BAB III

BAHAN DAN METODE

3.1 Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan penelitian meliputi skrining fitokimia, uji organoleptis, uji pH, uji busa sabun, pemeriksaan syarat mutu sabun padat sesuai SNI 3532-2016 serta uji antibakteri sediaan sabun mandi padat dari pelepah pisang (*Musa paradisiacal*),.

3.2 Waktu Dan Tempat Penelitian

3.2.1 Waktu Penelitian

Penlitian dilakukan pada rentang bulan Maret-Mei tahun 2022

3.2.2 Tempat Penelitian

Tempat Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang dan Laboratorium Farmasi Universitas Ma Chung.

3.3 Variabel Independen (Bebas)

Variabel ini mempunyai pengaruh atau menjadi penyebab terjadinya perubahan pada variabel lain. Menurut Sugiyono (2018) mendefinisikan variabel independen adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen. Dalam penelitian ini yang menjadi variable bebas adalah formulasi sediaan sabun mandi padat ekstrak pelepah pisang (*Musa paradisiacal*).

3.4 Variabel Dependen (Terikat)

Menurut Sugiyono (2018) variabel dependen adalah variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Dimana nilainya dipengaruhi variable lain dan disebut variable output, kriteria, atau konsekuen. Yang menjadi variable terikat dalam peneitian ini adalah sabun mandi yang mengandung antibakteri pencegah jerawat.

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah uraian tentang batasan variable yang diteliti, atau tentang apa yang diukur oleh variable yang

bersangkutan(Notoatmodjo, 2012). Definisi operasional dapat dilihat pada table berikut:

Variabel	Definisi	Cara	Skala	
		Pengukuran	Pengukuran	
Formulasi sediaan sabun mandi padat ekstrak pelepah pisang (<i>Musa paradisiacal</i>).	Zat hasil dari pembuatan sabun padat ekstrak pelepah pisang (Musa	Ekstraksi	Rasio	
	paradisiacal).			
Sabun mandi yang	Hasil yang didapat	Pengamatan	Rasio	
mengandung	dari berbagai	hasil dari		
antibakteri pencegah	pengujian	berbagai uji		
jerawat				

3.6 Alat dan Bahan

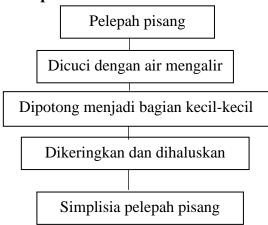
Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Cetakan sabun, Beaker glass 250 ml merk Pyrex, Beaker glass 100 ml merk Pyrex, Magnetic Hotplate stirrer NESCO MS H 280 pro, Waterbath Merk MEMMERTH, Timbangan Analitik OHAUS Pioneer, cawan porselen 125ml, Batang pengaduk, pipet tetes, spatula, Tabung reaksi kaca 15 ml merk Pyrex, tabung reaksi kaca 25 ml merk iwaki Pyrex, kertas saring whatman No 42, gelas ukur 100 ml merk Pyrex, corong pisah 500ml merk IWAKI, Corong kaca Pyrex 75 ml, oven merk Memmerth, Erlenmeyer Pyrex 500 ml, Vacuum pump 1 stage VP160, blender Merk Cosmos CB-802, Hirayama Autoclave HVE-50, buret 50 ml IWAKI, Labu didih 250 ml merk Duran, incubator merk Ecocell, Vortex Genius 3 IKA 3340000, pH meter merk Eutecht pH 700, Laminar Air Flow, pipet ukur 10 ml merk Pyrex, Toples kaca.

Bahan yang digunakan adalah VCO, Minyak Sawit merk Sunco, NaOH 30% Merck, Asam Stearat merk KAO, Gliserin Merck, propilen glikol Merck, Cocamid DEA Merck, Aquadest, ekstrak pelepah pisang, Bakteri *S.epidermidis*.

3.7 Sampel penelitian

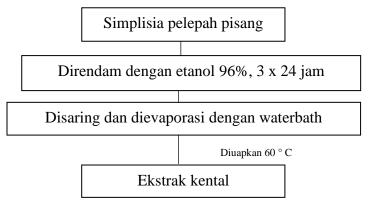
Sampel penelitian ini adalah ekstrak pelepah pisang.

3.8 Penyiapan sampel



Limbah pelepah pisang yang tidak digunakan setelah dikumpulkan di ambil 5 kg. Dicuci dalam air mengalir. Lalu dilakukan sortasi basah. Kemudian dipotong menjadi bagian keci-kecil dengan menggunakan pisau. Setelah itu dikeringkan dengan oven atau dibawah sinar matahari kurang lebih 3 hari untuk mengurangi kadar air pada pelepah pisang. Dan setelah itu dihaluskan dengan blender.

3.9 Ekstraksi Sampel



Penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi kemudian dievaporasikan dengan waterbath. Setelah pengeringan dan penghaluskan didapat simplisia pelepah pisang. Kemudian simplisia pelepah pisang direndam dalam wadah dengan etanol 96% hingga 1 cm diatas permukaan sampel. Perendaman di lakukan selama 3 x 24 jam sambil sesekali diaduk setiap hari. Hasil rendaman disaring dan dievaporasikan dengan waterbath dan dilakukan penguapan dengan pemanasan dibawah 60° C agar pelarut hilang dan diperoleh ekstrak yang kental. Hasil ekstraksi disimpan di dalam almari pendingin dengan suhu 4°C.

3.10 Pengujian Skrining Fitokimia Simplisia

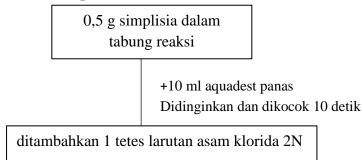
3.10.1 Pemeriksaan flavonoida

10 g simplisia +10 ml aquades didihkan dan saring

5 ml filtrat ditambah 0,1 g magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alcohol lalu dikocok

Sebanyak 10 gram simplisia ditambahkan 10 ml air, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, kedalam 5 ml filtrat ditambahkan 0,1 gram serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Farnsworth, 1996 dalam Kaban, 2015).

3.10.2 Pemeriksaan saponin



Sebanyak 0,5 gram sampel dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling panas, didinginkan kemudian dikocok kuatkuatselama 10 detik, timbulbusa yang mantap tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Tambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2N, bila buih tidak hilang menunjukan adanya saponin (Depkes RI, 1989 dalam Kaban, 2015).

3.11 Formula

Bahan	Formula(F)			Kegunaan
	F0	F1	F2	
Ekstrak pelepah	-	5 g	10 g	Zat aktif
pisang				
Virgin Coconut Oil	10 ml	10 ml	10 ml	Sumber minyak dan
(VCO)				emolien

Minyak Sawit	20 ml	20 ml	20 ml	Sumber minyak dan emolien
Propilen glikol	15 ml	15 ml	15 ml	Pengawet
Naoh 30%	20 ml	20 ml	20 ml	Sumber alkali
Gliserin	5 ml	5 ml	5 ml	Humektan atau pelembut
Asam stearat	5 g	5 g	5 g	Pengeras sabun
Cocaimid DEA	8 ml	8 ml	8 ml	Pembusa
Parfum	q.s	q.s	q.s	Pewangi
Aquadest	17 ml	12 ml	7 ml	Pelarut

Keterangan:

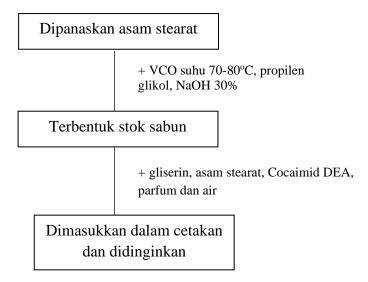
q.s = quantum sufficit(secukupnya)

F0 = Sediaan sabun mandi padat 0 g ekstrak pelepah pisang

F1 = Sediaan sabun mandi padat 5 g ekstrak pelepah pisang

F2 = Sediaan sabun mandi padat 10 g ekstrak pelepah pisang

3.12 Pembuatan Sabun Mandi Padat



Pembuatan sabun mandi padat diawali dengan pembuatan stok sabun. Dilebur asam stearat didalam beaker glass kemudian dicampurkan Virgin Coconut Oil (VCO) pada suhu 70-80oC, lalu dimasukkan propilen

glikol, aduk hingga homogen. Ditambahkan larutan NaOH 30% ke dalam beaker glass, diaduk sampai terbentuk stok sabun. Stok sabun kemudian ditambahkan dengan bahan bahan pendukung seperti gliserin, asam sitrat, Cocaimid DEA, dan air dengan tetap menjaga suhu dan diaduk terus hingga larutan homogen. Lalu ditambah parfum secukupnya, diaduk. Kemudian dimasukkan ke dalam cetakan dan didinginkan sampai mengeras.

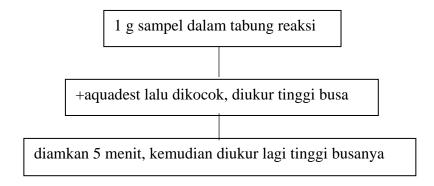
3.13 Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan cara dilihat dari bentuk, warna, dan bau dari sabun.

3.14 Pengujian pH

Alat pH meter dikalibrasi mengunakan larutan dapar pH 7 dan pH 4. 1 g sedian yang akan diperiksa diencerkan dengan air suling hinga 10 mL. Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam larutan yang diperiksa, jarum pH meter dibiarkan bergerak sampai menunjukkan posisi tetap, pH yang ditunjukan jarum pH meter dicatat (Depkes RI, 1995).

3.15 Uji Stabilitas Busa



Sampel ditimbang sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan akuades ad 10 ml, dikocok dengan membolak-balikkan tabung reaksi, lalu diukur tinggi busa yang dihasilkan dan diamkan 5 menit, kemudian diukur lagi tinggi busa yang dihasilkan setelah 5 menit (Sari, 2017)

Uji busa =
$$\frac{tinggi\ busa\ akhir}{tinggi\ busa\ awal}\ X\ 100$$

3.16 Pemerikasaan Syarat Mutu Sabun(SNI 3532-2016)

3.16.1 Persiapan contoh

Contoh sabun dipotong halus. Kemudian campur dengan menggunakan spatula seluruh contoh uji pada wadah yang bersih, kering dan tidak menyerap. Simpan contoh uji di tempat yang bersih dan kering. Lalu tutup rapat dan beri label identifikasi. (SNI 3532-2016)

3.16.2 Kadar air

Timbang cawan petri yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu $(105 \pm 2)^{\circ}$ C selama 30 menit (b0). Timbang $(5 \pm 0,01)$ g contoh uji ke dalam cawan petri diatas (b1). Panaskan dalam oven pada suhu (105 ± 2) °C selama 1 jam. Dinginkan dalam desikator sampai suhu ruang lalu ditimbang (b2). Ulangi sampai bobot tetap

Kadar air =
$$\frac{b1-b2}{b1} X 100$$

Keterangan:

Kadar air dalam satuan % fraksi massa

- b0 adalah bobot cawan kosong, g
- b1 adalah bobot contoh uji dan cawan petri sebelum pemanasan, g
- b2 adalah bobot contoh uji dan cawan petri setelah pemanasan, g.(SNI 3532-2016)

3.16.3 Total lemak (ekstraksi, titrasi, gravimetri)

Timbang (5 ± 0,01) g contoh uji (b0) dalam gelas piala, larutkan contoh uji tersebut dengan 100 mL akuades panas dengan suhu (70-80)0 C masukan ke dalam corong pemisah. Cuci gelas piala dengan sedikit akuades dan masukkan akuades tadi ke corong pemisah, tambahkan beberapa tetes larutan methyl orange. Sambil mengocok corong pemisah, tambahkan H2SO4 atau HCl yang sudah diketahui volumenya dengan buret, tambahkan berlebih 5 mL. Dinginkan corong pemisah sampai suhunya sekitar 25 °C. Tambahkan 100 mL pelarut petroleum. Pasang penutup dan balikkan corong pemisah secara perlahan sambil menahan penutupnya. Buka kran corong pemisah secara perlahan untuk membuang tekanan dan tutup kembali kran. Kocok perlahan dan

buang tekanannya kembali. Ulangi pengocokan sampai lapisan cairan terpisah sempurna. Pasang corong pemisah dengan posisi berdiri.Alirkan keluar lapisan cairan pelarut petroleum ke gelas piala. Ekstrak kembali cairan dalam corong pemisah dengan 50 mL pelarut petroleum. Ulangi proses (k dan l. Kumpulkan lapisan cairan dalam gelas piala. Campurkan ketiga ekstrak pelarut petroleum dalam gelas piala yang lain. Cuci ekstrak dengan akuades 25 mL sebanyak tiga kali sampai netral terhadap methyl orange. Diamkan selama 5 menit dan pisahkan ekstrak dengan pencucinya, saring dengan kertas saring jika diperlukan. Uapkan pelarut petroleum menggunakan penangas air. Larutkan residu dalam 20 mL etanol 95% netral. Tambah beberapa tetes larutan fenolftalein; . Titrasi dengan larutan KOH alkoholis sampai berwarna merah muda; . Catat volume yang digunakan (V. Uapkan larutan alkoholis dari larutan contoh hasil titrasi dalam penangas air. Saat penguapan hampir berakhir, putar gelas piala untuk mendistribusikan sabun membentuk lapisan tipis pada bagian samping dan dasar wadah. Supaya penguapan sempurna tambahkan aseton dan uapkan dalam penangas air. Panaskan pada oven dengan suhu $(103 \pm 2)^{\circ}$ C sampai perbedaan bobot setelah pemanasan untuk penambahan 15 menit tidak melebihi 3 mg, dinginkan, dan timbang bobotnya (b1).

Total lemak =
$$[b1 - (V \times N \times 0.038)] \times \frac{100}{b0}$$

Keterangan:

Total lemak dalam satuan % fraksi massa

- bo adalah bobot contoh uji, g
- b1 adalah bobot sabun kering, g
- V adalah volume KOH alkoholis yang digunakan untuk titrasi, mL
- N adalah normalitas larutan standar KOH alkoholis. (SNI 3532-2016)

3.16.4 Bahan tak larut dalam etanol (Gravimetri)

Larutkan (5 \pm 0,01) g contoh uji (b1) dengan 200 mL etanol netral ke dalam erlenmeyer tutup asah dan pasangkan pendingin tegak, panaskan di atas penangas air sampai sabun terlarut seluruhnya. Keringkan kertas saring atau cawan gooch dalam oven pada suhu (100-105) °C selama 30 menit. Biarkan kertas saring atau cawan Gooch dingin. Timbang kertas saring atau cawan Gooch. Ulangi cara kerja b sampai d sampai bobot tetap (b0). Tempatkan kertas saring atau cawan Gooch pada corong di atas labu erlenmeyer yang sudah dirangkai dengan pompa vakum. Saat sabun terlarut seluruhnya, tuang cairan ke kertas saring atau cawan Gooch. Lindungi larutan dari karbon dioksida dan asap asam selama proses dengan menutupnya menggunakan pendingin tegak. Cuci bahan yang tak larut dalam erlenmeyer pertama dengan etanol netral. Tuang cairan cucian tadi ke kertas saring atau cawan Gooch. Cuci residu pada kertas saring atau cawan Gooch dengan etanol netral sampai seluruhnya bebas sabun. Simpan filtratnya. Keringkan kertas saring atau cawan Gooch serta residu dalam oven pada suhu (100-105) °C selama 3 jam. Biarkan dingin. Timbang kertas saring atau cawan Gooch tersebut (b2).

Bahan tak larut dalam etanol =
$$\frac{b2-b0}{b1}$$
 X 100

Keterangan:

Bahan tak larut dalam etanol dalam satuan % fraksi massa

- bo adalah bobot kertas saring atau cawan gooch kosong, g
- b1 adalah bobot contoh uji, g
- b2 adalah bobot kertas saring atau cawan gooch kosong dan residu, g (SNI 3532-2016)

3.16.5 Alkali bebas atau asam lemak bebas

Panaskan filtrat dari penentuan bahan tak larut dalam alkohol (Subpasal 6.4). Saat hampir mendidih, masukkan 0,5 mL indikator fenolftalein 1%. Jika larutan tersebut bersifat asam (penunjuk fenolftalein tidak berwarna), titrasi dengan larutan standar KOH sampai timbul warna merah muda yang stabil. Jika larutan tersebut

bersifat alkali (penunjuk fenolftalein berwarna merah), titrasi dengan larutan standar HCl sampai warna merah tepat hilang. Hitung menjadi NaOH jika alkali atau menjadi asam oleat jika asam.

Alkali bebas =
$$\frac{40 \times V \times N}{b} \times 100$$

Keterangan:

Alkali bebas dalam satuan % fraksi massa

- V adalah volume HCl yang digunakan, mL
- N adalah normalitas HCl yang digunakan
- b adalah bobot contoh uji, mg
- 40 adalah berat ekuivalen NaOH

Asam Lemak bebas =
$$\frac{282 \times V \times N}{b} \times 100$$

Keterangan:

Asam lemak bebas dalam satuan % fraksi massa

- V adalah volume KOH yang digunakan, mL
- N adalah normalitas KOH yang digunakan
- B adalah bobot contoh uji, mg
- 282 adalah berat ekuivalen asam oleat ($C_{18}H_{34}O_2$) (SNI 3532-2016)

3.16.6 Kadar klorida

Larutkan ($5 \pm 0,01$) g contoh uji (b) dengan 300 mL akuades. Didihkan jika diperlukan untuk menyempurnakan pelarutan. Tambahkan larutan Magnesium Nitrat berlebih (sekitar 25 mL). Tanpa didinginkan atau disaring, titrasi dengan AgNO3 dengan indikator K2CrO4 sampai terbentuk warna merah bata. Catat volume AgNO3 yang digunakan (V).

Kadar Klorida =
$$\frac{5,85x \ V \ x \ N}{b} \ x \ 100$$

Keterangan:

Kadar klorida adalah % fraksi massa

- V adalah volume larutan standar AgNO3 yang dipakai untuk titrasi, mL
- N adalah normalitas larutan standar AgNO3
- 5,85 adalah bobot ekuivalen NaCl
- b adalah bobot contoh uji yang digunakan, g(SNI 3532-2016)

3.16.7 Lemak tidak tersabunkan

Timbang (5 \pm 0,01) g contoh (b0), masukkan dalam gelas piala 250 mL, tambahkan 50 mL etanol netral dan 50 mL larutan natrium hidrogen karbonat. Larutkan contoh dengan memanaskan tidak lebih dari 70°C. Setelah sabun larut seluruhnya, biarkan dingin dalam desikator. Pindahkan larutan ke dalam corong pemisah 250 mL. Bilas gelas piala beberapa kali dengan campuran etanol netral dengan larutan natrium hidrogen karbonat 1:1. Ekstrak tiga kali, aduk perlahan, setiap kali dengan 50 mL n-heksana atau petroleum eter,gabungkan ekstrak dan saring jika diperlukan . Cuci kertas saring sampai netral terhadap fenolftalein menggunakan 50 mL campuran etanol netral dengan akuades 1:1. Secara normal tiga kali pencucian sudah cukup. Pindahkan larutan ke dalam labu didih 250 mL yang sebelumnya dikeringkan dalam oven dengan suhu (103 ± 2) °C dan dibiarkan dingin dalam desikator lalu ditimbang. Uapkan sebagian besar solven pada penangas air mendidih. Keringkan labu dan residu selama 5 menit dalam oven dengan suhu (103 \pm 2) °C; Biarkan dingin dalam desikator. Ulangi cara kerja pengeringan, pendinginan, dan penimbangan sampai perbedaan 2 kali penimbangan tidak lebih dari 2 mg (b1).Larutkan residu dalam beberapa mL etanol netral. Gunakan mikro buret untuk titrasi asam lemak bebas dengan larutan standar KOH 0,1 N dengan menggunakan indikator fenolftalein sampai larutan berubah warna menjadi merah muda. Catat volume (V) dari larutan standar KOH 0,1 N yang digunakan untuk titrasi. Tambahkan 10 mL larutan standar KOH 2 N menggunakan pipet. Didihkan larutan dengan menggunakan pendingin tegak selama 30 menit. Tambahkan akuades yang volumenya seimbang dengan volume larutan. Pindahkan larutan tersebut ke dalam corong pemisah 50 mL. Gunakan beberapa mL campuran etanol netral dengan akuades 1:1 untuk mencuci labu. Ekstrak 3 kali, setiap kali dengan 10 mL n-heksana atau petroleum eter dan gabungkan ekstrak. Cuci sampai netral terhadap fenolftalein. Setiap mencuci, gunakan 10 mL campuran etanol netral dengan akuades 1:1. Secara normal 3 kali pencucian sudah cukup. Pindahkan larutan ke dalam labu didih 100 mL yang sebelumnya dikeringkan dalam oven pada suhu (103 ± 2)°C, dibiarkan dingin, dan ditimbang sampai bobot tetap. Uapkan sebagian besar solven pada penangas air mendidih. Keringkan labu dan residu selama 5 menit dalam oven dengan suhu (103 ± 2)°C, biarkan dingin dalam desikator dan timbang sampai bobot tetap. Ulangi cara kerja pengeringan, pendinginan, dan penimbangan sampai bobot tetap (b2).

Lemak tidak tersabunkan =
$$(b1 - \frac{V \times M}{10000} - b2) \times \frac{100}{b0}$$

Keterangan:

Lemak tidak tersabunkan dalam satuan % fraksi massa

- b0 adalah bobot contoh uji, g
- b1 adalah bobot hasil ekstrak pertama, g
- b2 adalah bobot hasil ekstrak kedua, g
- M adalah rata-rata relatif bobot molar dari asam lemak dalam sabun
- V adalah volume larutan standar KOH 0,1 N yang digunakan dalam penentuan keasaman pada ekstraksi pertama, mL. (SNI 3532-2016)

3.17 Uji Antibakteri

Metode yang digunakan adalah percentage kill. Pertama dilakukan penentuan Colony Forming Unit (CFU). Satu koloni biakan murni bakteri staphylococcus epidermidis diambil dengan menggunakan ose steril dari kultur bakteri, delanjutnya disuspensikan dalam tabung yang berisi 10ml NaCL 0,9%. Lalu dibuat pengenceran dari suspensi bakteri tersebut

kedalam 9 tabung yang berisi NaCl 0,9%. Dipipet 1 ml dari setiap tabung pengenceran. Diinkubasi dalam autoklaf pada suhu 35°C selama 1 x 24 Jam. Kemudian dibandingkan dengan kekeruhan yang sama dengan larutan standar MC. Farland.

Kedua, dilakukan uji percentage kill. Dipipet sebanyak 0,5ml suspense bakteri yang kekeruhannya sama dengan larutan standar MC.Farland yang menghasilkan jumlah koloni 100-200 pada penentuan CFU dicampur dengan 4,5ml sampel A. Setelah 30 detik. Dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam tabung 1A yang telah berisi 9ml akuades steril. Sebanyak 0,5ml suspense jamur dan 4,5 ml sampel B dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, setelah 30 detik. Dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam tabung 1B yang telah berisi 9ml akuades steril. Sebanyak 0,5ml suspense bakteri dan 4,5 ml sampel C dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, setelah 30 detik. Dipipet 1 ml dimasukkan ke dalam tabung 1C yang telah berisi 9 ml akuades steril. Masing - masing dibuat tiga kali pengulangan. Sebagai control, sebanyak 0,5ml suspense bakteri dicampur dengan 4,5ml aquades dimasukkan kedalam tabung reaksi steril. Kemudian tabung-tabung pengencer di vortex. Kemudian dipipet 1 ml suspense dari setiap tabung dimasukkan ke cawan petri steril dan dituangkan media SDA cair sebanyak 15ml dengan suhu 50^oC. Cawan petri digoyang membentuk angka delapan diatas permukaan meja agar media dan suspense bakteri tercampur rata dan dibiarkan hingga memadat. Diinkubasi selama 1 x 24jam pada suhu 37°C.

Control coloni dihitung menggunakan coloni counter yang kemudian hasilnya dibandingkan dengan 0,5 MC farland apabila kekeruhan pengenceran sama dengan MC farland maka control koloni memenuhi persyaratan untuk dijadikan sebagai control. Kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada kontrol dan dihitung rata-rata jumlah koloni. Kemampuan sabun mandi padat dalam membunuh pertumbuhan staphylococcus epidermidis dilihat dengan menghitung percentage kill. (Y, Rasyid, and Amir 2017)

Dengan rumus : Percentage kill = $\frac{(c-x)}{c}x$ 100%

Keterangan:

C: Jumlah koloni control

X : Jumlah koloni yang diteliti

Bakteri staphylococcus epidermidis

- Diambil sengkelit bakteri
- Dimasukkan dalam 10 ml NaCl 0,9%
- Dibuat pengenceran ke dalam 9 tabung yang berisi NaCl 0,9%
- Diteteskan masing-mansing 1 ml ke plat
- Diinkubasi 1 x 24 jam
- Dihitung masing-mansing jumlah koloni

Hasil

- Diambil 0,5 ml
- Dicampur dengan 4,5 ml sabun ekstrak pelepah pisang
- Dibiarkan selama 30 detik
- Diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung A
- Setelah 30 menit diambil 1 ml suspense
- Dimasukkan kedalam tabung B
- Setelah 30 menit diambil 1 ml suspense
- Dimasukkan kedalam tabung C
- Tabung di vortex
- 1 ml suspensi dari tiap tabung dituang ke dalam plat
- Diinkubasi selama 1 x 24 jam
- Dihitung koloni yang tumbuh

Hasil