

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental laboratorium dengan *the posttest only control group design*. Tujuannya adalah mengetahui seberapa efektif *clay mask* ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.) sebagai antibakteri terhadap *Cutibacterium acnes*, bakteri penyebab jerawat berdasarkan nilai diameter zona hambat yang diuji menggunakan metode sumuran. Uji ini dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali, didasarkan pada rumus Federer : $(n-1)(t-1) \geq 15$ yang mana (t) merupakan kelompok dan (n) adalah jumlah minimal pengulangan. Kelompok perlakuan berjumlah tiga variasi konsentrasi *clay mask* ekstrak daun gelinggang (*Cassia alata* L.) (5%, 7%,9% dan 11%) dengan satu kontrol positif (*clay mask* bermerk x) serta satu kontrol negatif (basis *clay mask*).

Rumus perhitungan jumlah minimal pengulangan : $(n - 1) (t - 1) \geq 15$

$$= (n - 1) (6 - 1) \geq 15$$

$$= (n - 1) (5) \geq 15$$

$$= 5n - 5 \geq 15$$

$$= 5n \geq 15 + 5$$

$$= 5n \geq 20$$

$$= n \geq \frac{20}{5}$$

$$= n \geq 4$$

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakognosi, Ilmu Resep dan Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Palangkaraya dengan waktu penelitian terhitung dari bulan Januari – April 2024.

3.3 Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah bakteri *Cutibacterium acnes*. Sedangkan sampel pada penelitian ini adalah biakan pada media agar bakteri *Cutibacterium acnes*.

3.4 Variabel dan Definisi Operasional

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian adalah konsentrasi *clay mask* ekstrak etanol 96% daun gelinggang dengan 5%, 7%, 9% dan 11%, kontrol positif, dan kontrol negatif.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian yaitu diameter zona hambat *clay mask* ekstrak etanol 96% daun gelinggang terhadap bakteri *Cutibacterium acnes*.

3.4.3 Definisi Operasional

Definisi operasional penelitian ini adalah :

- 1) Efektivitas daya hambat merupakan kemampuan *clay mask* ekstrak etanol 96% daun gelinggang untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Cutibacterium acnes*.
- 2) Konsentrasi ekstrak adalah jumlah *clay mask* ekstrak etanol 96% daun gelinggang dalam 4 konsentrasi yaitu, 5%, 7%,9% dan 11%.

3.5 Alat/Instrumen dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah *blender* (Philips®), toples kaca, kain hitam, oven (Fisher®), autoklaf (Hirayama®), timbangan, gelas ukur (Pyrex®), gelas beaker (Pyrex®), labu ukur (Pyrex®), cawan porselin (Pyrex®), cawan petri (Pyrex®),aluminium foil, *vacuum rotary evaporator* (IKA RP 10®), *water bath* (Mettler®), desikator (Duran®), pelubang media agar No.5, tabung reaksi (Pyrex®), pipet ukur (Pyrex®), batang pengaduk, sendok tanduk, mortar, stamper, *hot plate* (Thermo Scientific®), Lemari Pendingin (Panasonic®), pengayak no.40 (MBT®), lampu spiritus, sudip, *ball pipet*, ose, dan pinset.

3.5.2 Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan-bahan meliputi simplisia daun gelinggang, pelarut etanol 96%, bakteri *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, *clay mask* xxx, media *Brain Heart Infusion* (BHI), media *Blood Agar Plate* (BAP), Standar *McFarland* 0,5, Media *Mueller Hinton Agar* (MHA), FeCl₃

10%, amyl alcohol, HCl pekat, serbuk Mg, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, kloroform, asetat anhidrat, air panas, HCl 2N, FeCl₃ 1% aquades, NaCl 0,9%, etanol 96%, BaCl₂ 1%, H₂SO₄ 1%, bentonit, nipagin, kaolin, *xanthan gum*, gliserin, dan *oleum rosae*, kapas steril, kertas label, aluminium foil, kapas dan lidi.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Daun Gelinggang

Sampel daun gelinggang (*Cassia alata* L.) di determinasi pada Laboratorium FMIPA Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru Kalimantan Selatan. Determinasi dilakukan agar mengetahui identitas tumbuhan. Berdasarkan hasil determinasi yang dilakukan menyatakan bahwa tumbuhan dalam penelitian ini adalah jenis spesies *Cassia alata* L.

3.6.2 Pemilihan dan Pengambilan Sampel

Tumbuhan gelinggang (*Cassia alata* L.) yang dipilih pada penelitian ini adalah bagian daun segar, bersih dan tidak berjamur. Pengambilan sampel dilakukan pagi hari hal ini karena terjadi fotosintesis jam 08.00-09.30 WIB pada Februari 2024, cara pengambilan sampel dengan memetik daun dari pohonnya (Paerah *et al.*, 2021). Dimana tumbuhan ini tumbuh liar di Kalimantan Tengah. Daun gelinggang ini banyak tumbuh di kawasan jalan Sapan, Kelurahan Palangka, Kecamatan Jekan Raya, Palangkaraya.

3.6.3 Pembuatan Simplisia Daun Gelinggang

Simplisia dibuat mulai dari pengumpulan daun gelinggang, dilakukan sortasi basah dan dilanjutkan dengan proses pencucian dengan air mengalir

dan tiriskan hingga kering. Setelah itu, sampel dirajang dengan cara dipotong dengan ukuran lebih kecil dan dikeringkan dengan cara pengovenan pada suhu 40°C, setelah dikeringkan bahan baku tersebut disortir kembali. Setelah itu, sampel dihaluskan menggunakan blender dan diayak hingga menjadi serbuk ukuran mesh 40 dan ditimbang sebagai bobot dari simplisia (Depkes RI, 2000).

$$\% \text{ Rendemen simplisia} = \frac{\text{Bobot Simplisia}}{\text{Bobot daun gelinggang}} \times 100 \% \text{ (Aprillinia, 2022).}$$

3.6.4 Pembuatan ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.)

Simplisia daun gelinggang sebanyak 2 kg dimasukkan ke dalam maserator dilarutkan menggunakan etanol 96%. Tuang hingga sampel terendam dengan perbandingan antara serbuk simplisia dan pelarut yaitu 1:4 (Sidoretno *et al.*, 2023). Kemudian didiamkan selama 3x24 jam dalam bejana tertutup dan terlindung dari cahaya. Sese kali diaduk, apabila proses ekstraksi pertama selesai, ampasnya di maserasi kembali dengan pelarut yang baru sebanyak 2 kali. Setelah hasil ekstrak telah didapatkan, diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh bobot tetap dari ekstrak kental, lalu ekstrak disimpan dalam suhu kamar (Fitriani *et al.*, 2023).

3.6.5 Rendemen total ekstrak daun gelinggang (*Cassia alata* L.)

Berat serbuk awal dan berat akhir ekstrak kental dibandingkan untuk mengetahui rendemen ekstrak daun gelinggang (*Cassia alata* L.) (Sandra *et al.*, 2022).

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100 \% \text{ (Aprillinia, 2022).}$$

3.6.6 Skrining fitokimia

a. Uji fenol

Ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.) sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan pelarutnya sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke tabung reaksi. Lalu ditambahkan 2-3 tetes FeCl_3 10%. Jika terjadi perubahan warna menjadi hijau, merah, ungu, biru atau hitam intensif menunjukkan positif mengandung fenol (Jati *et al.*, 2019).

b. Uji flavonoid

Ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.) sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan pelarutnya sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke tabung reaksi. Lalu ditambahkan 1 mL HCl pekat dan 2 mg serbuk Mg, dan ditambahkan amyl alkohol. Jika terbentuk warna merah, kuning, atau jingga menunjukkan bahwa positif mengandung flavonoid (Jati *et al.*, 2019).

c. Uji alkaloid

Ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.) sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan pelarutnya sebanyak 2 mL ditambahkan dan dimasukkan ke tiga tabung reaksi. Tabung 1 ditambahkan pereaksi *Mayer* ditandai dengan terbentuk endapan putih, tabung 2 ditambahkan pereaksi *Dragendorff* ditandai dengan terbentuknya endapan kuning kejinggaan, dan tabung 3 ditambahkan pereaksi *Wagner* ditandai dengan endapan merah kecoklatan. Endapan tersebut menunjukkan positif mengandung alkaloid (Ramadhan *et al.*, 2020).

d. Uji steroid

Ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.) sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan pelarutnya sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke tabung reaksi ditambahkan 2-3 ml kloroform, 10 tetes asetat anhidrat, dan 2-3 tetes H₂SO₄ (pereaksi *Liebermann-burchard*) melalui dinding tabung. Jika terbentuk warna biru sampai hijau maka positif mengandung steroid (Jati *et al.*, 2019).

e. Uji saponin

Ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.) sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan pelarutnya sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke tabung reaksi. Lalu ditambahkan 5 mL air panas dan ditambahkan 2 tetes asam klorida (HCl) 2 N lalu dikocok kuat. Setelah itu, dilihat apakah terbentuk buih dari warna awal hijau muda setelah didiamkan selama 10 menit. Sampel mengandung saponin bila terdapat buih dan intensitas yang banyak dan konsisten selama 10 menit (Jati *et al.*, 2019).

f. Uji tanin

Ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.) sebanyak 0,5 g dilarutkan dengan pelarutnya sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke tabung reaksi, ditambahkan larutan gelatin 1%. Sampel mengandung tanin bila terbentuk endapan berwarna putih (Jati *et al.*, 2019).

3.6.7 Pembuatan *clay mask* dari ekstrak etanol daun gelinggang

Tabel 1. Formulasi standar yang digunakan (Depkes, 1978)

Bahan	Formula	Fungsi
Bentonit	1-8%	Basis <i>Clay Mask</i>
<i>Xanthan Gum</i>	0,1-1%	Pengental
Kaolin	5-40%	Basis <i>Clay Mask</i>
Gliserin	2-10%	Pelembab
Nipagin	<1	Pengawet
Parfum	Qs	Pengaroma
Air suling ad	100%	Pelarut

Tabel 2. Formulasi sediaan *clay mask* di modifikasi (Kumalasari *et al.*, 2023)

Formula dasar masker modifikasi tidak menggunakan Sodium Lauryl Sulfate (SLS) dan Titanium dioxide (TiO₂).

Bahan	F0	F1	F2	F3	F4	Fungsi
Ekstrak Daun Gelinggang (*)	-	5 g	7 g	9 g	11 g	Bahan Utama Zat Aktif
Kaolin	34g	34 g	34 g	34 g	34 g	Basis <i>Clay Mask</i>
Bentonit	1 g	1 g	1 g	1 g	1 g	Basis <i>Clay Mask</i>
Gliserin	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	8 ml	Pelembab
Nipagin	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1 g	0.1g	Pengawet
<i>Xanthan Gum</i>	0.8 g	0.8 g	0.8 g	0.8 g	0.8 g	Pengental
<i>Oleum rosae</i>	q.s	q.s	q.s	q.s	q.s	Pengharum
Aquades ad	56,1ml	51,1 ml	49,1 ml	47,1 ml	45,1 ml	Pelarut
Total			100 g			

Tahapan pembuatan *clay mask* dengan menggunakan ekstrak etanol 96% daun gelinggang :

- 1) Semua bahan ditimbang berdasarkan formulasi Tabel 2.
- 2) Nipagin dan bentonite dilarutkan ke dalam air panas, setelah itu didiamkan selama 15 menit.
- 3) Larutan tersebut dimasukkan ke dalam mortir dan ditambahkan *xanthan gum*, gerus hingga homogen.
- 4) Kaolin ditambahkan dan gerus kembali hingga homogen
- 5) Gliserin dimasukkan dan homogenkan kembali.
- 6) Ekstrak etanol daun gelinggang ditambahkan dan gerus hingga homogen.
- 7) *Oleum rosae* ditambahkan dan homogenkan semua bahan hingga membentuk *clay mask*.
- 8) *Clay mask* dimasukkan ke dalam wadah dan diberi label.

3.6.8 Pengambilan Bakteri Penyebab Jerawat

Bakteri *Cutibacterium acnes ATCC 6919* dalam penelitian ini berasal dari Laboratorium Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Palangkaraya.

3.6.9 Sterilisasi alat dan bahan

Proses sterilisasi alat dan bahan yang digunakan diantaranya yaitu cawan petri, *glass pearl*, erlenmeyer, dan kapas lidi dimasukkan ke dalam oven pada suhu 180°C selama 1 jam. Sedangkan ose dan pinset disterilisasi menggunakan api bunsen. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu

121°C dipertahankan selama 15 menit dalam tekanan 1 atm agar efektif untuk membunuh bakteri dan spora (Pakekong *et al.*, 2016).

3.6.10 Pembuatan Larutan Standar McFarland 0,5

Larutan standar McFarland 0,5 digunakan sebagai pembanding jumlah koloni bakteri pada medium cair yang digunakan untuk pengujian antibakteri dengan *range* kepadatan koloni tertentu (Sarosa *et al.*, 2018). Pembuatan larutan McFarland 0,5 dengan cara 0,05 mL BaCl₂ 1% dimasukkan pada tabung reaksi. Selanjutnya tambahkan 9,95 mL H₂SO₄ yang sebanding dengan suspensi bakteri, lalu ditutup rapat agar tidak terjadi penguapan dan larutan dikocok pada setiap penggunaan sebagai pembanding dengan suspensi bakteri (Pakekong *et al.*, 2016).

3.6.11 Pembuatan Media *Brain Heart Infusion* (BHI)

Media BHI ditimbang sebanyak 1,11 g, dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan aquades sebanyak 30 mL dan dipanaskan di atas alat *stirrer* hingga media larut dengan sempurna. Setelah itu, media dipipet ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL. Lalu, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dalam tekanan 1 atm (Pakekong *et al.*, 2016).

3.6.12 Pembuatan Media *Blood Agar Plate* (BAP)

Media BAP ditimbang sebanyak 2 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, setelah itu ditambahkan aquades sebanyak 50 mL dan dipanaskan dengan alat penangas listrik hingga larut sempurna. Selanjutnya media tersebut disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu

121°C dipertahankan selama 15 menit dalam tekanan 1 atm. Sambil menunggu proses sterilisasi, dilakukan pengambilan darah golongan O sebanyak 10 mL. Darah tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi *glass pearl* steril, kemudian digosok hingga darah lisis tidak nampak lagi benang fibrinnya. Setelah itu media BAP selesai dilakukan pencampuran dengan darah dan tuang ke dalam cawan petri steril (Pakekong *et al.*, 2016). Hasil akan menunjukkan bahwa bakteri *C.acnes* memiliki karakteristik bentuk koloni kecil, berwarna putih, dan konsistensi yang padat (Lestari *et al.*, 2015).

3.6.13 Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA ditimbang sebanyak 13,68 g, dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu ditambahkan aquades sebanyak 360 mL dan dipanaskan menggunakan penangas listrik hingga media larut dengan sempurna. Kemudian lakukan proses sterilisasi media dengan autoklaf 121°C dipertahankan selama 15 menit dalam tekanan 1 atm. Setelah selesai sterilisasi, media didiamkan pada suhu ruang. Lalu media dituang ke dalam cawan petri steril (Laia *et al.*, 2019).

3.6.14 Penanaman dan Pewarnaan Gram Bakteri *Cutibacterium acnes*

Penanaman bakteri *Cutibacterium acnes* dengan cara mengambil 1 mata ose pada masing-masing bakteri tersebut. Kemudian ditanam pada media BHI dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Pakekong *et al.*, 2016). Selanjutnya dilakukan pewarnaan gram dengan cara preparat secara melingkar dibuat dengan diameter 2-3 cm. Fiksasi diatas api spiritus hingga

kering. Preparat digenangi dengan kristal violet selama 1 menit buang, lalu dibilas dengan aquades. Selanjutnya preparat digenangi dengan lugol selama 1 menit, buang, bilas dengan aquades. Kemudian digenangi dengan alkohol hingga jernih buang. Preparat dibilas dengan aquades. Lalu digenangi dengan karbol fuchsin selama 1-2 menit, buang, lalu dibilas lagi dengan aquades. Kemudian keringkan dan periksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x100. *C.acnes* merupakan bakteri gram positif sehingga akan menunjukkan warna ungu (Hikma *et al.*, 2023).

3.6.15 Pembuatan suspensi bakteri *Cutibacterium acnes*

Dimasukkan NaCl 0,9% steril ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL, disiapkan koloni bakteri dari media BAP dan dinyalakan bunsen. Bakteri *Cutibacterium acnes* dari media BAP diambil masing-masing 1 mata ose lalu masukkan ke dalam NaCl 0,9% hingga memperoleh kekeruhan sesuai dengan standar McFarland 0,5. Apabila kurang keruh, tambahkan koloni pada suspensi, dan apabila terlalu keruh dilakukan penambahan NaCl 0,9% (Pakekong *et al.*, 2016).

3.6.16 Pembuatan kontrol negatif

Kontrol negatif yang digunakan adalah basis *clay mask* tanpa menggunakan bahan aktif berupa ekstrak daun gelinggang (*Cassia alata* L.). Kontrol negatif memasukkan ke dalam lubang sumuran pada media MHA (Istini, 2020).

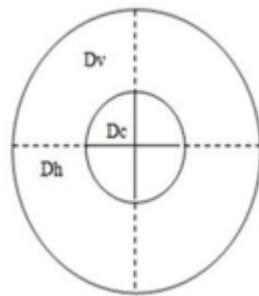
3.6.17 Uji Aktivitas Antibakteri Dengan Metode Sumuran

Clay mask ekstrak daun gelinggang (*Cassia alata* L.) diuji untuk mengetahui aktivitas antibakteri dengan menggunakan media MHA yang telah disteril lalu ditanami bakteri *C.acnes* dari suspensi bakteri menggunakan *cotton swab* steril. Pengujian antibakteri dilakukan dengan memasukkan 20 µl formulasi sediaan *clay mask* konsentrasi 5%, 7%, 9% dan 11%, kontrol positif *clay mask merk x* dan kontrol negatif basis sediaan ke dalam lubang yang terdapat pada media MHA dimana telah mengandung bakteri lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pelubangan media dilakukan secara aseptis dengan jumlah lubang sebanyak 6 lubang yang telah dibuat dengan 4 kali pengulangan. Pelubangan menggunakan pelubang no.5. Zona yang terbentuk merupakan aktivitas antibakteri yang dapat diukur menggunakan jangka sorong (Wananggari & Oktavilantika, 2024).

Tabel 3. Kategori penghambatan antibakteri berdasarkan diameter daya hambat CLSI (2012 dalam Nuralifah *et al.*, 2019)

Diameter (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 5 mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
10-20 mm	Kuat
≤ 20 mm	Sangat kuat

Rumus perhitungan diameter zona hambat :



$$= \frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$

Keterangan :

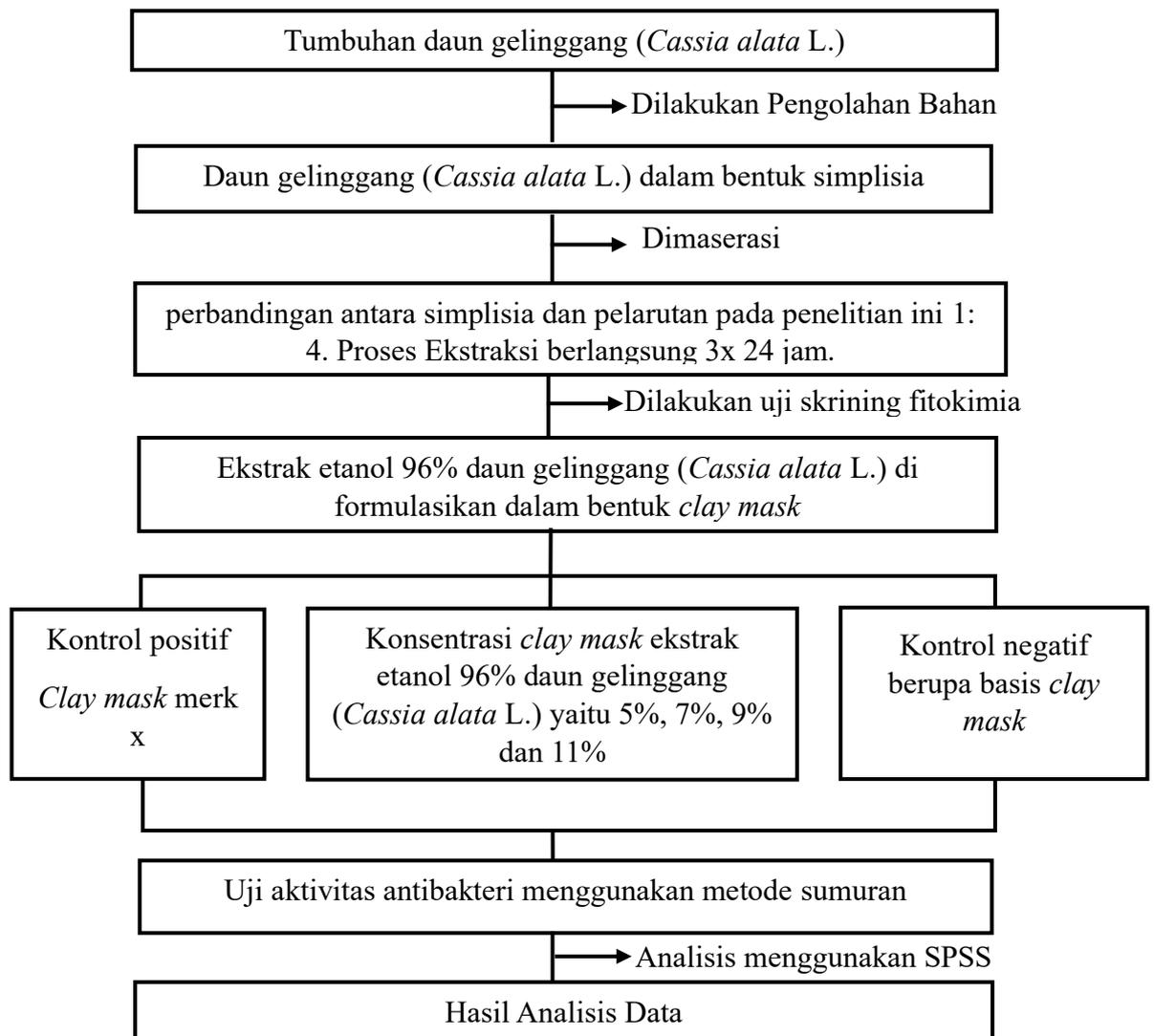
Dv = Diameter vertical

Dh = Diameter horizontal

Dc = Diameter cakram/sumuran

Gambar 4. Perhitungan zona hambat (Winastri *et al.*, 2020).

3.6.18 Jalan/Alur Penelitian



3.7 Pengolahan Data

Pengolahan data pada penelitian ini disajikan dalam bentuk tabulasi dan foto serta dengan perbandingan antara hasil penelitian yang diperoleh dengan standar yang telah ditetapkan berdasarkan kriteria CLSI (*Clinical Laboratory Standart Institute*) dengan terbentuknya zona bening atau zona hambat.

3.8 Analisis Data

Data hasil yang didapatkan berupa hasil diameter zona hambat kemudian dilakukan analisis menggunakan SPSS 26 untuk mengetahui efektivitas antibakteri yang terjadi pada *clay mask* ekstrak etanol 96% daun gelinggang (*Cassia alata* L.) dengan konsentrasi 5%, 7%, 9% dan 11% dan kontrol positif menggunakan *clay mask* merk x dalam menghambat pertumbuhan bakteri jerawat yaitu *C.acnes*. Uji analisis yang dilakukan antara lain uji normalitas dan uji homogenitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene* agar mengetahui data zona hambat yang dihasilkan berdistribusi normal atau tidak dan memeriksa apakah beberapa varians dari setiap kelompok data adalah sama atau tidak. Apabila data yang dihasilkan berdistribusi normal dan homogen, selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* dengan taraf kepercayaan 95% untuk membandingkan rata-rata aktivitas antibakteri dari beberapa konsentrasi *clay mask* yang berbeda sehingga memberikan pemahaman perbedaan signifikan dari tiap konsentrasi. Selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui perbedaan masing-masing kelompok dengan taraf kepercayaan 95%. Jika data tidak berdistribusi normal dan tidak homogen, maka analisis dialihkan ke analisis

non-parametrik dengan uji *Kruskall-Wallis* agar mengetahui perbedaan signifikan secara statistic antara dua atau lebih kelompok variabel, maka analisis menggunakan uji *Mann whitney* dengan taraf kepercayaan 95%.