

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah seluruh individu yang menjadi sumber pengambilan sampel. Populasi dalam penelitian ini adalah sediaan *clay mask* ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) dengan variasi konsentrasi kaolin sebagai basis.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi yang digunakan pada penelitian. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan *clay mask* ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) dengan variasi konsentrasi kaolin sebagai basis 30% ; 32% ; dan 34%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama adalah ekstrak daun beluntas dalam sediaan *clay mask* sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Variabel utama yang kedua adalah konsentrasi kaolin pada *clay mask* ekstrak daun beluntas yakni 30%, 32%, dan 34% sebagai basis sediaan *clay mask*.

Variabel utama yang ketiga adalah daya hambat sediaan *clay mask* ekstrak daun beluntas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat dikelompokkan menjadi berbagai macam jenis variabel yakni variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang dimungkinkan untuk diubah-ubah untuk mengetahui bagaimana hal itu mempengaruhi variabel tergantung. Jumlah kaolin yang ada dalam sediaan *clay mask* ekstrak daun beluntas merupakan variabel bebas dalam penelitian ini.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempunyai aspek terkontrol dan berdampak pada variabel tergantung. Formulasi *clay mask*, proses yang dipakai untuk membuatnya, kondisi peralatan, bahan yang digunakan di laboratorium, dan kondisi percobaan adalah seluruh contoh variabel terkontrol di penelitian ini.

Variabel tergantung penelitian adalah sumber permasalahan. Kemampuan uji penghambatan dan efektivitasnya terhadap bakteri ketika menggunakan ekstrak etanol duan beluntas, juga kualitas fisik sediaan *clay mask*, termasuk organoleptis, homogenitas, viskositas, pH, waktu kering, daya sebar, daya lekat, adalah variabel yang bergantung di penelitian ini.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun beluntas diperoleh dari tanaman beluntas yang terdapat di pucuk, berwarna hijau muda dan masih segar diambil dari milik warga Mojosoongo, Jebres, Surakarta.

Kedua, ekstrak etanol yang terbuat dari daun beluntas dibuat dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, dari metode tersebut daun beluntas akan diambil ekstrak etanolnya.

Ketiga, kaolin dikombinasikan dengan ekstrak daun beluntas guna membuat sediaan semi padat yang dikenal dengan nama *clay mask*.

Keempat, bakteri uji penelitian yakni *Staphylococcus aureus* ATCC 25933 didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNS

Kelima, metode difusi dipakai dalam penelitian ini guna mengevaluasi aktivitas antibakteri. Ekstrak etanol duan beluntas 8% dengan konsentrasi kaolin yang berbeda, menggunakan metode difusi padat sumuran.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain toples maserasi, timbangan analitik (*OHAUS®*), gelas beker (*pyrex®*), *rotary evaporator* (*cole parmer®*), blender, pH meter (*OHAUS®*), viscotester RION VT-06®, set alat uji daya lekat, set alat uji daya sebar, erlenmeyer (*pyrex®*), tabung reaksi (*pyrex®*), rak tabung reaksi, penjepit, corong pisah, kurs porselen, desikator, set alat sterling bidwell, ayakan 40 *mesh*, penangas air (*matrix®*), inkubator (*memmert®*), oven (*memmert®*), pipet tetes, bunsen, mikroskop (*olympuscx21®*), *hotplate stirrer* (*thermo®*), cawan petri, kaca objek, mortir, stamper, batang pengaduk, spatel, sendok tanduk, kulkas (*informa®*), cawan petri kecil, cawan petri besar, *stopwatch*, autoklaf, ose bulat, *boorprop*, mikropipet, *yellow tip*, jangka sorong, vortex, standar Mc Farland, kapas lidi.

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah daun beluntas (*Pluchea indica*) yang diambil dari daerah Mojosoongo, Surakarta. Etanol 70% (Cipta Kimia). Reagen yang diperlukan antara lain HCl 2%, reagen *Dragendorff*, reagen Mayer, serbuk Mg, HCl pekat, HCl 2N, FeCl₃ 1%. Bahan untuk formula *clay mask* terdiri dari kaolin (Cipta Kimia), bentonite (Cipta Kimia), xanthan gum (Cipta Kimia), Gliserin (Cipta Kimia), Aquadest (AH Chemical), TiO₂ (Cipta Kimia) Nipagin (AH Chemical). Bahan untuk uji aktivitas antibakteri biakan *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNS, media MHA, Clindamycin phosphate (*Medi-klin*®), toluene (AH Chemical), media VJA, kalium telurit 1%, H₂O₂ 3%, reagen *staphaurex*, kristal violet, *lugol's iodine*, etanol 96%, safranin, NAmiring, NaCl, dimethyl sulfoxide (DMSO) (AH Chemical).

D. Jalannya Penelitian

1. Pengambilan sampel daun beluntas

Sampel daun beluntas pada penelitian ini di ambil dari milik warga Mojosoongo, Surakarta. Bagian daun beluntas yang digunakan adalah daun yang masih muda bagian pucuk, biasanya masih berwarna hijau muda. Kandungan senyawa fitokimia pada daun beluntas muda lebih banyak dari pada daun yang telah tua (Hafsari *et al.*, 2015).

2. Determinasi daun beluntas

Beluntas dideterminasi di UPT Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi bertujuan untuk menetapkan keaslian dan kebenaran sampel yang akan digunakan dalam penelitian. Bagian tumbuhan yang digunakan untuk uji determinasi adalah seluruh bagian tumbuhan mulai dari akar, batang, dan daun.

3. Pembuatan serbuk

Daun beluntas yang diperoleh disortasi dan dicuci bersih untuk membersihkan kotoran dan kontaminasi yang melekat pada daun beluntas. Tahapan pengeringan diterapkan dengan cara dikeringkan dalam oven pada temperatur 45°C untuk mengurangi kadar air dan menghilangkan aktivitas enzim yang mampu menguraikan zat aktif sehingga pertumbuhan mikroorganisme terhambat. Daun beluntas yang sudah kering dihaluskan dengan *grinder* untuk menghaluskan simplisia daun beluntas menjadi bentuk serbuk dan diayak dengan ayakan no. 40 (Fitria, 2022).

4. Identifikasi serbuk daun beluntas

4.1. Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis serbuk daun beluntas meliputi pemeriksaan terhadap warna, bau, dan rasa dari daun beluntas. Pemeriksaan organoleptis bertujuan untuk mengetahui serbuk simplisia secara fisik dengan pengamatan panca indera.

4.2. Pemeriksaan susut pengeringan. *Moisture balance* adalah alat yang digunakan untuk pemeriksaan susut pengeringan serbuk daun beluntas ini. Langkah pertama serbuk simplisia sebanyak 2 gram ditimbang secara seksama, diletakkan pada wadah yang sudah ditara. Kemudian alat dioperasikan pada suhu 105°C ditunggu hingga muncul nilai susut pengeringan pada alat dengan satuan persen (%). Hasil susut pengeringan yang baik adalah tidak lebih dari 10% (Fitria, 2022).

4.3. Pemeriksaan kadar air. Penentuan kadar air dilakukan dengan serbuk simplisia daun beluntas sebanyak 20 gram dimasukkan labu alas bulat lalu toluen 150 mL yang telah dijenuhkan dengan aquades 15 mL dimasukkan. Alat *Bidwell-Sterling* lalu dipasang dan dengan api kecil dipanaskan, jika sudah tidak ada air yang menetes lagi pada tabung skala *receiver*, pemanasan dihentikan kemudian skala air yang telah terdestilasi dibaca (Agustin *et al.*, 2018).

5. Pembuatan ekstrak daun beluntas

Menurut Farmakope Herbal Indonesia 2017, pembuatan ekstrak dilakukan dengan serbuk kering simplisia dimaserasi menggunakan pelarut yang sesuai. Pelarut yang digunakan adalah pelarut yang mampu menyari sebagian besar metabolit sekunder yang terkandung pada serbuk simplisia, digunakan etanol 70% LP apabila dinyatakan lain dalam monografi. Serbuk kering simplisia 800 gram dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan 8 liter pelarut etanol 70%. Perendaman selama 6 jam awal dilakukan sambil diaduk sesekali, lalu selama 18 jam didiamkan. Maserat dipisahkan dengan cara penyaringan dengan corong buchner dan kertas saring. Proses penyarian diulangi sekurangnya satu kali dengan jenis pelarut serupa dan volume pelarut sebanyak setengah kali volume pelarut saat penyarian awal. Semua maserat dikumpulkan, lalu diuapkan dengan *rotary evaporator* suhu 50 °C sampai didapat ekstrak kental. Rendemen yang didapat dihitung, yakni presentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot serbuk simplisia yang digunakan dengan penimbangan. Rendemen harus mencapai nilai sekurangnya sebagaimana disyaratkan pada monografi ekstrak yaitu 8,3% (Depkes RI, 2017).

6. Penetapan persentase rendemen

Rendemen ekstrak bisa dihitung dengan cara jumlah bobot ekstrak yang diperoleh (gram) terhadap jumlah bobot simplia awal (gram) yang hasilnya dinyatakan dalam persen (%). Persyaratan hasil rendemen harus sesuai dengan masing-masing monografi ekstrak (Depkes RI, 2017). Rendemen ekstrak daun beluntas dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\%$$

7. Identifikasi ekstrak daun beluntas

7.1. Uji organoleptis. Uji organoleptis dilakukan untuk mengetahui ekstrak secara fisik dengan dengan pengamatan panca indera yang meliputi bentuk, bau, warna, tekstur sehingga mendapat deskripsi visual dari ekstrak. Pada penelitian ini ekstrak yang diperoleh diamati bentuk, warna, dan bau (Safitri *et al.*, 2018).

7.2. Uji susut pengeringan. Penentuan kadar susut pengeringan dilakukan dengan 0,5 gram ekstrak ditimbang dalam cawan alumunium dangkal yang telah dipanaskan sebelumnya dengan suhu 105 °C dan telah ditara. Ekstrak diratakan dalam cawan timbang, lalu dimasukkan ke dalam ruang pengering *moisture balance*, lalu ditutup alat, dan dikeringkan pada suhu penetapan hingga alat membaca secara otomatis (Fitria, 2022).

7.3. Uji bebas etanol ekstrak daun beluntas. Identifikasi bebas etanol ekstrak dilakukan dengan cara sampel dimasukkan tabung reaksi, lalu ditambahkan asam asetat dan asam sulfat lalu dipanaskan. Ekstrak apabila sudah tidak ada aroma ester yang khas dari etanol maka dinyatakan telah bebas etanol (Rasyid dan Amody, 2020).

7.4. Uji kadar sari larut etanol. Filtrat maserasi sejumlah 20 mL diuapkan hingga kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan dan ditara. Sisa sari dari etanol dipanaskan pada suhu 105 °C hingga diperoleh bobot tetap (Ginting dan Siregar, 2022). Menurut FHI 2017 kadar sari larut etanol tanaman beluntas tidak kurang dari 5,0%.

7.5. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun beluntas

7.5.1. Identifikasi alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara 1 ml ekstrak daun beluntas dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sebanyak 1,5 ml HCl 2% dibagi sama rata ke dalam tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 2-4 tetes reagen *dragendorff*,

hasil positif mengandung alkaloid jika terdapat keruhan atau endapan coklat. Tabung kedua ditambahkan 2-4 tetes reagen Mayer, ekstrak positif alkaloid bila terbentuk endapan putih kekuningan (Depkes RI, 1977).

7.5.2. Identifikasi flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara 5 ml ekstrak daun beluntas ditambah air panas sebanyak 2 ml dan dididihkan selama 5 menit. Filtrat disaring kemudian sebanyak 5 ml ditambahkan serbuk Mg sebanyak 0,05 mg dan HCl pekat 1 ml. Campuran tersebut dikocok kuat, hasil flavonoid positif ditandai terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga (Depkes RI, 1995).

7.5.3. Identifikasi saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan cara 5 ml ekstrak daun beluntas dimasukkan tabung reaksi lalu ditambahkan 2 tetes HCl 2 N. Ekstrak positif mengandung saponin bila terbentuk busa selama 7 menit (Depkes RI, 1995).

7.5.4. Identifikasi tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan 1 ml ekstrak beluntas dimasukkan tabung reaksi lalu ditambah 3 tetes pereaksi FeCl_3 1%. Hasil tanin positif ditandai terbentuknya warna hijau violet atau hijau kehitaman (Depkes RI, 1977).

8. Uji pendahuluan ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*)

Uji pendahuluan ekstrak daun beluntas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan untuk mengetahui daya hambat ekstrak terhadap bakteri tersebut. Konsentrasi ekstrak dengan daya hambat yang paling baik akan dipilih sebagai konsentrasi ekstrak dalam sediaan *clay mask*. Konsentrasi ekstrak yang diujikan adalah sebesar 4%, 6%, dan 8%. Pengujian ini menggunakan difusi sumuran karena daya hambat yang dihasilkan ekstrak akan berdifusi tidak hanya di permukaan tetapi hingga ke bawah. Ekstrak sebanyak 8 gram diencerkan dengan DMSO 10% ad 100 mL untuk memperoleh ekstrak konsentrasi 8% kemudian diencerkan lagi untuk memperoleh ekstrak 6% dan 4%. Zona hambat yang dihasilkan diukur dengan jangka sorong digital dan dianalisis dengan SPSS *One Way ANOVA* untuk melihat signifikansi hasil dan penentuan konsentrasi yang digunakan dalam sediaan. DMSO 10% digunakan sebagai pelarut dan kontrol negatif karena merupakan pelarut yang mampu melarutkan senyawa polar dan non polar, bersifat tidak toksis, dan tidak memengaruhi aktifitas antibakteri yang diujikan (Rahmi dan Putri, 2020).

9. Formulasi *clay mask* ekstrak daun beluntas

Tabel 1. Formulasi *Clay Mask* Ekstrak Daun Beluntas

Bahan	Formula (%)			Fungsi
	F1	F2	F3	
Ekstrak daun beluntas	8	8	8	Zat aktif
Kaolin	30	32	34	Basis
Bentonit	4	4	4	Basis
Gliserin	8	8	8	Humektan
Xanthan gum	1	1	1	<i>Suspending agent</i>
TiO ₂	0,8	0,8	0,8	Bahan pigmen
Nipagin	0,5	0,5	0,5	Bahan pengawet
Aquadest	ad 100	ad 100	ad 100	Pelarut

Sediaan *clay mask* dibuat dalam formula 100 gram. Sebelum pencampuran, setiap bahan ditimbang terlebih dahulu. Langkah awal nipagin dilarutkan terlebih dahulu dengan sebagian aquades panas, kemudian larutan nipagin tersebut digunakan untuk melarutkan bentonit dan xanthan gum kemudian diaduk cepat hingga homogen sebagai campuran I. Campuran I ditambahkan kaolin perlahan dengan aquades sedikit demi sedikit sambil terus diaduk. Campuran I kemudian ditambahkan TiO₂, ditambah sisa aquades dan diaduk homogen. Ekstrak dilarutkan dengan gliserin sebagai campuran II, dicampurkan perlahan pada campuran I, lalu diaduk sampai terbentuk sediaan masker yang homogen (Ardhany *et al.*, 2022).

10. Uji mutu fisik *clay mask* ekstrak daun beluntas

10.1. Uji organoleptis. Uji organoleptik dilakukan untuk mengetahui ekstrak secara fisik dengan pengamatan panca indera agar mendapat deskripsi sediaan secara visual. Uji organoleptik dilakukan dengan mengamati karakteristik bau, warna, dan konsistensi sediaan *clay mask* (Fauziah, 2018).

10.2. Uji homogenitas. Uji homogenitas dilakukan dengan mengoleskan masker secara merata pada transparan, kemudian kaca diarahkan ke cahaya. Sediaan *clay mask* yang homogen ditandai oleh tidak adanya butiran-butiran kasar saat diuji dengan kaca transparan (Syamsidi *et al.*, 2021).

10.3. Uji pH. Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dicelupkan pada sediaan *clay mask*. Nilai pH *clay mask* baik apabila sesuai dengan pH kulit yaitu antara 4,5-6,5 (Sopianti dan Bulan, 2018).

10.4. Uji daya sebar. Uji daya sebar dilakukan dengan meletakkan sebanyak 1 g sediaan di pusat antara 2 kaca, kaca bagian atas diberi beban anak timbangan dengan bobot 150 g. Pengukuran dilakukan, hingga diameter penyebaran gel konstan setelah 1 menit. Daya sebar ideal sediaan masker yaitu 5-7 cm (Saputra *et al.*, 2019).

10.5. Uji daya lekat. Uji daya lekat dilakukan dengan sejumlah 300 mg *clay mask* diletakkan pada kaca objek dan ditutup dengan kaca objek lainnya kemudian ditekan dengan beban seberat 1 kg selama 1 menit. Beban diangkat, dan kaca objek dilepaskan dengan beban 80 gram kemudian catat waktu yang dibutuhkan kaca objek sampai terlepas. Waktu lepas yang baik adalah lebih dari 1 detik (Dipahayu dan Lestari, 2021).

10.6. Uji viskositas. Pengujian viskositas *clay mask* dilakukan dengan menggunakan alat visco tester RION® VT-06. Spindel yang digunakan adalah spindel nomor 2. Spindel kemudian dicelupkan ke dalam sediaan yang telah dituang dalam *cup viscotester* dengan kecepatan putar sebesar 20 rpm. Viskositas sediaan *clay mask* akan dapat terbaca pada layar monitor alat viskometer (Qur'aniati *et al.*, 2022). Nilai viskositas yang baik untuk sediaan *clay mask* adalah 4.000 cPs – 40.000 cPs (Syamsidi *et al.*, 2021).

10.7. Uji waktu kering sediaan. Uji waktu kering sediaan *clay mask* dilakukan dengan mengoleskan 0,7 gram sediaan dioleskan diatas kaca petri dengan area 5,0 x 2,5 cm dengan ketebalan 1 mm, kemudian dihitung kecepatan sediaan mengering menggunakan *stopwatch*. Waktu kering sediaan yang baik adalah 10-20 menit (Syamsidi *et al.*, 2021).

10.8. Uji stabilitas cycling test. Tujuan dilakukan uji stabilitas adalah mengetahui stabilitas sediaan setelah penyimpanan dengan suhu yang berbeda. Uji stabilitas dilakukan dengan menyimpan sediaan *clay mask* selama 12 hari (6 siklus) pada suhu $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam oven dengan suhu $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam pula (dihitung perlakuan 1 siklus). Perlakuan diulangi sebanyak 6 siklus (Febriani *et al.*, 2021). Pengamatan kemudian dilakukan terhadap parameter organoleptis (Fitria, 2022).

11. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

11.1. Identifikasi bakteri secara isolasi. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* diinokulasikan pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang dalam cawan petri sudah ditetesi 3 tetes kalium telurit 1% dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Hasil pengujian akan

menunjukkan warna koloni hitam dan warna medium di sekitar koloni berwarna kuning. Medium di sekitar koloni berwarna kuning karena *Staphylococcus aureus* mampu memfermentasi manitol membentuk suasana asam dan *fenol red*. *Staphylococcus aureus* mampu mereduksi telurit sehingga koloni akan berwarna hitam (Atikasari, 2019).

11.2. Identifikasi biokimia secara fisiologi. Uji biokimia bakteri dapat dilakukan dengan uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dilakukan dengan cara mengambil bakteri dengan ose secara aseptis, lalu digoreskan pada kaca objek, kultur mikroba lalu ditetesi 1-2 tetes H_2O_2 3% agar aktivitas katalase pada mikroba dapat diketahui, amati ada tidaknya gelembung gelembung kecil, bila terdapat gelembung maka bakteri tersebut merupakan bakteri katalase positif dan sebaliknya jika tidak ada gelembung termasuk bakteri katalase negatif (El-Viera *et al.*, 2017). Uji koagulase dilakukan menggunakan plasma darah manusia atau hewan sebanyak 5 mL. Plasma ditambahkan asam sitrat yang telah diencerkan (1:5) dan biakan bakteri *Staphylococcus aureus* 3-4 ose dalam tabung reaksi. Tabung reaksi kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C , dilakukan pengamatan pada 4 jam pertama dan yang terakhir 18-24 jam. Gumpalan yang terbentuk jika tetap berada di dasar tabung saat dimiringkan menunjukkan reaksi uji koagulase positif (Mahfudh, 2022).

11.3. Identifikasi pewarnaan Gram. Pewarnaan mikroba uji ialah prosedur memberi warna mikroba uji memakai zat warna yang mampu menonjolkan struktur tertentu dari mikroba uji yang diamati. Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan gram positif, maka diujikan pewarnaan gram. Hasil positif ditunjukkan dengan gambaran mikroskopik berbentuk batang tak teratur berwarna ungu (Acherman *et al.*, 2014). Fiksasi bakteri uji dilakukan untuk pewarnaan gram dan diwarnai dengan kristal violet dan didiamkan 5 menit. Zat warna kemudian dibuang dan diganti dengan larutan *lugol's iodine* (larutan I_2 dan KI) selama 45-60 detik dibiarkan. Larutan *lugol's iodine* dibuang dan sediaan dicuci dengan etanol 96% selama 30 detik atau digoyangkan sampai tak ada lagi zat warna yang mengalir. Sediaan dialiri air dan diwarnai dengan safranin dalam 1-2 menit. Sediaan dicuci, dikeringkan, dan diamati dibawah mikroskop. Bakteri gram negatif akan berwarna merah dan gram positif berwarna ungu.

12. Uji aktivitas antibakteri *clay mask* ekstrak daun beluntas

12.1. Pembuatan media MHA. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 3,8 gram dilarutkan dalam 100 mL aquades steril. Media hingga mendidih dipanaskan. *Stirer* dipakai untuk pengadukan guna memastikan media tersuspensi sempurna. Media setelah tersuspensi sempurna, pada suhu 121°C selama 15 menit kemudian diautoklaf, lalu ditunggu hingga suhu hangat (40°C-45°C). MHA yang telah siap, lalu kedalam cawan petri steril dituangkan sekitar 20 mL dengan tingkat permukaan horizontal untuk memberi kedalaman sama rata $\pm 0,5$ cm. Media akan memadat setelah didiamkan (Ngajow, 2013).

12.2. Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus*. Tujuan peremajaan bakteri ialah agar bakteri memulai metabolisme kembali sesudah penyiapan. Peremajaan mikroba uji dilakukan dengan metode gores, yaitu dengan cara mengambil biakan awal mikroba sebanyak satu ose lalu digoreskan pada media *Nutrient Agar* (NA) miring. Suhu dan waktu inkubasi yakni suhu 37°C selama 24 jam (Dewi *et al.*, 2019).

12.3. Pembuatan suspensi bakteri uji. Pembuatan suspensi berguna untuk menentukan jumlah bakteri dan membandingkan pada standar Mc. Farland 0,5 setara $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Biakan bakteri yang sudah tumbuh diambil satu ose kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi berisi NaCl sebanyak 5 ml yang selanjutnya tingkat kekeruhan dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5, kemudian digunakan sebagai bakteri uji (Fitria, 2022).

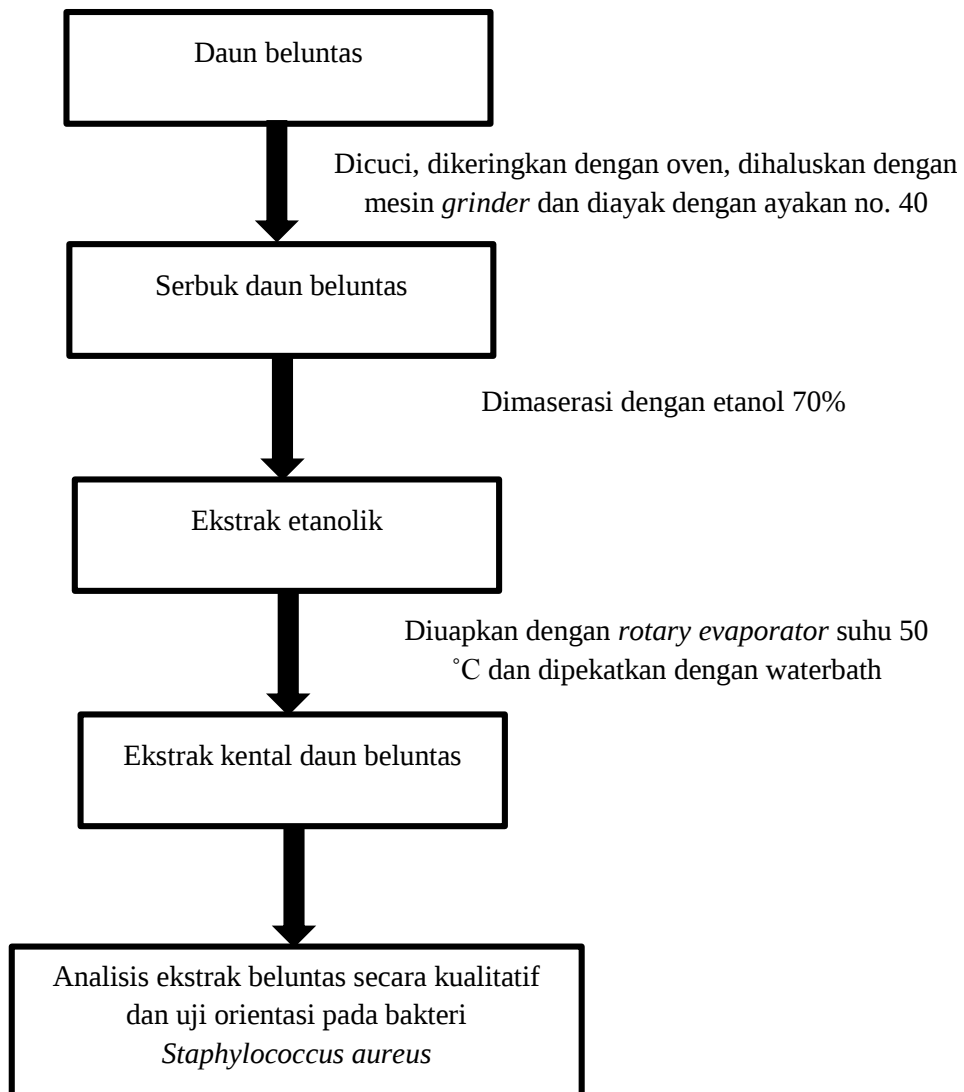
12.4. Uji aktivitas antibakteri. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi padat sumuran. Dibuat 7 lubang sumuran dengan boorprop, kemudian sebanyak 1 kapas lidi steril kultur bakteri yang sudah sesuai dengan larutan standar McFarland digores ke dalam media MHA yang telah memadat dan dilubangi. Setiap kelompok uji sebelum dimasukkan sumuran dilarutkan terlebih dahulu sebanyak 1 gram dengan DMSO 10% ad 2 mL. Masing-masing sumuran diisi penuh dengan kontrol positif berupa Mediklin® 1,2%, kontrol negatif berupa sediaan dengan basis 32% tanpa ekstrak, *clay mask* merk X, formula I, formula II, dan formula III, basis, dan DMSO 10% sebanyak 50 μ L dengan mikropipet, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditandai dengan adanya daerah bening di sekitar sumuran. Perlakuan uji dilakukan replikasi sebanyak 3x pada masing-masing sampel dan kontrol. Diameter zona bening yang terbentuk kemudian diukur jangka sorong digital.

E. Analisis Data

Data hasil pengujian pengaruh variasi konsentrasi basis kaolin 30%, 32%, dan 34% pada *clay mask* ekstrak daun beluntas dianalisis secara statistik dengan menggunakan SPSS uji *One Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%. Analisis dilakukan guna mengetahui adanya signifikansi perbedaan pada setiap data uji sifat fisik dan data uji daya hambat bakteri pada keempat formula *clay mask*. *One Way ANOVA* digunakan karena pengujian memiliki satu variabel bebas. *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney* yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi basis yang memiliki pengaruh berbeda atau sama antara satu dengan yang lain. Uji normalitas *Shapiro-wilk* dilakukan terlebih dahulu dengan nilai $\text{sig} > 0,05$ untuk menguji normalitas data. Selanjutnya uji homogenitas *Levene's test* untuk mengetahui homogenitas data dengan nilai $\text{sig} > 0,05$, apabila data telah terdistribusi normal dan homogen dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk menguji perbedaan rata-rata kelompok data diketahui dari uji *Post Hoc* Tukey. Apabila data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen ($\text{sig} < 0,05$) dilakukan uji *Kruskal Wallis* dilanjutkan uji *Post Hoc Mann Whitney*. Analisis data uji stabilitas menggunakan *Paired Sample T-Test* dan menggunakan uji non parametrik *Wilcoxon* bila data tidak terdistribusi normal.

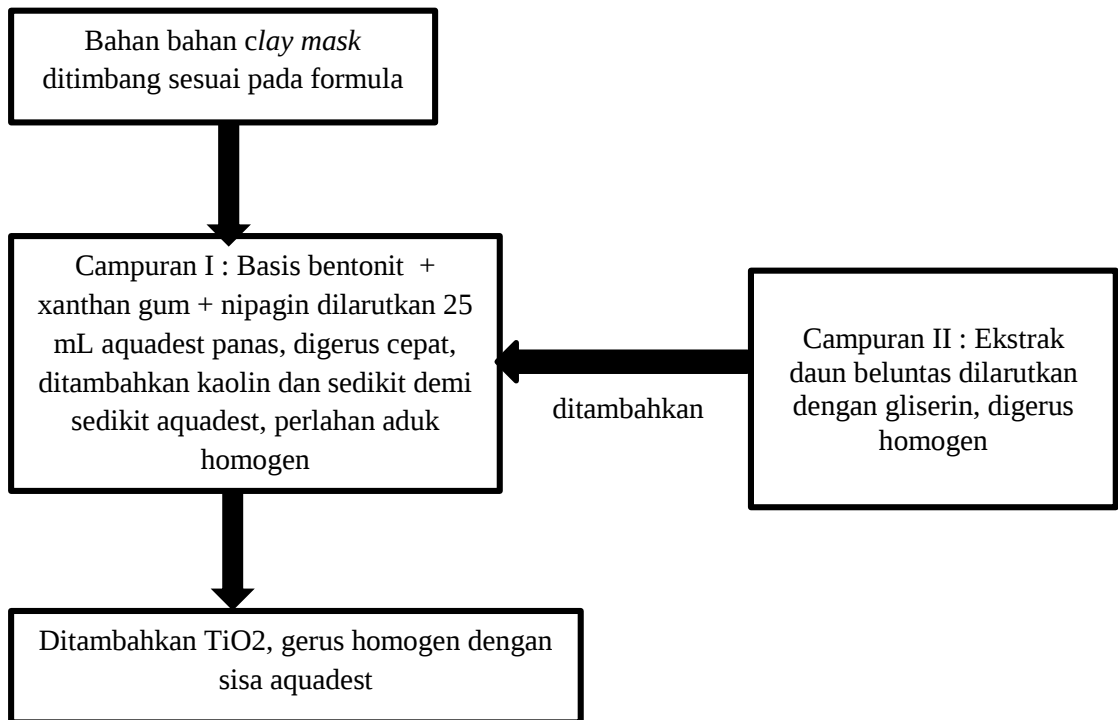
F. Skema Penelitian

1. Ekstrak daun beluntas



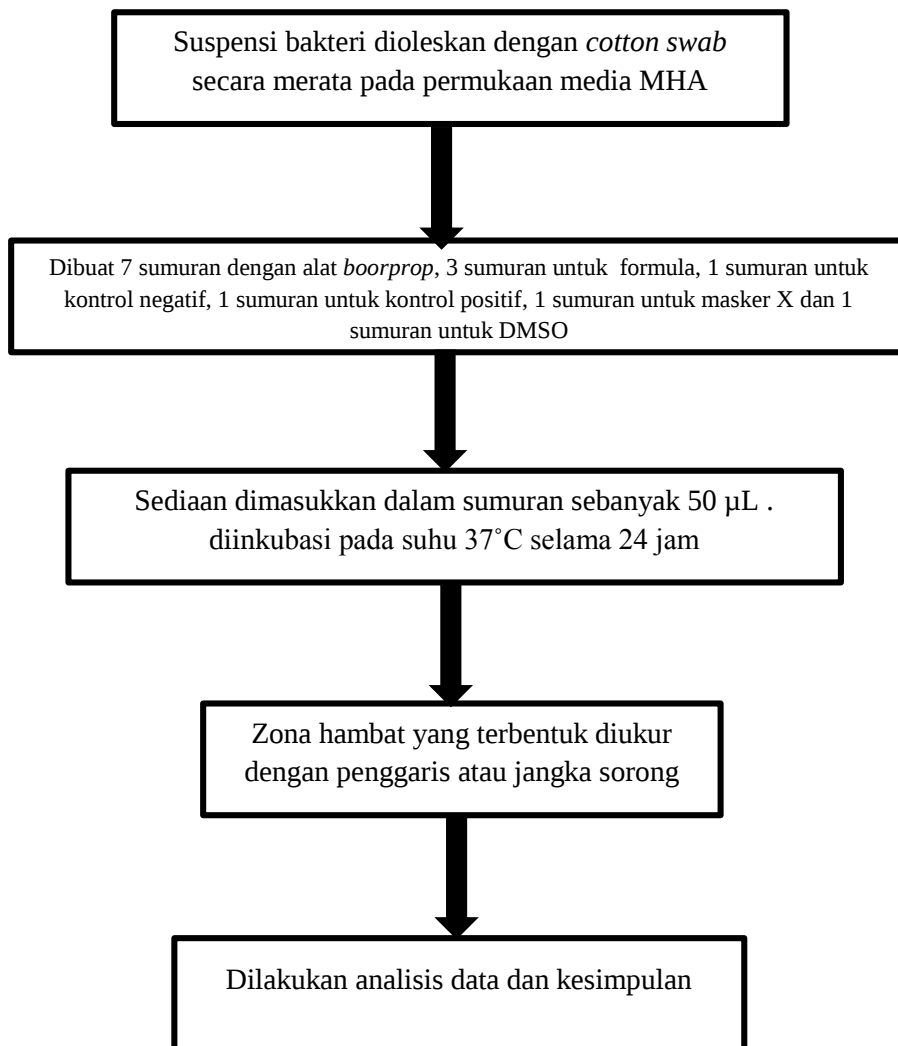
Gambar 4. Skema pembuatan ekstrak daun beluntas

2. Formulasi *clay mask* dengan ekstrak daun beluntas



Gambar 5. Skema formulasi *clay mask* ekstrak daun beluntas

3. Analisis diameter zona hambat formula *clay mask* ekstrak beluntas terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.



Gambar 6. Skema uji antibakteri *clay mask* ekstrak duan beluntas