

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Populasi adalah semua objek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) yang diperoleh dari petani di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

##### **2. Sampel**

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang dijadikan sumber informasi bagi semua data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian (sampel merupakan bagian dari populasi). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) yang dibuat sediaan emulgel dengan kadar 15%, 20%, dan 25%. Pengambilan rimpang jahe merah pada 13 febuari 2019 sebanyak 60 kg, tanaman rimpang yang dipilih dalam kondisi siap panen berumur 8-10 bulan setelah tanaman yang diambil secara acak dalam keadaan bersih, segar, tidak busuk, dan bebas penyakit.

#### **B. Variabel Penelitian**

##### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diinfeksi pada punggung kelinci.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri emulgel minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) dengan kadar 15%, 20%, dan 25%.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri pada sediaan *emulgel* rimpang jahe merah dengan kadar 15%, 20%, dan 25% terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## **2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *emulgel* minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) dengan konsentrasi 15%, 20%, dan 25%.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu di tetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah proses pembuatan minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*), pembuatan sediaan *emulgel*, pemilihan hewan uji kelinci dengan kondisi (berat badan, kesehatan, lingkungan tempat tinggal, dan kebersihan) yang sehat, kedalaman pencukuran bulu, tempat tumbuh tanaman, sterilisasi, kondisi peneliti, dan kondisi laboratorium.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam suatu penelitian. Variabel tergantung dari penelitian ini adalah adanya aktivitas antibakteri *emulgel* minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*) terhadap kulit kelinci yang dapat dilihat dari proses mutu fisik sediaan, kesembuhan lukanya dan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari nanah.

## **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, rimpang jahe merah (*Zingiberofficinale* var. *rubrum*) adalah rimpang jahe merah yang diambil secara acak dari petani di Tawangmangu,

Karanganyar, Jawa Tengah, dengan ciri rimpang jahe merah yang sudah siap panen berumur 8-10 bulan setelah masa tanam, dan bebas dari penyakit.

Kedua, rimpang jahe merah dicuci dengan menggunakan air mengalir yang bertujuan untuk membersihkan kotoran yang masih menempel, kemudian rimpang jahe merah kulitnya dikupas dan dipotong-potong. Minyak atsiri rimpang jahe merah adalah minyak atsiri hasil destilasi rimpang jahe merah dengan menggunakan metode destilasi uap air.

Ketiga, konsentrasi masing-masing minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiberofficinale var. rubrum*) yang di formulasikan kedalam sediaan emulgel adalah 15%, 20%, dan 25%.

Keempat, kelinci percobaan adalah kelinci jantan putih (New Zealand White) berumur  $\pm$  3-5 bulan, berat kelinci 1,5-2 kg dan kulit punggung kelinci adalah bagian punggung kelinci yang telah dicukur.

Kelima, bakteri uji dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Setia Budi.

Keenam, uji aktivitas antibakteri secara *in vivo* adalah uji daya penyembuhan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang di infeksi secara subkutan, kemudian dibalut perban steril dan dibiarkan selama 48 jam hingga terjadi infeksi kemudian dioleskan sediaan *emulgel* minyak atsiri rimpang jahe merah.

Ketujuh, kesembuhan adalah proses sembuhnya kelinci dari hilangnya eritema, tidak terbentuknya nanah dan keringnya luka dalam hitungan hari.

Kedelapan, perhitungan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari nanah adalah perhitungan jumlah koloni secara makroskopis dilakukan dengan cara menghitung jumlah pertumbuhan bakteri menggunakan metode *Plate count*.

## **C. Bahan dan Alat**

### **1. Bahan**

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak atsiri rimpang jahe merah diambil dari BPTO (Badan Penelitian Tanaman Obat) pada 13 febuari 2019 sebanyak 60 kg, tanaman rimpang yang dipilih dalam kondisi siap panen berumur 8-10 bulan setelah tanaman yang diambil secara acak dalam keadaan bersih, segar, tidak busuk, dan bebas penyakit. Bahan kimia digunakan adalah HPMC, propilen glikol, propil paraben, metil paraben, span 80, tween 80, parafin cair, air suling, alkohol 70%, cat kristal violet, lugol iodine, etanol aseton, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dan kontrol positif gentamicin. Media yang digunakan adalah, *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Brain Heart Infusion* (BHI), Kalium Tellurit, dan Plasma sitrat.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kondensor, dandang besar, timbangan, neraca gram analitik, gelas ukur, erlenmeyer, gelas Beker, tabung reaksi, pengaduk kaca, corong kaca, oven inkubator, piknometer, wadah emulgel, vial, stamfer dan mortir, cawan, kertas saring, cawan petri, jarum ose, pipet tetes, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, viskometer, pH meter, botol gelap minyak atsiri, alat cukur hewan percobaan, jarum suntik, alat GC-MS.

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci jantan putih (New Zealand White) berumur  $\pm$  3 bulan, berat 1,5-2 kg yang diperoleh dari laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Identifikasi determinasi tanaman**

Tahap awal dalam pegujian ini adalah mengidentifikasi/determinasi tanaman rimpang jahe merah dengan tujuan untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman rimpang bangle dan lengkuas merah dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi yang ada pada rimpang bangle dan lengkuas merah yang dilakukan di Laboratorium Morfologi dan Sistemik Tumbuhan, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

## **2. Pengambilan bahan**

Bahan uji yang digunakan adalah rimpang jahe merah yang diambil dari Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Jahe merah yang diambil untuk uji adalah bagian rimpang. Jahe merah dipisahkan dari rimpang yang masih segar dan yang sudah busuk, lalu dibersihkan dari kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing seperti tanah, serangga, daun, rumput, akar yang telah rusak.

## **3. Isolasi minyak atsiri**

Rimpang jahe merah disortir dan dicuci dengan menggunakan air mengalir agar kotoran yang menempel pada rimpang jahe merah menghilang. Kemudian rimpang jahe merah dipotong menjadi lebih kecil, dimasukkan kedalam alat penyulingan minyak dan air yang menyerupai dandang dengan penyangga berlubang yang telah berisi air. Penyulingan dilakukan diatas api sampai air mendidih. Uap air yang dihasilkan dialirkan pada pipa kebagian kondensor dan mengalami proses kondensasi, bersama dengan uap air tersebut minyak atsiri dari rimpang jahe merah terbawa. Penyulingan minyak atsiri jahe merah dilakukan selama 6 jam. Pemanasan dilakukan dengan api sampai penyulingan dihentikan setelah tidak ada penambahan minyak, kemudian tampung hasil destilat dan jumlah volume yang dihasilkan.

Minyak yang didapat kemudian dilakukan pemisahan antara fase air dan fase minyak menggunakan corong pisah dengan penambahan natrium sulfat anhidrat sampai jenuh kemudian dipisahkan dan hitung kadarnya. Minyak atsiri rimpang jahe merah yang sudah didapat disimpan dalam botol kaca coklat dan di tempat yang sejuk, hal ini dilakukan untuk menghindari minyak atsiri yang didapat tidak rusak dan teroksidasi.

## **4. Analisa minyak atsiri**

**4.1 Pengamatan organoleptik.** Pengamatan organoleptik terhadap minyak atsiri meliputi warna, aroma, bentuk, dan rasa dari minyak. Warna minyak atsiri hasil destilasi masing-masing sampel diambil volume sama dan ditempatkan dalam sebuah wadah berbahan kaca yang bersih dan jernih. Minyak atsiri memiliki rasa dan bau yang khas sesuai dari tanaman asalnya. Pada keadaan murni mudah menguap pada suhu kamar sehingga bila ditetaskan pada selembat

kertas maka ketika dibiarkan akan menguap, tidak meninggalkan bekas noda pada benda yang ditempel (Gunawan & Mulyani 2004).

**4.2 Identifikasi minyak atsiri.** Identifikasi minyak atsiri dengan cara ditetaskan pada permukaan air, minyak atsiri akan menyebar dan permukaan air tidak akan keruh. Minyak atsiri ditetaskan pada kertas saring, jika dibiarkan minyak akan menguap sempurna tanpa meninggalkan noda lemak (Gunawan & Mulyani 2004).

**4.3 Penetapan indeks bias minyak atsiri.** Penetapan indeks bias ditetapkan dengan alat refraktometer dan diulang sebanyak tiga kali. Badan prisma dibuka dan kemudian dibersihkan dengan kapas yang telah dibasahi alkohol. Refraktometer diatur sehingga garis dan skala tampak jelas, mencatat suhu ruang tempat bekerja kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma dan kemudian ditutup kembali. Pemutar sebelah kanan diatur sehingga batas gelap dan terang pada garis dan dibaca skala dicatat indeks biasnya (Irawan 2009).

**4.4 Penetapan bobot jenis minyak atsiri.** Penetapan bobot jenis ditetapkan dengan cara botol timbang dikeringkan dengan oven, kemudian ditimbang botol kosong dan dicatat hasilnya. Minyak atsiri rimpang jahe merah ditimbang dalam botol timbang dan catat hasilnya, penimbangan diulang sebanyak tiga kali. Data hasil penimbangan botol ditimbang dan minyak atsiri rimpang jahe merah dikurangkan bobot botol timbang kosong sehingga didapatkan bobot minyak atsiri. Dibandingkan bobot minyak dengan bobot air sehingga didapatkan bobot jenis dari minyak atsiri.

Bobot jenis = (bobot timbang + air) – bobot timbang kosong = (bobot air)

$$\text{Bobot jenis minyak atsiri} = \frac{\text{bobot minyak}}{\text{bobot air}}$$

**4.6 Penetapan karakteristik komponen senyawa penyusun minyak atsiri dengan Gas Chromatography – Mass Spectrometry (GC-MS).** Pengujian komponen senyawa penyusun minyak atsiri rimpang jahe merah menggunakan GC-MS Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), Shimadzu GCMS-QP2010S (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dilengkapi dengan Capillary Column Model Number: Agilent 19091S-433

HP-5MS 5% Phenyl Methyl Siloxane (diameter dalam 250  $\mu\text{m}$ , panjang 30 m, dan ketebalan film 0.25  $\mu\text{m}$ ) dan detektor yang digunakan FID. Kondisi GC: suhu awal 60°C dinaikkan sampai 250°C (4°C/menit) kemudian pada suhu 250°C dipertahankan selama 20 menit, gas pembawa Helium dengan kecepatan aliran 20 ml/min. Senyawa diidentifikasi dengan membandingkan retention index dan membandingkan mass spectra dengan yang ada di database wiley library dan NIST library (Adams 2004).

### **5. Formula emugel**

Formula dirancang dengan variasi konsentrasi minyak atsiri rimpang jahe merah pada tiap formula. Rancangan formula emulgel antibakteri minyak atsiri rimpang jahe merah dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Rancangan Formula Emulgel antibakteri minyak atsiri rimpang jahe merah**

Bahan	Satuan	Negatif	Positif	F1	FII	FII
Minyak Atsiri Rimpang Jahe Merah	%	0	0	15	20	25
HPMC	%	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Parafin cair	%	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
Span 80	%	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Twen 80	%	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Propilen Glikol	%	5	5	5	5	5
Propilparaben	%	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Metil Paraben	%	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Aquades ad	ml	100	100	100	100	100

## 6. Pembuatan sediaan emulgel

Pembuatan emulgel dilakukan sesuai komposisi formula yang tertera pada tabel. Semua bahan untuk pembuatan emulgel ditimbang terlebih dahulu dengan seksama. Kemudian dilakukan pembuatan basis emulgel dengan cara pembuatan emulsi fase minyak dibuat dengan mencampurkan span 80 dengan paraffin cair pada suhu 70°C. Fase air dibuat dengan mencampurkan tween 80 dengan sebagian air pada suhu 70°C. Fase minyak dimasukkan kedalam fase air pada suhu 70°C sambil terus diaduk dengan pengaduk hingga terbentuk emulsi. Kemudian pembuatan gel dengan mendispersikan HPMC dengan sedikit demi sedikit air panas dengan suhu 80°C, digerus sampai terbentuk basis gel. Metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam propilen glikol, lalu dicampurkan dengan gel. Kemudian emulsi dan gel yang sudah terbentuk dicampur dengan homogenizer pada kecepatan 300 rpm selama 45 menit sampai terbentuk emulgel. Penambahan zat aktif minyak atsiri rimpang jahe merah dicampurkan ditengah atau diakhir pada pembuatan sediaan emulgel, ketika sediaan emulgel sudah dingin. Apabila sediaan emulgel masih panas, kemudiaan zat aktif minyak atsiri dicampurkan. Mengakibatkan zat aktif minyak atsiri menguap, karena minyak atsiri tidak tahan terhadap suhu panas dan mudah menguap.

## 7. Pembuatan kontrol

**7.1 Kontrol negatif.** Kontrol negatif yang digunakan adalah emulgel yang tidak mengandung minyak atsiri rimpang jahe merah.



**7.2 Kontrol positif.** Kontrol positif yang digunakan adalah gel klindamisin.

**7.3 Kontrol normal.** Kontrol normal adalah kulit punggung kelinci tanpa pelakuan.

## **8. Pengujian sifat fisik sediaan emulgel**

**8.1 Uji organoleptik.** Uji organoleptik dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara melakukan pengamatan bau, warna, dan tekstur dari sediaan yang telah dibuat (Djajadisastra 2009).

**8.2 Uji homogenitas.** Sejumlah tertentu sediaan dioleskan pada dua keping kaca atau bahan transparan lain yang cocok, sediaan homogen apabila tidak terlihat adanya butiran kasar (Ditjen POM, 1979).

**8.3 Pengujian tipe emulsi.** Dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran. Sejumlah tertentu sediaan emulgel diteteskan ke dalam 30 mL air. Emulgel tipe m/a akan terdistribusi secara merata pada medium air. Emulgel tipe a/m tidak akan terdistribusi merata pada permukaan air (Shovyana, 2013).

**8.4 Uji pH.** Sediaan gel diukur pH nya menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi (Sudjono *et al* 2012)

**8.5 Uji viskositas.** Viskositas merupakan faktor penting dalam peningkatan stabilitas gel dan membuat suatu bentuk sediaan mudah di aplikasikan. Seorang farmasis akan mempertimbangkan viskositas untuk meningkatkan stabilitas sediaan yang diformulakan (Allen 2002). Penetapan viskositas gel dilakukan dengan menggunakan viskometer VT-04 yang telah dikalibrasi untuk VT-04 adalah desipaskal detik (d-pas). Pengujian dilakukan pada minggu pertama dan ketiga (Sayuti 2005).

**8.6 Uji daya lekat.** Gel diletakan di obyek yang telah ditentukan luasnya. Gelas obyek yang telah diletakan di atas gel tersebut dan ditekan dengan beban 1 kg selama 15 menit, kemudian gelas obyek dipasangkan pada alat tes. Selanjutnya beban seberat 80 gram dilepaskan dan dicatat waktunya sehingga kedua gelas obyek tersebut terlepas. Masing – masing percobaan direplikasi 3 kali untuk setiap gel yang diperiksa. Uji dilakukan pada minggu pertama dan setelah penyimpanan selama 3 minggu.

**8.7 Uji daya sebar emulgel.** Pengujian daya sebar gel dilakukan dengan alat ekstensometer,  $\pm 0,5$  gram diletakan di tengah alat (kaca bulat), kaca bulat bagian atas ditimbang terlebih dahulu dan diletakan di atas massa gel, dibiarkan selama 1 menit, diukur diameter gel yang menyebar (diambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi), ditambah 50 gram, 100 gram, 150 gram, dan 200 gram. Sebagai beban tambahan secara bertahap, setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit dan dicatat diameter gel yang menyebar seperti sebelumnya. Cara diatas diulangi untuk setiap formula gel yang diperiksa masing – masing 3 kali. Uji dilakukan pada minggu pertama dan setelah penyimpanan selama 3 minggu.

**8.8 Uji stabilitas sediaan emulgel.** Pengujian dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu dengan menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 48 jam kemudian dipindahkan ke suhu 40°C selama 48 jam (1 siklus). Setelah itu dilanjutkan sampai lima siklus. Setiap satu siklus selesai, dilihat ada tidaknya pemisahan fase atau perubahan, uji pH dan uji viskositas gel (Priani *et al.*, 2014).

## **9. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

**9.1 Identifikasi mikroorganisme secara isolasi.** Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasi pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah di tetesi 3 tetes kalium telurit 1% dalam cawan Petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna medium di sekitar koloni kuning. Kemampuan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat memfermentasi manitol membentuk suasana asam dan fenol red maka medium di sekitar koloni berwarna kuning (Jawet *et al.* 2007).

**9.2 Identifikasi morfologi secara pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol aseton = 1 : 1 sebagai peluntur), dan Gram D (cat sarfania sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara buat preparat ulas yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan aquadestilata mengalir dan

dikeringkan anginkan, preparat dilunturkan dengan Gram C didiamkan selama kurang lebih 30 detik, dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit, cuci dengan aquadestilata mengalir kemudian keringkan preparat. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dinyatakan positif apabila berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop.

**9.3 Identifikasi fisiologi secara biokimia.** Identifikasi secara fisiologi ada dua cara yaitu uji katalase dan koagulase.

**9.3.a Uji koagulase.** Uji koagulase dapat dilakukan dengan cara menginokulasikan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ke dalam BHI 10 ml kemudian diinkubasi selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C. Inokulum tersebut dipindahkan sejumlah 0,2 - 0,3 ml ke dalam tabung reaksi yang sudah disterilkan kemudian ditambahkan 0,5 ml koagulase plasma kemudian di aduk dan diinkubasi pada suhu 37°C. Diamati tiap jam sampai empat jam pertama dan dilanjutkan sampai 24 jam. Hal ini dimaksudkan untuk melihat atau mengecek koagulan yang terbentuk. Koagulan yang terbentuk secara padat atau solid serta tidak jatuh apabila tabung dibalik dinyatakan positif bahwa bakteri tersebut memang *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

**9.3.b Uji katalase.** Suspensi bakteri uji ditanam pada media Vogel Johnson Agar (VJA) kemudian diinkubasi selama 24 jam dan suhu 37°C, lalu ditambahkan 2-3 tetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mempunyai katalase. Penambahan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> akan terurai menjadi 2H<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>, hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara.

## **10. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Pembuatan suspensi untuk difusi dengan cara membuat terlebih dahulu media *Brain Heart Infusion* (BHI). Media *Brain Heart Infusion* (BHI) di autoklaf terlebih dahulu agar media steril. Mengambil biakan murni kurang lebih 2 Ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) yang telah di autoklaf dan diinkubasi selama 1 hari. Kekерuhan media *Brain Heart Infusion* (BHI) disesuaikan dengan

kekeruhan standar *Mc Farland* 0,5 setara dengan jumlah  $1,5 \times 10^8$  cfu/mL. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan standar *Mc Farland* 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian.

### **11. Pengujian aktivitas antibakteri**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci jantan putih sebanyak 5 ekor dengan umur  $\pm$  3 bulan dengan berat  $\pm$  1,5-2 kg. Hewan uji kelinci yang sudah diaklimatisasikan selama 5 hari dicukur bulu pada punggung kelinci kemudian dipilih 5 lokasi penyuntikkan dibagian kiri dengan jarak masing-masing lokasi  $\pm$  5 cm. Suspensi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinfeksi secara subkutan sebanyak 0,2 ml pada masing-masing lokasi pada kulit punggung kelinci yang telah disiapkan. Setelah itu sediaan *emulgel* diberikan setelah 48 jam pada daerah yang diinfeksi. *Emulgel* minyak atsiri rimpang jahe merah dengan kadar 15%, 20%, dan 25% dioleskan pada 3 lokasi dibagian kiri punggung kelinci, 2 lokasi dibagian kanan sebagai kontrol negatif dioleskan dengan basis *emulgel*, kontrol positif dioleskan dengan *gel* klindamisin, kontrol normal tanpa perlakuan. Penggolesan *emulgel* minyak atsiri rimpang jahe merah dilakukan 3 kali sehari, pengamatan waktu penyembuhan infeksi berdasarkan hilangnya eritema, nanah dan jumlah koloni bakteri yang berkurang (Naibabo *et al* 2013).

### **12. Pengamatan pengujian efek antibakteri**

Efek antibakteri dapat dilihat dengan cara makroskopis, mengamati lamanya waktu penyembuhan pada punggung kelinci dalam hitungan hari dengan ditandai adanya hilang eritema dan nanah pada punggung kelinci yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 setelah pemberian *emulgel* minyak atsiri rimpang jahe merah (Naibabo *et al.* 2013).

### **13. Perhitungan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dari nanah**

Pengamatan secara makroskopis. Perhitungan jumlah koloni secara makroskopis dilakukan dengan cara menghitung jumlah pertumbuhan bakteri menggunakan metode *Plate Count* dari nanah yang diambil dari punggung

kelinci. Tahap pengenceran dimulai dari larutan sampel sebanyak  $10^{-1}$  sampai  $10^{-3}$ , dimulai dari nanah punggung kelinci diambil dengan kapas lidi steril atau ose. Kemudian diencerkan dalam tabung reaksi yang berisi 1 ml NaCl fisiologis 0,9% (pengenceran  $10^{-0}$ ), dilanjutkan dengan pengambilan 1 ml campuran tadi kemudian dicampurkan dengan 9 ml NaCl (pengenceran  $10^{-1}$ ), dilanjutkan sampai mendapat pengenceran  $10^{-3}$ . Selanjutnya diambil 1 ml dari hasil pencampuran kemudian dituang pada medium VJA (*Vogel Johnson Agar*) yang telah ditambahkan kalium tellurit 1% dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24-48 jam (1-2 hari). Setelah diinkubasi jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan *plate count*. Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* berwarna hitam, dan disekitar koloni berwarna kuning. Perkiraan atau dugaan dari jumlah bakteri dalam suspensi tersebut, dan dilakukan setiap hari pengujian jumlah koloni selama 7 hari.

Perhitungan jumlah bakteri yang memenuhi persyaratan untuk dihitung berkisar antara 30-300 koloni. Bila jumlah koloni  $<30$ , dianggap terlalu sedikit (tidak memenuhi syarat), sedangkan bila jumlah koloni  $>300$  juga dianggap terlalu banyak (tidak memenuhi syarat). Cara menghitung jumlah bakteri adalah sebagai berikut :

$$ALT \text{ bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

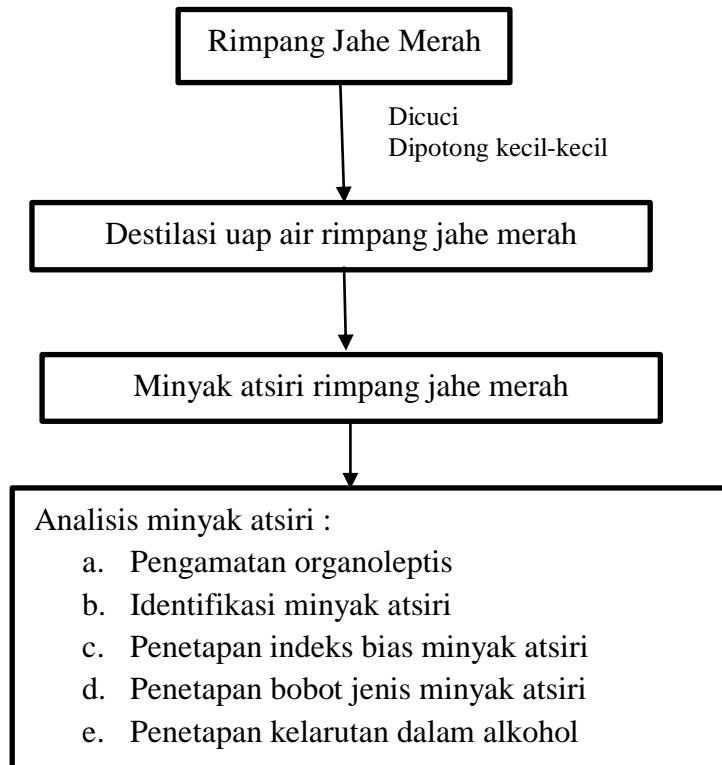
### E. Analisis Hasil

Data hasil penelitian efek sediaan emulgel rimpang jahe merah dengan kadar 10%, 20%, dan 30% dengan lamanya waktu penyembuhan dianalisis secara statistik menggunakan Metode Kolmogorv-Smirnov. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ( $p>0,05$ ) dilanjutkan dengan metode analysis of varian (ANOVA) dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Lanjutkan dengan uji Tukey untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ( $p<0,05$ ) maka dilanjutkan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan uji Mann-Wihitney untuk

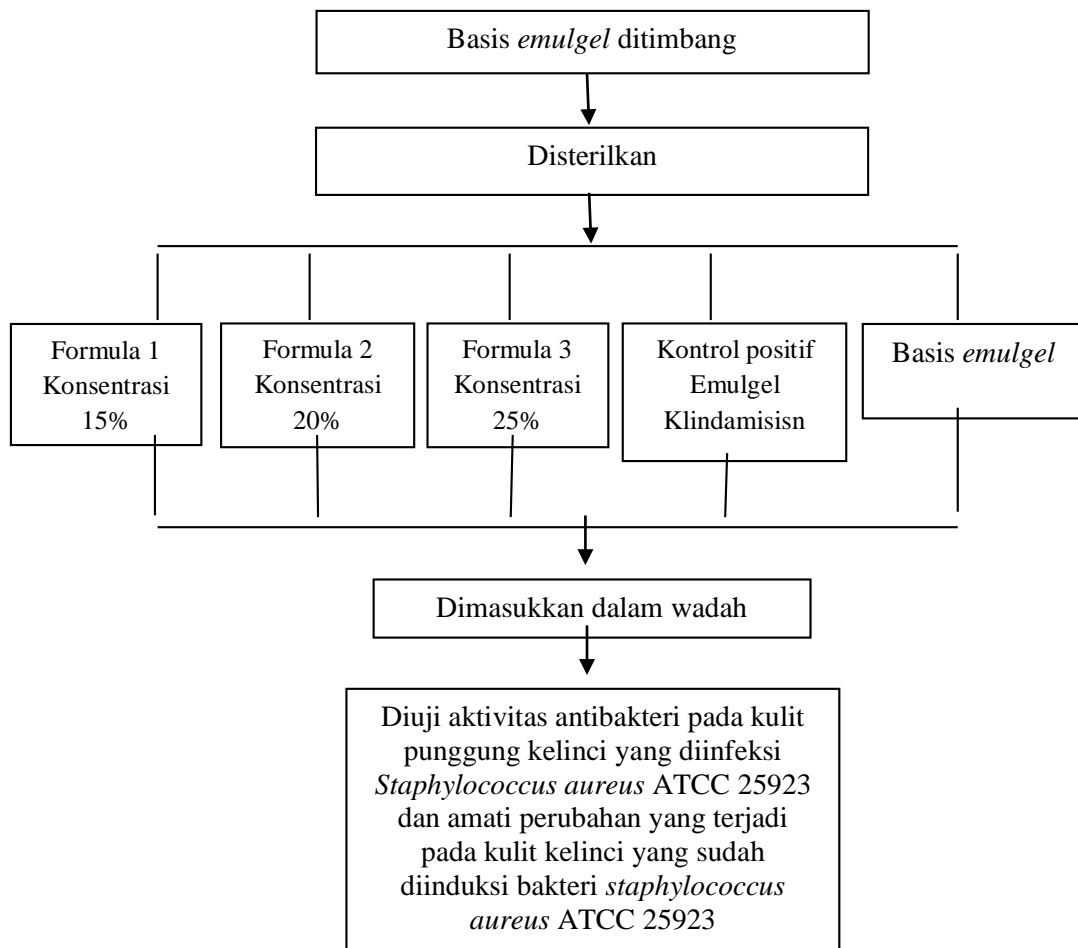
mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.

Data uji daya sebar, daya lekat, dan daya viskositas dianalisis secara statistik menggunakan uji Kolmogrov-Smirnov, jika terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dilanjutkan dengan uji ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ) maka dilanjutkan uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan uji Mann-Whitney  $H_0$  ditolak atau ( $p > 0,05$ ) (Puspitasari 2014).

### F. Skema Jalannya Penelitian

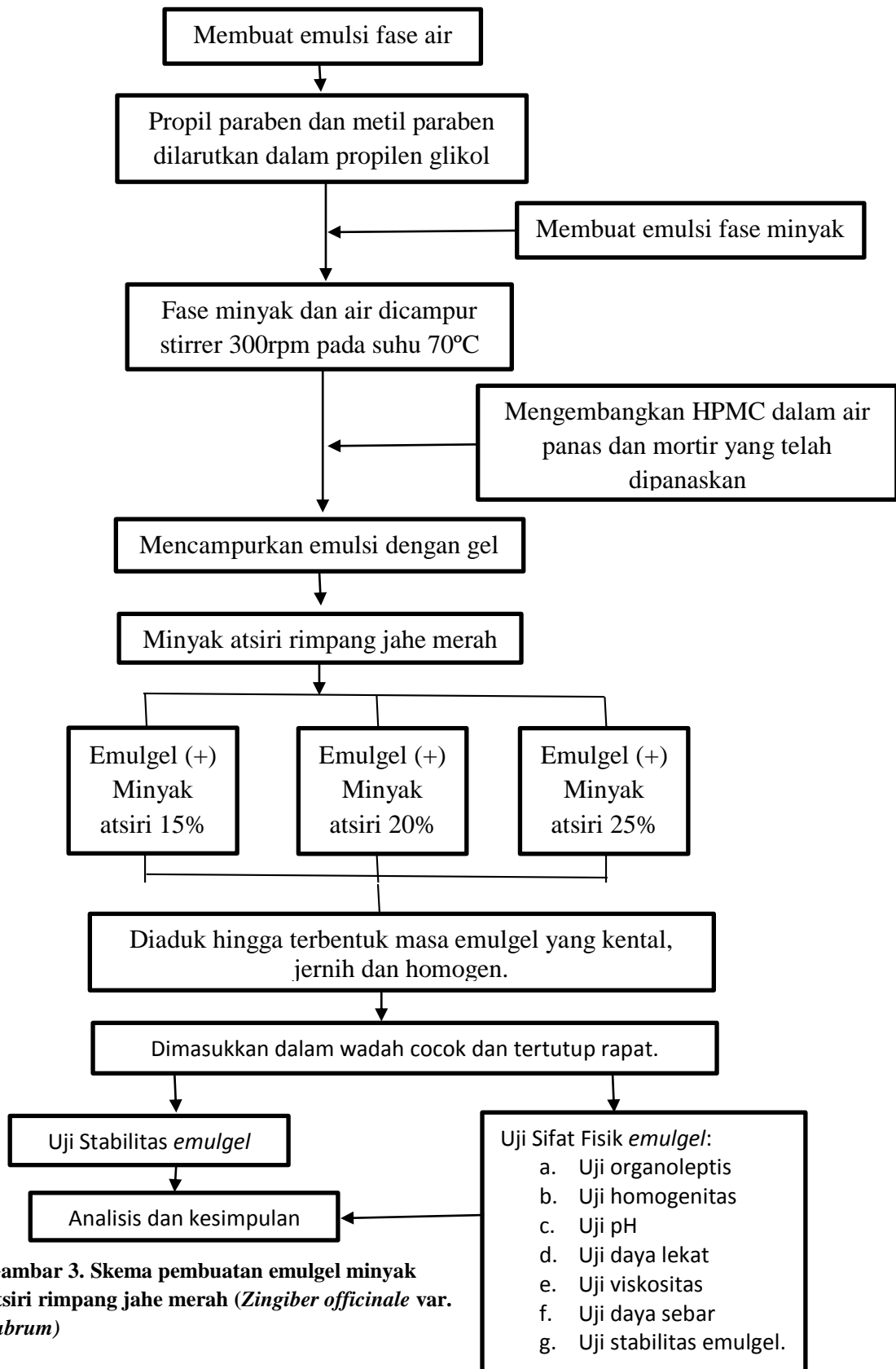


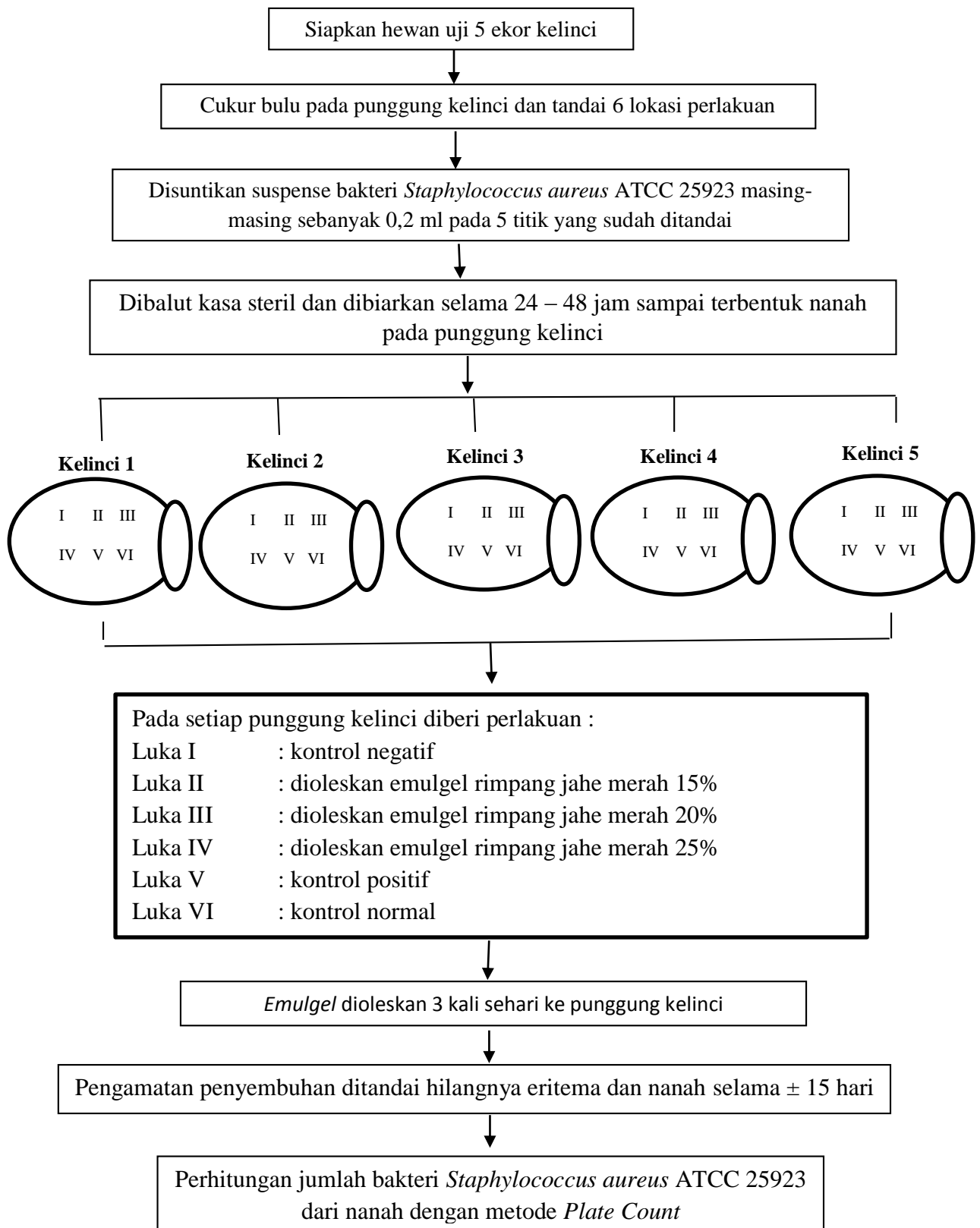
Gambar 1. Minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*)



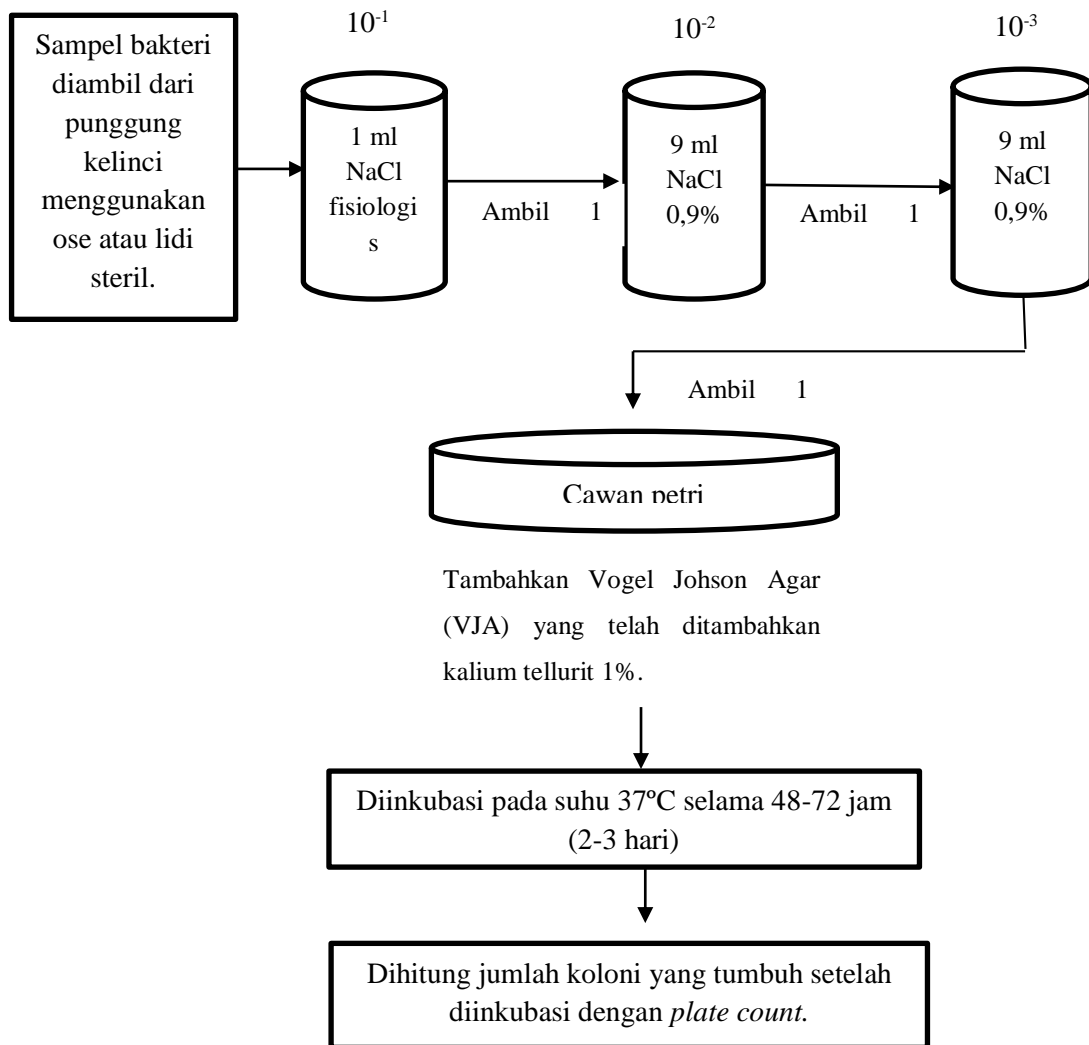
**Gambar 2.** Skema kerja pembuatan formulasi emulgel minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale var. rubrum*)







**Gambar 4.** Skema pengujian formulasi *emulgel* minyak atsiri rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* var. *rubrum*)



**Gambar 5. Skema pengujian plate count**

