

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan tujuan utama menguji coba suatu objek penelitian, formulasi sabun padat ekstrak buah pariijoto (*Medinilla speciosa* Bulme) yang diuji aktivitas antibakteri lalu dilihat diameter zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2022 – Januari 2023.

2. Tempat Penelitian

- a. Determinasi buah pariijoto (*Medinilla speciosa* Bulme) di lakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi FSM Universitas Diponegoro, Semarang Jawa Tengah.
- b. Pembuatan ekstrak buah pariijoto dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi waluyo, Kabupaten semarang, Jawa Tengah
- c. Skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Fitokimia Universitas Ngudi waluyo, Kabupaten semarang, Jawa Tengah
- d. Pembuatan sabun dan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak buah pariijoto dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Laboratorium

Teknologi Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Kesehatan Universitas Ngudi Waluyo, Kabupaten Semarang Jawa Tengah.

C. Subjek Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah parijoto yang sudah tua atau berwarna merah keunguan yang berasal dari Desa Colo, Kecamatan Dewe, Kabupaten Kudus Jawa Tengah. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak kental dari buah parijoto.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dari Desa Colo, Kecamatan Dewe, Kabupaten Kudus Jawa Tengah.

2. Variabel terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji stabilitas fisik sediaan sabun padat ekstrak buah parijoto dan diameter zona hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah :

- a. Tanaman didapatkan dari tempat yang sama (buah parijoto)
- b. Waktu perlakuan secara bersamaan
- c. Media, sterilisasi alat, suhu dan waktu inkubasi

E. Pengumpulan Data

1. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, autoclave (Memmert), oven (Memmert), inkubator (Ecocell MMM Group), *lamiar air fow*, waterbath (Nesco Lab), mikroskop, batang pengaduk, cetakan sabun silikon, hand blender (Maspion), blender (Cosmos), jangka sorong, kertas pH, tisu, spatula silikon, wadah plastik, jangka sorong, cawan petri (pyrex/iwaki), batang pengaduk, rak dan tabung reaksi (Pyrex), beker glass (Iwaki), pipet tetes, spatel, sudip, obyek gelas, corong kaca, ayakan nomor 40 mesh, timbangan analitik (Ohaus), jarum ose, pembakar bunsen, mikro pipet dan tip, penggaris, kain flannel, *vaccum rotary evaporator*, kaca transparan dan hotplate (Fisons).

2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pariijoto (*Medinilla speciosa* Blume), VCO 31,70% (*Trivico Virgin Coconut Oil*), Palm Oil 31,72% (*SunCo*), Olive Oil 26,57% (*Pomace Olive Oil Mueloliva*), bakteri uji yang digunakan *Propionibacterium acnes*, cakram kertas diameter ± 6 mm, *Nutrient Agar* (NA), NaOH, etanol 70% dan aquadest.

F. Pengolahan Data

1. Formulasi Sediaan Sabun Padat Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* bulme)

Tabel 3. 1 Formula Sediaan Sabun Padat Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Bulme)

Bahan	Satuan	Formula I	Formula II	Fomula III
Ekstrak etanol buah parijoto	g	0,5	1	1,5
VCO	mL	31,70	31,70	31,70
Palm Oil	mL	31,72	31,72	31,72
Olive Oil	mL	26,57	26,57	26,57
NaOH	g	9	9	9
Aquades	mL	add 10	add 10	add 10

Sumber : Dwi Putri *et al.*, 2022 (Dengan modifikasi)

Keterangan :

Formula I : sediaan sabun padat dengan massa ekstrak etanol parijoto 0,5 g

Formula II : sediaan sabun padat dengan massa ekstrak etanol parijoto 1 g

Formula III : sediaan sabun padat dengan massa ekstrak etanol parijoto 1,5 g

2. Penyiapan Bahan

Buah segar parijoto yang sudah tua atau berwarna merah keunguan yang diambil langsung dari Desa Colo, Kecamatan Dewe, Kabupaten Kudus Jawa Tengah. Buah segar parijoto sebanyak empat kilogram dilakukan sortasi basah untuk dipisahkan dari kotoran-kotoran atau benda-benda asing, kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih, ditiriskan dan di kering-anginkan hingga tidak ada air yang menetes (Niswah, 2014). Buah parijoto selanjutnya di keringkan dibawah matahari dan ditutup dengan kain hitam setelah itu di haluskan menggunakan blender, selanjutnya serbuk di ayak menggunakan ayakan 40 mesh dan di dapatkan serbuk halus buah parijoto.

3. Pembuatan Ekstrak Cair Buah Parijoto

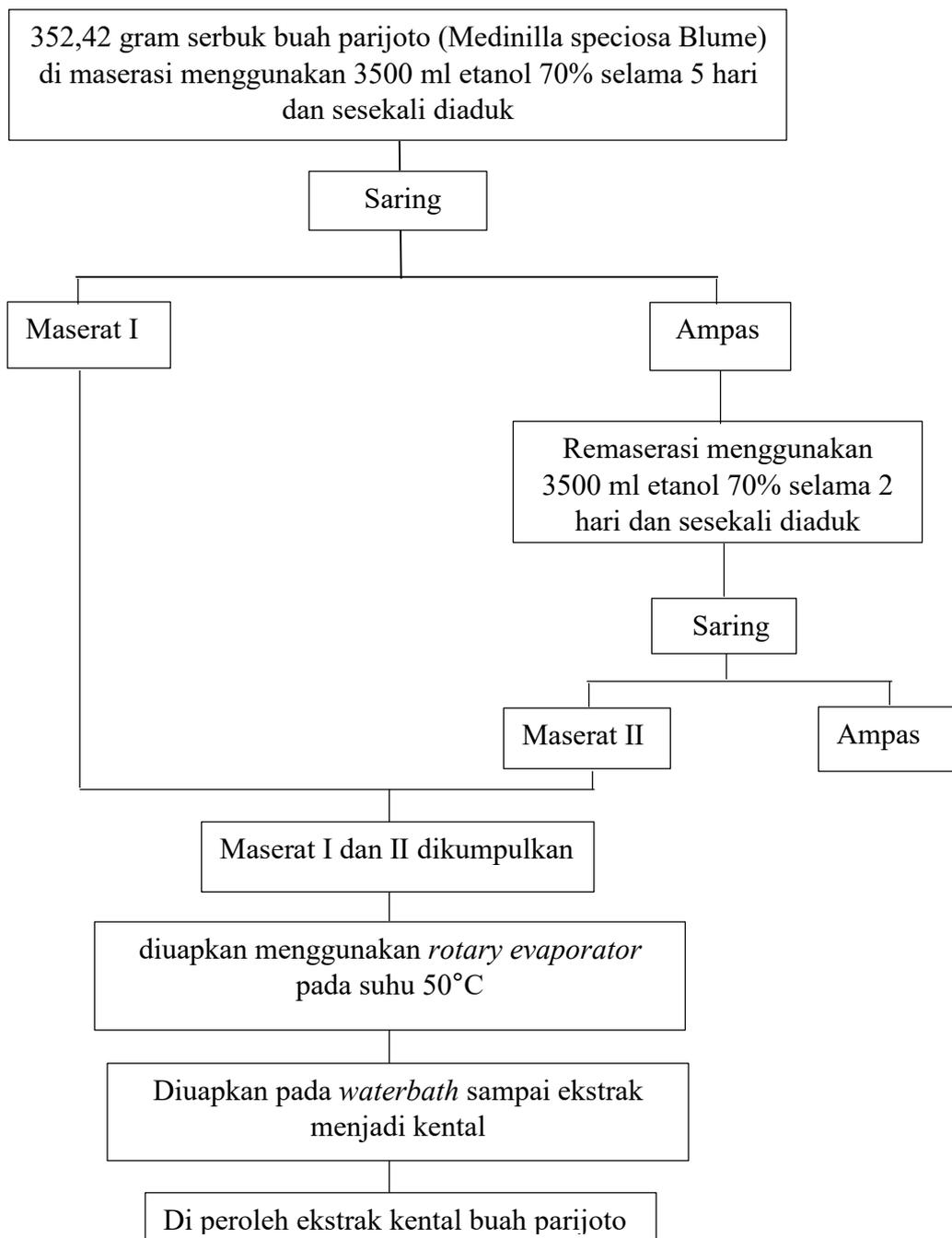
Pembuatan ekstrak buah parijoto menggunakan cara maserasi dengan cara memasukkan simplisia buah parijoto yang telah dihaluskan dan ditambahkan pelarut etanol 70%. Simplisia buah parijoto yang telah halus di maserasi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:10 yaitu 3,500 ml etanol dan 352,42 gram serbuk kemudian dimasukkan kedalam wadah tertutup dan terhindar dari cahaya selama 3 hari sambil sesekali diaduk, lalu disaring menggunakan kain flanel, selanjutnya dilakukan remaserasi sebanyak 1 kali selama 2 hari menggunakan pelarut yang sama. Maserat yang didapatkan disaring menggunakan kain flannel dan di tampung pada wadah kaca yang tidak tembus cahaya (Sugiarti & Muzlifah. 2018). Filtrat yang diperoleh dikumpulkan lalu dipekatkan menggunakan *vaccum rotary evaporatore* pada suhu 50°C dan diuapkan pada waterbath hingga diperoleh ekstrak kental kemudian dihitung rendemennya terhadap berat sampel awal.

4. Uji kadar air ekstrak

Uji kadar air ekstrak dilakukan dengan cara cawan porselen dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 105°C selama 1 jam dan kemudian timbang berat cawan porselen kosong, selanjutnya timbang ekstrak sebanyak 2 gram dan di panaskan pada oven selama 3 jam pada suhu 105°C. Sampel kemudian didinginkan dalam desikator selama 20 menit dan ditimbang (Azizah & Salamah, 2013)

5. Uji bebas etanol

Ekstrak buah pariijoto direaksikan dengan 2 mL kalium dikromat pada suasana asam dengan penambahan 3 tetes asam sulfat pekat. Larutan dianggap mengandung etanol jika terbentuk berwarna biru pada saat direaksikan (Vifta *et al.*, 2021)



Bagan 3. 1 Skema pembuatan ekstrak kental buah pariijoto

6. Skrining Fitokimia

a. Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,1 g ekstrak sampel ditambahkan dengan 10 ml aquades lalu dipanaskan selama 5 menit kemudian di saring ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 0,5 mg serbuk magnesium dan 1 ml HCl kemudian dikocok dengan kuat. Hasil positif dapat ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada larutan sampel (Nurlaila *et al.*, 2017).

b. Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan menggunakan larutan $FeCl_3$. Sampel selanjutnya ditimbang menggunakan timbangan digital sebesar 0,5 g, selanjutnya dilarutkan dengan menggunakan pelarut 50 mL aquades yang telah dipanaskan sebelumnya. Larutan tersebut kemudian dipanaskan selama 15 menit dan selanjutnya disaring menggunakan kertas saring. Filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan pada tabung reaksi dan direaksikan dengan 2-3 tetes larutan $FeCl_3$ 1%. Apabila warna sampel berubah menjadi warna hijau kehitaman atau biru tua, maka sampel tersebut mengandung senyawa tanin (Sugiarti & Pujiastuti, 2017)

c. Uji saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 0,1 gram ekstrak sampel ditambahkan dengan 10 ml aquades lalu dipanaskan selama 5 menit kemudian di saring kedalam tabung reaksi,

selanjutnya tambahkan dengan 4 tetes HCl lalu dikocok dengan kuat. Hasil positif dari uji saponin ditandai dengan terbentuknya busa stabil selama 10 menit (Nurlaila et al., 2017)

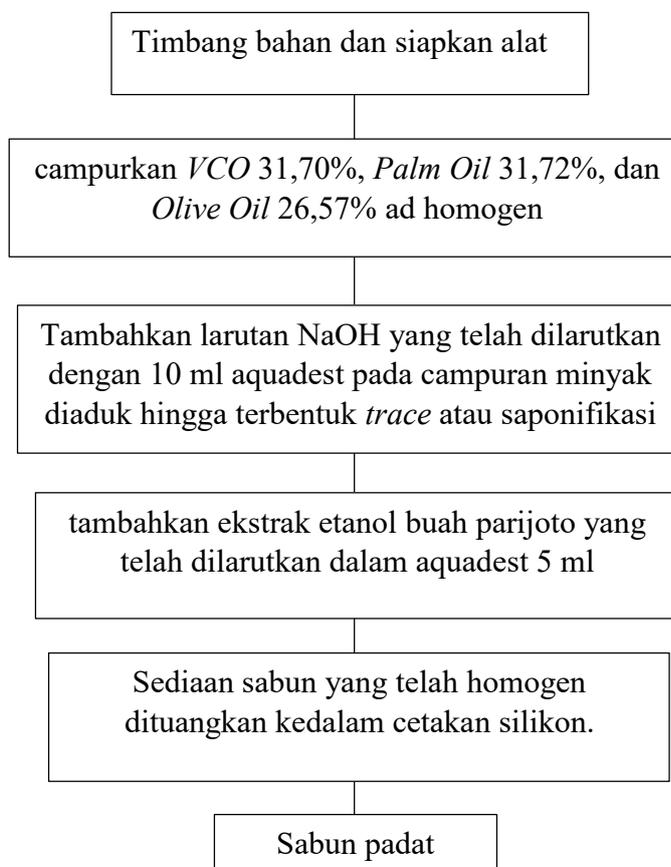
7. Pembuatan larutan NaOH

NaOH sebanyak 9 g dilarutkan sedikit demi sedikit dalam gelas beaker 10 mL kemudian di tambahkan aquades sampai volume 10 mL lalu diaduk sampai homogen dan didiamkan selama beberapa menit pada suhu ruang (Ryandini et al., 2018).

8. Pembuatan sediaan sabun ekstrak etanol buah parijoto (*Medinilla speciosa* Blume)

- a. Siapkan bahan yang akan digunakan yaitu ekstrak etanol buah parijoto dengan bahan tambahan minyak yaitu *VCO* 31,70 mL, *Palm Oil* 31,72 mL, *Olive Oil* 26,57 mL, bahan yang digunakan adalah NaOH dan aquadest.
- b. Bahan-bahan yang sudah disiapkan kemudian di timbang.
- c. Pertama, campurkan *VCO* 31,70 mL, *Palm Oil* 31,72 mL, dan *Olive Oil* 26,57 mL pada formula I, II dan III. masing-masing formula diaduk sampai homogen menggunakan *hand blender*.
- d. Selanjutnya tambahkan NaOH pada campuran minyak yang telah homogen pada formula I, II dan III. Pengadukan dilakukan pada seluruh campuran dengan menggunakan *hand blender* sampai terbentuk *trace* (tekstur yang kental) atau reaksi saponifikasi.

- e. Setelah terbentuk *trace* kemudian tambahkan ekstrak etanol buah parijoto yang telah dilarutkan dalam aquadest 5 ml sebanyak 0,5 g pada formula I, 1 g pada formula II dan 1,5 g pada formula III. Masing-masing formula kemudian diaduk kembali sampai homogen.
- f. Sediaan sabun yang telah homogen dituangkan kedalam cetakan silikon. Setelah dituangkan kedalam cetakan sediaan dibiarkan selama satu hingga dua hari pada suhu ruang/lemari pendingin agar sabun mengeras sempurna.
- g. Sabun yang telah padat dikeluarkan dari cetakan.



Bagan 3. 2 Skema pembuatan sabun padat ekstrak buah parijoto

9. Uji Stabilitas Fisik Sediaan

Uji stabilitas dipercepat menggunakan metode *cyling test* dimana sampel sabun akan disimpan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam dan $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam (1 siklus), untuk pengamatan stabilitas fisiknya dilakukan pada masing-masing siklus dari hari ke 0 sampai hari ke 10 dengan 5 siklus yang dilakukan selama 10 hari (Tomi & Indawati, 2018)

a. Uji organoleptis

Uji organoleptis meliputi bentuk sediaan secara fisik dan kekerasannya, aroma sediaan yang dihasilkan, tekstur dan warna sabun yang dihasilkan (Widyasanti et al., 2016).

b. Uji Derajat Keasaman (pH)

Pengukuran pH dilakukan dengan cara meletakkan sabun dalam air dan diukur menggunakan kertas pH. Prosedurnya sampel ditimbang sebanyak 1 g dan dilarutkan dalam 10 ml aquadest. Kertas pH dicelupkan ke dalam larutan dan Nilai pH sabun diamati menggunakan kertas pH (Nurhaliza, 2018). Uji pH dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Nilai pH 10 menunjukkan bahwa sabun tersebut bersifat basa dan nilai pH yang berkisar 9,0-11,0 adalah nilai pH normal untuk sabun. pH yang terlalu basa dapat mengakibatkan kulit mengalami iritasi seperti luka, gatal dan kering (Widyasanti et al., 2016).

c. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara, siapkan alat dan bahan kemudian mengambil sedikit sediaan sabun mandi padat ekstrak parijoto lalu dioleskan pada kaca transparan, setelah itu amati apakah terdapat partikel-partikel dan catat hasil yang didapatkan. Kriteria dari sabun yang homogen yaitu tidak terlihat adanya butiran-butiran dalam sabun (Maulana, 2013)

d. Uji Kadar Air Sabun padat

Dilakukan dengan cara metode gravimetri. Sabun yang telah disiapkan menggunakan botol timbang sebanyak 5 g. lalu dipanaskan didalam oven pada suhu 105°C selama 2 jam dan didinginkan sampai berat tetap (Nurhaliza, 2018). Kadar maksimal air yang

diperbolehkan dalam sediaan sabun padat adalah 15% (Sukawaty et al., 2016).

Keterangan :

= berat sampel + cawan (gram)

= berat sampel setelah pengeringan (gram)

W = berat sampel (gram)

e. Uji Tinggi Busa sabun padat

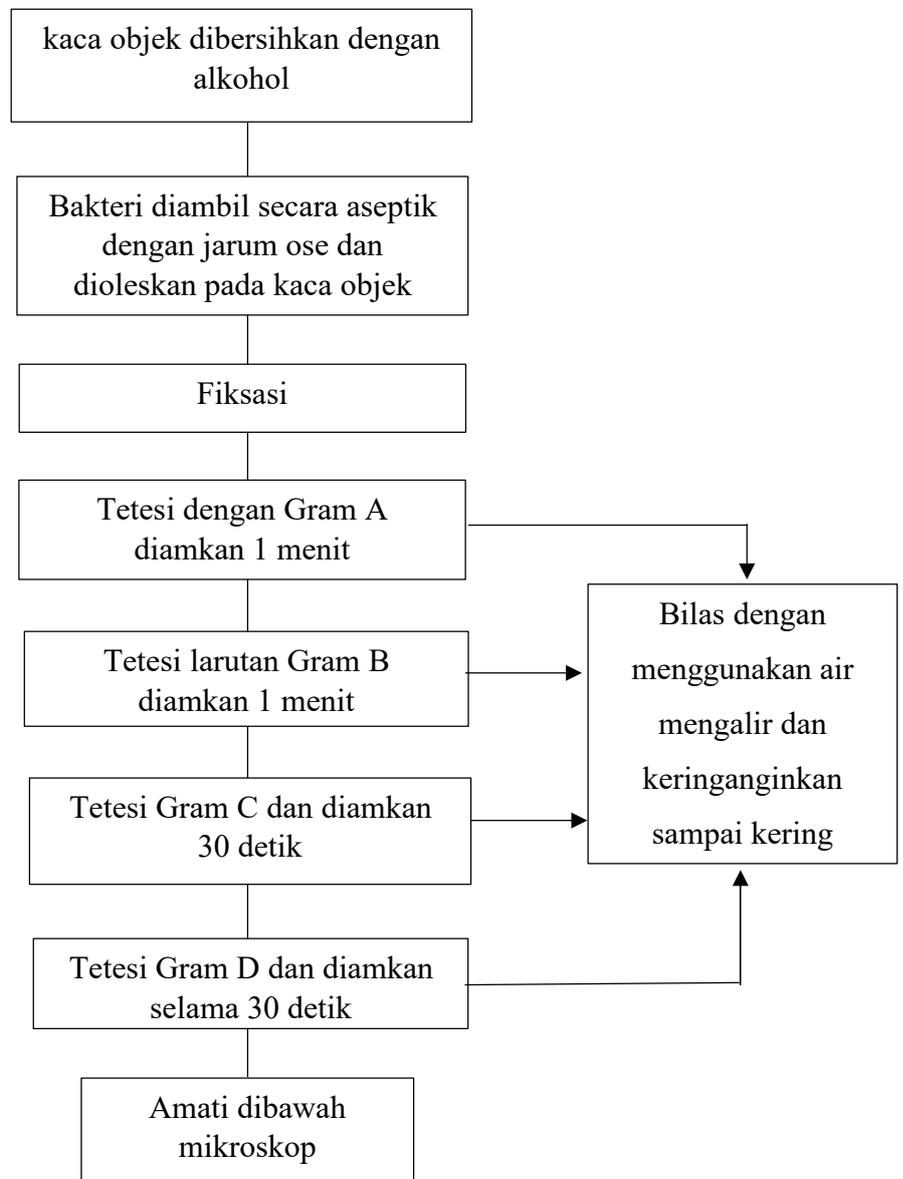
Uji tinggi busa dilakukan pada sediaan dengan formula optimum yang telah dibuat. Pengukuran tinggi busa bertujuan untuk melihat adanya daya busa yang dihasilkan oleh sabun padat organik dengan menggunakan metode yang sederhana, dengan cara menimbang 1 g sabun padat yang sudah dirajang lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi aquades 10 ml lalu dipanaskan dan kemudian ditunggu sampai larutan dingin. Selanjutnya dikocok selama 20 detik sampai terbentuk busa. Amati tinggi busa yang dihasilkan. Kriteria tinggi busa sabun padat yang ideal adalah 13-220 mm (Hutauruk et al. 2020).

10. Identifikasi Bakteri *Propionibacterium acnes*

Identifikasi bakteri *Propionibacterium acnes* dilakukan dengan cara pemeriksaan langsung dengan pewarnaan gram. Identifikasi dilakukan dengan cara kaca objek dibersihkan terlebih dahulu menggunakan alkohol dan dikeringkan, kemudian ditambahkan

bakteri yang diambil menggunakan jarum ose secara aseptis dan dioleskan pada kaca objek, lalu dilakukan fiksasi yaitu dengan cara dilewatkan beberapa kali diatas nyala api bunsen, kemudian ditetesi menggunakan ungu violet dan didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit kaca objek dialiri dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Bakteri kemudian ditetesi dengan larutan iodine dan didiamkan selama 1 menit, setelah 1 menit selanjutnya dicuci menggunakan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Setelah kering, selanjutnya ditetesi dengan alkohol 95% dan didiamkan selama 30 detik lalu dialiri dengan air dan dikeringanginkan sampai kering, kemudian ditetesi dengan safranin selama 30 detik dan dicuci menggunakan air mengalir, dikeringanginkan dan menggunakan kertas penghisap, setelah itu lakukan pengamatan dibawah mikroskop.

Bakteri yang mengandung kristal violet saat pewarnaan akan berwarna ungu dibawah mikroskop adalah bakteri gram positif sedangkan bakteri gram negatif akan berwarna merah. Perbedaan klasifikasi bakteri gram positif dan negatif didasarkan pada perbedaan struktur dinding sel bakteri (Jawetz et al., 2001). Gram positif memiliki susunan yang lebih sederhana dibandingkan bakteri gram negatif yang tergolong lebih kompleks.



Bagan 3. 3 Skema Identifikasi Bakteri

11. Uji aktivitas antibakteri sabun padat ekstrak buah parijoto (*Medinilla speciosa Blume*)

a. Pembuatan Media dan Sterilisasi

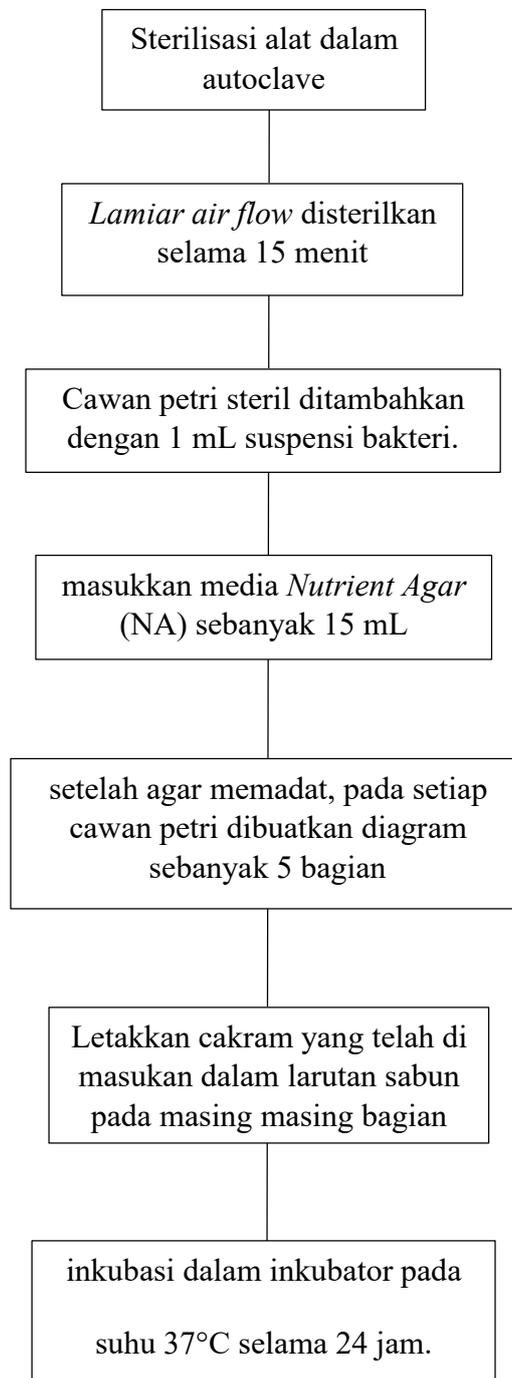
- 1) Serbuk *Nutrient agar* di timbang sebanyak 2,3 g dan dicampurkan dengan 100 mL aquades dalam erlenmeyer lalu dipanaskan dan diaduk menggunakan *stirrer* diatas *hotplate* sampai larut
- 2) Cawan petri, tabung reaksi, vial, beserta wadah yang telah dicuci bersih dan dikeringkan dibungkus dengan kertas dan plastik, sementara kertas cakram dimasukkan dalam cawan petri bersih. bahan dan media yang akan digunakan disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (Radji, 2010). Alat yang digunakan di sterilisasi menggunakan oven pada suhu 160°C selama 2 jam, setelah dilakukan sterilisasi semua alat dan bahan disimpan kedalam *laminar air flow* yang sebelumnya sudah di sterilisasi dengan menggunakan lampu UV selama 30 menit dan telah di bersihkan menggunakan alkohol 70%.

b. Kontrol Positif Dan Kontrol Negatif

Kontrol positif yang digunakan adalah sabun padat JF Sulfur dan kontrol negatif yang digunakan adalah basis sabun padat tanpa ekstrak.

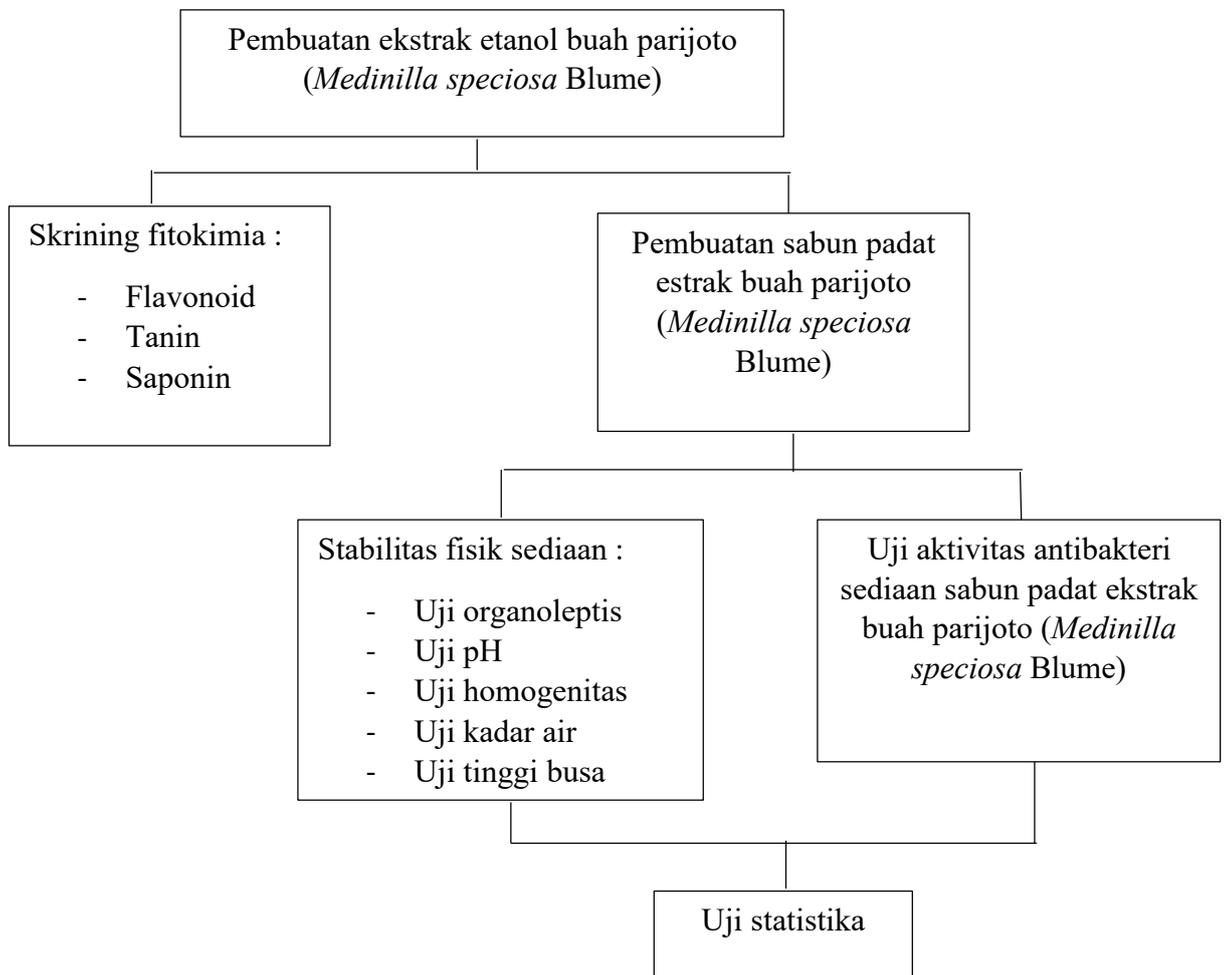
c. Prosedur Uji Antibakteri

- 1) Uji aktivitas antibakteri diawali dengan penyiapan cawan petri steril yang ditambahkan dengan 1 mL suspensi bakteri. Kemudian masukkan media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 15 mL yang sudah dicairkan diatas kompor listrik dengan menggunakan wadah yang berisi air. Cawan petri kemudian digoyangkan secara berlawanan arah jarum jam sebanyak 5-10x dan digoyangkan lagi searah dengan jarum jam sebanyak 5-10x agar media suspensi tercampur (Niswah, 2014).
- 2) Langkah selanjutnya setelah agar memadat, pada setiap cawan petri dibuatkan diagram sebanyak 5 bagian. Kertas cakram kontrol positif dan kontrol negatif, cakram kemudian dimasukkan kedalam sediaan sabun padat ekstrak buah parijoto yang telah dicairkan dengan cara 5 gram sabun dilarutkan dalam 10 mL aquadest (Febriyenti et al., 2014). Cakram kemudian diletakkan pada masing-masing bagian dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 3) Uji antibakteri ekstrak buah parijoto dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Kertas cakram di masukan kedalam larutan uji dan diletakkan diatas media agar lalu dilihat zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram dan diukur untuk melihat diameter zona hambatnya (Astutik et al., 2021)



Bagan 3.4 Prosedur Uji Antibakteri

12. Alur Penelitian

**Bagan 3.5 Skema Alur Penelitian**

13. Uji Statistika

Data pada penelitian ini dianalisis secara deskriptif. Analisis evaluasi sifat fisik, uji stabilitas dan uji antibakteri dilakukan secara statistik menggunakan metode analisis varian satu jalan Uji One Way ANOVA, SPSS versi 26 dengan taraf kepercayaan 95% (Lestari et al., 2020).

a. Uji Normalitas

Uji normalitas menggunakan uji normalitas *saphiro wilk*. Sebelum dilakukan uji statistik harus dilakukan uji normalitas terlebih dahulu untuk memastikan data terdistribusi normal ($P > 0,05$) (Hidayati, 2021). Uji normalitas ini bertujuan untuk menguji apakah dalam model regresi, variable pengganggu atau residual memiliki data yang terdistribusi normal atau tidak (Siregar, 2015). Pengambilan kesimpulan dari uji normalitas dapat dilihat berdasarkan:

- 1) Jika nilai singnifikansi yang diperoleh $> 0,05$ maka data dinyatakan terdistribusi normal.
- 2) Jika nilai signifikansi $< 0,05$ maka data dinyatakan tidak terdistribusi normal.

b. Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilakukan untuk mengetahui ada beberapa varian populasi yang digunakan adalah sama atau tidak. Uji homogenitas dilakukan sebagai salah satu prasyarat dalam *analisis independent sample t-test* dan juga Anova. Asumsi yang menjadi

dasar dalam analisis varian (Anova) adalah bahwa varian dari populasi adalah sama. Uji kesamaan antara dua varians digunakan untuk menguji apakah sebaran dari data tersebut termasuk hohomogen atau tidak, dengan cara membandingkan kedua variansnya. Jika dari kedua kelompok data atau lebih memiliki varians yang sama besar maka uji homogenitas tidak perlu dilakukan lagi kerana data yang didapatkan sudah dianggap homogen. Uji homogenitas dilakukan apabila data kelompok data tersebut terdistribusi normal. Uji homogenitas yang digunakan pada penelitian ini adalah uji levene test yaitu uji yang digunakan untuk menguji kesamaan varians dari beberapa populasi. Uji levene menggunakan uji varian satu arah. Data ditransformasikan dengan jalan mencari selisih dari masing-masing skor dengan rata-rata kelompoknya (Usmadi, 2020).

c. Uji *Post-Hoc* LSD (*Least Significant Different*)

Uji LSD (*Least Significant Different*) merupakan suatu prosedur lanjutan yang bertujuan untuk mengetahui perlakuan mana saja yang berbeda secara signifikan apabila hipotesis nol ditolak (Montgomery, 2011)