

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sebelas Maret (UNS), Laboratorium Teknologi Farmasi, Laboratorium Analisis Kimia, dan Laboratorium Bahan Alam Universitas An Nuur pada bulan Februari 2023 - Juli 2023. Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Jl. Raya Lawu No.11 Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

B. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan cara pengujian antibakteri sediaan serum ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) didapatkan melalui ekstraksi maserasi. Kandungan senyawa kimia didapatkan dari ekstrak kental. Yang kemudian dibuat sediaan serum dengan menggunakan formulasi ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) yang diuji aktivitas antibakteri dengan menggunakan bakteri *Propionibacterium acnes*.

C. Populasi, Sampel, dan Teknik Sampling

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) didapatkan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Jl. Raya Lawu No.11 Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah yang dibuat dalam sediaan Serum.

2. Sampel

Sampel yang dipergunakan dalam penelitian ini yaitu daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) yang masih segar dan berwarna hijau, umur pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) 3-4 bulan, bebas

dari serangga, fragmen hewan atau kotoran hewan, tidak mengandung jamur, atau tanda-tanda pengotor lain, tidak mengandung bahan lain yang beracun dan berbahaya, tempat tumbuh pada ketinggian 1.200-1.800 meter di atas permukaan laut, dengan intensitas cahaya 30-40%.

3. Teknik Sampling

Teknik yang digunakan dalam pengambilan sampel adalah purposive sampling merupakan pengambilan anggota sampel dari populasi dengan melakukan kriteria-kriteria pada sampel.

D. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) yang diperoleh dari ekstraksi meserasi, dibuat sediaan serum sebagai antibakteri *Propionibacterium acnes*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

a. Variabel bebas

Variable bebas dalam penelitian ini ialah formulasi sediaan serum antijerawat ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) dengan berbagai variasi konsentrasi 5%, 10%, dan 15%.

b. Variabel tergantung

Variabel tergantung merupakan variabel yang berdasarkan akibat dari variabel utama. Dalam penelitian ini variabel tergantungnya adalah aktivitas antibakteri sediaan serum ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*.

c. Variabel terkendali

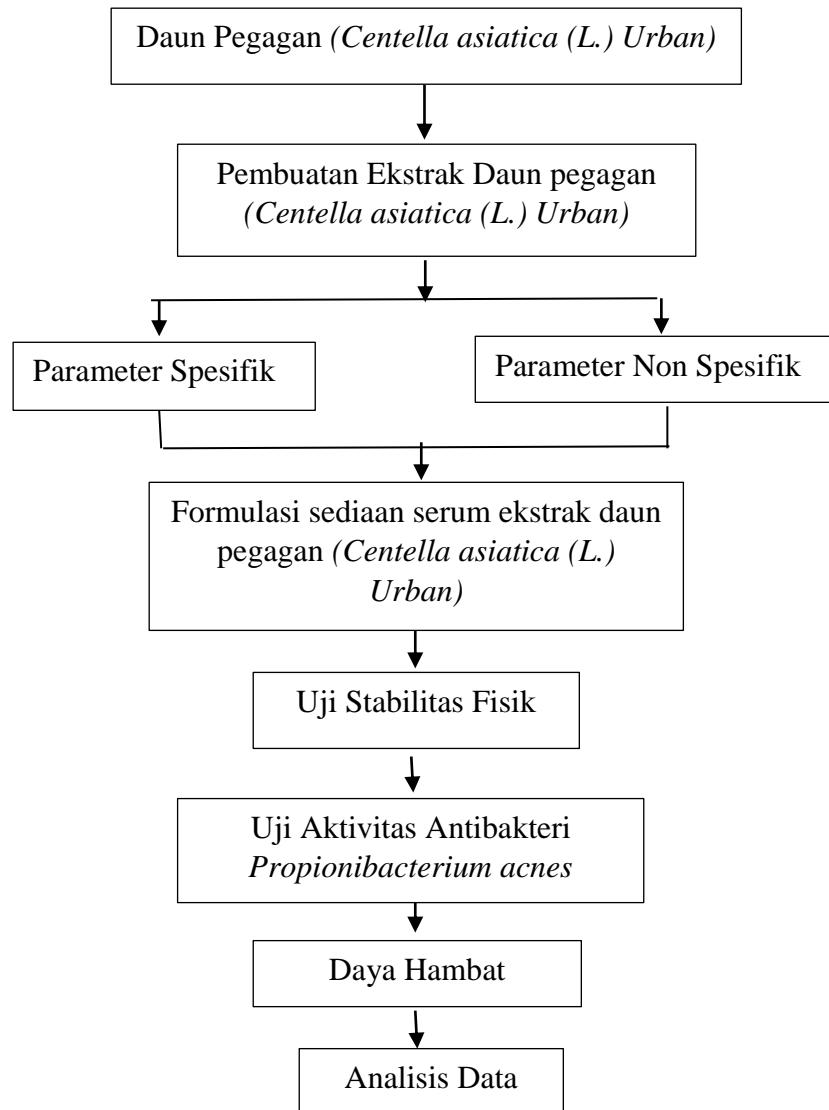
Variabel ini merupakan variabel yang diperlukan untuk referensi penelitian selanjutnya sehingga perlunya ditetapkan kualifikasinya agar hasilnya tepat. Variabel terkendali dari penelitian ini adalah metode ekstraksi dan stabilitas sediaan serum.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) yang di meserasi dengan menggunakan etanol 70%.
2. Ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) diuji parameter spesifik dan parameter non spesifik.
3. Pembuatan formulasi serum ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) dengan variasi konsentrasi 5%,10%, dan 15%.
4. Uji Stabilitas fisik yaitu, uji organoleptik, uji homogenitas, uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat.
5. Kontrol Positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah klindamisin 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$. Kontrol negatif yang digunakan yaitu formulasi tanpa ekstrak.
6. Bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Propionibacterium acnes*
7. Uji antibakteri menggunakan difusi kertas cakram
8. Diameter zona hambat adalah diameter hambatan bakteri yang ditunjukkan dengan zona bening disekitar kertas cakram pada media yang sudah ditanami bakteri dan terjadi akibat aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. Diameter diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan millimeter.

F. Kerangka Konsep

Gambar 3.1 Kerangka Konsep



G. Hipotesis

1. Kandungan senyawa ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) mempunyai potensi sebagai antibakteri yaitu triterpenoid, saponin, flavonoid, alkaloid dan tanin.
2. Uji stabilitas fisik pada serum ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) memiliki stabilitas fisik yang baik.
3. Formulasi serum ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) berpotensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes*.

H. Instrument Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bekker glass, timbangan analitik, blender, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung, autoklaf, erlenmeyer, penjepit, sudip, objek glass, stik pH, alat uji daya lekat, pinset, batang pengaduk, spatula, inkubator, bunsen, jarum ose, sput, kaca arloji, pH meter, botol meserasi, oven, pipet tetes, corong, kertas saring, timbangan analitik, viskometer, sarung tangan, pinset, cotton bud, kapas, pipet tetes, paper disk, plastic wrap, autoklaf, alumunium foil, rotary evaporator, hot plate, LAF (*Laminar Air Flow*) alat sterilisasi, jangka sorong, alat pengukur susut pengeringan (moisture balance), chamber, fase diam plat KLT silika GF254, pipa kapiler, lampu UV _{366 nm}, UV _{254 nm}.

2. Bahan

Ekstrak daun pegagan, xanthan gum, propiloen glikol, metil paraben, trietanolamin (TEA), aquadest, etanol 70%, bakteri *Propionibacterium acnes*, kertas saring whatman no. 42, HCl 2 N, FeCl3, NaCl, Mg, HCL pekat, disk klindamisin, media NA, aquadest steril, kertas cakram, NaCl Fisiologis, kasa steril, H₂SO₄ 1%, reagen mayer, reagen magner, reagen dragendorf, asam asetat, kloroform, etil asetat, n-butanol, methanol, kuersetin, piperin, ammonia, *Liberman Bouchard*, anasaldehid asam sulfat, n-heksana, asam stearat, *Blood*

agar plate (BAP), medium *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), darah hewan domba steril.

I. Jalannya Penelitian

1. Determinasi

Determinasi tanaman bahan uji dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan kebenaran bahan yang digunakan pada penelitian. Determinasi dilakukan dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi tanaman dengan referensi dalam literatur. Determinasi daun pegagan (*Centella asiatica (L). Urban*) pada penelitian ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Jl. Raya Lawu No.11 Kalisoro, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah.

2. Pengumpulan dan Pengeringan Bahan

Teknik pengumpulan bahan yang dilakukan pada daun yaitu dimulai dari pengambilan daun pegagan (*Centella asiatica (L). Urban*) pada saat pagi hari, saat tanaman mengalami proses fotosintesis. Daun dipetik dengan tangan satu persatu secara acak sebanyak 15 kg, kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan cemaran (kotoran dan bahan asing lain) dari bahan simplisia. tahap selanjutnya pencucian, pencucian dilakukan dengan air bersih. kemudian daun pegagan (*Centella asiatica (L). Urban*) yang telah dibersihkan, dirajang, pengeringan, sortasi kering, perajangan dapat dilakukan dengan pisau. Untuk pengeringan menggunakan oven dengan suhu 40°C-50°C daun pegagan kering, daun pegagan yang sudah kering kemudian diblender sampai halus, kemudian diayak hingga menjadi serbuk daun pegagan (*Centella asiatica (L). Urban*).

3. Pembuatan Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica (L). Urban*)

Serbuk simplisia daun pegagan (*Centella asiatica (L). Urban*) diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan melakukan penimbangan simplisia sebanyak 1000 g kemudian

direndam dengan pelarut sebanyak 10 liter (10.000 ml), kemudian diamkan selama 18 jam pada 6 jam pertama aduk sesekali. Setelah itu disaring dengan menggunakan kertas saring, lalu ulangi. Kembali dengan memberikan pelarut 5000 ml pada meserat tadi (FI III ed 2013). Kemudian ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan rotary evaporator dengan suhu 40°C (Asiyah, 2019).

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak yang dihasilkan}}{\text{Bobot awal serbuk simplisia}} \times 100\%$$

Hasil perhitungan rendemen ditunjukkan dengan satuan (%), semakin tinggi nilai rendemen maka nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Kualitas ekstrak yang dihasilkan berbanding terbalik dengan jumlah rendemen yang dihasilkan. Semakin tinggi nilai rendemen maka semakin rendah mutu yang didapatkan (Wijaya *et al.*, 2018).

4. Parameter Spesifik dan Parameter Non Spesifik

a. Parameter Spesifik

1) Uji Kandungan Kimia Simplisia

Menurut Hapsari (2017) Uji kandungan kimia simplisia ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L). Urban*) bertujuan untuk melihat kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya meliputi Uji Triterpenoid, saponin, flavonoid, alkaloid, tanin.

a) Uji Triterpenoid

Sejumlah sampel dilarutkan dengan kloroform, kemudian ditambah dengan ± 1 ml asam asetat anhidrat dan ditambahkan 3 tetes H_2SO_4 pekat. Hasil positif apabila terbentuk warna merah sampai ungu.

b) Uji Saponin

Dipipet sebanyak ± 1 ml ekstrak lalu ditambahkan aquadest kocok selama 10 detik, setelah itu amati perubahan yang terjadi. Kemudian tambahkan 2 tetes HCl

2 N, terbentuk busa dan tetap stabil ± 7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin.

c) Uji Flavonoid

Sebanyak ± 1 ml ekstrak ditambahkan dengan ± 1 ml air panas, didihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat sebanyak ± 1 ml ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan ± 1 ml HCl pekat, kemudian dikocok dengan cepat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga.

d) Uji Alkaloid

Ekstrak sebanyak 0,5 g ditambahkan 2 ml pelarut etanol 70% ditambahkan HCl 2 N 5 ml masing-masing ke dalam 3 tabung reaksi kemudian dipanaskan. Masing-masing tabung di reaksikan 4-5 tetes dengan reagen Mayer ditandai terbentuknya endapan putih, reagen Wagner ditandai terbentuknya endapan coklat, dan reagen Dragendorff ditandai terbentuknya endapan merah jingga.

e) Uji Tanin

Sebanyak ± 1 ml ekstrak lalu ditambahkan FeCl_3 1%, hasil positif ditandai dengan warna coklat kehijauan sampai biru kehitaman.

2) Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam yang dipakai yaitu silika gel GF₂₅₄ ukuran 10x2 cm. kemudian diaktifkan dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 15 menit. Ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) ditotolkan pada fase diam dengan pipa kapiler. Untuk fase gerak pada setiap senyawa diidentifikasi berdasarkan golongan senyawa.

a) Identifikasi Senyawa Triterpenoid

Siapkan fase gerak n-heksana : etilasetat (4:1) dengan baku perbandingan β -sitosterol. Penampak noda

anisaldehid asam sulfat. Hasil positif triterpenoid/steroid apabila timbul warna ungu-merah atau ungu setelah disemprot pereaksi anisaldehid asam sulfat (Budi *et al*, 2020).

b) Identifikasi Senyawa Saponin

Fase garak yang digunakan adalah kloroform : methanol : air (13:7:2). Penampak noda yang digunakan adalah Liebermen-Buchard. Buku pembanding yang digunakan adalah sapogenin. Apabila terjadi pembentukan warna hijau setelah penyemprotan Liebermen-Buchard maka hasil dinyatakan positif mengandung saponin (Pratama *et al*, 2016).

c) Identifikasi Senyawa Flavonoid

Fase gerak yang digunakan yaitu asam asetat glasial : butanol : air dengan perbandingan (1:4:5). Penampak noda uap yang digunakan adalah ammonia dengan baku perbandingan kuersetin kemudian diamati dengan sinar UV. Reaksi positif menunjukkan terbentuknya noda berwarna kuning coklat, setelah penyemprotan ammonia pada sinar tampak, UV 254 nm dan 366 nm (Sunnah *et al*., 2019).

d) Identifikasi Senyawa Alkaloid

Fase gerak yang digunakan yaitu etil asetat : methanol : air (6:4:2) dengan penampak noda pereaksi dagrendroff. Baku pembanding yang digunakan piperin. Apabila terbentuk noda berwarna coklat atau jingga setelah penyemprotan dagrendroff, maka dinyatakan positif alkaloid (Devi, 2020).

e) Identifikasi Senyawa Tanin

Fase gerak yang digunakan yaitu n-butanol : asam stearate : air dengan perbandingan (4:1:5) dengan

penampak noda pereaksi FeCl_3 5%. Baku pembanding yang digunakan adalah katekin. Apabila terbentuk noda berwarna biru kehitaman setelah penyemprotan FeCl_3 5%, maka dinyatakan positif mengandung tanin (Sopiah *et al*, 2019).

b. Parameter Non Spesifik

1) Susut Pengeringan

Uji susut pengeringan dilakukan dengan alat *mosisture balance*. Nyalakan *mosisture balance* dan panaskan 10 menit, setelah itu atur alat dengan menekan menu, pilih metode yang akan digunakan. Masukkan sampel kedalam *mosisture balance* lalu ratakan. Tutup *mosisture balance* kemudian hingga lampu mati dan catat hasilnya. Uji dilakukan sebanyak 3x percobaan, kemudian ukur rata-ratanya. Tunggu hingga suhu 30°C dan matikan alat (Yuri, 2016).

$$\text{Susut Pengeringan} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

2) Bobot Jenis

Bobot jenis ekstrak ditentukan terhadap hasil pengenceran ekstrak 1% dalam pelarut etanol dalam piknometer. Digunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang telah dididihkan pada suhu 25°C . Suhu diatur hingga ekstrak cair lebih kurang 20°C , lalu dimasukkan dalam piknometer.

Diatur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C . Kelebihan ekstrak cair dibuang dan ditimbang. Kurangkan bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis ekstrak cair adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dan bobot air, dalam piknometer dalam suhu 25°C (Anam, 2016).

3) Kadar Air

Menimbang 3 g ekstrak dan masukkan kedalam wadah yang telah di tara, kemudian keringkan pada suhu 105°C selama 5 jam dan ditimbang secara seksama. Pengeringan dilanjutkan, kemudian di timbang lagi pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara 2 penimbangan tidak lebih dari 0,25% (Yuri, 2016).

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{berat awal sampel}-\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100\%$$

4) Sisa Pelarut Organik

Uji bebas etanol pada ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) dilakukan dengan cara, Ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) ditambah 2 tetes H₂SO₄ pekat dan CH₃COOH, kemudian dipanaskan. Tidak adanya bau khas ester menunjukkan hasil negatif (Tenda *et al.*, 2017).

5. Formulasi

Pada penelitian ini menggunakan formulasi sebagai berikut:

Tabel 3.1 Formulasi Bahan (Firmansyah *et al.*, 2022)

Bahan	Konsentrasi					Kegunaan
	K+	K-	FI	FII	F III	
Ekstrak Daun pegagan		-	5%	10%	15%	Zat aktif
Xantham gum	klindamisin	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	Basis serum
Propilen glikol	10 µg/disk	15 g	15 g	15 g	15 g	Humektan
Metil paraben		0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g	Pengawet
TEA		1 g	1 g	1 g	1 g	Alkalizing agent
Aquadest ad		100 ml	100 ml	100 ml	100 ml	Pelarut

Cara pembuatan serum:

Menimbang 0,5 g xanthan gum yang dikembangkan pada air panas sebanyak 20 kalinya diamkan selama 10 menit sampai mengembang,

kemudian digerus hingga terbentuk basis gel (massa A). Propilen glikol, metil paraben diaduk dengan *magnetic stirrer* (500 rpm) hingga homogen (massa B). selanjutnya campurkan massa A dengan massa B aduk dengan rata dengan *magnetic stirrer* (1000 rpm) hingga homogen. Tambahkan ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) sesuai konsentrasi 5%, 10%, 15% yang telah dilarutkan dengan aquadest dan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga homogen, kemudian tambahkan TEA dan aquadest ad 100 ml diaduk dengan *magnetic stirrer* (1000 rpm) hingga homogen dan masukkan kedalam wadah serum (Firmansyah *et al.*, 2022).

6. Uji Stabilitas Fisik

Stabilitas didefinisikan sebagai kemampuan suatu produk untuk bertahan kualitasnya sesuai spesifikasi kualitas yang ditetapkan sepanjang periode waktu, penggunaan, dan penyimpanan (Naibaho *et al.*, 2013).

a. Uji Organoleptis

Pengujian Organoleptis bertujuan untuk mengamati warna, bau dan tekstur pada sediaan serum, uji organoleptis akan berpengaruh terhadap kenyamanan pengguna oleh karena itu sebaiknya sediaan memiliki warna yang menarik. Pengujian organoleptik dilakukan dengan mengamati warna, aroma dan konsistensi sediaan (Desriani *et al.*, 2018).

b. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara sampel serum dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok, sediaan harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya butiran kasar (Hasrawati *et al.*, 2020).

c. Uji pH

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Alat pH meter dinyalakan setelah itu dibiarkan sampai stabil selama 15 menit. Elektroda pH meter dibersihkan dengan aquadest,

kemudian dikeringkan dengan tisu. Elektroda dicelupkan kedalam larutan buffer, lalu dibiarkan beberapa saat hingga jarum pH meter stabil. Setelah stabil tombol kalibrasi diputar hingga jarum pH meter menunjukkan angka yang sama dengan pH larutan buffer. Selanjutnya ujung katoda dicelupkan kedalam 10 ml sampel. Standarisasi dilakukan pada pH 4-7 (Rawlins *et al.*, 2013).

d. Uji Daya Sebar

Pengujian daya sebar dilakukan dengan cara sediaan sebanyak 0,5 g diletakkan diatas kaca dan ditambah beban seberat 150 g, setelah 1 menit diukur diameter yang konstan (Warnida *et al.*, 2016).

e. Uji Daya Lekat

Sediaan diletakkan di atas objek gelas, kemudian objek gelas yang lain diletakkan diatasnya dan ditekan dengan beban seberat 1 kg selama 5 menit. Selanjutnya objek gelas dipasang pada alat uji. Kemudian beban seberat 80 g dilepaskan dan dicatat waktu pelepasan serum (Ikhsanudin *et al.*, 2017).

f. Uji Viskositas

Dilakukan pengujian viskositas bertujuan untuk mengetahui kekentalan serum, biasanya faktor-faktor yang mempengaruhi penurunan nilai viskositas yaitu suhu, konsentrasi bahan, dan reaksi kimia yang terjadi saat penyimpanan dipercepat. Pengujian viskositas dilakukan dengan cara memasukkan sediaan serum ke dalam wadah lalu dilihat nilai viskositas menggunakan Viscometer Brookfield menggunakan rotor nomer 4 dengan kecepatan 60 rpm (Ainara *et al.*, 2015). Dengan nilai viskostas pada serum wajah adalah sebesar 230- 1150 mPa.s (Septiyanti *et al.*, 2019).

7. Persiapan Media dan Pembuatan Bakteri

a. Sterilisasi Alat

Seluruh alat yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu dan dikeringkan. Alat-alat kemudian didetoks dengan cara

direbus pada air mendidih yang telah dicampur dengan tepol dan kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 15 menit. Tutup mulut tabung reaksi, gelas ukur, dan Erlenmeyer menggunakan kapas yang dibalut kasa kemudian dibungkus dengan kertas payung, kemudian bungkus Cawan petri dengan kertas payung. Sterilisasi dilakukan pada autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Jarum ose disterilkan dengan memijarkan pada api Bunsen (Hapsari, 2018).

b. Pembuatan Media

1) *Blood Agar Plate (BAP)*

Membuat media agar dengan cara menimbang 40 g blood agar base (Oxoid). Selanjutnya ditambahkan aquaest 500 ml kemudian homogenkan. Sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C . Setelah dikeluarkan dari autoklaf dibiarkan sampai suhunya mencapai $45^{\circ}\text{-}50^{\circ}\text{C}$ atau hangat kemudian tambahkan darah hewan domba steril sebanyak 5-10% kemudian dituang pada cawan petri sebanyak 10 ml (Nurulita, 2017).

2) *Mueller Hinton Agar (MHA)*

Mueller Hinton Agar (MHA) dibuat dengan cara menimbang 34 g masukkan dalam erlenmeyer berisi aquadest sebanyak 250 ml lalu homogenkan dengan magnetic stirer dan dipanaskan pada hot plate selama ± 10 menit. Sterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Kemudian tambahkan darah hewan domba steril sebanyak 5-10% kemudian dituang pada cawan petri sebanyak 10 ml (Nurulita, 2017).

c. Peremajaan Bakteri

Siapkan media *blood agar plate* (BAP). biakan murni bakteri *Propionibacterium acne* kemudian digoreskan dengan arah zig-zag menggunakan ose steril selanjutnya dimasukan kedalam

anaerogen kit dan gaspack kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 2x24 jam (Nuralifah *et al.*, 2019).

d. Pembuatan Suspensi Bakteri

Untuk membuat suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* yaitu dengan cara biakan *Propionibacterium acnes* diambil dengan kawat ose steril campurkan dengan BHI dan darah hewan domba, kemudian disuspensikan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml NaCl 9% hingga diperoleh kekeruhan sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland 0,5 (Rahayu, 2019).

e. Kontrol Negatif

Kontrol negatif adalah kelompok perlakuan yang tidak dapat menghasilkan efek atau memberikan perubahan pada variabel tergantung. Tujuan menggunakan kontrol negatif adalah untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan memiliki efek antimikroba. Kontrol negatif yang digunakan formulasi tanpa ekstrak yang bertujuan untuk mengetahui formulasi dari ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) dalam menghambat bakteri *Propionibacterium acnes* (Firmansyah *et al.*, 2022).

f. Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan klindamisin. Klindamisin 10 µg/disk digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan jenis *antibiotic* yang digunakan untuk mengobati penyakit akibat infeksi anaerob gram positif salah satunya bakteri *Propionibacterium acnes* dan banyak digunakan sebagai antijerawat baik secara oral maupun topikal (Firmansyah *et al.*, 2022).

8. Uji Aktivitas Bakteri

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun pegagan menggunakan metode difusi agar dengan teknik cakram (paper disk). Suspensi bakteri *Propionibacterium acnes* sebanyak 1 ml dituang secara merata

pada medium. Setelah mengering, kertas cakram steril dengan diameter 6 mm diresepsi dengan formulasi tanpa ekstrak sebagai sebagai kontrol negatif dan serum ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) dengan konsentrasi 5%, 10%, dan 15% sebanyak 20 μ l dan klindamisin 10 μ g/disk. Diletakkan pada permukaan medium secara aseptis (*cottond bud steril*). Medium dimasukan kedalam anoeragen kit perlakuan ini ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam setelah 24 jam akan terbentuk zona bening di sekitar cakram yang menunjukkan kemampuan dari sediaan uji dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Setelah itu dilakukan pengukuran zona hambat dengan menggunakan jangka sorong (Firmansyah *et al.*, 2022).

9. Daya Hambat

Uji daya hambat dilakukan dengan pengukuran zona hambat diukur dengan menggunakan mistar berskala/jangka sorong. Kemudian diperoleh berupa diameter (mm) daerah hambatan pertumbuhan mikroba termasuk diameter kertas cakram (Hasrawati *et al.*, 2020).

10. Analisis Data

Data yang diperoleh dari data penelitian di analisa secara kuantitatif menggunakan software SPSS dengan taraf kepercayaan 95%. Uji aktivitas sediaan serum ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica (L.) Urban*) disajikan dalam bentuk tabel, grafik dan gambar. Untuk mengetahui pengaruh stabilitas fisik meliputi uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat dan uji viskositas dan pengaruh diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dilakukan analisis menggunakan statistik *One Way ANOVA*. Dilanjutkan dengan uji Post Hoc menggunakan analisis Tukey test yaitu untuk melihat perbedaan signifikan antara masing-masing kelompok uji (Arianti, 2017).

J. Kerangka Penelitian

Gambar 3.2 Kerangka Penelitian

