

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Dan Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Determinasi tanaman merupakan serangkaian kegiatan yang bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang digunakan, menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan bahan yang digunakan dalam penelitian serta mencocokkan morfologi tanaman yang digunakan dengan pustaka. Determinasi tanaman dalam penelitian ini dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT), Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Berdasarkan surat **Keterangan** determinasi Nomor : YK.01.03/2/1290/2019 dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Perolehan Bahan

Tanaman binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) didapatkan dari Desa Karangpandan, Kecamatan Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar pada bulan Januari 2019. Bagian tanaman yang digunakan adalah daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). Daun yang digunakan dalam penelitian ini, digunakan umur dan yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, masih segar dan bebas hama penyakit.

3. Pembuatan Serbuk Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban).

Semua daun yang terkumpul diperlakukan tersendiri. Daun disortasi dan dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran yang menempel, daun dikeringkan pada suhu ruang lalu dimasukkan ke dalam oven pada suhu 50°C. Pengeringan ditujukan untuk mengurangi kadar air pada daun, kadar air mempengaruhi pada proses penyimpanan dan kontaminasi mikroorganisme yang

dapat menyebabkan pembusukan. Bahan yang sudah kering dihaluskan hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan no. 60 untuk memperoleh ukuran partikel yang seragam. Tujuan dari penyerbukan adalah untuk memperluas permukaan partikel bahan, luas permukaan yang besar mengakibatkan cairan penyari dapat melakukan kontak dengan lebih optimal dan zat aktif dapat berdifusi dengan semakin mudah. Berat serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang melewati ayakan sebanyak 556 gram. Presentase rendemen serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) diperoleh sebanyak %. Berat serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) yang melewati ayakan sebanyak 513 gram. Presentase rendemen serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diperoleh sebesar %. Tiap-tiap serbuk diambil 300 gram untuk proses ekstraksi menggunakan metode remaserasi. Hasil presentase rendemen serbuk bobot kering terhadap bobot basah dari tiap tanaman dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil presentase rendemen serbuk kering terhadap bobot basah

Tanaman	Bobot basah (g)	Bobot kering (g)	Rendemen (% b/b)
Binahong	6000	556	9,28%
Pegagan	6000	455	8,55%

Hasil perhitungan rendemen kedua serbuk dapat dilihat pada lampiran 5.

4. Hasil Penetapan Susut Pengeringan Serbuk Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan Daun Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban).

Susut pengeringan merupakan pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada suhu 105°C, sampai berat konstan yang dinyatakan sebagai nilai persen (%). Susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui batasan maksimal (rentang) besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (DEPKES RI 2000). Susut pengeringan dilakukan menggunakan alat Moisture Balance dengan suhu 105°C, ditunggu hingga alat memberikan tanda dan menunjukkan hasil dalam satuan persen (%).

Susut pengeringan mengukur kadar bahan menguap dari suatu bahan, berupa bahan mudah menguap dan air. Persyaratan susut pengeringan serbuk tidak boleh melebihi 10% (DEPKES RI 1995) bertujuan untuk mengetahui

stabilitas bahan dalam masa penyimpanan sehingga terhindar dari aktivitas mikroorganisme. Kandungan air yang tinggi menyebabkan kerusakan pada bahan karena adanya aktivitas bakteri atau jamur dan mengakibatkan potensi kerusakan pada senyawa aktif berkhasiat. Kadar air yang terlalu tinggi menyebabkan bahan rentan terhadap masa penyimpanan jangka lama.

Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dapat dilihat pada tabel 6 & 7.

Tabel 6. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)

No	Berat serbuk (gram)	Susut Pengeringan (%)
1	2	4,0
2	2	4,4
3	2	4,4
Rata-rata ± SD		4,266 ± 0,231

Tabel 7. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

No	Berat serbuk (gram)	Susut Pengeringan (%)
1	2	8,8
2	2	8,7
3	2	8,7
Rata-rata ± SD		8,73 ± 0,057

Presentase rata-rata susut pengeringan serbuk daun binahong adalah 4,266% dan serbuk daun pegagan adalah 8,73%. Hasil tiap-tiap serbuk telah sesuai dengan persyaratan dibawah 10%. Hasil penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 7.

5. Hasil Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan Ekstrak Etanol 70% Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Ekstrak etanol 96% daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) diperoleh dengan metode remaserasi. Ekstrak diremaserasi dengan perbandingan 1 bagian serbuk dalam 10 bagian pelarut. Serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) ditimbang sebesar 400 gram, dimasukkan dalam bejana remaserasi dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 4000 mL. Remaserasi dilakukan selama 24 jam, dengan sesekali digojog. Setelah 24 jam, hasil

remaserasi di saring dengan kain flannel dan kertas saring. Ampas hasil remaserasi pertama dimasukkan kembali ke dalam bejana remaserasi dan pelarut etanol 96% ditambahkan dengan perbandingan 1:5, disimpan selama 24 jam dan disaring. Filtrat hasil remaserasi pertama dan kedua dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil pembuatan ekstrak etanol 96% daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dapat dilihat pada tabel .

Ekstrak etanol 70% daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) diperoleh dengan metode remaserasi. Ekstrak diremaserasi dengan perbandingan 1 bagian serbuk dalam 10 bagian pelarut. Serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) ditimbang sebesar 300 gram, dimasukkan dalam bejana remaserasi dan ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3000 mL. Remaserasi dilakukan selama 24 jam, dengan sesekali digojog. Setelah 24 jam, hasil remaserasi di saring dengan kain flannel dan kertas saring. Ampas hasil remaserasi pertama dimasukkan kembali ke dalam bejana remaserasi dan pelarut etanol 70% ditambahkan dengan perbandingan 1:5, disimpan selama 24 jam dan disaring. Filtrat hasil remaserasi pertama dan kedua dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Hasil pembuatan ekstrak etanol 70% daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dapat dilihat pada tabel 9.

Tabel 8. Hasil rendemen ekstraksi daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Tanaman	Berat serbuk (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (% b/b)
Binahong	400	27,084	6,771
Pegagan	300	18,624	6,208

Serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) sebesar 400 g yang diremaserasi dengan pelarut etanol 96%, menghasilkan ekstrak kental sebanyak 27,084 g. Hasil rendemen ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) adalah 6,771 %. Serbuk daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) sebesar 300 g yang diremaserasi dengan pelarut etanol 70% menghasilkan ekstrak kental sebanyak 18,624 g. Hasil rendemen ekstrak daun

pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) adalah 6,208 %. Hasil perhitungan rendemen kedua tanaman dapat dilihat pada lampiran 6.

6. Hasil Penetapan Susut Pengerinan Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan Daun Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urban).

Susut pengeringan mengukur kadar bahan menguap dari suatu bahan, berupa bahan mudah menguap dan air. Persyaratan kadar air serbuk tidak boleh melebihi 10% (DEPKES RI 1995) bertujuan untuk mengetahui stabilitas bahan dalam masa penyimpanan sehingga terhindar dari aktivitas mikroorganisme. Kandungan air yang tinggi menyebabkan kerusakan pada bahan karena adanya aktivitas bakteri atau jamur dan mengakibatkan potensi kerusakan pada senyawa aktif berkhasiat. Kadar air yang terlalu tinggi menyebabkan bahan rentan terhadap masa penyimpanan jangka lama.

Susut pengeringan merupakan pengukuran sisa zat setelah pengeringan pada suhu 105°C, sampai berat konstan yang dinyatakan sebagai nilai persen (%). Susut pengeringan bertujuan untuk mengetahui Batasan maksimal (rentang) besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (DEPKES RI 2000). Susut pengeringan dilakukan menggunakan alat Moisture Balance dengan suhu 105°C, ditunggu hingga alat memberikan tanda dan menunjukkan hasil dalam satuan persen (%).

Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak etanol 96% daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan ekstrak etanol 70% daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) dapat dilihat pada tabel 9 & 10.

Tabel 9. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak etanol 96% daun binahong (*Anredera cordifolia* (T.) Steenis)

No	Berat serbuk (gram)	Susut Pengerinan (%)
1	2	8,0
2	2	8,4
3	2	8,4
Rata-rata ± SD		8,27 ± 0,239

Tabel 10. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak etanol 70% daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

No	Berat serbuk (gram)	Susut Pengerinan (%)
1	2	8,8
2	2	8,7
3	2	8,7
Rata-rata ± SD		8,73 ± 0,057

Presentase rata-rata susut pengeringan ekstrak etanol 96% daun binahong (*Anredera cordifolia* (T.) Steenis) adalah 8,27% dan ekstrak etanol 70% daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) adalah 8,73%. Susut pengeringan ekstrak daun binahong tidak lebih dari 10%, dan ekstrak daun pegagan tidak lebih dari 11% (MENKES 2009). Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak dapat dilihat pada lampiran 7.

1. Hasil Uji Bebas Etanol Ekstrak Etanol 96% Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan Ekstrak Etanol 70% Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Uji bebas etanol digunakan untuk mengetahui keberadaan etanol dalam ekstrak yang sudah dipekatkan. Uji bebas etanol dilakukan dengan uji esterifikasi. Uji esterifikasi dilakukan dengan cara menambahkan sejumlah kecil ekstrak dengan asam asetat (CH_3COOH) dan asam sulfat (H_2SO_4) pekat. Campuran kemudian dipanaskan. Ekstrak dinyatakan bebas etanol bila setelah dipanaskan, campuran tidak mengeluarkan bau ester khas etanol. Hasil uji bebas etanol dapat dilihat di tabel 11 dan lampiran 8.

Tabel 11. Hasil uji bebas etanol ekstrak etanol 96% daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan ekstrak etanol 70% daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Ekstrak	Tes bebas etanol	Hasil uji	Pustaka
Ekstrak daun binahong	Ekstrak + CH_3COOH + H_2SO_4 kemudian dipanaskan	Tidak mengeluarkan bau ester yang khas	Tidak ada bau ester yang khas (Sayuti 2015)
Ekstrak daun pegagan	Ekstrak + CH_3COOH + H_2SO_4 kemudian dipanaskan	Tidak mengeluarkan bau ester yang khas	Tidak ada bau ester yang khas (Sayuti 2015)

7. Hasil Uji Kandungan Kimia Ekstrak Etanol 96% Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan Ekstrak Etanol 70% Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Uji kandungan kimia digunakan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Kandungan kimia inilah yang memiliki peran masing-masing untuk memberikan efek terapeutik. Uji kandungan kimia pada ekstrak digunakan untuk mengetahui keberadaan alkaloid, flavonoid, tannin, dan

saponin. Hasil pengujian kandungan kimia ekstrak daun binahong dan ekstrak daun pegagan dapat dilihat di tabel 12 & 13.

Tabel 12. Hasil uji kandungan kimia ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steniss).

Kandungan kimia	Hasil ekstrak	Pustaka	Interprestasi data Ekstrak
Alkaloid	Terbentuk endapan warna coklat kemerahan	Terbentuk endapan warna coklat kemerahan dengan pereaksi Dragendroff (Jones & Kinghorn 2006)	+
Flavonoid	Terbentuk warna merah pada lapisan amil alcohol	Terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alcohol (Sangi <i>et al.</i> 2008)	+
Saponin	Terbentuk buih yang menetap walaupun ditambahkan HCl 2N (buih tidak hilang)	Terbentuk buih yang stabil walaupun ditambahkan HCl 2N (buih tidak hilang) (DepKes RI 1995)	+
Triterpenoid	Terbentuk cincin coklat	Terbentuk cincin coklat atau violet diperbatasan 2 pelarut (Nugrahani <i>et al.</i> 2016)	+
Tannin	Terbentuk warna hijau kehitaman	Terbentuk warna hijau kehitaman (Jones & Kinghorn 2006)	+

Keterangan : (+) = Mengandung golongan senyawa kimia
(-) = Tidak Mengandung golongan senyawa kimia

Tabel 13. Hasil uji kandungan kimia ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Kandungan kimia	Hasil ekstrak	Pustaka	Interprestasi data Ekstrak
Alkaloid	Terbentuk endapan warna coklat kemerahan	Terbentuk endapan warna coklat kemerahan dengan pereaksi Dragendroff (Jones & Kinghorn 2006)	+
Flavonoid	Terbentuk warna merah pada lapisan amil alcohol	Terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alcohol (Sangi <i>et al.</i> 2008)	+
Saponin	Terbentuk buih yang menetap walaupun ditambahkan HCl 2N (buih tidak hilang)	Terbentuk buih yang stabil walaupun ditambahkan HCl 2N (buih tidak hilang) (DepKes RI 1995)	+
Triterpenoid	Terbentuk cincin coklat	Terbentuk cincin coklat atau violet diperbatasan 2 pelarut (Nugrahani <i>et al.</i> 2016)	+
Tannin	Terbentuk warna hijau kehitaman	Terbentuk warna hijau kehitaman (Jones & Kinghorn 2006)	+

Keterangan : (+) = Mengandung golongan senyawa kimia
(-) = Tidak Mengandung golongan senyawa kimia

Surbakti *et al.* (2018) memaparkan bahwa ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steniss) memiliki kandungan kimia berupa alkaloid (Mayer), flavonoid, steroid, dan saponin. Uji kandungan kimia tannin menunjukkan hasil negatif. Sulistyani *et al.* (2011) memaparkan ekstrak etanol

daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steniss) pada uji pendahuluan menunjukkan adanya kandungan gugus kromofor. Ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (T.) Steniss) juga menunjukkan hasil positif untuk uji kandungan polifenol, flavonoid, dan saponin.

Kristina *et al.* (2009) memaparkan bahwa ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) mengandung alkaloid, saponin, tannin, fenolik, flavonoid, steroid, triterponid, glikosida dan asiatikosid. Pada penelitian Kristina *et al.* (2009) juga memaparkan bahwa ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) mengandung protein.

Tabel 13 menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin, hasil pengujian dapat dilihat pada lampiran. Tabel 14 menunjukkan bahwa ekstrak daun pegagan mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin, hasil pengujian dapat dilihat pada lampiran.

Pereaksi Dragendorff merupakan hasil dari campuran bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam bismut(III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat. Uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff yang positif ditunjukkan oleh adanya endapan coklat (Marliana *et al.* 2005).

Adanya senyawa flavonoid pada ekstrak daun pegagan ditandai dengan terjadinya perubahan warna ekstrak menjadi kuning karena penambahan H_2SO_4 . Menurut Markham (1998) flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenol dimana apabila senyawa ini direaksikan dengan asam maka akan terbentuk warna kuning yang disebabkan oleh terjadinya sistem konjugasi dari gugus aromatik.

Adanya senyawa tanin pada ekstrak ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna ekstrak menjadi hijau setelah penambahan $FeCl_3$. Perubahan warna pada ekstrak dapat terjadi karena adanya reaksi reduksi. Tanin merupakan golongan senyawa polifenol dimana senyawa polifenol ini akan bereaksi dengan $FeCl_3$ untuk mereduksi besi (III) menjadi besi (II) (Budini *et al.* 1980).

Ekstrak dinyatakan positif mengandung saponin hal ini terbukti dengan terbentuknya busa yang stabil. Menurut Burger *et al.* (1998) busa ini timbul

karena adanya penurunan tegangan permukaan pada cairan (air). Penurunan tegangan permukaan disebabkan karena adanya senyawa sabun (*sapo*) yang dapat merusak ikatan hidrogen pada air. Senyawa sabun ini biasanya memiliki dua bagian yang tidak sama sifat kepolarannya sehingga akan menimbulkan busa ketika dikocok.

Uji steroid dan triterpenoid menggunakan metode Liebermann-Bouchard, ekstrak dilarutkan dalam kloroform kemudian ditambah pereaksi Liebermann-Bouchard (asam asetat anhidrat- H_2SO_4) menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna menjadi merah kecoklatan untuk steroid dan coklat-ungu untuk triterpenoid. Reaksi triterpenoid dengan pereaksi Liebermann menghasilkan warna merah-ungu sedangkan steroid memberikan warna hijau-biru. Hal ini didasari oleh kemampuan senyawa triterpenoid dan steroid membentuk warna oleh H_2SO_4 dalam pelarut asam asetat anhidrid. Perbedaan warna yang dihasilkan oleh triterpenoid dan steroid disebabkan perbedaan gugus pada atom C-4 (Marliana & Saleh 2011). Hasil penelitian dapat dilihat pada lampiran 9.

8. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Biakan agar miring bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diambil secara aseptis secukupnya, kemudian dimasukkan ke dalam cairan NaCl fisiologis pada tabung steril. Kekeruhan suspensi disamakan dengan standar Mc Farland 0,5. Suspensi bakteri yang dibuat setara dengan $1,5 \times 10^8$ cfu/mL. Hasil pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dapat dilihat pada lampiran 11.

9. Hasil Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

9.1. Hasil identifikasi media selektif. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan pada media selektif VJA (Vogel Johnson Agar) yang telah ditambahkan kalium tellurite 1%. Suspensi bakteri pada larutan NaCl steril diinokulasikan pada media VJA dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Berdasarkan pengamatan koloni yang dihasilkan berwarna hitam dengan tepian kuning keemasan. Koloni bakteri berwarna hitam disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* yang mereduksi kalium tellurit (Morello *et al.* 2006). Fermentasi adalah proses penggunaan senyawa makromolekul organik menjadi senyawa yang lebih

sederhana oleh aktivitas mikrob pada kondisi anaerob (Pelczar & Chan 2008). *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada temperatur antara 15-45°C dan pada NaCl 15% mampu memfermentasi manitol serta mampu memfermentasi glukosa menghasilkan asam laktat (Todar 2005).

Uji fermentasi larutan manitol yang positif pada *Staphylococcus aureus* yaitu terjadi perubahan warna medium menjadi kuning menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* merubah manitol yang menghasilkan asam laktat sehingga dapat mengubah pH medium menjadi asam (Sari 2003). Terjadi perubahan warna media dari ungu menjadi kuning karena dapat memfermentasikan manitol (Cappucino & Sherman 2005). Menurut Volk & Wheeler (1993), sebagian besar mikroorganisme memperoleh energi dari substrat berupa karbohidrat yang selanjutnya difermentasi menghasilkan asam asam organik (seperti asam laktat dan asetat) dengan disertai atau tidak disertai pembentukan gas. Hasil pengamatan dapat dilihat pada lampiran 12.

9.2. Hasil identifikasi pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram adalah teknik pewarnaan diferensial yang memisahkan bakteri menjadi dua kelompok yaitu Gram positif dan Gram negatif (Harley & Presscot 2002). Bakteri Gram positif mempertahankan zat warna kristal violet karenanya tampak ungu tua sedangkan bakteri Gram negatif kehilangan kristal violet ketika dicuci dengan alkohol dan waktu diberi pewarna tandingan dengan warna merah safranin tampak bewarna merah (Zubaidah 2006). Menurut Purves dan Sadava (2003), perbedaan warna tersebut dikarenakan perbedaan ketebalan dinding peptidoglikan bakteri, bakteri Gram negatif memiliki peptidoglikan lebih tipis dibandingkan dengan bakteri Gram positif. Perbedaan ketebalan dinding ini mengakibatkan perbedaan kemampuan afinitas dengan pewarna Gram.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram-positif. Bakteri Gram-positif memiliki struktur dinding sel terluar berupa peptidoglikan tebal tanpa lapisan lipoprotein dan lipopolisakarida (Ijong 2015). Pada identifikasi pewarnaan Gram, dinding sel bakteri membentuk kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap bertahan walaupun diberi larutan pemucat (Lay 1994). Hasil pengamatan pewarnaan gram dengan mikroskop pada perbesaran 100x menunjukkan sel

berwarna ungu, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur. Hasil pengamatan dapat dilihat pada lampiran 12.

9.3. Hasil uji katalase. Uji katalase penting untuk membedakan *Streptococcus* dengan *Staphylococcus* (Todar 2005). Uji katalase digunakan untuk mengetahui aktivitas katalase pada bakteri yang diuji. Kebanyakan bakteri memproduksi enzim katalase yang dapat memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Hidrogen peroksida terbentuk sewaktu metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob dapat menguarikan zat toksik tersebut (Waluyo 2005). Katalase diproduksi secara alamiah oleh *Staphylococcus aureus* untuk perlindungan diri dari H_2O_2 yang bersifat toksik. Penentuan adanya katalase diuji dengan larutan H_2O_2 3% pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Bakteri diambil sebanyak 1 – 2 ose dari agar miring dan diletakkan diatas objek glass steril, kemudian larutan H_2O_2 3% diteteskan pada bakteri. Hasil positif menunjukkan terbentuknya gelembung udara. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa bakteri yang di uji katalase, membentuk gelembung-gelembung udara, dapat dipastikan bakteri tersebut merupakan *Staphylococcus*. Hasil pengamatan dapat dilihat di lampiran 12.

9.4. Hasil uji koagulase. Uji koagulase digunakan untuk membedakan antara *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Bakteri dimasukkan dalam tabung reaksi steril berisi plasma, dan diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan adanya jendolan berupa gel dibawah tabung. Hasil pengamatan dapat dilihat pada lampiran 12.

Andreasen (2008) menyatakan bahwa koagulase positif umumnya dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus*, namun ditemukan juga *Staphylococcus aureus* koagulase negatif. Koagulase negatif, bertindak sebagai patogen oportunistik (Yurdakul *et al.* 2013). Koagulase merupakan salah satu protein yang menyerupai enzim dan dapat menggumpalkan plasma oksalat atau sitrat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat dalam serum. Faktor reaksi koagulase serum bereaksi dengan koagulase untuk menghasilkan esterase dan aktivitas pembekuan dengan cara yang sama, yaitu pengaktifan protrombin menjadi trombin (Jawetz *et al.* 2001). Proses fagositosis *Staphylococcus aureus* koagulasi positif dapat

dikurangi dengan adanya reaksi penggumpalan darah, hal ini merupakan mekanisme penghambatan yang mungkin berasal dari fibrin bagian permukaan organisme. Enzim koagulase bereaksi terhadap bentuk kompleks yang dapat membelah fibrinogen dan menyebabkan pembentukan bekuan fibrin, fibrin juga tersimpan pada permukaan *Staphylococcus aureus*, yang mampu melindungi bakteri dari kerusakan sel akibat aksi fagositosis sel. Produksi koagulase terkait dengan potensi patogenitas yang invasive (Prescott dan Langsing 1999).

10. Hasil Pengujian Mutu Fisik Sediaan *Cold cream* Tunggal dan Kombinasi Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steniss) dan Ekstrak daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Sediaan *cold cream* dikatakan baik apabila memenuhi persyaratan sifat fisik dan stabil dalam penyimpanan. Parameter sifat fisik *cold cream* yang diuji pada penelitian ini meliputi: organoleptis, homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat dan stabilitas (*freeze thaw*). Pengujian organoleptis, viskositas, pH, daya sebar, dan daya lekat dilakukan pada hari ke-1 dan ke-21. Pengujian stabilitas *cold cream* metode *freeze thaw* dilakukan selama 5 siklus.

10.1. Hasil uji organoleptis sediaan *cold cream*. Pemeriksaan mutu fisik secara organoleptis dilakukan dengan mengamati warna, bau, dan konsistensi sediaan *cold cream*. Uji organoleptis dilakukan untuk mengetahui *cold cream* yang telah dibuat sesuai dengan warna dan bau ekstrak yang digunakan (Juwita 2013). Pemeriksaan mutu fisik *cold cream* secara organoleptis dapat dilihat pada tabel 14.

Tabel 14 menunjukkan adanya perbedaan warna, bau, dan konsistensi dari tiap-tiap formula. Sediaan *cold cream* yang mengandung ekstrak memiliki bau aromatis ekstrak pada hari ke 1 dan bau tetap sama pada hari ke 21. Sediaan *cold cream* yang tidak mengandung ekstrak (kontrol positif & negatif) memiliki bau khas basis *cold cream* pada hari ke 1 dan bertahan hingga hari ke 21. Hasil pengamatan tersebut menunjukkan semua formula memiliki kestabilan, karena tidak terjadi perubahan bau hingga hari ke 21.

Tabel 14. Hasil uji organoleptis sediaan *cold cream* tunggal dan kombinasi ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steniss) dan ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)

Pemeriksaan	Waktu	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Warna	Hari ke 1	Hijau tua	Hijau muda	Hijau tua	Putih susu	Putih susu
	Hari ke 21	Hijau tua	Hijau muda	Hijau tua	Putih susu	Putih susu
Bau	Hari ke 1	+++	+++	+++	+	+
	Hari ke 21	+++	+++	+++	+	+
Konsistensi	Hari ke 1	**	****	***	***	***
	Hari ke 21	**	****	***	***	***

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
 Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
 Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
 Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
 Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)
 +++ : Menunjukkan bau aromatis ekstrak yang intensif
 ++ : Menunjukkan bau aromatis ekstrak yang berkurang
 + : Menunjukkan bau aromatis basis *cold cream*
 * : Menunjukkan konsistensi *cold cream* sedikit kental
 ** : Menunjukkan konsistensi *cold cream* agak kental
 *** : Menunjukkan konsistensi *cold cream* kental
 **** : Menunjukkan konsistensi *cold cream* sangat kental

Perbedaan konsistensi dari tiap formula dikarenakan adanya perbedaan viskositas. Perbedaan konsistensi dapat disebabkan oleh proporsi jumlah ekstrak yang digunakan dan kandungan kimia yang terkandung di dalam ekstrak. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong mempengaruhi konsistensi *cold cream* menjadi agak kental, ekstrak daun pegagan menyebabkan konsistensi *cold cream* menjadi sangat kental, dan kombinasi kedua ekstrak menyebabkan konsistensi *cold cream* menjadi kental dan memiliki kemiripan dengan kontrol positif dan kontrol negatif.

10.2. Hasil uji homogenitas sediaan *cold cream*. Uji homogenitas bertujuan untuk melihat dan mengetahui tercampurnya bahan-bahan sediaan *cold cream* (Juwita 2013). Sediaan dikatakan homogen apabila dioleskan pada sekeping kaca tidak adanya pemisahan antara komponen penyusun emulsi tersebut (Erungan 2009). Homogenitas sediaan *cold cream* mempengaruhi efektivitas terapi, jika sediaan homogen maka diasumsikan bahwa zat aktif terdispersi merata dan saat pemakaian konsentrasi yang digunakan seragam. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 15.

Tabel 15. Hasil pengamatan uji homogenitas sediaan *cold cream*

Formula	Hari ke 1	Hari ke 21
Formula 1	Homogen	Homogen
Formula 2	Homogen	Homogen
Formula 3	Homogen	Homogen
Formula 4	Homogen	Homogen
Formula 5	homogen	Homogen

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
 Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
 Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
 Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
 Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa semua formula memiliki homogenitas yang baik. Suatu sediaan dikatakan memiliki homogenitas yang baik adalah bila fase terdispersi terdistribusi merata ke dalam fase pendispersi dan tidak membentuk terpisah. Pengamatan yang dilakukan pada hari ke 1 dan 21 menunjukkan tidak adanya perubahan dalam homogenitas sediaan dan dapat dikatakan semua sediaan stabil dalam homogenitas.

10.3. Hasil uji pH sediaan *cold cream*. Pengujian pH sediaan bertujuan untuk mengetahui keamanan sediaan *cold cream* saat digunakan agar tidak mengiritasi kulit. Mengetahui profil perubahan pH sediaan dapat memberikan gambaran tentang stabilitas sediaan tersebut. Berdasarkan hasil pengujian menunjukkan pH sediaan *cold cream* pada hari pertama pembuatan sampai hari ke-21 setelah penyimpanan rentang pH fisiologis kulit yaitu 4-7 (Anief, 2007).

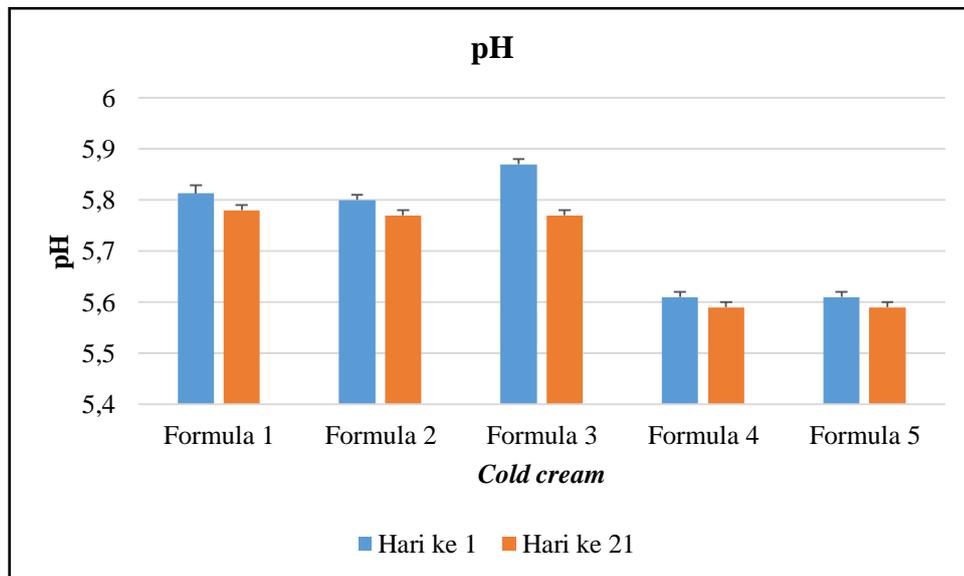
Pengujian pH dilakukan dengan alat pH meter digital yang telah dikalibrasi pada larutan dapar pH 4 dan 7. Hasil pengamatan pH dapat dilihat pada table 16.

Tabel 16. Hasil pengamatan uji pH sediaan *cold cream* tunggal dan kombinasi

Waktu	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Hari ke 1	5,81±0,01	5,80±0,01	5,87±0,01	5,61±0,01	5,61±0,01
Hari ke 21	5,78±0,01	5,77±0,01	5,77±0,01	5,59±0,01	5,59±0,01

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
 Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
 Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
 Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
 Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)



Gambar 11. Hasil pengamatan uji pH sediaan *cold cream* tunggal dan kombinasi

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
- Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
- Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
- Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Hasil pengujian pH sediaan pada hari ke 1 mengalami penurunan nilai pH sampai hari ke 21. Perubahan nilai pH sediaan uji masih memenuhi rentang pH fisiologis. Jika pH sediaan lebih rendah dari pH fisiologis kulit mengakibatkan iritasi kulit. Sediaan dengan pH yang lebih tinggi, mengakibatkan iritasi dan kulit kering (Young *et al.* 2002).

Perubahan pH sediaan selama penyimpanan menandakan kurang stabilnya sediaan selama penyimpanan. Ketidak-stabilan ini dapat merusak produk selama penyimpanan atau penggunaan. Perubahan nilai pH akan terpengaruh oleh media yang terdekomposisi oleh suhu tinggi saat pembuatan atau penyimpanan yang menghasilkan asam atau basa. Asam atau basa ini yang mempengaruhi pH. Selain itu perubahan pH juga disebabkan faktor lingkungan seperti suhu, penyimpanan yang kurang baik, kombinasi ke dua ekstrak yang kurang stabil dalam sediaan karena teroksidasi (Young *et al.* 2002).

Hasil uji statistik *Komogorov-Smirnov* menunjukkan data hasil pengukuran pH kelima formula memiliki distribusi tidak normal dengan nilai probabilitas $0,00 < 0,05$. Pengujian dilanjutkan dengan Uji *Kruskal-Wallis* dan Uji *Mann-Whitney*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan data memiliki nilai probabilitas $0,02 < 0,05$, dengan demikian pH formula *cold cream* memiliki perbedaan signifikan antara hari ke-1 dan hari ke-21. Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan data memiliki nilai probabilitas $0,019 < 0,05$, dengan demikian pH formula *cold cream* memiliki perbedaan signifikan antara hari ke-1 dan ke-21. Hasil pengujian pH masih masuk dalam rentang pH 4-7 (Anief 2007) dan dikatakan aman untuk penggunaan dan tidak berpotensi mengiritasi kulit. Hasil pengujian statistik pH *cold cream* dapat dilihat pada lampiran 16.

10.4. Hasil uji viskositas sediaan *cold cream*. Viskositas sediaan semi padat menjadi salah satu faktor yang perlu diperhatikan karena berkaitan dengan kenyamanan penggunaan. *Cold cream* harus mudah dioleskan dan dapat menempel pada kulit. *Cold cream* tidak boleh terlalu keras dan terlalu encer karena berkaitan dengan efek terapi yang diinginkan serta kenyamanan penggunaan. Pengukuran viskositas *cold cream* dilakukan pada hari ke 1 sampai hari ke 21 setelah pembuatan, untuk mengetahui pengaruh lama penyimpanan terhadap kestabilan nilai viskositasnya.

Tabel 17. Hasil pengamatan uji viskositas (dPas) *cold cream* tunggal dan kombinasi

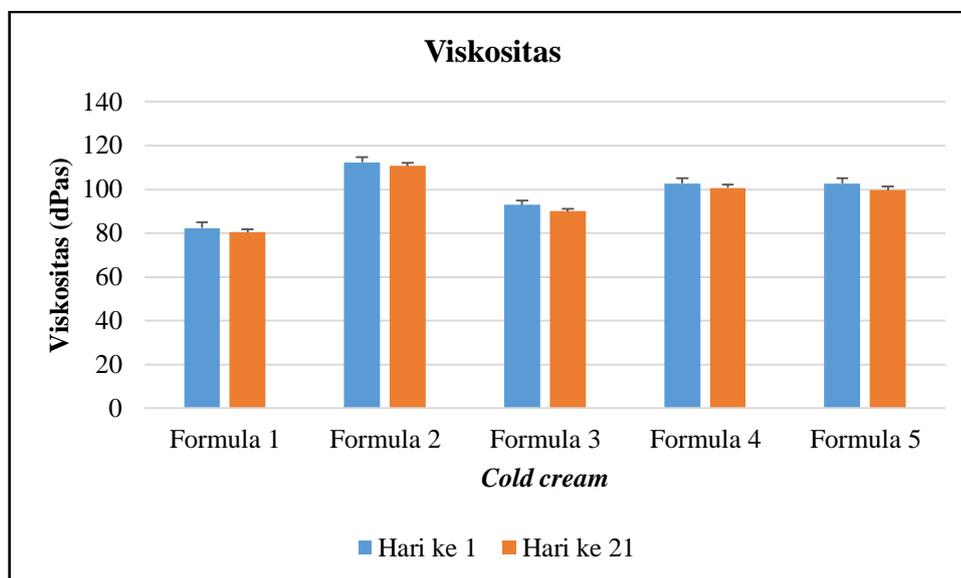
Waktu	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Hari ke 1	82,33±2,51	112,33±2,51	93,00±2,00	102,67±2,51	102,67±2,51
Hari ke 21	80,33±1,52	110,67±1,52	90±1,00	100,67±1,52	99,66±1,52

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
- Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
- Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
- Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Kelima formula *cold cream* diukur viskositasnya menggunakan viscotester rion VT-04. Hasil pengamatan menunjukkan adanya perbedaan nilai viskositas pada pengukuran hari ke-1 dan hari ke-21. Perubahan viskositas dapat dipengaruhi beberapa hal seperti pencampuran, pengadukan, pemilihan emulgator dan proporsi fase terdispersi (Alfred *et al.* 1993). Proporsi fase terdispersi

mempengaruhi viskositas, proporsi fase terdispersi yang tinggi menyebabkan viskositas *cold cream* meningkat begitu sebaliknya.



Gambar 12. Hasil pengamatan uji viskositas (dPas) *cold cream* tunggal dan kombinasi

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
- Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
- Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
- Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Viskositas *cold cream* yang mengandung ekstrak tunggal binahong 5% memiliki viskositas yang sangat rendah dibandingkan dengan formula lainnya. Viskositas formula 2 yang mengandung ekstrak pegagan 5% memiliki viskositas yang paling tinggi dibandingkan dengan formula lainnya. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kandungan masing-masing ekstrak. Interaksi kimia antara basis *cold cream* dan masing-masing ekstrak mempengaruhi dari viskositas *cold cream*.

Viskositas *cold cream* dipengaruhi oleh ukuran droplet. Ukuran *droplet* yang kecil menyebabkan viskositas yang lebih tinggi. Ukuran *droplet* berpengaruh pada stabilitas *cold cream*. Stabilitas *cold cream* dipengaruhi oleh distribusi ukuran *droplet*. Stabilitas viskositas juga dipengaruhi oleh ukuran partikel ekstrak (Moldovan *et al.* 2017).

Hasil uji statistik *Komogorov-Smirnov* menunjukkan data hasil pengukuran viskositas kelima formula memiliki distribusi normal dengan nilai

probabilitas $0,20 > 0,05$. Pengujian dilanjutkan dengan Levene's test homogen dan Two-way ANOVA. Hasil pengujian Two-way ANOVA menunjukkan bahwa data memiliki nilai probabilitas $0,881 > 0,05$, dengan demikian kelima formula tidak memiliki kebermaknaan perbedaan yang signifikan. Viskositas formula *cold cream* tidak memiliki perbedaan yang signifikan pada hari ke-1 dan hari ke-21. Hasil pengujian statistik viskositas cold cream dapat dilihat pada lampiran 17.

10.5. Hasil uji daya sebar. Pengujian daya sebar dilakukan untuk mengetahui kecepatan penyebaran sediaan *cold cream* pada kulit yang diobati. Pengukuran daya sebar dapat menggambarkan pemerataan *cold cream* dan kemampuan untuk menyebar saat diaplikasikan pada kulit, selain itu daya sebar dapat menggambarkan viskositas dari formula yang telah dibuat. Daya sebar berbanding terbalik dengan viskositas sediaan semi padat, jika viskositas semakin rendah maka daya sebar semakin tinggi (Garg *et al.* 2002). Kemampuan penyebaran krim yang baik akan memberikan kemudahan pengaplikasian pada permukaan kulit. Selain itu penyebaran bahan aktif pada kulit lebih merata sehingga efek yang ditimbulkan bahan aktif akan menjadi optimal. Semakin luas penyebaran sediaan pada permukaan kulit maka absorpsi dari bahan obat yang terkandung akan semakin meningkat (Naibaho *et al.* 2013). Pengujian dilakukan pada hari ke-1 dan ke-21 untuk diamati kestabilannya.

Tabel 18. Hasil pengamatan uji daya sebar *cold cream* tunggal dan kombinasi

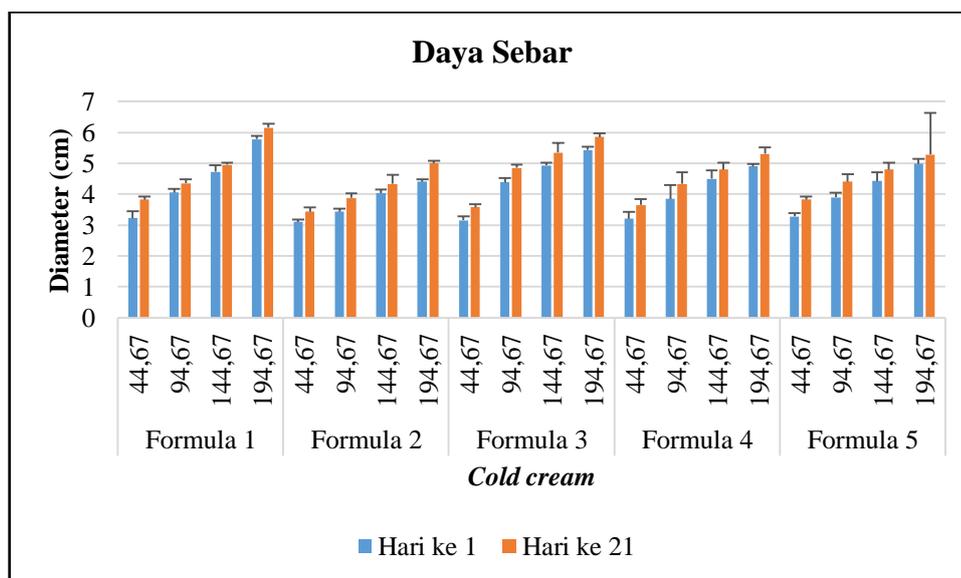
Waktu	Beban	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Hari ke 1	44,61g	3,23±0,22	3,10±0,08	3,15±0,13	3,20±0,22	3,28±0,10
	94,61g	4,05±0,13	3,43±0,10	4,38±0,15	3,85±0,44	3,90±0,14
	144,61g	4,73±0,21	4,03±0,13	4,93±0,10	4,50±0,28	4,43±0,29
	194,61g	5,78±0,10	4,40±0,08	5,43±0,10	4,90±0,08	4,98±0,17
Hari ke 21	44,61g	3,83±0,10	3,43±0,15	3,58±0,10	3,65±0,19	3,83±0,10
	94,61g	4,35±0,13	3,88±0,15	4,85±0,10	4,33±0,38	4,40±0,24
	144,61g	4,95±0,06	4,33±0,29	5,35±0,31	4,80±0,22	4,80±0,22
	194,61g	6,15±0,13	5,00±0,08	5,85±0,13	5,30±0,22	5,28±0,17

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
- Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
- Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
- Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Daya sebar dari kelima formula memiliki karakteristik yang berbeda. Formula yang memiliki viskositas rendah memiliki daya sebar yang lebih luas.

Daya sebar yang luas memberikan kenyamanan pada saat penggunaan. Proporsi cera alba dan cetaceum dalam *cold cream* memiliki peran dalam profil viskositas dan daya sebar *cold cream*. Hal ini disebabkan cera alba berperan sebagai penstabil emulsi dan cetaceum sebagai emolien (Nurkhalika 2016).



Gambar 13. Hasil pengamatan uji daya sebar (cm) *cold cream* tunggal dan kombinasi

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
- Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
- Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
- Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Hasil uji statistik *Komogorov-Smirnov* menunjukkan data hasil pengukuran daya sebar kelima formula memiliki distribusi tidak normal dengan nilai probabilitas $0,019 < 0,05$. Pengujian dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*. Hasil pengujian *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai probabilitas $0,002 < 0,05$. Hasil pengujian *Mann-Whitney* menunjukkan nilai probabilitas $0,002 < 0,05$. Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan daya sebar *cold cream* yang signifikan pada hari ke-1 dan hari ke-21. Hasil pengujian statistik daya sebar *cold cream* dapat dilihat pada lampiran 18.

10.6. Hasil uji daya lekat. Pengujian daya lekat dilakukan untuk mengetahui kemampuan melekat *cold cream* yang dibuat pada kulit. Kemampuan daya lekat akan mempengaruhi efek terapi yang dimiliki. Semakin lama

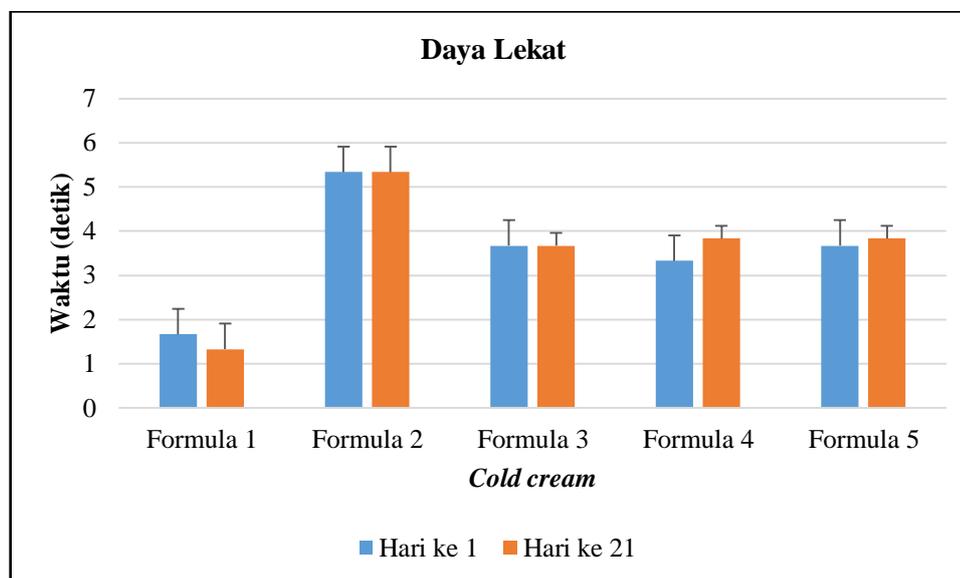
kemampuan melekat pada kulit, maka efek terapi yang diberikan relatif lebih lama (Ansel 2008). Daya lekat sediaan berbanding lurus dengan viskositas sediaan, semakin besar nilai viskositasnya maka semakin lama kemampuan sediaan tersebut untuk melekat. Bertambahnya waktu kontak sediaan akan bermanfaat ketika diaplikasikan ke kulit. Waktu kontak sediaan berpengaruh pada absorpsi obat melalui kulit. Semakin besar waktu kontak obat pada kulit maka konsentrasi obat yang diabsorpsi oleh kulit juga meningkat (Naibaho *et al.* 2013). Pengujian daya lekat dilakukan pada hari ke 1 dan 21.

Tabel 19. Hasil pengamatan uji daya lekat *cold cream* tunggal dan kombinasi

Waktu	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
Hari ke 1	1,67±0,57	5,33±0,57	3,67±0,57	3,33±0,57	3,67±0,57
Hari ke 21	1,33±0,57	5,33±0,57	3,67±0,29	3,83±0,29	3,83±0,29

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
- Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
- Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
- Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)



Gambar 14. Hasil uji pengamatan daya lekat *cold cream*

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
- Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
- Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
- Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa formula 2 (Pegagan 5%) yang memiliki viskositas tinggi memiliki daya lekat yang lebih lama daripada formula *cold cream* lainnya. Formula 1 (Binahong 5%) yang memiliki viskositas lebih rendah memiliki daya lekat yang lebih cepat. Daya lekat sediaan *cold cream* berbanding lurus dengan viskositas sediaan *cold cream*.

Hasil uji statistik *Komogorov-Smirnov* menunjukkan data hasil pengukuran daya lekat kelima formula memiliki distribusi tidak normal dengan nilai probabilitas $0,025 < 0,05$. Pengujian dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai probabilitas $0,783 > 0,05$. Uji *Mann-Whitney* menunjukkan nilai probabilitas $0,806 > 0,05$. Hal tersebut diinterpretasikan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara daya lekat hari ke-1 dan ke-21. Hasil pengujian statistik daya sebar *cold cream* dapat dilihat pada lampiran 19.

10.7. Hasil uji stabilitas metode *freeze thaw* pada *cold cream*. Metode uji stabilitas *freeze thaw* digunakan untuk mengetahui gambaran stabilitas *cold cream*. Metode *freeze thaw* dilakukan dengan cara menyimpan sediaan pada suhu 4°C selama 48 jam kemudian disimpan pada suhu 40°C selama 48 jam (1 siklus). Pengujian stabilitas *cold cream* dilakukan sebanyak 5 siklus. Pengujian stabilitas ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan *cold cream*, pengamatan yang dilakukan meliputi organoleptis, pH, dan viskositas (Hamsinah *et al.* 2016).

10.7.1. Hasil uji organoleptis stabilitas *freeze thaw*. Pengamatan organoleptis *freeze thaw* meliputi: ada tidaknya keterpisahan fase akibat dari penyimpanan pada suhu berbeda. Pengamatan dilakukan menggunakan panca indera (visual) selama 5 siklus. Hasil uji organoleptis stabilitas dapat dilihat pada tabel 20.

Tabel 20. Hasil pengamatan uji organoleptis stabilitas metode *freeze thaw* pada *cold cream*

Formula	Siklus 1	Siklus 2	Siklus 3	Siklus 4	Siklus 5
1	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil
2	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil
3	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil
4	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil
5	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
 Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan

- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
 Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
 Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kelima formula stabil. Pengamatan didasarkan pada tidak adanya keterpisahan fase. Hal ini menunjukkan bahwa pada proses formulasi *cold cream* sudah dilakukan dengan benar dan kelima formula *cold cream* tercampur secara homogen, sehingga fase terdispersi tercampur secara optimal pada fase pendispersi.

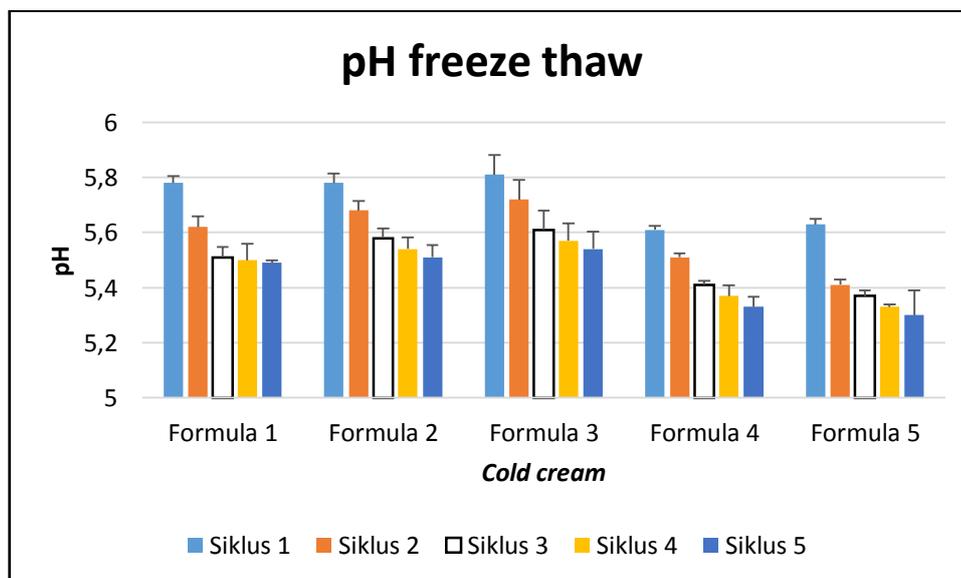
10.7.2. Hasil uji pH stabilitas freeze thaw. Uji stabilitas pH dilakukan dengan metode *freeze thaw*. Pengujian dilakukan selama 5 siklus. Pengukuran dilakukan setiap sebelum dan sesudah siklus. Hasil pengujian menunjukkan adanya penurunan pH dari setiap formula.

Tabel 21. Hasil uji pH stabilitas freeze thaw

Siklus	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
1	5.78±0,02	5.78±0,03	5.81±0,03	5.61±0,05	5.63±0,01
2	5.62±0,03	5.68±0,03	5.72±0,03	5.51±0,04	5.41±0,04
3	5.51±0,07	5.58±0,07	5.61±0,07	5.41±0,06	5.37±0,06
4	5.50±0,01	5.54±0,01	5.57±0,01	5.37±0,03	5.33±0,03
5	5.49±0,02	5.51±0,02	5.54±0,2	5.33±0,01	5.30±0,08

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
 Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
 Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
 Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
 Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)



Gambar 15. Grafik hasil uji pH stabilitas *freeze thaw*

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
- Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
- Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
- Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
- Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Penyimpanan suhu yang berbeda-beda akan terjadi perubahan pH pada sediaan *cold cream*, bahwa dari hasil yang diperoleh mengalami penurunan selama waktu penyimpanan. Akan tetapi penurunannya tidak melebihi dari batas standar suatu sediaan yaitu 4,5-7 (Wasitaatmadja 1997). Hal tersebut terjadi pengaruh CO₂, dimana CO₂ bereaksi dengan fase air sehingga membentuk asam.

Hasil uji statistik *Komogorov-Smirnov* menunjukkan data hasil pengukuran pH stabilitas metode *freeze thaw* kelima formula memiliki distribusi normal dengan nilai probabilitas $0,20 > 0,05$. Pengujian dilanjutkan dengan Levene's test homogen dan Two-way ANOVA. Hasil pengujian Two-way ANOVA menunjukkan data memiliki nilai probabilitas $0,011 < 0,05$. Hal tersebut diinterpretasikan bahwa kelima formula memiliki kebermaknaan perbedaan yang signifikan. pH stabilitas metode *freeze thaw* formula *cold cream* memiliki perbedaan yang signifikan pada tiap siklusnya. Hasil uji statistik stabilitas pH *cold cream* metode *freeze thaw* dapat dilihat pada lampiran 20.

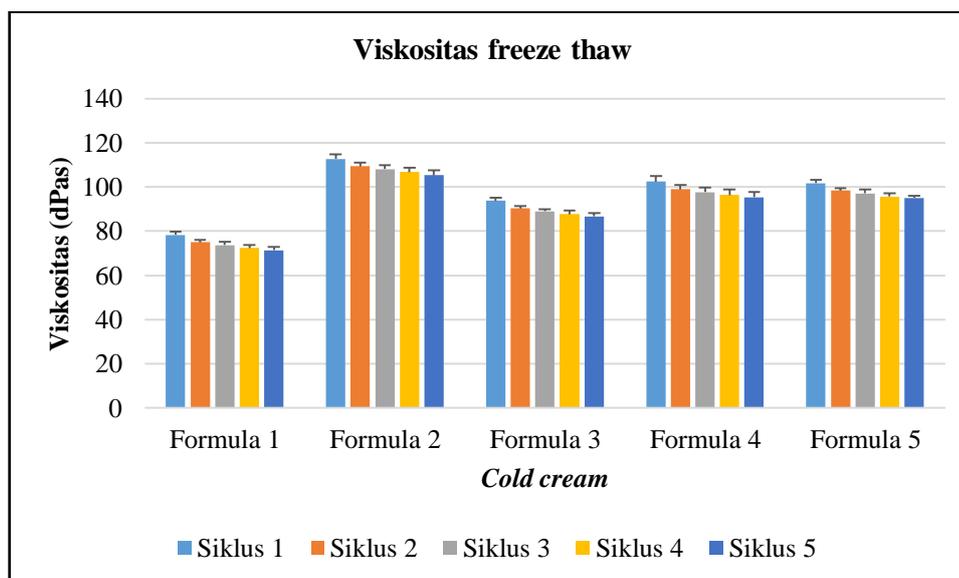
10.7.3. Hasil uji viskositas stabilitas freeze-thaw. Uji stabilitas viskositas dilakukan dengan metode *freeze thaw*. Pengujian dilakukan selama 5 siklus. Pengukuran dilakukan setiap sebelum dan sesudah siklus. Pengukuran dilakukan menggunakan viscotester rion VT-04. Hasil pengujian viskositas *freeze thaw* dapat dilihat pada tabel 22.

Tabel 22. Hasil uji viskositas freeze thaw

Siklus	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
1	78,30	112,67	93,67	102,23	101,67
2	75,00	109,33	90,33	99,00	98,33
3	73,67	108,00	89,00	97,67	97,00
4	72,33	106,67	87,67	96,33	95,67
5	71,33	105,33	86,67	95,33	95,00

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
 Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
 Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
 Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
 Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)



Gambar 16. Grafik hasil uji viskositas freeze thaw

Hasil pengamatan uji viskositas *freeze thaw* menunjukkan kelima formula memiliki penurunan viskositas pada tiap siklus. Penurunan viskositas seiring dengan bertambahnya waktu penyimpanan. Penyimpanan pada wadah yang kurang kedap menyebabkan formula *cold cream* dapat menyerap uap air dari udara. Hal ini menyebabkan viskositas stabilitas *cold cream* metode *freeze thaw* mengalami penurunan pada tiap siklusnya.

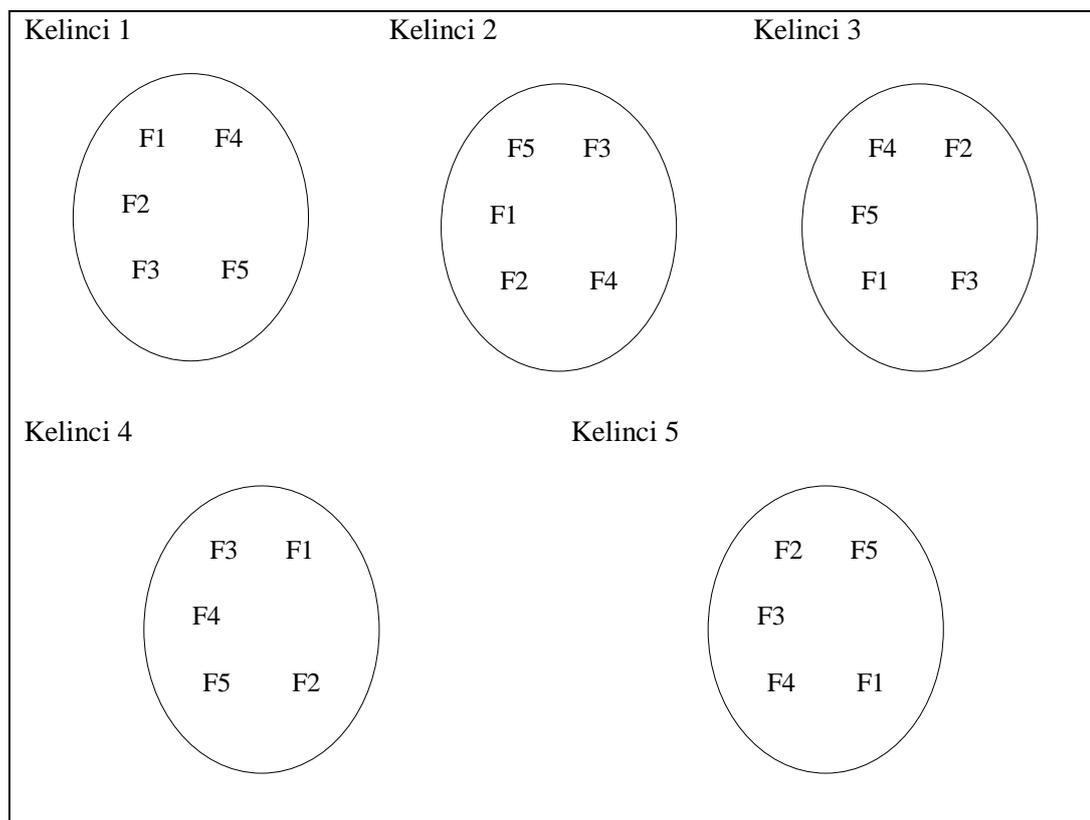
Hasil uji statistik *Komogorov-Smirnov* menunjukkan data hasil pengukuran daya lekat kelima formula memiliki distribusi tidak normal dengan nilai probabilitas $0,03 < 0,05$. Pengujian dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan nilai probabilitas $0,320 > 0,05$. Uji *Mann-Whitney* menunjukkan nilai probabilitas $0,116 > 0,05$. hal tersebut diinterpretasikan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara viskositas stabilitas metode *freeze thaw* pada tiap siklusnya. Hasil pengujian statistik stabilitas viskositas cold cream metode *freeze thaw* dapat dilihat pada lampiran 21.

11. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Cold cream Tunggal dan Kombinasi Ekstrak Daun Binahong dan Ekstrak Daun Binahong Pada Kulit Kelinci

Kelinci sejumlah 5 ekor diaklimatisasi selama 7 hari. Bulu pada punggung kelinci dicukur hingga licin dan dibagi menjadi 6 bagian. Suspensi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sesuai standar Mc Farland 0,5 sebanyak 0,2 ml diinduksikan secara intrakutan pada tiap lokasi. Pengamatan dilakukan selama 24-48 jam hingga terbentuk eritema, udem, dan nanah. Eritema, udem, dan nanah diamati diameter dan ketebalannya selama 14 hari. Sediaan *cold cream* dioleskan pada luka sebanyak 3 kali sehari pada lokasi luka dan ditutup menggunakan kasa steril. Pengaplikasian *cold cream* tiap kelinci diacak untuk menghindari kerancuan data, karena ada kemungkinan kelinci menjilat luka sehingga data yang diperoleh rancu seperti pada gambar 13. Luka yang sudah sembuh dibuat apusan dan digoreskan pada media selektif VJA, untuk mengetahui keberadaan bakteri pada luka yang sudah sembuh.

Staphylococcus aureus menginfeksi kulit melalui kerusakan kulit atau melalui rusaknya folikel rambut pada saluran kelenjar keringat (Iskamto 2009). *Staphylococcus aureus* memiliki beragam faktor virulensi, yang mencakup protein permukaan, enzim pengurai protein dan toksin perusak sel pejamu. Dinding sel *Staphylococcus aureus* mengandung polisakarida A (Antigen A) sebagai salah satu faktor virulensi. *Staphylococcus* memiliki kemampuan untuk membentuk kapsul. Kapsul dan antigen A dapat menghambat proses fagositosis oleh leukosit. Kemampuan patogenik *Staphylococcus aureus* merupakan pengaruh gabungan

dari faktor ekstraseluler, toksin dan sifat daya sebar invasif. *Staphylococcus aureus* menghasilkan α -toksin yang dapat mempercepat pembentukan mediator inflamasi, β -toksin & leukotoksin yang merusak membrane, koagulase yang dapat melindungi dirinya dari fagositosis, eksotoksin yang merusak jaringan pejamu, stafilokinase yang membantu penyebaran bakteri, dan enzim ekstraseluler lainnya yang berperan dalam keberlangsungan hidup bakteri (Husna 2018).



Gambar 17. Lokasi perlakuan pada kulit kelinci

Keterangan :

- Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong
 Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan
 Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan
 Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)
 Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Parameter yang digunakan untuk mengetahui daya kesembuhan luka infeksi adalah diameter eritema, ketebalan udem, dan nanah yang timbul. Pengamatan diameter eritema didasarkan pada skoring menurut Suhaimi *et al.* 2019. Skor dibagi menjadi 5 kategori (Tabel 3), tidak ada eritema, eritema ringan, eritema sedang, eritema kuat, dan eritema parah. Setiap hari diameter eritema diukur dengan 3 kali replikasi dan dirata-rata, hasilnya ditentukan nilai skornya sesuai pada tabel 3. Data dikumpulkan hingga 14 hari. Data pengamatan dapat dilihat pada tabel 25. Luka 4 yang diberikan perlakuan dengan formula 4 (kontrol positif) memberikan daya kesembuhan paling cepat (6 hari), kemudian berurutan formula 3, formula 1&2, dan formula 5.

Tabel 23. Hasil pengamatan daya kesembuhan (hari) cold cream terhadap kulit kelinci

Kelinci	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	Formula 5
1	9	8	8	5	12
2	9	9	8	6	12
3	8	9	7	5	13
4	9	9	7	5	12
5	8	8	8	6	13
Rata-rata	8,6	8,6	7,4	4,4	18,6

Keterangan :

Formula 1 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun binahong

Formula 2 : *Cold cream* mengandung 5% ekstrak daun pegagan

Formula 3 : *Cold cream* mengandung 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan

Formula 4 : *Cold cream* mengandung 0,1% gentamisin (kontrol positif)

Formula 5 : Basis *cold cream* (kontrol negatif)

Tabel 24. Hasil skoring pengamatan diameter eritema pada luka infeksi kulit kelinci

Hari ke-	Luka 1	Luka 2	Luka 3	Luka 4	Luka 5
1	4	4	4	4	4
2	4	4	4	3	4
3	3	3	3	2	4
4	3	3	3	2	3
5	3	3	2	1	3
6	2	2	2	0	3
7	2	2	1	0	2
8	1	1	0	0	2
9	0	0	0	0	2
10	0	0	0	0	1
11	0	0	0	0	1
12	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0

Keterangan :

Luka 1 : Luka yang diaplikasikan formula 1 (*cold cream* dengan kandungan ekstrak binahong 5%)

Luka 2 : Luka yang diaplikasikan formula 2 (*cold cream* dengan kandungan ekstrak pegagan 5%)

Luka 3 : Luka yang diaplikasikan formula 3 (*cold cream* dengan kandungan kombinasi ekstrak 5%)

Luka 4 : Luka yang diaplikasikan formula 4 (*cold cream* dengan kandungan gentamisin 0,1%)

Luka 5 : Luka yang diaplikasikan formula 5 (basis *cold cream*)

Pengamatan ketebalan udem didasarkan pada skoring menurut Suhaimi *et al.* 2019. Skor dibagi menjadi 4 kategori (Tabel 4), tidak ada udem, udem ringan, eritema sedang, dan udem parah. Setiap hari udem eritema diukur dengan 3 kali replikasi dan dirata-rata, hasilnya ditentukan nilai skornya sesuai pada tabel 4. Data dikumpulkan hingga 14 hari. Data hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 26. Pengamatan nanah didasarkan pada ada tidaknya nanah pada luka. Setiap hari

nanah diamati secara organoleptis. Data hasil pengamatan dikumpulkan hingga 14 hari. Data pengamatan dapat dilihat pada tabel 25.

Tabel 25. Hasil skoring pengamatan ketebalan udem pada luka infeksi kulit kelinci

Hari ke-	Luka 1	Luka 2	Luka 3	Luka 4	Luka 5
1	3	3	3	3	3
2	3	3	3	2	3
3	2	2	2	2	3
4	2	2	2	1	3
5	2	2	2	1	2
6	1	1	1	0	2
7	1	1	1	0	2
8	1	1	0	0	2
9	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	1
11	0	0	0	0	1
12	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0

Keterangan :

- Luka 1 : Luka yang diaplikasikan formula 1 (*cold cream* dengan kandungan ekstrak binahong 5%)
- Luka 2 : Luka yang diaplikasikan formula 2 (*cold cream* dengan kandungan ekstrak pegagan 5%)
- Luka 3 : Luka yang diaplikasikan formula 3 (*cold cream* dengan kandungan kombinasi ekstrak 5%)
- Luka 4 : Luka yang diaplikasikan formula 4 (*cold cream* dengan kandungan gentamisin 0,1%)
- Luka 5 : Luka yang diaplikasikan formula 5 (basis *cold cream*)

Data yang diperoleh dari parameter diameter eritema, ketebalan udem dan keberadaan nanah diinterpretasikan bahwa formula 4 (control positif) memiliki potensi penyembuhan yang paling efektif (5 hari). Hal ini disebabkan karena kandungan formula 4 berupa gentamisin 0,1%. Gentamisin merupakan antibiotik golongan aminoglikosida yang bersifat bakterisid (Katzung *et al.* 2009). Gentamisin menembus dinding bakteri dan mengikat diri pada ribosom sel bakteri. Hal ini menyebabkan gangguan pada proses translasi, sehingga biosintesa protein menjadi kacau (Radigan 2009).

Formula *cold cream* dengan kandungan tunggal atau kombinasi dari ekstrak daun binahong dan ekstrak daun pegagan memiliki daya penyembuhan luka yang relatif efektif. Formula 3 dengan kandungan kombinasi 2,5% ekstrak daun binahong dan 2,5% ekstrak daun pegagan memiliki daya kesembuhan lebih cepat dari pada *cold cream* dengan kandungan ekstrak tunggal. Formula 3 diduga memiliki efek sinergisme, hal ini didasarkan pada komposisi kandungan ekstrak

yang lebih beragam. Pengujian kandungan kimia ekstrak, menunjukkan bahwa ekstrak daun binahong dan ekstrak daun pegagan memiliki kandungan alkaloid, flavonoid, tannin, dan saponin.

Tabel 26. Hasil pengamatan nanah pada luka infeksi kulit kelinci

Hari ke-	Luka 1	Luka 2	Luka 3	Luka 4	Luka 5
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	-	+
6	+	+	-	-	+
7	-	-	-	-	+
8	-	-	-	-	+
9	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-

Keterangan :

- + : Nanah timbul
- : Nanah hilang
- Luka 1 : Luka yang diaplikasikan formula 1 (*cold cream* dengan kandungan ekstrak binahong 5%)
- Luka 2 : Luka yang diaplikasikan formula 2 (*cold cream* dengan kandungan ekstrak pegagan 5%)
- Luka 3 : Luka yang diaplikasikan formula 3 (*cold cream* dengan kandungan kombinasi ekstrak 5%)
- Luka 4 : Luka yang diaplikasikan formula 4 (*cold cream* dengan kandungan gentamisin 0,1%)
- Luka 5 : Luka yang diaplikasikan formula 5 (basis *cold cream*)

Kandungan alkaloid dalam ekstrak mempunyai kemampuan antibakteri karena memiliki gugus aromatik kuartener yang mampu berinterkalasi dengan DNA (Cowan 1999), selain itu alkaloid juga mampu mengganggu integritas komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri. Peptidoglikan merupakan komponen penyusun dinding sel bakteri sehingga adanya gangguan tersebut akan menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Cushine & Lamb 2005) Ekstrak daun pegagan memiliki kandungan alkaloid golongan piridin, tropen, kinolin, isokinolin, indol, imidazole, purin, amin dan steroid (Mursyidi 1990)

Flavonoid memiliki sifat bakteriostatik dengan mekanisme kerja menghambat sintesis nukleat, menghambat fungsi membrane dan menghambat

metabolism energi (Chusine & Lamb 2005). Ekstrak daun binahong memiliki kandungan flavonoid golongan auron (Veronita *et al.* 2017). Mekanisme kerja dari flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri, antara lain bahwa flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri. Mekanisme antiinflamasi terjadi melalui efek penghambatan pada jalur metabolisme asam arakhidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamin pada radang (Thomson 1993).

Kandungan senyawa tanin pada ekstrak mempunyai aksi antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menonaktifkan adhesin bakteri, menghambat kerja enzim, menghambat transport protein pada selubung sel (Cowan 1999). Menurut Chung *et al.* (2006) mekanisme kerja tanin sebagai bahan antibakteri antara lain melalui perusakan membran sel bakteri karena toksisitas tanin dan pembentukan ikatan kompleks ion logam dari tanin yang berperan dalam toksisitas tanin. Bakteri yang tumbuh dalam kondisi aerob memerlukan zat besi untuk berbagai fungsi, termasuk reduksi dari prekursor ribonukleotida DNA. Adanya ikatan antara tanin dan besi akan menyebabkan terganggunya berbagai fungsi bakteri.

Mekanisme saponin sebagai antibakteri dengan mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Ganiswara 1995). Kandungan flavonoid dan saponin dalam ekstrak daun binahong memiliki efek sinergistik dalam efek penyembuhan luka (Pariyana *et al.* 2016). Ekstrak pegagan mengandung senyawa saponin berupa *madecassic acid* dan *Asiatic acid* (Dewi *et al.* 2018).

Gohil *et al.* (2010) mengemukakan bahwa kandungan triterpenoid dan saponin pada ekstrak pegagan dapat mendukung penyembuhan luka, dengan cara meningkatkan *tensile strength* dan sintesis kolagen. Hal ini didukung oleh bentuk sediaan *cold cream* yang memiliki efek dingin bila diaplikasikan pada kulit dan membuat kulit senantiasa lembab (*moist*). Lingkungan kulit yang lembab berfungsi untuk menurunkan rasa nyeri, mempercepat pertumbuhan granulasi, dan epitalisasi (Tairawhiti & Huanora 2010).

Ekstrak daun pegagan memiliki komponen utama berupa asiatikosida, centellosida, madekosida, dan asam aiatik yang merupakan golongan senyawa triterpenoid saponin. Keempat senyawa tersebut memiliki peran dalam aktivitas antibakteri (James & Dubery 2009).

Kandungan protein dalam ekstrak daun binahong berfungsi sebagai stimulant kekebalan tubuh kelinci untuk merangsang pembentukan antibodi. Protein merangsang oksida nitrit yang dapat meningkatkan aliran darah dan membawa nutrisi untuk setiap sel sehingga merangsang tubuh memproduksi hormone pertumbuhan dan reproduksi sel untuk menggantikan sel yang rusak sehingga akan mengurangi eritema secara perlahan (Arifan *et al.* 2013). Ekstrak daun binahong membantu penyembuhan luka dengan meningkatkan pembentukan jaringan epitel dan kolagen (Rohma *et al.* 2015). Flavonoid dalam ekstrak daun binahong memiliki peran sebagai antioksidan (Umar *et al.* 2012). Antioksidan berperan dalam mengurangi sel nekrosis dan lipid peroksidasi. Pengurangan lipid peroksidasi dapat meningkatkan viabilitas serat kolagen dan mencegah kerusakan sel, sehingga dapat mempercepat perbaikan sel rusak (Astuti 2016).

Formula 5 memiliki daya penyembuhan yang paling lama. Hal ini disebabkan karena tidak adanya kandungan zat aktif antibakteri di dalamnya. Nipagin dan nipasol diduga memiliki peran dalam proses penyembuhan luka. Hal ini didasarkan pada tujuan pemakaian nipagin dan nipasol sebagai zat pengawet, dengan mekanisme antimikroba. Zat pengawet ditambahkan untuk menjaga stabilitas sediaan dari kontaminasi mikroorganisme yang dapat menurunkan mutu fisik dan khasiat *cold cream*.

Basis *cold cream* merupakan basis krim dengan tipe air dalam minyak. *Cold cream* memiliki proporsi fase minyak lebih banyak daripada fase air. *cold cream* memiliki daya lekat yang berbanding lurus dengan viskositasnya, dan meningkatkan waktu kontak dengan kulit. Waktu kontak sediaan berpengaruh pada absorpsi obat melalui kulit. Semakin besar waktu kontak obat pada kulit maka konsentrasi obat yang diabsorpsi oleh kulit juga meningkat (Naibaho *et al.* 2013). Proses penyembuhan luka pada punggung kelinci juga dibantu oleh mekanisme imunitas dari kelinci sendiri. *Staphylococcus aureus* memiliki

berbagai faktor virulensi yang akan dikenali sebagai antigen oleh sistem imunitas kelinci.

Hasil pengujian statistik pada diameter eritema dan ketebalan udem menunjukkan bahwa *cold cream* dengan kombinasi ekstrak binahong 2,5% dan ekstrak pegagan 2,5% memiliki perbedaan aktivitas antibakteri dibandingkan dengan *cold cream* dengan kandungan tunggalnya. Hal ini didasarkan pada uji Post-Hoc Tukey yang menunjukkan bahwa *cold cream* kombinasi berada pada subset yang berbeda dengan *cold cream* tunggalnya. Kelima formula *cold cream*, formula 4 dengan kandungan gentamisin 0,1% memiliki aktivitas antibakteri paling baik dan efektif. Perbedaan aktivitas antibakteri juga dapat dilihat pada waktu penyembuhan luka.

Apusan pada kulit kelinci dibuat setelah semua luka pada kulit kelinci sembuh dan terlihat seperti kulit semula. Apusan dilakukan menggunakan *cotton bud* steril dan digoreskan pada media selektif VJA steril. Media yang telah digores diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pembuatan apusan dilakukan untuk melihat keberadaan bakteri *Staphylococcus aureus* pada kulit kelinci. Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel 27.

Tabel 27. Hasil pengamatan apusan pada media selektif VJA

Luka	Kelinci				
	1	2	3	4	5
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	+	-	-	+

Keterangan :

- + : Nanah timbul
- : Nanah hilang
- Luka 1 : Luka yang diaplikasikan formula 1 (*cold cream* dengan kandungan ekstrak binahong 5%)
- Luka 2 : Luka yang diaplikasikan formula 2 (*cold cream* dengan kandungan ekstrak pegagan 5%)
- Luka 3 : Luka yang diaplikasikan formula 3 (*cold cream* dengan kandungan kombinasi ekstrak 5%)
- Luka 4 : Luka yang diaplikasikan formula 4 (*cold cream* dengan kandungan gentamisin 0,1%)
- Luka 5 : Luka yang diaplikasikan formula 5 (basis *cold cream*)

Hasil pengamatan apusan menunjukkan masih adanya bakteri *Staphylococcus aureus* pada luka 5. Luka 5 merupakan luka yang diaplikasikan

formula 5. Formula 5 tidak mengandung bahan aktif antibakteri dan hanya berupa basis cold cream. *Staphylococcus* koagulase negatif merupakan microbiota residen pada kulit yang memiliki potensial patogenik rendah (Jawetz *et al.* 2012). Kedua bakteri tersebut merupakan floral normal kulit dengan kepadatan populasi 10^3 CFU/cm² (Jawetz *et al.* 2012). *Staphylococcus aureus* merupakan floral transien yang berkoloni pada lapisan permukaan kulit dalam waktu singkat, biasanya terjadi akibat kontak dengan pasien atau lingkungan terkontaminasi (Jawetz *et al.* 2012).