

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni s.d. Juli 2024 dan dilaksanakan di tiga tempat berbeda. Penelitian Uji Antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara Jalan Lapangan Golf. No. 120 Desa Durian Jangak, Kec. Pancur Batu, Kabupaten Deli Serdang, Medan, Sumatera Utara, Identifikasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Herbarium Medanense USU, Jalan Bioteknologi Universitas Sumatera Utara, serta pemekatan Ekstraksi dan Uji Fitokimia di Laboratorium Kimia Organik Bahan Alam Hayati FMIPA Universitas Sumatera Utara Jalan Bioteknologi No.1, Padang Bulan, Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Laminar Air Flow Cabinet, autoklaf, cawan petri, oven, inkubator, timbangan analitik, rotary evaporator, jarum ose, bunsen, jangka sorong digital, pH meter, botol jar, objek glass, beaker glass, gelas ukur, tabung reaksi, Erlenmeyer, pinset, spatula, penjepit, batang pengaduk, botol maserasi, hot plate dan stirrer, corong kaca, spatula, vortex, lemari pendingin, stopwatch, blender

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.), Etanol 96%, aquadest, DMSO, bakteri *Propionibacterium acnes*, *mueller hinton agar* (MHA), *Nutrient Agar* (NA) NaCl 0,9%, HCl, H₂SO₄, FeCl₃, gliserin, butilen glikol, ectoin, *xanthan gum*, *phenoxyethanol*, *niacinamide*, klindamisin, aluminium foil, plastik *wrapping*, kapas steril, tissue, paper disk, kertas saring, cotton swab steril, spuit

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan uji metode difusi cakram dengan 4 variasi konsentrasi ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) yang berbeda yaitu 4%, 6%,

8%, 10% untuk uji aktivitas antibakteri pada formulasi sheet mask ekstrak daun murbei terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* yang dianalisa dua faktor yaitu, terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan sediaan sheet mask dengan variasi konsentrasi ekstrak daun murbei yakni tanpa perlakuan ekstrak daun murbei dan menggunakan ekstrak daun murbei. Sebagai kontrol positif dengan klindamisin dan sheet mask wardah yang menggunakan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan kontrol negatif menggunakan paper disk kosong yang ditetesi DMSO (Wardaniati & Islami, 2020). Kemudian dilakukan evaluasi formulasi sediaan Sheet mask (Uji Organoleptik, Uji Homogenitas, uji iritasi). Dalam penelitian ini sampel digunakan untuk mengidentifikasi komponen aktif yang terkandung dalam daun murbei (*Morus alba* L.) yang memiliki potensi sebagai agen anti-acne (Leny *et al.*, 2023).

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Identifikasi Daun Murbei (*Morus alba* L.)

Identifikasi tumbuhan daun murbei (*Morus alba* L.) dilakukan di laboratorium Herbarium Medanense USU, Jalan Bioteknologi Medan. Identifikasi daun murbei dilakukan dari morfologinya. Bukti kebenaran bahwa bahan tersebut merupakan daun murbei didapat dalam bentuk data.

3.4.2 Pembuatan Simplisia Daun Murbei

Sampel daun murbei diambil sebanyak 10 kg kemudian dicuci hingga bersih dengan air mengalir. Setelah itu ditiriskan dan dipotong kecil kecil agar mempermudah pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan cara dikering anginkan selama seminggu. Simplisia yang sudah kering kemudian ditimbang dan dihaluskan menggunakan blender untuk mempermudah pembuatan ekstrak (Raudhatunnisa *et al.*, 2023).

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Daun Murbei

Setelah dihaluskan hingga menjadi serbuk, kemudian serbuk simplisia daun murbei yang digunakan sebanyak 500 gram yang direndam etanol 96% 5L dimasukkan ke dalam botol maserasi kemudian botol ditutup. Proses ekstraksi dilakukan dengan melarutkan serbuk dalam perbandingan serbuk : pelarut (1:10).

Setelah itu maserasi dilakukan selama 3x24 jam kemudian diaduk setiap 6 jam untuk mendapatkan ekstrak daun murbei yang terlarut dengan sempurna. Kemudian dilakukan proses pemisahan dengan kertas saring dan filtrat kemudian diletakkan di erlenmeyer, selanjutnya maserat yang diperoleh diuapkan dengan *Rotary evaporator* pada suhu 30-40⁰C untuk menghasilkan ekstrak kental (Raudhatunnisa *et al.*, 2023).

3.4.4 Uji Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba* L.)

Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba* L.) yang meliputi pemeriksaan senyawa kimia golongan flavonoid, saponin, alkaloid, steroid dan tanin.

a. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 gram sampel ekstrak etanol daun Murbei (*Morus alba* L.) yang ditambahkan 20 ml aquadest steril dimasukkan kedalam tabung reaksi. Sebanyak 0,5 ml filtrat ditambahkan 0.05 mg serbuk Mg dan 2 ml amil alkohol. Uji flavonoid ditambahkan pereaksi FeCl₃ dengan dilarutkan ekstrak dalam etanol mendidih dan ditambah FeCl₃. Flavonoid ditandai dengan warna hijau atau hitam pekat setelah penambahan FeCl₃. Uji flavonoid dengan penambahan pereaksi H₂SO₄ ditambah 5 ml asam sulfat pekat, kemudian diamati. Hasil positif ditandai warna merah tua atau orange.

b. Uji Saponin

Dimasukkan 1 gram ekstrak etanol 96% daun Murbei (*Morus alba* L.) kedalam tabung reaksi dan ditambahkan aquadest panas sebanyak 10 ml kemudian didinginkan dan ditambahkan 2 tetes asam klorida (HCl) 2 N lalu dikocok hingga membentuk busa atau buih. Apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

c. Uji Alkaloid

Ditimbang sebanyak 1 gram ekstrak etanol dari daun murbei, lalu ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml aquadest. Dipanaskan diatas penangas air selama dua menit, didinginkan, lalu disaring. Larutan dibagi

dalam 2 tabung. Tabung I, ditambahkan 3 tetes filtrat dan 2 tetes pereaksi Mayer. Tabung II, 3 tetes filtrat diambil, dan 2 tetes pereaksi Dragendorff. Jika terdapat endapan putih pada tabung I dan endapan merah bata/jingga pada pereaksi dragendorff dan terbentuk endapan putih kekuningan pada pereaksi maeyer, maka ekstrak dianggap positif mengandung alkaloid (Hanum & Alfarabi, 2022).

d. Uji Steroid/Terpenoid

Sejumlah 1 gram ekstrak etanol daun murbei dimasukkan kedalam tabung reaksi. Ditambahkan 2 tetes reagen Liebermann-Burchard yaitu asam anhidrat dan asam sulfat peka dan pereaksi salkowsky yaitu FeCl_3 dan asam sulfat pekat. Adanya steroid triterpenoida menunjukkan bahwa warnanya ungu atau berubah menjadi hijau biru pada reagen Liebermann-Burchard dan terbentuk warna cokelat kemerahan hingga jingga pada pereaksi salkowsky (Hanum & Alfarabi, 2022).

e. Uji Tanin

Diambil 1 gram ekstrak etanol daun murbei lalu ditambahkan 2 ml air suling. Ditambahkan dengan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Apabila muncul warna biru atau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

3.4.5 Sterilisasi Alat dan Media

Sterilisasi merupakan instrumen dan perlengkapan yang diperlukan untuk mencegah kontaminasi. Alat dan media yang digunakan disterilkan dengan autoklaf dan oven. Autoklaf digunakan untuk mensterilkan bahan atau media dengan menggunakan uap pada suhu dan tekanan tinggi (biasanya 121°C) selama 15 menit. Alat dan bahan yang disterilkan dengan autoklaf seperti media pertumbuhan mikroba adalah bahan kimia tidak mudah terbakar. Sedangkan oven untuk sterilisasi panas kering dengan suhu 180°C pada peralatan logam dan gelas (Najmah *et al.*, 2024).

3.4.6 Pembuatan Media

Nutrient Agar (NA) ditimbang sebanyak 5 gram (20g/L), kemudian dilarutkan kedalam 250 ml aquades. Media NA dipanaskan hingga mendidih dan

homogen diatas hot plate stirrer. Disterilisasi di dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121° C dan tekanan 17 Psi. Ditunggu media hingga sedikit dingin sekitar 40-45°C. Kemudian dituang media steril ke dalam tabung reaksi untuk membuat agar miring (Retnaningsih *et al.*, 2019).

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 15,2 g dilarutkan dengan aquadest 400 ml dan dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer lalu ditutup dengan aluminium foil. Kemudian Erlenmeyer yang berisi larutan MHA dipanaskan dengan menggunakan hot plate dan diaduk dengan stirrer hingga larutan homogen. Setelah serbuk larut, media disterilkan selama 15 menit dengan autoklaf pada suhu 121⁰C. Kemudian media dituang ke dalam cawan petri hingga media padat. Cawan petri yang berisi media dimasukkan ke lemari pendingin (Leny *et al.*, 2023).

3.4.7 Peremajaan Bakteri

Bakteri *Propionibacterium acnes* diambil dengan menggunakan ose steril dari kultur murninya. Lalu diinokulasikan dan digoreskan ke dalam media agar miring NA, diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam (Retnaningsih *et al.*, 2019).

3.4.8 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba L.*)

Perlakuan uji dilakukan dengan membuat media MHA, dilanjutkan dengan suspensi biakan *Propionibacterium acnes* digores dengan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi medium MHA. Bakteri uji hasil peremajaan disuspensikan ke dalam larutan fisiologis NaCl 0,9% sebanyak 9 ml ke dalam tabung reaksi (Aliah *et al.*, 2019). Kekeruhan disetarakan dengan standar Mc. Farland 0.5. Jika kekeruhan suspensi bakteri uji sama dengan kekeruhan suspensi standar, artinya konsentrasi CFU lebih dari 3×10^8 CFU/ml (Sari *et al.*, 2023).

Ekstrak kental dibuat dengan konsentrasi 4%, 6%, 8%, 10%. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan paper disk (6 mm) ditempatkan pada media yang berisi sampel uji. Dimasukkan kertas cakram ke tabung reaksi yang berisi larutan uji. Selanjutnya media MHA yang telah di autoklaf selama 15 menit suhu 121⁰C, didinginkan hingga suhu 40⁰C. Dimasukkan swab steril ke dalam

larutan NaCl fisiologis biakan *Propionibacterium acnes*, kemudian digoreskan secara kuadran pada media MHA sebanyak 4 kali sehingga seluruh permukaan tergores, digoreskan juga pada pinggran cawan. Setelah itu kontrol negatif, kontrol positif, dan kertas cakram yang sudah mengandung ekstrak daun murbei diambil dengan pinset dan dimasukkan ke dalam cawan petri. Kemudian diinkubasi dengan inkubator selama 24 jam pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Area bening paper disk menandakan hasil positif aktivitas antibakteri (Nusaly *et al.*, 2024).

3.4.8.1 Pembuatan Kontrol

Kontrol positif yang digunakan adalah klindamisin sebagai K (+) ekstrak etanol daun murbei dan sheet mask wardah sebagai K (+) sediaan sheet mask dibuat dengan cara diambil dan ditimbang 1 gr kemudian dilarutkan dengan 100 ml aquades steril kemudian direndam paper disk lalu paper disk kosong yang ditetesi DMSO sebagai kontrol negatif.

3.4.8.2 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Pengukuran zona hambat ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) terhadap *Propionibacterium acnes* dilihat dari zona bening pada paper disk (metode disc diffusion Kirby and bauer). Paper disk yang digunakan berukuran 6 mm dengan daya serap 50 μ L. Kemudian paper disk direndam selama 15 menit diletakkan diatas media uji (sudah di autoklaf selama 15 menit) menggunakan pinset, pada masing-masing konsentrasi ekstrak daun murbei 4%, 6%, 8%, 10% serta kontrol positif dan kontrol negatif lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam secara aerob.

Hasil zona hambat diamati pada daerah yang tampak bening dan diukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong digital dan dicatat hasil (Hikma *et al.*, 2023). Zona hambat berdiameter ≤ 5 mm dikategorikan daya hambat lemah, 5-10 mm daya hambat sedang, 10-20 mm daya hambat kuat, dan ≥ 20 mm daya hambat yang sangat kuat (Nusaly *et al.*, 2024). Hasil zona hambat dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Zona Hambat} = \frac{\text{Diameter Zona Hambat} - \text{Diameter Cakram}}{\text{Diameter Cakram}}$$

3.4.9 Formulasi *Essence* Sediaan Sheet Mask

Dalam penelitian ini, dua konsentrasi zona hambat dari ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) yang paling efektif dipilih sebagai F1 (8%) dan F2 (10%). Selanjutnya dijadikan formula sheet mask ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.). Pembuatan formulasi sediaan sheet mask ekstrak daun murbei (*Morus alba* L.) dapat dilihat pada tabel 3.4 berikut:

Tabel 3.4 Formula *Essence* Sediaan Sheet Mask Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) (Verawaty *et al.*, 2020), (Savitri *et al.*, 2022)

No.	Nama Bahan	Konsentrasi %			Fungsi
		F0	F1	F2	
1.	Ekstrak daun murbei	-	8%	10%	Zat aktif
2.	Butylene glycol	5	5	5	Pengemulsi
3.	Glyserin	5	5	5	Humektan
4.	Ectoin	0,5	0,5	0,5	Penstabil
5.	Xanthan gum	0,5	0,5	0,5	Pengental
6.	Niacinamide	2	2	2	<i>Hydrating</i>
7.	Phenoxyethanol	0,5	0,5	0,5	pengawet
8.	Etanol 96%	3,0	3,0	3,0	Pelarut
9.	Aquadest	100	100	100	Pelarut

Disiapkan beaker dan timbangan untuk membuat larutan *essence*. Ekstrak daun murbei dimasukkan ke dalam beaker. Ditambahkan xanthan gum yang dilarutkan dengan aquadest steril yang telah dipanaskan (campuran I). Dilarutkan Phenoxyethanol di dalam air sebagian panas (campuran II). Campuran II dan campuran I dicampurkan sedikit demi sedikit hingga homogen (campuran III). Dilarutkan butilen glikol, gliserin, ectoin dan Niacinamide dihomogenkan (campuran IV). Campuran IV ditambah ke campuran III dan dihomogenkan (campuran V). Campuran IV ditambah campuran V dan ditambahkan etanol hingga sediaan homogen (Suwandi & Kustiawan, 2024)

3.5 Uji Mutu Sediaan

3.5.1 Organoleptik

Pengujian fisik masker dengan mengamati perubahan bau, warna, dan bentuk sediaan secara visual. Analisis organoleptik pada sediaan sheet mask dilakukan dengan menggunakan skala kesukaan (skala organoleptik) yang kemudian diubah menjadi data numerik. Tujuan dari uji organoleptik ini adalah

untuk mengevaluasi produk atau sediaan tertentu dan mengidentifikasi sediaan yang paling disukai oleh panelis. Adapun skala organoleptik yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari tingkatan sangat tidak suka (1), tidak suka (2), netral (3), suka (4), dan sangat suka (5). Panelis berjumlah 15 orang dewasa (> 18 tahun) yang menilai tingkat kesukaan berdasarkan warna, bentuk sediaan, dan aroma sediaan.

3.5.2 Uji Iritasi Kulit

Percobaan dilakukan pada 15 panelis dewasa (> 18 tahun) dengan jenis kulit yang berbeda di uji menggunakan metode temple preventif (patch test) yang dipotong 2x2 cm, sediaan ditempelkan dibelakang daun telinga selama 30 menit. Pengamatan dilakukan setelah 24 jam, jika tidak terjadi reaksi kulit seperti kemerahan, gatal, dan bengkak, maka kosmetik tersebut dapat digunakan sebagai berikut; tidak ada iritasi ditandai dengan simbol (-), apabila timbul rasa gatal maka diberi simbol (+), apabila timbul kemerahan dan adanya rasa panas maka ditandai dengan simbol (++) (Athallah *et al.*, 2022).

3.5.3 Pengukuran pH Sediaan

Ditimbang sampel 1g sediaan dan dilarutkan dalam air suling volume 100 ml, kemudian diukur pH larutan dengan alat pH meter. Hasil pH dicatat berdasarkan persyaratan pH standar kulit yaitu 4,5-6,5. Jika pH terlalu asam maka berdampak iritasi, dan kulit akan kering jika terlalu basa (Athallah *et al.*, 2022).

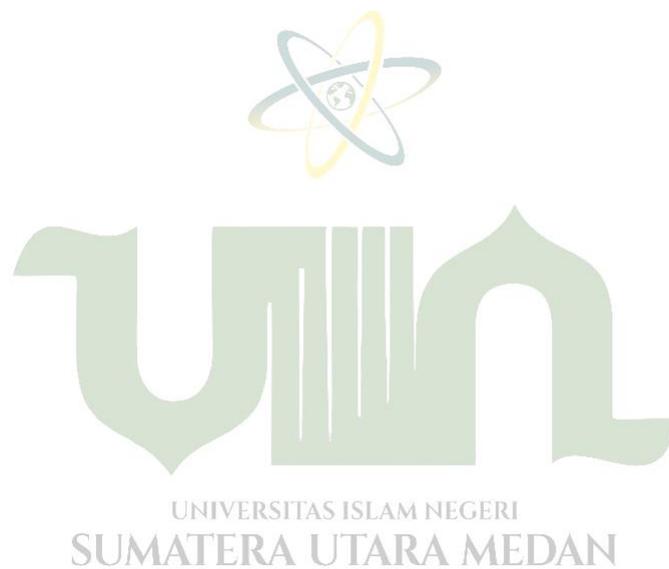
3.5.4 Homogenitas

Setelah jumlah tertentu sediaan dioleskan pada sekeping kaca objek dan diobservasi partikel kasar yang ada pada sediaan untuk pengamatan homogenitas sediaan yang tercampur rata (Verawaty *et al.*, 2020).

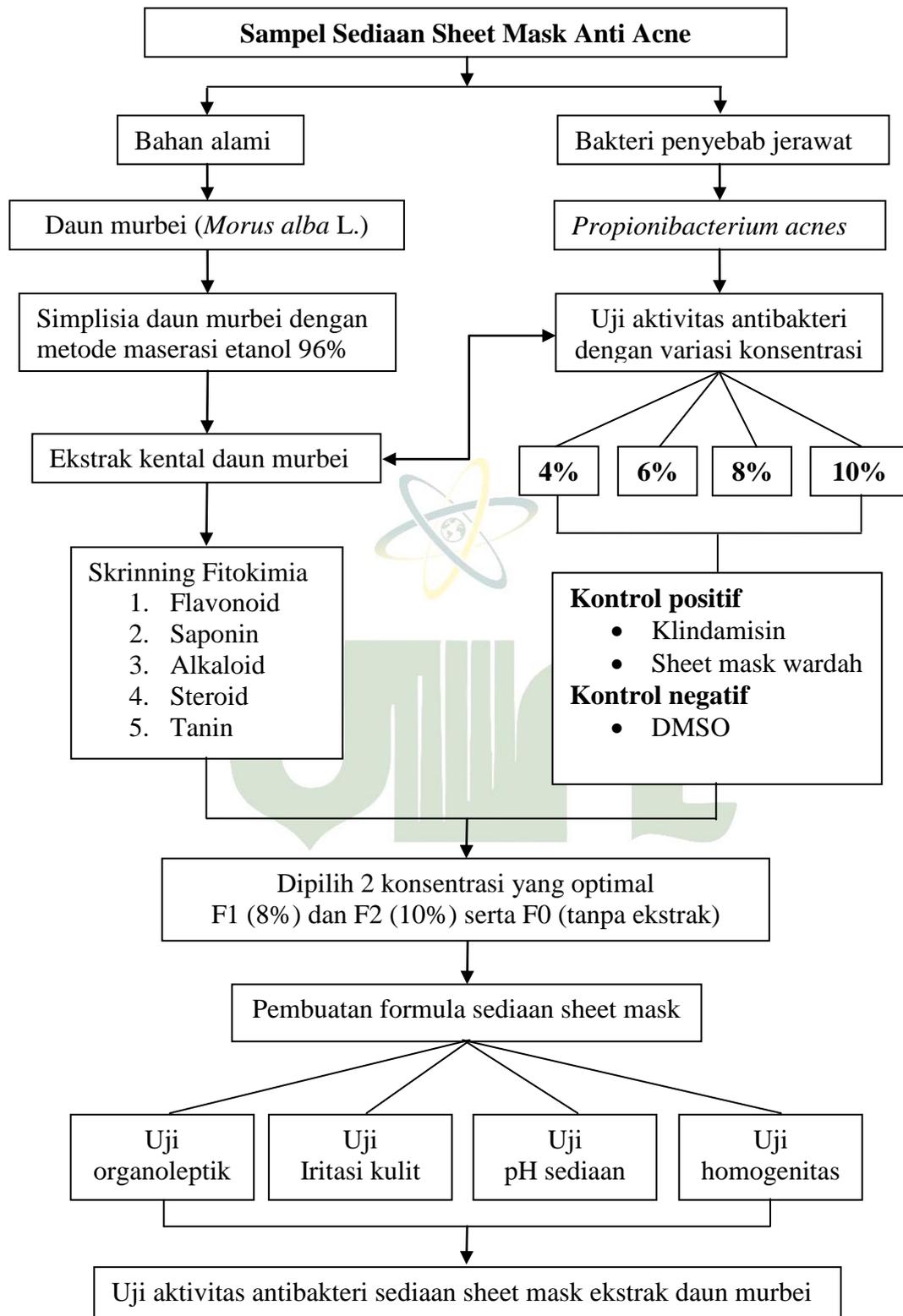
3.5.5 Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Sheet Mask

Metode yang digunakan pada pengujian antibakteri sediaan sheet mask yaitu dengan menggunakan metode difusi cakram. Dipadatkan media MHA lalu ditambahkan bakteri *P. acnes* yang diencerkan menurut Mc. Farland sebanyak 0,5 ml larutan keruh pada cawan petri. Disiapkan kertas disk yang direndam larutan *serum/essence* sheet mask wardah sebagai kontrol positif diletakkan pada

permukaan media MHA. Kertas disk kosong diletakkan ke media yang telah direndam dengan *serum/essence* untuk pengujian zona hambat pada F0 (tanpa ekstrak) dan formula yang paling baik yaitu F1 (8%) dan F2 (10%) dengan menggunakan pinset (Wardaniati & Islami, 2020). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona bening diukur dengan jangka sorong digital (Harnis *et al.*, 2022).



3.6 Skema Penelitian



Gambar 3.6 Skema Alur Penelitian