

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diperoleh dari desa Karangpandan Tawanmangu Kab. Karanganyar Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diambil secara acak dengan memilih daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, segar dan bersih yang diperoleh pada bulan september 2018 dari desa Karangpandan Tawanmangu Kab. Karanganyar Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian adalah ekstrak etanol 96% daun binahong terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel dari perasan daun segar 200 gram dan ekstrak daun binahong dari daun segar 200 gram. Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri sediaan emulgel perasan dan ekstrak etanol 96% daun binahong pada kulit punggung kelinci dilihat dari kesembuhan luka.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk diketahui pengaruhnya terhadap variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun binahong dalam formulasi sediaan emulgel.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, media, sterilisasi, kondisi fisik hewan uji yang meliputi; berat badan, usia dan jenis kelamin, tempat luka, temperatur, makanan dan minuman kelinci, proses pembuatan sediaan gel, penelitian dan laboratorium meliputi kondisi alat bahan yang digunakan harus steril.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah adanya aktivitas antibakteri pada kulit punggung kelinci yang dilihat dari lamanya waktu penyembuhan.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun binahong adalah daun tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, masih segar dan bebas dari penyakit, diambil dari petani di Karangpandan, Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, perasan dan ekstrak etanol daun binahong adalah ekstrak kental hasil remaserasi daun binahong dengan pelarut etanol 96%.

Ketiga, bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adalah bakteri yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Keempat, konsentrasi perasan dan ekstrak etanol daun binahong dalam formula gel adalah 200 gram daun segar yang digunakan dalam penelitian.

Kelima, kelinci percobaan adalah kelinci jantan putih (*New Zealand White*) berumur 3 bulan, 1,5-2 kg dan kondisi bagian punggung kelinci yang telah dicukur.

Keenam, uji aktivitas antibakteri secara *in vivo* adalah melihat daya penyembuhan terhadap pertumbuhan bakteri dengan cara menginfeksi secara subkutan 0,2 mL pada 5 lokasi pada kulit punggung kelinci yang telah dicukur, kemudian dibalut perban steril dan dibiarkan selama 48 jam hingga terjadi infeksi

kemudian di oleskan dengan emulgel perasan dan ekstrak etanol 96% daun binahong.

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

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi neraca analitik, tabung reaksi, cawan petri, cawan porselin, pipet ukur, Erlenmeyer, waterbath, batang pengaduk, pipet ukur, gelas kimia, labu ukur, kapas lidi steril, jarum ose, lampu spiritus, pipet volum, autoklaf, inkubator, beaker glass, mortir, stamper, wadah gel, stopwatch, viscometer, seperangkat alat uji daya sebar, obyek glass, *deck glass*, mikroskop, arloji, pH meter, mesh no. 60, kertas saring, *rotary evaporator*, dan oven.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel.Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun binahong yang diambil dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmagu, Jawa Tengah.

2.2 Bahan kimia.Bahan kimia yang digunakan adalah kalium tellurite 1%, etanol 96%, HPMC, gliserin, nipagin, propilen glikol, aquadest, *Nutrient Agar* (NA), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Brain Heart Infusion* (BHI), asam asetat (CH_3COOH), asam sulfat (H_2SO_4), hidrogen peroksida 3%, asam sitrat, FeCl 1%, methanol 30%, Kristal Violet (Gram A), Lugols Iodine (Gram B), Gram C, Safranin (Gram D),Gentamisin.

2.3 Bahan uji.Bahan uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2.4 Hewan uji.Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci jantan putih (*New Zealand white*) berumur 3 bulan, bobot 1,5-2 kg yang diperoleh dari Pasar Hewan Depok Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman merupakan tahaan pertama dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel tanaman daun binahong dengan cara mencocokkan ciri-ciri makroskopis dan morfologi yang ada dalam tanaman yang akan diteliti dengan kunci determinasi untuk menghindari kesalahan dari tanaman yang digunakan untuk penelitian. Determinasi dilakukan di B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional)

2. Pengambilan dan pemilihan bahan

Daun binahong diambil dari petani di Karangpandan, Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun binahong dibersihkan dengan menggunakan air mengalir agar menghilangkan kotoran-kotaran lain yang melekat pada daun binahong. Daun binahong yang telah dibersihkan dilanjutkan dengan proses pengeringan menggunakan oven pada suhu 50 °C sampai simplisia kering ditandai dengan daun pecah-pecah ketika diremas. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air pada daun binahong sehingga dapat mengurangi bahkan mencegah pembusukan yang disebabkan oleh mikroorganisme. Bahan yang sudah dikeringkan lebih mudah dihaluskan menjadi serbuk.

3. Pembuatan serbuk binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Daun binahong yang telah dikeringkan, kemudian diserbuk dengan alat penyerbuk lalu diayak dengan menggunakan ayakan no 60 sampai serbuk terayak habis. Hasil serbuk tersebut disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat. Kemudian dilakukan presentase bobot kering terhadap bobot basah.

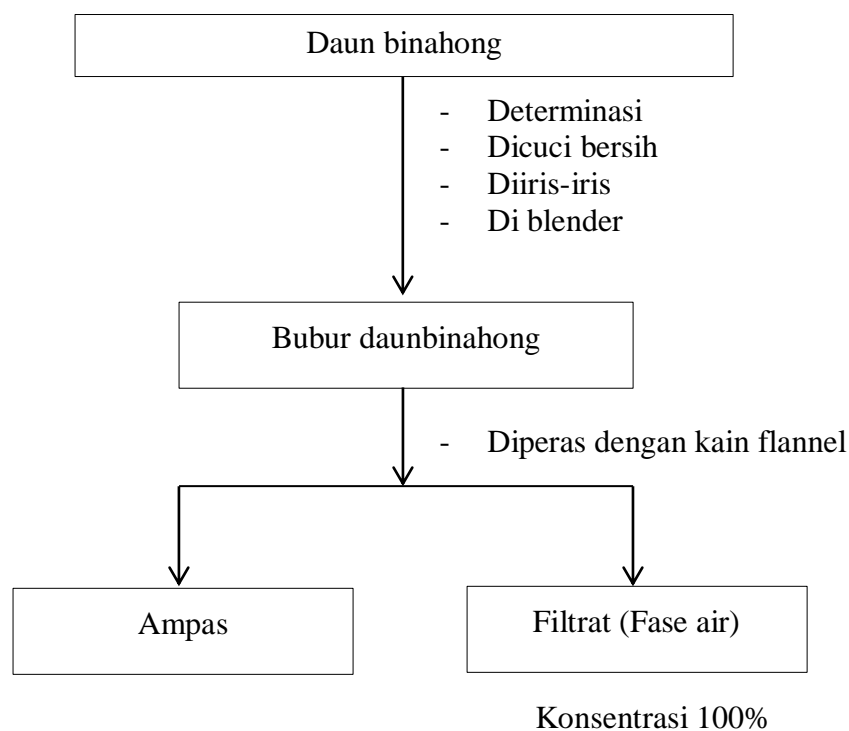
4. Penetapan susut pengeringan serbuk binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong dengan menggunakan alat *Moisture balance*. Timbang sebanyak 2 gram serbuk daun binahong dimasukkan alat tersebut dengan suhu 105 °C sampai bobot konstan dan terdapat bunyi dari alat, dilakukan sebanyak 3 kali ditandai dengan hasil diperoleh bobot konstan. Kadar air dalam simplisia tidak lebih dari 10% (Kemenkes RI 2010). Apabila kadar air > 10% akan menyebabkan terjadi proses enzimatik dan

kerusakan oleh mikroba sehingga penyimpanan waktu lama dapat merubah kandungan kimia yang telah terbentuk (Sayuti 2015).

5. Pembuatan perasan daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Daun tua binahong diambil tiga perempat dari pangkal batang tanaman binahong sebanyak 200 gr, dicuci bersih lalu ditiriskan kemudian dihaluskan dengan cara diblender. Daun tua dapat dilihat berdasarkan warna daun yaitu tidak terlalu berwarna hijau muda. Trikoma sebagai tempat akumulasi bioaktif lebih banyak terdapat pada daun dewasa atau tiga perempat dari pohon. Daun binahong yang sudah dihaluskan kemudian diperas menggunakan tangan dengan bantuan kain saring bersih hingga menghasilkan perasan daun binahong dengan konsentrasi 100%. (Trisnawati & Setyowati 2017)

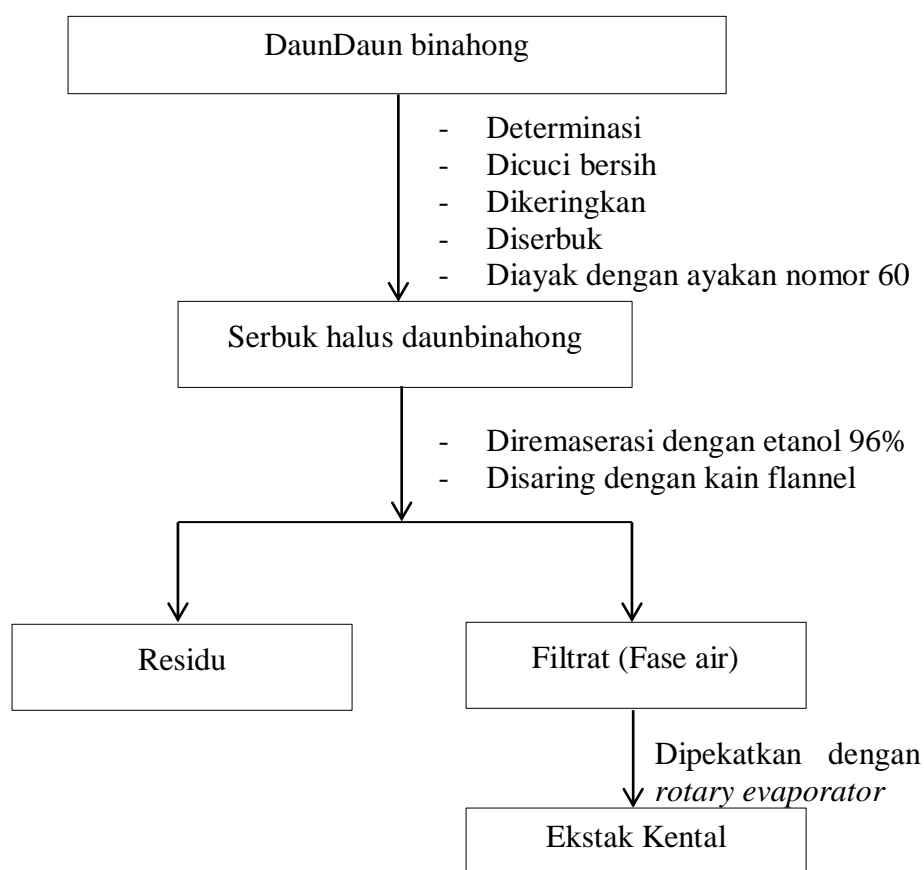


Gambar 11. Skema pembuatan perasan daun binahong

6. Pembuatan ekstrak etanol daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

Pembuatan ekstrak daun binahong menggunakan metode remaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 bagian.

Serbuk daun binahong ditimbang sebanyak 200 gram masukkan kedalam botol maserasi ditambahkan pelarut 96%. Setelah 24 jam disimpan, sediaan disaring dengan kain flannel. Setelah didapatkan maserat, maserat kemudian ditambah kembali dengan 10 bagian pelarut, setelah 24 jam berikutnya sediaan disaring kembali (KEMENKES RI 2013). Untuk memisahkan dengan cairan penyaringnya menggunakan *rotary evaporator* untuk menguapkan pelarut (Auliawan & Bambang 2014). Rendemen yang dihitung adalah persentase bobot (b/b) antara rendemen dengan bobot simplisia yang digunakan dalam penimbangan (KEMENKES 2013).



Gambar 12. Skema pembuatan ekstrak etanol daun binahong

7. Uji Susut Pengerinan Ekstrak

Penetapan susut pengeringan ekstrak daun binahong dengan menggunakan alat *Moisture balance*. Timbang sebanyak 2 gram ekstrak daun binahong dimasukkan alat tersebut dengan suhu 105°C hingga bobot konstan atau sampai

alat mengeluarkan bunyi, dilakukan sebanyak 3 kali ditandai dengan hasil diperoleh bobot konstan. Kadar air dalam simplisia tidak lebih dari 10% (KEMENKES RI 2010). Apabila kadar air > 10% akan menyebabkan terjadi proses enzimatik dan kerusakan oleh mikroba sehingga penyimpanan waktu lama dapat merubah kandungan kimia yang telah terbentuk (Sayuti 2015).

8. Uji bebas etanol ekstrak daun binahong

Uji bebas etanol disebut juga sebagai uji esterifikasi. Ekstrak daun binahong dilakukan pengujian bebas etanol untuk mengetahui bahwa ekstrak yang kita gunakan benar-benar bebas dari etanol. Uji bebas etanol ini dilakukan dengan cara ekstrak diteteskan dalam tabung reaksi dan ditambahkan asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan. Apabila ujinya positif ditunjukkannya bau ester yang khas dari etanol (Sayuti 2015).

9. Identifikasi kandungan kimia ekstrak etanol dan perasan daun binahong

9.1. Identifikasi senyawa alkaloid. Perasan atau Ekstrak ditimbang 0,5 gram ditambahkan 1 ml HCl 2M dan 9 ml aquadesr dipanaskan selama 2 menit, dinginkan dan kemudian di saring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian masing-masing ditambah dengan pereaksi *Dragendroff*, *Mayer* dan *Wagner* (Setyowati *et al* 2014).

9.2. Identifikasi senyawa flavonoid. Perasan atau Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambahkan air panas sebanyak 10 ml kemudian dipanaskan selama 5 menit. Identifikasi dilakukan dengan cara filtrat 5 ml ditambahkan sedikit serbuk logam Mg, 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amil alkohol kemudian dikocok. Apabila terjadi warna merah/kuning/jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Ismiyarto *et al* 2009).

9.3. Identifikasi senyawa saponin. Perasan atau Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambahkan 5 mL aquadest lalu dipanaskan selama 5 menit dan selanjutnya didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji saponin menunjukkan hasil positif jika terbentuk busa setinggi kurang lebih 1 cm dan tetap stabil setelah didiamkan selama 15 menit (Yuningsih 2007).

9.4. Identifikasi senyawa tanin. Perasan atau Ekstrak ditimbang sebanyak 0,1 gram ditambahkan 5 mL quadest kemudiaan didihkan selama 5 menit. Larutan

ini disaring dan filtratnya ditambahkan dengan 5 tetes FeCl 1%. Uji tannin menunjukkan hasil positif jika terbentuk warna biru tua atau hitam kehijauan (Yuningsih 2007).

10. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang dibiakkan di media nutrient agar (NA) diambil 2 ose atau lebih dan ditanam pada tabung yang berisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) diinkubasi 5-8 jam pada suhu 37°C, kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 setara dengan jumlah $1,5 \times 10^8$ cfu/ml. Tujuan disesuaikan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan Mc Farland 0,5 yaitu agar jumlah bakteri yang digunakan sama selama penelitian dan mengurangi kepadatan bakteri saat pengujian (Borman *et al.* 2015).

11. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

11.1. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. dilakukan dengan cara menginokulasi bakteri uji pada medium Vogel Jhonson Agar yang sebetulnya sudah ditambahkan kalium tellurite 1% kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji dikatakan positif jika berwarna hitam dan warna medium di sekitar berwarna kuning (Darwis W *et al.* 2013).

11.2. Identifikasi Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram pada bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dengan ditambahkan Kristal Violet (Gram A) sebagai pewarna utama, didiamkan kurang lebih 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan ditetesi Lugols Iodine (Gram B) sebagai mordant, didiamkan kurang lebih 1 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan, kemudian ditetesi Gram C dan didiamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan air mengalir lalu ditambahkan Safranin (Gram D) sebagai cat lawan atau penutup, didiamkan kurang lebih 1 menit, dan dicuci dengan air mengalir kemudian preparat dikeringkan di udara dan diamati dibawah mikroskop, menunjukkan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 positif apabila berwarna ungu, bentuk bulat dan bergerombol seperti anggur (Darwis W *et al.* 2013)

11.3. Identifikasi dengan Uji Biokimia.Terbagi menjadi dua uji yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase dilakukan dengan cara setetes larutan hidrogen peroksida 3% diteteskan pada kaca objek dan sejumlah kecil pertumbuhan bakteri diletakkan pada larutan. Pembentukan gelembung (pelepasan oksigen) menunjukkan hasil tes positif(Darwis W *et al.* 2013)

Uji koagulase dilakukan dengan cara plasma kelinci (atau manusia) diberikan asam sitrat yang diencerkan 1:5 dicampur dengan volume yang sama, ditanamkan 1 ose biakan bakteri pada agar dan diinkubasi pada 37°C selama 1-4 jam, hasil tes adalah positif bila adanya gumpalan pada tabung . (Darwis W *et al.* 2013)

12. Formulasi sediaan emulgel perasan dan ekstrak daun binahong (*Anrederacordifolia* (Ten.)

Berdasarkan jurnal penelitian dari Tri Novi Yani, Effionora Anwar,Fadlina Chany Saputri (2016),sbb:

Tabel 2. Formula

| | Gram (g) | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | F1 kontrol negatif | F2 Kontrol positif | F3 Perasan | F4 ekstrak | F5 Perasan | F6 ekstrak |
| Sampel Perasan dari daun segar | - | - | 75 | - | 75 | - |
| Sampel ekstrak dari daun segar | - | - | - | 1,24 | - | 1,24 |
| HPMC | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | - | - |
| Paraffin cair | 6,5 | 6,5 | 6,5 | 6,5 | - | - |
| Span 80 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | - | - |
| Tween 80 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | 1,5 | - | - |
| Propilen glikol | 5 | 5 | 5 | 5 | - | - |
| Propil paraben | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | - | - |
| Metil paraben | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | - | - |
| Gentamisin | - | 0,1 | - | - | - | - |
| Air suling ad | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Keterangan:

F1: formula emulgel control negative tanpa ekstrak

F2: formula emulgel control positif dengan gentamisin 100 mg

F3: formula emulgel perasan daun binahong

F4: formula emulgel ekstrak daun binahong

F5: perasan daun binahong + Air Suling ad 100

F6: ekstrak daun binahong + Air Suling ad 100

13. Pembuatan emulgel

Pembuatan emulgel dilakukan sesuai dengan komposisi formula yang tertera pada table 2. Masing-masing bahan basis emulgel ditimbang terlebih dahulu. Selanjutnya dilakukan pembuatan basis emulgel dengan cara: pembuatan

emulsi, fase minyak dibuat dengan mencampurkan span 80 dan nipagin dengan paraffin liquid pada suhu 70 °C. Fase air dibuat dengan mencampurkan tween 80 dengan sebagian propilenglikol pada suhu 70 °C. Fase minyak ditambahkan pada fase air dan nipasol pada suhu 70 °C sambil terus diaduk dengan pengaduk sehingga terbentuk emulsi. Gel dibuat dengan mendispersikan HPMC sedikit demi sedikit dalam air panas dengan suhu 80°C, digerus sampai terbentuk basis gel. Kemudian emulsi dan gel yang sudah terbentuk dicampur dengan *homogenizer* pada kecepatan 30 rpm selama 45 menit sampai terbentuk emulgel (Tri *et al.* 2016).

E. Evaluasi Sediaan Emulgel

1. Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan untuk melihat tampilan fisik sediaan dengan cara melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna dan bau dari sediaan yang telah dibuat (Sarlina *et al* 2017). Pengujian pertama dilakukan di hari pertama emulgel dibuat dan di uji kembali pada hari ke-1 dan hari ke-21 setelah pembuatan (Suryaniet *al* 2013).

2. Uji homogenitas emulgel

Uji homogenitas dilakukan dengan cara mengoleskan 3 bagian atas, tengah dan bawah dari gel pada kaca transparan. Homogenitas ditunjukkan dengan tidak adanya butiran kasar pada sediaan (Sayuti 2015). Pengujian pertama dilakukan di hari pertama gel dibuat dan di uji kembali pada hari ke-1 dan hari ke-21 setelah pembuatan (Ulfah *et al* 2016).

3. Uji pH emulgel

Uji pH dilakukan untuk mengetahui tingkat keasaman sediaan emulgel sehingga menjamin sediaan emulgel tidak menyebabkan iritasi pada kulit (Sayuti 2015). Uji ini dilakukan dengan menimbang 1 gram sediaan dilarutkan dalam aquadest 9 mL dalam beaker glass aduk hingga merata. Larutan diukur pH nya dengan pH meter yang telah distandarisasi, jika terlalu asam ditambahkan sedikit basa dan jika terlalu basa ditambahkan sedikit asam sampai pH ideal dengan pH kulit. pH sediaan yang memenuhi kriteria pH kulit dalam interval 4,5-6,5 (Sayuti

2015). Pengujian pertama dilakukan di hari pertama emulgel dibuat dan di uji kembali pada hari ke-1 dan hari ke-21 setelah pembuatan (Suryani *et al* 2013).

4. Pengukuran Viskositas

Untuk mengetahui sifat rheologi dari sediaan dilakukan pengukuran viskositas, dengan menggunakan *Viscotester* Rion VT-04F spindel no 2. Sampel ditempatkan pada wadah dan dipasang pada *viscotester portable*. Alat dinyalakan dan diamati pergerakan jarumnya (Tiran & Nastiti 2014). Pengamatan dilakukan pada hari ke-1 dan penyimpanan hari ke-21 (Sharon *et al.* 2013).

5. Daya Sebar

Sebanyak 0,5 gram sediaan krim diletakkan dengan hati-hati di atas kertas grafik yang dilapisi kaca, dibiarkan sesaat (1 menit). Luas daerah yang diberikan oleh sediaan dihitung. Kemudian ditutup lagi dengan kaca yang diberi beban tertentu masing-masing 50 gram, 100 gram, dan 150 gram. Dibiarkan selama 60 detik, lalu pertambahan luas yang diberikan oleh sediaan dapat dicatat (Voigt 1994). Pengamatan dilakukan pada hari ke-1 dan penyimpanan hari ke-21 (Sharon *et al.* 2013).

6. Pengujian Stabilitas emulgel.

6.1 Metode *freeze thaw*. Mempercepat evaluasi kestabilan adalah dengan *cycling test*. Uji *freeze thaw* ini dilakukan sebanyak 5 siklus. Sediaan emulgel disimpan pada suhu dingin $\pm 4^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, proses ini dihitung 1 siklus. Pengamatan karakteristik fisik sediaan meliputi pengamatan organoleptic, pengujian homogenitas, pengukuran pH, pengukuran viskositas, dan uji daya sebar (Dewi 2010)

7. Pengujian terhadap hewan uji

7.1 Penyiapan hewan uji. Hewan uji kelinci jantan putih sebanyak 5 ekor dengan umur 3 bulan dengan berat 1,5-2 kg. Kelinci diaklimatisasi dengan lingkungan tempat penelitian selama 5 hari sebelum diperlakukan agar hewan uji tersebut terbiasa dengan lingkungan dan perlakuan yang baru. Hewan uji ditempatkan dalam kandang dan diberi makan yang cukup untuk setiap harinya.

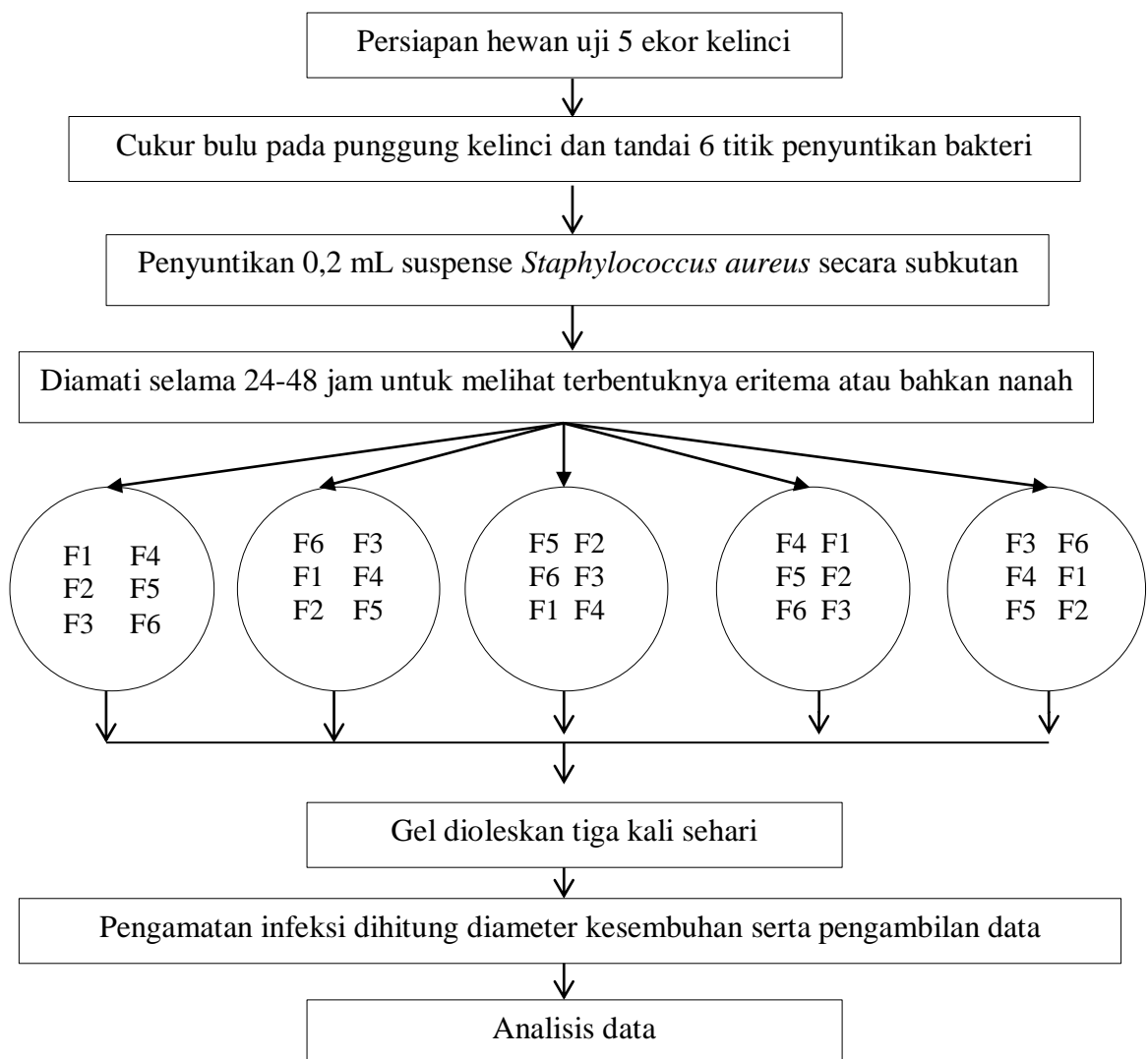
7.2 Pengujian aktivitas antibakteri. Di sediakan lima ekor hewan uji kelinci yang sudah diaklimatisasi dicukur bulu didaerah punggung sebelah kanan, kiri, dan bagian punggung bagian belakang hingga tidak meninggalkan rambut atau licin. Lalu diberikan tanda lokasi yang akan diperlakukan sebanyak 6 lokasi secara acak (F1, F2, F3, F4, F5, F6,) dimana tiga formula dari 6 formula secara acak berada diposisi bagian kiri punggung kelinci Sedangkan tiga formula sisanya berada diposisi kanan pada bagian punggung kelinci, pengacakan berbeda pada setiap kelinci yang bertujuan tidak adanya pengaruh dari masing masing lokasi. Kemudian $0,2 \times 1,5 \times 10^8$ cfu/mL suspensi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinduksikan pada setiap lokasi kulit kelinci secara subkutan dan diamati selama 24-48 jam untuk melihat terbentuknya eritema atau bahkan nanah. Apabila daerah tersebut telah terbentuk nanah. Pemberian sediaan gel dilakukan setelah terbentuk nanah pada daerah infeksi. Pada daerah yang telah ditandai dioleskan emulgel formula 1-6 yang telah diformulasikan dalam bentuk emulgel. Lokasi penyuntikan ditutup atau dibalut dengan perban steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri lain. Pengolesan gel dilakukan 3 kali sehari (tiap 8 jam) hingga nanah dan eritema sembuh.

7.3 Pengamatan daya kesembuhan efek antibakteri. Pengamatan daya kesembuhan dari efek antibakteri dilihat secara makroskopis untuk mengamati lamanya penyembuhan infeksi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diinfeksi pada punggung kelinci setelah pemberian sediaan emulgel maksimal 7 hari, kemudian dianalisis di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta. Parameternya adalah mengecilnya diameter eritema dan keringnya luka pada kulit punggung kelinci. (Paju *et al*, 2013) Menggunakan Skor Tanpa eritema 0 ,sangat sedikit eritema (hampir tidak terlihat) 1 ,eritema jelas terlihat (diameter 25,1-30 mm) 2, eritema sedang (diameter 30,1-35 mm) 3, eritema berat (gelap merah dengan membentuk eskar, diameter > 35 mm)4,

8. Analisis Data

Data hasil pengujian mutu fisik yakni pH, viskositas, uji daya sebar dan daya lekat serta uji stabilitas *Cycling test* dianalisis secara statistik menggunakan metode Kolmogorv-Smirnov. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p >$

0,05) dilanjutkan dengan metode 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-Whitney untuk mengetahui konsentrasi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.



Gambar 13. Skema pengujian aktivitas antibakteri sediaan gel ekstrak daun binahong (terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vivo*)