

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif eksperimental laboratorium dengan tujuan membuktikan kemampuan masker gel *peel - off* yang mengandung ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dapat menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*, yang dapat diidentifikasi melalui nilai Konsentrasi Hambat Maksimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Maksimum (KBM) dengan menggunakan metode difusi cakram.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah tanaman telang (*Clitoria ternatea L.*) yang berasal dari Desa Jogorogo, Kabupaten Ngawi.

3.2.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah masker gel *peel - off* ekstrak bunga telang

3.3 Definisi Operasional dan Variabel

3.3.1 Definisi Operasional

1. Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*) merupakan tanaman yang memiliki beragam manfaat yakni antimikroba, antiparasit, antiinflamasi, serta aktivitas antimikroba terhadap mikroorganisme. Hal ini dikarenakan bunga telang memiliki senyawa metabolit sekunder berupa antosianin yang bermanfaat sebagai antibakteri.

2. Antibakteri adalah senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Antibakteri dapat merujuk pada substansi yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan serta reproduksi bakteri.
3. Masker gel *peel off* merupakan salah satu masker wajah dengan sediaan berbentuk gel, yang saat kering akan membentuk lapisan film yang elastis pada permukaan kulit dan mudah dalam pemakaiannya karena tidak perlu dibilas. Sediaan masker gel *peel - off* dibuat dengan pencampuran antara PVA, HPMC, Propilen glikol, Metil paraben, Propil paraben, *Aquades*. Masker gel *peel - off* dibuat dengan penambahan ekstrak bunga telang sebagai zat aktif dengan konsentrasi yang berbeda-beda yakni 0,5%, 1%, 2%.
4. Sampel yang akan digunakan adalah bagian bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) yang dalam kondisi baik tidak mengalami kebusukan bunga, berwarna ungu-kebiruan, sudah mekar keluar dari daun pelindung.
5. Ekstrak adalah sediaan yang mempunyai kandungan bahan aktif atau komponen kimia yang didapat dari proses ekstraksi tanaman. Ekstraksi merupakan langkah awal dalam memisahkan komponen bioaktif. Ekstraksi dengan pelarut sering digunakan untuk mengekstraksi senyawa bioaktif tanaman.
6. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dikenal sebagai kelompok bakteri gram positif berbentuk kokus, nonmotil, dan nonspora. Morfologi selnya memiliki bentuk seperti anggur atau cocciform dengan panjang berkisar antara 0,5 hingga 1,5 mikrometer. *Staphylococcus epidermidis* bersifat tidak bergerak atau non-motil, dan tidak memiliki flagela. *Staphylococcus epidermidis* berfungsi sebagai bahan uji antibakteri.
7. Zona hambat dan zona bunuh merupakan zona yang terbentuk disekitar cakram dengan ditandai dengan zona jernih dari pertumbuhan bakteri pada media. Zona hambat yang terbentuk diukur vertical dan horizontal dengan satuan mm menggunakan

jangka sorong. Zona hambat berfungsi sebagai parameter kepekaan bakteri terhadap antibakteri yang di uji kan dan sebagai parameter konsentrasi terendah yang memperlihatkan kematian bakteri (tidak adanya pertumbuhan).

3.3.2 Variabel bebas

Variabel bebas (Variabel *Independent*) merupakan faktor yang memiliki pengaruh atau menyebabkan perubahan pada variabel dependen, yang menjadi perhatian utama dalam penelitian. Dalam penelitian ini, variabel bebasnya adalah formulasi sediaan masker gel *peel - off*.

3.3.3 Variabel Terikat

Variabel terikat (Variabel *dependent*) merupakan faktor yang terpengaruh oleh variabel bebas. Dalam penelitian ini, variabel terikatnya adalah zona hambat pertumbuhan aktivitas antibakteri.

3.4 Waktu dan Tempat Penelitian

3.4.1 Waktu dan Jadwal Penelitian

Tabel 3. 1 Waktu dan Jadwal Penelitian

Rencana Kegiatan	Bulan					
	1	2	3	4	5	6
Pengajuan Judul dan Pembuatan Proposal						
Seminar Proposal						
Persiapan Penelitian						
Melakukan Penelitian						
Pengumpulan Data						
Penyusunan Laporan						
Seminar Hasil						

3.4.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi STIKes Panti Waluya Malang pada bulan Maret hingga Juni 2024

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Penelitian ini menggunakan alat :

- | | |
|-----------------------------|----------------------------|
| a. Kertas saring | m. Spatel |
| b. Kertas cakram | n. Mortar dan stamper |
| c. Corong | o. <i>Stopwatch</i> |
| d. Batang Pengaduk | p. <i>Thermometer</i> |
| e. pH meter | q. Jarum ose |
| f. Jangka sorong | r. Autoklaf |
| g. <i>Rotary evaporator</i> | s. <i>Magnetic stirrer</i> |
| h. Timbangan analitik | t. <i>Vortex</i> |
| i. Pipet ukur | u. Bunsen |
| j. <i>Hotplate</i> | v. Jangka Sorong |
| k. Gelas ukur | w. Inkubator |
| l. <i>Beaker glass</i> | x. drigalsky |

3.5.2 Bahan

Penelitian ini menggunakan bahan :

- | | |
|---|---|
| a. Bunga Telang | g. Propil paraben |
| b. Etanol 70% | h. <i>Aquades</i> |
| c. Polivinil alcohol (PVA) | i. <i>Media Nutrient Agar (NA)</i> |
| d. Hidroksipropil metil selulosa (HPMC) | j. <i>Media Mueller Hinton (MHA)</i> |
| e. Propilen glikol | k. Biakan <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| f. Metil paraben | |

3.6 Cara Kerja

1. Persiapan Simplisia Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*)

- a. Bunga telang diambil kemudian disortasi, dipisahkan dari bunga yang buruk (kering, tidak berwarna ungu-kebiruan)
- b. Kemudian bunga telang dicuci bersih hingga tidak ada kotoran yang menempel
- c. Bunga yang telah disortasi lalu dikering anginkan
- d. Kemudian ditimbang berat simplisia kering bunga telang yang dihasilkan

2. Pembuatan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*)

- a. Simplisia bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) ditimbang sebanyak 250 gram
- b. Kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% dengan rasio 1: 8. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi selama 3×24 jam.
- c. Kemudian hasilnya disaring menggunakan kertas saring dan diperoleh filtrat.
- d. Selanjutnya filtrat diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak kental.
- e. Apabila ekstrak yang didapat dari *Rotary Evaporator* kurang dinilai kental dapat dikentalkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak kental.
- f. Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang dan dihitung hasil rendemen ekstrak etanol bunga telang dengan rumus

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{Jumlah berat sampel hasil}}{\text{Jumlah berat sampel awal}} \times 100\%$$

3. Pembuatan Sediaan Masker Gel *Peel - off* dengan Berbagai %Konsentrasi

- a. Menimbang setiap bahan sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan.

- b. Kemudian, polivinil alkohol dikembangkan dalam mortar menggunakan *aquades* panas pada suhu 80°C kemudian diaduk hingga homogen (pada wadah A).
- c. Selanjutnya, mengembangkan HPMC dalam *aquades* hangat hingga mengembang (pada wadah B).
- d. Disamping itu, Propilen glikol dilarutkan dalam wadah terpisah (Wadah C).
- e. Selanjutnya, wadah A,B, dan C dicampurkan pada satu *beaker glass*, kemudian ditambahkan sisa *aquades* dan diaduk hingga homogen
- f. Setelah homogen, sediaan yang bercampur dipisah menjadi 4 bagian untuk penambahan ekstrak bunga telang sebanyak 0,5%, 1% dan 2%.

Tabel 3. 2 Formula Sediaan Masker Gel *Peel - off* dengan Berbagai % Konsentrasi

Bahan	Satuan	Konsentrasi			Fungsi
		F1	FII	FIII	
Ekstrak Bunga Telang	Persentase	0,5	1	2	Bahan Aktif
PVA		15	15	15	Pembentuk Lapisan Film
HPMC		1	1	1	Basis Gel
Propilen glikol		10	10	10	Humektan
Aquades	mL	Ad 50	Ad 50	Ad 50	Pelarut

F1 : mengandung ekstrak bunga telang 0,5%

F2 : mengandung ekstrak bunga telang 1%

F3 : mengandung ekstrak bunga telang 2%

4. Pembuatan Sediaan Masker Gel *Peel - off* tanpa Penambahan Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*) dan tanpa ekstrak sebagai Kontrol Negatif Antibakteri

- a. Menimbang setiap bahan sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan.

- b. Kemudian, polivinil alkohol dikembangkan dalam mortar menggunakan *aquades* panas pada suhu 80°C kemudian diaduk hingga homogen (pada wadah A).
- c. Selanjutnya, mengembangkan HPMC dalam *aquades* hangat hingga mengembang (pada wadah B).
- d. Disamping itu, Propilen glikol dilarutkan dalam wadah terpisah (Wadah C).
- e. Selanjutnya, wadah A,B, dan C dicampurkan pada satu *beaker glass*, kemudian ditambahkan sisa *aquades* dan diaduk hingga homogen

Tabel 3. 3Formula Sediaan Masker Gel *Peel - off* Tanpa Penambahan Ekstrak Sebagai Kontrol Negatif

Bahan	Satuan	Konsentrasi	Fungsi
		Kontrol Negatif	
PVA	Persentase	15	Pembentuk Lapisan Film
HPMC		1	Basis Gel
Propilen glikol		10	Humektan
Aquades	mL	Ad 50	Pelarut

K - : sediaan masker gel *peel - off* tanpa penambahan ekstrak bunga telang

5. Masker Komersial sebagai Kontrol Positif Antibakteri

Masker sebagai kontrol positif antibakteri kedua didapatkan dengan membeli sediaan masker gel *peel - off* komersial yang memiliki kandungan Aqua, Polyvinyl Alcohol, Ethanol, Propylene Glycol, PEG-40 Hydrogenated Castor Oil, Nonoxynol-14, Ethoxydiglycol, Diazolidinyl Urea, Methyl Paraben, Propyl Paraben, Parfum, Disodium EDTA, Trisodium Nitrilotriacetic Acid, CI 42090.

Kegunaan dari komposisi masker komersial yakni PVA sebagai pembentuk lapisan film, HPMC sebagai basis gel, Disodium EDTA sebagai pengikat, propilen glikol sebagai humektan, (Hidayati *et al.*, 2023).

6. Pembuatan Media *Nutrient Agar*

- a. Melarutkan *Nutrient Agar* menggunakan *aquades* didalam Erlenmeyer.
- b. Kemudian, larutan dididihkan menggunakan *hotplate* dan diaduk dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna.
- c. Setelah suhunya turun, media dituang sebanyak 5 mL kedalam tabung reaksi, ditutup dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit.
- d. Setelah di sterilisasi, tabung reaksi tersebut dimiringkan dan didinginkan.

7. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar*

- a. Media dilarutkan dengan *aquades* didalam Erlenmeyer.
- b. Kemudian, larutan dididihkan menggunakan *hotplate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna.
- c. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit.
- d. Sejumlah 15 mL media MHA dituang secara aseptis ke dalam cawan petri, lalu didiamkan hingga memadat.

8. Peremajaan Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

- a. Koloni bakteri *S. epidermidis* diambil dari biakan murni pada media *Nutrient Agar* dengan jarum ose steril, lalu diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Agar* miring secara aseptis.
- b. Media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C menggunakan incubator selama 24 jam.

9. Penyiapan cakram

- a. Kertas cakram yang disiapkan sebanyak 24 buah
- b. Masing-masing cakram direndam larutan sampel berbeda konsentrasi ekstrak telang (0,5%, 1% dan 2%) pada masker gel *peel - off*, kontrol positif masker gel *peel - off* komersial dan kontrol negatif
- c. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali

10. Pembuatan Suspensi Bakteri

- a. Melarutkan Nutrient Broth menggunakan aquades didalam Erlenmeyer.
- b. Kemudian, larutan dididihkan menggunakan hotplate dan diaduk dengan bantuan magnetic stirrer hingga larut sempurna.
- c. Setelah suhunya turun, media dituang sebanyak 10 mL kedalam tabung reaksi, ditutup dan disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, selama 15 menit.
- d. Bakteri *S. epidermidis* pada Nutrient Agar yang akan digunakan selanjutnya diinokulasikan dalam media Nutrient Broth (NB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

11. Pengujian Antibakteri KHM dan KBM (Difusi Cakram)

- a. Suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada NB sebanyak 1 mL di inokulasikan dengan metode *spread plate* pada media *Mueller Hinton Agar* dan diratakan dengan *Drigalsky*.
- b. Kemudian kertas cakram yang telah direndam pada sampel diletakkan pada media MHA
- c. Selanjutnya, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C
- d. Setelah diinkubasi, zona bening yang terbentuk dapat diamati

3.7 Evaluasi Sediaan Masker *Peel - off*

3.7.1 Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik dilaksanakan untuk mengamati perubahan fisik pada sediaan masker gel *peel - off*, termasuk konsistensi, warna, dan aroma (Annisa *et al.*, 2021).

3.7.2 Uji Viskositas

Pengujian viskositas dilakukan dengan *falling ball*, bertujuan untuk menilai tingkat kekentalan sediaan. Gesekan yang ditimbulkan oleh fluida yang bergerak disebut viskositas (kekentalan). Besarnya gesekan tersebut dikatakan sebagai derajat kekentalan zat cair. Kekentalan (viskositas) merupakan salah satu sifat zat cair yang memiliki koefisien kekentalan yang berbeda-beda (Azizah Lubis, 2018).

3.7.3 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas dilaksanakan dengan cara mengoleskan sediaan masker gel *peel - off* di antara dua keping kaca objek untuk mendeteksi kemungkinan gumpalan atau partikel di dalamnya (Annisa *et al.*, 2021).

3.7.4 Uji Pengukuran pH

Pengujian pH menggunakan pH meter bertujuan untuk memastikan kecocokan pH sediaan dengan pH kulit wajah. Sebanyak 1 gram masker gel *peel - off* dilarutkan dalam 10 ml *aquades*, kemudian pH larutan diukur menggunakan pH meter yang telah distandarisasi (Annisa *et al.*, 2021).

3.7.5 Uji Daya Sebar

Pengujian penyebaran dilakukan dengan menempatkan 1 gram sediaan di tengah cawan petri yang ditempel kertas milimeter blok. Diameter penyebaran sediaan diukur pada setiap penambahan beban selama 1 menit (Annisa *et al.*, 2021).

3.7.6 Uji Waktu Kering

Pengujian waktu pengeringan dilaksanakan untuk menilai durasi yang diperlukan agar sediaan membentuk lapisan film yang kering. Pengujian ini dilakukan dengan mengoleskan sediaan ke punggung tangan dan mengamati

waktu yang diperlukan untuk mengering, yaitu mulai dari saat pengolesan hingga terbentuknya lapisan yang kering (Annisa *et al.*, 2021).

3.8 Evaluasi Aktivitas Antibakteri

3.8.1 Zona Hambat

Pengukuran zona hambat yang terbentuk diukur *vertical* dan *horizontal* dengan satuan mm menggunakan jangka sorong.

$$\text{Zona hambat} = \frac{(D1-D3)+(D2-D1)}{2}$$

D1 = Diameter *vertical*

D2 = Diameter *horizontal*

D3 = Diameter cakram ($\pm 6\text{mm}$) (Saputera, Marpaung, *et al.*, 2019)

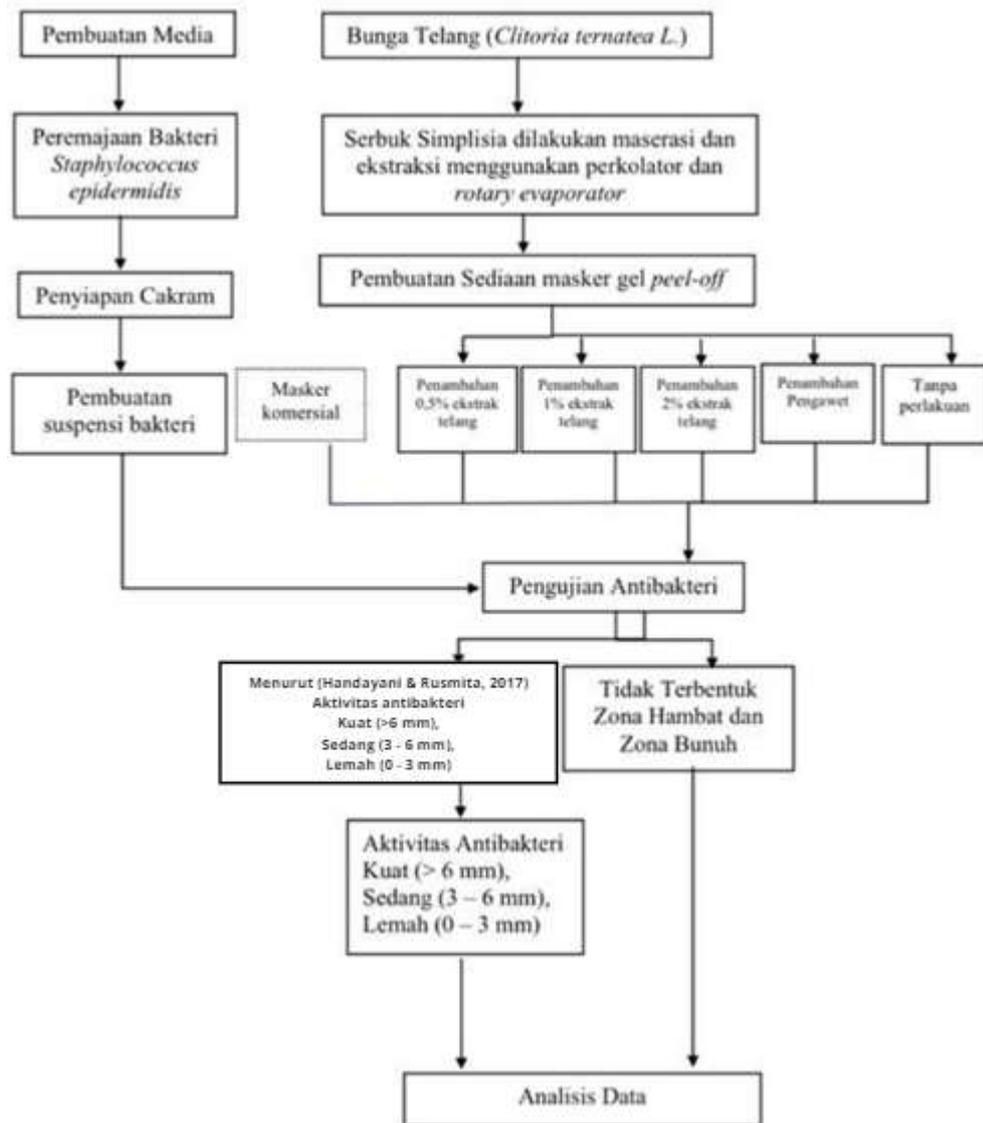
3.8.2 Zona Bunuh

Penentuan zona bunuh dengan adanya pengamatan ada tidaknya pertumbuhan bakteri dalam media agar setelah diinkubasi. Konsentrasi terendah yang memperlihatkan kematian bakteri (tidak ada pertumbuhan) merupakan nilai KBM. Sehingga dinilai positif KBM ketika sudah tidak ada pertumbuhan bakteri pada media setelah proses inkubasi, sedangkan negatif KBM ketika masih ditemui pertumbuhan bakteri pada media setelah proses inkubasi (Munira & Nasir, 2023).

3.9 Analisa Data

Analisa data yang diperoleh dalam penelitian ini dilakukan secara kuantitatif menggunakan *One sample T-test* untuk membandingkan aktivitas antibakteri ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea L.*) dengan perbedaan konsentrasi terhadap *Staphylococcus epidermidis*. Langkah awal pengujian adalah dengan menguji normalitas data yang didapat untuk mengetahui data sampel terdistribusi normal, selanjutnya dilakukan uji *One sample T-test* dengan menggunakan IBM SPSS *Statistics* versi 23.

3.10 Kerangka Pemecahan Masalah



Gambar 3. 1 Kerangka Pemecahan Masalah