

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah wilayah yang diteliti atas objek atau subyek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti (Sugiyono, 2015). Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.) memiliki ciri morfologis berupa bunga berwarna merah muda keputihan dengan gradasi kuning di bagian tengah yang beredar di Sukoharjo, Jawa Tengah pada bulan Januari 2025.

2. Sampel

Sampel merupakan objek yang diteliti dan dianggap mewakili seluruh populasi (Notoadmodjo, 2018). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.) dengan karakteristik merah, tidak busuk, tidak layu dan tidak cacat yang diambil secara acak yang beredar di Sukoharjo, Jawa Tengah pada bulan Januari 2025.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah formulasi sediaan *clay mask* ekstrak bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.).

Variabel utama yang kedua adalah, evaluasi sifat fisik *clay mask* ekstrak bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.).

Variabel utama yang ketiga adalah, aktivitas antibakteri *clay mask* ekstrak bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.)

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah didefinisikan terdahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali, variabel tergantung.

2.1. Variabel bebas, variabel bebas pada penelitian ini adalah perbandingan konsentrasi kaolin sebagai basis dari formula sediaan *clay mask* ekstrak bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.)

2.2 Variabel kendali, variabel kendali pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri *clay mask* ekstrak bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi

laboratorium (meliputi kondisi ruangan, alat dan bahan yang digunakan), media yang digunakan dalam penelitian, metode ekstraksi serta formula.

2.3. Variabel tergantung, Variabel tergantung meliputi mutu fisik serta kestabilan *clay mask* ekstrak bunga kamboja merah (*Plumeria rubra L.*) meliputi uji organoleptik, uji homogenitas, uji pH, uji viskositas, uji waktu kering, uji daya sebar, uji daya lekat, uji stabilitas, uji iritasi, dan uji tingkat kesukaan (hedonik).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bunga kamboja merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan tradisional. Kandungan tanaman pada bagian bunga memiliki senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid yang dapat digunakan sebagai antibakteri.

Kedua, ekstrak etanol bunga kamboja merah merupakan ekstrak yang diperoleh menggunakan metode maserasi dari bunga kamboja merah yang berasal dari daerah Sukoharjo, menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak bunga kamboja kemudian diuji aktivitas antibakteri dan diformulasikan menjadi *clay mask*.

Ketiga, kaolin merupakan basis *clay mask* yang dibuat variasi konsentrasi masing-masing kaolin 25%, 30%, dan 35%.

Keempat, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang digunakan untuk uji penghambatan suatu antibiotik suatu sediaan.

Kelima, uji aktivitas adalah pengujian untuk mengetahui kemampuan daya hambat sediaan *clay mask* ekstrak bunga kamboja merah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan metode dilusi yang ditandai tabung jernih sebagai konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) pada media yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri. Selanjutnya dilakukan uji dengan metode difusi cakram yang ditandai adanya zona bening di sekitar cakram.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini antara lain timbangan, oven, *grinding*, ayakan no 40, bejana maserasi, kain flannel, batang pengaduk, kertas saring, *rotary evaporator*, tabung reaksi, cawan petri, inkubator, jarum ose, kertas cakram kosong, *stamper*, *beaker glass*, *object glass*, pH meter, viscometer *Brookfield*, seperangkat alat uji daya sebar, seperangkat alat uji daya lekat seperti gelas objek, oven, mortir, autoklaf, bunsen, mikroskop dan wadah *clay mask*.

2. Bahan

Bahan utama yang digunakan bunga kamboja, etanol 70%. Reagen yang diperlukan antara lain HCl 2%, reagen Dragendorff, reagen Mayer, serbuk Mg, HCl pekat, HCl 2N, FeCl₃ 1%, asam asetat glasial, kloroform, media MHA, NA, VJA, BHI, pewarna Kristal violet, pewarna lugol iodine, *mc farland* 0,5. Bahan untuk formula *clay mask* antara lain terdiri dari bentonite, xanthan gum, kaolin, gliserin, DMDM *hydantoin*, akuadest, larutan dapar pH asam, larutan dapar pH netral.

D. Prosedur penelitian

1. Determinasi tanaman

Langkah awal dalam penelitian ini adalah melakukan proses determinasi tanaman guna memastikan keakuratan identitas sampel yang digunakan. Penetapan identitas tanaman didasarkan pada karakter morfologis dari tanaman kamboja. Prosedur determinasi ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.

2. Pengambilan sampel

Sampel berupa bunga kamboja diperoleh dari wilayah Sukoharjo, Jawa Tengah. Proses pengambilan bahan dilakukan dengan mempertimbangkan kualitas bunga, yakni dipilih bunga yang masih segar, tidak mengalami kerusakan, serta bebas dari serangan hama. Setelah dikumpulkan, bunga kamboja dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada permukaannya.

3. Pembuatan simplisia bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.)

Setelah dikumpulkan, bahan dicuci di bawah air mengalir untuk membersihkan sisa tanah dan kotoran lain yang menempel, kemudian ditiriskan hingga tidak ada air yang tersisa. Selanjutnya, bunga kamboja merah dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga diperoleh simplisia kering. Simplisia yang telah kering kemudian digiling menggunakan alat penghalus (*grinder*) hingga menjadi serbuk, lalu diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40 untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam.

3.1 Uji susut pengeringan serbuk simplisia. Pengujian susut pengeringan dilakukan untuk menentukan berkurangnya berat bahan akibat penguapan air selama proses pengeringan. Sebanyak 2 gram serbuk simplisia ditimbang dan dimasukkan ke dalam alat moisture

balance menggunakan wadah berbahan aluminium foil. Pengukuran dilakukan pada suhu 105°C hingga berat serbuk menjadi konstan, dan nilai susut pengeringan dapat ditentukan berdasarkan selisih berat sebelum dan sesudah pengeringan.

3.2 Penetapan kadar air serbuk bunga kamboja. Kadar air dalam serbuk bunga kamboja ditentukan menggunakan metode azeotropi dengan alat Sterling-Bidwell. Sebanyak 20 gram serbuk dimasukkan ke dalam labu, kemudian ditambahkan 200 mL toluen jenuh air. Labu dipanaskan secara hati-hati hingga air tidak lagi menetes ke dalam tabung berskala. Volume air yang tertampung dalam tabung skala digunakan untuk menghitung kadar air dalam persentase. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali ulangan (Kemenkes, 2017).

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{volume air destilasi (mL)}}{\text{bobot serbuk}} 100\%$$

4. Pembuatan ekstrak bunga kamboja (*Plumeria rubra* L.)

Proses ekstraksi dilakukan dengan menimbang 1.400 gram serbuk bunga kamboja, kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserator. Serbuk tersebut direndam menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan bahan terhadap pelarut sebesar 1:10. Perendaman dilakukan sambil diaduk sesekali selama 6 jam pertama, lalu didiamkan selama 18 jam. Setelah itu, maserat dipisahkan dari ampas dengan cara filtrasi. Proses maserasi diulangi satu kali lagi dengan pelarut yang sama, namun jumlah pelarut dikurangi menjadi setengah dari volume sebelumnya. Semua maserat yang diperoleh kemudian digabung dan diuapkan menggunakan Rotary Evaporator pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental (Farmakope Herbal Indonesia, 2017).

5. Karakterisasi Ekstrak bunga kamboja (*Plumeria rubra* L.)

5.1 Pemeriksaan organoleptis. Pemeriksaan organoleptis dilakukan untuk menilai karakteristik fisik ekstrak secara subjektif menggunakan pancaindra, meliputi bentuk, warna, dan bau. Ekstrak ditempatkan dalam wadah transparan dan diamati di bawah pencahayaan cukup. Warna dan bentuk diamati secara visual, sedangkan bau dinilai dengan mencium aroma dari jarak ± 5 cm tanpa menghirup secara langsung.

5.2 Uji kadar air ekstrak. Pengujian kadar air pada ekstrak dilakukan dengan metode gravimetri. Sebanyak 1 gram ekstrak bunga kamboja ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah yang telah ditara sebelumnya. Sampel kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama lima jam pertama dengan posisi penutup wadah dibuka.

Setelah itu, wadah dikeluarkan dari oven dan diletakkan dalam desikator selama 15 menit dalam kondisi tertutup agar mendingin. Selanjutnya, dilakukan penimbangan. Proses pemanasan dan penimbangan diulang setiap satu jam hingga tercapai bobot konstan, yaitu jika perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak melebihi 0,25% dari berat sebelumnya (Depkes RI, 2000). Pengujian dilakukan dalam tiga kali replikasi untuk mengurangi kemungkinan terjadinya kesalahan hasil.

5.3 Uji bebas etanol. Pengujian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan sisa etanol dalam ekstrak. Sebanyak 1 mL ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan masing-masing dua tetes asam sulfat (H_2SO_4) dan asam asetat. Campuran kemudian dipanaskan. Apabila tidak tercium bau khas ester, maka ekstrak tersebut dapat dinyatakan bebas dari kandungan etanol.

6. Skrinning Fitokimia ekstrak bunga kamboja

6.1 Identifikasi Flavonoid. Sebanyak 5 g serbuk simplisia ditimbang kemudian ditambahkan 100 mL air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Kedalam 5 mL filtrat ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1995).

6.2 Identifikasi Tanin. Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia diekstraksi menggunakan 10 mL air suling, kemudian disaring. Filtrat hasil penyaringan diencerkan dengan air hingga tidak berwarna. Dari larutan tersebut, diambil 2 mL dan ditambahkan 1 hingga 2 tetes larutan FeCl_3 . Reaksi positif terhadap tanin ditandai dengan munculnya warna biru tua atau hijau kehitaman (Depkes RI, 1995).

6.3 Identifikasi Saponin. Sebanyak 0,1 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL aquades, kemudian dipanaskan selama lima menit. Setelah itu, larutan disaring dan filtrat dikocok kuat-kuat. Timbulnya busa setinggi 1–10 cm yang stabil selama ± 10 menit serta tidak hilang setelah penambahan larutan HCl 2 N mengindikasikan adanya kandungan saponin (Depkes RI, 1995).

6.4 Identifikasi Alkaloid. Sebanyak 1 mL ekstrak bunga kamboja merah dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1,5 mL larutan HCl 2% dan dibagi ke dalam dua tabung berbeda. Pada tabung pertama ditambahkan 2–4 tetes reagen Dragendorff, dan

terbentuknya endapan coklat atau kekeruhan menunjukkan hasil positif alkaloid. Pada tabung kedua, setelah ditambahkan 2–4 tetes reagen Mayer, terbentuknya endapan putih kekuningan juga mengonfirmasi keberadaan alkaloid (Depkes RI 1977).

6.5 Identifikasi Terpenoid/Steroid. Sebanyak 1 gram ekstrak ditambahkan 1 mL kloroform, kemudian ditambahkan asam asetat glasial hingga seluruh sampel terendam. Larutan dibiarkan selama 15 menit, lalu diambil sebanyak 6 tetes dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2–3 tetes asam sulfat pekat secara perlahan. Warna merah, jingga, atau ungu menandakan adanya terpenoid, sedangkan warna biru menunjukkan keberadaan senyawa steroid.

7. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak etanol dari bunga kamboja merah (*Plumeria rubra* L.) dilarutkan dalam etanol 70%, lalu dilakukan analisis KLT dengan menggunakan kuersetin sebagai pembanding. Fase gerak yang digunakan terdiri atas campuran toluen p.a, etil asetat p.a, dan etanol p.a dengan perbandingan 3:3:0,5. Bercak kromatogram diamati di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, serta menggunakan pereaksi penampak bercak berupa AlCl_3 .

8. Uji Aktifitas Antibakteri

8.1 Sterilisasi. Semua peralatan yang akan dipergunakan harus dicuci hingga dalam keadaan bersih, kemudian dikeringkan. Labu ukur dan gelas ukur, ataupun alat yang terbuat dari kaca disterilkan selama 15 menit dalam autoklaf pada suhu 121°C . Bahan yang terbuat dari karet disterilkan terlebih dahulu dengan merendamnya dalam alkohol 70%. kemudian jarum ose dibersihkan dengan cara dipanaskan diatas bunsen atau lampu spiritus untuk mensterilkannya. Alat dengan bahan kaca non presisi yaitu seperti tabung reaksi. Erlenmeyer, dan beakerglass. ditutup mulutnya dengan kapas, sedangkan cawan petri dibungkus menggunakan kertas dan dioven pada suhu 160°C selama 2 jam (Pertiwi, 2010).

8.2 Pembuatan media. Media yang digunakan yaitu *Nutrient Agar* (NA), *Mannitol Salt Agar* (MSA), *Vogel Johnson Agar* (VJA), serta *Mueller Hinton Agar* (MHA). Masing- masing media memiliki kegunaannya yaitu media NA untuk peremajaan bakteri, MSA digunakan untuk media pada pengujian aktivitas antibakteri. Masing-masing media ditimbang sesuai dengan takaran yang tertera pada kemasan, lalu

ditambahkan aquadest. Campuran antara media dengan aquadest dihomogenkan dan dipanaskan di atas penangas air sampai mendidih sambil diaduk hingga terlarut sempurna. Masing-masing media dituang pada tabung reaksi, kemudian ditutup dengan kapas, dan dilakukan sterilitas dalam autoklaf selama 15 menit pada temperature 121°C. Tabung reaksi berisi media NA yang sudah disterilisasi, kemudian dibiarkan dalam temperature ruangan selama lebih kurang 30 menit hingga memadat dengan kemiringan 30°, diperhatikan media tidak mengenai tutup tabung.

8.3 Peremajaan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 1 jarum ose, kemudian digoreskan secara zig-zag didalam media NA dengan permukaan miring dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Nurchayanti *et al.*, 2011).

8.4 Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan mengambil satu ose koloni bakteri yang telah diremajakan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL larutan NaCl 0,9%. Larutan tersebut kemudian divortex selama beberapa detik hingga tercampur secara homogen, sehingga terbentuk suspensi bakteri yang siap digunakan untuk pengujian lebih lanjut.

8.5 Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Proses identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan melalui beberapa tahapan pengujian yang mencakup karakteristik koloni dan morfologi mikroskopis, yaitu:

8.5.1 Identifikasi berdasarkan koloni. Suspensi bakteri diinokulasikan pada media diferensial Vogel Johnson Agar (VJA) yang sebelumnya telah ditambahkan tiga tetes larutan kalium telurit ke dalam cawan petri. Setelah inokulasi, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan terbentuknya koloni berwarna hitam, yang mengindikasikan kemampuan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dalam mereduksi telurit menjadi bentuk logam. Warna kuning di sekitar koloni menunjukkan terjadinya fermentasi mannitol oleh bakteri tersebut (Jawetz *et al.*, 2007).

8.5.2 Identifikasi mikroskopis secara morfologi. Identifikasi mikroskopis dilakukan melalui pewarnaan Gram untuk menentukan sifat bakteri. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan larutan Gram A

(kristal violet sebagai pewarna utama), Gram B (iodium lugol sebagai mordan), Gram C (campuran etanol dan aseton dengan perbandingan 1:1 sebagai peluntur), dan Gram D (safranin sebagai pewarna kontras). Langkah pertama, preparat ulas dibuat dari suspensi bakteri dan difiksasi. Selanjutnya, ulasan ditetesi larutan Gram A hingga seluruh permukaan tertutup, kemudian didiamkan selama satu menit dan dicuci menggunakan air suling mengalir. Preparat lalu diberi Gram B dan didiamkan selama satu menit, setelah itu dibilas kembali. Tahap berikutnya adalah pelunturan dengan Gram C selama 30 detik, kemudian dicuci dan diberi Gram D selama satu menit sebagai pewarna penutup. Setelah tahap pencucian terakhir dan pengeringan, preparat diamati di bawah mikroskop. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dikategorikan Gram positif apabila tampak berwarna ungu di bawah mikroskop, dengan bentuk sel bulat dan tersusun berkelompok menyerupai rangkaian buah anggur.

8.5.3 Identifikasi fisiologis *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Dalam proses identifikasi secara fisiologis, terdapat dua uji yang dilakukan, yaitu :

a. Uji katalase. Pada uji katalase dilakukan dengan menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium nutrient cair dengan menggunakan Hidrogen peroksida (H_2O_2) sebanyak 3%. Keberhasilan uji katalase ditandai oleh adanya gelembung udara karena *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 memiliki enzim katalase. Sebagaimana H_2O_2 akan terurai menjadi H_2 dan O_2 , yang menghasilkan gelembung udara.

b. Uji koagulase. Uji koagulase dilakukan dengan menggunakan plasma darah kelinci yang sebelumnya telah diberikan asam sitrat dan diencerkan dengan perbandingan 1:5. Setelah itu, tambahkan 1 ose biakan bakteri, yang kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$. Tabung yang berisi campuran tersebut diperiksa apakah ada pembentukan gumpalan selama 1-4 jam. Hasil yang menunjukkan adanya koagulase yang kuat dapat dikonfirmasi ketika tabung tes dibalik, dan gumpalan plasma tetap melekat pada dinding tabung (Jawets *et al.*, 2007). Dengan demikian, dalam identifikasi fisiologis, dilakukan uji katalase untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghasilkan gelembung udara akibat reaksi enzim katalase terhadap H_2O_2 . Sementara uji koagulase digunakan untuk memeriksa kemampuan

bakteri dalam menggumpalkan plasma darah kelinci dengan menggunakan asam sitrat sebagai faktor koagulasi.

8.6 Pembuatan larutan uji. Larutan uji ekstrak bunga kamboja merah dengan konsentrasi 48% (b/v) dibuat dengan cara menimbang 4,8 gram ekstrak, kemudian melarutkannya menggunakan pelarut DMSO 10% hingga mencapai volume akhir 10 mL. Larutan DMSO 10% dibuat dengan cara mengambil 1 mL DMSO murni, kemudian ditambahkan aquadest hingga mencapai volume akhir 10 mL. Larutan dihomogenkan dan digunakan untuk pengujian selanjutnya.

9. Uji Aktifitas Antibakteri secara dilusi

Pada uji dilusi untuk menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari ekstrak tunggal bunga kamboja merah, pada uji dilusi ini menggunakan 8 seri konsentrasi tabung reaksi. Setiap seri tabung reaksi mengandung kontrol negatif berupa media BHI, kontrol positif berupa BHI dan suspensi bakteri, dengan pengenceran menurun yaitu 48%; 24%; 12%; 6%, 3%; 1,5%.

Tabung 1 adalah sebagai kontrol negatif berupa 1 mL BHI. Tabung 8 adalah kontrol positif yang berupa media BHI 1 mL dan 1 mL suspensi bakteri. Tabung nomor 2 berisi 1 mL BHI, 1 mL larutan uji, 1 mL suspensi bakteri. Tabung nomor 3 hingga 7 berisi 1 mL media BHI yang sudah steril. Tabung nomor 2 hingga nomor 7 dengan mengambil 1 mL pada tabung sebelumnya dan tabung nomor 7 dipipet 1 mL dan dibuang.

Tabung nomor 2 hingga nomor 7 masing-masing ditambahkan dengan 1 mL suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kemudian di homogenkan dengan di vortex. Pada 8 tabung seri konsentrasi diinkubasi selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Tabung yang menunjukkan hasil jernih digoreskan pada media VJA kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C, lalu diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri. Jika hasil tabung jernih dengan konsentrasi terendah maka dinyatakan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Sedangkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada media VJA tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri. Hasil KBM teraktif dengan konsentrasi terkecil akan digunakan untuk pengujian secara difusi.

10. Uji Aktifitas Antibakteri secara difusi cakram

Uji pendahuluan terhadap ekstrak bunga kamboja ini dilakukan dengan metode difusi cakram. Cawan petri ditandai sesuai kelompok uji masing-masing, media MHA dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL secara aseptis, kemudian suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasikan pada media MHA yang telah memadat menggunakan kapas lidi steril keseluruh permukaan media. Kertas cakram kosong berdiameter 6 mm direndam ± 15 menit dengan larutan ekstrak bunga kamboja dengan konsentrasi 3%, 6% dan 9% menggunakan pelarut DMSO 10%, kontrol negatif digunakan DMSO 10%, untuk kontrol positif menggunakan kertas cakram yang telah berisi antibiotik klindamisin. Kertas cakram yang berisi sampel, kontrol negatif dan kontrol positif diletakkan di atas media MHA menggunakan pinset steril, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram diukur diameternya menggunakan jangka sorong, zona bening yang terbentuk menandakan sampel dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

11. Formula Sediaan *Clay mask* Ekstrak etanol bunga kamboja

Tabel 1. Formula *clay mask* ekstrak bunga kamboja

Nama Bahan	Penimbangan Bahan						fungsi
	F1	F2	F3	K1	K2	K3	
Ekstrak etanol bunga kamboja	6	6	6	-	-	-	Zat aktif
Kaolin	25	30	35	25	30	35	Basis
Bentonite	1	1	1	1	1	1	Basis
Propilenglikol	8	8	8	8	8	8	Humektan
DMDM <i>hydatoin</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Xantan gum	1	1	1	1	1	1	<i>Suspending agent</i>
<i>aquadest</i>	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	Pelarut

Keterangan :

F1 : formula ekstrak bunga kamboja variasi kaolin 25%

F2 : formula ekstrak bunga kamboja variasi kaolin 30%

F3 : formula ekstrak bunga kamboja variasi kaolin 35%

K1 : formula kontrol negative tanpa ekstrak bunga kamboja variasi kaolin 25%

K2 : formula kontrol negative tanpa ekstrak bunga kamboja variasi kaolin 30%

K3 : formula kontrol negative tanpa ekstrak bunga kamboja variasi kaolin 35%

12. Pembuatan Sediaan *clay mask*

Sediaan *clay mask* dibuat dalam formula 100 gram tiap formula. Masing masing bahan ditimbang sesuai dengan formulanya. Bentonit dan DMDM *hydatoin* dilarutkan dalam air panas 10 mL kemudian diamkan selama 15 menit. Siapkan mortir, masukan bentonite dan DMDM *hydatoin* ke dalam mortir ditambahkan xantan gum digerus

hingga homogen. Kaolin dan gliserin di masukan ke dalam mortar sedikit demi sedikit sambil terus digerus hingga homogen. Ekstrak bunga kamboja dilarutkan dengan *aquadest* kemudian ditambahkan ke dalam mortar dan digerus sampai homogen. Sisa *aquadest* yang ada ditambahkan ditambahkan ke dalam mortir. Sediaan *clay mask* dimasukan ke dalam wadah yang sesuai. Langkah-langkah pembuatan *masker* ini diulangi untuk formula lainnya dengan menyesuaikan jumlah dari masing masing formula (Zainal *et al.* , 2023).

13. Uji mutu fisik *Clay mask* ekstrak buga kamboja merah

11.1 Uji Organoleptik. Uji organoleptik sediaan *masker* dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, bau, dan tekstur pada sediaan

11.2 Uji Homogenitas. Uji homogenitas dilakukan dengan cara sampel *clay mask* dioleskan sebanyak 1 gram pada kaca objek cocok, kemudian dikatubkan dengan kaca objek atau bahan transparan lainnya dan dilihat apakah basis sediaan halus dan permukaannya merata. Sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar. Uji dilakukan 3 kali, 3 kali replikasi (Wasiaturrahmah, 2018).

11.3 Uji pH. Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan alat pH neter pada pH netral yaitu 7. Elektroda dibilas mrnggunakan *aquadest* sebelum dan sesudah digunakan, kemudian elektroda dimasukan pada sediaan dan hasil dapat dibaca setelah angka pada pH meter stabil. Uji dilakukan 3 kali, 3 kali replikasi (Permatasari, 2021).

11.4 Uji Viskositas. Uji viskositas sediaan dilakukan dengan menggunakan alat *Viscometer Brookfield*, sediaan *masker* dimasukan ke dalam wadah, ukuran *spindle* yang digunakan disesuaikan, atur kecepatan 60 rpm alat dihidupkan dan viskositas akan terbaca pada alat viscometer Uji dilakukan 3 kali, 3 kali replikasi (Melian, 2018).

11.5 Uji Waktu Kering. Sediaan *masker* dioleskan pada punggung telapak tangan dengan luas area pengolesan 3x3 cm sebanyak 0,5 g sampai membentuk lapisan tipis seragam, hitung waktu sediaan sampai mengering. Uji dilakukan 3 kali, 3 kali replikasi.

11.6 Uji daya sebar. Untuk memastikan *clay mask* terdistribusi secara merata ketika dioleskan pada kulit, dilakukan uji daya sebar. Caranya adalah dengan mengambil *clay mask* sebanyak 0,5 gram lalu diletakkan di tengah kaca bundar yang sudah diberi skala. Kemudian,

kaca bundar lain atau benda bening lainnya beserta beban seberat 50, 100 dan 150 gram diletakkan di atas *clay mask*. Setelah didiamkan selama satu menit, diukur diameter area yang terisi oleh *clay mask*. Hasil yang ideal adalah diameter antara 2 hingga 5 sentimeter. Untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat, pengujian ini diulang sebanyak tiga kali untuk setiap jenis formula *clay mask*. Uji dilakukan 3 kali, 3 kali replikasi (Nastiti *et al.*, 2021).

11.7 Uji daya lekat. Sebanyak 0,5 gram masker dioleskan diatas gelas obyek. Diletakkan gelas obyek yang lain *clay mask* kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit, dicatat waktu hingga kedua gelas obyek terpisah. Syarat waktu daya lekat yang baik untuk sediaan topikal adalah adalah tidak kurang dari 4 detik. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (Permatasari, 2021).

14. Uji Stabilitas (*Cycling test*)

Stabilitas fisik masker diuji dengan metode *cycling test* yang dilakukan sebanyak enam siklus. Prosedur dimulai dengan menyimpan sediaan masker pada suhu rendah, yaitu $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, kemudian dipindahkan ke dalam oven bersuhu 40°C selama 24 jam berikutnya. Perpindahan suhu selama dua hari ini dihitung sebagai satu siklus. Setelah melalui enam siklus penyimpanan, masker diamati untuk menilai adanya perubahan karakteristik fisik, yang meliputi perubahan warna, aroma, konsistensi (bentuk) dari *clay mask*, nilai pH, daya sebar, serta waktu pengeringan (Nastiti *et al.*, 2021).

15. Uji Aktivitas Antibaktri *Clay mask*

Pengujian terhadap aktivitas antibakteri dari sediaan *clay mask* dilakukan dengan metode difusi cakram (*disc diffusion*) menggunakan media MHA (*Mueller Hinton Agar*), sesuai dengan prosedur yang diadaptasi dari Mawan *et al.* (2017). Langkah awal dimulai dengan memberi label pada cawan petri sesuai dengan masing-masing kelompok perlakuan. Selanjutnya, media MHA sebanyak 10 mL dituangkan secara aseptis ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Setelah media mengeras, suspensi bakteri diinokulasikan secara merata pada permukaan media menggunakan kapas lidi steril. Cakram kertas steril berdiameter 6 mm direndam dalam masing-masing formula *clay mask* (F1, F2, F3) selama kurang lebih 15 menit. Kontrol negatif berupa formula K1, K2, dan K3 terdiri dari *clay mask* tanpa penambahan ekstrak bunga kamboja, sedangkan kontrol positif menggunakan cakram yang telah mengandung klindamisin. Seluruh cakram kemudian ditempatkan

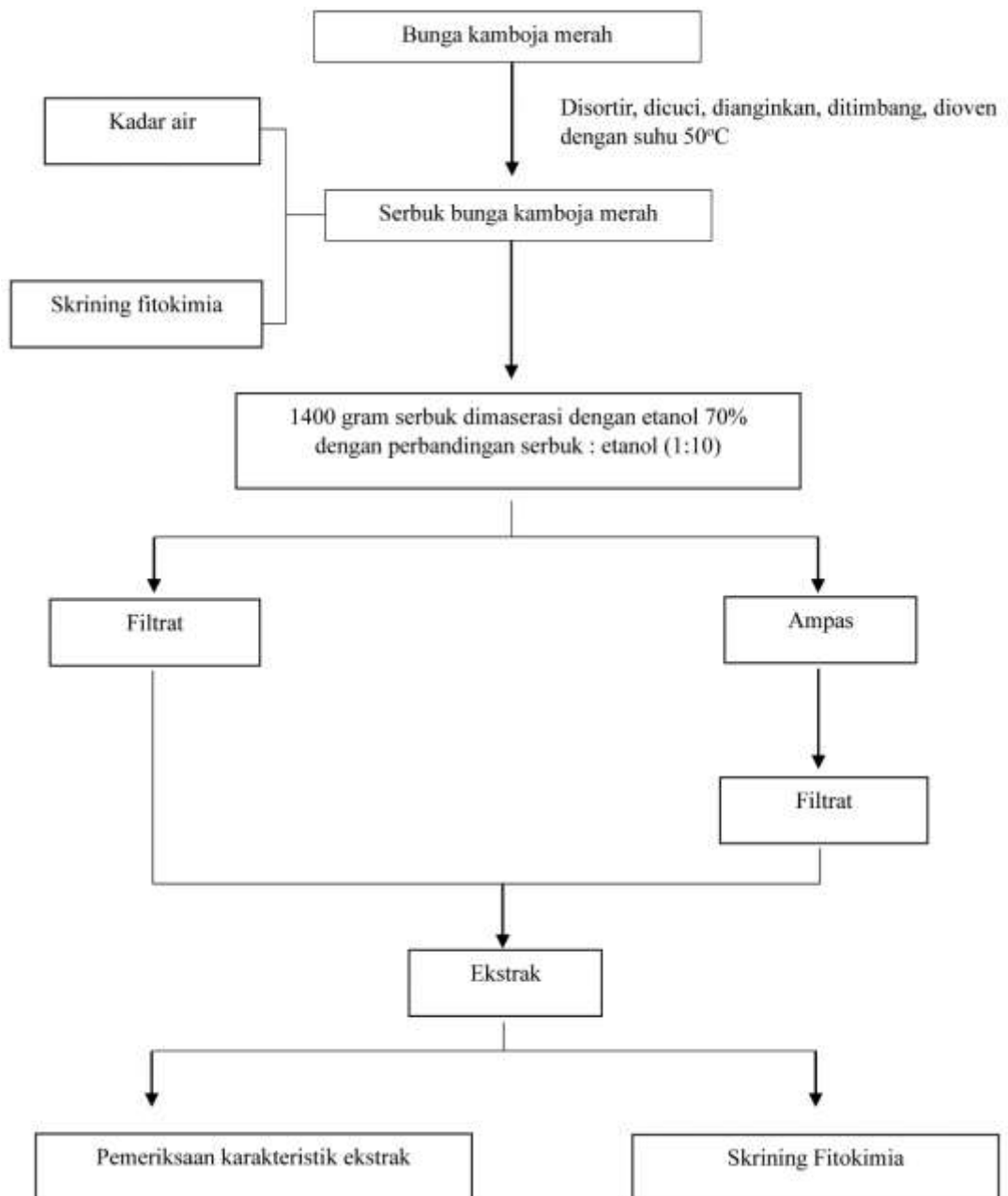
secara aseptis pada permukaan media yang telah diinokulasi bakteri menggunakan pinset steril, sesuai dengan posisi penandaan sebelumnya. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi selesai, zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Terbentuknya zona bening menunjukkan adanya kemampuan antibakteri dari sediaan yang diuji.

E. Analisis data

Hasil penelitian yang diperoleh data mutu fisik sediaan *Clay mask* ekstrak bunga kamboja merah (organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat dan waktu kering) serta zona hambat hasil uji orientasi ekstrak bunga kamboja dan zona hambat hasil aktivitas antibakteri *clay mask* dianalisis dengan aplikasi SPSS (*Statistical Package For The Socioal Sciences*), dilakukan uji *Shapiro-Wilk* apabila data didapatkan nilai $p < 0,05$ dilanjutkan dengan uji *non parametric* dengan uji *Kruskal Wallis* dan apabila nilai p masih kurang 0,05 dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. Jika hasil uji *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai $p > 0,05$ dilanjutkan dengan metode uji *One way anova*. Jika pada *homogeneity of variance* nilai $p > 0,05$ dilanjutkan dengan uji SNK, tetapi jika nilai $p > 0,05$ dilanjutkan uji *post hoc*. Uji stabilitas sediaan *clay mask* ekstrak bunga kamboja merah menggunakan *Paired T-Test* untuk mengetahui perbedaan sebelum pengujian stabilitas dan sesudah pengujian stabilitas

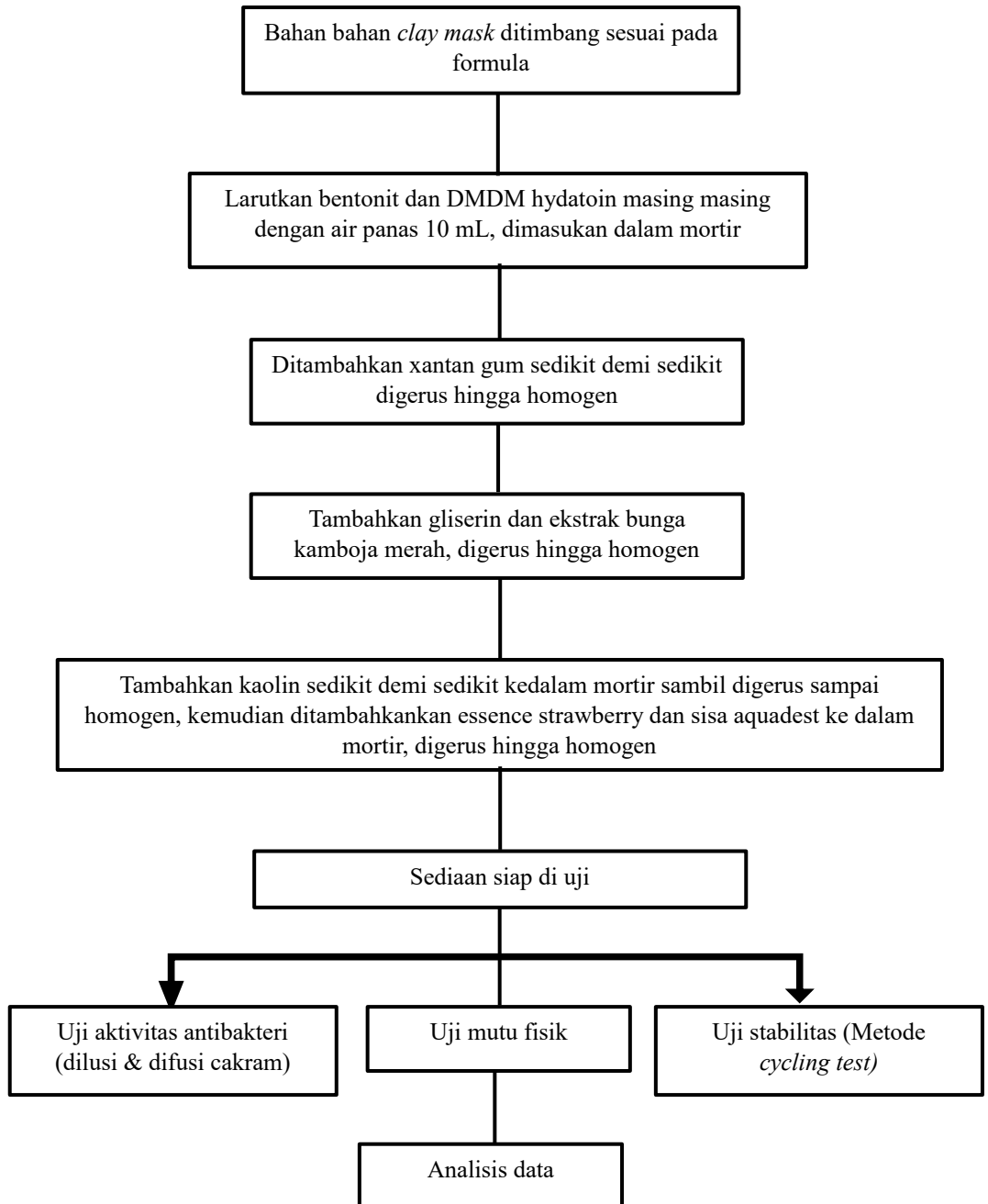
F. Skema Penelitian

1. Ekstrak bunga kamboja merah



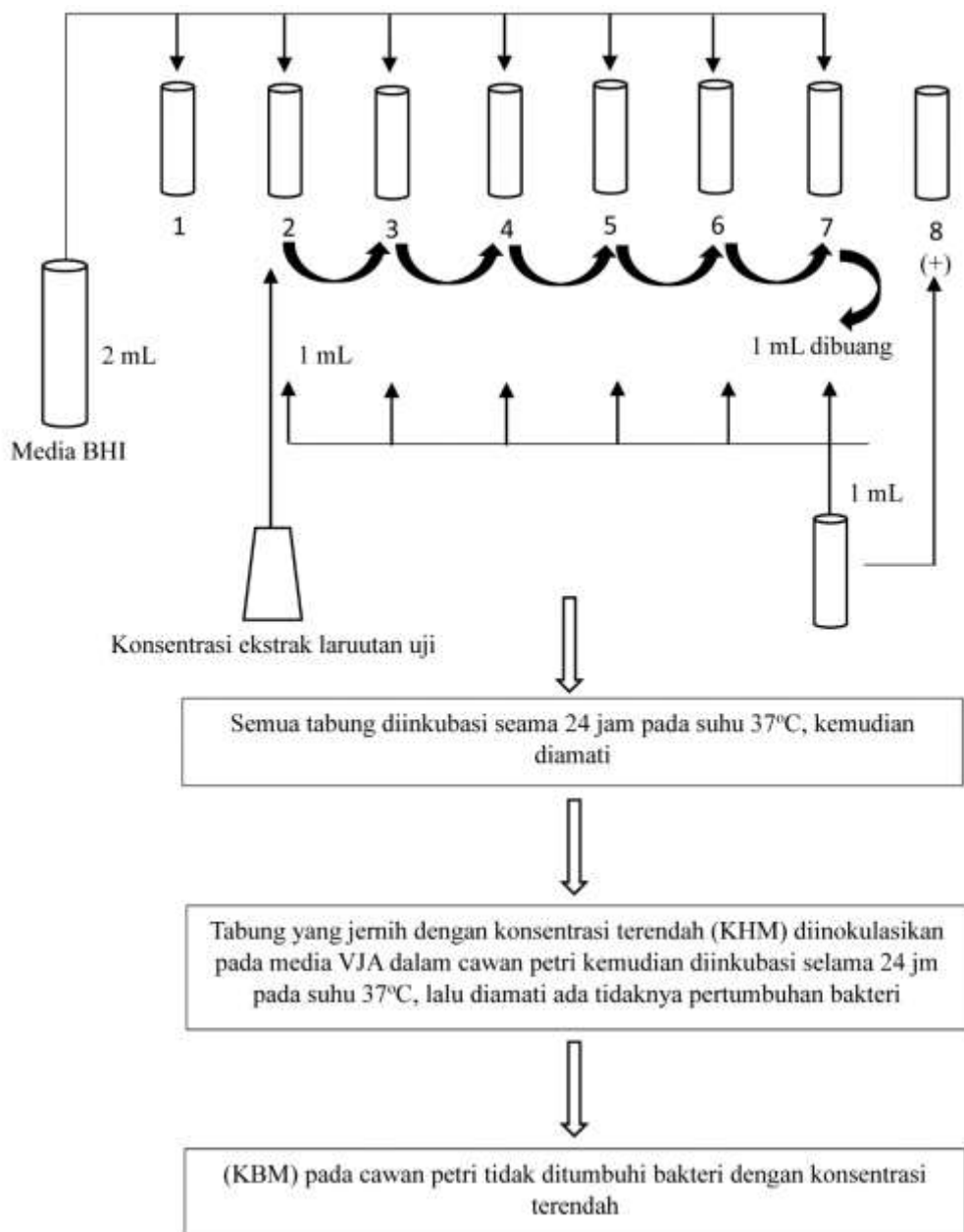
Gambar 4. Skema Penelitian Pembuatan Ekstrak Bunga Kamboja merah

2. Formulasi *clay mask* dengan ekstrak bunga kamboja merah.



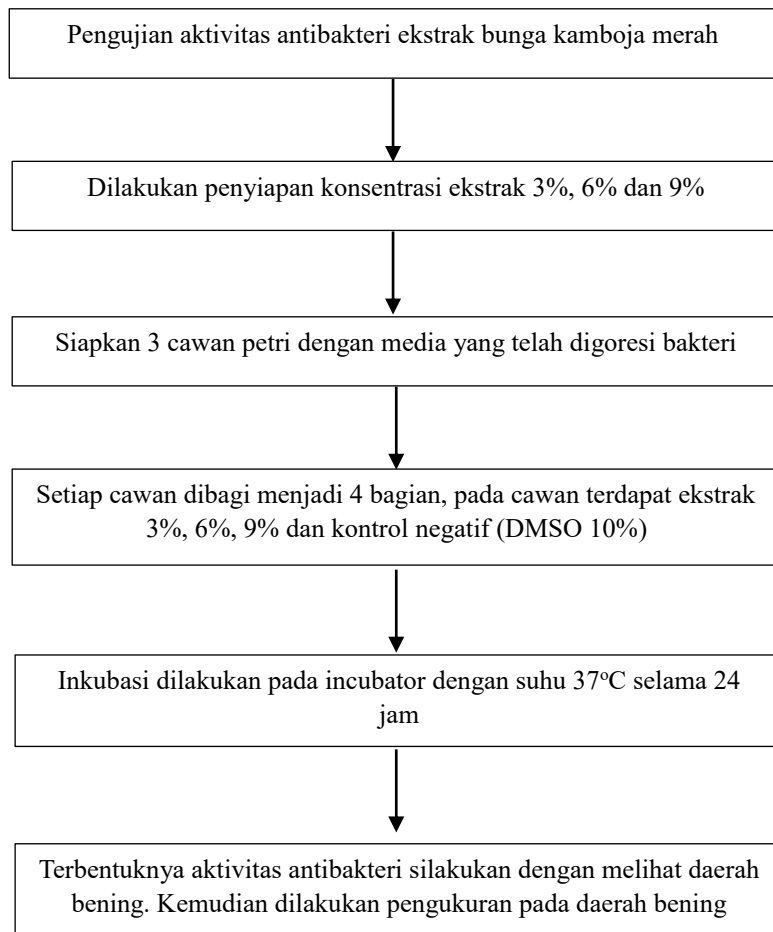
Gambar 5. Skema Penelitian Formulasi *clay mask* dengan ekstrak bunga kamboja merah.

3. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi



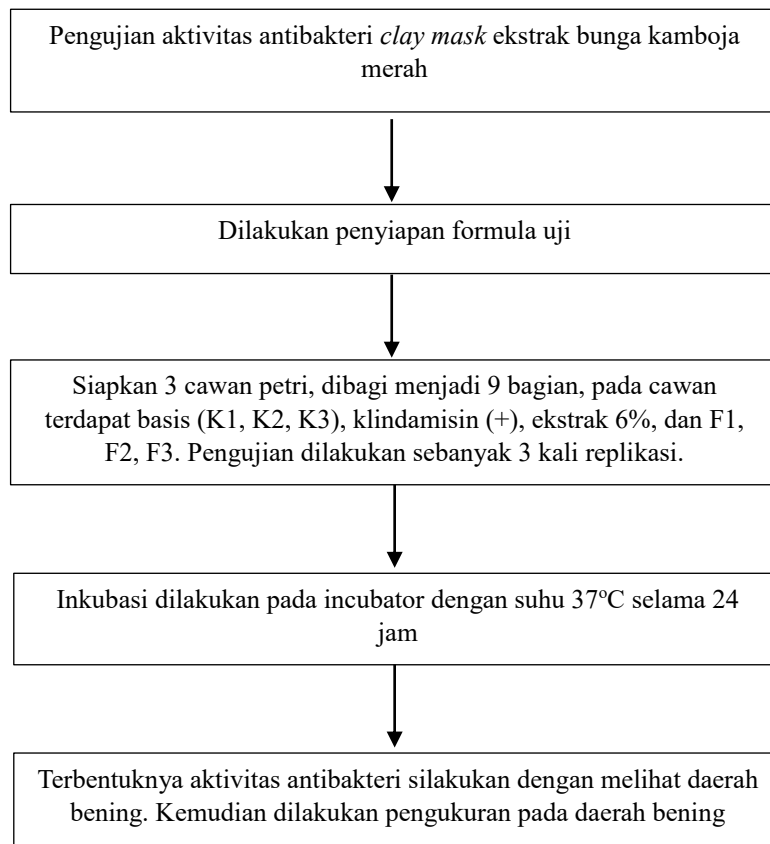
Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

4. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak bunga kamboja merah secara difusi cakram disk



Gambar 7. Skema pengujian aktivitas antibakteri ekstrak bunga kamboja secara difusi

5. Skema pengujian aktivitas antibakteri *clay mask* dengan metode difusi cakram disk



Gambar 8. Skema pengujian aktivitas antibakteri *clay mask* secara difusi