

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah jenis penelitian eksperimental. Penelitian ini menguji aktivitas antibakteri *P.acnes* dari formula *sheet mask* bioselulosa dari fraksi etil asetat kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca* L).

3.2 Sampel Penelitian

3.2.1 Sampel Fraksi

Sampel fraksi pada penelitian ini adalah fraksi etil asetat kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca* L). Fraksi diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO).

3.2.2 Sampel Bakteri

Bakteri yang digunakan pada penelitian kali ini adalah bakteri *Propionibacterium acnes* dan starter *acetobacter xylinum*..

3.3 Bahan dan Alat Penelitian

3.3.1 Bahan

Bahan penelitian yang akan digunakan antara lain fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L), starter bakteri *Acetobacter xylinum*, gula pasir, amonium sulfat, asam stearat, air kelapa tua, tween 80, gliserin, xantan gum, phenoxyetanol, PEG-40 *hydrogenated castrol oil*, butylene glycol, sodium benzoate, sodium metabisulfate, sodium EDTA, aquades (Raisa Fitri, 2021)

3.3.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu timbangan analitik, penangas air, gelas ukur (Pyrex), corong glass (Pyrex), tabung reaksi, erlenmeyer (Pyrex), batang pengaduk, bunsen, pH meter (PH/ISE Meter pH-240L), pipet tetes, hot plate, cawan petri, lampu spirtus, jarum ose, mikropipet (DragonLab), batang sumuran, inkubator, LAF (*Laminar Air Flow*), jangka sorong, viskometer (LR Lamy Rheology Instruments), *climatic chamber* (Mettler climate chamber ICH260), corong pisah.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah tiga variasi formula sediaan *sheet mask* bioselulosa fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca L*) dengan konsentrasi 25%, 12,5%, 6,25%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah evaluasi fisik sediaan *sheet mask* bioselulosa fraksi etil asetat kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca L*) yang meliputi: Uji pH, uji stabilitas, uji organoleptik, uji homogenitas.

3.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Kegiatan penelitian dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Waktu penelitian dilakukan dari bulan Januari sampai dengan bulan Juli tahun 2025.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Determinasi Tanaman

Identifikasi tanaman determinasi di Departemen FMIPA Universitas Padjajaran (UNPAD) Jatinangor. Tujuan determinasi tanaman yaitu untuk

membedakan spesies tumbuhan dengan menggunakan karakteristik khusus yang tidak dimiliki oleh tumbuhan lain (Izza, 2018).

3.6.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Pisang Kepok

Serbuk kulit pisang kepok ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1: 6 pelarut lalu diaduk selama 2-5 jam. Setelah itu di aduk lalu diendapkan (maserasi) selama 2-3 hari, setelah 2-3 hari di maserasi kemudian di saring dan diambil fitratnya menggunakan kertas saring wattman no.52. Terakhir filtrat dikentalkan menggunakan *vacum rotary evaporator* selama 6 jam dengan suhu 40°C-50°C sampai menjadi ekstrak kental etanol 96%.

3.6.3 Pembuatan Fraksinasi Kulit Pisang Kepok

Pada tahap awal fraksinasi dilakukan ekstraksi cair-cair (ECC) terhadap ekstrak etanol kental yang telah ditimbang dan dilarutkan dalam sedikit etanol, kemudian ditambahkan aquades sebanyak 500 mL. Campuran ini dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan pelarut n-heksana dengan volume yang sama (500 mL), lalu dikocok untuk memisahkan fraksi. Proses pemisahan ini diulang 3 kali sampai fraksi n-heksana terlihat jernih. Selanjutnya, fraksi air yang tersisa dipartisi ulang menggunakan pelarut etil asetat dalam jumlah dan rasio yang sama (500 mL; 1:1) tahap ini juga dilakukan sebanyak 3 kali hingga fraksi etil asetat terpisah sempurna. Terakhir, fraksi etil asetat dikentalkan menggunakan rotary evaporator untuk memperoleh fraksi bentuk pekat (Shafira *et al*, 2023).

3.6.4 Skrining Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan dengan menggunakan pereaksi pendeteksi golongan pada tabung reaksi. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi :

1. Alkaloid

Sebanyak 3 mL ekstrak dimasukkan ke dalam masing-masing dari 3 tabung reaksi. Masing-masing tabung ditambahkan 5 tetes pereaksi Mayer (tabung 1), Dragendorff (tabung 2) dan Libermann-Bouchardat (tabung 3). Reaksi positif ditandai dengan munculnya endapan putih atau kuning

(Mayer), cokelat jingga (Dragendorff), serta cokelat sampai hitam (Bourchardat). Kandungan alkaloid dinyatakan positif bila 2 atau lebih pereaksi membentuk endapan khas (Arifuddin *et al.*, 2020).

2. Tannin

Sebanyak 3 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan larutan FeCl_3 10%. Jika terbentuk warna biru atau kehijauan maka reaksi menunjukkan hasil positif terhadap kandungan senyawa tanin (Arifuddin *et al.*, 2020).

3. Saponin

Sebanyak 3 mL ekstrak dicampurkan dengan 10 mL air suling panas dalam tabung reaksi, lalu dikocok kuat dan biarkan selama 10 menit. Jika buih terbentuk tambahkan HCl 2N. Kandungan saponin dikatakan positif apabila buih tetap stabil dan tidak menghilang setelah penambahan HCl 2N (Arifuddin *et al.*, 2020).

4. Flavonoid

Siapkan tabung reaksi lalu masukkan 3 mL ekstrak kemudian tambahkan serbuk Mg dan tetesi HCl pekat sebanyak 5 tetes. Akan terbentuk warna merah atau kuning atau jingga yang menunjukkan positif mengandung flavonoid (Arifuddin *et al.*, 2020).

5. Steroid/ Terpenoid

Sebanyak 3 mL ekstrak dicampurkan dengan pereaksi Liebermann-Burchard dalam tabung reaksi. Jika terbentuk cincin berwarna cokelat atau violet pada batas larutan, maka hasil uji menunjukkan adanya terpenoid. Jika cincin yang terbentuk berwarna biru kehijauan maka reaksi menunjukkan positif steroid (Arifuddin *et al.*, 2020).

3.6.5 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L)

1. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan disterilisasikan terlebih dahulu di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Dan untuk jarum ose cukup dipanaskan diatas api bunsen.

2. Pembuatan Media

Larutkan 0,28 gram media NA dalam 20 mL aquades di erlenmeyer, panaskan hingga larut lalu sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Diamkan media yang sudah dituangkan pada cawan petri pada suhu ruang selama 30 menit hingga memadat.

3. Pembuatan Suspensi Media

Untuk membuat suspensi bakteri siapkan tabung reaksi yang telah disterilisasi dan masukkan 10 mL larutan NaCl 0,9% ke dalam tabung reaksi tersebut. Setelah itu sterilkan jarum ose menggunakan api bunsen, tunggu beberapa saat sampai jarum ose tidak terlalu panas. Ambil kultur bakteri menggunakan jarum ose dan masukkan kedalam tabung reaksi yang terdapat larutan NaCl 0,9% sampai didapat kekeruhan yang sesuai dengan standar McFarland

4. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok

Pada pengujian antibakteri ini menggunakan metode sumuran. Pertama, suspensi bakteri *P.acnes* dengan kekeruhan larutan MacFarland 0,5% dibuat pada media agar yang telah memadat. Kemudian, sebanyak 100µL suspensi bakteri diambil menggunakan mikropipet, dimasukkan ke dalam media agar yang telah memadat dan ditunggu selama beberapa saat. Selanjutnya, 4 sumuran dibuat pada media agar dengan menggunakan alat pencadangan atau lubang tipis dengan ukuran 7 mm. Setiap lubang diberi 0,1 gram sediaan. Pengujian dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow*. Setelah selesai masukkan media kedalam jar anaerob dan kemudian

diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Sampel diukur diameter daerah beningnya di sekitar sumuran dengan jangka sorong.

3.7 Formulasi Pembuatan *Essence* Fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L)

Formulasi pembuatan *essence* fraksi etil asetat kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca* L) yang dibuat pada penelitian ini tertera pada tabel berikut:

Tabel 3.2 Formulasi Pembuatan *Essence* Fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L) (Raissa Fitri, 2021)

No	Bahan	Konsentrasi (%)				Keterangan
		F0	F1	F2	F3	
1	Fraksi etil asetat kulit pisang kepok (<i>Musa paradisiaca</i> L)	-	25	12,5	6,25	Zat Aktif
2	Tween 80	5	5	5	5	Penetration enhancer
3	Gliserin	5	5	5	5	Emolien Humektan
4	Xantan gum	0,2	0,2	0,2	0,2	Agen Penambah Viskositas
5	Phenoxyetanol	0,3	0,3	0,3	0,3	Pengawet
6	PEG-40 <i>hydrogenated castrol oil</i>	3	3	3	3	Co-solvent
7	Butylene Glycol	1	1	1	1	Humektan
8	Sodium benzoate	0,5	0,5	0,5	0,5	Pengawet
9	Sodium Metabisulfate	0,1	0,1	0,1	0,1	Stabilisator

10	Sodium EDTA	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengkelat (<i>Chelating Agent</i>)
11	Aquades	Ad	Ad	Ad	Ad	Pelarut
		50	50	50	50	

3.8 Cara Pembuatan *Essence* Fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca* L)

Campuran 1 yaitu Tween 80 dan PEG-40 dicampurkan dengan fraksi etil asetat kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca* L) hingga homogen kemudian ditambahkan gliserin. campuran 2 yaitu Xanthan gum didispersikan dengan butilen glikol, campuran 3 yaitu natrium benzoat, metabisulfit, natrium EDTA dilarutkan dalam aquades, kemudian campurkan campuran 2 dan campuran 3 hingga homogen menjadi campuran 4. Setelah itu dituangkan kedalam campuran 1 hingga homogen.

3.9 Pengujian Evaluasi *Essence* Fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca* L).

3.9.1 Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk mengevaluasi karakteristik fisik dari sediaan *essence* berdasarkan parameter warna, aroma, dan bentuk.

3.9.2 Uji pH

Uji pH dilakukan menggunakan pH meter dengan tiga kali pengulangan, rentang pH yang sesuai untuk sediaan *essence* adalah antara 5,53 hingga 6,16 (Reveny *et al.*, 2017).

3.9.3 Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan sejumlah sediaan pada permukaan kaca bening untuk memastikan bahwa seluruh komponen di dalam sediaan telah tercampur secara merata (Afriadi *et al.*, 2021).

3.9.4 Uji Viskositas

Uji viskositas dilakukan menggunakan viskometer *brookfield* pada kecepatan 10 rpm dengan spindel nomor 1. Nilai viskositas yang disarankan untuk sediaan *essence* berkisar antara 230 hingga 1150 cps (Ambarwati, 2022).

3.9.5 Uji Aktivitas Antibakteri Essence Fraksi Etil Asetat Kulit Pisang Kepok (*Musa paradisiaca* L)

Proses perendaman kertas cakram dalam larutan *essence* dilakukan selama 15 menit untuk memastikan bahwa cairan terserap secara maksimal. Setelah perendaman, kertas cakram diletakkan pada media NA yang telah ditumbuhkan bakteri *P.acnes* penempatan dilakukan dengan jarak antar cakram 4 cm dan jarak 2 cm dari cakram ke sisi cawan petri. Aktivitas antibakteri ditandai dengan munculnya zona bening pada permukaan media.

3.10 Formulasi Pembuatan Lembar *Sheet Mask* Bioselulosa

Formulasi sediaan lembar *sheet mask bioselulosa* yang dibuat pada penelitian ini tertera pada tabel berikut:

Tabel 3.3 Formulasi sediaan lembar *sheet mask* bioselulosa (Raissa Fitri, 2021).

Bahan	Konsentrasi (%)
Starter Bakteri <i>Acetobacter xylinum</i>	10%
Gula Pasir	4%
Asam Stearat	2,5%
Amonium Sulfat	0,5%
Air Kelapa Tua	Ad 100%

3.11 Pembuatan Lembar Masker *Sheet Mask* Bioselulosa

Air kelapa tua sebanyak 10 mL dipanaskan pada suhu 80°C selama lima belas menit. Setelah itu, biarkan hingga dingin lalu tambahkan gula putih dan amonium sulfat. tambahkan asam asetat hingga pH larutan mencapai 4, setelah lautan dingin kemudian tambahkan starter bakteri *acetobacter xylinum* campurkan semua bahan secara merata dan masukkan ke dalam cetakan, tutup dengan kertas roti untuk mencegah kontaminasi lingkungan. Selama 2-3 hari produk diinkubasi pada suhu 30°C. Setelah bioselulosa selesai dibuat kemudian dicuci dengan air mengalir dan kuktur di bagian bawah lembaran dibersihkan. Rebus lembar bioselulosa dalam air mendidih selama 30 menit. Kemudian direndam dalam larutan NaOH panas 0,5% selama 15 menit. Setelah itu, dicuci dengan air mengalir dan direndam kembali dengan akuades selama 1 hari hingga pH netral. Lembar bioselulosa yang sudah memiliki pH yang netral diletakkan di atas pelat kaca untuk membuat masker wajah. Setelah itu dicuci bersih (Reveny *et al.*, 2017).

3.12 Pengujian Evaluasi *Sheet Mask* bioselulosa

3.12.1 Uji Organoleptik

Uji organoleptik bertujuan menilai warna, bau, dan tekstur bioselulosa yang akan diaplikasikan sebagai material utama dalam pembuatan *sheet mask*.

3.12.2 Uji Ketebalan Lembar Masker

Lembar masker bioselulosa yang telah dibuat dievaluasi dengan menggunakan mikrometer skrup untuk mengukur ketebalan (Fitri. R., 2021).

3.12.3 Uji Berat Lembar Masker Bioselulosa

Mengukur berat lembar masker bioselulosa dengan menimbang basah dan menekannya selama 120 detik untuk mendapatkan berat yang konsisten (Fitri. R., 2021).

3.12.4 Uji pH

Uji pH pada penelitian ini menggunakan pH meter. pH bioselulosa yang aman untuk digunakan pada kulit memiliki nilai pH antara 4,5-6,5 (Putri *et al.*, 2019).

3.12.5 Uji Daya Mengembang Masker Bioselulosa

Kemampuan bioselulosa dalam menyerap essence dievaluasi melalui uji daya mengembang dengan pengukuran berat setelah perendaman selama interval waktu tertentu (3, 6, 12, dan 24 jam). Efektivitas penyerapan ini dipengaruhi oleh kapasitas air bioselulosa yang mencapai 10-20 kali berat selulosa keringnya (Azizah *et al.*, 2020).

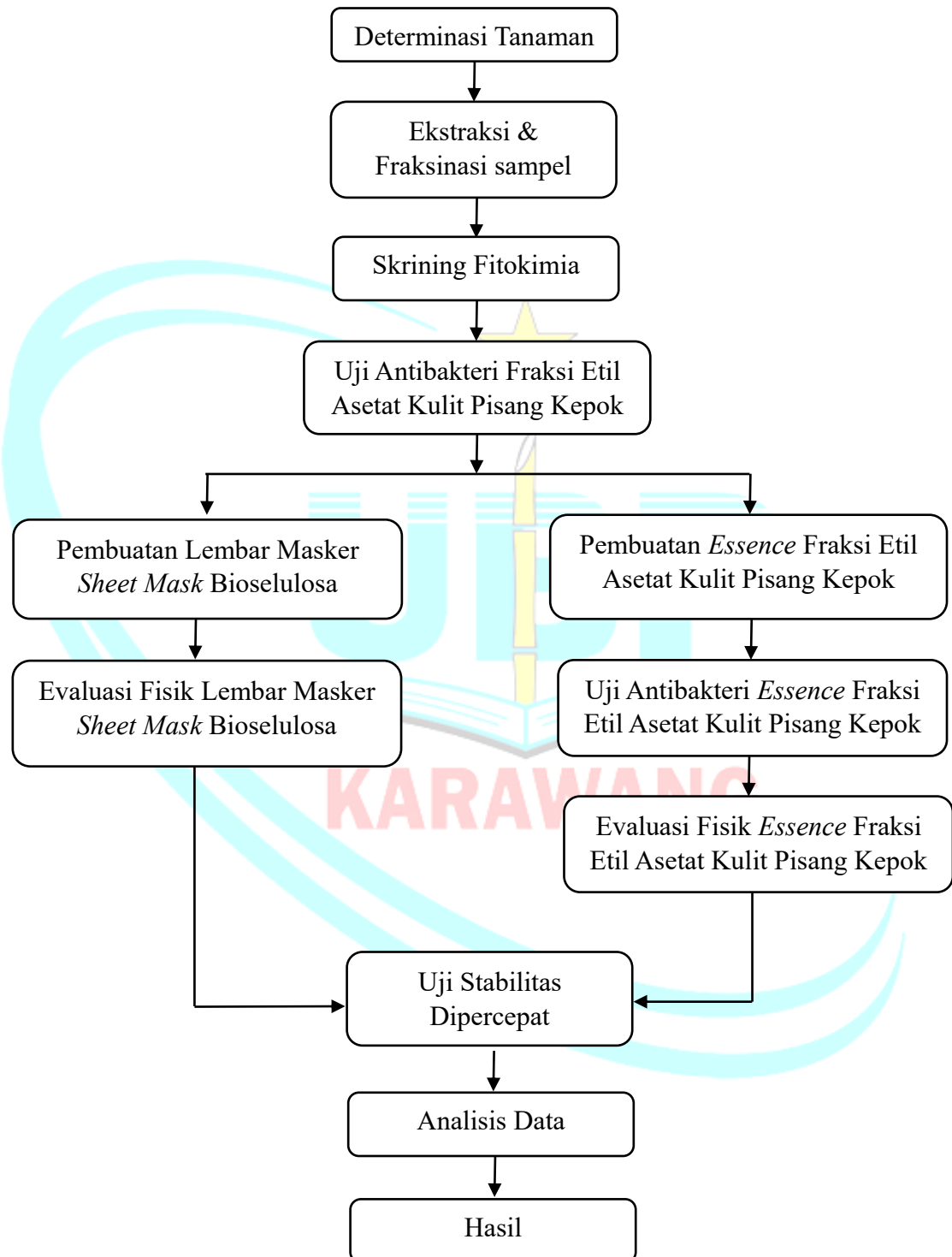
3.12.6 Uji Stabilitas Dipercepat

Metode *cycling test* digunakan untuk menguji stabilitas dipercepat sediaan essence dengan menyimpannya secara bergantian selama 24 jam, selama 6 siklus. Pada setiap siklus diamati perubahan fisik seperti pH, organoleptik, homogenitas dan viskositas (Suryani *et al.*, 2017).

3.13 Analisis Data

Analisis data statistik pada pengujian *sheet mask* bioselulosa mengandung fraksi etil asetat kulit pisang kepok (*Musa paradisiaca L*) untuk *acne treatment* menggunakan uji *one-way ANOVA* atau satu arah melalui program GraphPad Prism 10.4.0 data yang sudah diolah diinterpretasikan dalam bentuk table dan grafik. Sementara itu, untuk uji organoleptik diamati sebagai data deskriptif.

3.14 Diagram Alir Prosedur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian