# BAB III

**METODE PENELITIAN**

## Rancangan Penelitian

Metode penelitian ini adalah metode *True Eksperimental* dan dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Grup Design* dimana hasil penelitian diamati setelah perlakuan selesai. Penelitian ini menggunakan sampel serbuk teh celup bekas. Tahapan pada penelitian ini meliputi pemeriksaan mutu sediaan, uji keamanan dan kesukaaan serta uji aktivitas antibakteri.

### Variabel Penelitian

Variabel penelitian meliputi variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah serbuk simplisia teh celup bekas, serbuk nano teh celup bekas dan variasi formulasi masker wajah serbuk. Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakterisitik simplisia, senyawa metabolit sekunder, karakteristik serbuk nano, karakteristik formulasi masker wajah serbuk dan uji aktivitas antibakteri.

### Parameter Penelitian

Parameter pada penelitian ini sebagai berikut:

1. Parameter karakteristik serbuk simplisia teh celup bekas:kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar abu tidak larut air, dan kadar sari larut air.
2. Parameter metabolit sekunder: senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, steroid/triterpenoid, dan glikosida.
3. Parameter karakteristik serbuk nano: ukuran partikel dan morfologi partikel.
4. Parameter karakteristik formulasi masker wajah serbuk: organoleptis, pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, waktu sediaan mengering, mikromeritik, iritasi dan hedonisitas.
5. Parameter aktivitas antibakteri: daya hambat terhadap bakteri *propionibacterium acnes* dan *staphylococcus epidermidis*.

## Jadwal dan Lokasi Penelitian

### Jadwal Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai dengan Juni 2024.

### Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

## Alat dan Bahan

### Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu neraca analitik (shimadzu), mortir dan stemper (Onemed), cawan porselin (pyrex), gelas ukur (Iwaki), penangas air, tanur, desikator, mikroskop, beaker glass (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), pH meter, pipet tetes, kertas perkamen, kawat ose, *laminar air flow*, cawan petri, lampu bunsen, autoklaf (B-One), oven (Memmert), vortex, *hotplate* (Ika C-Mag HS 7), tabung reaksi (pyrex), rak tabung reaksi, sarung tangan, jangka sorong, ayakan, *scanning electron microscopy* (Hitachi) dan *particle size analyzer* (Fritsch).

### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu serbuk teh celup bekas, kaolin (merck), TEA (merck), tepung beras, tragacant (merck), aquadest, magnesium karbonat (merck), etanol 96% (merck), aquadest (onemed), asam klorida pekat (merck), asam sulfat pekat (merck), besi (III) klorida (merck), timbal (II) asetat (merck), raksa (II) klorida (merck), kalium iodida (merck), alfa-naftol (merck), asam nitrat pekat (merck), iodium (merck), bismuth (III) nitrat (merck), asam asetat glasial (merck), eter (merck), kloroform P (merck), natrium sulfat anhidrat P (merck), metanol P (merck), asam kloralhidrat (merck), serbuk magnesium (merck), isopropanol (merck), asam asetat anhidrat (merck), amil alkohol (merck), natrium hidroksida (merck), toluen (merck), DMSO (merck), NaCl 0,9%, biakan murni *Propionibacteriumacnes* dan *Staphylococcusepidermidi*s*.*

## Pengumpulan Dan Pengolahan Bahan

### Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan adalah serbuk teh celup bekas. Metode pengambilan sampel dilakukan secara purposive, yaitu mengambil sampel dengan sengaja dari suatu tempat tanpa membandingkan dari tempat lain. Sampel serbuk teh celup bekas diambil dari beberapa rumah makan di jalan Garu, Kecamatan Medan Amplas, Kota Medan.

### Pengolahan Bahan

Pengolahan bahan sampel serbuk teh celup bekas yang telah dikumpulkan kemudian dicuci dengan air bersih lalu ditiriskan untuk membuang sisa-sisa air yang terkandung dalam teh lalu dikeringkan dan disimpan dalam wadah bersih. Serbuk teh celup bekas yang sudah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender lalu diayak (Nurjanah *etal*., 2018).

## Karakteristik Simplisia

### Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotropi. Dengan menggunakan alat yang terdiri dari labu alas bulat 500 ml, alat penampung dan pendingin, tabung penyambung dan tabung penerima 5 ml.

1. Penjenuhan Toluene

Sebanyak 200 ml toluene dan 2 ml aquadest dimasukkan ke dalam labu alas bulat lalu dipasangkan alat penampung dan pendingin kemudian didestilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama 30 menit lalu volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml.

1. Penetapan kadar air simplisia

Sebanyak 5 gr serbuk simplisia teh celup bekas yang telah ditimbang, dimasukkan ke dalam labu yang berisi toluen jenuh, lalu dipanaskan dengan hati-hati selama 15 menit. Setelah toluen mendidih, kecepatan pada tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes untuk tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam tabung pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan hingga 5 menit, lalu tabung penerima dibiarkan mendingin pada suhu kamar. Setelah air dan toluen memisah sempurna, volume air dibaca dengan ketelitian 0,05 ml. Selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (v/b) (Depkes RI, 1989).

### Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gr zat yang telah di gerus dan ditimbang dimasukkan ke dalam krus yang telah dipijarkan dan ditara. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pemijaran dilakukan pada suhu 500-600oC lalu dinginkan dan timbang. Jika dengan ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, saring menggunakan kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

### Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total, didihkan dengan 25 ml asam klorida encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui krus kaca masir atau kertas saring bebas abu, cuci dengan air panas, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu yang tidak larut dalam asam terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

### Penetapan Kadar Sari Larut Air

Timbang 5 gr serbuk, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml kloroform P (2,5 ml kloroform dalam 100 ml aquadest) menggunakan labu bersumbat sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal beralas datar yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105oC hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

### Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Timbang 5 gr serbuk, dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml etanol 95% menggunakan labu bersumbat sambil dikocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindari penguapan etanol 95%, uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105oC hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol 95%, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan (Depkes RI, 1989).

## Pembuatan Larutan Pereaksi

### Larutan Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 gr kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aquadest lalu tambahkan sedikit demi sedikit 2 gr iodium dan dicukupkan dengan air hingga 100 ml (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 gr raksa (II) klorida P dilarutkan dengan 60 ml aquadest didalam gelas ukur 100 ml, pada wadah lain larutkan 5 gr kalium iodida dalam 10 ml aquadest. Kedua larutan ini dicampur dalam labu ukur 100 ml lalu diencerkan dengan aquadest sampai garis tanda (Ditjend POM, 1995).

### Larutan Pereaksi Dragendorff

Sebanyak 8 gr bismut (II) nitrat dilarutkan dalam 20 ml asam nitrat P. Pada wadah lain ditimbang 27,2 gr kalium iodida dilarutkan dengan 50 ml aquadest, diamkan sampai memisah sempurna. Ambil larutan jernih dan encerkan dengan air secukupnya hingga 100 ml (Depkes RI, 1989).

### Larutan Pereaksi Molish

Sebanyak 3 gr alfa-naftol dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N sampai batas tanda (Ditjend POM, 1995).

### Larutan Pereaksi Asam Klorida 2 N

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat lalu diencerkan dengan aquadest sampai 100 ml (Ditjend POM, 1995).

### Larutan Pereaksi Libermann-Burchard

Sebanyak 5 ml asam asetat anhidrat dicampur dengan asam sulfat pekat sebanyak 5 ml, lalu tambahkan etanol hingga 50 ml (Ditjend POM, 1995).

### Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M

Sebanyak 15,17 gr timbal (II) asetat dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam aquadest bebas CO2 sampai garis tanda (Ditjend POM, 1995).

### Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

Sebanyak 1 gr besi (III) klorida 1% dilarutkan dalam aquadest sampai 100 ml (Ditjend POM, 1995)

### Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2N

Sebanyak 8,001 gr kristal natrium hidroksida, dilarutkan dalam aquadest hingga 100 ml (Ditjend POM, 1995).

## Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap sampel serbuk teh celup bekas yang meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid/triterpenoid dan glikosida.

### Pemeriksaan Alkaloid

Serbuk dan serbuk nano teh celup bekas sebanyak 1 gr dimasukkan ke dalam masing-masing sampel lalu ditambahkan 2 ml asam klorida 2N (suasana asam) dan ditambah aquadest sampai 9 ml lalu dipanaskan diatas hot plate magnetic stirrerKemudian didinginkan lalu disaring untuk mendapatkan filtrat. Setelah itu dilakukan pemeriksaan alkaloid:

1. Tabung reaksi I: 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning.
2. Tabung reaksi II: 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi bouchardat. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Tabung reaksi III: 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi dragendorf. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan paling sedikit dua dari tiga percobaan diatas (Depkes RI, 1989).

### Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 1 gr serbuk dan serbuk nano teh celup bekas ditimbang lalu ditambahkan 10 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 gr serbuk magnesium dan 1 ml asam klorida pekat dan 2 ml amil alkohol lalu dikocok dan dibiarkan memisah. Reaksi positif jika terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1989).

### Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 1 gr serbuk dan serbuk nano teh celup bekas ditimbang, dididihkan selama 3 menit dalam 10 ml air suling lalu didinginkan dan disaring. Larutan diambil 2 ml ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Jika terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1989).

### Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 0,5 gr serbuk dan serbuk nano teh celup bekas, ditimbang dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 ml aquadest panas, didinginkan lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

### Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 1 gr serbuk dan serbuk nano teh celup bekas dimaserasi dengan 20 ml n-heksan selama 2 jam dan disaring. Filtrat sebanyak 5 ml diuapkan dalam cawan penguap lalu ditambahkan beberapa tetes pereaksi lieberman-burchard. Terbentuknya warna biru kehijauan menunjukkan adanya steroid dan terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoid (Depkes RI, 1989).

### Pemeriksaan Glikosida

Sebanyak 3 gr serbuk dan serbuk nano teh celup bekas disari dengan 30 ml campuran dengan 7 ml bagian etanol 96%, 3 ml bagian aquadest serta 10 ml bagian HCl 2N lalu direfluks selama 30 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 ml filtrat ditambahkan dengan 25 ml aquadest dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4M dikocok lalu didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrat disari dengan 20 ml campuran dengan 3 bagian kloroform dan 2 bagian isopropanol dan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Sari yang diperoleh diuapkan pada suhu 50oC. Sisanya dilarutkan dalam 2 ml metanol, lalu diambil 0,1 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diuapkan dipenangas air. Sisa ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes pereaksi molish kemudian secara perlahan ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin berwarna ungu menunjukkan adanya glikosida (Depkes RI, 1989).

## Pembuatan Serbuk Nano Teh Celup Bekas

Serbuk nano dibuat melalui serbuk teh celup bekas yang sudah dihaluskan menggunakan blender kemudian dihaluskan kembali menggunakan *Ball Mill*. Serbuk teh celup bekas yang diperoleh diayak menggunakan ayakan mesh 100 lalu diuji keseragaman partikel menggunakan *Particle Size Analyzer*(PSA) untuk menentukan ukuran partikel dari serbuk nano teh celup bekas (Syahrial & Handayani, 2020).

## Karakteristik Serbuk Nano

### Uji Ukuran Partikel Serbuk Nano

Serbuk nano yang dihasilkan diuji dengan menggunakan alat*Particle Size Analyzer*(PSA). Serbuk diambil lalu dimasukkan ke dalam kuvet yang sebelumnya sudah dibersihkan, tujuannya agar tidak mempengaruhi hasil analisis yang diperoleh. Kuvet yang telah diisi lalu dimasukkan ke dalam sampel holder, kemudian ukuran partikel dari serbuk teh celup bekas dapat diamati pada komputer (Destiyana & Rijal, 2018).

### Uji Morfologi Serbuk Nano

Morfologi serbuk nano dapat diamaati menggunakan *ScanningElectronMicroscopy* (SEM) dengan cara sampel dipreparasi terlebih dahulu dengan menempelkan serbuk pada double carbon tape yang telah tertempel pada holder. Setelah itu, hembuskan udara menggunakan blower ke arah serbuk untuk memastikan serbuk menempel kokoh pada carbon tape (Hoten, 2020).

## Formulasi Sediaan Masker Wajah Serbuk

Formulasi sediaan masker wajah serbuk diformulasikan dengan menggunakan zat aktif berupa serbuk dan serbuk nano teh celup bekas.

### Formula Dasar Sediaan Masker Wajah Serbuk

Formulasi sediaan masker wajah dibuat dengan menggunakan formula dasar dari (Wasitaatmadja, 1997).

R/ Zat Aktif (sampel) x

Kaolin 80 gram

TEA 3 gram

Magnesium Karbonat 12 gram

Tepung Beras 4 gram

Tragacant 1 gram

### Modifikasi Formula Sediaan Masker Wajah Serbuk Nano

Formulasi masker yang dimodifikasi dengan menambahkan serbuk dan serbuk nano dari teh celup bekas sebagai zat aktif sehingga diperoleh formula masker wajah pada Tabel 3.1 berikut:

Tabel 3.1Rancangan Formula Sediaan Masker Wajah

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Komposisi** | **F0** | **F1** | **F2** |
| Serbuk Teh Celup Bekas | 0 | 12,5 g | 12,5 g |
| Basis Masker | 100 g | 87,5 g | 87,5 g |

Keterangan:

F0 : Masker serbuk blanko

F1 : Masker serbuk teh celup bekas konsentrasi 12,5%

F2 : Masker serbuk nano teh celup bekas konsentrasi 12,5%

### Prosedur Pembuatan Masker Wajah

Adapun cara pembuatan sediaan serbuk masker wajah yang mengandung serbuk dan serbuk nano teh celup bekas yaitu: Ditimbang masing-masing bahan. Dimasukkan ke dalam lumpang kaolin beserta zat aktif laludigerushinggahomogen. Ditambahkantepungberas,TEA, magnesium karbonat dan tragacant lalu digerus kembali hingga homogen.

## Pemeriksaan Mutu Fisik Sediaan

Pemeriksaan mutu fisik dilakukan terhadap sediaan masker wajah serbuk. Pemeriksaan dilakukan terhadap mutu fisik, uji keamanan dan kesukaan serta aktivitas antibakteri terhadap sediaan masker wajah serbuk nano teh celup bekas. Evaluasi fisik sediaan meliputi: uji organoleptis, homogenitas, pH, daya lekat, daya sebar, uji waktu sediaan mengering, dan uji mikromeritik. Evaluasi uji keamanan dan kesukaan meliputi uji iritasi dan hedonisitas. Evaluasi aktivitas antibakteri meliputi uji daya hambat bakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*.

### Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis merupakan cara pengujian dengan menggunakan indra manusia sebagai media untuk menilai mutu produk, bau, rasa serta tekstur (Lubis *etal*., 2022).

### Uji Homogenitas

Sebanyak 1 gram masker dioleskan pada sekeping kaca transparan. Kemudian diamati sediaan harus menunjukkan sediaan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Lubis *etal*., 2022).

### Uji pH

Sebelum digunakan, pH meter dikalibrasi dengan menggunakan larutan buffer pH 7 dan 4. Elektroda yang digunakan dibilas dengan aquades sebelum dan setelah pengukuran. Sebanyak 1 gram serbuk diencerkan dengan air suling hingga 10 ml. Diambil larutan tersebut dan ditempatkan pada pH meter. Hasil pH akan muncul pada layar setelah beberapa saat. Campuran dihomogenkan dengan cara dibolak-balik selama 1 menit. Pembacaan pada alat pH meter dilakukan setelah 5 menit untuk memastikan angka sudah stabil dan tidak bergerak lagi (Lubis *etal*., 2022).

### Uji Daya Lekat

Masker yang telah berbentuk pasta ditimbang sebanyak 1 gram kemudian diletakkan diatas objek gelas setelah itu ditutup kembali menggunakan objek gelas yang lainnya lalu ditekan dengan beban 50 gram selama 1 menit. Diangkat salah satu objek gelas kemudian dicatat waktu pelepasan sediaan dari obyek gelas (Lubis *etal*., 2022).

### Uji Daya Sebar

Uji daya sebar dilakukan dengan menimbang masker sebanyak 0,5 gramdiletakkan di atas kaca berskala, bagian atasnya diberi kaca yang sama dan diberibeban 50 gram sampai diperoleh dayasebaryang konstanlalu diberi rentangwaktu1-2menit.Diameterpenyebarandiukurpadasaatsediaanberhentimenyebar(Voigt, 1984).

### Uji Waktu Sediaan Mengering

Uji waktu sediaan mengering dilakukan dengan cara mengoleskan sediaan ke punggung tangan dan diamati waktu yang diperlukan sediaan untuk mengering (Lubis *etal*., 2022).

### Uji Mikromeritik

Masukkan25gram masker serbuk teh celup bekas kedalamnomorayakanpaling kecil lalu tutup. Goyang pengayak dengan arah putaran horizontal dan ketukkansecara vertikal pada permukaan yang keras selama tidak kurang dari 20 menitmenggunakan alat *shieve shaker*. Timbang saksama jumlah yang tertinggal padapengayakdan dalam wadah penampung(DepkesRI, 2020).

## Uji Keamanan dan Kesukaan

### Uji Iritasi

Uji iritasi dilakukan terhadap 6 orang sukarelawan. Sediaan uji yang sudah berbentuk pasta dioleskan pada lengan bagian atas lalu diberi bahan penutup yang terdiri dari kertas saring berbentuk persegi dengan panjang 2 cm, alumunium foil dan plaster. Sediaan didiamkan selama kurang lebih 15 menit serta ditinjau perubahan yang dialami berupa iritasi pada kulit (Tama Octi R. Ramli & Mazaya Fadhila, 2022). Adapun kriteria panelis yang diikutkan pada uji iritasi:

1. Wanita
2. Usiaantara20-30 tahun
3. Berbadansehatjasmanidanrohani
4. Tidakmemilikiriwayatpenyakitalergi
5. Menyatakankesediaannyadijadikanpanelisujiiritasi

### Uji Hedonik

Uji kesukaan dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan panelis terhadap sediaan yang dibuat. Jumlah panel uji kesukaan makin besar semakin baik. Sebaiknya jumlah itu paling sedikit 20 orang panelis dengan cara setiap panelis memberikan penilaian terhadap masing-masing sediaan yang diperoleh, berdasarkan warna, bentuk dan bau. Adapun kriteria panelis yang diikutkan pada uji kesukaan:

1. Memiliki kepekaan dan konsentrasi yang tinggi.
2. Panelis tidak terlatih diambil secara acak.
3. Berbadan sehat.
4. Tidak dalam keadaan tertekan.
5. Mempunyai pengetahuan dan pengalaman tentang penilaian organoleptik.

Setiap panelis diminta untuk mengoleskan setiap sediaan masker wajah serbuk yang telah diformulasikan, pada kulit punggung tangannya, dan menilai warna, bentuk dan baunya. Kemudian mengisi lembar kuisoner yang telah disediakan dengan cara memilih (5) bila sangat suka (SS), (4) bila suka (S), (3) bila cukup suka (CS), (2) bila kurang suka (KS), dan (1) bila tidak suka (TS). Data yang diperoleh selanjutnya dihitung tingkat kesukaannya (Rahmatunnisa *etal.*, 2022).

## Uji Aktivitas Antibakteri

### Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi untuk alat-alat yang digunakan antara lain: Alat-alat yang terbuat dari gelas dibungkus dengan kertas perkamen, disterilkan menggunakan oven pada suhu 170oC selama 1 jam. Alat-alat atau bahan-bahan jenis lainnya seperti media disterilkan di autoklaf pada suhu 121oC selama 15 menit. Jarum ose dan pinset disterilkan dengan cara fiksasi/dibakar pada lampu bunsen. Sebelum mulai daerah sekitar pengerjaan disemprotkan dengan etanol 70% dan dibiarkan selama 15 menit sebelum digunakan. Meja dibersihkan dari debu dan dilap menggunakan cairan desinfektan (Irianto, 2006).

### Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Komposisi : Natrium klorida 0,9 g

Air steril ad 100 ml

Cara pembuatan :

Ditimbang sebanyak 0,9 g Natrium klorida kemudian dilarutkan dengan air suling steril sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 ml sampai larut sempurna, kemudian ditambahkan kembali air suling steril sampai garis tanda. setelah itu larutan tersebut dimasukkan dalam labu Erlenmeyer steril yang bertutup lalu disterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121oC selama 15 menit (Ditjen POM, 1979).

### Pembuatan Suspensi Standart Mc.Farland

Suspensi standart yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan suspensi mikroba sama dengan 108CFU/ml.

Komposisi : H2SO4  99,5 ml

BaCl2 0,5 ml

Cara pembuatan :

Sebanyak 99,5 ml H2SO4 1% dimasukkan ke dalam labu tentukur 100 ml, kemudian ditambahkan 0,5 ml BaCl2 1,175%. Kemudian kocok larutan tersebut sampai homogen dan kemudian ditutup. Apabila tingkat kekeruhan hasil suspensi mikroba sama dengan kekeruhan suspensi standart setara dengan konsentrasi mikroba 108 CFU/ml (Ditjen POM, 1979).

### Pembuatan Media Miring Nutrient agar

Komposisi : Beef extract 3,0 g

Pepton 5,0 g

Agar 12,0 g

Aquadest ad 1000 ml

Cara pembuatan :

Nutrient Agar (NA) sebanyak 1 g dilarutkan dalam 50 ml aquadest, dilarutkan dengan cara ditambahkan aquadest sedikit demi sedikit hingga NA tersebut larut sambil diaduk. Setelah itu larutan tersebut dipanaskan hingga hampir mendidih, lalu ditambahkan aquadest sedikit ke dalam larutan panas tersebut sambil diaduk perlahan hingga tampak larutan jernih. Kemudian tutup mulut labu erlenmeyer dengan kapas yang dibalut dengan kain kasa, kemudian disterilkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121oC selama 15 menit.

Sebanyak 10 ml media NA yang telah disiapkan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dan dibungkus mulut tabung lalu disterilkan di dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121oC. Kemudian tabung yang berisi agar diletakkan pada kemiringan 30-40oC. Diperhatikan bahwa media tidak menyentuh tutup tabung kemudian agar dibiarkan menjadi dingin dan padat.

### Pembuatan Media MHA

MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram (38g/L), kemudian dilarutkan kedalam 250 ml aquadest. Media dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna. Disterilisasi di dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121ºC. Tunggu hingga agak dingin sekitar 40-45ºC. Tuang media steril ke dalam tabung reaksi untuk membuat media agar (Retnaningsih *etal*., 2019).

### Identifikasi Bakteri (Pewarnaan Gram)

Ambil1-2tetesaquadeststerildiletakkandi atas kacaobjek,kolonibakteridiambilsatuosedarimediadiletakkandi atasaquadeststerildansebarkan hingga merata, biarkan olesan tersebut kering karena udara. Setelaholesan benar-benar kering kemuadian lewatkan kaca objek tersebut beberapa kalidi atas nyala api sampai kaca objek terasa agak panas bila ditempelkan padapunggung tangan. Kemudian ditetesi dengan larutan kristal ungu (gram A), dandidiamkan selama satu menit, kemudian cuci menggunakan aquadestpada botolsemprot dan dikeringkan. Selanjutnya ditetesi dengan larutan iodium (gram B)dan dibiarkan selama 2 menit, dicuci menggunakan aquadestpada botol semprotdan dikeringkan. Kemudian ditetesi dengan larutan etanol 95% (gram C) selama30 detik, dicuci menggunakan aquadestpada botol semprot dan dikeringkan.Setelahituditetesidenganlarutansafranin(gramD)atauzatpenutupdandidiamkan selama 30 detik, kemudian dicuci menggunakan aquadestpada botolsemprot dan dikeringkan. Selanjutnya diamati dengan menggunakan mikroskoppada pembesaran kuat (Waluyo, 2010).

### Peremajaan Bakteri

Bakteri *Propionibacteriumacnes* dan *Staphylococcusepidermidis* diambil dengan menggunakan kawat ose steril dari kultur murninya. Lalu diinokulasikan dalam media agar, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37ºC selama 1x24 jam (Retnaningsih *et al*., 2019).

### Uji Aktivitas Antibakteri

Siapkan media Mueller Hilton Agar (MHA) yang telah dibuat dalam cawan petri. Homogenkan suspensi biakan bakteri yang telah sesuai dengan standar Mc Farland. Ambil suspensi dengan cara mengoleskan cotton swab steril keseluruh bagian media sehingga inokulum terdistribusi secara merata. Tempatkan cakram yang telah direndam dengan larutan uji pada berbagai konsentrasi (3,125; 6,25; 12,5; 25; dan 50%) pada permukaan media. Posisikan cawan secara terbalik dan inkubasi pada suhu 37ºC selama 1x24 jam. Setelah itu, diukur zona hambat pertumbuhan bakteri menggunakan jangka sorong. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik clindamisin dan sebagai kontrol negatif digunakan DMSO. Penelitian diulangi sebanyak tiga kali.

### Uji Antibakteri Pada Sediaan

Uji aktivitas antibakteri pada sediaan menggunakan metode difusi sumuran. Inokulasi suspensi bakteri menggunakan metode cawan tuang. Uji aktivitas antibakteri diawali dengan penyiapan cawan petri steril yang ditambahkan dengan 1 ml suspensi bakteri. Kemudian masukkan media MHA sebanyak 15 ml. Cawan petri ini kemudian digoyang-goyangkan untuk memperoleh suspensi bakteri yang homogen pada permukaan media. Langkah selanjutnya pada media tersebut dibuat lubang sumuran 6-8 mm, kemudian dimasukkan konsentrasi sediaan masker serbuk nano teh celup bekas (F0, F1, F2) serta kontrol positif menggunakan masker wajah yang ada dipasaran dan kontrol negatif berupa DMSO. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri diamati berdasarkan pengukuran diameter daerah hambat atau daerah zona bening yang terbentuk di sekeliling sumuran yang terbentuk menggunakan jangka sorong (Jamil *etal*., 2023).

## Analisis Data

Berdasarkan hasil data yang diperoleh maka untuk mengetahui pengaruh aktivitas antibakteri pada formulasi masker wajah serbuk nano teh celup bekas, data dianalisis dengan metode *One Way* Anova untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok data.