# **BAB III**

# **METODE PENELITIAN**

## 3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental(*True experimental*). Sampel yang digunakan adalah bonggol nanas.data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif dan kualitatif.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

Pada penelitian ini terdapat dua jenis variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah simplisia bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr), ekstrak bonggol nanas, essens dan nano essnes sheet mask ekstrak bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) konsentrasi 0 dan 12,5%. Variabel terikat yaitu karakteristik fisik simplisia, metabolit sekunder, aktivitas anti *acne* ekstrak bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr), karakteristik fisik sediaan *sheet mask*, stabilitas, uji keamanan sediaan *sheet mask* dan aktivitas anti *acne* sediaan.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Parameter simplisia bonggol nanas : makroskopik, mikroskopik, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, dan kadar air simplisia.
2. Parameter metabolit sekunder ekstrak bonggol nanas : senyawa alkaloid flavonoid, steroid, tannin, saponin, glikosid.
3. Parameter aktivitas anti *acne* ekstrak bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr: diameter daya hambat bakteri *Propionibacterium acnes*.
4. Parameter stabilitas: organoleptis, homogenitas, pH, ukuran partikel.
5. Parameter karakteristik fisik sediaan: daya serap dan keseragaman bobot.
6. Parameter keamanan: uji anti iritasi
7. Parameter aktivitas anti *acne* sediaan: diameter daya hambat terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*

## 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2023 – Mei 2024

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan dan di Laboratorium Nanomedicin Universitas Sumatera Utara.

## 3.3Bahan dan Peralatan

### 3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ekstrak bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr), asam klorida (HCl) pekat, raksa (II) klorida, aquadest,kalium iodide, iodium,bismut (II) nitrat, asam nitrat pekat, timbal (II) asetat, α-naftol, etanol, asam nitrat, besi (III) klorida, asam asetat anhidrat, asam klorida 2 N, media Muller Hinton Agar (MHA), bakteri *Propionibacterium acnes*, Gliserin (humko), Butilen glikol (Eastman Chemical Company), PEG-40 *Hydrogenated* castor oil (Nikko *Chemicals*) Xanthan Gum (Jungbunzlauer) , Nipagin (Sigma-Aldrich) , Nipasol (Sigma-Aldrich) , Etanol 96%, Parfum.

### 3.3.2 Peralatan Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas laboratorium, kertas saring, lumpang dan alu , pipet tetes (Onemed), pinset (Onemed), kaca objek (Onelab), timbangan analitik (Mettler Toledo)), *oven* (Memmert UN55), *ultrasonic homogenizer* (Biostellar Ultrasonic Cell Disrupter), homogenizer (Diab), wadah kedap udara, penyaring, *Particle Size Analyer* (Fritsch), lemari pendingin (Aqua), stopwatch, plat tetes, *rotary evaporator* (R-3 Buchi), hotplate (Thermo), blender (Philips), mikroskop, *cover glass*, inkubator, cawan petri, pH meter.

## 3.4 Pengumpulan dan Pembuatan Sampel

### 3.4.1 Pengumpulan Sampel

Objek penelitian ini terdiri dari buah nanas bongol (*Ananas comosus* (L.) Merr), yang diperoleh melalui pembelian dari penjual rujak di Jalan garu IIA, pengambilan sampel dilaksanakan secara acak, tanpa melakukan perbandingan dengan daerah lainnya.

### 3.4.2 Pengolahan Sampel

50 buah bonggol nanas dipisahkan dari daging buah nanas, lalu dicuci dengan air mengalir dan dipotong kecil-kecil. Setelah itu, bonggol nanas basah seberat 6 kg ditimbang, kemudian dikeringkan menggunakan *oven* pada suhu 40-50˚C selama kurang lebih 4 hari hingga diperoleh simplisia kering. Selanjutnya, simplisia kering diblender dan disaring dengan ayakan berukuran 60 mesh (Sumiati et al., 2020).

## 3.5Karakterisasi Simplisia

### 3.5.1 Pemeriksaan Makroskopik Simplisia

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) dengan cara memperhatikan warna, bentuk, bau dan ukurannya (Bilal & Sari Lubis, 2022).

### 3.5.2 Pemeriksaan Mikroskopik Simplisia

Pemeriksaan mikroskopik pada serbuk simplisia bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) dilakukan dengan meletakkan sampel serbuk bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr) di atas kaca objek. Kemudian, kaca objek ditetesi dengan kloralhidrat, ditutup menggunakan cover glass, dan dilakukan viksasi hingga transparan. Setelah itu, sampel diamati menggunakan mikroskop (Depkes RI., 1979).

### 3.5.3 Penetapan Kadar Abu Total

Lebih kurang 2-3 g zat yang telah digerus dan ditimbang saksama, masukkan ke dalam krus platina atau krus silikat yang telah dipijarkan dan ditara, ratakan. Pijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, dinginkan, timbang. Jika dengan cara ini arang tidak dapat dihilangkan, tambahkan air panas, saring melalui ker- tas saring bebas abu. Pijarkan sisa dan kertas saring dalam krus yang sama. Masukkan filtrat ke dalam krus, uapkan, pijarkan hingga bobot tetap, timbang. Hitung kadar abu terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

Kadar Abu Total = $\frac{Berat Abu}{Bobot simplisia}$ × 100%

### 3.5.4 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada Penetapan kadar abu, didihkan dengan 25 ml asam klorida encer P selama 5 menit, kumpulkan bagian yang tidak larut dalam asam, saring melalui 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 di udara (Depkes RI, 1989).

Kadar Abu Yang Tidak Larut Asam = $\frac{Berat Abu}{Bobot simplisia}$ × 100%

### 3.5.5 Penetapan Kadar Air

1. **Penjenuhan Toluen**

Sebanyak 200 ml toluen dimasukkan kedalam labu alas bulat, lalu ditambahkan 2 ml air suling, kemudian alat dipasang dan dilakukan destilasi selama 2 jam. Destilasi dihentikan dan dibiarkan dingin selama ±30 menit, kemudian volume air dalam tabung penerima dibaca dengan ketelitian 0,05 ml (Depkes RI, 1989).

1. **Penetapan Kadar Air Simplisia Dengan Metode Azeotrope**

Kemudian kedalam labu tersebut dimasukkan 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang saksama, lalu dipanaskan hati-hati selama 15 menit, setelah toluen mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes untuk tiap detik sampai sebagian besar air terdestilasi, kemudian kecepatan destilasi dinaikkan sampai 4 tetes tiap detik. Setelah semua air terdestilasi, bagian dalam pendingin dibilas dengan toluen. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian 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 terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (Depkes RI., 1995).

Kadar air = $\frac{(volume air akhir-volume air awal)}{berat simplisia}$ × 100%

### 3.5.6 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Keringkan serbuk (4/18) di udara, maserasi selama 24 jam 5,0 g serbuk dengan 100 ml etanol (95%), menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol (95%), uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105° hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap bahan yang telah diker ingkan di udara (Depkes RI, 1989).

Kadar Sari Larut Dalam Etanol = $\frac{Berat sari}{Bobot simplisia}$ ×FP×100%

### 3.5.7 Penetapan Kadar Sari Larut Air

Keringkan serbuk, maserasi selama 24 jam 5,0 g serbuk dengan 100 ml air kloroform P, menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan sisa pada suhu 105° hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen sari yang larut dalam air, dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

Kadar Sari Larut Dalam Air = $\frac{Berat sari}{Bobot simplisia}$×FP×100%

## 3.6 Pembuatan Ekstrak Bonggol Nanas

Pembuatan ektrak bonggol nanas dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Masukkan 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat halus yang cocok kedalam sebuah bejana, tuangi dengan 75 bagian cairan penyari, tutup, dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, serkai, peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Pindahkan ke dalam bejana tertutup, biarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya, selama 2 hari. Enap tuangkan atau saring (Depkes, 1979). Maserat lalu dipekatkan dengan alat rotary evaporator lalu ditimbang.

% rendemen = $\frac{Berat Ekstrak Kental Etanol}{Berat Simplisia Kering}$ x 100%

## 3.7 Pembuatan Larutan Pereaksi

### **3.7.1 Larutan Pereaksi Asam Klorida**

Sebanyak 17 mL asam klorida pekat diencerkan dalam aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### 3.7.2 Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 mL aquadest, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida kemudian larutkan dalam 10 mL air suling. Kedua larutan dicampurkan lalu ditambahkan aquadest hingga diperoleh larutan 100 mL (Depkes RI, 1989).

### 3.7.3 Larutan Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 mL aquadest, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### 3.7.4 Larutan Pereaksi Dragendorf

Sebanyak 8 g bismut (II) nitrat ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 20 mL asam nitrat pekat. Pada wadah lain ditimbang sebanyak 27,2 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 50 mL aquadest. Kemudian kedua larutan dicampurkan dan didiamkan sampai memisah sempurna. Larutan yang jernih diambil dan diencerkan dengan aquadest hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

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

Ditimbang sebanyak 15,7 g timbal (II) asetat dan dilarutkan dalam aquadest bebas CO2 hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### 3.7.6 Larutan Pereaksi Molish

Ditimbang sebanyak 3 g α-naftol, tambahkan beberapa tetes etanol kemudian dilarutkan dalam asam nitrat 0,5N hingga 100 mL (Depkes RI, 1989).

### 3.7.7 Larutan Pereaksi Besi (III) klorida 1%

Ditimbang 1 g besi (III) klorida, dilarutkan dalam aquadest sehingga diperoleh larutan sebanyak 100 mL (Depkes RI, 1989).

### 3.7.8 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2N

Sebanyak 5,5 mL asam sulfat pekat diencerkan dengan aquadest hingga 100 mL.(Depkes RI, 1989).

### 3.7.9 Larutan Pereaksi Lieberman-burchard

Sebanyak 5 mL asam asetat anhidrida dicampur perlahan dengan 5 mL asam sulfat pekat dan ditambahkan etanol hingga 50 mL (Depkes RI, 1989).

## 3.8 Skrining Fitokimia Ekstrak

### 3.8.1 Pemeriksaan Alkaloid

Ekstrak bonggol nanas sebanyak 1 g kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing sampel ditambahkan 2 mL asam klorida 2 N (suasana asam) dan ditambah aquadest sampai 9 mL, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring, filtrat yang diperoleh dipakai untuk uji alkaloid. Ke dalam 3 tabung reaksi dimasukkan 0,5 mL filtrat. Pada masing masing tabung reaksi:

1. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi mayer, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning.
2. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi bouchardat, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam.
3. Filtrat ditambahkan dengan 2 tetes larutan pereaksi dragendrorf, reaksi positif ditandai dengan terbentuknya endapan warna merah atau jingga.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan sekitarnya 2 reaksi dari 3 percobaan diatas (Depkes RI, 1989).

### 3.8.2 Pemeriksaan Flavonoid

Ekstrak bonggol nanas sebanyak 10 g masing-masing ditambahkan 100 Ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 mL. asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol lalu dikocok kemudian dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terbentuk warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alcohol (Depkes RI, 1989).

### 3.8.3 Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Ekstrak bonggol nanas ditimbang sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap kemudian ditambahkan 5 tetes asam asetat anhidrat dan 5 tetes asam sulfat pekat (pereaksi liberman-burchard). Terbentuknya warna ungu sampai merah ungu menunjukkan adanya triterpenoid dan terbentuknya warna biru hijau menunjukkan adanya steroid (Depkes RI, 1989).

### 3.8.4 Pemeriksaan Tanin

Ekstrak bonggol nanas ditimbang sebanyak 0,5 g ditambah 10 mL aquadest, dikocok dan disaring. Filtrat diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Larutan diambil 2 mL ditambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Depkes RI, 1989).

### 3.8.5 Pemeriksaan Saponin

Ekstrak bonggol nanas ditimbang sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL aquadest panas, didinginkan kemudian dikocok kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10cm. Penambahan 1 tetes larutan HCl 2 N, apabila busa tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

### 3.8.6 Pemeriksaan Glikosida

Ditimbang 3 g ekstrak bonggol nanas lalu disari dengan 30 mL campuran etanol 96%, aquadest dan HCl dengan perbandingan (7:3:10) lalu direfluks selama 2 jam, didinginkan kemudian disaring agar diperoleh filtrat. Diambil 20 mL filtrat ditambahkan dengan 25 mL aquadest dan 25 mL timbal (II) asetat 0,4 M kemudian dilakukan pengocokan dan diamkan selama 5 menit lalu disaring. Dilakukan tiga kali pengulangan, tiap kali dengan campuran isopropanol dan kloroform dengan perbandingan (2:3). Sari yang diperoleh diuapkan pada suhu 500C kemudian sisa dilarutkan dalam 2 mL metanol. Lalu diambil 0,1 masukkan dalam tabung reaksi dan diuapkan di penangas air. Sisa ditambah 2 mL air dan 5 tetes pereaksi Molish, lalu secara perlahan-lahan ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung untuk melihat hasil positif glikosida, jika positif hasilnya yaitu terbentuknya cincin berwarna ungu (Depkes RI, 1989).

## 3.9 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bonggol Nanas terhadap Bakteri *Propionibakterium acnes*

3.9.1 Sterilisasi Alat Peralatan gelas yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri telah dicuci dengan teliti dan dikeringkan. Peralatan tersebut kemudian ditutup di ujungnya menggunakan aluminium foil dan dibungkus dengan plastik. Cotton swab, media Mueller Hinton Agar (MHA) , NaCl dalam tabung reaksi, dan semua peralatan lainnya disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit(Pelezar & Chan, 2005)**.**

### 3.9.2 Pembuatan Larutan Standard Mc. Farland 0,5 %

Sebanyak 9,5 ml asam sulfat pekat 1 % dimasukkan ke dalam lalu tentukur 100 ml, kemudian ditambahkan 0,5 ml Barium clorida 1,175 %. Kemudian kocok larutan tersebut sampai homogen dan kemudian ditutup (Retnaningsih Agustina, 2019).

### 3.9.3 Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %

Natrium klorida ditimbang sebanyak 0,9 gram kemudian dilarutkan dalam aquades steril sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 mL hingga larut sempurna. Ditambahkan aquades steril sampai garis yang ditandai, dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril bertutup, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 121ºC pada 1 atm selama 15 menit (Bilal & Sari Lubis, 2022).

### 3.9.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Biakan bakteri diambil 1 ose kemudian dimasukkan kedalam 10ml larutan Nacl 0,9%, lalu dihomogenkan dengan vortex setelah itu samakan kekeruhannya denagn Mc Farlan 0,5% (Bilal & Sari Lubis, 2022).

### 3.9.5 Pembuatan Media Pembenihan 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 121º C. Tunggu hingga agak dingin sekitar 40-45ºC. Tuang media steril ke dalam tabung reaksi untuk membuat agar miring (Retnaningsih Agustina, 2019).

### 3.9.6 Peremajaan Bakteri *Propionibacterium acnes*

Bakteri *Propionibacterium acnes*  yang berasal dari biakan murninya, diambil sebanyak 1 Ose kemudian diinokulasikan dengan cara digores pada media MHA dengan metode agar miring kemudian diinkubasi pada suhu 37º C selama 18-24 jam (Kurama et al., 2020).

### 3.9.7 Uji Anti *acne* Dengan Metode Cakram

Uji aktivitas antibakteri ekstrak bonggol nanas dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram (disc). Kertas cakram ditotolkan kedalam masing-masing serial konsentrasi sediaan *sheet mask*. Kemudian Supensi bakteri di masukan kedalam erlenmeyer yang berisi 150 ml media padat kemudian dihomogenkan hingga bakteri suspense tercampur dengan media, selanjutnya media dituang kedalam cawan petri sebanyak 30 ml dan dibiarkan hingga memadat. Setelah memadat, letakkan kertas cakram pada media pengujian dan di inkubasi pada suhu 37º C selama 24 jam. Selanjutnya diukur zona hambat menggunakan jangka sorong (Kurama et al., 2020).

## 3.10 Formulasi Essens *Sheet mask* Ekstrak Bonggol Nanas

## **Penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi ekstrak bonggol nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr). F0 (0), F1(12,5), F2 (12,5). Formulasi sediaan ini adalah sebagai berikut (Rauyani, 2019):**

## **Rancangan formula dapat dijelaskan pada tabel** **3.1**

## Tabel 3.1 **Formula Sediaan Essens *Sheet mask* Ekstrak Bonggol Nanas**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **No** | **Nama bahan** | **Kegunaan bahan** | **Formulasi (g)** |
| **F0** | **F1 (Essens)** | **F2****(Nano essens)** |
| 1. | Ekstrak Bonggol Nanas | Zat aktif  | 0 | 12,5 | 12,5 |
| 2 | Gliserin | Pelembab  | 5 | 5 | 5 |
| 3. | Butilan glikol  | Pelembab  | 5 | 5 | 5 |
| 4. | PEG-40 *Hydrogenated castor oil* | Pengemulsi  | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 5. | Xanthan Gum | Pengental  | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 6.  | Nipagin  | Pengawet | 0,18 | 0,18 | 0,18 |
| 7. | Nipasol  | Pengawet | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| 8. | Etanol 96% | Pelarut  | 2 | 2 | 2 |
| 10. | Aquadest  | Pelarut  | ad 100 | ad 100 | ad 100 |

Keterangan :

F0 : Formula Blanko Essens *Sheet mask* mengandung 0g Ekstrak bonggol nanas

F1 : Formulasi Essens *Sheet mask* mengandung 12,5 g ekstrak bonggol nanas

F2 : Formulasi Nano Essens *Sheet mask* mengandung 12,5 g Ekstrak bnggol nanas

### 3.10.1 Pembuatan Essens *Sheet mask* Ekstrak Bonggol Nanas

Dikembangkan 0,33 g xantan gum sedikit demi sedikit dengan menambah beberapa aquades dalam lumpang (massa I). Dilarutkan 0,198 g nipagin dalam air panas dan 0,022 gram nipasol dalam etanol (massa II). Dicampur massa I dengan II (massa III). Sebanyak 5,5 g gliserin dan 0,11 mL PEG-40 *Hydrogenated Castor Oil*dimasukkan ke cawan penguap lalu dihomogenkan (massa IV). Masing-masing ekstrak dalam tiap formula (0 dan 12,5 g) dilarutkan dengan penambahan 5,5 mL butilen glikol dalam lumpang berdasarkan variasi yang sudah ditetapkan ke basis essence (massa V), kemudian dicampurkan massa III dengan massa IV sampai homogen (massa VI). Kemudian massa V ditambahkan ke dalam massa VI Ditambahkan etanol, dan dicukupkan dengan aquades lalu dihomogenkan. *Sheet mask* atau compressed mask yang digunakan dari serat kertas non woven merk “ELOV”. Dilipat compressed mask kosong berdasarkan ukuran kemasan (9 × 13 cm) lalu dimasukkan ke kemasan *foil bag.* Ditimbang 30 mL sediaan lalu dituangkan ke foil bag yang sudah terisi compressed mask(Rauyani, 2019).

### 3.10.2. Pembuatan Nano Essens *Sheet mask* Ekstrak Bonggol Nanas

Sediaan Essens *Sheet mask* bonggol nanas diaduk dengan *homogenizer* dengan kecepatan 1.700 rpm selama 1 jam. Kemudian dimasukkan ke dalam *ultrasonic homogenizer* selama 1 jam (Yosephine et al., 2023).

## 3.11Uji Stabilitas

### 3.11.1 Uji Organoleptis

Pengujian organoleptis dilaksanakan dengan mengamati secara langsung, bertujuan untuk memahami bentuk, warna, dan aroma sediaan. Observasi organoleptis untuk semua formulasi *sheet mask* dilakukan pada hari 0, 7, 14, dan 21(Khoyrill Muttiin & Lubis, 2021).

### 3.11.2 Uji Homogenitas

Homogenitas diuji dengan mengambil sediaan dan mengoleskannya secara merata di atas suatu objek kaca atau bahan transparan yang sesuai, sehingga susunan yang homogen dapat diamati tanpa adanya partikel kasar yang terlihat. Pengujian ini dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (Sinaga et al., 2023).

### 3.11.3 Uji pH Sediaan

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pengukur pH. Sediaan ditempatkan di alat pengukur pH tersebut. Tiap formulasi diharuskan mencakup kisaran pH yang sesuai dengan kisaran pH kulit sekitar 4,5-6,5 dilakukan tiga kali pengulangan (Kusumawati et al., 2020).

### 3.11.4 Uji Ukuran Partikel Sediaan

Sediaan dari masing-masing formula diukur partikelnya menggunakan PSA (*Partikel Size Analizer)*.

**3.12 Uji Karakteristik Fisik Sediaan**

**3.12.1 Uji Daya Serap**

Ditimbang Kertas *sheet mask*sebanyak 5 buah, kemudian ditetesi denganair, menggunakan buret. Lalu diamatijumlah air yang mampu diserap sampaisediaan dan air memisah, uji daya serap airdiukur sebagai bilangan air yang digunakanuntuk mengkarakterisasi basis absorpsi(Voigth.R., 1995).

$$\frac{Berat basah - Berat kering}{Bobot basah}×100\%$$

**3.12.2 Uji Keseragaman Bobot Sediaan**

Sediaan *sheet mask* ditimbang sebanyak 10 sediaan, hitung bobot rata-rata tiap sediaan. Jika ditimbang satu persatu, tidak boleh lebih dari dua sediaan *sheet mask* yang masing-masing bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih besar dari harga yang ditetapkan kolom A dan tidak satu buahpun yang bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih dari harga yang ditetapkan kolom B (Depkes RI., 1979).

## 3.13 Uji Anti Iritasi

Uji iritasi dilakukan dengan patch test dengan penutup berupa plester Dermafix t, dilakukan pada enam sukarelawan yang memenuhi kriteria. Sediaan uji akan dioleskan/ditempelkan pada kulit lengan kanan bagian atas peserta selama 48 jam. Tiap 24 jam reaksi kulit dievaluasi dengan mengamati reaksi berupa merah, gatal, dan edema. Dalam 48 jam uji, peserta tidak boleh mencuci lengan kanan bagian atas, lengan yang sedang diuji tidak boleh terkena air dan tidak boleh diusap (Ervina et al., 2022).

## 3.14 Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Essens dan Nano Essens *sheet mask* terhadap Bakteri *Propionibakterium acnes*

3.14.1 Sterilisasi Alat Peralatan gelas yang akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri telah dicuci dengan teliti dan dikeringkan. Peralatan tersebut kemudian ditutup di ujungnya menggunakan aluminium foil dan dibungkus dengan plastik. Cotton swab, media MHA, NaCl dalam tabung reaksi, dan semua peralatan lainnya disterilkan menggunakan autoklaf dengan tekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit(Pelezar, 2005)**.**

### 3.14.2 Pembuatan Larutan Standard Mc. Farland 0,5 %

Sebanyak 9,5 ml asam sulfat pekat 1 % dimasukkan ke dalam lalu tentukur 100 ml, kemudian ditambahkan 0,5 ml Barium clorida 1,175 %. Kemudian kocok larutan tersebut sampai homogen dan kemudian ditutup (Retnaningsih Agustina, 2019).

### 3.14.3 Pembuatan Larutan NaCl 0,9 %

 Natrium klorida ditimbang sebanyak 0,9g kemudian dilarutkan dalam aquades steril sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 mL hingga larut sempurna. Ditambahkan aquades steril sampai garis yang ditandai, dimasukkan ke dalam erlenmeyer steril bertutup, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada tekanan 121ºC pada 1 atm selama 15 menit (Bilal & Sari Lubis, 2022).

### 3.14.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Biakan bakteri diambil 1 ose kemudian dimasukkan kedalam 10ml larutan Nacl 0,9%, lalu dihomogenkan dengan vortex setelah itu samakan kekeruhannya denagn Mc Farlan 0,5% (Bilal & Sari Lubis, 2022).

### 3.14.5 Pembuatan Media Pembenihan 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 121º C. Tunggu hingga agak dingin sekitar 40-45ºC. Tuang media steril ke dalam tabung reaksi untuk membuat agar miring (Retnaningsih Agustina, 2019).

### 3.14.6 Peremajaan Bakteri *Propionibacterium acnes*

Bakteri *Propionibacterium acnes* yang berasal dari biakan murninya, diambil sebanyak 1 Ose kemudian diinokulasikan dengan cara digores pada media MHA dengan metode agar miring kemudian diinkubasi pada suhu 37ºC selama 18-24 jam (Kurama et al., 2020).

### 3.14.7 Identifikasi Bakteri

Pewarnaan gram dilakukan dengan cara satu tetes akuades di teteskan pada kaca objek, selanjutnya koloni bakteri diambil dan dihomogenkan pada aquadest selanjutnya dikeringkan dan difiksasi diatas Bunsen. Olesan bakteri ditetesi dengan Kristal violet selama 3-5 menit, lalu dialiri dengan air. Olesan bakteri selanjutnya ditetesi larutan lugol selama 1 menit, selanjutnya ditetesi alkohol 96% selama 10 detik sampai zat warna luntur, lalu dialiri dengan air. Pewarna safranin diteteskan pada olesan bakteri selama 1 menit, lalu dialiri dengan air. Hasil pewarnaan gram diamati dengan mikroskop (Ginting, 2018).

### 3.14.8 Uji Anti *acne* Dengan Metode Cakram

Uji aktivitas antibakteri dari sediaan *sheet mask* nanopartikel ekstrak bonggol nanas dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram (disc). Kertas cakram ditotolkan kedalam masing-masing serial konsentrasi sediaan *sheet mask*. Kemudian Supensi bakteri di masukan kedalam erlenmeyer yang berisi 150 ml media padat kemudian dihomogenkan hingga bakteri suspense tercampur dengan media, selanjutnya media dituang kedalam cawan petri sebanyak 30 ml dan dibiarkan hingga memadat. Setelah memadat, letakkan kertas cakram pada media pengujian dan di inkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam. Selanjutnya diukur zona hambat menggunakan jangka sorong. lakukan pengulangan pada konsentrasi selanjutnya.Sebagai kontrol positif digunakan dua produk antibiotik Klindamisin dan *sheet mask* dari ekstak buah nanas dan sebagai kontrol negatif digunakan DMSO. Penelitian diulangi sebanyak tiga kali (Kurama et al., 2020).

Keterangan:

* Positif : Jika terjadi zona hambat (zona bening) disekitar kertas cakram.
* Negatif : Tidak terjadi zona hambat (zona bening) disekitar kertas cakram

## 3.15 Metode Pengolahan Data

Berdasarkan data yang diperoleh, untuk menilai dampak aktivitas antibakteri pada formulasi sediaan essens dan nano essens *sheet mask* Bonggol Nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.).Dalam penelitian ini, metoda pengolahan data menggunakan komputer dengan software SPSS (Statistical Package For Social Sciences) versi 26. SPSS digunakan untuk mendapatkan hasil perhitungan yang akurat serta cepat dalam pengolahan data. Data yang diperoleh dalam penelitian ini akan disajikan dalam bentuk tabel agar sistematis untuk menganalisis dan lebih mudah dipahami.