

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

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

Populasi adalah subyek atau obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang minyak atsiri lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang diperoleh dari Yogyakarta, DIY pada bulan Januari 2019. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* sehingga penelitian ini juga menggunakan populasi yaitu kelinci.

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

Sampel adalah bagian dari populasi yang mampu merepresentasikan data yang diperlukan untuk menjawab permasalahan penelitian. Sampel penelitian ini adalah rimpang bangle (*Zingiber cusumunar* Roxb.) yang diambil secara acak dari tanaman yang siap panen yang berumur 10 sampai 12 bulan dari masa tanam. Rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) diambil secara acak yang berada dalam kondisi bersih, segar, tidak busuk dan bebas penyakit yang sudah siap panen berusia 2,5 sampai 3 bulan dari masa tanam. Kelinci yang digunakan sebagai sampel percobaan dalam penelitian ini adalah kelinci jantan *New Zealand* berumur 3-5 bulan dengan berat 1,5-2 kg serta dalam kondisi sehat.

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

##### **1. Identifikasi variabel penelitian**

Variabel-variabel yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah kombinasi minyak atsiri lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diinfeksi pada kulit punggung kelinci.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah sediaan gel kombinasi minyak atsiri lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan konsentrasi 2%, 4%, dan 8%.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri pada sediaan gel kombinasi minyak atsiri lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan konsentrasi 2%, 4%, dan 8% terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## **2. Klasifikasi variabel penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini diklasifikasikan menjadi variabel bebas, variabel terikat dan variabel kendali.

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi variabel lainnya atau variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung yang menjadi fokus dalam penelitian. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.).

Variabel terikat atau disebut juga dengan variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh variabel bebas atau titik pusat permasalahan pilihan dalam penelitian ini. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu aktivitas antibakteri yang terbentuk dilihat dari lama waktu penyembuhan pada punggung kelinci yang diberi gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan konsentrasi yang berbeda-beda terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar mendapatkan hasil yang tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain dengan benar. Variabel kendali dalam penelitian ini yaitu gel minyak atsiri rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), sterilisasi, suhu, kondisi peneliti, kondisi laboratorium, media dan metode penelitian.

## **3. Definisi operasional variabel penelitian**

Definisi operasional variabel yang digunakan dalam penelitian ini yang yang pertama adalah gel minyak atsiri rimpang bangle (*Zingiber cusumunar* Roxb.). Gel minyak atsiri rimpang bangle merupakan gel yang dibuat dari minyak atsiri rimpang bangle. Minyak atsiri rimpang bangle diperoleh melalui metode destilasi uap air.

Kedua yaitu gel minyak atsiri rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum). Gel minyak atsiri rimpang lengkuas merah merupakan gel yang dibuat dari minyak atsiri rimpang lengkuas merah. Minyak atsiri rimpang bangle diperoleh melalui metode destilasi uap air.

Ketiga adalah gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb). Gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle merupakan gel yang dibuat dari campuran antara minyak atsiri rimpang lengkuas merah dengan minyak atsiri bangle dengan perbandingan 3:1. Perbandingan komposisi minyak atsiri tersebut didasarkan pada hasil pengujian aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle secara *in vitro* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle dilakukan formulasi berdasarkan perbedaan konsentrasi kombinasi minyak atsiri yang digunakan dalam pembuatan gel.

Keempat adalah aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah aktivitas daya penyembuhan terhadap pertumbuhan bakteri pada punggung kelinci yang sudah diinfeksi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada 6 lokasi kemudian diolesi gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dengan minyak atsiri bangle dengan 3 konsentrasi dengan kontrol positif dan kontrol negatif (basis gel). Aktivitas antibakteri diamati berdasarkan waktu dan konsentrasi yang diperlukan dari gel untuk dapat bekerja optimal menyembuhkan infeksi di punggung kelinci yang telah diinfeksi sebelumnya.

Kelima yaitu kelinci percobaan adalah kelinci jantan *New Zealand* berumur 3-5 bulan dengan berat 1,5-2 kg. Kesembuhan adalah proses sembuhnya kelinci dilihat dari hilangnya lesi, abses, eritema, nanah, keropeng (luka yang masih basah), keringnya luka dalam hitungan hari, serta ada tidaknya koloni *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Keenam yaitu pengamatan hilangnya eritema adalah pengamatan hilangnya eritema dilakukan dengan cara mengukur luas diameter eritema setiap hari selama 14 hari.

Ketujuh yaitu pengamatan ada tidaknya koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah pengamatan koloni secara makroskopis dilakukan dengan cara mengoleskan nanah dan melihat pertumbuhan koloni menggunakan media *Vogel Jhonson Agar* (VJA) dilakukan setiap hari selama 14 hari.

### **C. Bahan dan Alat**

#### **1. Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.). Hewan percobaan kelinci Jantan *New Zealand*. Bakteri uji adalah *Staphylococcus auerus* ATCC 25923. Bahan-bahan kimia meliputi gliserin, carbopol, triethanolamin, propilengikol, nipagin, aquades, etanol 70%, *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Brain Heart Infusion* (BHI), Mc Farland 0,5, Kalium tellurit, kital violet (Gram A), lugol iodin (Gram B), aseton (Gram C), safranin (Gram D), hidrogen peroksida 3%, plasma darah kelinci, natrium sulfat anhidrat, silika gel, asam sulfat, vanillin.

#### **2. Alat**

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 incubator, piknometer, wadah gel, vial, Stamfer, dan mortir, cawan, kertas saring, cawan Petri, jarum Ose, pipet tetes, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat gel, alat viskometer, pH meter, botol minyak atsiri, alat cukur hewan percobaan dan jarum suntik, plat KLT, pipa kapiler, dan lidi kapas.

### **D. Jalannya Penelitian**

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

Penelitian ini diawali dengan mengidentifikasi determinasi tanaman lengkuas merah dan bangle dengan tujuan untuk menetapkan kebenaran sampel dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi rimpang lengkuas merah dan bangle.

Identifikasi morfologi ini dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

## **2. Pengambilan bahan**

Lengkuas merah dan bangle diambil dari BPTO (Balai Penelitian Tanaman Obat), Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019. Lengkuas merah dan bangle diambil bagian rimpangnya yang masih segar kemudian dibersihkan dari kotoran, serangga dan bagian yang rusak/busuk.

## **3. Isolasi minyak atsiri**

Isolasi minyak atsiri dilakukan masing-masing terhadap rimpang lengkuas merah dan bangle. Isolasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle dilakukan dengan metode yang sama yaitu metode destilasi uap air. Rimpang lengkuas merah dan bangle dipotong-potong menjadi bagian kecil-kecil kemudian dimasukkan alat penyulingan minyak dan dimasukkan ke dalam dandang dengan penyangga berlubang yang telah berisi air. Penyulingan dilakukan diatas api sampai air mendidih. Uap air yang dihasilkan dialirkan melalui pipa kondensor. Minyak atsiri yang terbawa uap air mengalami kondensasi dan destilat ditampung. Penyulingan minyak atsiri dilakukan selama 6 jam. Pemanasan dihentikan ketika sudah tidak ada lagi penambahan destilat.

Destilat yang terbentuk dipisahkan antara fase air dan minyak dengan corong pisah dengan penambahan natrium sulfat anhidrat sampai jenuh kemudian dipisahkan dan dihitung rendemennya. Minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle yang dihasilkan disimpan dalam botol tertutup yang telah disterilisasi dan disimpan dalam keadaan sejuk. Isolasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle dipaparkan pada Gambar 9.

## **4. Analisis 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 tempat kaca yang bersih dan jernih. Bau dan rasa minyak atsiri memiliki bau dan rasa yang khas sesuai dari tanaman asalnya.

**4.2 Penetapan indeks bias minyak atsiri.** Penetapan indeks bias ditetapkan dengan alat refraktometer dan diulang sebanyak tiga kali. Badan prima 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 menutup kembali. Pemutar sebelah kanan diatur sehingga batas gelap dan terang tepat pada garis dan dibaca skala dicatat indeks biasnya.

**4.3 Identifikasi minyak atsiri.** Identifikasi minyak atsiri lengkuas merah dan bangle seperti identifikasi minyak atsiri pada umumnya yaitu diteteskan pada permukaan air, minyak atsiri akan menyebar dan permukaan air tidak akan keruh. Minyak atsiri diteteskan pada kertas saring, jika dibiarkan minyak akan menguap sempurna tanpa meninggalkan noda lemak.

**4.4 Penetapan bobot jenis minyak atsiri.** Penetapan bobot jenis ditetapkan dengan cara botol timbang dikeringkan dengan cara dioven, kemudian ditimbang botol kosong dan dicatat hasilnya. Minyak atsiri lengkuas merah dan bangle ditimbang dalam botol timbang dan dicatat hasilnya.

**4.5 Penetapan kelarutan dalam alkohol.** Uji kelarutan minyak atsiri dapat dilakukan dengan cara memasukkan 1 ml minyak atsiri ke dalam gelas ukur 10 ml, kemudian ditambah alkohol 70% secara bertahap. Setiap penambahan alkohol dikocok dan diamati kejernihannya.

**4.6 Penetapan minyak atsiri secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).** Plat KLT yang mengandung silika gel GF<sub>254</sub> dengan ukuran 1,5 X 10 cm disiapkan, kemudian sampel ditotolkan 1,5 cm dari ujung plat dengan menggunakan pipet kapiler. Plat KLT dibiarkan sesaat, kemudian dimasukkan ke dalam bejana KLT yang sudah jenuh dengan uap pelarut. Pelarut yang digunakan adalah toluen : etil asetat (93: 7 v/v). Bercak-bercak dideteksi pada UV<sub>254</sub> nm, UV<sub>365</sub> nm, menggunakan pereaksi semprot vanilin-asam sulfat dan anisaldehyd-asam sulfat. Harga R<sub>f</sub> yang telah dihitung dan warna noda dibandingkan dengan data sekunder dari literatur.

## 5. Sterilisasi

Media dan alat-alat seperti cawan Petri yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, sedangkan alat seperti jarum Ose disterilkan dengan pemanas api langsung dan inkas disterilkan dengan menggunakan formalin (Suriawiria 2005).

## 6. Rancangan formula sediaan gel kombinasi minyak atsiri

Rancangan formulasi gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dibuat formulasi sediaan gel kombinasi minyak atsiri dibuat dengan 3 variasi kombinasi minyak atsiri yaitu 2%, 4%, 8% . Rancangan formulasi gel kombinasi minyak atsiri lengkuas merah dan bangle dipaparkan pada Tabel 1.

**Tabel 1. Rancangan formula gel kombinasi minyak atsiri lengkuas merah dan bangle**

Bahan	Gel kombinasi minyak atsiri lengkuas merah dan bangle (3:1)			Basis gel
	FI (2%)	FII (4%)	FIII (8%)	
Minyak atsiri lengkuas merah	1,5 ml	3 ml	6 ml	-
Minyak atsiri bangle	0,5 ml	1 ml	2 ml	
Carbopol 940	2 g	2 g	2 g	2 g
Triethanolamin	1 g	1 g	1 g	1 g
Propilenglikol	10 g	10 g	10 g	10 g
Gliserin	2 g	2 g	2 g	2 g
Metil Paraben	0,04 g	0,04 g	0,04 g	0,04 g
Aquades	Ad 100 g	Ad 100 g	Ad 100 g	Ad 100 g

**Keterangan:**

- FI : Gel kombinasi minyak atsiri bangle dan lengkuas merah konsentrasi 2%  
 FII : Gel kombinasi minyak atsiri bangle dan lengkuas merah konsentrasi 4%  
 FIII : Gel kombinasi minyak atsiri bangle dan lengkuas merah konsentrasi 8%  
 K(-) : Kontrol negatif dengan basis gel yang tidak diberi kombinasi minyak atsiri

## 7. Pembuatan sediaan gel kombinasi minyak atsiri

Gel minyak atsiri dibuat dengan berbagai formulasi berdasarkan konsentrasi minyak atsiri. Gel minyak atsiri kombinasi lengkuas merah dan bangle dibuat dengan 3 formulasi yaitu dengan konsentrasi minyak atsiri kombinasi secara berturut-turut 2%, 4%, 8% Campuran A dibuat dengan karbopol yang dikembangkan dengan sebagian aquades panas kemudian Trietanolamin (TEA) dimasukkan tetes demi tetes ke dalam karbopol yang telah dikembangkan. Campuran B dibuat dengan melarutkan Nipagin ke dalam gliserin, kemudian propilenglikol dimasukkan dan diaduk sampai homogen. Gerus sedikit basis

(campuran A) ke dalam lumpang, kemudian masukkan sedikit demi sedikit kombinasi minyak atsiri lengkuas merah dan bangle sambil digerus homogen (Campuran C). Masukkan campuran B ke dalam campuran C sambil diaduk kemudian masukkan sisa aquades dan diaduk sampai membentuk masa gel yang homogen. Skema pembuatan gel minyak atsiri dipaparkan pada Gambar 10.

## **8. Pembuatan kontrol**

**8.1 Kontrol negatif.** Kontrol negatif yang digunakan adalah gel yang tidak mengandung minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle.

**8.2 Kontrol positif.** Kontrol negatif yang digunakan adalah gel gentamisin 0,1% produk dari PT. Erela, Semarang, Indonesia yang tidak mengandung minyak atsiri rimpang lengkuas merah dan bangle.

## **9. Pengujian mutu fisik gel**

**9.1 Uji daya lekat gel.** Gel diletakkan di atas obyek yang telah ditentukan luasnya. Gelas obyek yang lain diletakkan di atas gel tersebut dan ditekan dengan beban 1kg selama 5 menit, kemudian gelas obyek dipasangkan pada alat tes, selanjutnya dilepaskan dan dicatat waktunya sehingga kedua gelas obyek tersebut terlepas. Masing-masing percobaan direplikasi 3 kali untuk setiap gel yang diperiksa (Voigt 1994). Uji dilakukan pada minggu pertama dan setelah penyimpanan selama 3 minggu.

**9.2 Uji organoleptis.** Uji organoleptik meliputi pemeriksaan konsistensi, warna, dan bau dari gel.

**9.3 Uji daya sebar.** Pengujian daya sebar gel dilakukan dengan cara gel sebanyak 0,5 gram diletakkan di tengah alat (kaca bulat), kaca bulat bagian atas ditimbang terlebih dahulu dan diletakkan 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, dan 150 gram. Sebagai beban tambahan secara bertahap, setiap penambahan beban didiamkan selama 1 menit dan dicatat diameter gel yang menyebar seperti sebelumnya. Cara di atas diulangi untuk setiap formula gel yang diperiksa masing-masing 3 kali (Voigt 1994). Uji dilakukan pada minggu pertama dan setelah penyimpanan selama 3 minggu.



**9.4 Uji homogenitas.** Masing-masing gel yang akan diuji dioleskan pada gelas obyek untuk diamati homogenitasnya. Apabila tidak terdapat butiran-butiran kasar di atas obyek tersebut maka gel yang diuji homogen. Uji dilakukan pada minggu pertama dan minggu ketiga.

**9.5 Uji stabilitas gel.** 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.

**9.6 Uji pH gel.** Penentuan pH sediaan dilakukan dengan menggunakan stik pH meter yang dicelupkan ke dalam masing-masing gel hand sanitizer yang telah diencerkan. Setelah tercelup dengan sempurna, kemudian dilihat dan dicatat nilai pH yang muncul pada pH meter. Cara di atas diulangi pada formula masing-masing 3 kali. Uji dilakukan pada hari pertama dan setelah penyimpanan selama 10 hari.

**9.7 Uji viskositas.** Penetapan viskositas gel dilakukan dengan menggunakan viskometer VT-04. Ketika rotor mulai berputar jarum penunjuk viskositas secara otomatis bergerak maju ke kanan kemudian setelah penunjuk stabil, dibaca viskositas yang telah dikalibrasi untuk VT-04 adalah desipaskal second (d-pas) setelah selesai pengukuran viskotester dimatikan. Pengujian direplikasi 3 kali untuk setiap gel yang diperiksa (Voigt 1994). Uji dilakukan pada hari pertama dan setelah penyimpanan selama 10 hari.

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

Pembuatan suspensi dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2 Ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Suspensi dibuat dalam tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kekeruhannya 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. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

**11.1 Identifikasi bakteri dengan medium uji deferensial.** Identifikasi dilakukan dengan cawan gores. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 digoreskan pada cawan yang berisi media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang telah ditetesi 3 tetes kalium tellurit 1% dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan warna hitam yang merupakan hasil dari bakteri yang telah mereduksi telurit dan muncul warna kuning dimedium sekitar koloni dikarenakan bakteri dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan adanya indikator fenol red didalam VJA dapat merubah pH pada medium sehingga pH turun dan medium pH menjadi kuning (Jawetz *et al.*, 2007).

**11.2 Identifikasi dengan pewarnaan Gram.** Pewarnaan Gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordant), Gram C (etanol : aseton = 1 : 1 sebagai peluntur dan Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara membuat preparat usap (smear) yang telah difiksasi kemudian ditetesi Gram A sampai semua usapan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Kemudian ditetesi akuades mengalir kemudian ditetesi Gram B didiamkan kurang lebih 1 menit kemudian dicuci dengan akuades mengalir dan dikeringkan diudara. Preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C dan didiamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan akuades mengalir kemudian dikeringkan. Selanjutnya ditetesi Gram D dan didiamkan selama 1 menit dan dicuci dengan akuades. Bakteri dinyatakan positif jika berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dengan mikroskop.

**11.3 Identifikasi biokimia.** Identifikasi biokimia bakteri dilakukan dengan uji katalase. Uji katalase dilakukan dengan menggunakan suspensi bakteri uji dengan penambahan 2 tetes hidrogen peroksida 3%. Bakteri dinyatakan Gram positif jika terbentuk gelembung karena bakteri Gram positif mempunyai enzim katalase yang dapat menguraikan hidrogen peroksida menjadi H<sub>2</sub>O dan O<sub>2</sub>.

Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci yang diencerkan ditambah satu ose biakan bakteri, diinkubasi pada suhu 37°C. Hasil pengamatan

tabung diperiksa dengan melihat pembentukan gumpalan selama 1-4 jam. Hasil positif kuat jika tabung tes dibalik atau dimiringkan, gumpalan plasma tidak terlepas dan tetap melekat pada dinding tabung. *Staphylococcus aureus* yang bersifat koagulase positif akan menggumpalkan plasma dalam waktu 1 jam (Jawetz *et al.*, 2007).

#### **12. Pengujian antibakteri gel minyak atsiri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada kulit punggung kelinci**

Sebanyak 5 ekor hewan uji yaitu kelinci dicukur bulu pada punggung kelinci dan masing-masing kelinci ditandai 6 lokasi penyuntikan bakteri sebanyak 0,1 ml secara subkutan. Gel kombinasi minyak atsiri bangle dan lengkuas merah, kontrol negatif yaitu basis gel, kontrol positif yaitu gentamicin salep, dan kontrol normal (tanpa perlakuan) dioleskan sebanyak 2 kali sehari sehari pada masing-masing kelompok sampel sampai sembuh. Pengamatan penyembuhan ditandai dengan hilangnya eritema dan nanah. Skema pengujian antibakteri gel minyak atsiri dipaparkan pada Gambar 11.

#### **13. Pengamatan kesembuhan dengan diameter eritema**

Pengamatan kesembuhan kulit punggung kelinci yang telah diinfeksi sebelumnya dengan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan cara makroskopis untuk mengetahui ada tidaknya koloni. Pengamatan kesembuhan juga dilakukan dengan mengamati waktu kesembuhan kulit punggung kelinci yang diolesi gel. Kesembuhan dicirikan dengan hilangnya lesi, abses, nanah, keropeng luka pada kulit punggung kelinci, sedangkan untuk analisis kuantitatif dilakukan dengan mengelompokkan eritema kedalam skor-skor yang sesuai. Skor eritema : 0= tidak ada eritema, 1= eritema ringan (diameter < 25,00 mm), 2= eritema sedang (diameter antara 25,10-30,00 mm), 3= eritema kuat (diameter antara 30,10-35,00), 4= eritema parah (diameter >35,10 mm).

#### **14. Pengamatan ada tidaknya koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Pengamatan ada tidaknya koloni bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah pengamatan koloni secara makroskopis dilakukan dengan cara mengoleskan nanah pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) dengan

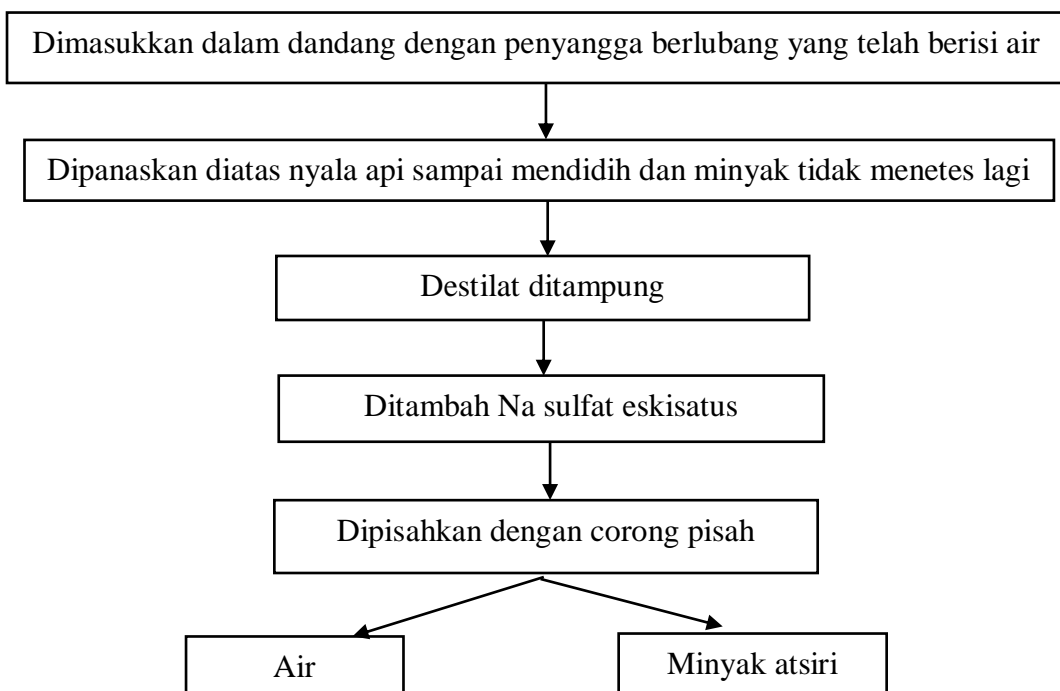
menggunakan kapas lidi steril, kemudian melihat ada tidaknya pertumbuhan koloni dilakukan dua hari sekali.

### E. Analisis Hasil

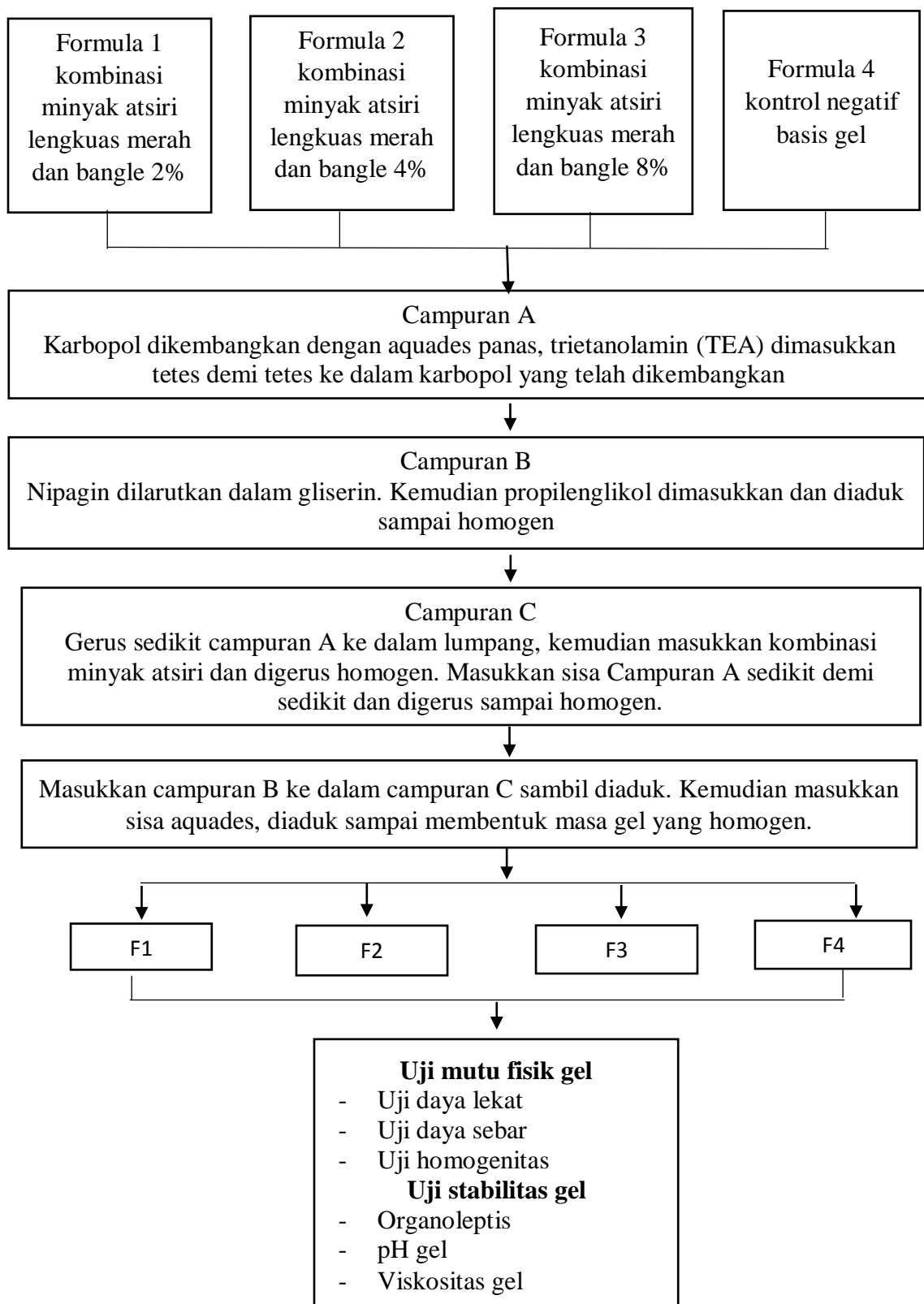
Aktivitas antibakteri gel kombinasi minyak atsiri rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) dan rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan konsentrasi 2%, 4%, 8% dengan basis gel sebagai kontrol negatif dan gentamicin salep sebagai kontrol positif serta kontrol normal sebagai pembanding dilihat dari lamanya waktu penyembuhan. Hasil dilakukan uji analisis dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* hasil dinyatakan signifikan atau terdistribusi normal jika nilai  $p > 0,05$ , kemudian data tersebut dilakukan analisis secara statistik menggunakan uji *Anova* dan dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

Data uji daya sebar, daya lekat, pH, dan uji viskositas yang kemudian dilakukan analisis secara statistik menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov*, hasil dinyatakan signifikan atau terdistribusi normal jika nilai  $p > 0,05$  kemudian dilanjutkan dengan uji *Paired sample t-test* dengan taraf kepercayaan yaitu 95%.

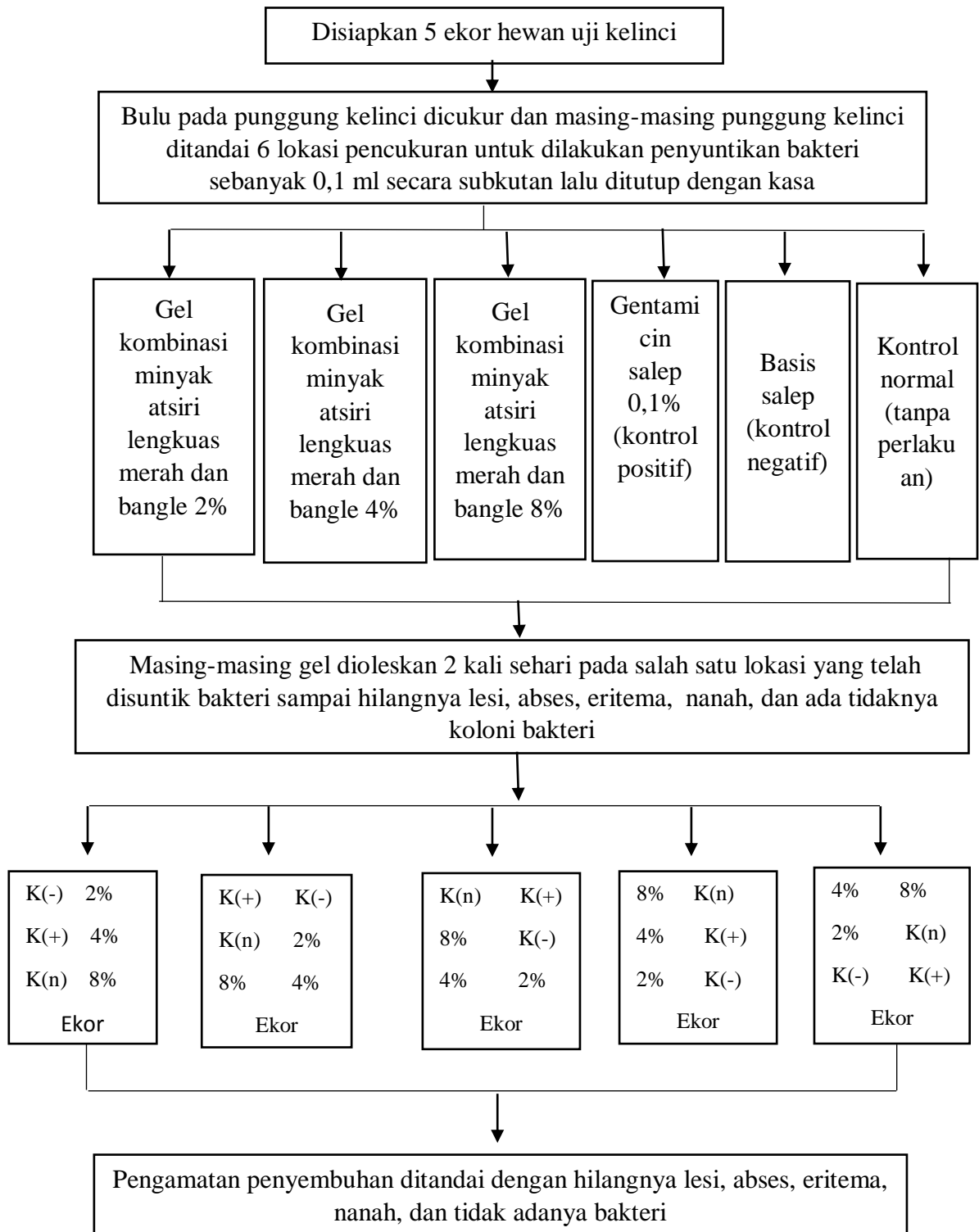
### F. Skema Penelitian



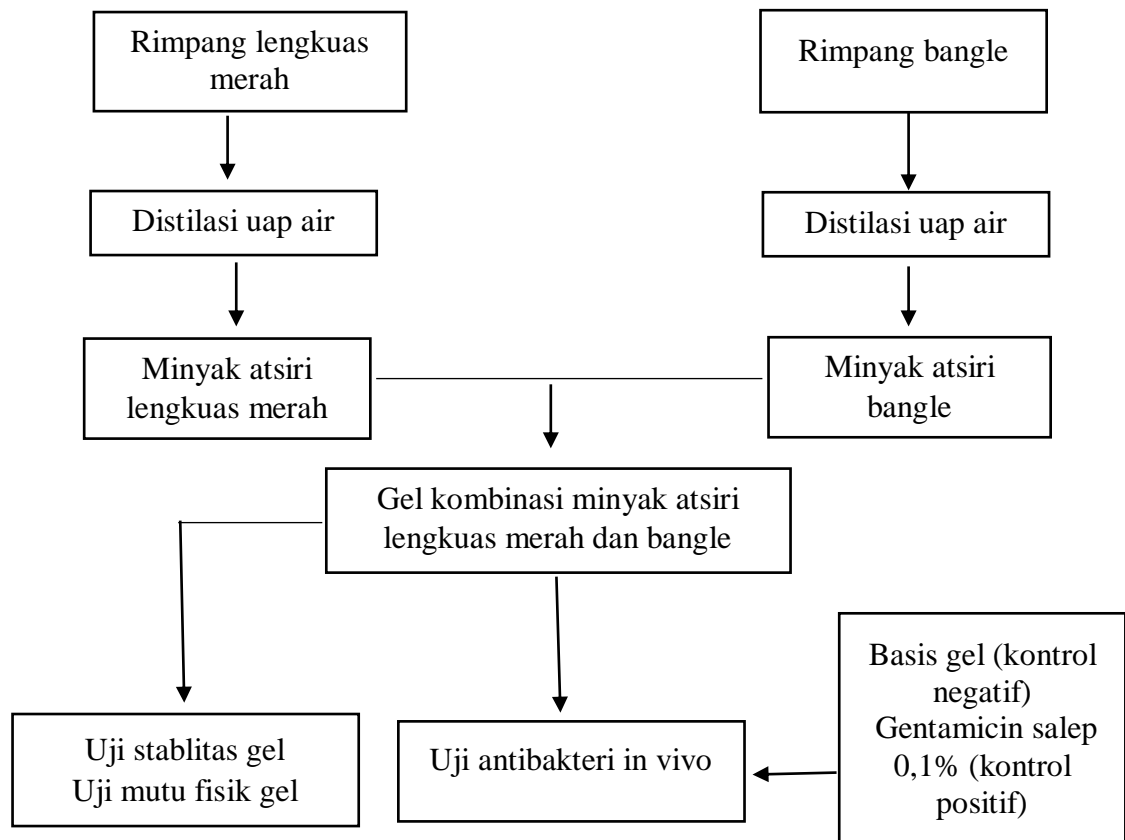
Gambar 9. Skema isolasi minyak atsiri



Gambar 10. Skema pembuatan gel minyak atsiri



Gambar 11. Skema pengujian antibakteri gel minyak atsiri



Gambar 12. Skema jalannya penelitian