dedak padi dengan mengamati morfologi luar tumbuhan. Dengan mengamati bentuk luar, ukuran, warna, dan bau dari dedak padi.

# Pemeriksaan mikroskopik

Serbuk simplisia dedak padi diambil secukupnya, ditambah dengan air lalu disaring, endapan diambil dan diletakkan pada objek glass lalu ditutup dengan deck glass dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 40 × 10 (Efendi, 2020).

Tujuan dari pemeriksaan mikroskopik adalah untuk mengetahui apakah serbuk simplisia tersebut memiliki ciri – ciri spesifik tanamannya dengan melihat fragmen mikroskopik.

# Penetapan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotropi (destilasi toluen). Alat meliputi labu alas 500 ml, alat penampung, pendingin, tabung penerima, tabung penyambung dan alat pemanas.

Cara penetapan: ke dalam labu alas bulat dimasukkan 200 ml toluen dan 2 ml air suling, didestilasi selama 2 jam. Dibiarkan mendingin selama 30 menit, dibaca volume air pada tabung penerima. Selanjutnya ke dalam labu dimasukkan 5 gram serbuk simplisia, lalu dipanaskan hati – hati selama 15 menit, setelah toluene mulai mendidih, kecepatan tetes diatur menjadi 2 tetes tiap detik, hingga sebagian air tersuling, kemudian dinaikkan kecepatan tetes menjadi 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling bagian dalam pendingin dibilas dengan toluene. Dilanjutkan penyulingan selama 5 menit, kemudian dibiarkan mendingin pada

suhu kamar setelah air dan toluene memisah. Volume dibaca dengan ketelitian 0,1 ml, selisih kedua volume air yang dibaca sesuai kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (Ditjen POM, 1995).

Tujuan dari penetapan kadar air adalah untuk mengetahui kandungan air yang terkandung dalam simplisia.

# Penetapan kadar sari larut dalam air

Sebanyak 5 gram serbuk dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml air- kloroform (2,5 ml kloroform dan air suling sampai 1 liter) dalam labu bersumbat sambil berkali–kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam, kemudian disaring. 20 ml filtrate diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan pada suhu 105oC hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan diudara (Ditjen POM, 1995).

Tujuan dari penetapan kadar sari larut dalam air adalah untuk mengetahui kandungan senyawa-senyawa aktif yang bersifat polar (larut dalam air).

# Penetapan kadar sari larut dalam etanol

Sebanyak 5 gram serbuk simplisia dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol (96%) dalam labu bersumbat sambil berkali – kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemuidian dibiarkan selama 18 jam. Kemudian disaring cepat untuk menghindari penguapan etanol, kemudian diuapkan 20 ml filtrate hingga kering dalam cawan penguap berdasar rata yang telah ditara, dipanaskan sisa pada suhu 105oC hingga bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 96% dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1995).

Tujuan dari penetapan kadar sari larut dalam air adalah untuk mengetahui kandungan senyawa-senyawa aktif yang bersifat polar, semi polar-nonpolar (larut dalam etanol).

# Penetapan kadar abu total

Sebanyak 5 gram serbuk yang telah digerus dan ditimbang seksama, dimasukkan ke dalam krus porselen yang telah dipijar dan ditara, kemudian diratakan. Krus dipijar perlahan – lahan sampai arang habis, pijaran dilakukan pada suhu 600oC selama 3 jam, kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1995).

Tujuan dari penetapan kadar abu total adalah untuk mengetahui berapa persen pengotoran yang diakibatkan dari logam–logam dan silikat yang terkandung dalam tanah.

# Penetapan kadar abu yang tidak larut asam

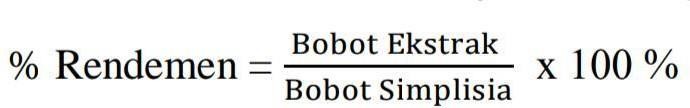
Abu yang telah diperoleh dalam penrtapan kadar abu total dididihkan dalam

25 ml asam klorida 2N selama 5 menit, bagian yang tidak larut asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring, dipijar hingga bobot tetap kemudian didinginkan dan ditimbamg. Kadar abu yang tidak larut asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Ditjen POM, 1995)

Tujuan dari penetapan kadar abu yang tidak larut asam adalah untuk mengetahui jumlah kadar abu yang diperoleh dari faktor ekternal, berasal dari pengotor tanah yang berasal dari pasir dan tanah.

# Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi dedak padi (*Oryza sativa* L.*)* dilakukan dengan cara maserasi. Serbuk simplisia 10 bagian (500g) dimasukkan ke dalam bejana kemudian dituangkan 75 bagian (3750mL) cairan penyari etanol lalu ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya matahari sambil diaduk-aduk sesekali. Setelah 5 hari campuran diserkai dan ampasnya diperas (maserat I). maserat dipisahkan dari ampas. Ampas dibilas dengan cairan penyari etanol 96% hingga diperoleh 100 bagian (1250 mL) maserat. Dipindahkan dalam bejana tertutup (maserat 2), maserat digabungkan dan dibiarkan ditempat sejuk terlindung dari cahaya selama 2 hari. Maserat lalu dipekatkan dengan alat *Rotary Evaporator* pada suhu 50C dan diperoleh ekstrak etanol lalu diuapkan kembali diatas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental, ditimbang dan dimasukkan ke wadah tertutup (DepKes RI, 1979). Kemudian hitung rendemen dari ekstrak dedak padi dengan rumus berikut (Harbone, 1987).



# Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia untuk mengetahui ada tidaknya komponen-komponen bioaktif yang terdapat pada ekstrak. Ekstrak dilarutkan dengan sedikit pelarutnya kemudian dilakukan uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid (Harborne, 1987).

# Uji alkaloid

Ekstrak dedak padi ditimbang 0,5 gram kemudian ditambahkan 1 mL HCL 2N dan 9mL aquadest, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat digunakan untuk pengujian berikut ini:

* + - * Pereaksi Mayer

Tiga tetes ektrak ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi mayer. Terbentuknya endapan putih sampai kuning menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

* + - * Pereaksi Bouchardat

Tiga tetes ekstrak ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Bouchardat. Terbentuknya endapan coklat sampai hitam menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

* + - * Pereaksi Dragendrof

Tiga tetes ekstrak ditambahkan dengan 2 tetes pereaksi Dragendrof. Terbentuknya endapan jingga sampai merah menunjukkan adanya senyawa alkaloid (Harborne, 1987).

Bila sedikitnya 2 dari 3 pereaksi di atas positif maka ektrak dedak padi dinyatakan mengandung senyawa alkaloid.

# Uji flavanoid

Ekstrak dedak padi sebanyak 1 g dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas di didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Selanjutnya filtrate diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 1 mL HCl pekat dan 2 mL amil alkohol. Positif mengandung flavonoid bila terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Famsworth, 1966).

# Uji saponin

Ekstrak dedak padi sebanyak 0,5 g dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah air 10 mL air panas, dinginkan kemudian dikocok selama 10 detik, terbentuk buih atau busa, kemudian diteteskan 2-3 tetes HCl 1 N, Jika busa tidak hilang maka menandakan adanya senyawa saponin (Harborne, 1987).

# Uji tannin

Ekstrak dedak padi sebanyak 0,5 g diencerkan dengan 10 ml lalu disaring lalu filtrat diambil sebanyak 2 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2-3 tetes pereaksi FeCl3 1%, Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan terdapat tannin (Famsworth, 1966).

# Uji triterpenoid dan steroid

Ekstrak dedak padi sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 mL n-heksan selama 2 jam, lalu disaring, filtrat kemudian diuapkan dalam cawan penguap, lalu sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna merah menjadi ungu untuk triterpenoid dan hijau menjadi biru untuk steroid (Harborne, 1987).

# Uji glikosida

Pengujian dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 2 mL ekstrak yang telah diekstraksi dengan pelarut air dan etanol, kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Kemudian tambahkan 5 ml asam asetat anhidrat dan 10 tetes H2SO4 pekat. Amati perubahan warna yang terjadi jika terbentuk warna biru/hijau menandakan adanya senyawa glikosida (Depkes RI, 1989).

# Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan untuk pengujian mikrobiologi harus disterilkan terlebih dahulu seperti *beaker glass*, erlenmayer, tabung reaksi dan cawan petri, disterilkan dioven pada suhu 170°C selama 1-2 jam, alat atau bahan gelas dan tidak tahan terhadap pemanasaan tinggi dalam jangka waktu lama seperti gelas ukur, media, pipet tetes di sterilkan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan jarum ose dengan cara dibakar pada lampu spiritus sampai pijar (lay, 1994).

# Pemeriksaan Aktivitas Antibakteri

# Pembuatan larutan uji

Dibuat larutan uji 5%, 10%, 12,5% , 15%, 25% dan 30%. cara ditimbang 0,1 g; 0,15 g; dan 0,3 g ekstrak etanol dedak padi kemudian dilarutkan dalam 1 mL larutan aquadest (Putri *et al.,* 2020). Denagan cara ekstrak kental dedak padi yang diperoleh diencerkan menggunakan DMSO menjadi 6 tingkat konsentrasi yaitu konsentrasi 12.5%, 25%, 50% dan 70%. Konsentrasi tersebut didapatkan melalui pengenceran menggunakan rumus sebagai berikut :

V1 × C1 = V2 × C2

Keterangan:

V1 = Volume awal

C1 = Konsentrasi awal

V2 = Volume akhir (V1 + pelarut)

C2 = Konsentrasi akhir

1. Pengenceran konsentrasi 5% V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 5%

V1 =

1 𝑚𝐿 × 5%

100%

V1 = 0,05 mL

Dalam 1 mL, terdapat 0,05 gr ekstrak kental dedak padi dan 0,95 mL DMSO

1. Pengenceran konsentrasi 10% V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 10%

V1 =

1 𝑚𝐿 × 10%

100%

V1 = 0,1 mL

 Dalam 1 mL, terdapat 0,1 gr ekstrak kental dedak padi dan 0,9 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 12,5%

V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 12,5%

V1 =

1 𝑚𝐿 × 12,5%

100%

V1 = 0,125 mL

 Dalam 1 mL, terdapat 0,125 gr ekstrak kental dedak padi dan 0,875 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 15% V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 15%

V1 =

1 𝑚𝐿 × 15%

100%

V1 = 0,15 mL

 Dalam 1 mL, terdapat 0,15 gr ekstrak kental dedak padi dan 0,85 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 25% V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 25%

V1 =

1 𝑚𝐿 × 25%

100%

V1 = 0,25 mL

 Dalam 1 mL, terdapat 0,25 gr ekstrak kental dedak padi dan 0,75 mL DMSO.

1. Pengenceran konsentrasi 30% V1 x C1 = V2 x C2

V1 x 100% = 1 mL x 30%

V1 =

1 𝑚𝐿 × 50%

100%

V1 = 0,3 mL

 Dalam 1 mL, terdapat 0,3 gr ekstrak kental dedak padi dan 0,5 mL DMSO.

# Pembuatan media agar miring

*Nutrient Agar* (NA) sebanyak 0,4 gram dilarutkan dalam 20 mL aquades menggunakan erlenmeyer. Dihomogenkan dengan *stirer* diatas penangas air sampai mendidih. Sebanyak 5 mL dituangkan masing-masing pada 2 tabung reaksi steril dan ditutup dengan *aluminium foil*. Media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu

ruangan selama ± 30 menit sampai media memadat pada kemiringan 30°. Media Agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Lay, 1994).

# Peremajaan bakteri pada media agar

Bakteri uji diremajakan pada media *Nutrient agar* (NA) miring steril. Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli*. Bakteri uji diinokulasikan sebanyak satu ose ke dalam media NA dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Peremajaan bakteri dilakukan di tempat yang steril (El Rahma *et al.,* 2023).

# Pembuatan larutan standar Mc. Farland

Larutan H2SO4 1% sebanyak 9,95 mL dicampurkan dengan larutan BaCl22H2O 1,175% sebanyak 0,5 mL dalam erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspensi bakteri uji (Putri *et al.,* 2020).

# Pembuatan larutan NaCl 0.9%

Ditimbang sebanyak 0,9 g Natrium Klorida dilarutkan dalam air suling steril sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 ml sampai larut sempurna. Ditambahkan air suling steril yang bertutup lalu disterilkan pada autoklaf pada suhu 121C selama 15 menit (Depkes RI, 1995).

# Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji yang telah diinokulasi dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung berisi 2 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan Mc. Farland (Putri *et al.,* 2020).

# Pembuatan media pengujian

1. Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA (*Nutrient Agar*) ditimbang sebanyak 2,4 gram dan dilarutkan dalam 120 ml aquadest didalam gelas beaker dan ditutup dengan kapas lalu dibungkus dengan aluminium foil. Media dihomogenkan diatas *hot plate* dan diaduk dengan batang pengaduk hingga larutan jernih dan homogen, selanjutnya gelas beaker berisi media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121C selama 15 menit (El Rahma *et al.,* 2023).

1. Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

Dibuat dengan mengambil serbuk media sebanyak 38 gram, dilarutkan kedalam 1 liter aquades dan didihkan selama satu menit. Media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, selanjutnya dimasukkan dalam cawan petri sebanyak 20 ml dan dibiarkan hingga mengeras (El Rahma *et al.,* 2023).

# Uji aktivitas antibakteri ekstrak dedak padi

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode *Kirby-Bauer,* yaitu metode difusi dengan cakram kertas. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah steril dimasukkan sebanyak 20 ml kedalam cawan petri steril dibiarkan memadat. Kemudian celupkan cotton swab steril ke suspensi bakteri dan diperas di dinding tabung lalu goreskan ke media MHA dengan merata. Diambil ekstrak dedak padi dengan berbagai konsentrasi 5; 10; 12,5; 15; 25 dan 30%. sebagai kontrol positif digunakan kertas cakram berisi amoksisilin dengan pelarut DMSO sebagai kontrol negatif. Kertas cakram direndam dalam larutan ekstrak dan pembanding selama 3 menit. Kemudian diletakkan kertas cakram kedalam cawan petri biarkan beberapa saat agar proses difusi berlangsung. Kemudian cawan

diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah terinkubasi, diukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan jangka sorong. Dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan (Salni dan Mukti, 2011).

* 1. **Formula Sediaan *Paper Soap***

Formula sediaan *paper soap* didapat dari formula pada penelitian Mujahidah

*et al.* tahun 2019 dapat dilihat pada tabel 3.1.

**Tabel 3.1** Formula sediaan *paper soap* (Mujahidah *et al.,* 2019)

|  |  |
| --- | --- |
| Bahan | Formula (%) |
| Ekstrak kulit luar kacang tanah | 10 |
| VCO | 6,0 |
| NaOH 30% | 5,0 |
| BHT | 0,1 |
| HPMC | 3,5 |
| Gliserin | 5,0 |
| Dinatrium EDTA | 0,2 |
| Aquadest | Ad 100 |

Berdasarkan formula sediaan *paper soap* dari penelitian yang dilakukan oleh Mujahidah *et al.* (2019) di atas maka dibuat modifikasi formula seperti yang tertera pada tabel 3.2.

**Tabel 3.2** Modifikasi formula sediaan *paper soap*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Bahan | F0(%) | F1(%) | F2(%) | F3(%) |
| Ekstrak Etanol Dedak padi | 0 | 15 | 25 | 30 |
| VCO | 6,0 | 6,0 | 6,0 | 6,0 |
| NaOH 30% | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |
| HPMC | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 |
| Gliserin | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |
| BHT | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Dinatrium EDTA | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| SLS | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| *Essential oil* jasmine | 5 tts | 5 tts | 5 tts | 5 tts |
| Aquadest | Ad 100 | | | |

Keterangan :

Tts : tetes

F0(%) : Sediaan *paper soap* dengan konsentrasi ekstrak 0% F1(%) : Sediaan *paper soap* dengan konsentrasi ekstrak 15% F2(%) : Sediaan *paper soap* dengan konsentrasi ekstrak 25% F3(%) : Sediaan *paper soap* dengan konsentrasi ekstrak 30%

* 1. **Pembuatan *Paper Soap***

Semua bahan ditimbang dengan seksama. Kemudian HPMC dikembangkan di dalam air panas, SLS dilarutkan dalam air, dinatrium EDTA dilarutkan ke dalam air, dicampurkan ke HPMC yang telah mengembang lalu tambahkan gliserin (massa 1). BHT dimasukkan ke dalam VCO, tambahkan NaOH 30% lalu panaskan diatas hotplate dengan suhu 70C, aduk sampai terbentuk massa sabun (massa 2), M1 dan M2 dicampurkan dan diaduk sampai homogen, tambahkan pewangi, lalu tambahkan ektrak dedak padi kemudian aduk sampai tercampur seluruhnya. Cetak diatas kertas laminating, kemudian diratakan sampai setipis mungkin, biarkan disuhu ruang 1 hari sampai *paper soap* dapat dilepas dari kertas, lalu dipotong dan disimpan ke dalam wadah (Wulandari, 2021).

* 1. **Evaluasi *Paper Soap* Ekstrak Etanol Dedak Padi**

1. Pemeriksaan organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan teknik observasi visual,

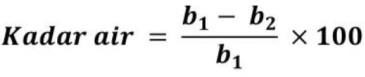
yaitu melihat bentuk, mencium bau, dan warna pada sediaan yang diformulasikan dengan menggunakan panca indera (Adlina *et al.,* 2023).

1. Pemeriksaan pH

Pengukuran pH dilakukan dengan alat pH meter Alat ini dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan dapar pH 4-9, elektroda dibilas dengan air suling dan dikeringkan. Pengukuran pH dilakukan dengan cara timbang 1 gram *paper soap* dilarutkan dengan akuades hingga 10 ml dalam wadah yang cocok. Elektroda dicelupkan ke dalam wadah tersebut dan dibiarkan angka bergerak sampai posisi konstan. Angka yang ditunjukkan pH meter merupakan pH sediaan *paper soap* (Departemen Kesehatan RI, 2014). Menurut SNI 2588:2017 pH sabun cuci tangan yang memenuhi syarat adalah berkisar 4-10.

1. Pemeriksaan kadar air

Penetapan kadar air dilakukan dengan menimbang cawan petri yang telah dikeringkan di dalam oven pada suhu (105  2)C selama 30 menit (b0), timbang 1 gram sabun yang telah potong halus ke dalam cawan petri yang telah dikeringkan (b1), lalu panaskan dalam oven pada suhu (105  2)C selama 1 jam, lalu dinginkan dalam desikator sampai suhu ruang lalu ditimbang (b2), ulangi sampai bobot tetap (SNI 3532:2016).



Keterangan :

Kadar air dalam satuan % fraksi massa b0 adalah bobot cawan petri kosong, g

b1 adalah bobot cawan uji dan cawan petri sebelum pemanasan, g b2 adalah bobot cawan uji dan cawan petri sesudah pemanasan, g

Menurut SNI 3532:2016 kadar air dalam sabun padat yang memenuhi syarat adalah maksimal 15%.

1. Pemeriksaan ketebalan

Pemeriksaan ketebalan *paper soap* dilakukan dengan mikrometer yang kemudian diukur ketebalan diketiga titik (bagian tengah, bagian atas dan bagian bawah) pada masing masing sediaan *paper soap*. Lalu dijumlahkan dan dicari rata – rata ketebalannya (Dewi, 2019). Paper soap memiliki ketebalan sekitar 10m-500m (Fahjar *et al.,* 2022).

1. Pemeriksaan keseragaman bobot

Pengujian terhadap keseragaman bobot *paper soap* dilakukan dengan cara menimbang *paper soap* pada masing-masing *paper soap* tiap formula. Kemudian dihitung rata-rata berat dari sediaan *paper soap* (Anantia *et al.,* 2019).

1. Uji daya busa

Uji daya busa dilakukan dengan mengukur tinggi busa *paper soap* dengan cara dimasukkan 1 gram *paper soap* dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL air suling. Tabung dibolak-balikkan, diukur tinggi busa yang terbentuk. (Fitri *et al.,* 2023**)**. Menurut SNI 3532:2016 tinggi busa yang memenuhi syarat adalah 1,3-22 cm.

1. Uji stabilitas sediaan

Uji stabilitas dilakukan dengan menggunakan Metode *Freezeand Thaw* dengancara sediaan *paper soap* untuk masing-masing formula

ditimbang sebanyak 1 lembar dan dimasukkan ke dalam 8 vial yang ditutup rapat. Sebanyak 4 vial digunakan sebagai kontrol yang disimpan pada suhu 25ºC dan 4 vial akan digunakan untuk siklus *Freeze and Thaw*, dengan cara vial disimpan pada suhu dingin 42C selama 24 jam, lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 402C selama 24 jam, proses ini dihitung 1 siklus. Amati perubahan organoleptisnya. Lakukan hingga 6 siklus dan amati perubahan organoleptis (bentuk dan warna) dan pH sediaan tiap siklus, sediaan dikatakan stabil bila telah melewati 6 siklus, tidak terjadi perubahan organoleptis, dan pH sediaan (Anggai *et al.,* 2013).

1. Pengujian waktu tercuci

Pengujian waktu tercuci dilakukan dengan mengambil 1 lembar *paper soap* kemudian dialiri air sehingga seluruh sabun pada telapak tangan terbasahi. Kemudian telapak tangan diusapkan sampai timbul busa. Waktu yang dibutuhkan *paper soap* untuk habis tercuci dicatat (Eryani *et al.,* 2022).

1. Uji iritasi pada responden.

Disiapkan 12 orang sukarelawan, kemudian dilakukan pengujian iritasi dengan cara sabun dilarutkan dengan akuades lalu dioleskan di bagian lengan bawah dengan diameter 3 cm, lalu ditutup dengan menggunakan plester anti air, kemudian dibiarkan selama 24 jam dan dilihat reaksi yang terjadi berupa eritmia dan edema (Octora *et al.,* 2020)

1. Uji hedonik

Uji hedonik dilakukan kepada 20 orang yang masing-masing panelis diberikan sampel *paper soap* dengan formula F0, F1, F2, F3 lalu diarahkan

untuk mengisi kuisioner dengan tingkat kesukaan skala 1-9 dari parameter tidak suka hingga parameter sangat suka (Fitri *et al*., 2023)

* 1. **Uji Antibakteri *Paper Soap* Ekstrak Dedak Padi**

Pengujian ini menggunakan metode difusi cakram disk. Media uji MHA disterilkan pada suhu 121°C kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat Bakten uji dipindahkan ke dalam media MHA dengan cara digoreskan menggunakan cutton swab steril. Encerkan masing-masing formulasi sebanyak 1 gram dengan akuades 10 ml. Kertas cakram kosong direndam pada masing-masing konsentrasi *paper soap* ekstrak dedak padi selama 15 menit. Kontrol positif yang digunakan adalah cakram disk yang telah direndam dengan larutan *paper soap* yang beredar di pasaran. Kontrol negatif pada pengujian ini adalah basis *paper soap* yaitu formulasi dengan konsentrasi ekstrak 0%. Cakram yang sudah direndam selanjutnya diletakkan diatas media dan diberi label Masing-masing media yang telah diisi sediaan uji, kontrol positif dan kontrol negatif diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam, setelah dunkubasi, diukur hasil diameter zona hambat (mm) yang diperoleh. Pada pengujian ini dilakukan replikasi 3 kali (Putra *et al*., 2024)

# Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan mengunakan SPSS, semua analisa akan diulang sebanyak tiga kali dan akan diuji dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada tingkat kepercayaan 95% dan taraf α 0,05.