

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau yang diteliti. Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah daun bandotan yang diperoleh di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019 dan sediaan emulgel ekstrak daun bandotan dengan variasi konsentrasi *gelling agent* Na-CMC.

2. Sampel

Sampel adalah bagian dari populasi yang dipilih dengan cara tertentu hingga dianggap mewakili populasi. Sampel yang digunakan adalah daun bandotan (*Agerantum conyzoides* L) yang berwarna hijau, segar, tidak terlalu tua, tidak terlalu muda dan bebas dari hama dan emulgel dari ekstrak daun bandotan dengan berbagai variasi konsentrasi *gelling agent* Na-CMC.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun bandotan yang diperoleh hasil maserasi.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah variasi *gelling agent* Na-CMC dalam pembuatan emulgel ekstrak etanol daun bandotan.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah pengujian stabilitas sifat fisik dan aktivitas penyembuhan infeksi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 secara *in vivo*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama diklasifikasikan ke dalam berbagai macam yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dipengaruhi atau diubah-ubah untuk dipelajari. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi *gelling agent* Na-CMC dalam pembuatan sediaan emulgel.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah sifat fisik dari emulgel meliputi organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya lekat, daya sebar, dan stabilitas. Penyembuhan infeksi pada kulit punggung kelinci dilihat dari kesembuhan luka, hilangnya eritema dan nanah .

Variabel terkendali adalah variabel yang dianggap berpengaruh terhadap variabel variabel tergantung selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya . Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah ekstrak dari daun bandotan, bakteri yang digunakan dalam pengujian yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, waktu inkubasi bakteri, proses pembuatan sediaan emulgel, dosis pemakaian emulgel, pemilihan hewan coba kelinci (jenis, berat badan, kesehatan dan kebersihan), tempat tumbuh tanaman, kondisi laboratorium, bahan-bahan yang digunakan, kondisi peneliti dan penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun bandotan adalah daun dari tanaman bandotan segar dan bebas hama yang diambil dari Tawangmangu , Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol daun bandotan adalah ekstrak hasil ekstraksi daun bandotan dengan menggunakan metode maserasi.

Ketiga, konsentrasi *gelling agent* Na-CMC pada sediaan emulgel ekstrak daun bandotan berbeda-beda yaitu 2%, 3% dan 4%.

Keempat, stabilitas fisik emulgel yang akan diuji meliputi organoleptis, pH , homogenitas, viskositas , daya sebar dan daya lekat emulgel

Kelima, bakteri uji dalam penelitian adalah *Staphlococcus aureus* ATCC dari laboratorium klinik dengan menggunakan hewan uji.

Keenam, hewan uji yang digunakan adalah kelinci jantan putih (*New Zealand*) berumur \pm 3 bulan , bobot 2-3 kg dan kulit punggung kelinci yang telah dicukur.

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri secara *in vivo* adalah daya penyembuhan terhadap pertumbuhan bakteri dengan cara menginfeksi secara subkutan, lalu ditutup dengan kasa steril dibiarkan sampai 48 jam sampai terjadi infeksi, kemudian di oleskan emulgel ekstrak etanol daun bandotan.

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

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah ekstrak etanol daun bandotan yang diperoleh dari daun bandotan.

1.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan yaitu Na-CMC, Propilen glikol, Metil Paraben, Propil Paraben, Tween 80, Span 80, Aqua destilata, gel *Clindamycin*, *Brain Heart Infusion*, *Vogel Johnson Agar*, *Mueller-Hinton* agar, kalium tellurit, serum darah kelinci, DMSO, alkohol 70 %, cat kristal violet , lugol iodin.

1.3 Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang di peroleh dari laboraturium mikrobiologi Universitas Setia Budi.

1.4 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan kelinci putih jantan galur *New Zealand white* ± 3-5 bulan , dengan berat 2-3 kg.

2. Alat

Alat- alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan digital, botol maserasi, *rotary evaporator*, *vortex*, *stirer*, *moisture balance*, *Viscometer* ayakan mesh no 40, Corong kaca, erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, kapas lidi steril, batang pengaduk, waterbath, pH meter, mortir dan stamfer .

D. Jalanya Penelitian

1. Pengambilan tanaman

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman bandotan (*Agerantum conyzoides* L) yang digunakan pada bagian daunnya. Daun bandotan diambil daun yang tidak terlalu tua, tidak terlalu muda dan masih segar.

2. Identifikasi tanaman

Identifikasi tanaman yang dilakukan adalah dengan determinasi tanaman. Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan dan memastikan kebenaran

sampel daun bandotan (*Agerantum conyzoides* L) dengan cara mencocokkan ciri morfologi tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi, agar menghindari kesalahan penggunaan tanaman ketika penelitian. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Morfologi dan Sitematika Tumbuhan Universitas Setia Budi Surakarta.

3. Pembuatan serbuk

Daun bandotan dioven dengan suhu 40° C, setelah daun kering kemudian digiling lalu diayak dengan ayakan mesh no 40 dan disimpan dalam wadah yang kering kemudian ditutup rapat.

4. Identifikasi serbuk daun bandotan

4.1. Pemeriksaan organoleptis serbuk daun bandotan. Pemeriksaan organoleptis serbuk daun bandotan meliputi pengamatan bentuk, warna, dan bau dari serbuk daun bandotan.

4.2. Penetapan susut pengeringan serbuk daun bandotan. Penetapan susut pengeringan serbuk daun bandotan dilakukan dengan cara serbuk daun bandotan ditimbang sebanyak 2 gram kemudian diukur kadar airnya dengan satuan % menggunakan alat *moisture balance*.

4.3. Penetapan kadar air serbuk daun bandotan. Penetapan kadar air dari serbuk daun bandotan menggunakan *sterling-bidwell* berdasarkan Kemenkes (2010). Pelarut yang digunakan dalam penetapan kadar air serbuk adalah toluen sejumlah 200 ml yang dijenuhkan dengan 20 ml air, lapisan air dibuang. Serbuk daun bandotan sebanyak 20 gram dimasukkan dalam labu kering, untuk zat yang menyebabkan gejalak mendadak tambahkan, batu didih secukupnya. Masukkan 200 ml toluen jenuh air dalam labu kering dan pasang rangkaian alat. Labu dipanaskan secara hati-hari selama 15 menit hingga toluen mendidih. Kecepatan penyulingan selanjutnya diatur kurang lebih 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan *toulene*. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit, dan basahi tabung penerima dengan tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluene memisah sempurna.

Kadar air dihitung dalam %v/b. Persyaratan untuk serbuk simplisia, kadar air tidak boleh lebih dari 10% (Depkes RI 1994).

5. Pembuatan ekstrak daun bandotan

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode remaserasi. Serbuk Simplisia ditempatkan pada botol kaca gelap, dengan tujuan agar terlindung dari cahaya matahari, lalu dimasukkan etanol 70% sebanyak 10 kali bobot serbuk. Rendam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Maserat disaring, didapatkan ampas dan filtrat. Maserasi diulangi sekurang-kurangnya satu kali dengan jumlah pelarut setengah dari pelarut pada penyarian pertama. Filtrat pertama dan filtrat kedua dicampurkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator*, hingga diperoleh ekstrak kental dengan bobot tetap (Kemenkes 2013).

6. Identifikasi ekstrak daun bandotan

6.1 Pemeriksaan Organoleptis. Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun bandotan dengan mengamati bentuk, warna dan bau dari ekstrak daun bandotan.

6.2 Penetapan kadar air ekstrak. Penetapan kadar air dari serbuk daun bandotan menggunakan *sterling-bidwell* berdasarkan Kemenkes (2010). Pelarut yang digunakan dalam penetapan kadar air serbuk adalah toluen sejumlah 200 ml yang dijenuhkan dengan 20 ml air, lapisan air dibuang. Ekstrak daun bandotan sebanyak 10 gram dimasukkan dalam labu kering, untuk zat yang menyebabkan gejala mendadak tambahkan, batu didih secukupnya. Masukkan 200 ml toluen jenuh air dalam labu kering dan pasang rangkaian alat. Labu dipanaskan secara hati-hari selama 15 menit hingga toluen mendidih. Kecepatan penyulingan selanjutnya diatur kurang lebih 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluen. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit, dan basahi tabung penerima dengan tetesan air turun. Baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam %v/b. Persyaratan kadar ekstrak etanol tidak boleh lebih dari 10% (Depkes RI 1979). Penetapan kadar air ekstrak bertujuan untuk mengurangi kerusakan

ekstrak akibat dari pertumbuhan mikroba serta reaksi enzimatik yang disebabkan adanya kandungan air yang berlebih pada ekstrak.

6.2 Uji bebas alkohol ekstrak daun bandotan. Uji bebas alkohol bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak yang digunakan tidak mengandung alkohol. Prosedur uji bebas alkohol yaitu dengan menambahkan ekstrak dengan asam asetat (CH_3COOH) dengan asam sulfat (H_2SO_4) pekat lalu dipanaskan. Ekstrak yang bebas alkohol tidak berbau ester (Depkes RI 1995).

7. Identifikasi kandungan kimia

7.1. Flavonoid. Ekstrak 0,1 gram ditambahkan serbuk magnesium 0.1 mg dan 0.4 mL amil alkohol (campuran asam klorida 37 % dan etanol 95 % dengan volume yang sama) dan 4 mL alkohol kemudian campuran dikocok. Pembentukan warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan hasil flavonoid (Harborne 1987).

7.2. Alkaloid. Ekstrak sebanyak 0.1 gram ditambahkan 10 mL kloroform dan tambahkan beberapa tetes amonia. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan beberapa tetes H_2SO_4 pekat. Fraksi asam diambil dan dibagi menjadi 3 tabung, kemudian ditambahkan pereaksi *Dragendorf*, *Meyer*, dan *Wagner*. Keberadaan alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi *Meyer*, endapan merah pada pereaksi *Dragendorf*, dan endapan coklat pada endapan pereaksi *Wagner* (Harborne 1987).

7.3. Saponin. Ekstrak 0,1 gram ditambah air panas, dikocok sampai membentuk busa. Busa yang stabil selama 10 menit dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2 N menunjukkan saponin (Harborne 1987).

7.4. Tanin. Ekstrak sebanyak 0,5 gram ditambahkan 10 mL akuades kemudian dididihkan. Setelah dingin filtrat ditambahkan 5 mL FeCl_3 1 % (b/v). Apabila terjadi perubahan warna menjadi biru tua, berarti sampel mengandung tanin (Harborne 1987).

7.5. Minyak atsiri. Minyak atsiri diidentifikasi dengan fase diam silika gel GF254, Fase gerak toluena : etil asetat (93 : 7), Pembanding eugenol, Pereaksi semprot vanilin-asam sulfat, Positif warna coklat jingga (Depkes 1987).

8. Penetapan rendemen

Persen rendemen diperoleh dengan ekstrak daun bandotan ditimbang kemudian dibagi berat serbuk dan dikalikan 100%

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

9. Formula emulgel

Formulasi dirancang dengan variasi konsentrasi gelling agent Na-CMC pada tiap formula.

Tabel 1. Formula emulgel

Bahan	Konsentrasi (%)
Carbomer 940	0,5
Parafin cair	7,5
Span 80	1,5
Tween 80	1,5
Propilen Glikol	5
Nipagin	0,03
Nipasol	0,01
TEA	Qs
Aqua destilata	ad 100

Sumber : Riski *et al* 2016

Tabel 2. Rancangan formula emulgel yang telah dimodifikasi

Bahan	Satuan	Konsentrasi (%)			
		Kontrol basis	F1	F2	F3
Ekstrak daun bandotan	Persen	-	20,00	20,00	20,00
Na-CMC	Gram	3,00	2,00	3,00	4,00
Parafin cair	Gram	7,5	7,5	7,5	7,5
Span 80	Gram	1,5	1,5	1,5	1,5
Tween 80	Gram	1,5	1,5	1,5	1,5
Propilen glikol	Gram	5	5	5	5
Nipagin	Gram	0,03	0,03	0,03	0,03
Nipasol	Gram	0,01	0,01	0,01	0,01
Aqua destilata	Gram	ad 100	ad 100	ad 100	ad 100

10. Pembuatan emulgel

10.1 Pembuatan emulsi. Fase minyak dibuat dengan meleburkan nipasol, parafin cair dan span 80 secara berturut-turut dalam cawan poselin diatas *hotplate* hingga suhu 70°C. Fase air dibuat dengan cara melarutkan nipagin, tween 80, propilen glikol dan sedikit air pada suhu 70°C. Fase minyak dituang ke mortir,

tambahkan sedikit demi-sedikit fase air diaduk pelan-pelan dengan stamfer, tambah sedikit demi sedikit ekstrak kental daun bandotan, aduk lagi sampai terbentuk massa emulsi (Riski 2016).

10.2 Pembuatan *gelling agent*. Na-CMC dikembangkan dalam mortir dengan aqua destilata panas sejumlah 20 kali berat Na-CMC, diamkan selama 5-10 menit agar mengembang. Setelah 5-10 menit aduk dengan stamfer sampai membentuk massa gel (Riski 2016).

10.3 Pembuatan emulgel. Massa emulsi dicampurkan dengan gel sedikit demi sedikit menggunakan stirer, kemudian diaduk sampai homogen dan membentuk massa emulgel yang diinginkan (Riski 2016).

11. Pembuatan kontrol

11.1 Kontrol positif. Kontrol positif adalah gel merek Medi-klin dengan kandungan *Clindamycin* 1 % .

11.2 Kontrol negatif. Kontrol negatif adalah emulgel yang tidak mengandung ekstrak etanol daun bandotan.

11.3 Kontrol normal. Kontrol normal adalah kulit punggung kelinci tanpa perlakuan apapun.

12. Pengujian sifat fisik

12.1 Uji organoleptis. Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati : warna, bau serta konsistensi dari sediaan emulgel.

12.2 Uji homogenitas. Uji dilakukan dengan mengoleskan sedikit bagian atas pada kaca transparan. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar dan ekstrak yang tercampur merata.

12.3 Uji pH. Pengukuran pH emulgel menggunakan alat pH meter dengan prosedur penetapan sebagai berikut : emulgel diencerkan dengan perbandingan 1:10. Sebanyak 1 g, dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian diencerkan dengan 10 mL aqua destilata. pH meter dicelupkan ke dalam emulgel yang telah diencerkan dan dilihat nilai pH yang tertera pada alat.

12.4 Uji viskositas. Pengujian viskositas dengan alat *viscometer*, prosedur ujinya adalah sebagai berikut : alat disiapkan pada posisi horisontal dan rotor dapat diatur sedemikian rupa sehingga jarum penunjuk tepat horisontal, emulgel yang diukur yaitu 50 gram diletakkan dalam cup viskotester. Rotor

dicelupkan dalam emulgel tersebut hingga batas yang tertera pada rotor. *Viscometer* dihidupkan dan rotor akan mulai bergerak atau berputar, biarkan beberapa saat hingga jarum penunjuk stabil.

12.5 Uji daya lekat. Emulgel 0,5 gram diletakkan diatas kaca obyek yang telah ditentukan luasnya. Gelas obyek yang lain diletakkan di atas gel tersebut dan ditekan dengan beban 1 kilogram selama 5 menit, setelah itu beban diangkat dan tarik tuas sambil stopwatch dinyalakan. Waktu dihitung saat tuas ditarik dan dihentikan ketika kaca obyek terlepas. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pada tiap formula (Naibaho *et al.* 2013).

12.6 Uji daya sebar. Emulgel sebanyak 0,5 gram di letakkan hati –hati diatas kaca transparan , kemudian ditutup dengan kaca tranparan yang lain dan diberikan beban secara bertahap (50 gram, 100 gram, 150 gram dan 200 gram) setiap penambahan beban diberikan waktu 1 menit dan diukur diameternya. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali pada tiap formula (Hernani 2012).

12.7 Uji stabilitas *freeze-thaw*. Uji stabilitas *freeze-thaw* dilakukan. Sediaan emulgel disimpan pada suhu 4⁰ C kemudian selama 24 jam kemudian di lanjutkan dengan disimpan pada suhu 40⁰ C selama 24 jam (satu siklus) dilanjutkan sampai lima siklus, setelah *freeze-thaw* selesai 5 siklus, dilakukan pengujian sifat fisik yaitu : Organoleptis, pH, viskositas, daya lekat, dan daya sebar, untuk melihat apakah terjadi perubahan sifat fisik setelah dilakukan uji stabilitas *freeze-thaw* (Priani *et al.* 2013).

13. Sterilisasi

Sterilisasi media uji MHA,VJA, BHI disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121^o C dengan tekanan 1 ATM selama 15 menit dan alat-alat gelas seperti *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri yang digunakan dalam penelitian disterilisasi dengan oven suhu 170^o C selama 15 menit, sedangkan alat seperti jarum ose dipanaskan langsung dalam api bunsen dan inkas disterilkan dengan disemprot menggunakan formalin cair.

14. Pembuatan kosentrasi larutan uji

Pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun bandotan, konsentrasi yang dibuat berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Harun (2017). Ekstrak daun bandotan dibuat menjadi 4 variasi konsentrasi yaitu 10%,

20%, 30% dan 40%. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dibuat dari larutan induk yaitu dengan menimbang 4 gram ekstrak kemudian dilarutkan dalam DMSO 5% sampai 10 mL, kemudian dari larutan induk diencerkan menjadi 10%, 20% dan 30%. Kontrol positif menggunakan *Clindamycin*, pembuatan dosis kontrol positif berdasarkan sediaan injeksi yang ada di pasaran yaitu 150 mg/mL, menimbang serbuk *Clindamycin* 600 mg kemudian dilarutkan dalam aqua pro injeksi sebanyak 4 mL dan diencerkan menjadi 2 μ g setara dengan konsentrasi disk cakram *Clindamycin*. Kontrol negatif menggunakan larutan DMSO 100% yang diencerkan menjadi konsentrasi 5%.

15. Pembuatan suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan mengambil biakan murni pada media NA miring kurang lebih 2 ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kemudian dibuat suspensi dalam tabung yang berisi *Brain Heart Infusion* (BHI) dan kekeruhannya disesuaikan dengan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Tujuan disesuaikannya suspensi bakteri dengan standar Mc farland 0,5 adalah agar bakteri yang digunakan sama selama penelitian.

16. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

16.1 Identifikasi dengan media selektif. Suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang telah siap diinokulasikan pada medium VJA yang sudah ditambahkan 3 tetes kalium telurit 1% kemudian diinkubasi selama 48-72 jam dengan suhu 37⁰ C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dengan warna kuning di sekitar koloni (Hadioetomo 1985).

16.2 Pewarnaan Gram. *Object glass* disiapkan dan bersihkan dengan kapas beralkohol 70%. NaCl 0,9% sebanyak satu tetes diletakkan dalam *object glass* kemudian ambil tu ose biakan bakteri murni, homogenkan dengan NaCl 0,9% di permukaan *object glass* dan fiksasi di atas bunsen. Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama, ditetaskan lalu didiamkan kurang lebih selama 1 menit, dicuci dengan aqua destilata mengalir dan ditetesi lugol Iodine (Gram B sebagai mordant) diamkan kurang lebih 1 menit, dicuci kembali menggunakan aqua destilata mengalir dan dikeringkan, kemudian tetesi dengan gram C (etanol

96%), diamkan kurang lebih 10-15 detik, dicuci aqua destilata mengalir kemudian ditetesi gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup) dan didiamkan kurang lebih 1 menit, lalu dicuci dengan aqua destilata mengalir dan preparat dikeringkan di udara. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 positif bila berwarna ungu, berbentuk bulat, dan bergerombol seperti anggur waktu diamati dibawah mikroskop (Jawetz *et al.* 2013).

16.3 Uji biokimia. Uji biokimia ada 2 cara yaitu dengan uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dilakukan dengan menambahkan beberapa tetes larutan hidrogen peroksida pada slide (*objek glass*) kemudian ditambahkan sejumlah kecil bakteri dari media nutrient agar, hasil positif menunjukkan adanya gelembung udara. Gelembung udara yang terbentuk disebabkan karena enzim katalase mengurai hidrogen peroksida menjadi H₂O dan O₂. Enzim katalase adalah enzim yang dimiliki bakteri *Staphylococcus aureus* yang berperan dalam sebagai daya tahan antibakteri terhadap fagositosis. Enzim katalase menjadi pembeda antara bakteri *Staphylococcus aureus* dari gram positif dan *Streptococcus* dari gram negatif. Uji koagulase dilakukan dengan menggunakan plasma darah kelinci yang telah ditambahkan asam sitrat dan diencerkan dengan perbandingan 1:5 dan ditambah dengan satu ose biakan bakteri dari media cair yaang telah berumur 24 jam, kemudian diinkubasi dengan suhu 37⁰ C. Sebuah tabung yang berisi plasma darah kelinci ditambah dengan media cair steril sebagai kontrol positif. Jika terbentuk gumpalan plasma setelah 1-4 jam hasil positif, gumpalan plasma yang terbentuk kuat, jika tabung dibalik plasma tidak terlepas dari dinding tabung. *Staphylococcus aureus* menghasilkan koagulase, enzim protein yang dapat menggumpalkan plasma oksalat atau sitrat. Koagulase berikatan dengan prothrombin, bersama-sama mereka menjadi aktif secara enzimatik dan memulai polimerisasi fibrin. Produksi koagulase dianggap identik dengan potensi invasif patogenik (Jawetz *et al.* 2013).

17. Uji aktivitas ekstrak

Pengujian aktivitas ekstrak menggunakan metode difusi sumuran. Difusi sumuran adalah pembuatan lubang pada media padat yang telah diinokulasikan bakteri. Media padat *Mueller Hinton Agar (MHA)* diinokulasikan bakteri, yaitu

dengan menggunakan kapas lidi steril kemudian dimasukkan kedalam suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang telah distandarkan dengan standar *Mc Farland* 0,5, usapkan pada seluruh permukaan media sampai merata, tunggu 15 menit agar suspensi bakteri berdifusi pada media. Pada media yang telah diusap dengan suspensi bakteri kemudian dibuat sumuran dengan lubang sebesar 6 mm. Injeksikan masing – masing konsentrasi ekstrak, kontrol positif ,dan negatif pada lubang menggunakan *micropipet* sebanyak 50 μ l. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Daya hambat yang terbentuk berupa zona bening, diukur menggunakan jangka sorong manual (Febrianasari 2018)

18. Pengujian efek antibakteri

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci sebanyak 5 ekor dengan umur \pm 3 bulan dengan berat 2-3 kg. Hewan uji kelinci yang sudah diaklimatisasi selama 5 hari dicukur bulu pada punggung kelinci kemudian dipilih 5 lokasi penyuntikan dibagian kiri dengan jarak masing-masing lokasi \pm 5 cm. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinfeksi dengan menginjeksikan secara subkutan sebanyak 0,25 ml pada masing masing lokasi kulit pada punggung kelinci yang telah disiapkan. Emulgel diberikan setelah 48 jam pada daerah yang diinfeksi. Emulgel ekstrak etanol daun bandotan dengan konsentrasi Na-CMC 2%, 3%, dan 4% dioleskan pada 3 lokasi kulit di punggung kanan dan kiri kelinci, 2 lokasi di punggung kanan sebagai kontrol negatif dioleskan basis emulgel tanpa ekstrak, kontrol positif dioleskan gel *clindamycin*, kontrol normal tanpa perlakuan. Punggung kelinci yang telah dioles emulgel ditutupi dengan *aluminium foil* untuk menghindari emulgel dijilat oleh kelinci. Emulgel dioleskan 2 kali sehari (pagi dan sore), pengamatan waktu penyembuhan infeksi berdasarkan hilangnya eritema dan nanah berkurang (Naibabo *et al.* 2013).

19. Pengamatan daya kesembuhan infeksi

Efek antibakteri dapat dilihat secara makroskopis dengan mengamati lamanya waktu penyembuhan infeksi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diinfeksi pada punggung kelinci. Parameter kesembuhan infeksi ditandai dengan hilangnya eritema, nanah dan keringnya luka infeksi pada kulit punggung

kelinci yang diinfeksi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 setelah di berikan sediaan emulgel ekstrak daun bandotan dengan variasi konsentrasi Na-CMC.

E. Analisis Data

Data uji daya sebar, daya lekat, pH dan viskositas sediaan emulgel ekstrak daun bandotan dianalisis menggunakan uji *Kolmogorof-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 ($p > 0,05$).

Data hasil pengujian efek emulgel ekstrak etanol daun bandotan dengan konsentrasi Na-CMC 2%,3% dan 4% dengan lamanya waktu penyembuhan infeksi dianalisis secara statistik menggunakan metode *Kolmogorof- Smirnov*. Hasil terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan metode *analysis of varian* (*ANOVA*) satu jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal- Wallis* dan dilanjutkan dengan *Mann-Whitney* untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antar satu dengan yang lainnya.