

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang diperoleh dari Desa Karangpandan, Kec. Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang diambil secara acak dengan memilih daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, segar dan bersih yang diperoleh pada bulan Januari 2019 dari Desa Karangpandan, Kec. Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini adalah ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang menggunakan pelarut etanol 96%.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari sediaan cold krim kombinasi ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap infeksi kulit kelinci karena *Staphylococcus aureus*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

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

2.1 Variabel bebas. Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanolik daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dengan berbagai konsentrasi.

2.2 Variabel terkendali. 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 kemurnian bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, kondisi laboratorium (antara lain: kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril), waktu pengamatan, waktu panen, tempat tumbuh tanaman, metode ekstraksi, dan fraksinasi.

2.3 Variabel tergantung. Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah waktu penyembuhan luka oleh sediaan cold krim kombinasi ekstrak etanolik daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu terlalu tua yang diperoleh dari Tawang Mangu, Jawa Tengah.

Kedua, daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) adalah daun yang diambil kemudian dicuci pada air mengalir untuk membersihkan kotoran yang menempel setelah itu dikeringkan dalam alat pengering (oven) pada suhu 40°C, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan no 60.

Ketiga, ekstrak etanol adalah hasil ekstraksi daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) menggunakan pelarut etanol 96% dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang diekstraksi dengan larutan penyari

etanol 70% menggunakan proses remaserasi kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*.

Keempat, Formulasi sediaan *cold cream* aktibakteri dari ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban).

Kelima, Sediaan *cold cream* diuji mutu fisik dan stabilitasnya.

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

Ketujuh, uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah pengujian pada kulit kelinci yang sebelumnya dihilangkan rambutnya dan diinduksi bakteri *Staphylococcus aureus* secara intrakutan yang menyebabkan kulit kelinci mengalami infeksi.

Kedelapan, pengamatan waktu penyembuhan luka antara sediaan *cold cream* tunggal dan kombinasi ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap kulit kelinci yang terinfeksi oleh *Staphylococcus aureus*.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, ayakan nomor 60, lampu spiritus, timbangan analitik, kaki tiga, gelas ukur, Erlemeyer, tabung reaksi, pipet tetes, pipet volume, pinset, Beaker glass, botol cokelat, mikroskop, tisu, alat tulis, masker, corong kaca, batang pengaduk, corong pisah, *gravity displacement autoklaf*, *evaporator*, *blender*, kertas saring, kain flannel, *moisture balance*, *static incubator*, pinset, kapas lidi steril, *chamber*, *rectangular water bath*, corong pisah.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban), bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Pelarut yang digunakan untuk penyarian adalah etanol 96% dan 70%. Bahan kimia yang digunakan adalah

n-heksana, etil asetat, air, larutan Mayer, aquadestilata, DMSO 5%, HCl 2N, FeCl₃ 1%, larutan Dragendrof, kalium telurit, hidrogen peroksida, asam asetat pekat, asam sulfat pekat, asam klorida pekat, asam sitrat.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran tanaman tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dengan melakukan determinasi. Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi meliputi daun, batang, bunga, akar dan buah pada tanaman binahong dan pegagan sesuai dengan kepustakaan dan dibuktikan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO-OT) Tawangmangu, Kab. Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pembuatan serbuk daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Pembuatan serbuk daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dilakukan dengan cara dicuci dengan air mengalir guna membersihkan kotoran dan debu yang masih menempel. Daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang telah dicuci bersih dipotong-potong kemudian ditimbang, setelah itu di oven pada suhu 40°C. Simplisia yang sudah kering dihaluskan kemudian diayak menggunakan pengayak nomor 60 sehingga diperoleh serbuk yang mempunyai derajat kehalusan relatif homogen.

3. Penetapan susut pengeringan serbuk daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

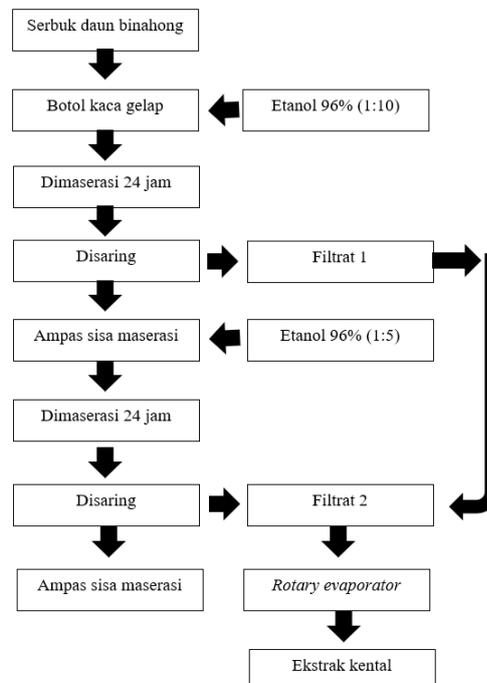
Penetapan susut pengeringan serbuk daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) menggunakan alat *moisture balance*. Suhu *moisture balance* diatur yaitu sebesar 105°C dan waktu pengeringan secara manual hingga kering kemudian dimasukkan neraca timbang dengan posisi 0,00 kemudian 2 gram serbuk daun

tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dimasukkan. Kadar air memenuhi syarat kadar air suatu serbuk simplisia tidak boleh lebih dari 10% (Depkes 2000).

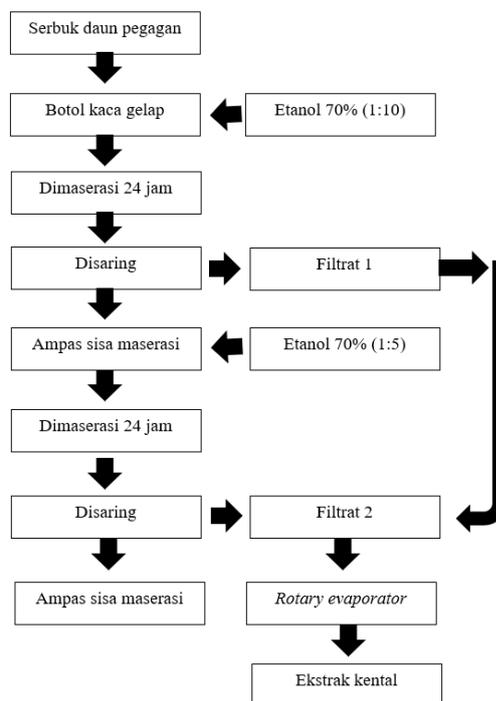
4. Pembuatan ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode remaserasi. Langkah awal yang dilakukan adalah masukkan serbuk simplisia dengan derajat halus yang cocok kedalam sebuah bejana, dituangi dengan cairan penyari dengan perbandingan (1:10), tutup, biarkan selama 24 jam terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, serkai, peras, ampas ditambah cairan penyari (1:10) ditunggu 24 jam, saring dan dijadikan satu (KEMENKES RI 2013). Semua hasil remaserasi dikumpulkan, kemudian diuapkan dengan penguap vakum atau penguap tekanan rendah hingga diperoleh ekstrak kental (KEMENKES RI 2009). Porsen rendemen diperoleh dari menimbang hasil ekstrak kemudian dibagi serbuk daun binahong atau daun pegagan kering dan dikalikan 100%.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak pekat (g)}}{\text{Berat serbuk simplisia (g)}} \times 100\% \dots \dots \dots (1)$$



Gambar 6. Skema pembuatan ekstrak daun binahong



Gambar 7. Skema pembuatan ekstrak daun pegagan

5. Tes bebas etanolik ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan CH_3COOH pekat dan H_2SO_4 pekat kemudian dipanaskan. Uji positif bebas etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Sayuti 2015).

6. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

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 selama 15 menit 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).

7. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk menetapkan kebenaran kandungan kimia yang terkandung dalam simplisia. Identifikasi kandungan kimia dibuktikan di Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.

7.1 Identifikasi alkaloid. Sebanyak 0,1 gram ekstrak dari tiap-tiap tanaman dilarutkan dalam 10 ml CHCl_3 (kloroform) dan 4 tetes NH_4OH kemudian disaring dan filtratnya dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup. Ekstrak dalam tabung reaksi kemudian dikocok dengan ditambah 10 tetes H_2SO_4 2 M, sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam yang berada di atas dipisahkan kedalam tabung reaksi yang lain dan ditambahkan preaksi mayer yang menghasilkan endapan berwarna putih. Sedangkan penambahan pereaksi dragendroff yang akan menimbulkan endapan warna merah jingga.

7.2 Identifikasi steroid dan triterpenoid. Sebanyak 0,1 gram ekstrak dari tiap-tiap tanaman dilarutkan dengan metanol kemudian di uapkan diatas *waterbath*. Filtrat digerus kemudian dilarutkan dengan 2 ml kloroform dalam tabung reaksi, lalu ditambah dengan asam asetat anhidrat sebanyak 10 tetes, selanjutnya larutan ditetesi dengan H_2SO_4 pekat \pm 3 tetes melalui dinding tabung reaksi. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpen, Sedangkan munculnya warna hijau menunjukkan steroid.

7.3 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 0,1 gram ekstrak dimasukkan kedalam gelas piala kemudian ditambah 10 ml aquadest dipanaskan sampai mendidih selam 5 menit . Setelah itu disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan serbuk Mg, HCL pekat 1 ml dan 1 ml amilalkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol.

7.4 Identifikasi tannin. Sebanyak 0,1 gram ekstrak ditambah dengan 10 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan saring. Sebagian filtrat yang diperoleh ditambahkan dengan larutan FeCl_3 1 %. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau kehitaman.

7.5 Identifikasi saponin. Sebanyak 0,1 gram ekstrak dimasukkan kedalam gelas piala kemudian ditambah 10 ml air panas dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama \pm 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 1 ml HCL 2 M. Adanya saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.

8. Formulasi sediaan *cold cream* kombinasi ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Berdasarkan jurnal penelitian dari Swastini *et al.* (2015), formula *cold cream* sbb:

R/	Cera alba	12
	Cetaceum	12,5
	Paraffin Liq.	56,5
	Nipagin	0,01
	Nipasol	0,03
	Aqua dest	Ad 100

Tabel 2. Formula *cold cream*

Nama bahan	Fungsi	Jumlah (%)				
		F1	F2	F3	F4 Kontrol positif	F5 Kontrol negatif
Ekstrak daun binahong	Bahan aktif	5	-	2,5	-	-
Ekstrak daun pegagan	Bahan aktif	-	5	2,5	-	-
Gentamisin	Kontrol				0,1	-
Basis <i>cold cream</i>		Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan :

F1 : formula *cold cream* tunggal ekstrak binahong 5%

F2 : formula *cold cream* kombinasi ekstrak binahong 2,5% dan ekstrak pegagan 2,5 %

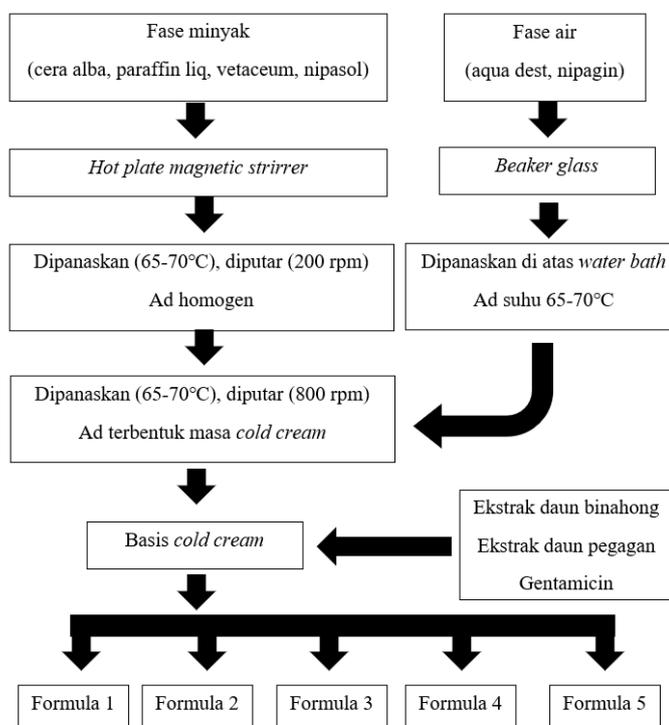
F3 : formula *cold cream* tunggal ekstrak pegagan 5%

F4 : formula *cold cream* kontrol positif (gentamisin 0,1 %)

F5 : formula *cold cream* kontrol negatif (tanpa bahan aktif)

9. Pembuatan *cold cream* kombinasi ekstrak daun tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Cold cream diformulasikan sesuai dengan tabel diatas dengan Metode pembuatan basis *cold cream* menggunakan metode hasil modifikasi Putra (2014) yaitu terlebih dahulu fase minyak (cera alba, cetaceum, parafin cair, propil paraben) dipanaskan pada *hot plate magnetic stirrer* dengan kecepatan 200 rpm, dengan suhu 65-70°C hingga homogen. Fase air (aquades & metil paraben) dipanaskan dalam wadah terpisah pada penangas air dengan suhu 65-70°C sampai melarut sempurna. Fase air dimasukkan kedalam fase minyak sedikit demi sedikit dan diaduk konstan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 200 rpm, selama 15 menit agar tidak terbentuk gelembung udara. Campuran yang telah homogen dinaikkan kecepatannya menjadi 800 rpm, selama 15 menit hingga terbentuk basis krim. Setelah terbentuk basis krim kemudian ditambahkan masing- masing ekstrak dengan pengadukan konstan.



Gambar 8. Skema pembuatan *cold cream*

10. Uji Mutu Fisik

10.1. Uji Organoleptis. Pemeriksaan organoleptis meliputi konsistensi, warna, dan bau yang diamati dengan panca indera manusia (Erawati *et al.* 2016). Pengamatan dilakukan pada hari ke-1 dan penyimpanan hari ke-21 (Sharon *et al.* 2013).

10.2. Uji homogenitas. Sebanyak 50 miligram sediaan krim dioleskan pada gelas objek yang bersih dan diamati menggunakan mikroskop optik pada pembesaran 10 kali (Aghel *et al.* 2007).

10.3. Uji pH. Alat pH meter dikalibrasi menggunakan larutan dapar pH 7 dan pH 4. Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam sampel *cold cream* yang diperiksa, jarum pH meter dibiarkan bergerak sampai menunjukkan posisi tetap. pH yang ditunjukkan jarum pH meter dicatat (Akhtar *et al.* 2011). Pengamatan dilakukan pada hari ke-1 dan penyimpanan hari ke-21 (Sharon *et al.* 2013).

10.4. Uji daya sebar. Sebanyak 0,5 gram sediaan krim diletakkan dengan hati-hati di atas kaca grafik yang dilapisi kaca penutup, 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).

10.5. Uji daya lekat. Sediaan krim 0,25 gram diletakan diatas 2 gelas obyek yang telah ditentukan. Kemudian ditekan dengan beban 1 kg selama 5 menit. Setelah itu beban diangkat dari gelas obyek kemudian gelas obyek dipasang pada alat uji. Alat uji diberi beban 80 gram kemudian dicatat waktu pelepasannya sampel dari gelas obyek (Miranti 2009). Pengamatan dilakukan pada hari ke-1 dan penyimpanan hari ke-21 (Sharon *et al.* 2013).

10.6. Uji Viskositas. Untuk mengetahui sifat rheologi dari sediaan dilakukan pengukuran viskositas, dengan menggunakan *Viscotester* Rion VT-04F spindle no 2. Sampel ditempatkan pada wadah dan dipasang pada *viscotester portabel*. Alat dinyalakan dan diamati pergerakan jarumnya (Tiran & Nastiti

2014). Pengamatan dilakukan pada hari ke-1 dan penyimpanan hari ke-21 (Sharon *et al.* 2013).

10.7. Uji *freeze-thaw*. Penyimpanan pada siklus *freeze thaw* dilakukan untuk melihat stabilitas fisik *cold cream* setelah disimpan selama 24 hari pada suhu yang berbeda yaitu 4°C dan 40°C. Penyimpanan dilakukan dalam 5 siklus dan satu siklus berlangsung selama 24 jam pada masing masing suhu. *Cold cream* ditimbang kurang lebih 2 gram, dimasukkan ke dalam beberapa vial dan disimpan dalam lemari es (suhu 4°C) selama 24 jam, kemudian dilanjutkan dengan penyimpanan sediaan pada suhu 40°C pada 24 jam berikutnya. Pengamatan organoleptis, pH, dan viskositas dilakukan setiap sebelum dan sesudah 1 siklus (Hamsinah *et al.* 2016).

11. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*

Bakteri uji pada media agar miring diambil dengan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi larutan NaCl 0,9 % hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan 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 (Ngajow *et al.* 2013)

12. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*

12.1 Uji Media selektif. Suspensi *Staphylococcus aureus* diinokulasi secara goresan pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang sebelumnya ditambah kalium telurit 1%, kemudian diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang dihasilkan berwarna hitam dan warna medium di sekitar koloni kuning (Agustie & Samsumaharto 2013).

12.2 Uji Pewarnaan Gram. Satu ose koloni bakteri *Staphylococcus aureus* diambil secara aseptis, dikeringkan dan difiksasi di atas lampu bunsen. Setelah kering, ditetaskan zat warna *crystal violet* sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan lalu ditetaskan lagi dengan larutan lugol, dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan. Preparat dicuci lagi dengan alkohol 70%

selama 30 detik dan keringkan. Preparat diberikan larutan safranin selama 2 menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Pengamatan dilakukan dengan mikroskop (Herlina *et al.* 2015).

12.3 Uji Katalase. Uji katalase dilakukan dengan meneteskan hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% pada gelas obyek yang bersih. Biakan *Staphylococcus aureus* dioleskan pada gelas obyek yang sudah ditetesi hidrogen peroksida. Reaksi positif ditandai oleh terbentuknya gelembung-gelembung udara (Hadioetomo 1990).

12.4 Uji Koagulase. Uji koagulase tabung digunakan untuk mengetahui adanya koagulase bebas. 200 mikro liter plasma dimasukkan kedalam tabung steril secara aseptis. Satu ose biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dicampurkan. Tabung diinokulasi pada suhu $37^\circ C$. Pengamatan dilakukan pada 4 jam pertama dan setelah 18-24 jam. Reaksi positif ditandai dengan pembentukan *clot* atau *jelly*, dan bila dimiringkan *jelly* tetap berada di dasar tabung (Lay 1994).

13. Pengujian Terhadap Hewan Kelinci

13.1. Penyiapan hewan uji. Hewan uji kelinci jantan *New Zealand White* sebanyak 5 ekor dengan umur 3 bulan dengan berat 1,5-2 kg. Kelinci diadaptasikan dengan tempat penelitian selama 5 hari sebelum diperlakukan agar hewan uji tersebut terbiasa dengan lingkungan dan perlakuan yang baru. Hewan uji ditempatkan dalam kandang yang sesuai dan diberi makan dan minum *ad libitum*.

13.2. Pengujian aktivitas antibakteri. Lima ekor hewan uji kelinci *New Zealand White* 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 5 lokasi (F1, F2, F3, F4, F5) dimana F1, F2, F3 berada diposisi lokasi acak merupakan daerah yang diuji pemberian *cold cream* ekstrak daun binahong, kombinasi ekstrak daun binahong dengan pegagan dan ekstrak tunggal pegagan, dengan masing-masing konsentrasi seperti pada formula di atas. Sedangkan lokasi F4 sebagai kontrol positif (gentamisin) dan lokasi F5 sebagai kontrol negatif (*cold*

cream yang tidak mengandung ekstrak), dimana daerah F4 dan F5 berada dilokasi acak.

Sebanyak 0,2 mL suspensi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diinduksikan pada setiap lokasi kulit kelinci secara intrakutan dan diamati selama 24-48 jam untuk melihat terbentuknya eritema, edema atau bahkan nanah. Eritema yang muncul diukur diameternya dan ditentukan skoringnya, terbentuknya edema juga dihitung ketebalannya serta ditentukan skoringnya dan diamati apabila daerah tersebut telah terbentuk nanah. Pemberian sediaan *cold cream* dilakukan setelah eritema mencapai skor 4, udem mencapai skor 3 dan terbentuk nanah pada daerah infeksi. Pada daerah F1 dioleskan *cold cream* formula 1 dengan konsentrasi 5% ekstrak binahong, daerah F2 dioleskan *cold cream* formula 2 dengan konsentrasi 2,5% ekstrak binahong dan 2,5% ekstrak pegagan (kombinasi), daerah F3 dioleskan *cold cream* formula 3 dengan konsentrasi 5% ekstrak pegagan, daerah F4 dioleskan *cold cream* gentamisin (kontrol positif) dan daerah F5 dioleskan *cold cream* yang tidak mengandung ekstrak (kontrol negatif).

Lokasi penyuntikan ditutup atau dibalut dengan perban steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri lain. Pengolesan *cold cream* dilakukan 3 kali sehari (tiap 8 jam) hingga nanah, udem dan eritema sembuh. Pengamatan eritema dan edema dilakukan setiap hari dengan mengukur diameter eritema dan ketebalan edema. Daerah infeksi yang sudah sembuh dilakukan apusan menggunakan *cotton bud* steril, lalu digoreskan pada media selektif VJA untuk melihat keberadaan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Tabel 3. Pengelompokan eritema (Suhaimi et al. 2019)

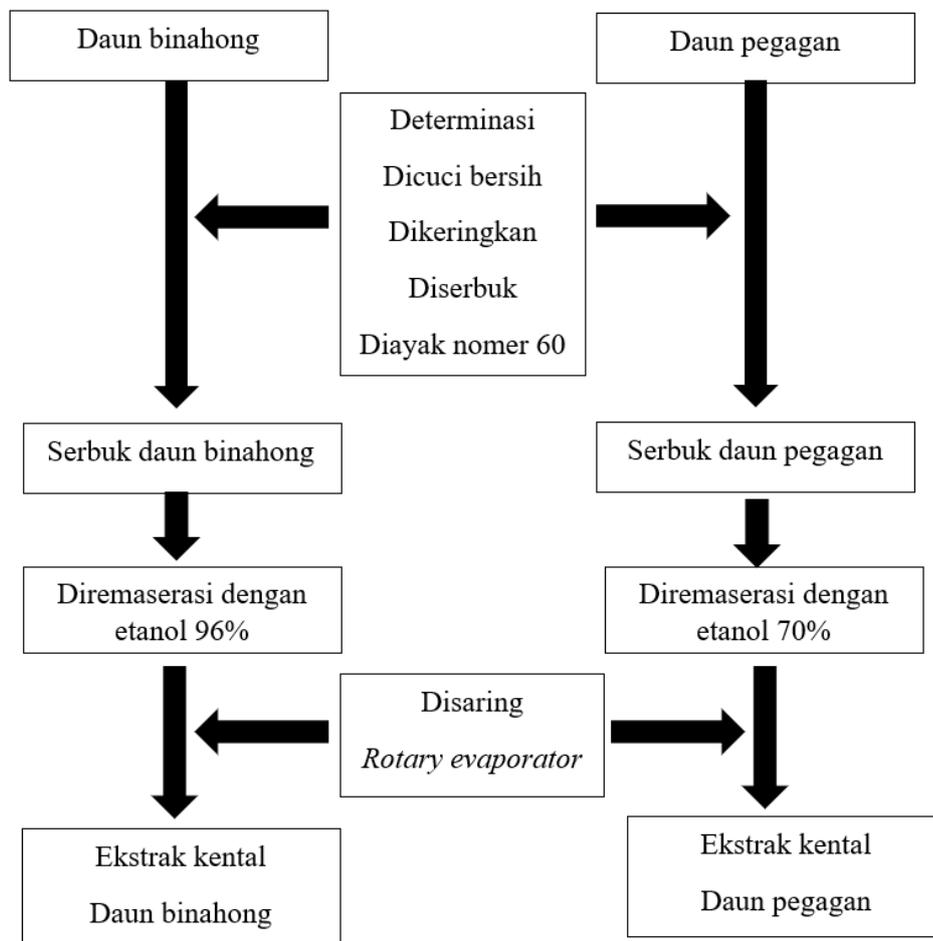
Skor	Kategori	Diameter eritema (mm)
0	Tidak ada eritema	-
1	Eritema ringan	< 25,00
2	Eritema sedang	25,10-30,00
3	Eritema kuat	30,10-35,00
4	Eritema parah	> 35,10

Tabel 4. Pengelompokan udem (Suhaimi et al. 2019)

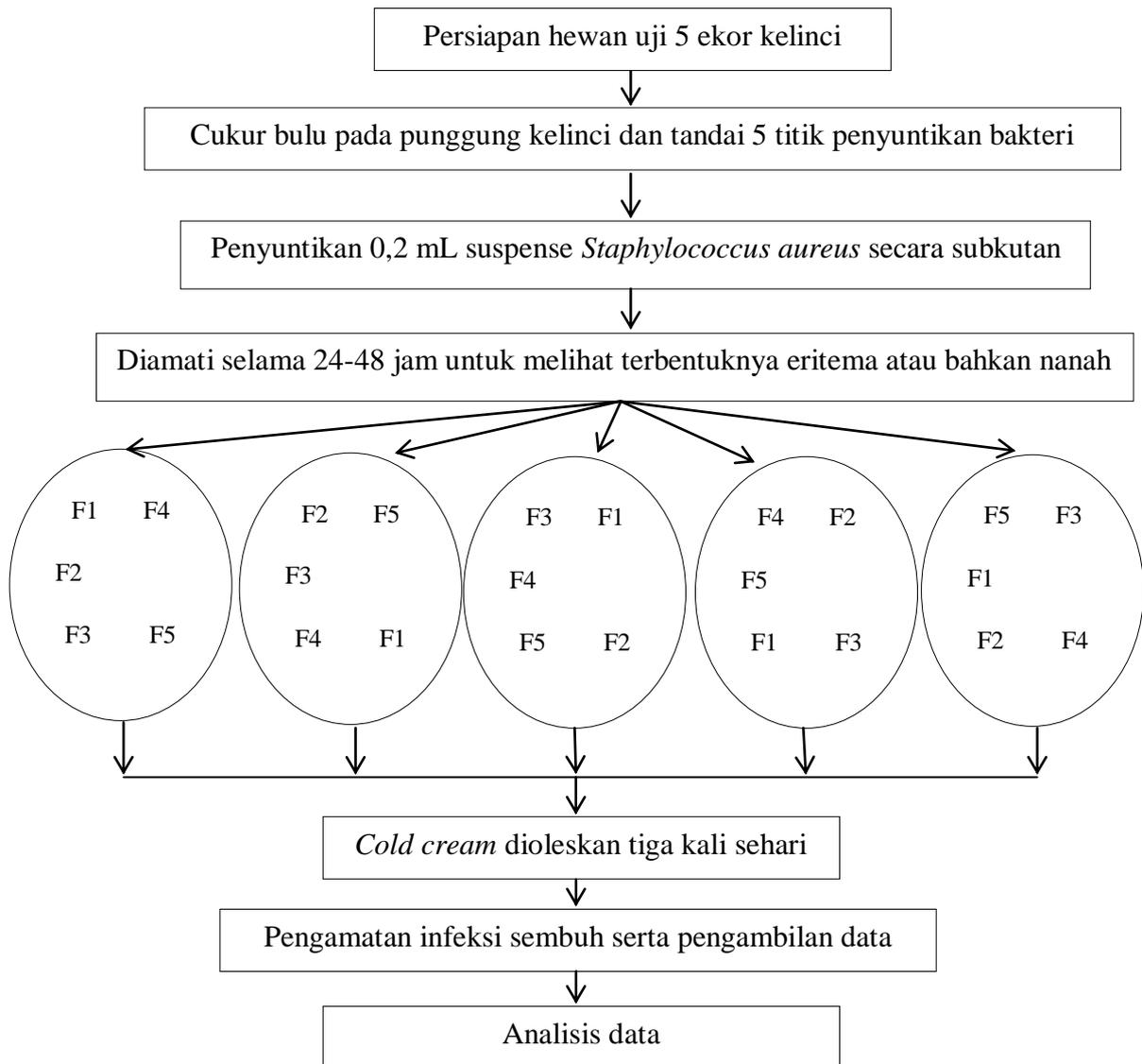
Skor	Kategori	Ketebalan udem (mm)
0	Tidak ada udem	-
1	Udem ringan	< 1,00
2	Udem sedang	1,10-2,00
3	Udem parah	> 2,00

13.3. Pengamatan daya kesembuhan efek antibakteri. Pengamatan daya kesembuhan dari efek antibakteri dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif, dengan mengukur diameter eritema, ketebalan dan diameter edema, dan waktu keringnya luka serta lama hilangnya nanah, kemudian ditentukan skoringnya. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui aktivitas penyembuhan luka pada kulit kelinci karena *Staphylococcus aureus*. Pengamatan dilakukan dari hari pertama pemberian sediaan *cold cream* hingga sembuh. Hasil pengamatan kemudian dianalisis di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

E. Skematis Penelitian



Gambar 9. Skema pembuatan ekstrak etanol daun binahong dan daun pegagan



Gambar 10. Skema pengujian aktivitas antibakteri sediaan *cold cream* ekstrak tunggal dan kombinasi dari binahong dan pegagan terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vivo*.

F. Analisis Data

Hasil pengamatan uji mutu fisik *cold cream*, meliputi pH, viskositas, uji daya sebar, daya lekat, uji stabilitas *freze thaw*, dan aktivitas penyembuhan luka dianalisis menggunakan metode *Kolmogorv-Smirnov*. Hasil yang diperoleh jika terdistribusi normal ($p > 0,05$) dilanjutkan dengan *Lavene test* untuk menguji homogenitasnya, kemudian dilanjutkan dengan metode ANOVA dua jalan dengan taraf kepercayaan 95%. Analisis statistik dilanjutkan dengan uji *post hoc* dan uji

Tukey untuk mengetahui *cold cream* dengan kandungan ekstrak tunggal atau kombinasi memiliki pengaruh yang 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 *cold cream* dengan kandungan ekstrak tunggal atau kombinasi memiliki pengaruh yang sama atau berbeda antara satu dengan yang lainnya.