

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan yaitu penelitian eksperimen.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam, Teknologi Sediaan Farmasi, Laboratorium Farmasetika Prodi D III Farmasi Kemenkes Poltekkes Kupang dan Laboratorium Sains dan Teknologi Fakultas MIPA Universitas Widia Mandira Kupang.

2. Waktu penelitian

Penelitian akan dilakukan mulai dari bulan Februari hingga bulan Agustus 2025.

C. Objek Penelitian

Objek penelitian dalam penelitian ini adalah sediaan detergen cair cuci piring sari kulit buah pisang kepok dengan konsentrasi 30% dan ekstrak etanol kulit buah pisang kepok dengan konsentrasi 5%.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah detergen cair cuci piring sari kulit buah pisang kepok 30% dan ekstrak etanol kulit pisang kepok 5%.

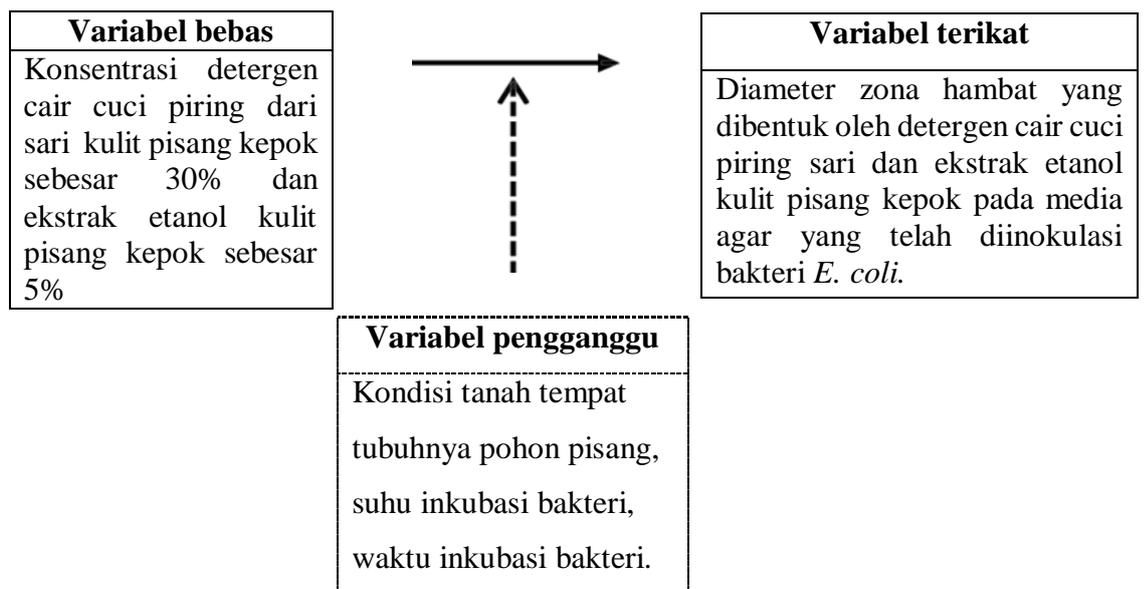
2. Variabel terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah diameter zona hambat yang dibentuk oleh detergen cair cuci piring sari dan ekstrak etanol kulit buah pisang kepok pada media agar yang telah diinokulasi bakteri *Escherichia coli*.

3. Variabel pengganggu

Variabel pengganggu adalah kondisi tanah tempat tubuhnya pohon pisang, suhu inkubasi bakteri, waktu inkubasi bakteri.

E. Kerangka Konsep



Keterangan : _____ : Yang diteliti

..... : Yang tidak diteliti

Gambar 3. Hubungan antar variabel

F. Definisi Operasional

Tabel 2. Definisi operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala
1.	Sari kulit buah pisang kepok pisang (<i>Musa paradisiaca</i> L)	Sari kulit buah pisang kepok matang yang ditandai dengan warna kuning pada kulit pisang yang diperoleh dengan cara menghaluskan kulit pisang kepok (<i>Musa paradisiaca</i> L) kemudian ditambah aquades lalu diperas untuk memperoleh filtrat dan ampas.		Rasio
2.	Ekstrak etanol kulit buah pisang kepok (<i>Musa paradisiaca</i> L)	Ekstrak kental kulit buah pisang kepok (<i>Musa paradisiaca</i> L) yang diperoleh dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%		Rasio
3.	Detergen cair cuci piring sari dan ekstrak etanol kulit buah pisang kepok (<i>Musa paradisiaca</i> L)	Detergen cair cuci piring yang diformulasikan menggunakan sari dan ekstrak etanol kulit buah pisang kepok sebagai bahan aktifnya		Nominal
4.	Bakteri <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Salah satu bakteri yang termasuk dalam bakteri gram negatif dari family <i>Enterobacteriaceae</i> sebagai bakteri uji yang digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri		Nominal
5.	Metode difusi sumuran	Metode yang digunakan untuk penanaman bakteri agar dapat melihat zona hambat.		Rasio
6.	Zona hambat	Zona bening yang akan terbentuk di sekitar lubang sumuran jika sampel atau zat antimikroba yang digunakan tersebut efektif terhadap dalam menghambat pertumbuhan bakteri	Jangka sorong	Rasio
7.	Daya hambat	Indikator untuk mengukur kemampuan detergen cair cuci piring dari sari dan ekstrak kulit buah pisang kepok (<i>Musa paradisiaca</i> L) mampu menghambat pertumbuhan bakteri <i>E. coli</i> . Dimana semakin besar diameter zona hambat, semakin kuat daya hambatnya terhadap bakteri. Nilai diameter zona hambat dapat memberikan informasi tentang sensitivitas bakteri terhadap senyawa yang diuji.		Ordinal

G. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu kertas perkamen, beaker glass (pyrex dan iwaki, schot duhan), timbangan digital (zhimadzu), bejana maserasi, waterbath (memmerthgrinder, batang pengaduk, kain saringan mesh 200 (Nilon), rotary evaporator (Eyela tipe N-1000), tisu, aluminium foil, rak tabung, tabung reaksi (pyrex), ayakan mesh 60, botol sabun, cawan petri, pipet tetes (pyrex), autoklaf, cawan porselin, Erlenmeyer (pyrex, iwaki, schot duhan), inkubator, *Laminar Air Flow (LAF)*, jarum ose, pembakar bunsen, masker, *blue tip*, *cork borer* 5 mm, gelas ukur, *spreader*, jangka sorong, mikropipet, vortex, batang pengaduk, *hot plate*, kompor listrik, *colony counter*, sarung tangan.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah pisang kepok, etanol 96%, asam sitrat, natrium klorida, texapon, Hydroxil Ethyl Cesulosa (HEC), pewarna pandan, sari jeruk nipis, HCl pekat, FeCl₃, serbuk magnesium, pereaksi bouchardat, pereaksi dragendorff, pereaksi mayer, HCl 1 N dan 2 N, isolat bakteri *Echerichia coli* ATCC 25922, nutrient agar (Merck Germany), nutrient broth (Merck Germany), aquadest, kapas, kasa, sabun cair cuci piring merek "X", kertas coklat, label.

H. Prosedur Penelitian

1. Pengambilan bahan

Pisang kepok yang sudah matang diambil di Desa Oesao, Kecamatan Kupang Timur, Kabupaten Kupang.

2. Pembuatan simplisia kulit buah pisang Kepok

Kulit buah pisang kepok yang sudah didapat dilakukan sortasi basah untuk memisahkan benda asing dan kotoran pada kulit buah pisang, kemudian dicuci pada air yang mengalir dengan tujuan membersihkan kotoran seperti tanah yang sulit dibersihkan tanpa air pada kulit buah pisang. Sesudah dicuci, tiriskan air sisa cucian, lalu dirajang untuk mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya, dikeringkan diudara terbuka dengan diangin-anginkan namun tetap terlindung dari sinar matahari langsung dengan ditutupi kain hitam dari atasnya. Kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kulit buah pisang yang rusak selama proses pengeringan. Selanjutnya, dihaluskan dengan menggunakan bantuan *grinder* dan diayak menggunakan ayakan mesh 60 hingga menjadi serbuk dengan ukuran yang seragam (Nasri, 2023).

3. Pembuatan ekstrak kulit buah pisang Kepok

Ekstraksi kulit buah pisang kepok dilakukan dengan menggunakan ekstraksi cara dingin yaitu maserasi dengan perbandingan 1:10 dimana 1 adalah sampel dan 10 adalah pelarut (Narrinda *et al.*, 2024). Proses awal ekstraksi adalah kulit buah pisang kepok yang sebelumnya telah menjadi serbuk simplisia ditimbang sebanyak 550 gram masukan kedalam wadah maserasi kemudian ditambahkan sebanyak 75 bagian dari 5,5 liter (4125 mL) etanol 96% kemudian diaduk dengan menggunakan batang pengaduk. Proses maserasi dilakukan selama tiga hari sambil sesekali di aduk untuk dipastikan senyawa telah ditarik secara sempurna. Setelah tiga hari dimaserasi, ekstrak

disaring dan diambil filtratnya dan pindahkan ke wadah baru. Ampas hasil penyaringan maserasi pertama kemudian direndam kembali (remaserasi) menggunakan etanol 96% sebanyak 25 bagian dari 5,5 liter (1.375 mL) dalam wadah tertutup rapat hingga terendam sempurna. Pada tahap remaserasi perendaman dilakukan dalam kurun waktu dua hari. Kemudian, filtrat yang diperoleh dari remaserasi digabung dengan hasil maserasi sebelumnya yang selanjutnya dilakukan penguapan dengan alat *rotary evaporator* dengan suhu 55°C yang bertujuan untuk memisahkan ekstrak dari cairan penyaringnya. Setelah itu sampel hasil evaporasi dipindahkan dalam cawan porselen untuk dilakukan pemekatan ekstrak. Tahap ini dilakukan dengan cara sampel dilakukan pemekatan di atas *waterbath* dengan suhu 40°C sampai menghasilkan ekstrak dengan tekstur yang kental. Setelah itu ekstrak kental ditimbang dan dihitung % rendemen ekstrak (Sampoerna & Pandapotan Nasution, 2022).

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{bobot ekstrak kental}}{\text{bobot simplisia kering}} \times 100\%$$

4. Pembuatan sari kulit buah pisang kepok

Kulit buah pisang kepok dilakukan penghalusan menggunakan *cooper* hingga berbentuk halus kemudian ditimbang sebanyak 30 g dan dimasukkan ke dalam beaker gelas dan ditambahkan aquades sebanyak 50 mL dan diaduk hingga homogen, setelah itu diperas dengan menggunakan kain saringan dan dipisahkan filtrat dari residunya. Setelah itu, ampas ditambah lagi aquades sebanyak 25 mL dan diaduk hingga tercampur kemudian diperas dan dipisahkan dari residunya. Setelah itu, disaring sekali lagi

dengan menambahkan aquades 25 mL dan diperas menggunakan kain saringan. Sari air dari kulit pisang kepok yang diperoleh digunakan dalam formulasi detergen (Ramadani *et al.*, 2024).

5. Skrining fitokimia

a. Identifikasi flavonoid

Sampel sebanyak 1 gram ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 5 mL lalu dikocok, dilakukan pemanasan dan dikocok lagi dan disaring. Masing-masing filtrat dibagi kedalam 2 tabung reaksi, tabung pertama sebagai blanko, lalu ditambahkan serbuk magnesium 0,5 gram dan 3 tetes HCl. Jika positif mengandung flavonoid maka akan terbentuk warna kuning hingga merah tua (Mulyani *et al.*, 2022).

b. Identifikasi saponin

Sampel sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan air mendidih sebanyak 10 mL, kocok hingga berbusa. Jika positif mengandung saponin maka busa tidak hilang kurang lebih selama 10 menit (Mulyani *et al.*, 2022).

6. Uji bebas etanol

Ekstrak kental sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan asam sulfat pekat (H_2SO_4) dan asam asetat masing-masing sebanyak 2. Kemudian dilakukan pemanasan. Jika ekstrak telah bebas dari etanol maka tidak akan tercium aroma khas ester seperti aroma buah-buahan (Tivani *et al.*, 2021).

7. Formula

Tabel 3. Formula detergen cuci piring sari dan ekstrak etanol kulit buah pisang kepok

Formula	Sari	Ekstrak	Fungsi Bahan
Kulit buah pisang kepok	30 %	5%	Zat aktif
Hydroxy ethyl cellulose	0,21 %	0,21 %	Pengental
Texapon	10 %	10 %	Penghasil busa
Natrium klorida	2,1 %	2,1 %	Pengental
Asam sitrat	0,3 %	0,3 %	Pengangkat lemak
Sari jeruk nipis	1 mL	-	Pengaroma
Pewarna pandan	2 tts	-	Pewangi
Aquades	Ad 100 mL	Ad 100 mL	Pelarut

Sumber: Modifikasi formula dari (Rustini *et al.*, 2023)

8. Pembuatan detergen cair dari sari

- Disiapkan alat yang digunakan antara lain kertas perkamen, sudip, sendok tanduk, spatel, cawan porselen, batang pengaduk, *beaker glass*, gelas ukur dengan ukuran 10 mL, 20 mL dan 50 mL dan juga bahan yang digunakan antara lain sari kulit buah pisang kepok, Hydroxy Ethyl Cellulose (HEC), texapon, NaCl, asam sitrat, sari jeruk nipis, pewarna pandan, dan aquades.
- Ditimbang texapon 10 g, NaCl 2,10 g, asam sitrat 0,30 g, HEC 0,21 g, sari kulit buah pisang kepok 30 g dan diukur aquades \pm 100 mL, sari jeruk nipis 1 mL.
- Dimasukkan texapon, NaCl, Hydroxy Ethyl Cellulose dan asam sitrat kedalam *beaker glass* lalu dilarutkan menggunakan aquades sebanyak 20 mL (ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan cepat) hingga homogen.
- Dimasukan sedikit demi sedikit sari kulit buah pisang kepok sebanyak 30 g sambil diaduk hingga merata.

- e. Ditambahkan sari jeruk nipis sebanyak 1 mL dalam campuran
- f. Ditambahkan pewarna pandan 2 tetes sebagai pewarna lalu diaduk hingga homogen.
- g. Campuran akhir dicukupkan volumenya dengan aquadest hingga 100 mL.
- h. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Rustini et al., 2023).

9. Pembuatan detergen cair dari ekstrak

- a. Disiapkan alat yang digunakan antara lain kertas perkamen, sudip, sendok tanduk, spatel, cawan porselen, batang pengaduk, *beaker glass*, gelas ukur 10 mL, 20 mL dan 50 mL dan juga bahan yang digunakan antara lain ekstrak etanol kulit buah pisang kepok, Hydroxy Ethyl Cellulose (HEC), texapon, NaCl, asam sitrat, sari jeruk nipis, pewarna pandan, dan aquades.
- b. Ditimbang texapon 10 g, NaCl 2,10 g, asam sitrat 0,30 g, HEC 0,21 g, sari kulit buah pisang kepok 30 g dan diukur aquades \pm 100 mL.
- c. Dimasukan texapon, NaCl, HEC, dan asam sitrat dalam *beaker glass* kemudian ditambahkan aquades sebanyak 20 mL (ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk dengan cepat) hingga homogen.
- d. Ditambahkan sedikit demi sedikit ekstrak etanol kulit buah pisang kepok sebanyak 5 g dan dicampur hingga homogen.
- e. Campuran akhir dicukupkan volumenya dengan aquadest hingga 100 mL.
- f. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Rustini et al., 2023).

10. Pengujian antibakteri

a. Pembuatan media Nutrien Agar (NA) dan Nutrien Broth (NB)

1) Media NA

Ditimbang nutrient agar sebanyak 3,6 gram dimasukkan kedalam Erlenmeyer 250 mL kemudian dilarutkan dengan akuades 180 mL. Setelah itu dipanaskan diatas *hot plate* sambil diaduk hingga homogen dan mendidih. Jika sudah mendidih media NA diturunkan dari *hot plate* (Sangkoy *et al.*, 2023).

2) Media NB

Ditimbang nutrient broth sebanyak 0,12 gram dimasukkan kedalam Erlenmeyer 100 mL kemudian dilarutkan dengan akuades 15 mL. Setelah itu dipanaskan diatas *hot plate* sambil diaduk hingga homogen. Setelah homogen media NB diturunkan dari *hot plate* (Yevani *et al.*, 2023).

b. Sterilisasi alat dan media

Alat-alat dan media yang akan digunakan dalam pengujian dicuci bersih kemudian dikeringkan. Setelah itu, dibungkus dengan kertas coklat. Semua alat dan bahan serta media yang akan digunakan dalam pengujian disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm, suhu 121 °C selama 15 menit dan jarum ose disterilkan dengan cara pijar di nyala api bunsen.

c. Peremajaan bakteri

Bakteri *Echerichia coli* ATCC 25922 yang berasal dari biakan murninya, diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan dengan cara dimasukkan pada media NB kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 18 - 24 jam.

d. Pembuatan media pengujian dan pengujian antibakteri

1. Dituangkan media NA sebanyak 20 mL pada masing-masing cawan dan dibiarkan hingga padat.
2. Dicampurkan suspensi bakteri kedalam media pembenihan nutrient agar sebanyak (100 mikroliter atau 0,1 ml). Kemudian suspensi bakteri diratakan dengan menggunakan *spreader* pada masing-masing cawan petri.
3. Dibuat lubang sumuran pada masing-masing cawan petri, dimana untuk sampel (detergen cair dari sari dan dari ekstrak) masing-masing dibuat 1 lubang sumuran dan untuk kontrol positif dan negatif masing-masing dibuat 2 lubang sumuran menggunakan *cork borer* 5 mm.
4. Masing-masing cawan diberikan label penanda untuk sampel, kontrol positif dan kontrol negatif.
5. Pipet sampel menggunakan mikropipet sebanyak 100 mikroliter kemudian dimasukan kedalam sumuran, begitupun kontrol positifnya adalah detergen merk "X" dan kontrol negatifnya adalah basis sabun dimasukkan juga ke masing-masing sumuran yang sudah diberi tandai dengan label.

6. Setelah itu dinkubasi dalam incubator selama 1x24 jam dengan suhu 37°C.

7. Setelah 24 jam, dilakukan pengamatan terhadap amati zona atau daerah bening yang terbentuk disekitar lubang sumuran dan mengukur menggunakan jangka sorong.

e. Perhitungan diameter zona hambat

$$\text{Rumus : } D = d1 + d2 - X$$

Ket:

D = Diameter zona hambat

d1 = diameter vertikal zona hambat

d2 = diameter horizontal zona hambat

X = diameter lubang sumuran

I. Analisis Data

Analisis statistik awal dari sediaan detergen cair cuci piring dari sari dan ekstrak kulit pisang kepok yaitu dilakukan uji normalitas data. Interpretasi uji normalitas data:

1. Jika nilai Sig. (P value) < (0,05) maka data tersebut tidak terdistribusi normal.
2. Jika nilai Sig. (P value) > (0,05) maka data tersebut terdistribusi normal.

Uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah sampel-sampel data-data memiliki varian yang sama atau data homogen. Interpretasi uji homogenitas varian:

- 1) Jika nilai Sig. Based on Mean $< (0,05)$ maka dikatakan bahwa varians data tidak homogen (uji homogenitas tidak terpenuhi).
- 2) Jika nilai Sig. Based on Mean $> (0,05)$ maka dikatakan bahwa varians data homogen (uji homogenitas terpenuhi).

Apabila data terdistribusi normal dan variannya homogen maka dilanjutkan dengan analisis dengan uji One Way Anova (Anova satu arah) dengan interpretasi uji:

1. Jika nilai Sig. (P value) $< (0,05)$ maka berkesimpulan ada perbedaan signifikan.
2. Jika nilai Sig. (P value) $> (0,05)$ maka berkesimpulan tidak ada perbedaan secara signifikan.

Apabila dari hasil uji ANOVA ditemukan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan maka dilanjutkan dengan Post Hoc test (*Games Howell*) dengan interpretasi uji:

1. Jika nilai Sig. (P value) $< (0,05)$ maka berkesimpulan ada perbedaan secara nyata.
2. Jika nilai Sig. (P value) $> (0,05)$ maka berkesimpulan tidak ada perbedaan secara nyata.