

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi pada penelitian ini adalah sediaan masker *peel off* ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dengan variasi kombinasi konsentrasi *HPMC* dan *PVA*

Penelitian ini menggunakan sampel sediaan masker *peel off* ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dengan variasi kombinasi konsentrasi *HPMC* (1,5% ; 1,75 % ; 2% ; 2,5% ; 3%) dan *PVA* (10,5% ; 10,25% ; 10 % ; 9,5% ; 9%).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama pada penelitian yaitu ekstrak daun bandotan hasil dari proses ekstraksi dengan maserasi

Variabel utama kedua pada penelitian yaitu variasi konsentrasi *HPMC* dan *PVA* pada sediaan masker *peel off* ekstrak daun bandotan sebagai *gelling agent* serta pembentuk lapisan film.

Variabel utama ketiga penelitian yaitu aktivitas antibakteri masker *peel off* ekstrak daun bandotan dengan variasi kombinasi konsentrasi *HPMC* dan *PVA*

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang sudah diidentifikasi, selanjutnya dikelompokkan menjadi beberapa variabel yaitu variabel bebas, tergantung, serta terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya dalam variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi kombinasi konsentrasi *HPMC* dan *PVA* sediaan masker *peel off* ekstrak daun bandotan.

Variabel tergantung adalah variabel akibat dari variabel utama yang merupakan kriteria dari penelitian. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan mutu fisik yang baik pada sediaan masker *peel off* ekstrak daun bandotan yaitu uji organoleptik, uji homogenitas, uji viskositas, pH, uji daya sebar, daya lekat, uji waktu mengering, dan uji stabilitas.

Variabel terkendali yaitu variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel bebas selain variabel tergantung, sehingga variabel ini perlu diklasifikasikan agar hasil yang diperoleh tepat dan dapat diulang oleh peneliti lain. Variabel terkendali pada penelitian ini yaitu ekstrak daun bandotan, metode dan cara pembuatan sediaan masker *peel off*, kondisi peneliti, serta kondisi lobaratorium.

3. Definisi Operasional Variabel

Pertama, daun bandotan yang merupakan daun yang berasal dari tumbuhan bandotan yang masih segar dan terbebas dari hama yang diperoleh dari Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun bandotan yaitu hasil dari proses ekstraksi daun bandotan dengan pelarut etanol 96% yang telah disaring dan dipekatkan hingga menjadi ekstrak kental menggunakan metode maserasi

Ketiga, variasi konsentrasi *gelling agent* dan pembentuk lapisan film yang digunakan pada masker *peel off* yaitu *HPMC* dan *PVA*

Keempat, evaluasi mutu fisik dari sediaan masker *peel off* dengan melakukan pengujian sediaan yaitu uji organoleptik, uji pH, viskositas, waktu sediaan mengering, daya sebar, dan daya lekat, serta stabilitas.

Kelima, uji aktivitas antibakteri adalah pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* sediaan masker *peel off* dari ekstrak daun bandotan dengan variasi konsentrasi *HPMC* dan *PVA* yang ditunjukkan dengan diameter zona hambat pada media MHA.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Penelitian ini menggunakan alat seperti timbangan analitik, mesin penggiling (blender), botol maserasi, water bath, oven, peralatan gelas, *rotary vacuum evaporatory*, cawan petri, ose bulat, pinset, inkubator, pH meter, viskometer Rion, seperangkat alat uji homogenitas, daya lekat, daya sebar, mortir, stamfer, bunsen, sudip, pengaduk, ayakan mesh 40, mikro pipet, *boor prop*, desikator, kurs porselin, kain flannel, kertas saring.

2. Bahan

Penelitian ini menggunakan daun bandotan (*Ageratum conyzoides*, L.) sebagai zat aktif yang dibuat menjadi ekstrak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Bahan kimia yang digunakan yaitu PVA, HPMC, propil paraben, gliserin, metil paraben, *aquadest*, klindamisin 1%, media MHA, BHI borth, media MSA, Preaksi wagner, mayer, dragondorf, larutan FeCl_3 , larutan HCl pekat, larutan HCl 2N, larutan BaCl_2 , larutan asam sulfat, larutan asam asetat anhidrida, kloroform.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang digunakan pada penelitian yaitu dengan mencocokkan ciri-ciri makroskopis dan mikroskopis tanaman tersebut. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengumpulan dan Pengeringan Tanaman

Daun bandotan yang didapatkan dari Tawangmangu, bagian yang digunakan yaitu daun yang masih muda hingga tua, masih segar dan bebas dari hama. Daun bandotan kemudian dibersihkan dari kotoran dan dilakukan pencucian dengan air mengalir hingga bersih.

Daun bandotan yang sudah dibersihkan, kemudian dikeringkan menggunakan sinar matahari. Tujuannya agar kadar air berkurang, agar tidak terjadinya perubahan kimiawi, dan mencegah terjadinya reaksi enzimatis sehingga mengurangi kualitas, mencegah agar tidak terjadi pertumbuhan bakteri dan jamur serta untuk memudahkan dalam pembuatan serbuk.

3. Pembuatan Serbuk

Daun bandotan yang sudah dikeringkan, selanjutnya digiling menggunakan mesin penggiling/blender hingga menjadi serbuk, kemudian diayak dengan ayakan mesh 40. Serbuk yang diperoleh kemudian ditimbang, kemudian menyimpan serbuk pada wadah yang bersih, kering, dan tertutup rapat.

4. Identifikasi Serbuk

4.1 Pemeriksaan organoleptis serbuk daun bandotan.

Pemeriksaan dengan mengamati secara langsung bentuk fisik, bau, dan warna dari sebuk daun bandotan.

4.2 Pemeriksaan susut pengeringan serbuk daun bandotan. Penetapan susut pengeringan dengan alat *moisture balance*, diilakukan dengan cara mengkalibrasi alat dan mentara alat sesuai akurasi, kemudian serbuk daun bandotan dimasukkan kedalam plat sebanyak 2 gram. Pengukuran susut pengeringan dengan suhu 105°C selama 30 menit hingga terdengar bunyi ‘beep’. Selanjutnya melakukan pembacaan hasil yang tertera pada layar. Syarat susut pengeringan berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia adalah tidak lebih dari 10%.

4.3 Pemeriksaan kadar air serbuk daun bandotan.

Penetapan menggunakan metode destilasi dengan alat yang digunakan yaitu *sterling bidwell*. Penetapan kadar air dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 10gram serbuk daun bandotan, kemudian dimasukkan kedalam labu destilasi, dan ditambahkan pelarut toluena yang sebelumnya telah dijenuhkan dengan air sebanyak 100mL, digojog hingga tercampur sempurna. Selanjutnya memasang labu destilasi yang dihubungkan dengan kondensor. Setelah semua terpasang, kran air dinyalakan bersamaan dengan dilakukannya pemanasan langsung sehingga uap air dari cairan yang mendidih mengalir melalui kondensor dan akan terlihat adanya pemisahan air pada pipa. Pemanasan dilakukan selama 30 menit dan apabila air tidak bertambah maka pemanasan dihentikan.

5. Pembuatan Ekstrak

Metode pembuatan ekstrak daun bandotan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan dengan memasukkan 800 gram serbuk kedalam maserator, kemudian masukkan 10 bagian pelarut. Campuran serbuk dengan pelarut selanjutnya direndam pada saat 6 jam pertama diaduk sesekali, lalu didiamkan kurang lebih 18 jam. Maserat yang didapatkan kemudian disaring menggunakan kain flannel. Proses penyarian diulangi sebanyak 1 kali menggunakan pelarut yang sama dengan jumlah volume setengah jumlah volume pelarut yang pertama, setelah itu semua hasil maserat dipekatkan atau diuapkan dengan *rotary vacuum evaporatory* hingga diperoleh ekstrak kental. Lakukan pemeriksaan organoleptis dan hitung rendemen. Hasil perhitungan nilai rendemen harus sesuai dengan yang telah

ditetapkan pada monografi masing-masing ekstrak (Kemenkes, 2017).

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

6. Identifikasi Ekstrak Daun Bandotan

6.1 Pengujian organoleptis ekstrak daun bandotan.

Pemeriksaan organoleptis dengan mengamati secara langsung bentuk, warna, serta bau dari ekstrak daun bandotan.

6.2 Penetapan kadar air ekstrak daun bandotan.

Penetapan dengan menimbang 10 gram ekstrak kemudian dimasukkan ke dalam kurs yang telah ditara sebelumnya, lalu dioven pada suhu 105°C selama 5 jam. Lalu didinginkan dengan dimasukkan dalam desikator selama 15 menit, setelah itu ditimbang hingga bobot tetap dan dihitung kadar airnya dalam hitungan persen (Supriningrum *et al.*, 2018).

6.3 Pemeriksaan bebas etanol ekstrak daun bandotan.

Tujuan pemeriksaan ini adalah untuk memastikan ekstrak daun bandotan yang dihasilkan tidak mengandung etanol. Pemerikasaan dilakukan dengan cara sebagai berikut, ekstrak ditambahkan dengan H_2SO_4 pekat lalu ditambahkan lagi CH_3COOH , kemudian dipanaskan. Ekstrak menunjukkan bebas alkohol apabila tidak beerbau ester (Kurniawati, 2015).

6.4 Pemeriksaan kandungan kimia ekstrak daun bandotan.

Pemeriksaan ini dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak daun bandotan. Pemeriksaan kandungan senyawa kimia ekstrak daun bandotan menggunakan pereaksi warna yang spesifik pada masing-masing senyawa.

6.4.1 Identifikasi flavonoid. Memasukkan 500mg ekstrak kedalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dengan *aqueous* dan dipanaskan, kemudian disaring hingga didapatkan filtrat. Membahankan serbuk Mg sebanyak 0,1 g pada filtrat yang didapatkan, kemudian ditambahkan HCl pekat 1 mL dan 3 mL amil alkohol lalu dikocok dengan kuat hingga memisah. Hasil menunjukkan positif flavonoid apabila lapisan amil alkohol berubah warna menjadi merah, kuning, jingga (Pradana *et al.*, 2018).

6.4.2 Identifikasi alkaloid. Alkaloid dapat diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi mayer, wagner, dan dragendorf yaitu dengan memasukkan ekstrak daun bandotan sebanyak 0,5 g

kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan HCL 2N sebanyak 1mL dan 6 mL *aquadest* lalu dipanaskan kurang lebih 2 menit, didinginkan, kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian dengan 4 mL filtrat pada masing-masing bagian dan ditambahkan dengan pereaksi mayer, wagner, dan dragondorf. Hasil menunjukkan positif alkaloid pada pereaksi mayer adalah adanya endapan warna putih, pereaksi wagner dengan adanya endapan berwarna jingga sampai merah coklat, pada pereaksi dragondorf menunjukkan hasil positif alkaloid endapan jingga (Illing *et al.*, 2017).

6.4.3 Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dapat dilakukan dengan memasukkan 500mg ekstrak ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2 mL *aquadest*, kemudian dipanaskan kurang lebih 2-3 menit, didinginkan kemudian kocok kuat hingga membentuk busa. Hasil menunjukkan positif mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa stabil lebih kurang 2-4 menit (Rahmawati & Hidajati, 2017).

6.4.4 Identifikasi tanin. Identifikasi tanin dapat dilakukan dengan memasukkan 200mg ekstrak ke tabung reaksi kemudian melarutkannya dengan *aquadest* 10 mL, lalu ditambahkan 2-3 tetes FeCl 1%. Hasil positif mengandung tanin terjadinya perubahan warna menjadi hitam kebiruan atau hijau (Marlinda *et al.*, 2012).

6.4.5 Identifikasi terpenoid. Identifikasi terpenoid dapat dilakukan dengan memasukkan 0,5 gram ekstrak kedalam tabung reaksi, lalu melarutkannya dalam 2-3 mL klotoform, kemudian ditambah asam asetat anhidrida 10 tetes dan kemudian ditambahkan H₂SO₄ pekat 2-3 tetes melalui dinding tabung reaksi. Terdapat cincin kecoklatan atau violet menunjukkan positif senyawa terpenoid (Mardiyah *et al.*, 2014).

7. Formula Masker *Peel off*

Formulasi dirancang dengan menggunakan variasi kombinasi konsentrasi *gelling agent* yaitu *HPMC* dan *PVA* pada setiap formula.

Tabel 1. Formula masker gel peel off ekstrak metanol biji C. papaya (Amaliah et al., 2018)

Bahan	Fungsi	Konsentrasi % (b/b)		
		FI	FII	FIII
Ekstrak metanol biji C. papaya	Zat aktif	0,5	0,5	0,5
HPMC	<i>Gelling agent</i>	2	3	4
PVA	<i>Gelling agent</i>	10	9	8
Metil Paraben	Pengawet	0,18	0,18	0,18
Propil paraben	Pengawet	0,02	0,02	0,02
Gliserin	Humektan	11	11	11
Aquadest ad	Pelarut	100	100	100

Tabel 2. Formula masker peel off ekstrak daun bandotan (Ageratum conyzoides. L)

Bahan	Formula (%)					K-	K+	Fungsi
	FI	FII	FIII	FIV	FV			
Ekstrak daun bandotan	10	10	10	10	10	-	Klindamisin	Zat aktif
PVA	10,5	10,25	10	9,5	9	10,5	10,5	<i>Pembentuk lapisan film</i>
HPMC	1,5	1,75	2	2,5	3	1,5	1,5	<i>Gelling agent</i>
Gliserin	10	10	10	10	10	10	10	Humektan
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Propil paraben	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Aquadest ad	100	100	100	100	100	100	100	Pelarut

Keterangan :

FI : formula 1 dengan variasi PVA 10,5% dan HPMC 1,5%

FII : formula 2 dengan variasi PVA 10,25% dan HPMC 1,75%

FIII : formula 3 dengan variasi PVA 10% dan HPMC 2%

FIV : formula 4 dengan variasi PVA 9,5% dan HPMC 2,5%

FV : formula 5 dengan variasi PVA 9% dan HPMC 3%

8. Pembuatan Masker *Peel off*

Membuat lima rancangan formulasi masker *peel off* ekstrak daun bandotan dengan variasi kombinasi konsentrasi HPMC dan PVA sebagai *gelling agent* dan pembentuk lapisan film

Pertama, pada wadah terpisah mengembangkan PVA dan HPMC dengan *aquadest* hingga suhu 90 °C dan diaduk dengan kecepatan pengadukan yang konstan. HPMC yang telah mengembang kemudian dimasukkan kedalam wadah PVA sambil diaduk hingga homogen, kemudian didinginkan, kemudian pada

wadah lain melarutkan metil paraben serta propil paraben dengan gliserin dan diaduk hingga homogen, kemudian metil paraben dan propil paraben sambil diaduk hingga tercampur merata dimasukkan kedalam campuran PVA dan *HPMC* secara perlahan dan diaduk hingga homogen, setelah itu campuran ditambahkan ekstrak, kemudian sisa *aquadest* ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen. Setelah itu masker *peel off* dihomogenkan, kemudian simpan didalam wadah (Amaliah *et al.*, 2018).

9. Kontrol Uji

9.1 Kontrol positif. Kontrol positif pada penelitian ini adalah sediaan masker *peel off* menggunakan zat aktif antibiotik klindamisin 1%.

9.2 Kontrol negatif. Kontrol negatif pada penelitian ini adalah sediaan masker *peel off* tanpa ekstrak daun bandotan.

10. Pengujian Mutu Fisik Sediaan Masker *Peel off*

10.1 Uji organoleptik. Mengamati perubahan bentuk, bau, warna, dan tekstur dari sediaan masker *peel off* ekstrak daun bandotan (Saputra *et al.*, 2019).

10.2 Uji homogenitas. Uji homogenitas dapat dilakukan dengan mengambil 100 mg sediaan, kemudian dioleskan pada kaca objek. Lalu ditutup dengan kaca objek lain, setelah itu diamati apakah basis tersebut homogen dan halus merata (Saputra *et al.*, 2019).

10.3 Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan menimbang 200 mg sediaan masker *peel off*, kemudian diletakkan pada kaca objek kemudian tutup dengan kaca objek lain, setelah itu diberi beban 1 kg dalam 5 menit, beban diambil dan kedua kaca objek ditarik dengan beban 80 gram dan dicatat waktu kedua kaca objek dapat lepas. (Saputra *et al.*, 2019). Nilai daya lekat yang baik pada sediaan adalah tidak kurang dari 4 detik.

10.4 Uji daya sebar. Uji daya sebar dengan menimbang 500mg sediaan, kemudian diletakkan pada tengah kaca yang berukuran 20x20 cm, kemudian ditutupi dengan mika dan ditambahkan pemberat yang diletakkan diatasnya hingga bobot 200 gram, selanjutnya diukur dan dicatat diameter terbentuk

setelah 1 menit. Syarat diameter daya sebar yang baik adalah 5-7 cm (Saputra *et al.*, 2019).

10.5 Pengukuran pH. Tujuan pengukuran pH adalah untuk mengetahui tingkat keasaman masker dan mengetahui pH masker sudah sesuai dengan pH kulit terutama kulit wajah (Andini *et al.*, 2017). Pengukuran dengan alat pH meter. Dimulai dengan melakukan kalibrasi pH meter terlebih dahulu pada pH netral yaitu pada pH 7 dan pH asam yaitu pada pH 4. Kemudian elektroda dibilas menggunakan *aquades* sebelum dan setelah digunakan untuk pengukuran. Sediaan masker ditimbang 1 gram lalu diencerkan menggunakan *aquadest* hingga 100 mL, kemudian larutan tersebut diambil dan dimasukkan kedalam pH meter. Hasil pengukuran akan muncul pada layar setelah beberapa saat. (Pratiwi *et al.*, 2018). Nilai pH sediaan yang baik adalah sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5-6,5.

10.6 Pengukuran Viskositas. Pengujian menggunakan alat viskometer RION VT-04F. Menimbang 100 g masker *peel off* kemudian dimasukkan dan diukur dengan alat viskometer secara langsung menggunakan *spindle* nomor yang sesuai. Nilai viskositas dapat dilihat pada skala yang ada pada alat setelah mencapai angka yang stabil (Andini *et al.*, 2017). Syarat viskositas sediaan gel yang baik adalah 50-1000 dPas.

10.7 Uji waktu mengering. Tujuan dilakukan uji ini yaitu untuk mengetahui lamanya sediaan masker dapat mengering pada lapisan kulit dan membentuk lapisan film (Ariani & Wigati, 2009). Meletakkan 0,2 gram sediaan masker di *object glass* dan dioleskan secara merata sehingga membentuk lapisan tebal 1mm. Kemudian ditunggu sampai kering dan dapat dikelupas, setelah itu mencatat waktu yang dibutuhkan sediaan mengering dari mengoleskan sediaan hingga dapat dikelupas (Fauziah *et al.*, 2020).

10.8 Uji stabilitas sediaan masker *peel off*. Uji *cycling test* digunakan untuk mengetahui stabilitas sediaan. Uji ini dilakukan sebanyak 6 siklus dengan menyimpan sediaan masker *peel off* pada suhu 4 °C selama 24 jam, kemudian dipindahkan kedalam oven pada suhu 40 °C selama 24 jam. Waktu selama penyimpanan dua suhu dianggap 1 siklus. Lalu mengamati adalanya

perubahan warna, bau, dan tekstur dari sediaan masker (Luthfiyana *et al.*, 2019).

11. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

11.1 Identifikasi goresan pada *Manitol Salt Agar (MSA)*. Menginokulasikan bakteri dengan jarum ose ke media MSA, kemudian diinkubasikan dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam. Apabila hasil positif *Staphylococcus epidermidis* dengan tidak terjadinya perubahan warna yaitu dari merah menjadi kuning pada media yang digunakan karena bakteri *Staphylococcus epidermidis* tidak dapat memfermentasikan manitol (Toelle & Lenda, 2014)

11.2 Pewarnaan Gram. Tujuan pewarnaan gram yaitu untuk mengidentifikasi morfologi dan sifat gram dari bakteri yang diamati yaitu bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan menggunakan mikroskop. Cara yang harus dilakukan adalah dengan meletakkan *aquadest* steril pada kaca objek kemudian inokulasikan bakteri yang telah diinkubasi diatas kaca objek menggunakan jarum ose, kemudian dilebarkan dan difiksasi diatas api. Kaca objek yang telah diinokulasikan dengan bakteri kemudian ditambahkan kristal violet sebanyak 3-5 tetes, didiamkan 5 menit lalu dibilas dengan air mengalir kemudian dikeringkan, setelah itu ditambahkan lugol kemudian didiamkan 1 menit bilas kembali dengan air mengalir kemudian dikeringkan, lalu ditetesi dengan alkohol dan didiamkan selama 20 detik dan dicuci kembali dengan air yang mengalir lalu dikeringkan, setelah itu meneteskan 2-3 tetes safranin dan didiamkan selama 1-2 menit, kemudian dicuci menggunakan air mengalir dan setelah itu dikeringkan. Tahap selanjutnya mengamati bentuk morfologi dan sifat bakteri menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100X. Hasil positif *Staphylococcus epidermidis* adalah terbentuknya warna ungu dan bentuk bulat bergerombol seperti anggur (Karimela *et al.*, 2018).

11.3 Identifikasi biokimia. Dua uji identifikasi biokimia adalah dengan uji katalase dan koagulase. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan larutan H₂O₂ keatas kaca objek, kemudian menginokulasikan 1 ose bakteri pada kaca objek. Hasil dapat diamati dengan terbentuknya gelembung atau tidak (Ibrahim *et al*, 2015). Apabila hasil positif *Staphylococcus epidermidis*

adalah dengan terbentuknya gelembung-gelembung pada kaca objek (Karimela *et al.*, 2018).

Uji koagulase dengan inokulasi koloni kedalam 2 mL BHI Broth dan diinkubasi pada suhu 35 °C selama 18 jam. Kemudian 0,2 mL inokulum dipindahkan kedalam tabung steril, menambahkan 0,5 mL koagulase plasma yang sudah ditambah EDTA. Setalah itu inkubasi kembali pada suhu 35 °C, mengamati tiap jam untuk melihat terbentuknya koagulan. Apabila hasil positif *Staphylococcus epidermidis* koagulan yang terbentuk cair dan jatuh bila tabung dibalik (Karimela *et al.*, 2018).

12. Pengujian Mikrobiologi Sediaan Masker *Peel Off*

12.1 Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus epidermidis*. Menyiapkan dahulu 1 tabung berisi standar baku larutan Mc Farland 0,5. Selanjutnya membuat suspensi bakteri uji dengan mengambil 1 Ose biakan murni, selanjutnya dimasukkan kedalam tabung yang berisi 5 mL NaCl 0,9% lalu dihomogenkan, setelah itu menyetarkan suspensi bakteri tersebut dengan larutan standar Mc Farland 0,5 (Nurhayati *et al.*, 2020).

12.2 Pembuatan standar kekeruhan Mc Farland 0,5.

Larutan baku Mc Farland terdiri atas larutan BaCl 1% dan larutan asam sulfat 1%. Pembuatan standar MC Farland dapat dilakukan dengan dengan mencampurkan 0,05mL larutan BaCl 10% dengan asam sulfat 1% sebanyak 9,95 mL, kemudian dikocok hingga tercampur sempurna. Nilai absorban larutan baku Mc Farland 0,5 setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL suspensi bakteri (Toy *et al.*, 2015)

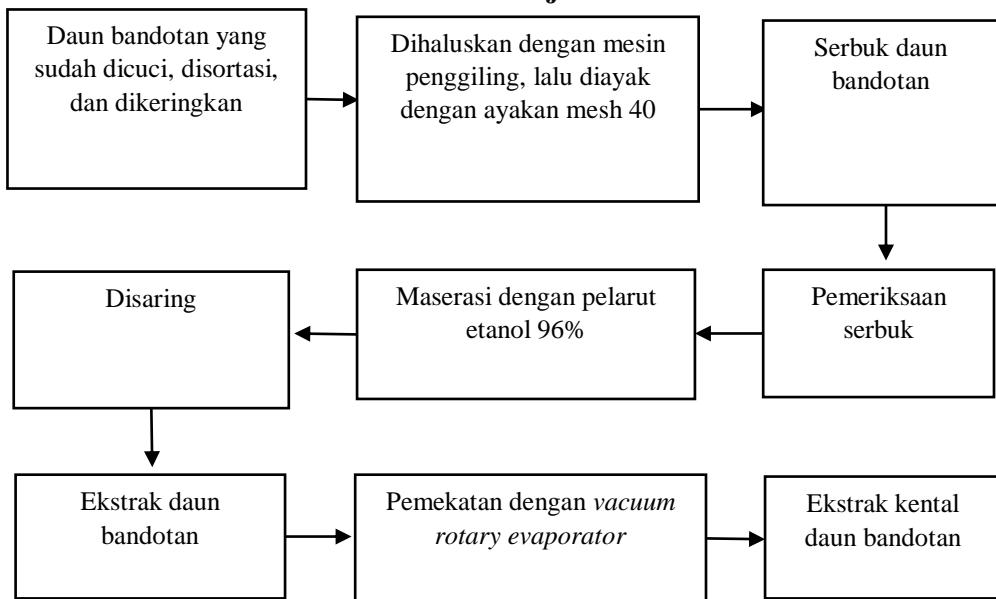
12.3 Uji aktivitas antibakteri. Metode untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi sumuran. Hasil uji aktivitas antibakteri dapat diketahui dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk yaitu bagian yang tidak ditumbuhgi oleh bakteri yang ditandai terbentuknya daerah bening/jernih disekitar lubang sumuran. Pengujian dengan menggunakan formula masker *peel off* formula 1 hingga 5. Suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* diinokulasikan secara merata diatas media *Muller Hinton Agar* (MHA) dengan menggunakan swap kapas steril. Media MHA yang sudah diinokulasikan dengan bakteri dibuat sumuran dengan menggunakan *boor prop* steril dengan menempelkannya sampai terbentuk lubang sumuran. Tiap

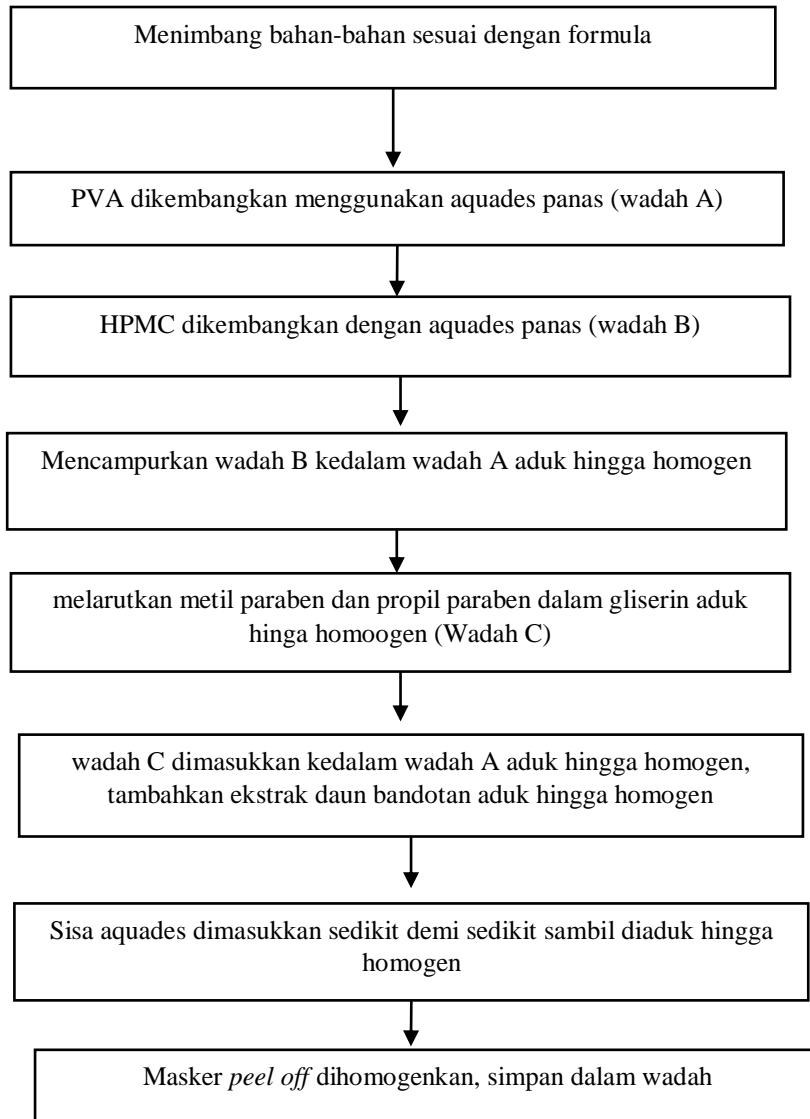
cawan petri dibuat beberapa lubang sumuran, cawan petri I dibuat 5 lubang dan cawan petri II 2 lubang. Kemudian memipet 50 μL pada masing-masing sampel (formula masker *peel off*) dan kemudian diteteskan ke lubang sumuran tersebut, kemudian inkubasi pada suhu 37 °C dalam inkubator selama waktu 24 jam, kemudian mengukur diameter zona hambatnya secara manual menggunakan penggaris atau jangka sorong (Saputra *et al.*, 2019).

E. Analisis Data

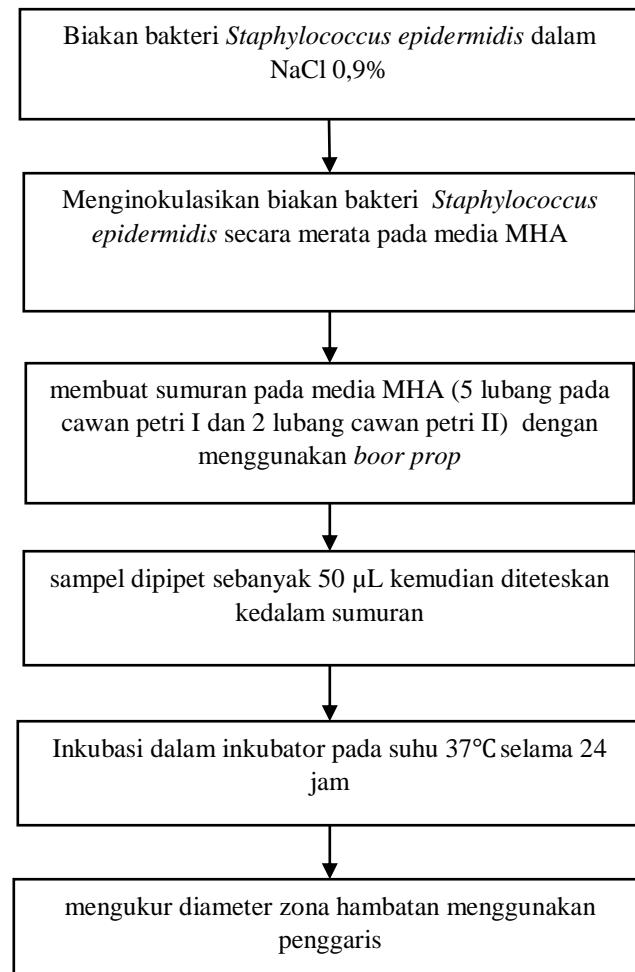
Data hasil uji mutu fisik sediaan masker *peel off* yaitu uji pH, viskositas, daya lekat, uji daya sebar, uji waktu mengering dianalisis secara statistik dengan *software* SPSS 26 untuk mengetahui adanya perbedaan dari kelima formula sediaan yang dibuat. Analisis dengan melakukan uji *one way* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% apabila terdistribusi normal $p>0,05$ dan apabila tidak terdistribusi normal $p<0,05$ maka dilanjutkan dengan melakukan uji *kruskal wallis* dan dilanjutkan dengan uji *mann whitney*, sedangkan untuk hasil uji stabilitas pada setiap formula dianalisis dengan menggunakan uji *Paired t-test* (Andini *et al.*, 2017).

Hasil uji aktivitas antibakteri yaitu diameter zona hambat dianalisis secara statistik dengan menggunakan *software* SPSS 26. Analisis dengan uji *one way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% jika data terdistribusi normal ($p>0,05$) kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc tukey* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu sampel dengan sampel lainnya. Jika hasil tidak terdistribusi normal ($p<0,05$) dilanjutkan dengan uji *kruskal wallis* dan kemudian dilanjut dengan uji *mann whitney* (Mayefis *et al.*, 2020).

F. Skema Uji**Gambar 9. Pembuatan ekstrak kental daun bandotan**



Gambar 10. Pembuatan masker *peel off* ekstrak daun bandotan



Gambar 11. Skema Uji Aktivitas Antibakteri