

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian. Populasi dalam penelitian ini adalah sediaan *clay mask* ekstrak daun seledri.

2. Sampel

Sampel merupakan bagian dari populasi penelitian. Sampel dalam penelitian ini adalah sediaan *clay mask* ekstrak daun seledri dengan variasi xanthan gum 0,5%, 1%, dan 1,5%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah sediaan *clay mask*.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi xanthan gum 0,5%, 1%, dan 1,5%.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah stabilitas dan mutu fisik sediaan *clay mask* ekstrak daun seledri.

Variabel utama keempat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri *clay mask* ekstrak daun seledri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang diidentifikasi digolongkan ke dalam berbagai jenis variabel seperti variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat.

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diubah-ubah untuk melihat bagaimana pengaruhnya terhadap variabel lain. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi xanthan gum 0,5%, 1%, dan 1,5%.

Variabel terikat adalah variabel yang diamati untuk mengukur pengaruh yang ditimbulkan oleh variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji mutu fisik dan stabilitas *clay mask* serta aktivitas antibakteri ekstrak daun seledri pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel terikat, sehingga kualifikasi harus ditentukan agar hasil

yang diperoleh tidak tersebar atau tidak dapat sepenuhnya diulang oleh peneliti lain. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, ekstrak daun seledri, pembuatan suspensi, suhu, sterilisasi, derajat pengolesan, metode penelitian, kesterilan laboratorium penelitian, kondisi peneliti, metode difusi, jumlah bakteri suspensi, dan media.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama adalah daun seledri yang diperoleh dari Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah dipilih yang segar dan sehat secara acak, dicuci dengan air mengalir, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di luar di tempat yang terlindung dari sinar matahari sampai kering. Dibuat serbuk dengan cara di blender sampai diperoleh serbuk halus dan dilanjutkan dengan ekstraksi.

Kedua, ekstrak daun seledri adalah ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Ketiga, sediaan *clay mask* adalah pembuatan sediaan dengan basis *thickener agent* xanthan gum.

Keempat, mutu fisik sediaan *clay mask* dengan variasi konsentrasi xanthan gum 0,5%, 1%, dan 1,5% adalah uji yang meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji lama waktu mengering, uji iritasi, dan uji kesukaan (hedonic).

Kelima, stabilitas sediaan *clay mask* adalah pengujian sediaan menggunakan metode *cycling test*.

Keenam, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, aktivitas antibakteri *clay mask* ekstrak daun seledri adalah uji aktivitas menggunakan metode cakram disk untuk menentukan aktivitas antibakteri dari sediaan yang berdasarkan ukuran zona bening yang terbentuk. Zona bening yang terbentuk dari pengujian antibakteri merupakan hasil dari kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk ekstrak maserasi dan uji fitokimia yaitu Erlenmeyer, mesin blender, neraca analitik, gelas ukur, pisau, pipet tetes, toples kaca, botol coklat maserasi, saringan, toples, *beaker*

glass, *vacum rotary evaporator*, desikator, oven, *waterbath*, kurs porselen, lampu spirtus, ayakan *mesh* no 60.

Alat untuk pembuatan dan uji mutu fisik *clay mask* yaitu mortir dan stamper, sudip, neraca analitik, tabung reaksi, *baeker glass*, batang pengaduk, gelas ukur, *Erlenmeyer*, cawan porselin, pipet tetes, kaca transparan, *moisture balance*, viskometer *Brookfield*, pH meter.

Alat untuk uji aktivitas antibakteri adalah LAF, *vortex mixer*, jangka sorong, korek api, rak tabung reaksi, cawan petri, lampu spirtus, jarum ose, pH meter, pinset, kapas, label, inkubator, *autoclave*, oven, mikropipet, *boor prop*, *object glass*, mikroskop, *ent-kas*, kertas coklat, pipet pasteur steril.

Alat yang digunakan untuk pewarnaan Gram adalah *object glass*, pipet tetes, mikroskop. Alat untuk uji katalase dan koagulase yaitu jarum *ose*, pipet volume, *object glass*, *deck glass*, tabung reaksi, bunsen.

2. Bahan

Bahan sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah daun seledri segar yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, kab. Karanganyar, Jawa Tengah dan etanol 96% yang digunakan untuk ekstraksi.

Bahan pengujian ekstrak antara lain reagen *Dragendroff*, reagen *Wagner*, Etanol 96%, H_2SO_4 , CH_3COOH , HCl pekat, logam Mg, air hangat, $FeCl_3$.

Bahan yang digunakan untuk proses pembuatan *clay mask*: ekstrak daun seledri, Kaolin, Bentonite, Propilen glikol, Nipagin, Xanthan gum, *Oleum rosae*, dan aquadest.

Bahan yang digunakan untuk pengujian antibakteri: bakteri *Staphylococcus aureus*, *clay mask* merk x, klindamisin solution 1,2%, media *Muller Hinton Agar* (MHA), media *Nutrient Agar* (NA), media *Manitol Salt Agar* (MSA), kristal violet, safranin, cairan H_2O_2 , koagulase plasma, larutan *Mc. Farland*, larutan lugol.

Bahan yang digunakan untuk uji pewarnaan Gram adalah pewarna kristal violet, pewarna lugols iodine, etanol 96% atau aseton, dan safranin. Bahan untuk uji biokimia yaitu H_2O_2 3%, BHI, plasma EDTA, dan bakteri *Staphylococcus aureus*.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi dalam penelitian ini untuk mengetahui kesesuaian sampel daun seledri. Determinasi dilakukan dengan perbandingan morfologis karakteristik tanaman seledri dengan literatur yang dilakukan oleh Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengambilan bahan

Daun seledri diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah. Bagian daun seledri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun seledri hijau yang segar dan tidak layu. Serbuk simplisia diperoleh dengan cara di blender sampai diperoleh serbuk halus dan diayak dengan ayakan nomor 60. Serbuk ditimbang dengan neraca analitik berdasarkan bahan-bahan yang diperlukan untuk membuat ekstrak.

3. Pemeriksaan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan menggunakan alat yaitu *moisture balance*. Langkah awal, serbuk ditimbang sebanyak 2 g, lalu dimasukkan ke dalam *moisture balance*. Nilai yang konstan ada susut pengeringan serbuk ditandai dengan bunyi alarm pada alat. Pengujian ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi dengan syarat kelembapan $\leq 10\%$ (DepKes R1, 2000).

4. Pembuatan ekstrak daun seledri

Ekstrak daun seledri dibuat dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Dalam bejana maserasi dimasukkan serbuk daun seledri yang sudah dihaluskan sebesar 1000 g dan tambahkan pelarut 10 liter etanol 96%. Biarkan serbuk simplisia terendam sepenuhnya. Sebelum menghitung pada proses maserasi, dilakukan pengadukan terlebih dahulu. Kemudian dihitung waktu maserasi setelah pengadukan, yaitu dimaserasi selama 18 jam. Hasil maserasi disaring dengan kain flanel hingga diperoleh ekstrak cair yang bebas dari ampas daun seledri dan dilanjutkan dengan penyaringan ulang dengan kertas saring. Ampas maserat direndam lagi dengan setengah pelarut awal atau 5 liter etanol 96%. Setelah semua maserat terkumpul, diuapkan pada *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. Kemudian timbang dan catat rendemen yang diperoleh (Kemenkes, 2017).

5. Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun seledri

Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun seledri dilakukan dengan melihat sifat fisik ekstrak. Pemeriksaan organoleptis meliputi

dengan mengamati bentuk, warna dan bau ekstrak daun seledri yang diperoleh.

6. Penetapan kadar air ekstrak daun seledri

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode destilasi toluen. Toluena sebanyak 100 ml yang dituangkan terlebih dahulu menggunakan aquadest 10 ml, setelah itu ditimbang ekstrak 20 gram dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Toluena yang sudah jenuh dimasukkan dalam labu alas bulat kemudian labu tersebut dipanaskan selama 15 menit hingga air tersuling semua, setelah air memisah semua, volume air baru bisa dibaca. Persyaratan kadar air dalam ekstrak yaitu tidak lebih dari 10% (Sari, 2022).

7. Identifikasi kandungan senyawa ekstrak daun seledri dengan uji fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun seledri. Pengujian fitokimia meliputi uji tanin, saponin, flavonoid, dan steroid/triterpenoid (Khaerati, 2011) :

7.1 Tanin. Mendidihkan 1 mL ekstrak dengan 10 mL air lalu disaring, tambahkan beberapa tetes FeCl_3 1 %. Uji positif ditandai dengan terbentuknya warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin (Gustiana, 2022).

7.2 Saponin. Ekstrak 0,5 gram dilarutkan dengan 10 ml air panas dalam tabung reaksi, lalu didinginkan dan dikocok sampai muncul buih, lalu ditambahkan tetesan HCL 2N. Terbentuknya buih konstan selama 10 menit menunjukkan hasil positif saponin (Kristianingsih, 2018).

7.3 Flavonoid. Ekstrak 0,5 gram dilarutkan dalam etanol lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan serbuk Mg, HCL pekat, dan amil alkohol kemudian dikocok dengan kuat dan dibiarkan sampai memisah. Terbentuknya perubahan warna menjadi merah atau coklat pada lapisan amil alkohol menunjukkan hasil positif flavonoid golongan flavon (Lianah, 2021).

7.4 Steroid/Triterpenoid. Sebanyak 0,5 gram ekstrak daun seledri ditambahkan 15 tetes anhidrida asetat dan kemudian 5 tetes asam sulfat pekat pekat. Adanya senyawa golongan steroid ditandai dengan munculnya warna biru sedangkan adanya senyawa golongan terpenoid akan berwarna merah (Kristianingsih, 2018).

7.5 Uji bebas etanol. Uji bebas etanol dilakukan untuk menentukan ekstrak tersebut sudah tidak mengandung etanol. Pengujian bebas etanol dilakukan dengan ekstrak daun seledri H_2SO_4 kemudian ditambah dengan CH_3COOH , setelah itu dilakukan pemanasan. Hasil positif bebas etanol ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas (E. Kurniawati, 2015).

8. Formulasi *clay mask* dengan ekstrak daun seledri

Langkah pertama dalam membuat *clay mask* dengan ekstrak daun seledri adalah menentukan formulasi yang akan digunakan. Komponen pembuatan sediaan *clay mask* dengan ekstrak daun seledri dilakukan dengan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Ardhanay *et al.*, (2022) dimana hasil yang diperoleh pada penelitian ini mampu menghasilkan sediaan *clay mask* dengan mutu fisik yang baik dan stabilitas yang baik. Bahan yang digunakan yaitu ekstrak daun seledri, Kaolin, Bentonite, Propilen glikol, Nipagin, Xanthan gum, Oleum rosae, dan aquadest. Perencanaan formula yang akan dilakukan sebagai berikut:

Tabel 1. Rancangan formula *clay mask* ekstrak daun seledri

Bahan	Fungsi	Konsentrasi					
		F01	F02	F03	F1	F2	F3
Ekstrak daun seledri	Bahan aktif	-	-	-	5%	5%	5%
Kaolin	Eksipien	15	15	15	15	15	15
Bentonite	Rheologi modifier	4	4	4	4	4	4
Propilen glikol	Humektan	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Nipagin	Pengawet	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Xanthan gum	Thickener agent	0,5%	1%	1,5%	0,5%	1%	1,5%
Oleum rosae	Pengaroma	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Aquadest <i>ad</i>	Pelarut	60	60	60	60	60	60

Keterangan

F01: Formula dengan konsentrasi xanthan gum 0,5%

F02: Formula dengan konsentrasi xanthan gum 1%

F03: Formula dengan konsentrasi xanthan gum 1,5%

F1: Formula dengan konsentrasi xanthan gum 0,5% ditambah ekstrak

F2: Formula dengan konsentrasi xanthan gum 1% ditambah ekstrak

F3: Formula dengan konsentrasi xanthan gum 1,5% ditambah ekstrak

Pembuatan sediaan *clay mask* pada formulasi ini dengan melarutkan bentonite dan nipagin masing-masing dengan 15 mL air panas, diamkan selama 15 menit, kemudian kedua campuran tersebut dimasukkan ke dalam mortir, kemudian tambahkan xanthan gum digerus sampai homogen (Fase 1). Ekstrak daun seledri dimasukkan ke dalam mortir, tambahkan terlebih dahulu menggunakan propilen glikol

untuk menghindari kesulitan melarutkan ekstrak dalam formula *clay mask* kemudian aduk sampai homogen (Fase 2). Kaolin ditambahkan secara bertahap ke dalam mortir sambil digerus sampai homogen (Fase 3). Oleum rosae ditambahkan terakhir pada mortir sebagai pewangi, gerus hingga homogen (Fase 4).

9. Evaluasi sediaan mutu fisik *clay mask* ekstrak daun seledri

9.1 Uji organoleptis. Uji organoleptis dilakukan dengan pengamatan langsung meliputi: bentuk, warna, tekstur sediaan, dan bau sediaan *clay mask* dengan ekstrak daun seledri (Yuniarsih *et al.*, 2020).

9.2 Uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan dengan menimbang sebanyak 0,1 gram sampel uji, diletakkan diantara dua kaca object. Lihatlah apakah terdapat partikel kasar atau ketidak homogenan dibawah kaca. Uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah terdapat campuran yang tidak tercampur dengan baik (DepKes RI, 1979).

9.3 Uji pH. *Clay mask* dengan ekstrak daun seledri dapat diukur menggunakan pH universal atau pH meter. pH meter dimasukkan ke dalam larutan, hasil angka pH akan muncul di instrument pH meter dan pH universal, dicocokkan hasil indikator lalu dicatat hasilnya (Yuniarsih *et al.*, 2020). Rentang pH 4,5 - 7 dimana nilai tersebut dianggap aman untuk kulit wajah (Safilla, 2022).

9.4 Uji viskositas. Viskositas adalah parameter uji untuk mengetahui daya alir/kekentalan suatu sediaan. Pengukuran viskositas *clay mask* diukur menggunakan viskometer *Brookfield*. Viskometer ini menggunakan gasing atau kumparan yang dicelupkan kedalam sampel dengan spindel nomor 6 dengan 20 rpm. Dibaca viskositas pada layar viskometer *Brookfield* (Qur'aniati, 2022). Nilai viskositas untuk sediaan *clay mask* yaitu 4000 - 40000 cps (Syamsidi *et al.*, 2021).

9.5 Uji daya sebar. Sebanyak 1 g sediaan masker diletakkan di atas kaca transparan, dimana kaca transparan bagian atas dibebani dengan menggunakan anak timbangan 50 g dan 100 g. Masing-masing diberi rentang waktu 1-2 menit, selanjutnya diameter penyebaran diukur pada setiap penambahan beban. Daya sebar yang memenuhi standar *clay mask* yaitu 5-7 cm. Uji daya sebar dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Safilla, 2022).

9.6 Uji daya lekat. Sejumlah 300 mg *clay mask* diletakkan diatas kaca objek pertama, kemudian ditutup dengan kaca objek kedua, ditekan dengan beban 1 kg selama 1 menit, setelah itu beban diangkat

dari kaca objek dan dilepaskan. Waktu yang dibutuhkan untuk kedua kaca objek tersebut terlepas dicatat. Uji daya lekat dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Ardhany, 2022).

9.7 Uji lama waktu mengering. Sebanyak 0,5 gram sediaan pada masing-masing konsentrasi dioleskan di kaca objek dan diamati berapa lama waktu yang dibutuhkan sediaan untuk mengering. Persyaratan waktu mengering sediaan *clay mask* yaitu 10-25 menit (Safilla, 2022).

9.8 Uji iritasi. Uji ini dilakukan pada 12 orang sukarelawan dengan teknik yaitu uji tempel terbuka yang dilakukan dengan mengoleskan sediaan *clay mask* (F1, F2, dan F3) sebanyak ± 500 mg dibelakang telinga, kemudian dibiarkan selama 24 jam dan diamati apa yang terjadi. Gejala yang timbul diamati, umumnya reaksi iritasi positif ditandai oleh adanya kemerahan, gatal-gatal, atau bengkak pada kulit yang diberi perlakuan (Febriani, 2021).

9.9 Uji kesukaan (Hedonic). Uji kesukaan ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan panelis terhadap sediaan yang dibuat, jumlah panelis uji kesukaan makin besar semakin baik. Jumlah panelis 20 orang dengan cara setiap panelis memberikan penilaian terhadap masing-masing *clay mask*. Parameter pengamatan pada uji kesukaan adalah kemudahan dioleskannya *clay mask*, homogenitas, efek setelah penggunaan, dan intensitas warna (Febriani, 2021).

9.10 Uji stabilitas dipercepat. Uji stabilitas sediaan dilakukan dengan metode *cycling test*. Cara ini dilakukan dengan menyimpan sediaan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ dalam waktu 24 jam. Sediaan uji dipindahkan ke suhu 40°C selama 24 jam (satu siklus). Pengujian sediaan dilakukan dari siklus 1 sampai siklus 6 (Febriani, 2021). Setelah siklus selesai, dilakukan uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji lama waktu mengering.

10. Peremajaan bakteri

Dari biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus*, secara aseptis diambil satu ose, dan digoreskan pada media miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Wijayanti dan Safitri, 2018).

11. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

11.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan isolasi. Isolasi bakteri pada media MSA dilakukan dengan mengambil satu ose *Staphylococcus aureus* dari suspensi bakteri, diinokulasi dalam media MSA, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Dewi, 2013). Hasil

inokulasi bakteri *Staphylococcus aureus* pada media MSA menunjukkan perubahan warna pada media dari merah menjadi kuning (Hayati *et al.*, 2019).

11.2 Identifikasi morfologi *Staphylococcus aureus* dengan pewarnaan Gram. Sifat Gram dan morfologi bakteri dapat dilihat dari pewarnaan Gram. Pewarnaan dilakukan dengan cara menggoreskan bakteri uji pada object glass dan difiksasi di atas api bunsen. Teteskan kristal violet diamkan selama 1 atau 2 menit. Zat sisa warna dibersihkan, bilas dengan air mengalir. Preparat ditetesi dengan larutan lugol, diamkan selama 30 detik. Bilas di bawah air mengalir. Preparat dilunturkan dengan alkohol 96% sampai tidak ada zat warna yang tersisa dan dicuci dengan air mengalir. Zat warna safranin ditetaskan, dibiarkan selama 2 menit, preparat dibilas dengan air mengalir dan dibiarkan kering. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100x (Hayati *et al.*, 2019). *Staphylococcus aureus* dinyatakan positif berdasarkan hasil untuk bakteri Gram-positif berbentuk kokus yang bergerombol seperti anggur, berwarna ungu di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100x.

11.3 Identifikasi fisiologi uji biokimia dengan uji katalase. Uji katalase digunakan untuk mengidentifikasi genus *Staphylococcus aureus*. H₂O₂ ditetaskan pada *object glass* dan satu ose dari inokulum MSA diletakkan pada *object glass* dan dihomogenkan. Hasil positif pada uji katalase menunjukkan adanya gelembung gas (O₂) yang diperoleh dari genus *Staphylococcus* (Hayati *et al.*, 2019).

11.4 Pengujian koagulase. Uji koagulase dilakukan untuk mengetahui terdapat ada atau tidaknya enzim koagulase yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus*. Uji koagulase dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri masukkan dalam 1 ml media BHI dilanjutkan dengan inkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, tambahkan 1 mL plasma kelinci diikuti dengan inkubasi selama 4 jam pertama untuk melihat hasilnya. Lanjutkan inkubasi selama 24 jam jika belum menunjukkan koagulase positif. Hasil positif pada uji koagulase dengan adanya gumpalan pada tabung dan hasil negatif jika tidak ada gumpalan seperti gel (SNI, 2015).

12. Pengujian aktivitas antibakteri *clay mask* ekstrak daun seledri

12.1 Pembuatan suspensi bakteri uji. Dibuat suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan mengambil bakteri 1 ose dan dimasukkan ke dalam tabung yang telah berisi media *Brain Heart*

Infusion (BHI). Suspensi dihomogenkan dengan cara di vortex, kemudian disamakan kekeruhannya menggunakan standar *Mc. Farland* 0.5 (Agustin *et al.*, 2018).

12.2 Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun seledri.

Media MHA diinokulasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan kapas lidi steril dengan cara menggoreskan media sebanyak tiga kali pada seluruh permukaan media. Media yang telah diinokulasi bakteri dibuat dalam sumuran dengan 7 lubang dengan alat tip mikro pipet, masing-masing sumuran diisi ekstrak daun seledri dengan konsentrasi 1, 5, 10, 15, dan 20%, kontrol positif klindamisin solution 1,2% dan kontrol negatif DMSO 5%. Inkubasi cawan petri pada suhu 37⁰C selama 18 jam. Kemudian ukur setiap zona hambat di sekitar sumuran menggunakan jangka sorong (Lubis, 2020).

12.3 Pengujian aktivitas antibakteri clay mask ekstrak daun seledri. Pengujian antibakteri *clay mask* dilakukan dengan metode difusi cakram disk. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan merendam cakram disk pada sediaan yang akan diuji. Suspensi bakteri uji diambil menggunakan kapas lidi steril dan dinokulasikan pada media MHA. Cawan petri dibuat menjadi 7 bagian menggunakan garis spidol pada bagian belakang cawan petri. Sediaan *clay mask* diambil sebanyak 1 gram dengan menggunakan spatel logam steril yang akan diuji bakteri, kemudian dimasukkan ke dalam *beaker glass* yang berisi cakram disk dan direndam selama 30 menit. Cakram disk diambil menggunakan pinset diletakkan pada setiap bagian garis sesuai dengan formula sediaan *clay mask*. F0 basis gel tanpa ekstrak daun seledri (kontrol negatif), F1 dengan konsentrasi xanthan gum 0,5% dan ekstrak daun seledri 5%, F2 dengan konsentrasi xanthan gum 1% dan ekstrak daun seledri 5%, F3 dengan konsentrasi xanthan gum 1,5% dan ekstrak daun seledri 5%, *clay mask* pembanding sebagai kontrol positif. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi (Fitryanti *et al.*, 2019).

Inkubasi pada suhu 37⁰C selama 18 jam dalam inkubator. Pengamatan zona hambat dilakukan dengan mengukur zona bening yang terbentuk (Indarto *et al.*, 2019). Diameter zona bening yang terbentuk diukur secara horizontal dan vertikal menggunakan alat mistar berskala dengan satuan millimeter (mm). Hasil pengukuran zona bening ditentukan kekuatan daya antibakterinya. Kategori kekuatan daya antibakteri dengan zona hambat 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah, zona hambat 5-10 mm termasuk kategori sedang, zona

hambat 10-20 termasuk kategori kuat, dan zona hambat 20 mm hingga lebih termasuk kategori sangat kuat (Khairani *et al.*, 2019).

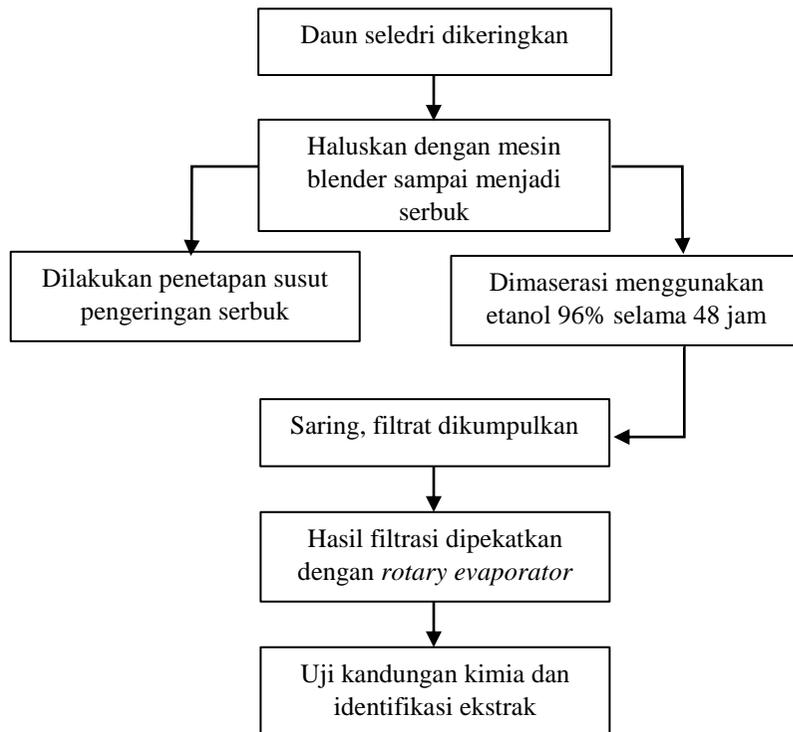
E. Analisis Data

Hasil penelitian diperoleh data mutu fisik *clay mask* yang meliputi uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji lama waktu mengering, uji iritasi, uji kesukaan (hedonic), dan uji stabilitas dipercepat sediaan *clay mask*. Metode statistik digunakan untuk menganalisis data dengan uji Shapiro-wilk. Terdistribusi normal dan homogen jika ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan ANOVA dan jika tidak berdistribusi normal ($p < 0,05$) dilanjutkan uji Kruskal-Wallis, sedangkan uji stabilitas untuk masing-masing formula dianalisis dengan uji T-test (Puspitasari, 2014).

Metode Shapiro-wilk digunakan sebagai uji untuk melihat pengaruh *clay mask* dari ekstrak daun seledri pada variasi konsentrasi xanthan gum 0,5%, 1% dan 1,5%, dengan mengukur zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Jika sesuai dengan distribusi normal ($p > 0,05$), hasilnya dianalisis dengan analisis variance (ANOVA) pada rentang 95% dan jika tidak berdistribusi normal, hasilnya dianalisis dengan Kruskal-Wallis. Selain itu, uji Tukey dilakukan untuk menentukan konsentrasi mana yang berpengaruh. Uji stabilitas dianalisis menggunakan uji T-test.

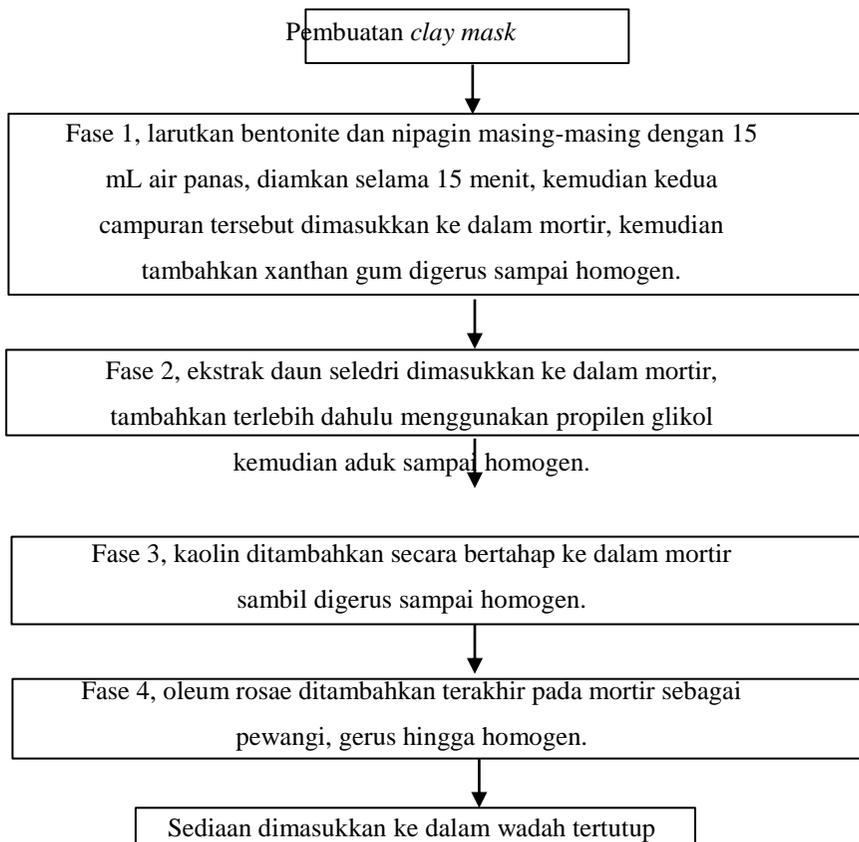
F. Skema Rancangan Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak daun seledri



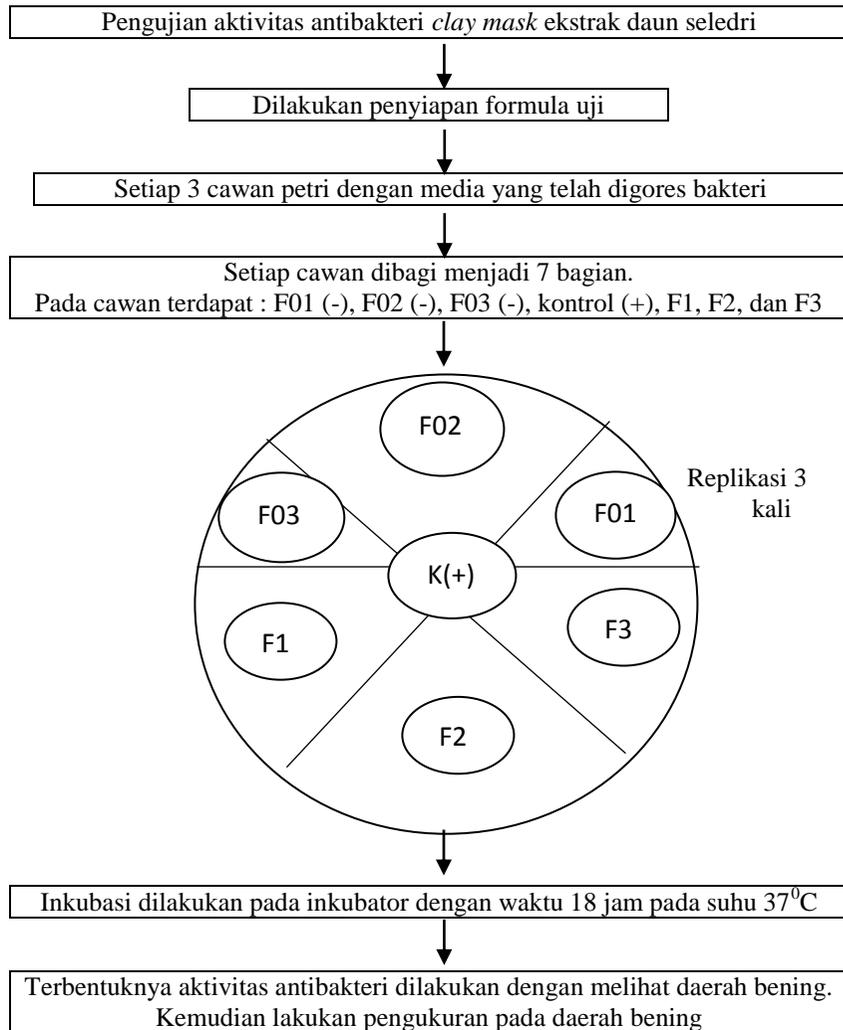
Gambar 2. Pembuatan ekstrak daun seledri

2. Pembuatan *clay mask* ekstrak daun seledri



Gambar 3. Pembuatan *clay mask* ekstrak daun seledri

3. Skema pengujian aktivitas antibakteri *clay mask* ekstrak daun seledri metode difusi cakram disk



Gambar 4. Pengujian *clay mask* ekstrak daun seledri