

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bandotan yang diperoleh dari Petani Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah dan sediaan emulgel ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) dengan variasi konsentrasi *gelling agent* carbopol 940.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun bandotan segar, tidak terlalu tua, tidak terlalu muda, dan bebas hama dan emulgel dari ekstrak daun bandotan dengan berbagai variasi konsentrasi *gelling agent* carbopol 940.

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

##### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun bandotan yang diperoleh dari hasil maserasi dengan pelarut etanol 70%.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah sediaan emulgel dari ekstrak etanol daun bandotan dengan konsentrasi *gelling agent* carbopol 940 yang berbeda-beda serta pengujian stabilitas mutu fisik emulgel dengan berbagai macam pengujian.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri emulgel dari ekstrak etanol daun bandotan dengan variasi konsentrasi carbopol 940 pada kulit punggung kelinci dilihat dari kesembuhan luka.

##### **2. Klasifikasi Variabel Utama**

Variabel utama diklasifikasikan menjadi 3 macam, yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja dipelajari pengaruhnya. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi *gelling agent* carbopol 940 yang terkandung dalam sediaan emulgel.

Variabel tergantung adalah persoalan utama yang merupakan kriteria didalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah stabilitas

sediaan emulgel, mutu fisik emulgel (organoleptis, homogenitas, viskositas, daya sebar, daya lekat, pH) dan daya aktivitas antibakteri dari emulgel ekstrak daun bandotan pada kulit punggung kelinci yang dilihat dari lamanya waktu kesembuhandengan melihat diameter luka infeksi.

Variabel terkontrol adalah variabel yang berpengaruh selain pada variabel bebas sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh bisa diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah ekstrak daun bandotan (tempat tanaman tumbuh, umur tanaman), bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, proses pembuatan emulgel, waktu inkubasi bakteri, hewan uji kelinci (berat, jenis, kondisi kesehatan), kondisi laboratorium termasuk alat dan bahan-bahan yang digunakan.

### **3. Definisi Operasional Variabel Pertama**

Pertama, daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang memiliki daun berwarna hijau segar dan bebas hama diperoleh dari Petani Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah

Kedua, ekstrak daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) adalah hasil ekstraksi daun bandotan dengan pelarut etanol 70%, kemudian diuapkan dengan *Vacuum Rotary Evaporator*.

Ketiga, sediaan emulgel ekstrak etanol daun bandotan adalah emulgel yang diformulasikan dengan tanaman bandotan dengan konsentrasi *gelling agent* carbopol 940 yang berbeda-beda yaitu formula 1 konsentrasi carbopol 940 0,5%, formula 2 carbopol 940 1,5%, formula 3 carbopol 940 2,5%.

Keempat, uji stabilitas dan mutu fisik sediaan emulgel ekstrak daun bandotan yaitu pengujian organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat emulgel.

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

Keenam, hewan uji yang digunakan adalah kelinci jantan putih yang berumur  $\pm$  3 bulan dengan bobot sekitar 2-3 kg dan kulit punggung kelinci yang sudah dicukur.

Ketujuh, pengujian aktivitas antibakteri secara *in vivo* adalah 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 kasa steril dibiarkan sampai 48 jam sampai terjadi infeksi, lalu dilakukan pengolesan emulgel ekstrak etanoldaun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.).

Kedelapan, kesembuhan merupakan proses sembuhnya kelinci yang dilihat dari berkurangnya diameter luka infeksi dalam waktu hitungan hari.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan antara lain bejana maserasi dari bahan gelas, timbangan analitik, oven, *evaporator*, autoklaf, *incubator*, kertas saring, *moisture balance*, cawan uap, labu ukur, corong kaca, gelas kimia, pipet ukur, *erlenmeyer*, batang pengaduk, *waterbath*, cawan petri, cawan porselin, mortir, stamfer, viscometer, tabung reaksi steril, mikropipet, jarum ose, *vortex mixer*, *sentrifuge*, jangka sorong, pinset, lampu pijar, pot salep, ayakan mesh no 40, sendok tanduk, seperangkat alat uji daya sebar, *pH* meter, seperangkat alat uji daya lekat, label, kertas alumunium foil.

#### 2. Bahan

**2.1 Bahan sampel.** Sampel yang digunakan adalah daun bandotan yang diambil dari Petani Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan adalah carbopol 940, span 80, tween 80, Trietanolamin, propilenglikol, metil paraben, propil paraben, akuades, cakram *clindamycin*, serbuk *clindamycin*, paraffin cair, *brain heart infusion*, *vogel johnson agar* (VJA), kalium telurit, Na<sub>3</sub>SO<sub>4</sub> eksikatus, cat kristal violet, lugol iodine, etanol : aseton = 1:1, safranin dan NaCl.

**2.3 Bakteri uji.** Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

**2.4 Hewan uji.** Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci putih jantan berumur  $\pm$  3-5 bulan, bobot kelinci 2-3 kg.

#### **D. Jalannya Penelitian**

##### **1. Pengambilan Tanaman**

Daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) diperoleh dari Petani Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) diambil daun yang tidak terlalu tua, tidak terlalu muda dan daun masih segar.

##### **2. Determinasi Tanaman**

Determinasi deskripsi tanaman digunakan untuk mengetahui kebenaran dari sampel tanaman daun bandotan (*Ageratum conyzoides* L.) yang akan digunakan pada penelitian ini. Determinasi dan identifikasi dilakukan berdasarkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman terhadap kepustakaan yang dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

##### **3. Pembuatan Serbuk**

Tanaman bandotan disortir dan dicuci dengan menggunakan air mengalir agar kotoran yang menempel pada daun bandotan hilang, kemudian daun bandotan yang sudah bersih ditiriskan hingga air yang terdapat dipermukaan daun berkurang atau hilang, kemudian dioven pada suhu 40°C sampai kering. Simplisia yang sudah kering kemudian diserbuk dengan alat penggiling. Diserbuk sampai halus kemudian diayak dengan ayakan mesh no 40. Serbuk ditimbang lagi untuk menentukan bobot persen kering terhadap persen basah, selanjutnya serbuk disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup rapat.

##### **4. Identifikasi Serbuk Daun Bandotan**

**4.1 Pemeriksaan organoleptis serbuk daun bandotan.** Pemeriksaan organoleptis pada serbuk daun bandotan dengan cara mengamati warna, bau, dan bentuk serbuk daun bandotan.

**4.2 Penetapan susut pengeringan serbuk daun bandotan.** Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang atau menguap pada saat proses pengeringan (Depkes RI 2000). Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan

cara serbukdaun bandotan ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian diukur kehilangan senyawa yang menguap atau hilang dan bobot serbuk daun bandotan dengan menggunakan alat *moisture balanced* dengan suhu 105°C. Hasil penetapan susut pengeringan dihitung dalam satuan (%).

**4.3 Penetapan kadar air serbuk daun bandotan.** Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluene. Toluene dijenuhkan dengan air, setelah dikocok didiamkan, maka kedua lapisan air dan toluena akan memisah, kemudian lapisan air dibuang. Ekstrak daun bandotan sebanyak 20 gram dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan 200 ml toluene yang sudah dijenuhkan dengan air. Labu dipanaskan hati-hati, selanjutnya pelarut toluene akan ditampung pada *stahel*. Pemanasan dihentikan bila tidak ada tetesan air lagi. Setelah lapisan air dan toluene memisah sempurna, volume air dibaca dan dihitung kadar air dalam persen terhadap berat ekstrak semula. Penetapan kadar air dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali ( Saifudin *et al.* 2011)

$$\text{Persen kadar air} : \frac{v}{w} \times 100 \%$$

Keterangan :

V = volume air yang terdestilasi (ml)

W = jumlah sampel yang diambil (gram)

## 5. Pembuatan Ekstrak Kental Daun Bandotan

Pembuatan ekstrak kental daun bandotan dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% dengan perbandingan pelarut 1:10. Campuran antara serbuk kering dan 7,5 bagian etanol 70% dimasukkan dalam botol maserasi kemudian ditutup dan disimpan selama 5 hari dengan sesekali dilakukan penggojokan berulang-ulang, disaring dengan kain flannel dan kertas saring. Ampas yang diperoleh dibilas dengan 2,5 bagian sisa pelarut dan dienapkan selama dua hari kemudian digabungkan dengan filtrat yang pertama. Hasil campuran antara filtrat 1 dan 2 kemudian digabung dan diuapkan dalam *vacum rotary evaporator* dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental.

## 6. Identifikasi Ekstrak Daun Bandotan

**6.1 Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun bandotan.** Pemeriksaan organoleptis pada ekstrak daun bandotan meliputi warna, bentuk dan bau dari ekstrak daun bandotan.

**6.2 Penetapan kadar air ekstrak daun bandotan.** Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluene. Toluene dijenuhkan dengan air, setelah dikocok didiamkan, maka kedua lapisan air dan toluena akan memisah, kemudian lapisan air dibuang. Ekstrak daun bandotan sebanyak 10 gram dimasukkan ke dalam labu alas bulat dan ditambahkan 200 ml toluene yang sudah dijenuhkan dengan air. Labu dipanaskan hati-hati, selanjutnya pelarut toluene akan ditampung pada *stahel*. Pemanasan dihentikan bila tidak ada tetesan air lagi. Setelah lapisan air dan toluene memisah sempurna, volume air dibaca dan dihitung kadar air dalam persen terhadap berat ekstrak semula. Penetapan kadar air dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali ( Saifudin *et al.* 2011)

$$\text{Persen kadar air} : \frac{V}{W} \times 100 \%$$

Keterangan :

V = volume air yang terdestilasi (ml)

W = jumlah sampel yang diambil (gram)

**6.3 Uji bebas alkohol ekstrak daun bandotan.** Pemeriksaan bebas etanol 70% terhadap ekstrak daun bandotan bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak daun bandotan sudah tidak mengandung alkohol. Prosedur uji bebas alkohol menambahkan asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) dan asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pekat kedalam tabung reaksi yang sudah berisi ekstrak daun bandotan kemudian dipanaskan. Ekstrak yang bebas alkohol tidak tercium bau khas ester dan jika tercium bau ester khas alkohol maka ekstrak masih mengandung etanol 70%.

## 7. Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Daun Bandotan

**7.1 Identifikais alkaloid.** Ekstrak daun bandotan sebanyak 0,1 gram ditambah 10 ml kloroform dan ditambah beberapa tetes ammonia. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan beberapa tetes ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) pekat. Fraksi asam diambil dan dibagi menjadi 3 tabung. Tabung 1 ditambah pereaksi *Dragendorff*, tabung 2 ditambah pereaksi *Meyer*, tabung 3 ditambah

pereaksi *Wagner*. Adanya senyawa alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi *Mayer*, endapan merah pada pereaksi *Dragendrof* dan endapan coklat pada pereaksi *Wagner* (Harbone 1987).

**7.2 Identifikasi flavonoid.** Ekstrak kental daun bandotan sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan 10 ml air panas kemudian dididihkan selama 5 menit. Larutan ekstrak disaring, diambil filtratnya. Filtrat sebanyak 5 ml, ditambah serbuk Zink/Mg sebanyak 0,5 gram dan tambah 1 ml HCl pekat. Ditambahkan 1 ml amyl alkohol, dikocok kuat kemudian didiamkan hingga memisah. Positif adanya flavonoid bila terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amyl alkohol (Depkes RI 1987).

**7.3 Identifikasi saponin.** Sampel ditimbang sebanyak 3 ml kemudian masukkan tabung reaksi tambah dengan 10 ml air panas kemudian dinginkan dan kocok kuat-kuat selama 10 detik tambahkan 1 tetes HCl. Apabila masih terbentuk busa yang stabil selama 10 menit, maka sampel positif mengandung saponin (Agustina *et al.* 2016).

**7.4 Identifikasi tanin.** Ekstrak sebanyak 1 gram ditambah 10 ml akuades kemudian dididihkan. Setelah dingin filtrat ditambah 5 ml FeCl<sub>3</sub> 1% (b/v). Jika terjadi warna biru tua kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Agustina *et al.* 2016).

## 8. Formula Emulgel

Formulasi dirancang dengan variasi konsentrasi kombinasi *gelling agent* carbopol 940 pada tiap formula.

**Tabel 1. Formulasi emulgel**

Bahan	Konsentrasi (%)
Carbopol 940	0,5
Parafin cair	7,5
Span 80	3
Tween 80	3
Propilen Glikol	5
Nipagin	0,03
Nipasol	0,01
TEA	4 tetes
Aqua destilata	ad 100

Sumber (Riski *et al.* 2016)

**Tabel 2. Rancangan formula emulgel ekstrak daun bandotan yang sudah dimodifikasi**

Bahan	Satuan	Konsentrasi (%)			
		Negatif	F1	F2	F3
Ekstrak Daun bandotan	Gram	-	20,00	20,00	20,00
Carbopol 940	Gram	1,5	0,5	1,5	2,5
Paraffin 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

## 9. Pembuatan Emulgel

**10.1 Pembuatan emulsi.** Pembuatan emulsi dilakukan dengan cara fase minyak dibuat dengan meleburkan nipasol, paraffin cair, dan span 80 secara berturut-turut dalam cawan porselin diatas *hot plate* hingga suhu 70°C. Fase air dibuat dengan cara mencampurkan nipagin, propilen glikol, tween 80 dan aqua destilata pada suhu 70°C. Fase minyak dituang ke dalam fase air, diaduk dengan *homogenizer* kecepatan 300 rpm sampai terbentuk massa emulsi (Riskiet *al.* 2016) kemudian ekstrak etanol daun bandotan dimasukkan dalam emulsi diaduk hingga ekstrak homogen dengan emulsi.

**10.2 Pembuatan gel.** Pembuatan gel dilakukan dengan cara carbopol 940 didispersikan dengan aquadest selama 1 jam. Setelah terdispersi ditambahkan Trietanolamin (TEA) secukupnya (3-4 tetes), sambil diaduk sampai terbentuk massa gel.

**10.3 Pembuatan emulgel.** Pembuatan emulgel dilakukan dengan cara massa emulsi yang sudah dicampur dengan ekstrak etanol daun bandotan dicampurkan ke dalam gel kemudian diaduk dengan menggunakan homogenizer dengan kecepatan 300 rpm sampai homogen dan terbentuk massa emulgel yang dikehendaki (Riski *et al.*2016).

## 10. Pembuatan Kontrol

**11.1 Kontrol positif.** Kontrol positif yang digunakan adalah gel medi klin *Clindamycin* 1%.

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

**11.3 Kontrol normal.** Kontrol normal yang digunakan adalah kulit punggung kelinci tanpa perlakuan apapun.

## **11. Pengujian Sifat Fisik Emulgel Ekstrak Daun Bandotan**

**12.1 Uji organoleptis.** Pengujian organoleptis dilakukan dengan mengamati sediaan emulgel dari warna, bau, bentuk dari sediaan.

**12.2 Uji homogenitas.** Uji homogenitas dilakukan dengan cara meletakkan sediaan diantara dua kaca objek dan dan diamati ada atau tidaknya partikel kasar yang terdapat dalam sediaan. Sediaan emulgel dikatakan homogen apabila tidak terdapat butiran kasar.

**12.3 Uji daya sebar.** Sediaan emulgel sebanyak 0,5 g diletakkan di tengah-tengah kaca bulat, ditutup dengan kaca bulat lain yang telah ditimbang beratnya, dibiarkan selama 1 menit dan diukur diameter sebar emulgel. kemudian diberikan beban secara bertahap yaitu 50 gram, 100 gram, 150 gram dan 200 gram. Setiap penambahan beban diberikan waktu 1 menit kemudian dilakukan pengukuran diameternya. Pengujian daya sebar dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali pada setiap formula (Suardi *et al.* 2008). Pengujian pertama dilakukan setelah sediaan emulgel dibuat. Sediaan emulgel kemudian disimpan selamam 7 haridan diuji lagi daya sebar nya. Sediaan emulgel hari ke 14 dan hari ke 21 diuji lagi daya sebar nya.

**12.4 Uji daya lekat.** Uji ini dilakukan dengan cara sediaan emulgel 0,25 gram diletakkan diatas objek glass lalu ditutup dengan objek glass yang lain. Beban seberat 1 kg diletakkan diatas objek glass selama 5 menit, setelah itu beban diangkat dan tuas ditarik, kemudian catat waktu pelepasan kedua objek *glass* dengan menggunakan stopwatch. Waktu dihitung ketika tuas tepat ditarik dan dihentikan ketika kaca objek glass terlepas (Naibaho *et al.* 2013). Pengujian daya lekat dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada setiap formula. Pengujian pertama dilakukan setelah sediaan emulgel dibuat. Sediaan emulgel kemudian disimpan selama 7 hari dan diuji lagi daya lekatnya, selanjutnya pada hari ke 14 dan hari ke 21 diuji lagi daya lekatnya.

**12.5 Uji viskositas.** Uji viskositas dilakukan dengan menggunakan alat viskometer. Emulgel sebanyak 100 gram dimasukkan kedalam cup viskotester

kemudian rotor dicelupkan dalam emulgel hingga batas yang tertera pada rotor. Viskotester dihidupkan dan rotor akan mulai berputar, biarkan beberapa saat hingga jarum penunjuk viskositas menunjukkan angka stabil. Pengujian viskositas diulangi sebanyak empat kali tiap formulanya yaitu pada hari pertama dibuat, 7 hari setelah dibuat, hari ke 14 dan hari ke 21 (Gard *et al.* 2002)

**12.6 Uji pH.** Uji pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter yang sebelumnya sudah dikalibrasi dengan dapar standar pH 4 dan pH 7. Emulgel sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam beaker glass kemudian diencerkan dengan menggunakan aqua destilata sebanyak 5 ml. pH meter dicelupkan kedalam emulgel yang sudah diencerkan dan dilihat nilai pH pada alat. Pengujian pH diulangi sebanyak empat kali tiap formulanya yaitu pada hari pertama dibuat, 7 hari setelah dibuat, hari ke 14 dan hari ke 21 (Naibaho *et al.* 2013).

**12.7 Uji stabilitas.** Uji stabilitas dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu dengan cara 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 selesai satu siklus diamati ada tidaknya pemisahan fase (Priani *et al.* 2013)

## 12. Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan pada media dan alat-alat kaca seperti beker glass, gelas ukur, erlenmeyer yang digunakan untuk penelitian disterilkan terlebih dahulu dengan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dan alat-alat seperti ose di sterilisasi dengan cara dipanaskan langsung dalam api bunsen dan inkas disterilkan dengan disemprot formalin.

## 13. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dengan mengambil biakan murni kurang lebih 2-3 ose bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Suspensikan dalam tabung yang sudah diisi media *Brain Heart Infusion* (BHI) lalu kekeruhannya disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 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.

#### **14. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji**

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun bandotan, yang dilakukan oleh Harun (2017). Ekstrak daun bandotan dibuat 4 macam variasi konsentrasi yaitu konsentrasi 10%, 20%, 30%, dan 40%. Variasi konsentrasi ekstrak dibuat dari larutan induk dengan menimbang ekstrak daun bandotan sebanyak 4 gram kemudian dilarutkan dengan 10 mL DMSO 5%. Dari larutan induk diencerkan menjadi beberapa konsentrasi yaitu 10%, 20%, 30%. Kontrol positif yang digunakan adalah klindamisin. Dosis klindamisin berdasarkan sediaan injeksi yang ada di pasaran yaitu 150 mg/mL. Klindamisin sulfate ditimbang sebanyak 600 mg kemudian dilarutkan dengan aqua pro injeksi sebanyak 4 mL, kemudian dilakukan pengenceran sesuai dengan disk cakram yaitu 2 $\mu$ g setara dengan 0,2%. Kontrol negative menggunakan larutan DMSO 100% yang diencerkan menjadi konsentrasi 5%.

#### **15. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Bandotan.**

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan Metode Difusi sumuran. Suspensi bakteri ditanam atau dioles pada media MHA secara merata, kemudian ditunggu selama 15 menit agar suspensi bakteri berdifusi ke media, selanjutnya media dilubangi dengan alat *boor proof*. Masing-masing variasi konsentrasi ekstrak bandotan dimasukkan dalam sumuran sebanyak 50  $\mu$ L dengan menggunakan mikropipet. Kontrol negatif dan kontrol positif masing-masing di pipet sebanyak 50  $\mu$ L dengan mikropipet dan dimasukkan dalam sumuran. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Hasil daya uji antibakteri didasarkan pada pengukuran Diameter Daerah Hambat (DDH) pertumbuhan bakteri yang terbentuk di sekeliling sumuran. Diameter Daerah Hambat (DDH) yang terbentuk di sekitar sumuran diamati dengan menggunakan jangka sorong. Uji dilakukan dengan tiga kali pengulangan.

#### **16. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

**16.1 Identifikasi dengan media selektif.** Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinokulasi pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang sudah ditambahkan 3 tetes kalium telurit 1% kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan adanya warna hitam pada

koloni dan warna kuning pada medium dikarenakan *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasikan manitol menjadi suasana asam dan adanya indikator *fenol red* dalam *Vogel Jonson Agar* dapat merubah medi pH pada medium sehingga pH menurun dan medium berubah menjadi kuning (Jawetz *et al.* 2007).

**16.2 Identifikasi mikroskopis dengan pewarnaan gram.** Pewarnaan gram positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dilakukan dengan menggunakan kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama, lugol iodine (Gram B) sebagai mordant, gram C (etanol : aseton = 1:1) sebagai peluntur, gram D (cat safranin sebagai penutup). Pewarnaan dilakukan dengan cara dibuat preparat ulas yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram B. Diamkan selama 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan preparat dilunturkan dengan Gram C dan diamkan kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aqua destilata mengalir dan preparat dikeringkan diudara. Preparat ditetesi Gram D dan diamkan selama 1 menit lalu dicuci dengan dengan aqua destilata mengalir dan preparat dikeringkan diudara. Hasil positif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bila berwarna ungu, berbentuk bulat, dan bergerombol seperti anggur ketika diamati dibawah mikroskop (Priani *et al.* 2014)).

**16.3 Uji biokimia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.** Uji biokimia dilakukan dengan 2 cara yaitu dengan uji katalase dan koagulase. Uji katalase dengan menggunakan suspense bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ditanam pada medium nutrient cair dengan hydrogen peroksida 3%. Hasil positif bila ditunjukkan dengan adanya pembentukan gelembung udara. Uji koagulase dapat menggunakan plasma darah kelinci diberi sitrat, kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:5 kemudian ditambah dengan satu ose biakan bakteri dan dieramkan dengan suhu 37°C. Kontrol positif tabung plasma darah kelinciditambah media cairsteril dan dieramkan. Tabung-tabung diperiksa dengan melihat pembentukan massa 1-4 jam. Hasil positif kuat ketika tabung test dibalik gumpalan plasma tidak terlepas dan masih tetap melekat didinding tabung (Radji 2011).

### **17. Pengujian Efek Antibakteri Sediaan Emulgel Ekstrak Daun Bandotan**

Penelitian ini menggunakan hewan uji kelinci sebanyak 5 ekor dengan umur  $\pm$  3 bulan dengan berat badan 2-3 kg. Hewan uji kelinci yang sudah diaklimatisasi selama 5 hari kemudian dicukur bulunya di daerah punggung. Pilih 5 lokasi penyuntikan pada bagian kiri dengan jarak masing-masing lokasi  $\pm$  5 cm.. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sebanyak 0,2 ml diinfeksi secara subkutan pada masing-masing lokasi kulit pada punggung kelinci yang telah disiapkan. Sediaan emulgel diberikan setelah 48 jam pada daerah yang diinfeksi. Emulgel ekstrak etanol daun bandotan dengan konsentrasi *gelling agent* carbopol 940 dengan konsentrasi pada formula 1 carbopol 940 0,5 %, formula 2 carbopol 940 1,5%, formula 3 carbopol 940 2,5% dioleskan pada 3 lokasi kulit punggung kelinci bagian kiri, 2 lokasi di punggung kanan sebagai kontrol negatif dioleskan basis emulgel, kontrol positif dioles gel *clindamycin*, kontrol normal tanpa perlakuan. Emulgel dioleskan 2 kali sehari, pengamatan waktu penyembuhan infeksi berdasarkan keringnya nanah, hilangnya eritema dan berkurangnya diameter luka infeksi(Dhegoet *al.* 2014).

### **18. Pengamatan Pengujian Efek Antibakteri**

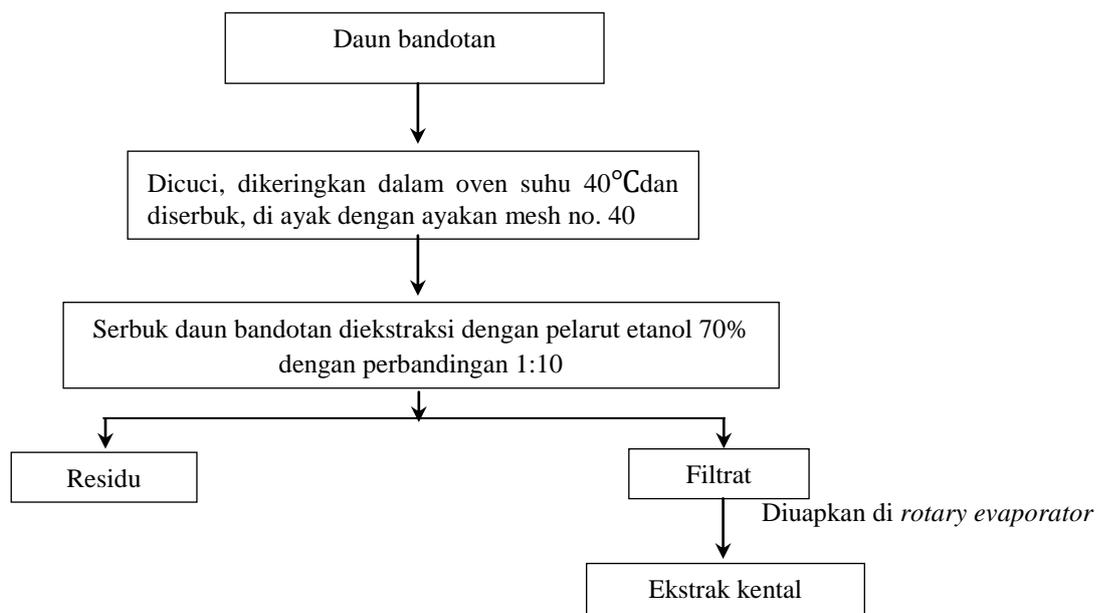
Pengamatan efek antibakteri dapat dilakukan dengan pengamatan secara makroskopis yaitu mengamati gejala klinis yang muncul pada kulit punggung kelinci yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* waktu berdasarkan penyembuhan infeksi dalam berapa hari yang ditandai dengan keringnya nanah, hilangnya eritema dan berkurangnya diameter luka infeksi pada kulit punggung kelinci yang telah diinfeksi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 setelah pemberian sediaan emulgel ekstrak daun bandotan dengan variasi konsentrasi carbopol 940 pada kulit punggung kelinci.

### **E. Analisis Data**

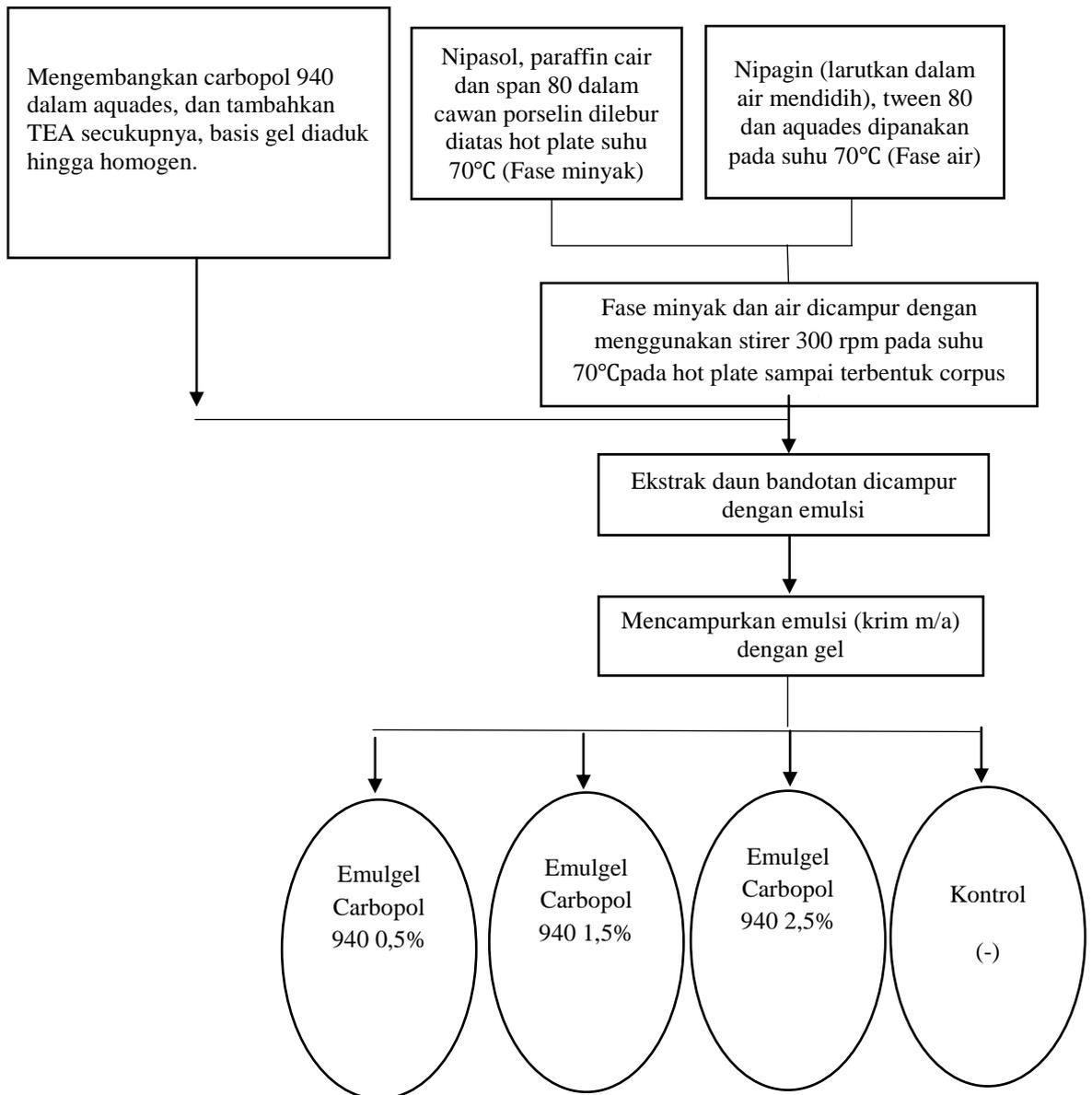
Data hasil uji daya sebar emulgel, daya lekat emulgel, dan viskositas sediaan emulgel ekstrak daun bandotan dianalisis menggunakan uji Kolmogorof-Smirnov, jika terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dilanjutkan dengan uji ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Hasilnya jika tidak terdistribusi normal

( $p < 0,05$ ) maka dilanjutkan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan uji Mann-Whitney  $H_0$  ditolak atau ( $p > 0,05$ ).

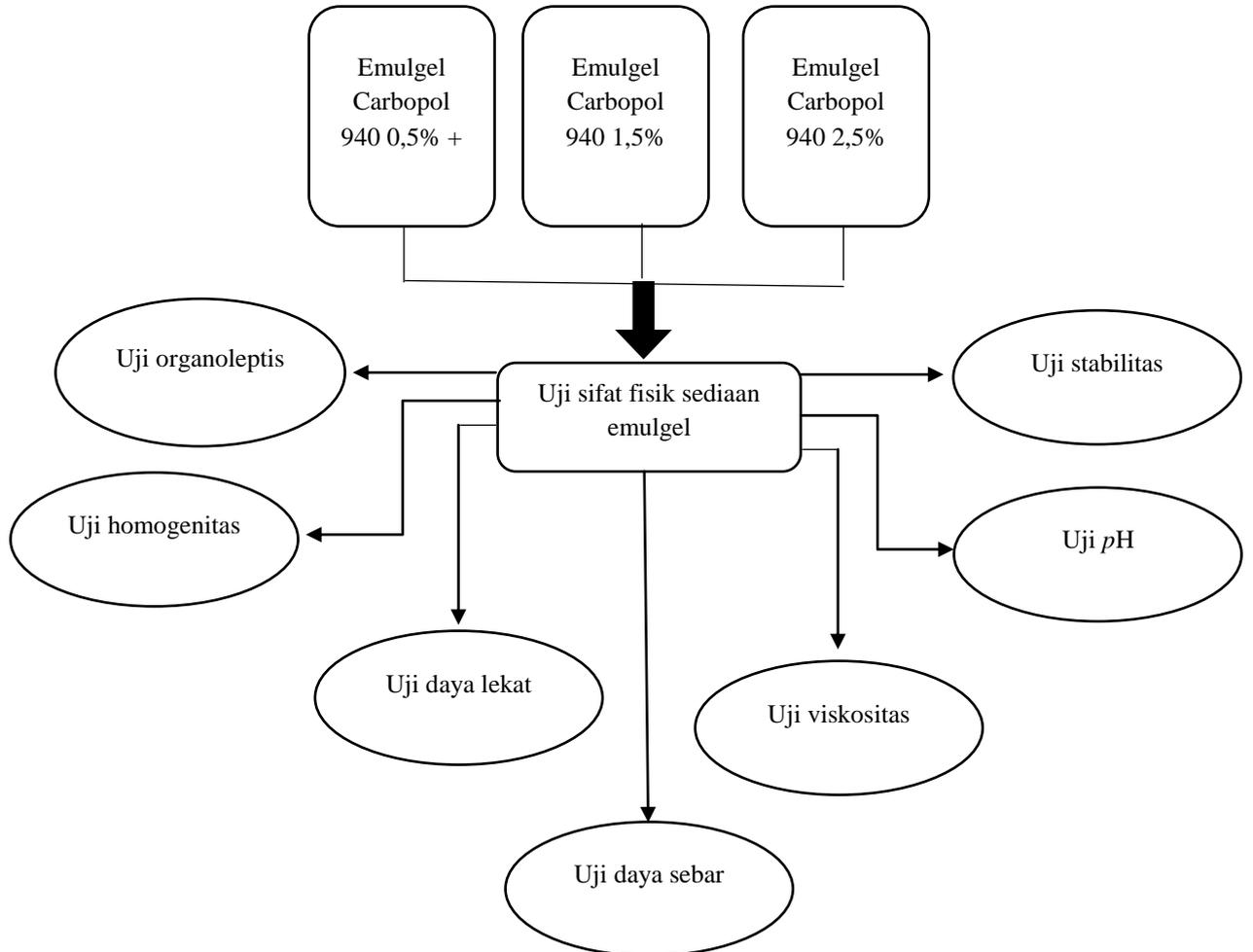
Data hasil pengujian efek emulgel ekstrak etanol daun bandotan dengan konsentrasi carbopol 940 (0,5%,1,5%,2,5%) dengan diameter penyembuhan infeksi dianalisis secara statistik menggunakan metode Kolmogorof- Smirnov. Hasil terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dilanjutkan dengan uji ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%, dilanjutkan dengan uji Tukey untuk mengetahui konsentarsi mana yang memiliki pengaruh sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya. 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 antara satu dengan yang lainnya.



**Gambar 9. Skema pembuatan ekstrak daun bandotan**



**Gambar 10. Skema pembuatan emulgel ekstrak daun bandotan**



**Gambar 11. Skema uji sifat fisik ekstrak daun bandotan**

