

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirih merah yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan masker gel *peel-off* ekstrak daun sirih merah dengan variasi konsentrasi gelatin (10% ; 7,5% ; 5% ; 2,5% ; 0%) dan HPMC (0% ; 2,5% ; 5% ; 7,5% ; 10%).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

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

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

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

2. Klasifikasi operasional variabel utama

Variabel yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti yang berpengaruh terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini

adalah variasi konsentrasi HPMC dan gelatin ekstrak daun sirih merah dalam sediaan masker gel *peel-off*.

Variabel tergantung merupakan persoalan utama yang menjadi kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah adanya aktivitas anti jerawat terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada media MHA dan stabilitas fisik masker gel *peel-off*, yaitu uji organoleptik, pH, homogenitas, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan waktu mengering.

Variabel terkendali yaitu variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan klasifikasinya agar dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah ekstrak daun sirih merah (tempat tanaman tumbuh dan umur tanaman), komposisi campuran, metode dan proses pembuatan sediaan masker gel *peel-off*, kondisi peneliti dan kondisi laboratorium termasuk alat dan bahan-bahan yang digunakan saat penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirih merah adalah bagian daun dari tanaman sirih merah yang diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu.

Kedua, ekstrak etanol daun sirih merah adalah hasil maserasi daun sirih merah dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang telah disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental.

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

Keempat, uji sifat fisik masker gel *peel off* adalah pengujian masker gel *peel-off* terhadap uji organoleptik, homogenitas, viskositas, daya sebar, daya lekat dan waktu mengering.

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

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan digital, mesin pembuat serbuk, ayakan no. 40, bejana maserasi, *vacum rotary evaporator* IKA® RV 10, oven, *moisture balance*, chamber, pH meter, flakon, mortir & stamfer, labu takar, *viscometer*, pipet volume, gelas ukur (5 mL / 50 mL / 100 mL), batang pengaduk, lampu UV, kertas saring, kain flanel, erlenmeyer 250 mL, beaker glass 100 mL, sudip, wadah sediaan masker gel *peel-off*, lampu spiritus, tabung reaksi, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, cawan porselin, dan *object glass*.

2. Bahan

2.1 Bahan Sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) yang masih segar dan bebas hama serta biakan murni *Staphylococcus epidermidis*.

2.2 Bahan Kimia. Bahan kimia yang digunakan yaitu HPMC, gelatin, gliserin, metil paraben, propil paraben, TEA, etanol 96%, aquadest, standar Mc Farland 0,5, medium MHA, NaCl 0,9%, MSA, NA, dan Aseton.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman sirih merah

Determinasi tanaman dalam tahap penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopisnya. Hal ini dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologis tanaman pada pustaka yang dibuktikan di B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar.

2. Pengumpulan dan pengeringan bahan

Tanaman sirih merah diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Karanganyar. Daun sirih merah yang akan digunakan adalah daun muda hingga cukup tua yang masih segar dan bebas dari hama. Daun dibersihkan dan dicuci dengan air bersih.

Daun sirih merah yang sudah dibersihkan, kemudian dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 40°C. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar

air, mencegah terjadinya perubahan kimiawi, reaksi enzimatik yang dapat menurunkan mutu, menghindari pertumbuhan jamur dan bakteri, dan memudahkan dalam proses pembuatan serbuk.

3. Pembuatan serbuk

Daun sirih merah yang sudah kering, digiling dan diserbuk dengan alat pembuat serbuk, kemudian diayak menggunakan ayakan nomor *mesh* 60. Serbuk ditimbang lagi untuk menentukan bobot persen kering terhadap persen bobot basah. Serbuk yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah kering tertutup rapat.

4. Identifikasi serbuk daun sirih merah

4.1 Pemeriksaan organoleptik serbuk daun sirih merah. Pemeriksaan organoleptik dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari serbuk daun sirih merah.

4.2 Penetapan susut pengeringan serbuk daun sirih merah. Penetapan susut pengeringan daun sirih merah dilakukan dengan cara serbuk dari daun sirih merah ditimbang 2 gram. Kemudian diukur susut pengeringan serbuk dengan alat *moisture balance* O'Haus MB23 pada suhu 105°C, lalu dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Tahap ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

5. Pembuatan ekstrak daun sirih merah

Pembuatan ekstrak daun sirih merah dilakukan dengan cara maserasi. Serbuk kering daun sirih merah dimasukkan dalam botol maserasi kemudian ditambah dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10. Campuran serbuk kering dengan etanol direndam selama 6 jam sambil sesekali diaduk, kemudian ditutup dan disimpan dalam ruangan yang terhindar dari cahaya matahari selama 18 jam. Setelah 18 jam, maserat disaring dengan kain flannel. Proses penyarian diulang dengan menggunakan ampas pada penyarian pertama dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Semua hasil maserat dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C

sampai dihasilkan ekstrak kental. Kemudian dilakukan pemeriksaan organoleptis dan perhitungan rendemen dari ekstrak kental tersebut (Depkes RI 2013).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang diperoleh (g)}}{\text{Bobot simplisia awal yang ditimbang (g)}} \times 100\%$$

6. Identifikasi ekstrak daun sirih merah

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

6.2 Pemeriksaan susut pengeringan ekstrak daun sirih merah. Pemeriksaan kadar air ekstrak dilakukan dengan alat *moisture balance* O'Haus MB23 pada suhu 105°C, lalu dilakukan pembacaan sampai muncul angka dalam persen. Tahap ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

6.3 Pemeriksaan bebas alkohol ekstrak daun sirih merah. Pemeriksaan ini bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak daun sirih merah tidak mengandung alkohol sehingga didapatkan ekstrak yang murni tanpa kontaminasi. Alkohol sendiri memiliki aktivitas antibakteri sehingga keberadaannya harus dihilangkan agar tidak menghasilkan positif palsu pada perlakuan sampel (Mubarak *et al.* 2018). Prosedur pemeriksaan bebas alkohol yaitu dengan menambahkan sampel dengan asam asetat (CH₃COOH) dan asam sulfat (H₂SO₄) pekat kemudian dipanaskan. Ekstrak yang bebas alkohol tidak akan tercium bau ester (Depkes RI 1995).

6.4 Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun sirih merah. Identifikasi kandungan kimia dilakukan untuk menetapkan kandungan kimia daun sirih merah. Kandungan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun sirih merah diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing.

6.4.1 Identifikasi flavonoid. Identifikasi flavanoid dilakukan dengan melarutkan 0,5 gram ekstrak dengan 10 mL air panas kemudiah dididihkan selama 5 menit. Larutan ekstrak disaring, filtrat digunakan sebagai larutan percobaan. Diambil larutan percobaan sebanyak 5 mL, ditambahkan lebih kurang 0,1 gram

serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat dan 1 mL amil alkohol, dikocok kuat, kemudian didiamkan hingga memisah. Warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Noer *et al.* 2018).

6.4.2 Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorf. Sebanyak 0,5 gram ekstrak ditambah dengan 1 mL HCl 2 M dan 9 mL *aquadest* dipanaskan selama 2 menit, didinginkan dan kemudian disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, masing-masing ditambah dengan pereaksi Mayer, Wagner, Dragendorf, dan Bouchardat. Terbentuknya endapan putih pada pereaksi Mayer menunjukkan hasil yang positif pada alkaloid, terbentuknya warna coklat kemerahan pada pereaksi Wagner menunjukkan hasil positif alkaloid, terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning pada pereaksi Dragendorf menunjukkan hasil positif alkaloid, dan terbentuknya endapan coklat pada pereaksi Bouchardat (Setyowati *et al.* 2014).

6.4.3 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest hingga seluruh sampel terendam, dididihkan selama 2-3 menit dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat, maka akan terbentuk busa yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit. Pada penambahan HCl pekat beberapa tetes, buih tidak hilang (Illing *et al.* 2017).

6.4.4 Identifikasi tanin. Sebanyak 100 mg ekstrak diencerkan dengan 10 mL aquadest kemudian disaring, filtrat tersebut ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya golongan tanin (Noer *et al.* 2018).

6.4.5 Identifikasi triterpenoid. Sebanyak 2 mL ekstrak diuapkan dalam cawan porselin hingga diperoleh residu, kemudian residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat pekat anhidrat. Lalu tambahkan asam sulfat pekat sebanyak 2 mL melewati dinding tabung reaksi, reaksi positif triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya cincin kecokelatan atau violet pada perbatasan larutan (Minarno 2015).

7. Formula Masker Gel *Peel-off*

Formulasi dirancang dengan variasi konsentrasi basis gelatin dan HPMC pada tiap formula.

Tabel 1. Formula Masker Peel-off (Karmilah & Rusli 2018)

Bahan	Formula (gram)			Fungsi
	A	B	C	
Pati jagung manis	5	10	15	Zat aktif
Gelatin	2,5	2,5	2,5	Basis
HPMC	5	5	5	Peningkat viskositas
Gliserin	2	2	2	Humektan
Triethanolamin	2	2	2	<i>Stabilizer agent</i>
Nipagin	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Nipasol	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Aquadest ad	100	100	100	Pelarut

Tabel 2. Rancangan Formula Masker Gel *Peel-off* yang telah dimodifikasi

Bahan	Formula (gram)				
	FI	FII	FIII	FIV	FV
Ekstrak daun sirih merah	20	20	20	20	20
Gelatin	7,5	5	3,75	2,5	0
HPMC	0	2,5	3,75	5	7,5
Gliserin	2	2	2	2	2
Triethanolamin	2	2	2	2	2
Nipagin	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18
Nipasol	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Aquadest ad	100	100	100	100	100

Keterangan tabel 2 :

- FI : Formula 1 dengan Gelatin 7,5% dan HPMC 0%
- F2 : Formula 2 dengan Gelatin 5% dan HPMC 2,5%
- F3 : Formula 3 dengan Gelatin 3,75% dan HPMC 3,75%
- F4 : Formula 4 dengan Gelatin 2,5% dan HPMC 5%
- F5 : Formula 5 dengan Gelatin 0% dan HPMC 7,5%

8. Pembuatan Sediaan Masker Gel *Peel-off*

Masker gel *peel-off* dibuat dalam 5 formula dengan perbedaan konsentrasi gelatin sebagai *film forming agent* dan HPMC sebagai *gelling agent*. Pembuatan masker gel *peel-off* dimulai dengan mengembangkan gelatin dengan air panas (80°C) di dalam mortir. HPMC dikembangkan dengan aquadest dingin, diaduk secara konstan hingga mengembang. Nipagin dan nipasol dilarutkan dalam campuran gliserin dan triethanolamin. Ditambahkan massa HPMC yang sudah mengembang ke dalam massa gelatin, kemudian ditambahkan campuran nipagin, nipasol, dan gliserin-triethanolamin. Semua campuran diaduk hingga homogen.

Ekstrak daun sirih merah dilarutkan dengan aquadest, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam basis masker gel *peel-off* yang sudah

terbentuk dan dicukupkan bobotnya hingga 100 g dengan aquadest sambil diaduk sampai homogen.

9. Pembuatan Kontrol Uji Aktivitas

9.1 Kontrol Negatif. Kontrol negatif yang digunakan adalah sediaan masker gel *peel-off* yang tidak mengandung ekstrak daun sirih merah.

9.2 Kontrol Positif. Kontrol positif yang digunakan adalah masker gel *peel-off* yang mengandung klindamisin 1,2%.

9.3 Kontrol Normal. Kontrol normal adalah masker gel *peel-off* yang mengandung ekstrak daun sirih merah.

10. Pengujian Sifat Fisik Sediaan Masker Gel *Peel-Off*

10.1 Pemeriksaan Organoleptik. Uji organoleptik dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara mengamati konsistensi, warna, dan bau dari sediaan yang telah dibuat (Cahyani & Putri 2017).

10.2 Pemeriksaan Homogenitas. Sediaan diuji homogenitasnya dengan cara mengoleskan sediaan pada sekeping kaca object glass, kemudian diamati ada tidaknya partikel/zat yang belum tercampur secara homogen (Yanti 2018).

10.3 Pengukuran pH. Sediaan masker gel *peel-off* diukur pH nya dengan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan pH 7. Elektroda dari pH meter dicelupkan ke dalam setiap formula yang sebelumnya telah dilarutkan dengan aquadest, ditunggu hingga layar pada pH meter menunjukkan angka yang stabil. Pengujian pH diulangi sebanyak 3 kali tiap formulanya. Pengujian pertama dilakukan sehari setelah sediaan dibuat. Sediaan disimpan selama 1 minggu dan diuji lagi. Pengujian dilakukan setiap minggu selama 3 minggu (Rahmawanty *et al.* 2015).

10.4 Pengukuran Viskositas. Viskometer dipasang tegak lurus dengan arah klem. Rotor kemudian dipasang pada viskometer dengan menguncinya berlawanan arah jarum jam. Sediaan masker gel *peel-off* dimasukkan ke dalam wadah, viskometer diatur ketinggiannya sampai rotor tercelup sempurna, kemudian alat dihidupkan. Viskositas sediaan diketahui dengan mengamati gerakan jarum penunjuk yang stabil. Pengujian viskositas dilakukan pada hari ke-2, hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-21 (Yanti 2018).

10.5 Pengujian Daya Sebar. Sebanyak 0,5 g sediaan masker gel *peel-off* diletakkan diatas kaca bulat, ditutup dengan kaca yang lain yang telah ditimbang beratnya, dibiarkan selama 1 menit kemudian diukur diameter sebaranya. Beban seberat 50 g ditambahkan dan didiamkan lagi selama 1 menit kemudian diukur diameter sebar seperti sebelumnya. Penambahan beban dilanjutkan hingga bobot mencapai 200 gram dan diukur kembali diameternya setelah didiamkan 1 menit (Karmilah & Rusli 2018).

10.6 Pengujian Daya Lekat. Sebanyak 0,2 gram sediaan masker wajah *peel off* diletakkan pada kaca objek. Kaca objek yang lain diletakkan diatas sediaan masker wajah *peel off*, pada kaca objek diletakkan sebesar 1 kg ditunggu selama 5 menit. Lepaskan beban seberat 80 gram dan dicatat waktu yang diperlukan hingga kedua kaca objek tersebut terlepas. Pengujian diulang sebanyak 3 kali (Cahyani & Putri 2017).

10.7 Pengujian Waktu Sediaan Mengering. Sebanyak 0,7 gram sampel masker gel *peel-off* dioleskan pada *object glass* dengan area seluas 5 x 2,5 cm, diratakan seperti pada pengaplikasian masker pada wajah. *Object glass* yang telah diolesi masker gel *peel-off* dimasukkan ke dalam oven pada suhu $36,5\pm 2^{\circ}\text{C}$, kemudian dimonitor sampai sediaan mengering dan membentuk lapisan film (Susiloningsih 2016).

10.8 Uji Stabilitas Sediaan Masker Gel Peel-Off. Pengujian dilakukan dengan metode *cycling test* yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 24 jam kemudian sampel dipindahkan ke dalam oven yang bersuhu 40°C selama 24 jam (1 siklus). Percobaan dilakukan sampai 6 siklus, kemudian pada tiap siklus diamati ada tidaknya perubahan pada sifat fisik (Phindo 2016; Karmilah & Rusli 2018).

11. Pengujian Mikrobiologi Masker Gel Peel off

11.1 Pembuatan Media Uji. Sebanyak 3,8 gram media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilarutkan dalam 100 mL aquadest steril. Media kemudian dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk hingga terlarut secara sempurna. Untuk mempermudah pengadukan bisa dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Setelah media terlarut sempurna, kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah cukup waktu matikan autoklaf, dibiarkan

sampai suhu turun, kemudian media dikeluarkan dari autoklaf. Media kemudian didinginkan sampai suhu 45-50°C. *Mueller Hinton Agar* yang sudah siap kemudian dituangkan ke dalam cawan petri, didiamkan, dan ditunggu hingga memadat (Wardaniati & Pratiwi 2017).

11.2 Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji. Konsentrasi ekstrak daun sirih merah yang divariasikan dengan menggunakan pelarut aseton yaitu 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%. Ekstrak daun sirih merah ditimbang 3 gram kemudian dilarutkan dengan 10 mL aseton sehingga diperoleh larutan induk sebesar 30%. Dari larutan induk kemudian diencerkan beberapa konsentrasi yaitu 10%, 15%, 20%, dan 25%. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik klindamisin.

11.3 Pembuatan Standar Kekeruhan Mc Farland 0,5. Larutan baku Mc Farland terdiri atas dua komponen, yaitu larutan BaCl₂ 1% dan H₂SO₄ 1%. Sebanyak 0,05 mL larutan BaCl₂ 1% dicampurkan dengan 9,95 mL larutan H₂SO₄ 1% kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh (Anugrah 2015).

11.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Pembuatan suspensi dengan mengambil biakan murni kurang lebih 1 Ose dengan menggunakan jarum Ose steril, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi dengan 10 mL NaCl 0,9% dan dikocok hingga didapatkan suspensi bakteri. Kekeruhan yang dihasilkan kemudian disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan standar Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan selama penelitian jumlahnya sama dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

11.5 Identifikasi Bakteri *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Identifikasi bakteri dilakukan melalui 3 cara, yaitu identifikasi morfologi dengan metode pewarnaan Gram, identifikasi secara goresan, dan identifikasi biokimia bakteri.

11.5.1 Identifikasi Pewarnaan Gram. Uji pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui morfologi sel bakteri dan sifat bakteri berdasarkan sifat pewarnaannya. Pewarnaan Gram dilakukan dengan menggunakan Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama, kemudian didiamkan kurang lebih 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir dan ditetesi Lugols Iodine (Gram B sebagai

mordant), didiamkan kembali selama 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi dengan Gram C (alkohol), didiamkan kurang lebih 45 detik, dicuci aquadest mengalir kemudian ditetesi Gram D (cat Safranin sebagai cat lawan atau penutup), didiamkan kurang lebih 1 menit, setelah itu dicuci dengan aquadest mengalir dan dikeringkan di udara. Hasil positif *Staphylococcus epidermidis* akan menunjukkan warna ungu pada sel bakteri dan berbentuk bulat (kokus) jika diamati dibawah mikroskop (Septiandari *et al.* 2017; Yanti 2018).

11.5.2 Identifikasi Goresan. Suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* diinokulasikan pada media BAP (*Blood Agar Plate*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan tidak terjadi hemolisis pada media agar darah (Rahmi *et al.* 2015).

11.5.3 Identifikasi Biokimia. Identifikasi dengan uji biokimia dilakukan melalui 3 macam uji yaitu uji katalase, koagulase, dan uji pada media MSA. Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri sebanyak 1 Ose yang diinokulasikan pada objek glass kemudian ditetesi dengan H₂O₂ 3% sebanyak 1-2 tetes. Hasil positif bila terbentuk buih atau gelembung udara (Yanuartono 2018).

Uji koagulase dilakukan dengan cara plasma darah kelinci yang diberi sitrat, diencerkan (1:5) kemudian ditambah 1 Ose biakan bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gumpalan yang melekat dan tidak terlepas pada objek glass ketika dibalik (Yanti 2018).

Uji pada media MSA dilakukan dengan cara menginokulasikan suspensi bakteri pada media MSA (*Manitol Salt Agar*) dan diinkubasi pada suhu 37°C. Hasil positif ditunjukkan dengan media yang tetap berwarna merah (Holderman *et al.* 2017).

11.6 Uji Aktivitas Antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram. Hasil daya uji antibakteri didasarkan pada pengukuran diameter daerah hambat (DDH) pertumbuhan bakteri yang terbentuk di sekeliling kertas cakram. Suspensi bakteri uji diambil dengan kapas lidi steril, kemudian dioleskan pada permukaan medium MHA hingga semua permukaan media teroleskan, kemudian ditunggu beberapa saat sampai mengering

(Wardaniati & Pratiwi 2017). Masing-masing ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda-beda, modifikasi formula I-V, kontrol negatif, dan kontrol positif diambil sebanyak 20 µl dengan menggunakan mikropipet dan diteteskan pada kertas cakram steril, kemudian ditunggu selama 5-10 menit agar meresap. Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, zona bening yang terbentuk di sekitar cakram diamati dan diukur dengan menggunakan penggaris atau jangka sorong. Uji ini dilakukan pengulangan (replikasi) 3 kali (Bramantio 2018).

Kontrol negatif yang digunakan adalah basis masker gel *peel-off* yang tidak mengandung ekstrak daun sirih merah dan pelarut aseton. Kontrol positif yang digunakan adalah cakram antibiotik klindamisin dan sediaan masker gel *peel-off* klindamisin 1,2%.

12. Uji Potensi Iritasi Pada Kulit

Uji iritasi sediaan masker gel *peel-off* dilakukan secara *in vivo* pada hewan uji kelinci dengan metode Draize. Kelinci yang digunakan adalah kelinci *new zeland* dewasa berkelamin jantan yang bulu di bagian punggungnya telah dicukur sampai bersih. Masing-masing sampel iritan sebanyak 0,5 gram dioleskan pada area uji, kemudian ditutup dengan perban yang tidak reaktif selama 24 jam. Penutupan pada area uji yang sudah diolesi sampel bertujuan untuk menjaga agar sampel yang diuji tetap diposisi semula dan mencegah penguapan sampel (Tranggono & Latifah 2014). Setelah 24 jam, perban dibuka dan area uji dibersihkan dengan air untuk menghilangkan sisa bahan uji. Pada waktu 24, 48, dan 72 jam setelah pemberian sampel uji, area uji diperiksa dan diamati perubahannya sebagai reaksi kulit terhadap sampel uji dan dinilai dengan cara memberi skor 0 sampai 4 tergantung tingkat keparahan reaksi kulit yang dilihat (Draize 1959).

Derajat iritasi diperoleh dengan cara membandingkan indeks iritasi yang diperoleh dengan skor sebagai berikut :

Tabel 3. Skor Derajat Iritasi

EVALUASI	SKOR
Tidak mengiritasi	0,0
Sangat sedikit iritasi	0,1-0,4
Sedikit iritasi	0,41-1,9
Iritasi sedang	2,0-4,9
Iritasi parah	5,0-8,0

Tabel 4. Skor Derajat Edema

REAKSI KULIT	SKOR
Tanpa edema	0
Sangat sedikit edema (hampir tidak terlihat)	1
Edema tepi berbatas jelas	2
Edema sedang (tepi naik \pm 1 mm)	3
Edema berat (tepi naik lebih dari 1 mm & meluas keluar daerah pejanan)	4

Tabel 5. Skor Derajat Eritema

REAKSI KULIT	SKOR
Tanpa eritema	0
Sangat sedikit eritema (nyaris tidak terlihat)	1
Eritema berbatas jelas	2
Eritema sedang sampai berat	3
Eritema berat (merah bit) sampai sedikit membentuk kerak	4

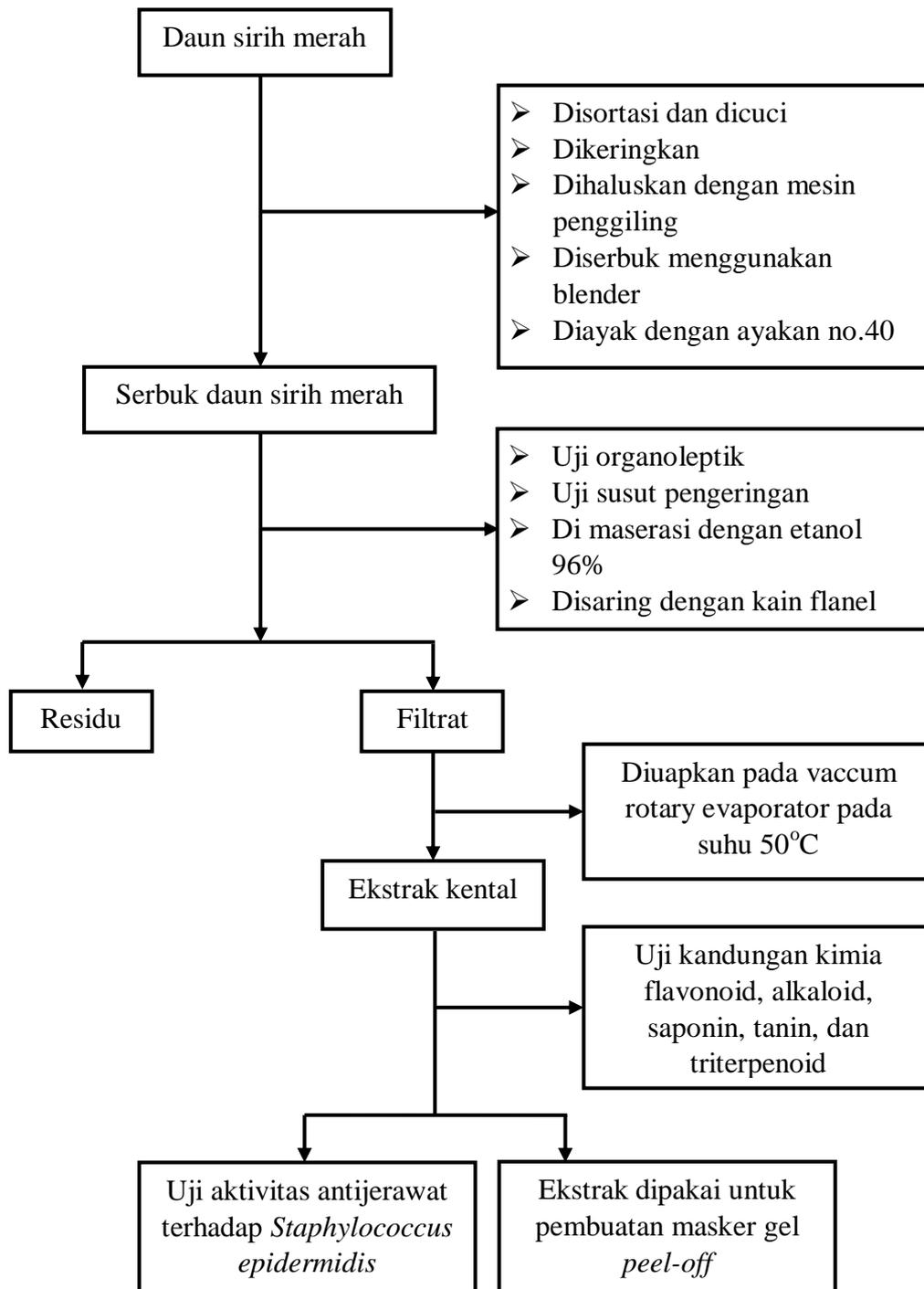
$$\text{Indeks iritasi primer} = \frac{\text{Jumlah eritema 24/48/72 jam} + \text{Jumlah edema 24/48/72 jam}}{\text{Jumlah kelinci}}$$

E. Analisis Data

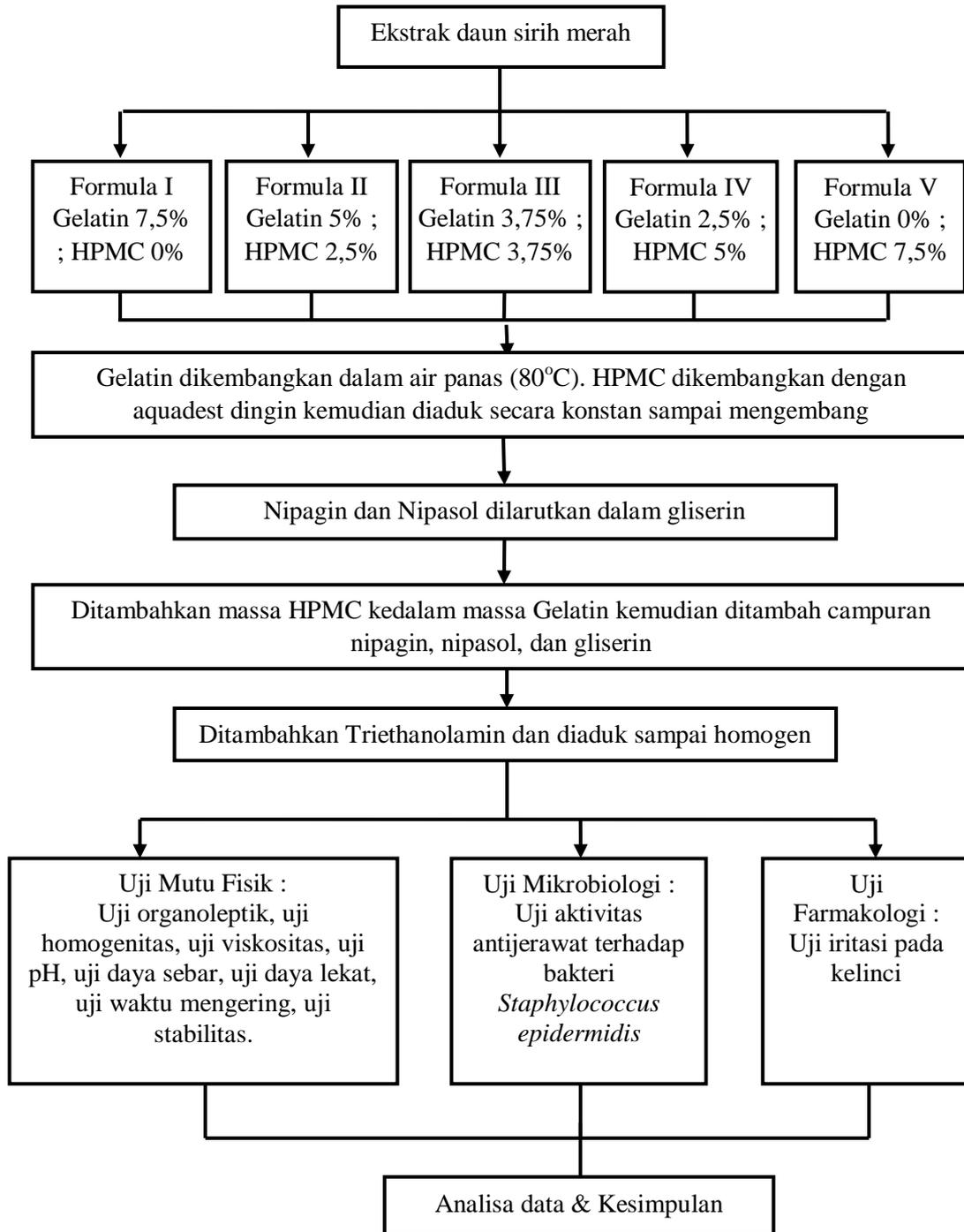
Data uji pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan waktu mengering dianalisis secara statistik menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan uji ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan uji *Mann-Whitney* H_0 ditolak atau ($p > 0,05$) (Susiloningsih 2016).

Data diameter hambat dianalisis secara statistik menggunakan metode *Kolmogorov-Smirnov*. Jika hasil yang diperoleh terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan metode *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Dilanjutkan dengan uji *Tukey* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya. Jika hasilnya 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 berbeda antara satu dengan yang lainnya (Yanti 2018).

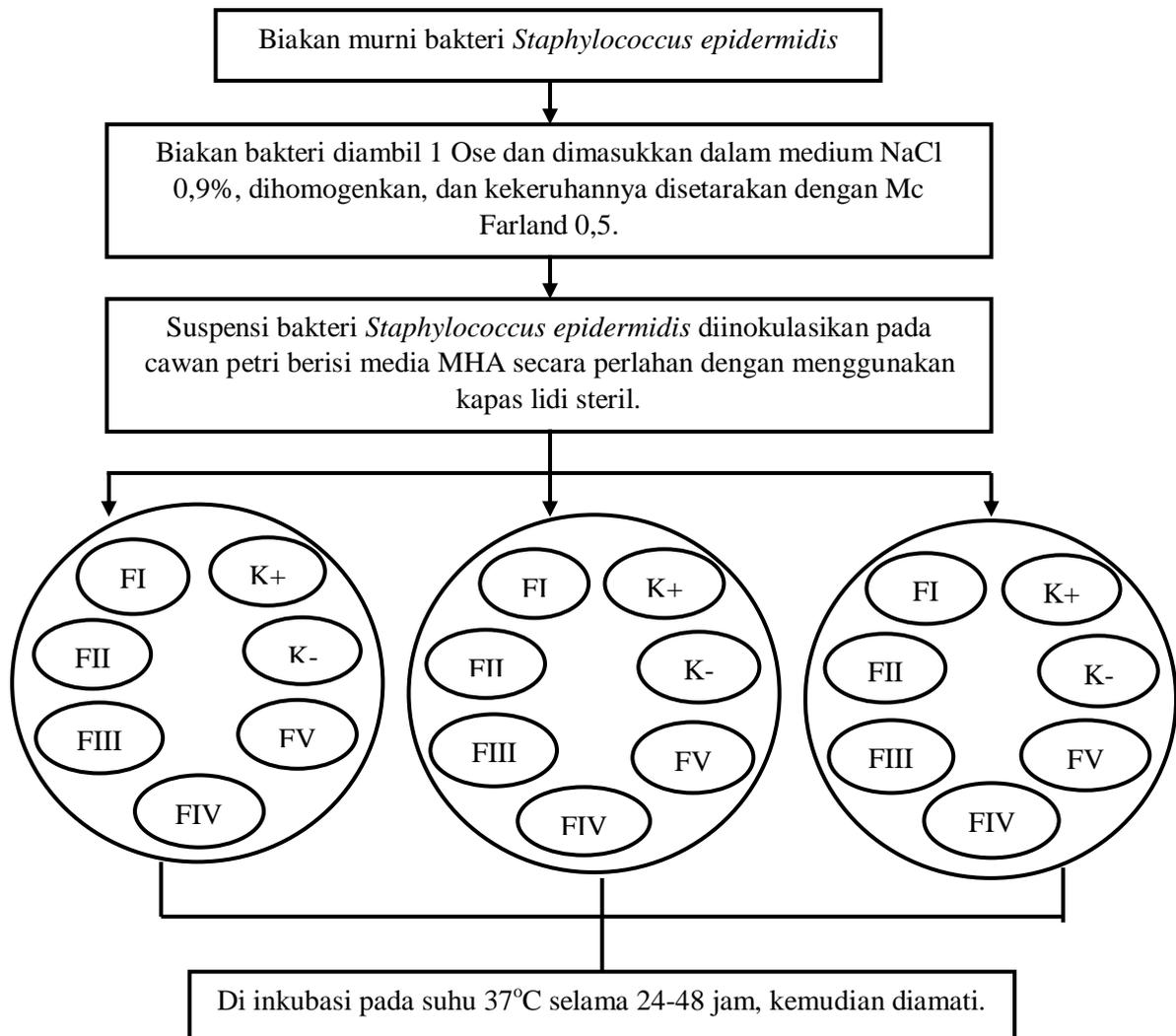
F. Skema Penelitian



Gambar 10. Skema pembuatan ekstrak daun sirih merah



Gambar 11. Skema pembuatan masker gel *peel-off* daun sirih merah



Gambar 12. Skema pengujian antibakteri

Keterangan :

- FI : Formula 1 (Gelatin 7,5% ; HPMC 0%)
- FII : Formula 2 (Gelatin 5% ; HPMC 2,5%)
- FIII : Formula 3 (Gelatin 3,75% ; HPMC 3,75%)
- FIV : Formula 4 (Gelatin 2,5% ; HPMC 5%)
- FV : Formula 5 (Gelatin 0% ; HPMC 7,5%)
- K+ : Masker gel *peel-off* klindamisin 1,2%
- K- : Basis sediaan masker gel *peel-off*