

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong yang diambil dari desa Cemoro sewu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian, sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong segar dan bebas dari hama yang dibuat sampel sediaan masker gel *peel-off* dari ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dengan variasi konsentrasi yaitu 30%, 25%, 20%, 15% dan 10%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun binahong yang diperoleh dari proses penggilingan.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah sediaan masker gel *peel-off* dari ekstrak daun binahong dengan varian konsentrasi gelatin dan HPMC sebagai *film coating* dan *gelling agent* yang konsentrasinya berbeda-beda serta pengujian stabilitas fisik masker gel *peel-off* dengan macam pengujian.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri sediaan masker gel *peel-off* dari ekstrak daun binahong dengan variasi gelatin dan HPMC.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang terlebih dahulu telah diidentifikasi, selanjutnya dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yakni variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol,

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung dengan perubahan yang dilakukan. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi

konsentrasi gelatin dan HPMC ekstrak daun binahong dalam sediaan masker *peel-off*.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah variabel akibat dari variabel utama yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung yang dimaksud adalah adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 dan stabilitas mutu fisik masker gel *peel-off* yaitu uji organoleptik, homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, waktu mengering, dan stabilitas (*Freeze thaw*).

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel tergantung selain variabel bebas. Variabel ini perlu ditetapkan atau dinetralisir kualifikasinya sehingga hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulangi oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali yang dimaksud yakni cara pembuatan masker gel *peel-off*, kondisi penelitian, dan kondisi laboratorium penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun binahong adalah daun dari tanaman binahong dan bebas hama yang diambil dari desa Cemoro sewu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun binahong adalah hasil ekstraksi daun binahong dengan etanol 96% yang telah disaring dan dipekatkan sampai menjadi ekstrak kental dengan maserasi.

Ketiga, varian *film agent* dan *gelling agent* yang digunakan adalah gelatin dan HPMC.

Keempat, evaluasi sifat fisik masker gel *peel-off* adalah pengujian masker gel *peel-off* terhadap uji organoleptik, homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, waktu mengering dan stabilitas (*Freeze thaw*).

Kelima, uji aktivitas antibakteri adalah pengujian aktivitas antibakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 pada ekstrak daun binahong dan sediaan masker gel *peel-off* dari ekstrak daun binahong dengan variasi konsentrasi gelatin dan HPMC yang ditunjukkan dengan presentase diameter daerah hambat pada medium MHA.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, mesin penggiling, ayakan mesh 40, botol maserasi, waterbath, oven, peralatan gelas, *rotary vacuum evaporator*, *moisture balance*, chamber, cawan petri, ose bulat, pinset, cakram kertas steril, inkubator, seperangkat alat uji homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, sudip, *stopwatch*, viskometer *Cup and Bob*, pH meter, mortir, stamper, labu distilasi, dan bunsen.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) sebagai bahan aktif yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan etanol 96%. Bahan kimia yang digunakan yakni gelatin, HPMC, gliserin, triethanolamin, nipagin, nipasol, *aqua destillata* reagen identifikasi fitokimia, klindamisin 1,2%, media bakteri MHA, media VJA, media katalase, media koagulase, bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi simplisia

Identifikasi simplisia tanaman pada tahapan ini adalah untuk menetapkan kebenaran sampel simplisia tanaman binahong dengan mencocokkan ciri makroskopik serta mikroskopik simplisia tanaman yang akan diteliti untuk menghindari kesalahan dari simplisia tanaman yang akan digunakan untuk tahap penelitian. Identifikasi simplisia tanaman ini dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret.

2. Pengumpulan Bahan

Daun binahong yang diperoleh dari desa Cemoro sewu, Karanganyar, Jawa Tengah. Bagian tanaman yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak daun binahong adalah daun yang tidak terlalu tua dan juga tidak terlalu muda. Dilakukan pengeringan pada suhu 50°C.

3. Pembuatan serbuk daun binahong

Simplisia kering tersebut kemudian diserbuk dengan alat penggiling atau blender. Lalu diayak menggunakan ayakan mesh 40. Serbuk ditimbang lagi untuk menentukan bobot persen kering terhadap persen bobot basah.

4. Identifikasi serbuk daun binahong

4.1 Pemeriksaan organoleptis serbuk daun binahong. Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari serbuk daun binahong.

4.2 Penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong. Penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi dengan cara serbuk daun binahong ditimbang sebanyak 2 gram kemudian diukur kadar airnya dalam kadar dengan satuan persen menggunakan alat *moisture balance*.

5. Pembuatan ekstrak daun binahong

Pembuatan ekstrak daun binahong dengan cara masukan bagian serbuk simplisia ke dalam maserator, tambahkan 10 bagian pelarut etanol 96%. Rendam selama 6 jam pertama sambil sekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara sentrifugasi, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian utama. Kumpulkan semua maserat, kemudian uapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah sehingga diperoleh ekstrak kental. Hitung rendemen yang diperoleh yaitu presentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dngan penimbangan. Rendemen harus mencapai angka sekurang-kurangnya sebagaimana ditetapkan pada masing-masing monografi ekstrak (Kemenkes RI 2013).

6. Identifikasi ekstrak daun binahong

6.1 Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun binahong. Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari ekstrak daun binahong.

6.2 Penetapan susut pengeringan ekstrak daun binahong. Susut pengeringan daun binahong dilakukan dengan cara ekstrak daun binahong ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian diukur susut pengeringan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Suhu yang digunakan adalah 105°C. Penandaan hasil analisa setelah selesai yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali. Kadar susut pengeringan memenuhi syarat dimana suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10%. (Depkes RI 1979).

6.3 Pemeriksaan bebas alkohol ekstrak daun binahong. Pemeriksaan ini bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak daun binahong tidak mengandung alkohol. Prosedur pemeriksaan bebas alkohol yaitu dengan menambahkan sampel dengan asam asetat (CH_3COOH) dan asam sulfat (H_2SO_4) pekat lalu dipanaskan. Ekstrak yang bebas alkohol tidak berbau ester (Depkes RI 1995)

6.4 Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun binahong. Identifikasi kandungan kimia dilakukan untuk menetapkan kandungan kimia daun binahong.

6.4.1 Identifikasi Flavonoid. Identifikasi flavonoid pada ekstrak daun binahong dengan metode reaksi warna yaitu ekstrak kental sebanyak 0,5 gram, di larutkan dalam 10 ml air panas dididihkan selama 5 menit. Larutan ekstrak disaring, filtrat digunakan sebagai larutan percobaan. Diambil larutan percobaan sebanyak 5 ml, ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5 gram dan ditambahkan 1 ml HCl pekat. Ditambahkan Amyl alkohol sebanyak 1 ml, dikocok kuat, kemudian didiamkan hingga memisah. Hasil positif apabila terbentuk warna dalam amyl alkohol (Depkes RI 1995).

6.4.2 Identifikasi saponin. Ekstrak kental daun binahong sebanyak 0,2 gram ditambahkan dengan air hangat, dikocok selama 1 menit kemudian dibiarkan. Pada penambahan 3 tetes HCl 2N busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI 1995).

6.4.3 Identifikasi alkaloid. Uji alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dengan etanol. Larutan uji dibagi ke dalam tiga tabung. Satu tabung sebagai pembanding (tidak diberi reagen) dan dua tabung reaksi diberi beberapa tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan 2 pereaksi alkaloid yaitu pereaksi *Dragendorff* dan pereaksi *Mayer*. Hasil uji positif diperoleh bila terbentuk endapan merah hingga jingga dengan pereaksi *Dragendorff* dan endapan putih kekuningan dengan pereaksi *Mayer* (Andaryekti *et al.* 2015).

6.4.4 Identifikasi tanin. Sejumlah ekstrak ditambah 20 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit, setelah dingin disaring. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pereaksi larutan besi (III) klorida 1%. Jika tanin positif maka akan terbentuk warna hijau violet setelah direaksikan dengan larutan besi (III) klorida.

6.4.5 Identifikasi steroid/triterpenoid. Sebanyak 5 ml filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Residu ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liebermann-Buchard yang berisi anhidrida asetat dan asam sulfat pekat (2:1). Hasil positif steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru sampai hijau. Terbentuknya warna merah jambu sampai ungu menunjukkan positif triterpenoid (Widiyati 2006).

7. Formula Masker gel *peel-off*

Formulasi dirancang dengan variasi konsentrasi ekstrak daun binahong pada tiap formula.

Tabel 1. Formula Masker Gel *peel-off* (Karmilah dan Nirwanti Rusli 2018).

| Bahan | Formula A | Formula B | Formula C | Fungsi |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|----------------------|
| Pati jagung manis | 5 g | 10 g | 15 g | Zat aktif |
| Gelatin | 2,5 g | 2,5 g | 2,5 g | Basis |
| HPMC | 5 g | 5 g | 5 g | Peningkat viskositas |
| Gliserin | 2 g | 2 g | 2 g | Humektan |
| Triethanolamin | 2 g | 2 g | 2 g | Stabilizer agent |
| Nipagin | 0,18 g | 0,18 g | 0,18 g | Pengawet |
| Nipasol | 0,02 g | 0,02 g | 0,02 g | Pengawet |
| Aquades add | 100 g | 100 g | 100 g | Pelarut |

Tabel 2. Rancangan Formula Masker Gel *peel-off* Ekstrak Daun Binahong

| Bahan | Satuan | FI | FII | FIII | FIV | FV |
|----------------|--------|------|------|------|------|------|
| Ekstrak | % | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Gelatin | gram | 7,5 | 5 | 3,75 | 2,5 | 0 |
| HPMC | gram | 0 | 2,5 | 3,75 | 5 | 7,5 |
| Gliserin | gram | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Triethanolamin | gram | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Nipagin | gram | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 | 0,18 |
| Nipasol | gram | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| Aquades ad | ml | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Keterangan:

FI : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi Gelatin 7,5% dan HPMC 0%

FII : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi Gelatin 5% dan HPMC 2,5%

FIII : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi Gelatin 3,75% dan HPMC 3,75%

FIV : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi Gelatin 2,5% dan HPMC 55 %

FV : Masker gel *peel-off* dengan konsentrasi Gelatin 0% dan HPMC 7,5%

8. Pembuatan Sediaan Masker Gel *Peel-Off*

Lima rancangan formulasi masker gel *peel-off* ekstrak daun binahong seperti terlihat pada Tabel 2, hasil dari modifikasi rancangan formulasi terdapat faktor yang diubah yaitu konsentrasi zat aktif yaitu ekstrak daun binahong.

Cara pembuatan sediaan masker gel *peel-off* ekstrak etanol daun binahong yaitu ekstrak dilarutkan dengan aquades sedikit demi sedikit hingga ekstrak larut seluruhnya. Gelatin dikembangkan dalam aquadest panas, setelah mengembang aduk gelatin sampai homogen (wadah A). HPMC dibuat dengan mengembangkan HPMC di dalam aquadest dingin, setelah mengembang aduk HPMC sampai homogen (wadah B). Dilarutkan nipagin dan nipasol di dalam gliserin (wadah C). Kemudian campuran wadah A, wadah B, wadah C dan TEA secara berturut-turut dimasukkan kedalam ekstrak yang telah larut kemudian di aduk hingga homogen. Dimasukan pula ekstrak kedalam wadah A, aduk sampai homogen semua campuran. Sisa air ditambahkan ke dalam campuran sambil terus diaduk. Masker gel *peel-off* dihomogenkan, kemudian diisikan kedalam wadah.

9. Kontrol Uji

9.1 Kontrol positif. Kontrol positif yang digunakan adalah sediaan masker gel *peel-off* klindamisisn 1,2 % .

9.2 Kontrol negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah sediaan masker gel *peel-off* yang tidak mengandung ekstrak daun binahong.

10. Pengujian mutu fisik sediaan masker gel *peel-off*

10.1 Uji Organoleptik. Uji organoleptik dilakukan secara visual dan dilihat secara langsung bentuk, warna, bau, dari masker gel *peel-off* yang di buat (Ansel 1998).

10.2 Uji Homogenitas. Masker gel *peel-off* diambil pada masing-masing formula secukupnya kemudian dioleskan pada plat kaca, kemudian diamatai dan diraba massa masker gel *peel-off* harus menunjukkan susunan homogen yaitu tidak terasa adanya bahan padat pada kaca (Lestari 2002).

10.3 Uji pH. Uji pH dilakukan menggunakan pH meter. Mula-mula elektroda dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan pH 7. Kemudian elektroda dicelupkan ke dalam sediaan masker gel *peel-off* yang telah diencerkan dengan aquadest. Nilai pH yang muncul di layar dicatat. Pengukuran dilakukan pada suhu ruang (Hurria 2014).

10.4 Uji Viskositas. Pengukuran viskositas dilakukan terhadap sediaan masker gel *peel-off* dengan menggunakan *Viscometer Brookfield* dengan menggunakan spindel sesuai konsistensi sediaan. Hal ini dilakukan dengan cara mencelupkan spindel ke dalam sediaan masker gel *peel-off* kemudian dilihat viskositasnya (Hurria 2014).

10.5 Uji daya sebar. Pengujian dilakukan dengan menggunakan sediaan masker gel *peel-off* sebanyak 0,5 gram diletakkan diatas kaca bulat. Kaca bulat yang lainnya ditimbang, diletakkan di atas sediaan, diamkan selama 1 menit. Catat diameter yang diperoleh. Diameter sediaan yang menyebar (panjang rata-rata diameter dari berbagai sisi) Kemudian meletakkan beban 50 gram dan diamkan selama 1 menit, catat diameter. Penambahan beban dilakukan hingga 200 gram dan setiap penambahan didiamkan selama 1 menit (Hurria 2014).

10.6 Uji daya lekat. Sebanyak 0,5 gram sediaan masker gel *peel-off* dioleskan diatas gelas obyek yang sudah diketahui luasnya. Diletakkan gelas obyek yang lain pada bagian atas masker gel *peel-off* tersebut kemudian ditekan dengan

beban 1 kg selama 5 menit. Gelas obyek tersebut dipasang pada alat uji kemudian di beri beban seberat 80 gram dan dicatat waktu hingga kedua gelas obyek terpisah (Azkia *et al* 2017).

10.7 Uji waktu mengering. Pengujian waktu sediaan mengering dilakukan dengan menggosokkan sejumlah sampel seperti saat mengaplikasikan masker pada punggung tangan dan kemudian dihitung waktu yang dibutuhkan oleh sediaan untuk mengering hingga dapat dikelupas (Zhelsiana 2016). Kemudian dilakukan uji waktu mengering menggunakan oven yaitu plat kaca dimasukkan kedalam oven pada suhu $36,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Kemudian sampel ditimbang sebanyak 0,7 gram dan dioleskan di atas plat kaca dengan luas $5,0 \times 2,5$ cm, membentuk lapisan tipis dengan ketebalan 1 mm. Plat kaca kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu $36,5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Sediaan dimonitor selama 5 menit, sampai proses pengeringan selesai dan film yang terbentuk dapat diangkat dengan mudah dari plat kaca (Viera *et al.* 2009)

10.8 Uji Stabilitas. Pengujian dilakukan dengan metode *Freeze thaw* yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 48 jam kemudian dipindahkan ke suhu 40°C selama 48 jam (1 siklus). Setelah itu dilanjutkan sampai lima siklus. (Priani *et al* 2014).

11. Identifikasi Bakteri

11.1 Identifikasi bakteri pada agar darah. Biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ditanam pada media agar darah, kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C . Setelah itu diamati adanya tipe hemolisis pada koloni bakteri yang tumbuh (Mudatsir 2010).

11.2 Pewarnaan Gram. Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram dilakukan dengan membuat preparat oles *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Preparat ditetesi pewarna kristal ungu (kristal violet) sebanyak 2-3 tetes, didiamkan selama 1 menit. Kelebihan kristal ungu (kristal violet) dibuang dengan memiringkan kaca objek di atas bak pewarna, bilas dengan air menggunakan botol pijit, kaca objek ditiriskan dikembalikan ke atas rak. Larutan iodin sebanyak 2-3 tetes ditetaskan pada preparat dengan memiringkan kaca objek, bilas kembali

dengan air atau sampai zat ungu kristal tidak tampak lagi, cuci dengan air lalu tiriskan, beri safranin sebanyak 2-3 tetes selama 30 detik, buang safranin lalu bilas dengan air, tiriskan kaca objek dan serap kelebihan air dengan menekan kertas serap di atasnya, kemudian amati di bawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x dan lensa okuler dengan perbesaran 10x. Hasil positif *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 bila berwarna ungu dan bentuk bulat (kokus) (Volk & Wheller 1993).

11.3 Identifikasi secara biokimia. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditambahkan dengan H₂O₂ 3%. Penambahan H₂O₂ akan terurai menjadi H₂O dan O₂. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara.

Uji koagulase dilakukan dengan cara 200 µl plasma sitrat dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 3-4 koloni biakan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 yang diuji ditambahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur. Selanjutnya, tabung dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C. Pengamatan dilakukan pada 4 jam pertama, dan sesudah 18-24 jam. Hasil positif jika tabung reaksi dibalik, gumpalan plasma tidak terlepas dan melekat pada tabung. (Lay 1994).

Uji manitol dilakukan untuk mengetahui kemampuan memfermentasi manitol pada *Staphylococcus sp.* Sebanyak 2-4 koloni biakan *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 diambil menggunakan ose steril kemudian ditusukkan pada media MSA (*Mannitol Salt Agar*), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati kontrol media dan perubahan media pada media yang ditanami bakteri. Hasil positif ditunjukkan perubahan warna pada medium dari warna merah menjadi kuning karena adanya *fenol acid* dan hasil negatif tidak ada perubahan warna.

12. Pengujian Mikrobiologi Masker gel peel-off

12.1 Pembuatan media uji. Dimasukan sebanyak 8 gram media *Mueller Hinton Agar* (MHA) kedalam gelas erlenmeyer kemudian dilarutkan dalam 400 ml aquadest steril. Media dipanaskan sampai mendidih. Dilakukan pengadukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* agar media tersuspensi sempurna. Kemudian di

sterilkan di dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, lalu ditunggu sampai suhu hangat (40°C-45°C). *Mueller Hinton Agar* yang sudah siap, kemudian dituangkan sekitar 15 ml kedalam cawan petri steril dengan tingkat permukaan horizontal untuk memberikan kedalaman seragam \pm 0,5 cm. Media didiamkan sampai memadat (Ngajow 2013).

12.2 Pembuatan konsentrasi larutan uji. Pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong, konsentrasi yang dibuat merujuk pada penelitian Ainurrochmah *et al.* (2013) yaitu membuat larutan stok terlebih dahulu sebesar 100% dengan cara melarutkan 3 gram ekstrak kental yang kemudian ditambahkan DMSO 5% sebanyak 10 ml. Larutan stok kemudian diencerkan dengan menambahkan DMSO untuk mendapatkan konsentrasi 25%, 20%, 15% dan 10%.

12.3 Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Pembuatan suspensi bertujuan untuk menentukan jumlah bakteri dan dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5 yang setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Pembuatan suspensi dilakukan dengan cara diambil koloni pada media NA miring kurang lebih 1-2 jarum Ose bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% 10 ml lalu homogenkan dan lakukan inkubasi selama 5-8 jam. Amati kekeruhan dan bandingkan dengan standar Mc Farland 0,5 (Azrifitria *et al.* 2010). Jika hasilnya lebih keruh dari standar Mc Farland 0,5 maka tambahkan pelarut NaCl 0,9% secukupnya hingga sama dengan standar, namun apabila lebih jernih dari standar maka lakukan inkubasi lagi 1-3 jam untuk mengamati apakah kekeruhannya bertambah, atau dengan cara lain dengan menambahkan mikroba bakteri beberapa Ose dari koloni bakteri pada media selektif dan inkubasi selama 1-3 jam. Amati kekeruhan hingga mencapai standar Mc Farland 0,5. Bakteri yang berada dalam larutan NaCl 0,9% yang sudah sesuai dengan standar Mc Farland 0,5 merupakan larutan stok bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Oonmetta-aree *et al.* 2005).

12.4 Uji aktivitas antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan Metode Difusi Kertas Cakram (Jawetz *et al.* 2005). Hasil daya uji antibakteri didasarkan pada pengukuran Diameter Daerah Hambat (DDH) pertumbuhan

bakteri yang terbentuk di sekeliling kertas cakram. Dengan menggunakan larutan uji yaitu konsentrasi ekstrak daun binahong 10%, 15%, 20%, 25% dan 30% untuk uji pendahuluan ekstrak, modifikasi formula masker gel *peel-off* formula I-V, kontrol negatif dan kontrol positif sediaan masker gel *peel-off*. Diambil suspensi bakteri uji kemudian diulas secara merata pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) menggunakan kapas lidi steril dengan metode perataan (*Spread Plate Method*). Media didiamkan 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media (Ningsih 2013). Pada media MHA diletakkan 7 cakram steril masing-masing berukuran ± 6 mm yang telah direndam dalam sediaan masker gel *peel-off* ekstrak daun binahong formula I-V, kontrol positif dan kontrol negatif.

Kontrol negatif yang digunakan adalah sediaan masker gel *peel-off* yang tidak mengandung ekstrak daun binahong sebanyak 10 μ l yang dijenuhkan pada cakram steril dan sebagai kontrol positif digunakan sediaan masker gel *peel-off* klindamisin 1,2% dan sediaan masker gel *peel-off* yang ada dipasaran sebanyak 10 μ l. Masa inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya. Diameter daerah hambat sekitar kertas cakram diukur dan dinyatakan dalam satuan mm. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi (Pratiwi 2008).

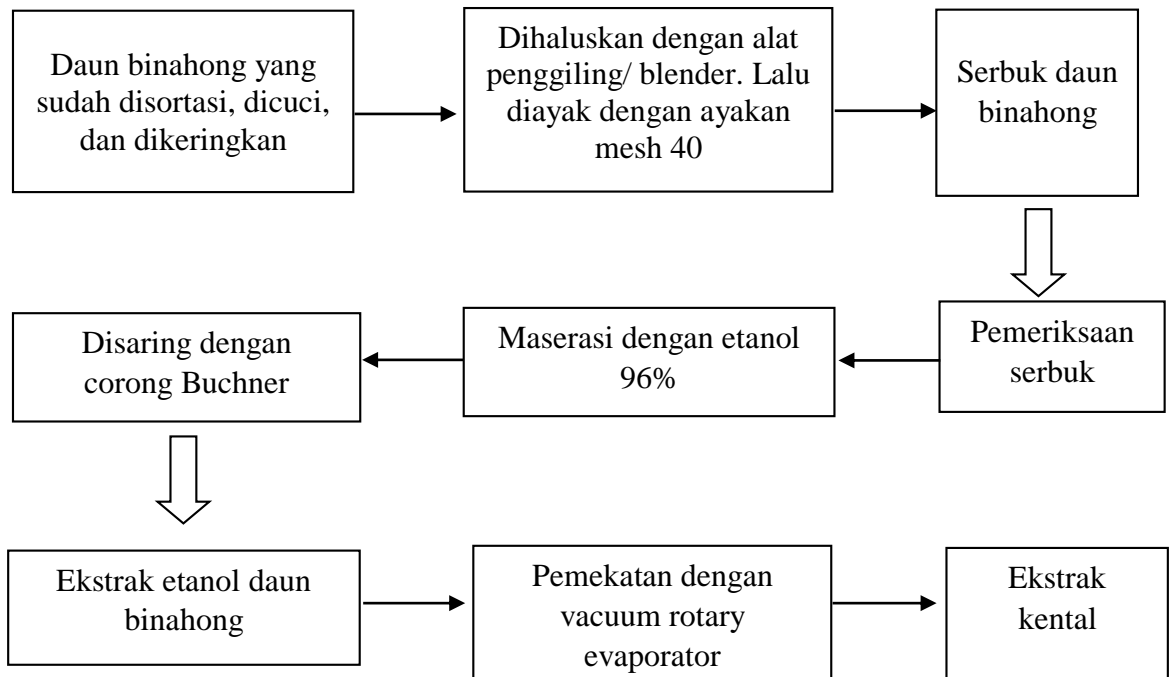
E. Analisis Data

Masker gel *peel-off* dari masing-masing formula diuji sifat fisiknya yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, waktu mengering dan stabilitas masker gel *peel-off* dengan metode *Freeze Thaw* dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kolmogrov-Smirnov*, jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* H_0 ditolak atau ($p > 0,05$).

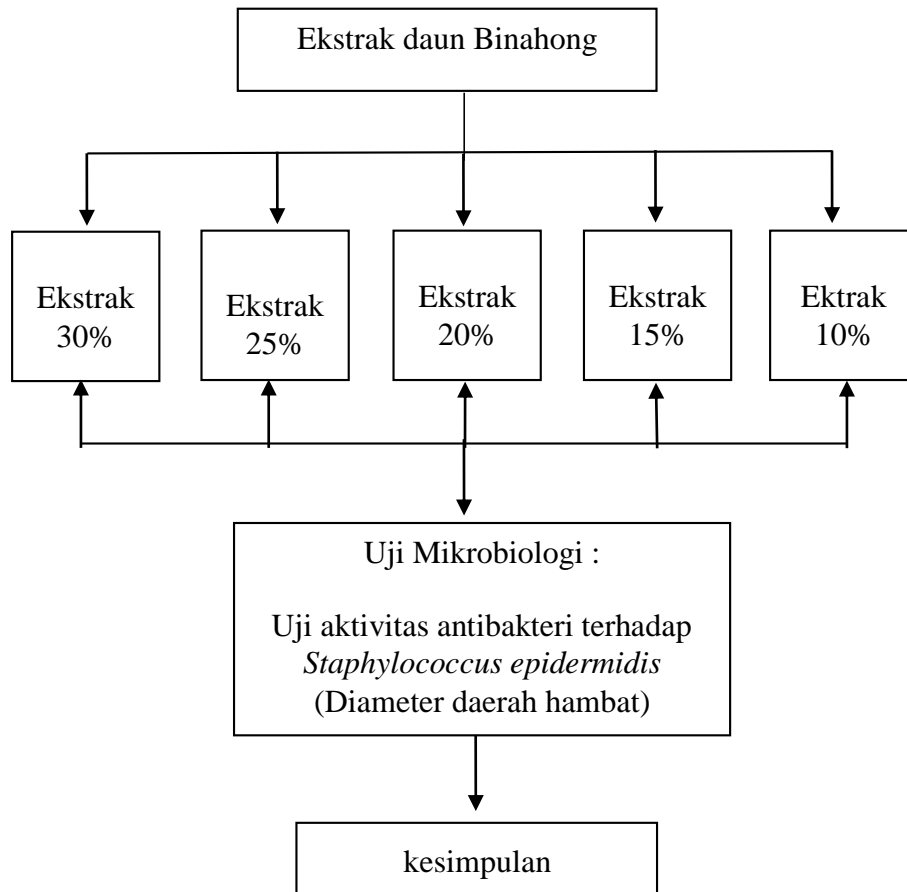
Data diameter hambat dianalisis secara statistik menggunakan Metode *Kolmogrov-Smirnov*. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan metode analysis of varian (ANOVA) One Way engan taraf kepercayaan 95%. Lanjutakan dengan uji Tukey untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau beda antara satu dengan yang lainnya.

Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau beda antara satu dengan yang lainnya.

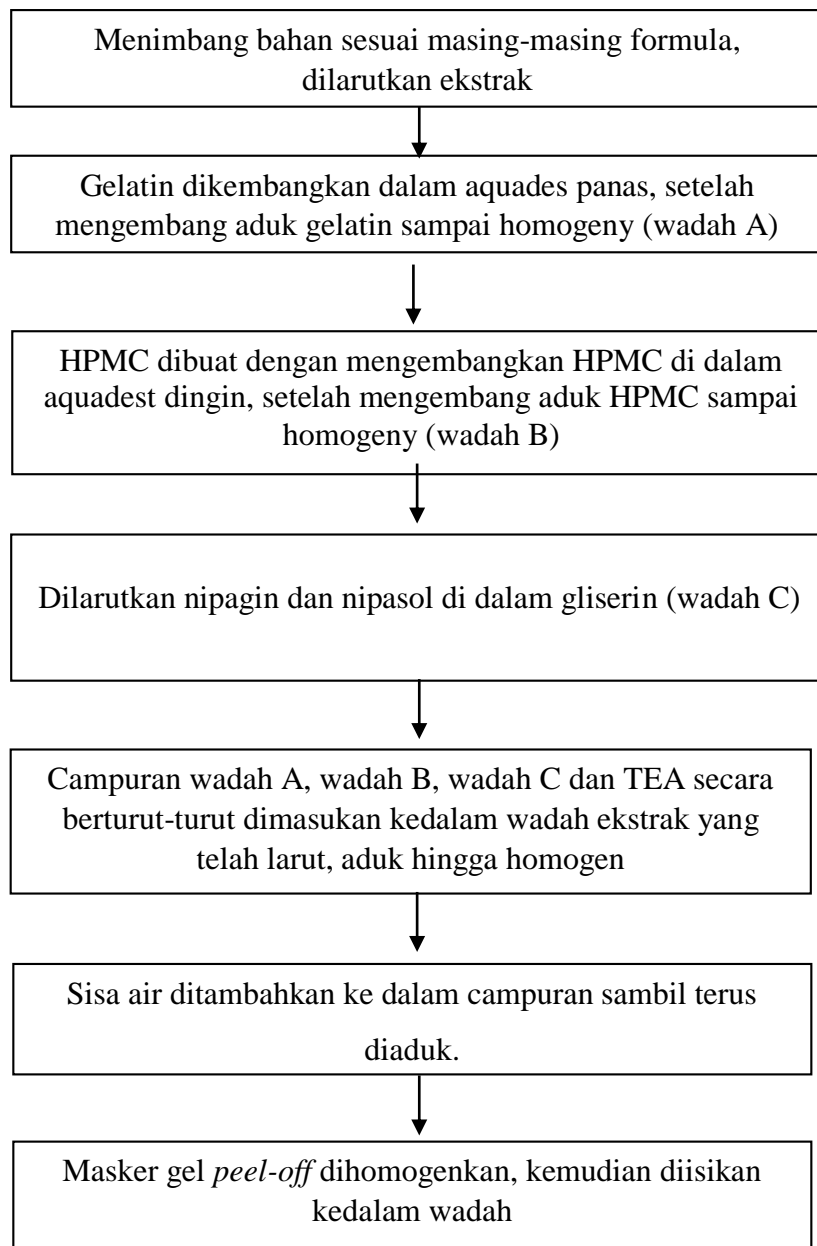
F. Skema Penelitian



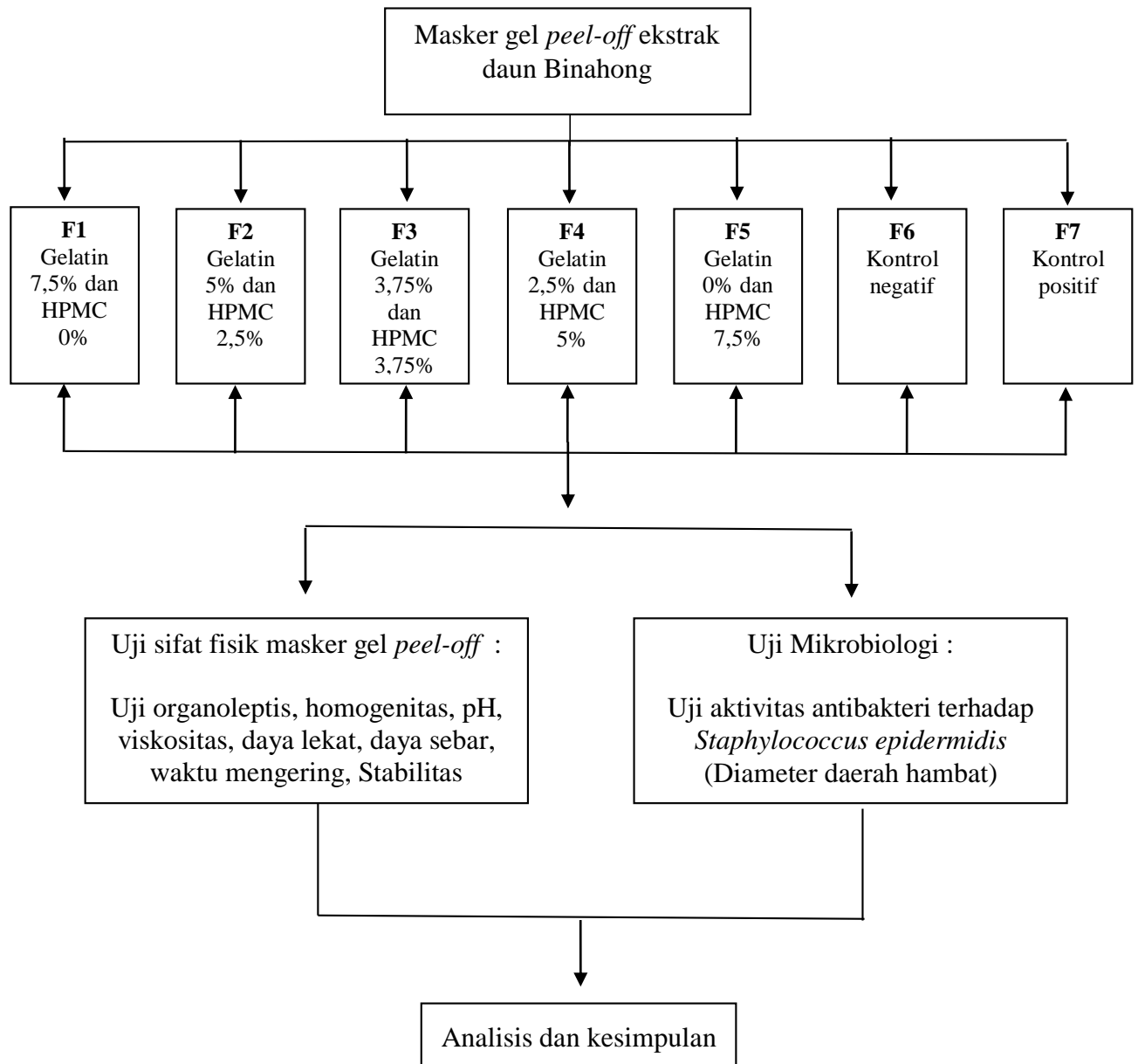
Gambar 10. Skema pembuatan ekstrak daun binahong



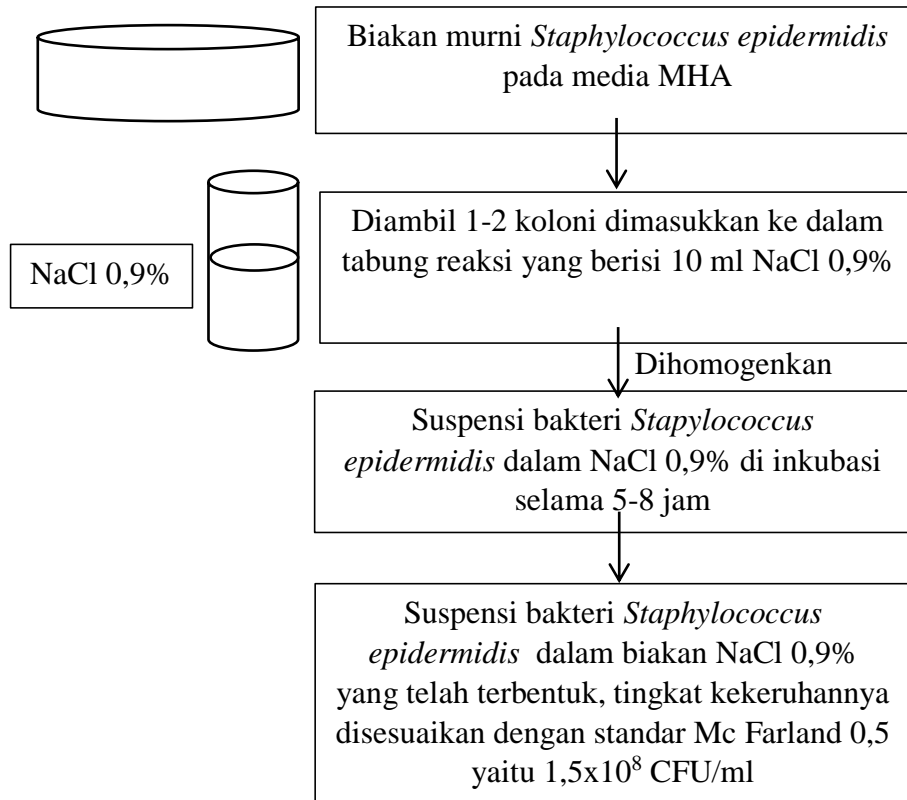
Gambar 11.Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong



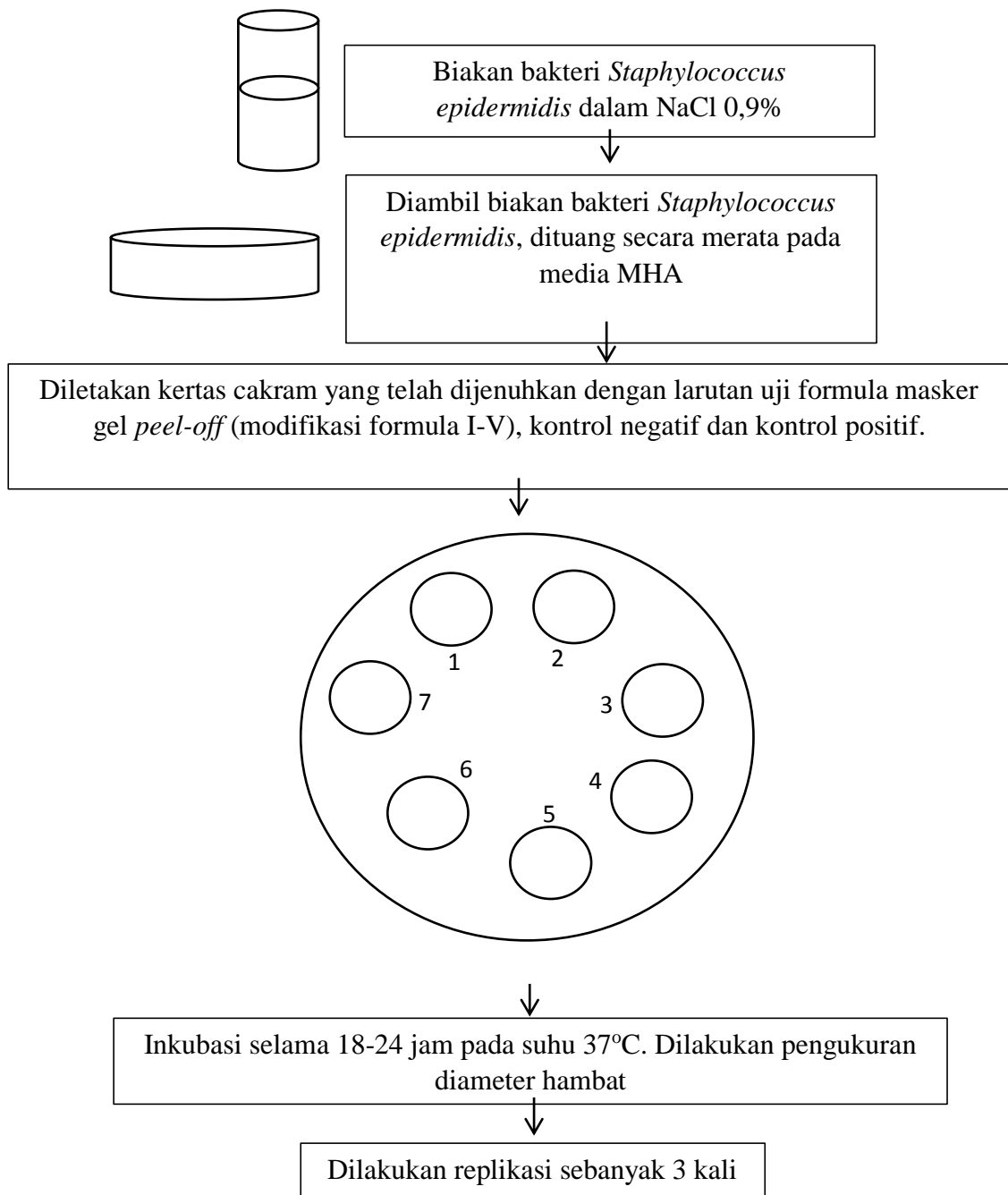
Gambar 12. Skema pembuatan Masker gel *peel-off* ekstrak daun binahong



Gambar 13. Skema pengujian sifat fisik dan aktivitas antibakteri Masker gel *peel-off* ekstrak daun binahong



Gambar 14. Skema pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*



Gambar 15. Skema pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram