

**AKTIVITAS *ANTIACNE* EKSTRAK ETANOL HERBA
ALFALFA (*Medicago sativa* L.) PADA KELINCI**

SKRIPSI



oleh:

Eko Wahyu Saputro

165010016

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS WAHID HASYIM
SEMARANG
Maret 2020**

**AKTIVITAS *ANTIACNE* EKSTRAK ETANOL HERBA
ALFALFA (*Medicago sativa* L.) PADA KELINCI**

SKRIPSI

**Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat
dalam mencapai derajat Sarjana Farmasi
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Wahid Hasyim**

oleh:

Eko Wahyu Saputro

165010016

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS WAHID HASYIM
SEMARANG
Maret 2020**

INTISARI

AKTIVITAS *ANTIACNE* EKSTRAK ETANOL HERBA ALFALFA (*Medicago sativa* L.) PADA KELINCI

Herba alfalfa mengandung flavonoid yang berkhasiat sebagai antibakteri dan antiinflamasi. Jerawat disebabkan salah satunya oleh bakteri *P. acnes*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas *antiacne* ekstrak etanol herba alfalfa pada kelinci yang diinduksi bakteri *P. acnes* dan mengetahui kadar flavonoid total dalam ekstrak.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *pre and post test control group design*. Herba alfalfa diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 70%. Penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode spektrofotometer dengan pembanding kuersetin. Uji aktivitas *antiacne* menggunakan 5 ekor kelinci yang area punggungnya dicukur dan diinduksikan 0,2 mL suspensi bakteri *P.acnes* secara intradermal. Setelah jerawat muncul dalam 24 jam, diameter eritema diukur pada hari ke-1 dan diberi perlakuan dua kali sehari selama 15 hari : K₁ (Klindamisin 2%); K₂ (DMSO 50%); serta EEHA 50%, 60%,70% (C₁– C₃). Penurunan diameter eritema pada hari ke-15 dianalisis secara statistik dengan uji Anova satu jalan dan *Post Hoc Tukey* dengan taraf kepercayaan 95%.

Persentase rata-rata penurunan diameter eritema pada EEHA (50%,60% dan 70%) secara berturut-turut sebesar 48,70%; 48,26% dan 54,09%. EEHA tidak memiliki aktivitas *antiacne* pada seluruh konsentrasi. EEHA mengandung flavonoid total sebesar 2,323 mgQE/g.

Kata kunci: Ekstrak Etanol, Herba Alfalfa, Flavonoid, *Propionibacterium acnes*, *antiacne*

ABSTRACT

ANTIACNE ACTIVITY OF ALFALFA HERBA ETHANOL EXTRACT (*Medicago sativa* L.) IN RABBIT

Alfalfa herb contains flavonoids which have antibacterial and anti-inflammatory properties. Acne is caused by P. Acnes bacteria. This study aims to determine the antiacne activity of alfalfa herb ethanol extract in rabbits induced by P. acnes bacteria and determine the total flavonoid levels in the extract.

This study is an experimental study with a pre and post-test control group design. Alfalfa herb was extracted using the maceration method with 70% ethanol. Determination of total flavonoid levels using the spectrophotometer method with quercetin comparison. Antiacne activity test used 5 rabbits whose back area was shaved and induced 0.2 mL of P.acnes bacterial suspension intradermally. After acne appears within 24 hours, erythema diameter was measured on day 1 and treated twice a day for 15 days: K1 (Clindamycin 2%); K2 (50% DMSO); and EEHA 50%, 60%, 70% (C1 - C3). Erythema diameter decrease on day 15th was calculated and analyzed by one-way Anova test and Post Hoc Tukey with a 95% confidence level.

The average percentage reduction in erythema diameter on EEHA (50%,60%, and 70%) were 48.70%, 48.26%, and 54.09%, respectively. EEHA does not have significant antiacne activity at all concentrations. EEHA contains total flavonoids of 2,323 mgQE /g.

Keyword : *Ethanol Extract, Alfalfa Herba, Propionibacterium acnes, Antiacne, Flavonoids*

PENGESAHAN SKRIPSI

Berjudul

**AKTIVITAS *ANTIACNE* EKSTRAK ETANOL HERBA
ALFALFA (*Medicago sativa* L.) PADA KELINCI**

oleh:
Eko Wahyu Saputro
165010016

**Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim
Pada tanggal: 6 Maret 2020**

Pembimbing,



(apt. Risha Fillah Fithria, M.Sc.)

Mengetahui:

Fakultas Farmasi
Universitas Wahid Hasyim
Dekan,



(apt. Agus Budiarti, M.Sc.)

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Eko Wahyu Saputro

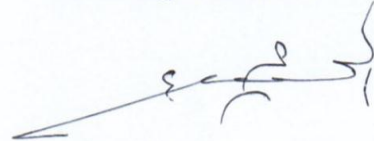
NIM : 165010016

Judul Skripsi : Aktivitas *Antiacne* Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (*Medicago sativa* L.) pada Kelinci.

Dengan ini menyatakan bahwa dalam skripsi saya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah skripsi saya dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Demikian surat pernyataan ini dibuat untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Semarang, 06 Maret 2020



Eko Wahyu Saputro

“Gekocht Succes Zal Niet Lang Duren”

Kesuksesan yang dibeli tidak akan bertahan lama

Doa Ibu Mewakili Seisi Dunia

Kupersembahkan untuk:

***Kedua orang tua sebagai wujud hormat dan baktiku
Almamater sebagai wujud terima kasih dan khidmahku***

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala nikmat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dengan judul “**Aktivitas *Antiacne* Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (*Medicago Sativa L.*) Pada Kelinci**”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program studi ilmu farmasi tingkat Strata 1 (S1), Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang. Penulis mungkin tidak akan mampu untuk menyelesaikan penelitian dan skripsi ini tanpa kerjasama, bimbingan, nasihat, kritik dan saran serta dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan banyak terima kasih kepada:


1. Aqnes Budiarti M.Sc., Apt., selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
2. Risha Fillah Fitrhia, M.Sc., Apt., selaku dosen pembimbing pertama yang telah meluangkan banyak waktu untuk memberikan bimbingan, semangat, motivasi dan saran untuk menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kesehatan, menyayangi ibu dan keluarga. Aamiin
3. Erika Indah Safitri, M.Farm., selaku pembimbing kedua yang telah meluangkan banyak waktunya untuk memberikan bimbingan, masukan, saran dan semangatnya untuk menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan ibu kesehatan dan memudahkan untuk segala hal yang Ibu kerjakan. Aamiin
4. Ririn Lispita Wulandari M.Si.Med., Apt., selaku dosen penguji pertama yang telah banyak memberikan masukan dan saran demi perbaikan dan

sempurnanya penyusunan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kesehatan untuk ibu dan keluarga. Amiin.

5. Dewi Andini Kunti Mulangsri, M.Farm., Apt., selaku dosen penguji kedua yang telah banyak memberikan masukan dan saran demi perbaikan dan sempurnanya penyusunan skripsi ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kesehatan dan kemudahan kepada ibu. Amiin.
6. Kiki Damayanti, M.Farm., Apt., sebagai salah satu dosen yang menginspirasi dan mendidik saya dengan sabar, semoga Allah SWT senantiasa memberikan kemudahan kepada ibu. Amiin
7. Seluruh Staff Fakultas Farmasi dan juga Staff Laboratorium Kimia analisis, laboratorium Farmakognosi dan Mikrobiologi, serta Laboratorium Farmakologi atas bantuannya selama penelitian dan juga selama menjadi mahasiswa.
8. Nurazisa, Kharista Khasanyzulaikhah, Danang Yogo Wijaya selaku tim Alfa atas kerjasama, optimisme, saling membantu dan menyemangati untuk menyelesaikan skripsi ini. Semoga kita semua diberikan kemudahan dalam setiap langkah kita
9. Bagas Herbayu A, Windy Marlina, Fasa Riki P, Fian Sancoko P, Iqbal M N Ardhi Priyo W dan M. Rifki Pratama yang sudah menjadi teman, penyemangat dan berjuang bersama di S1 Farmasi Unwahas. Semoga senantiasa kalian dipermudah jalanya oleh Allah SWT.

10. Salsa Berliana Az'zahra sebagai penyemangat dan selalu menemani dihari-hari penelitian saya. Semoga senantiasa diberi kemudahan oleh Alloh SWT disetiap langkahnya.

Semarang, 06 Maret 2020



Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
INTISARI.....	ii
<i>ABSTRACT</i>	iii
PENGESAHAN SKRIPSI	iv
SURAT PERNYATAAN	v
PERSEMBAHAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI.....	x

DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	3
D. Manfaat Penelitian	3
E. Tinjauan Pustaka	3
1. Jerawat.....	4
2. Bakteri <i>Propionibacterium acnes</i>	4
3. Herba Alfalfa	5
4. Flavonoid	8
F. Landasan Teori.....	9
G. Hipotesis.....	11
BAB II. METODE PENELITIAN	12
A. Jenis dan Variabel Penelitian	12
B. Bahan dan Alat yang Digunakan.....	12
1. Bahan.....	12
2. Alat.....	13
3. Hewan Uji.....	13
a. Perhitungan hewan uji dan preparasi	14
b. Sampel Penelitian	15
C. Jalannya Penelitian	15
1. Determinasi Tanaman	15
2. Pengumpulan Bahan.....	15
3. Pembuatan Simplisia Herba Alfalfa.....	16
4. Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Alfalfa.....	16
5. Uji Aktivitas <i>Antiacne</i> Ekstrak Etanol Herba Alfalfa pada Kelinci.....	18
a. Pembuatan Larutan Uji	18
b. Pembuatan Suspensi Bakteri	19
c. Penentuan Aktivitas <i>Antiacne</i> EEHA	20
6. Uji Penetapan Kadar Flavonoid EEHA.....	22
a. Pembuatan Larutan Induk Kalium Asetat 1 M.....	22
b. Pembuatan Larutan Induk $AlCl_3$ $AlCl_3$	22
c. Pembuatan larutan induk kuersetin 2500ppm	22
d. Pembuatan Seri Konsentrasi Kuersetin	22
1) Konsentrasi 2 ppm.....	22
2) Konsentrasi 4 ppm.....	23

3) Konsentrasi 6 ppm.....	23
4) Konsentrasi 8 ppm.....	23
5) Konsentrasi 10 ppm.....	23
6) Konsentrasi 12 ppm.....	23
e. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal	23
f. Penentuan <i>operating time</i> (OT)	24
g. Penetapan kurva baku kuersetin Seri 2, 4, 6, 8, 10,12 ppm.....	24
h. Pembuatan Larutan Induk EEHA	24
i. Penentuan Kadar Flavonoid Total EEHA	25
D. Analisis Data	25
BAB III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN 27	
A. Determinasi Tanaman	27
B. Pengumpulan Bahan & Penyiapan Simplisia	27
C. Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Alfalfa	28
D. Uji Kandungan Flavonoid Total	29
BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan.....	36
B. Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN.....	41

DAFTAR TABEL

Tabel I. Penentuan kadar flavonoid total (EEHA).....	31
--	----

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Tampilan Mikroskopis <i>Propionibacterium acnes</i>	5
Gambar 2. Tanaman Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L); bunga alfalfa (a), tanaman alfalfa (b)	6
Gambar 3. Struktur Kimia Flavonoid golongan aglikon	9
Gambar 4. Lokasi bagian punggung kelinci diberi perlakuan	14
Gambar 5. Skema ekstraksi herba alfalfa dengan metode maserasi	18
Gambar 6. Skema uji aktivitas EEHA.....	21
Gambar 7. Berat serbuk simplisia herba alfalfa (7a); dan susut pengeringan (7b)	28
Gambar 8. Ekstrak etanol herba alfalfa (Dokumen Pribadi).....	
Gambar 9. Kurva baku kuersetin	30
Gambar 10. (a) Permukaan Kulit Kelinci Normal (sebelum diinduksi),	

(b)Udem dan kemerahan setelah suspense <i>P. Acne</i> (0,2ml),	
(c) timbulnya jerawat 24 jam setelah diinduksi	32
Gambar 11. Grafik penurunan diameter eritema kelinci	34

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Determinasi Alfalfa	42
Lampiran 2. Etical Clearance	45
Lampiran 3. Sertifikat <i>P. Acnes</i>	46
Lampiran 4. Perhitungan Rendemen simplisis & ekstrak	47
Lampiran 5. Hasil Spektrofotometri EEHA.....	48
Lampiran 6. Uji aktivitas <i>antiacne</i> EEHA pada kelinci	53
Lampiran 7. Dokumentasi.....	58

BAB I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Acne vulgaris merupakan suatu penyakit peradangan kronis dari folikel polisebasea yang ditandai adanya komedo, papul, kista, dan pustula. Prediksi *acne vulgaris* terutama pada daerah wajah, bahu, lengan atas, dada, dan punggung (Sukanto dkk., 2005).

P. acnes adalah bakteri Gram positif anaerob yang dapat menyebabkan inflamasi pada kulit (Brzuszkiewicz, dkk., 2011). *P. acnes* secara normal terdapat pada kulit yang menjadi faktor penyebab terbentuknya fase inflamasi pada jerawat (Strauss, dkk., 2007). Bakteri ini menyebabkan jerawat dengan menghasilkan

lipase yang memecah asam lemak bebas dari lipid pada kulit. Asam lemak ini dapat menimbulkan inflamasi jaringan ketika berhubungan dengan sistem imun dan mendukung terjadinya jerawat (Miratunnisa, dkk., 2015).

Acne dapat diterapi dengan menggunakan antibiotik, asam azelat dan retinoid, namun obat-obat ini memiliki efek samping dalam penggunaannya sebagai *antiacne* antara lain resistensi antibiotik, iritasi, kerusakan organ dan terjadinya imunohipersensitivitas (Dewi, 2015 cit Elvina, 2014). Peluang pengembangan budidaya tanaman obat-obatan di Indonesia masih sangat terbuka luas, sejalan dengan semakin berkembangnya industri jamu, obat herbal, fitofarmaka, dan kosmetika tradisional (Dewi, 2015 cit Prasetyono, 2012). Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai alternatif obat-obatan adalah Alfalfa.

Alfalfa merupakan tanaman yang berasal dari famili Fabaceae atau kacang-kacangan yang telah terbukti sebagai antiinflamasi dan antibakteri. Alfalfa juga mengandung alkaloid, saponin dan isoflavonoid (Newall., 1996). Penelitian yang dilakukan oleh Laksmonowati (2005), kandungan utama dari ekstrak etanolik daun dan batang alfalfa adalah flavonoid. Flavonoid diketahui mampu menghambat asam arakhidonat yang akan memproduksi prostaglandin sehingga berkhasiat sebagai antiinflamasi (Winarsi, 2005).

Hasil penelitian Chavan dkk. (2015) menyimpulkan bahwa ekstrak metanol daun herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) memiliki aktivitas antimikroba secara signifikan ditunjukkan dengan diameter daerah hambat (DDH) dan konsentrasi hambat minimum (KHM) yang dihasilkan terhadap bakteri *E. coli*, *P. aeruginosa*, dan *S. Aureus*. Artinya, ekstrak metanol daun alfalfa (*Medicago*

sativa L.) menunjukkan aktivitas antimikroba yang signifikan serta dapat digunakan sebagai pendukung penggunaan herba alfalfa sebagai agen antimikroba spektrum luas. Aktivitas antibakteri secara *in vitro* herba alfalfa juga telah diteliti oleh Doss dkk. (2011) pada 7 jenis bakteri, yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenase*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi* dan *Klebsiella pneumoniae*, dengan menunjukkan hasil sebagai agen antimikroba dengan memberikan diameter daya hambat (DDH) baik pada gram positif maupun negatif. Hasil uji kandungan senyawa kimia ekstrak etanol herba alfalfa menunjukkan bahwa mengandung flavonoid dan glikosida jantung (Doss, dkk., 2011)

Bo-ping dkk. (2010) menyebutkan dalam hasil penelitiannya bahwa ekstrak etanol alfalfa mengandung flavonoid. Madeswaran dkk. (2011) menyebutkan bahwa flavonoid dari golongan flavonol, flavon, dan isoflavon potensial sebagai antiinflamasi. Flavonoid juga mempunyai pengaruh terhadap metabolisme kolagen dengan beberapa cara antara lain berikatan silang dengan serat kolagen sehingga ikatan silang kolagen menjadi kuat dan mampu menghentikan kerusakan struktur kolagen yang diakibatkan adanya enzim dari sel darah putih selama peradangan.

Aktivitas *antiacne* secara *ex vivo* pada herba alfalfa belum pernah dilaporkan, tetapi pada salah satu penelitian aktivitas krim antijerawat kayu secang secara *ex vivo* terhadap *P. acnes* pada kelinci telah dilakukan (Sa'diah, dkk., 2013). Berdasarkan uraian tersebut, peneliti tertarik untuk membuktikan aktivitas *antiacne* ekstrak etanol herba alfalfa secara *ex vivo* pada kelinci yang

diinduksi *P. acnes* dan menentukan kadar flavonoid total yang terkandung dalam ekstrak etanol herba alfalfa.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang, perumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut :

- a. Apakah ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) memiliki aktivitas *antiacne* pada kelinci ?
- b. Berapa kadar flavonoid total ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

- a. Mengetahui adanya aktivitas *antiacne* ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) pada kelinci.
- b. Menentukan kadar flavonoid total ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.).

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan keilmuan dan pengetahuan mengenai kemampuan tanaman obat tradisional dari ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) sebagai *antiacne*, sehingga dapat dikembangkan oleh peneliti selanjutnya serta bermanfaat untuk masyarakat.

E. Tinjauan Pustaka

1. Jerawat

Jerawat merupakan penyakit inflamasi kronis dengan penyebab yang multifaktor yang sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor genetik, ras, musim, psikis, hormonal, infeksi bakteri, dan keaktifan dari kelenjar minyak. *Acne*

vulgaris merupakan suatu penyakit peradangan kronis dari folikel polisebasea yang ditandai adanya komedo, papul, kista, dan pustula. Prediksi *acne vulgaris* terutama pada daerah wajah, bahu, lengan atas, dada, dan punggung. *Acne vulgaris* diketahui mempunyai empat dasar patogenesis yaitu hiperpoliferasi folikel polisebaseous, produksi sebum berlebih, peradangan, dan infeksi *Propionibacterium acnes*. Kombinasi faktor-faktor tersebut mempengaruhi proses pembentukan jerawat (Sukanto dkk., 2005).

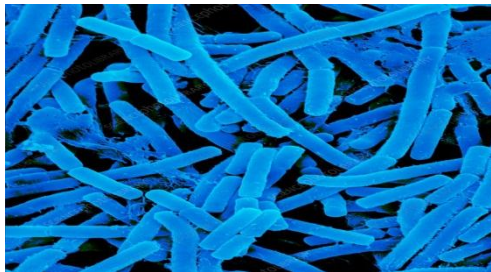
2. Bakteri *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes merupakan difteroid anaerob yang biasanya menetap pada kulit normal. Bakteri ini ikut serta dalam patogenesis jerawat dengan menghasilkan lipase, yang memecahkan asam lemak bebas dari lipid pada kulit. Asam lemak ini dapat menimbulkan radang jaringan dan ikut menyebabkan jerawat. (Khan, 2009).

Bakteri ini dapat bertahan hidup dengan memanfaatkan asam lemak dalam sebum yang dikeluarkan oleh kelenjar minyak di folikel. *P. acnes* mengubah asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak jenuh yang menyebabkan sebum menjadi padat. Jika produksi sebum bertambah, *P. acnes* juga akan bertambah banyak yang keluar dari kelenjar sebasea, karena bakteri *P. acnes* merupakan bakteri pemakan lemak. Pengobatan jerawat dilakukan dengan cara memperbaiki abnormalitas folikel, menurunkan produksi sebum, menurunkan jumlah koloni *Propionibacterium acnes* dan menurunkan inflamasi pada kulit (Harahap, 2000).

Klasifikasi *Propionibacterium acnes* adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Eukariotik*
Divisi : *Actinobacteria*
Kelas : *Actinobacteridae*
Bangsa : *Actinomycetales*
Suku : *Propionibacteriaceae*
Marga : *Propionibacterium*
Jenis : *Propionibacterium acnes*



Gambar 1. Tampilan mikroskopis *Propionibacterium acnes* (Science Photo Library, 2020)

3. Herba Alfalfa

a. Diskripsi dan Morfologi Herba Alfalfa

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Gambar 2.) termasuk dalam *family Fabaceae* (suku polong-polongan) yang merupakan satu jenis kacang-kacangan yang memiliki kandungan protein tinggi dan digunakan sebagai pakan ternak yang mempunyai peranan penting dalam penyediaan hijauan pakan murah dengan nilai gizi dan pencernaan tinggi. Nama alfalfa berasal dari bahasa Arab yang artinya bapak dari segala tanaman, bahkan disebut juga ”Ratu Hijauan (*The Queen of Forage Crops*)” (Lacefield dkk., 2011). Sebagai pakan ternak, alfalfa memiliki kandungan protein, vitamin, dan mineral yang tinggi (Sajimin, 2011).

Alfalfa (Gambar 2.) merupakan tanaman tahunan berupa herba berakar



dalam, bercabang dan membentuk rhizom. Alfalfa memiliki batang mendatar, menanjak sampai tegak, berkayu pada bagian dasar, cabang-cabang pada bagian dasar. Batang alfalfa memiliki tinggi sekitar 30-120 cm, satu tangkai berdaun tiga (trifoliat), panjang daun 5-15 mm dan berbulu pada permukaan bawah. Pada tangkai alfalfa memiliki daun berbulu. Alfalfas memiliki bunga berbentuk tandan yang rapat berisi sekitar 10-35 bunga serta mahkota dengan aneka ragam warna antara lain ungu, biru dan putih (Mannetje dan Jones, 2000)

a **b**
Gambar 2. Tanaman Alfalfa (*Medicago sativa* L.): bunga alfalfa (a), tanaman alfalfa (b)
(Sajimin, 2011).

b. Klasifikasi Alfalfa

Berdasarkan kedudukan alfalfa dalam tata nama (sistematika), klasifikasi tanaman alfalfa menurut USDA (2011) adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*
Subkingdom : *Tracheobionta*
Phylum : *Tracheophyta*
Subphylum : *Spermatophytina*
Super division : *Spermatophyta*
Division : *Magnoliophyta*
Super class : *Angiospermae*
Class : *Gymnospermae*
Subclass : *Dicotyledonae*
Order : *Fabales*

Family : *Fabaceae*
Genus : *Medicago*
Spesies : *Medicago sativa* L.

c. Kandungan Kimia Herba Alfalfa

Daun tanaman alfalfa banyak mengandung protein dan serat yang tinggi yang sangat cocok digunakan sebagai hijauan bagi ternak maupun sebagai suplemen. Kandungan unsur lain yaitu flavonoid terdiri apigenin, glikosida, luteolin dan adenosin yang berfungsi sebagai antiperadangan, antibodi, antiparasit dan antioksidan (Rahmawati dan Sitanggang, 2006). Alfalfa mengandung alkaloid, saponin dan isoflavonoid (Newall., 1996). Hasil uji kandungan senyawa kimia oleh Doss dkk. (2011) membuktikan bahwa alfalfa mengandung flavonoid, fitoestrogen dan kumarin. Ekstrak etanol herba alfalfa terkandung flavonoid dan glikosida jantung (Doss, dkk., 2011)

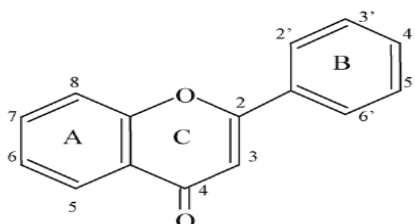
Penelitian yang dilakukan oleh Laksmonowati (2005), kandungan utama dari ekstrak etanolik daun dan batang alfalfa adalah flavonoid. Flavonoid diketahui mampu menghambat asam arakhidonat yang akan memproduksi prostaglandin sehingga berkhasiat sebagai antiinflamasi (Winarsi, 2005).

Bo-ping dkk. (2010) menyebutkan dalam hasil penelitiannya bahwa ekstrak etanol alfalfa terkandung flavonoid. Madeswaran dkk. (2011) menyebutkan bahwa flavonoid dari golongan flavonol, flavon, dan isoflavon potensial sebagai anti-inflamasi. Flavonoid juga mempunyai pengaruh terhadap metabolisme kolagen dengan beberapa cara antara lain dengan berikatan silang dengan serat kolagen sehingga ikatan silang kolagen menjadi kuat, dan mampu

menghentikan kerusakan struktur kolagen yang diakibatkan adanya enzim dari sel darah putih selama peradangan.

4. Senyawa Flavonoid

Senyawa flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai sistem pertahanan terhadap infeksi oleh mikroorganisme, sehingga tidak mengherankan apabila senyawa ini efektif sebagai senyawa antimikroba terhadap sejumlah mikroorganisma. Flavonoid merupakan salah satu senyawa polifenol yang memiliki bermacam-macam efek antara lain efek antioksidan, antitumor, antiradang, antibakteri dan antivirus (Parubak, 2013). Flavonoid adalah salah satu metabolit sekunder yang penting pada tumbuhan yang merupakan turunan dari 2-*phenyl-benzyl- γ -pyrone* dengan biosintesis menggunakan jalur fenil propanoid (Mierziak, dkk., 2014). Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai struktur kerangka (gambar 3.) terdiri 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, artinya kerangka karbonnya terdiri atas dua gugus C6 (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon (Tian-yang dkk., 2018). Flavonoid dibagi menjadi beberapa subkelompok berdasarkan substitusi karbon pada gugus aromatik sentral (C). Subkelompok tersebut adalah flavon, flavonols, flavanon, flavanol atau katekin, antosianin dan kalkon. Flavonoid berperan sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi dan antidiabetes (Panche dkk., 2016).



Gambar 3. Struktur Kimia Flavonoid (Mursyidi, 1990)

F. Landasan Teori

Senyawa flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai sistem pertahanan dan dalam responsnya terhadap infeksi oleh mikroorganisme, sehingga tidak mengherankan apabila senyawa ini efektif sebagai senyawa antimikroba terhadap sejumlah mikroorganisme. Flavonoid merupakan senyawa polar yang memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Flavonoid dapat tersari oleh pelarut polar seperti etanol, metanol dan etilasetat (Gafur, dkk., 2013 cit Rijke, 2005). Hasil uji kandungan senyawa kimia oleh Doss dkk. (2011) membuktikan bahwa alfalfa mengandung flavonoid, fitoestrogen, kumarin. Flavonoid merupakan salah satu senyawa polifenol yang memiliki berbagai macam efek antara lain efek antioksidan, antitumor, antiradang, antibakteri dan antivirus (Parubak, 2013). Susilowati dkk. (2014) membuktikan bahwa ekstrak etanol herba alfalfa mengandung kadar flavonoid total 8,13 %.

Madeswaran dkk. (2011) menyebutkan bahwa flavonoid dari subkelompok flavonol, flavon dan isoflavon potensial sebagai antiinflamasi. Flavonoid diketahui mampu menghambat asam arakhidonat yang akan memproduksi prostaglandin sehingga berkhasiat sebagai antiinflamasi (Winarsi, 2005). Flavonoid sebagai antiinflamasi bekerja dengan cara memproduksi pro inflamatori mediator menstimulasi sel yang berkaitan dengan inflamasi seperti limfosit, monosit, makrofag, dan sel matosit (Sangeetha, dkk., 2016).

Mekanisme kerja senyawa flavonoid diduga dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi. Adanya gugus hidroksi flavonoid akan membentuk kompleks dengan protein pada bakteri dan melisiskan membran bakteri tersebut (Cushnie dan Lamb, 2005).

Menurut Doss dkk. (2011), ekstrak etanol herba alfalfa menghasilkan diameter daerah hambat (DDH) terhadap 5 dari 7 bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif antara lain (*S. aureus*, *S. pyogens*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumuniae*). DDH terbesar dihasilkan pada *S.aureus* yaitu 11.6 mm. Kandungan senyawa kimia dalam ekstrak etanol herba alfalfa adalah glikosida jantung dan flavonoid.

Penelitian secara *ex vivo* anti jerawat telah dilakukan oleh Sa'diah dkk. (2013), yaitu efektivitas krim anti jerawat kayu secang terhadap *P.acnes* pada kelinci. Hasilnya, seluruh formula krim ekstrak secang berpotensi sebagai anti jerawat dengan persentase kesembuhan selama 15 hari yang berbeda bermakna dengan formula basis.

Klindamisin merupakan suatu antibiotik yang dapat bekerja sebagai bakteristatik maupun bakterisidal, tergantung pada konsentrasi obat, tempat infeksi dan organisme penyebab infeksi (Mulyani, dkk., 2017). Klindamisin digunakan untuk mengobati infeksi serius akibat bakteri anaerob atau bakteri aerob gram positif. Klindamisin bekerja dengan menghambat sintesis protein (Huda, dkk., 2019 cit Katzung, dkk., 2012) *P. acnes* merupakan bakteri gram positif (McDowell, dkk., 2013), sehingga klindamisin dapat dipilih sebagai kontrol positif pada percobaan.

G. Hipotesis

Ekstrak etanol herba alfalfa (*Medicago sativa* L.) memiliki aktivitas *antiacne* pada kelinci.

BAB II. METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Variabel Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan *pre and post test control group design*. Penelitian dilakukan dengan mengukur penurunan diameter eritema pada punggung kelinci yang diinduksi bakteri *P. acnes* dan setelah perlakuan pemberian EEHA selama 15 hari. Variabel penelitian adalah sebagai berikut :

1. Variabel bebas : Seri konsentrasi ekstrak etanol herba alfalfa
2. Variabel tergantung : Persentase penurunan diameter eritema
3. Variabel terkontrol :

Kepadatan inokulum bakteri (tingkat pengenceran suspensi bakteri), lingkungan dan media pertumbuhan bakteri, jenis bakteri, usia kultur bakteri, jenis dan umur kelinci, ukuran luas permukaan kulit punggung kelinci, waktu dan jumlah pengolesan EEHA

B. Bahan dan Alat yang Digunakan

1. Bahan

- a. Bahan yang digunakan dalam preparasi ekstrak etanol herba alfalfa dalam penelitian ini yaitu herba alfalfa yang diperoleh dari daerah Tlatar, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi herba alfalfa yaitu etanol 70% (teknis)\
- b. Bahan yang digunakan dalam penetapan kadar flavonoid total adalah kuersetin (Sigma), pereaksi $AlCl_3$ 10% (Merck), CH_3COOK , *aqua pro injection*, etanol p.a (Merck).
- c. Bahan yang digunakan untuk biakan dan suspensi bakteri adalah *Propionibacterium acnes* diperoleh dari Universitas Sumatera Utara, media *Muller Hinton Agar* (MHA), media *Brain Heart Infusion* (BHI), NaCl fisiologis 0,9%.
- d. Bahan yang digunakan untuk pembuatan larutan Mc. Farland adalah H_2SO_4 1% (Merck), $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1%, *Aquadest pro injection*.
- e. Bahan yang digunakan untuk uji *ex vivo* adalah suspensi bakteri *P.acnes*, NaCl fisiologis 0,9 %, EEHA 50%, 60%, 70%.

2. Alat

- a. Alat yang digunakan dalam preparasi ekstrak etanol herba alfalfa dalam penelitian ini adalah seperangkat alat ekstraksi yang terdiri dari seperangkat alat gelas (Iwaki Pyrex), toples dan pengaduk, desikator, alat penyerbuk dan ayakan, timbangan elektrik (Ohaus), *moisture balance* (Ohaus), vakum dan corong *buchner*, oven, penguap vakum putar (Heidolph).
- b. Alat yang digunakan untuk penetapan kadar flavonoid total adalah seperangkat alat gelas (Iwaki Pyrex), Spektrofotometer UV-Vis 1800 (Shimadzu), *magnetic stirer* dan mikropipet
- c. Alat yang digunakan dalam penentuan aktivitas *antiacne* adalah *Laminar Air Flow* (Suzhou Antai Air Tech Co_LTD type HF 100), inkubator (Binder), petri, bunsen, ose, *sentrifuse*, flakon, spuit (10 ml, 5ml dan 1 ml), kapas alkohol, gunting dan silet cukur.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah kelinci jantan jenis *New Zealand* yang diperoleh dari peternakan di daerah Kaliwungu, Kabupaten Kendal, Jawa Tengah.

a. Perhitungan Hewan Uji dan Preparasi

Perhitungan hewan uji berdasarkan rumus Federer (1977) : $(t-1)(n-1) \geq 15$, t merupakan kelompok perlakuan, sedangkan n merupakan jumlah sampel tiap kelompok. Banyaknya sampel pada tiap kelompok dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

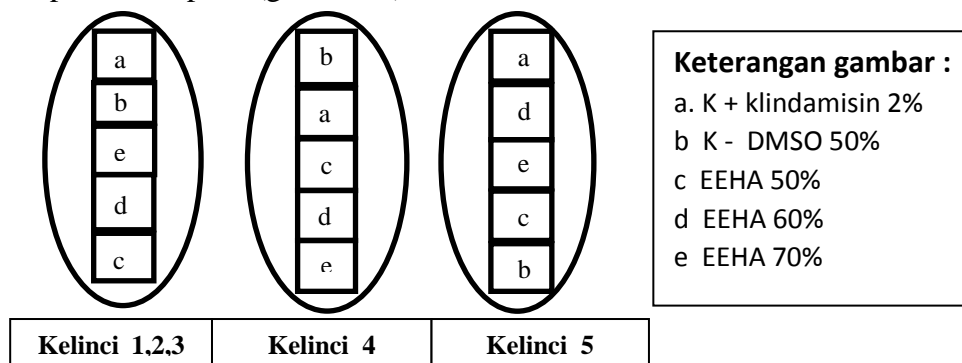
$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 15 + 4$$

$$4n \geq 19$$

Berdasarkan perhitungan rumus, dalam satu kelompok uji digunakan minimal 5 ekor kelinci. Punggung kelinci dibagi menjadi 5 area dengan luas masing-masing area (3x3) cm². Pembagian lokasi pada punggung kelinci dapat dilihat pada (gambar 4.)



Gambar 4. Lokasi bagian kulit punggung kelinci diberi perlakuan.

b. Sampel Penelitian

1. Kriteria Inklusi

- a) Kelinci jantan
- b) Berat badan : 2 – 3 kg
- c) Umur : 6 – 12 bulan
- d) Kelinci dalam keadaan sehat, tidak ada kelainan atau tidak sedang menderita penyakit kulit

2. Kriteria Eksklusi

Kelinci sakit selama waktu aklimatisasi

3. *Drop Out*

Kelinci mati selama penelitian

C. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman alfalfa dilakukan di laboratorium Ekologi dan Biosistemika, Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro Semarang. Dilakukan dengan mencocokkan bagian tanaman dari akar, batang, daun, bunga dan biji herba alfalfa dengan kunci determinasi tanaman dalam buku Flora of Java karangan (Becker, dan Brink., 1968)

2. Pengumpulan Bahan

Tanaman alfalfa yang digunakan pada penelitian ini berupa daun, batang, bunga dan biji. Herba alfalfa diambil daerah Sumber Tlatar, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah. Herba alfalfa dipanen pada siang hari dengan kriteria umur yang dipanen adalah 3-6 bulan. Usia tersebut dipakai karena kandungan senyawa kimia didalam herba alfalfa cukup optimal.

3. Pembuatan Simplisia Herba Alfalfa

Herba alfalfa disortasi basah untuk menghilangkan kotoran dan bahan-bahan asing lainnya. Herba Alfalfa dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40⁰C sampai kering. Simplisia yang sudah kering, daunnya akan mudah hancur bila diremas dengan tangan serta batang akan mudah dipatahkan dengan tangan. Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak dalam penyimpanan yang lama, karena dengan

adanya air akan mengakibatkan simplisia mudah ditumbuhi jamur (Harborne, 1987).

Simplisia yang sudah kering disortasi kering dan dihaluskan dengan menggunakan alat penyerbuk yang dilengkapi dengan pengayak, lalu diukur kadar airnya dengan alat *moisture content balance*. Persyaratan kadar air pada simplisia kering sebelum dilakukan proses penyarian yaitu kurang dari 10%. Setelah itu disimpan dalam wadah kering tertutup rapat dalam ruangan terlindung dari cahaya matahari supaya tidak terjadi kerusakan dekomposisi kandungan senyawanya (Depkes RI, 1986).

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Alfalfa

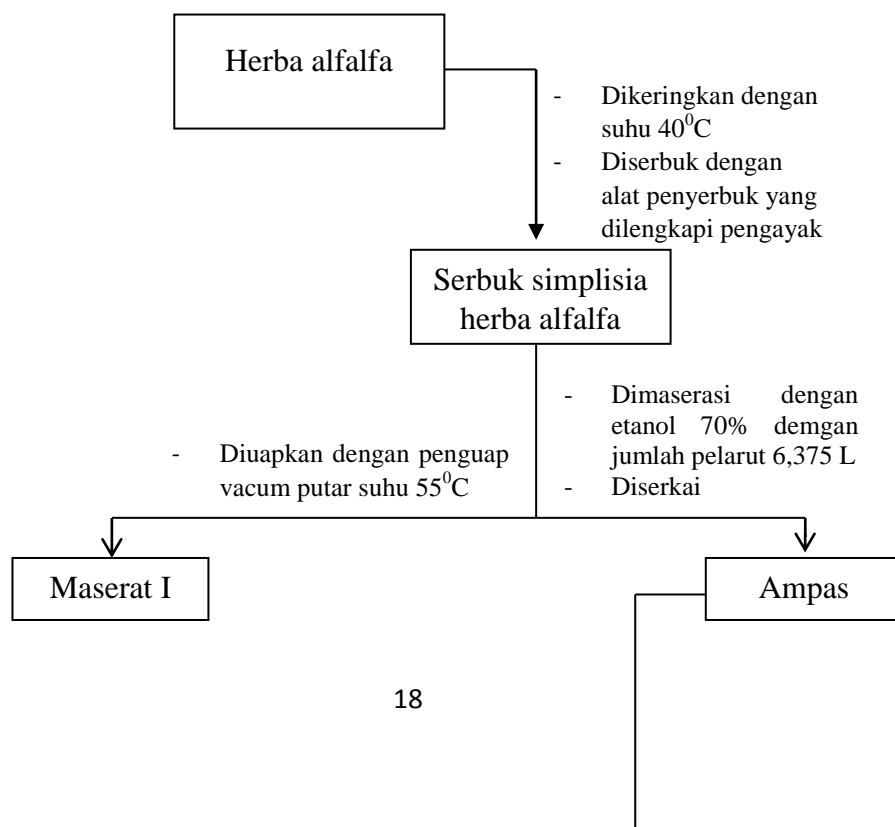
Pembuatan ekstrak etanol herba alfalfa dilakukan dengan cara metode maserasi dengan perbandingan bahan dan pelarut adalah 1:10. 850 gram serbuk simplisia herba alfalfa dengan cairan pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etanol 70% sebanyak 8,5 L. Proses pertama yang dilakukan adalah 850 gram serbuk simplisia herba alfalfa dimasukkan kedalam toples kaca ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak (75% dari pelarut total 8,5 L) yaitu 6,375 L dan campuran diaduk perlahan-lahan. Pengadukan dilakukan minimal 3 kali sehari dan prosesnya membutuhkan waktu 3 hari. Setelah 3 hari campuran tersebut disaring menggunakan corong *Buchner* dan diperoleh maserat I.

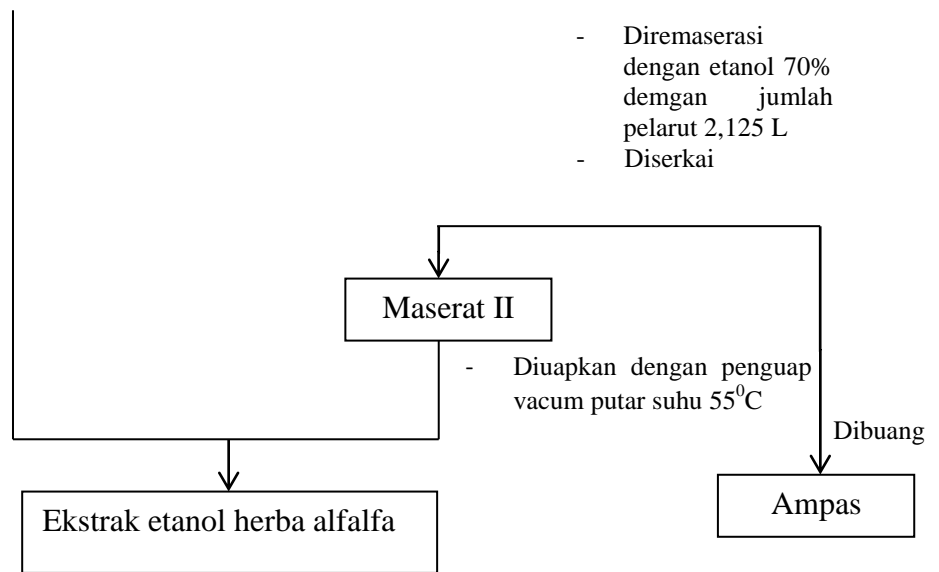
Proses remaserasi dilakukan dengan menambahkan sisa pelarut (25% dari pelarut total 8,5 L) yaitu 2,125 L kedalam ampas maserasi didalam toples, campuran diaduk perlahan dan proses ini dilakukan selama 2 hari. Setelah proses penyaringan diperoleh maserat II. Hasil maserat I dan II kemudian dicampurkan.

Maserat tersebut diuapkan terlebih dahulu selama 24 jam agar dapat dipisahkan antara filtrat dan endapan yang terjadi.

Maserat diuapkan menggunakan penguap vakum putar pada suhu 55°C untuk mendapatkan ekstrak kental herba alfalfa. Ekstrak kental tersebut ditimbang beratnya lalu dimasukkan kedalam wadah botol gelap bertujuan untuk mencegah reaksi fotolitik yang dapat menyebabkan kerusakan senyawa aktif (Depkes RI., 1986 ; Hanin dan Pratiwi, 2017). Ekstrak kental kemudian dihitung rendemennya dan disimpan dalam desikator. Skema pembuatan ekstrak dapat dilihat pada (Gambar 5.) Perhitungan rendemen ekstrak dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Randemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental yang diperoleh}}{\text{Berat serbuk bahan}} \times 100\%$$





Gambar 5. Skema ekstraksi herba alfalfa dengan metode maserasi

5. Uji Aktivitas *Antiacne* Ekstrak Etanol Herba Alfalfa pada Kelinci

a. Pembuatan Larutan Uji

Larutan stok uji berupa ekstrak etanol herba alfalfa dibuat dengan melarutkan senyawa uji dalam DMSO 50% yang dibuat dengan 5 mL DMSO 100% di ad kan dengan 10 mL *aquades p.i* dalam labu takar sampai dengan tanda batas hingga diperoleh konsentrasi DMSO 50% sebagai kontrol negatif. Klindamisin 2% sebagai kontrol positif dibuat dengan melarutkan serbuk klindamisin sebanyak 0,1 gram dengan 5 mL DMSO 50%. Seri pengenceran konsentrasi 70% dibuat dengan melarutkan 3,5 gram EEHA dengan 300 mcL DMSO 50%; konsentrasi 60% dibuat dengan 1700 mcL EEHA 70% dilarutkan dengan 300 mcl DMSO 50%; konsentrasi 50% dibuat dengan 1400 mcL EEHA 70% dilarutkan dengan 600 mcL DMSO 50% (Lampiran 6.).

b. Pembuatan Suspensi Bakteri

Koloni bakteri uji diremajakan dalam media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Biakan *P. anes* dalam media MHA ditumbuhkan pada media BHI (*Brain Heart Infusion*) dan diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Bakteri yang tumbuh dalam media BHI kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh ditambah dengan 10 mL NaCl 0,9% dan dihomogenkan, kemudian disentrifugasi kembali dengan kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Pencucian dilakukan sampai 3 kali hingga diperoleh bakteri murni dalam NaCl 0,9% tanpa ada media BHI (*Brain Heart Infusion*).

Endapan bakteri dibuat suspensi dalam larutan NaCl 0,9 % fisiologis dengan kekeruhan sesuai dengan standar kekeruhan *Mc. Farland* 10 dengan kerapatan bakteri 3×10^9 CFU/mL. *Mc. Farland* 10 dibuat dengan mencampurkan larutan asam sulfat 1% sebanyak 9,0 mL dan BaCl₂.2H₂O 1% sebanyak 1,0 mL (Sa'diah, dkk., 2013).

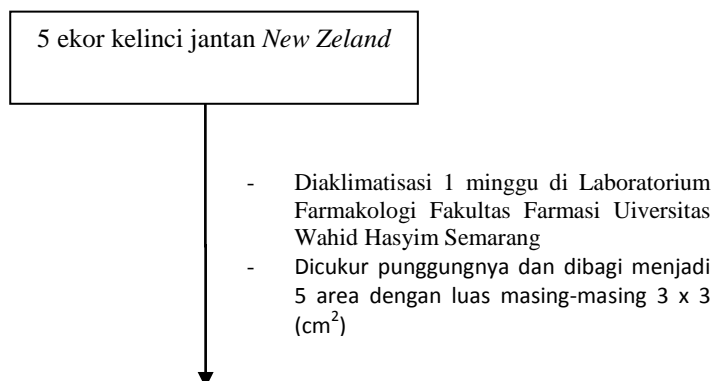
c. Penentuan Aktivitas *Antiacne* EEHA

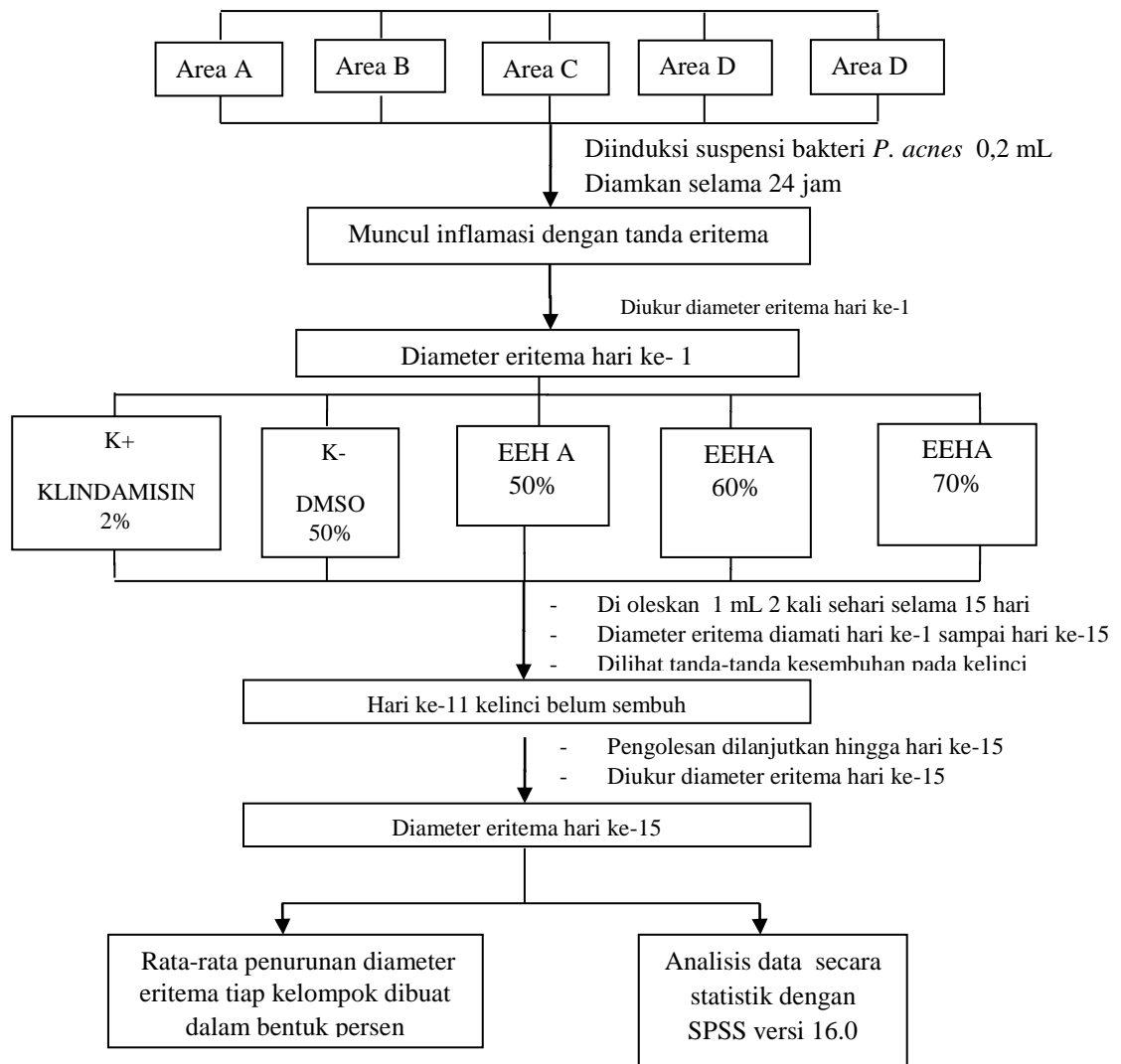
Hewan uji kelinci jantan dari peternakan kelinci daerah Kaliwungu sebanyak 5 ekor sesuai dengan kriteria inklusi diaklimatisasi selama 1 minggu di Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang. Apabila terdapat hewan coba yang sakit atau mati, maka akan dikeluarkan dari penelitian.

Kelinci sebanyak lima ekor diinduksi dengan suspensi bakteri *P.acnes* pada 5 titik lokasi pada punggung yang telah dicukur dengan luas masing-masing

(3 x 3) cm². Suspensi bakteri *P. acnes* diinduksikan dengan jalan disuntikkan secara intradermal sebanyak 0,2 mL. Hewan uji didiamkan selama 24 jam sampai timbul jerawat. Setelah jerawat muncul, kemudian dilakukan pengolesan pada masing-masing area pada punggung kelinci dengan larutan klindamisin 2%, DMSO 50%, EEHA (50%, 60%, 70%) sebanyak 1 mL setiap hari (2 kali pengolesan yaitu pagi dan malam) selama 15 hari. Parameter yang diamati adalah area inflamasi serta kemerahan pada area uji. Diameter eritema diamati dan diukur hari ke-1 dan hari ke-15. Pada hari ke-11 diameter eritema pada punggung kelinci diamati untuk mengetahui sudah atau belum kelinci mengalami kesembuhan. Tanda-tanda kesembuhan pada kelinci berupa kulit yang tidak kemerahan, tidak mengalami pembengkakan dan beberapa pada jerawat kelinci tidak terdapat nanah (Sa'diah, dkk., 2013).

Kemampuan *antiacne* EEHA dalam menurunkan diameter eritema pada kulit punggung kelinci yang telah diinduksi *P. acnes* dilakukan dengan mengukur diameter eritema hari ke-1 setelah induksi dan mengukur diameter eritema pada hari ke-15 setelah perlakuan. Penurunan diameter eritema dihitung dengan rumus yaitu, diameter eritema hari ke-1 setelah induksi dikurangi diameter eritema hari ke-15 setelah perlakuan. Penurunan diameter eritema dibuat dalam bentuk persen setiap kelompok perlakuan.





Gambar 6. Skema uji aktivitas EEHA

6. Uji Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Herba Alfalfa

a. Pembuatan Larutan Induk Kalium Asetat 1 M

Kalium asetat sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 5 mL etanol pada labu takar hingga tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 1 M (Puspitasari dan Wulandari, 2017).

b. Pembuatan Larutan Induk $AlCl_3$

AlCl_3 sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 5 mL etanol p.a pada labu takar hingga tanda batas lalu digojog hingga homogen (Puspitasari dan Wulandari, 2017).

c. Pembuatan larutan induk kuersetin (2500 ppm)

Larutan induk kuersetin 2500 ppm dibuat dengan menimbang kuersetin sebanyak 125 mg kemudian dilarutkan dengan etanol p.a hingga larut. Larutan kuersetin tersebut dimasukkan dalam labu takar 50 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas kemudian dilakukan pengenceran 100 kali sehingga kadarnya menjadi 25 ppm (Puspitasari dan Wulandari, 2017).

d. Pembuatan Seri Konsentrasi Kuersetin

Kuersetin dibuat seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm dalam 5 mL etanol p.a. (Puspitasari dan Wulandari, 2017).

1) Konsentrasi 2 ppm

Larutan induk kuersetin 25 ppm dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 400 μL , dimasukkan dalam labu takar 5 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan digojog hingga homogen.

2) Konsentrasi 4 ppm

Larutan induk kuersetin 25 ppm dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 800 μL , dimasukkan dalam labu takar 5 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan digojog hingga homogen.

3) Konsentrasi 6 ppm

Larutan induk kuersetin 25 ppm dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 1200 μL , dimasukkan dalam labu takar 5 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan digojog hingga homogen.

4) Konsentrasi 8 ppm

Larutan induk kuersetin 25 ppm dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 1600 μL , dimasukkan dalam labu takar 5 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan digojog hingga homogen.

5) Konsentrasi 10 ppm

Larutan induk kuersetin 25 ppm dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 2000 μL , dimasukkan dalam labu takar 5 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan digojog hingga homogen.

6) Konsentrasi 12 ppm

Larutan induk kuersetin 25 ppm dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 2400 μL , dimasukkan dalam labu takar 5 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas. Larutan digojog hingga homogen.

e. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal

Pengukuran panjang gelombang maksimum dengan pembanding kuersetin dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebanyak 1000 μL dari salah satu seri konsentrasi yaitu 6 ppm ditambahkan AlCl_3 10 % sebanyak 200 μL dan CH_3COOK 1 M sebanyak 200 μL . Absorbansi dibaca pada spektrofotometer UV-Vis dari *range* 400-500 nm. Panjang gelombang maksimal diperoleh dengan melihat pada panjang gelombang mana yang menghasilkan serapan paling tinggi

f. Penentuan *operating time* (OT)

Pengukuran *operating time* dengan pembanding kuersetin dibaca menggunakan spektrofotometer UV-VIS. Sebanyak 1000 μL dari salah satu seri konsentrasi yaitu 6 ppm ditambahkan AlCl_3 10 % sebanyak 200 μL dan CH_3COOK 1 M sebanyak 200 μL . Absorbansi dibaca pada spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum.

g. Penetapan kurva baku kuersetin

Seri konsentrasi kuersetin (2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm) masing-masing dibuat sebanyak 1000 μL , ditambahkan AlCl_3 10 % sebanyak 200 μL dan 200 μL CH_3COOK 1 M. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum 429,5 nm dan *operating time* yang telah ditentukan yaitu 25 menit.

h. Pembuatan Larutan Induk Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (EEHA)

Ekstrak kental masing-masing ditimbang sebanyak 125 mg dimasukkan ke dalam *beker glass* 50 mL, dilarutkan dengan etanol p.a menggunakan bantuan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 300 rpm sampai terlarut sempurna, kemudian dimasukkan dalam labu takar 50 mL, ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas.

i. Pembacaan Absorbansi Flavonoid Total Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (EEHA)

Sampel ekstrak dipipet 1000 μL ditambahkan AlCl_3 10 % sebanyak 200 μL dan CH_3COOK 1 M sebanyak 200 μL . Absorbansi dibaca pada spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum yaitu 429,5 nm dan *operating time* yang telah diperoleh yaitu 25 menit. Perlakuan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

D. Analisis Data

1. Aktivitas *Antiacne* Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (EEHA)

Data penurunan diameter eritema dianalisis secara statistik menggunakan *software SPSS 16.0* diuji homogenitas varian datanya menggunakan *Levene test* dan normalitasnya menggunakan uji *Shapiro-wilk*. Jika varian data homogen dan terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji Anova satu jalan dan dilanjutkan dengan uji *Pos Hoc Tukey*. Ekstrak etanol herba alfalfa dikatakan mempunyai aktivitas *antiacne* jika hasil penurunan diameter eritema pada perlakuan dengan EEHA lebih besar secara signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif (Purnomo, 2016).

2. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (EEHA)

Data yang diperoleh berupa nilai absorbansi dari ekstrak etanol (70%) herba alfalfa dihitung kadar flavonoid total dengan memplotkan nilai absorbansi sampel ekstrak ke dalam persamaan kurva baku kuersetin.

Kadar flavonoid total dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar flavonoid total} = \frac{C \times V \times fp}{g}$$

Keterangan: C = Kadar Flavonoid (nilai X)

V = Volume ekstrak yang digunakan (ml)

Fp = Faktor Pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

BAB III. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dilakukan untuk mengetahui identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian, menghindari kekeliruan penggunaan bahan baku,

HALAMAN INI TIDAK TERSEDIA

BAB III

DAPAT DIAKSES MELALUI

UPT PERPUSTAKAAN UNWAHAS

BAB IV. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Ekstrak etanol herba alfalfa konsentrasi 50%, 60% dan 70% tidak memiliki aktivitas *antiacne*.
2. EEHA mempunyai kadar flavonoid total 2,323 mg QE/gram. Artinya, dalam satu gram ekstrak mengandung sebanyak 2,323 mg flavonoid.

B. Saran

1. Perlu dilakukan peningkatan konsentrasi EEHA hingga diperoleh aktivitas *antiacne* yang lebih optimal.
2. Perlu dilakukan identifikasi jenis senyawa golongan flavonoid dengan menggunakan kromatografi kolom yang dilanjutkan dengan elusidasi struktur dalam herba alfalfa dari jenis penyarian pelarut non polar, semi polar maupun polar.
3. DMSO sebagai pelarut sampel uji perlu digantikan dengan pelarut yang baru, agar dapat dipastikan ada atau tidaknya aktivitas *antiacne* berasal dari kandungan flavonoidnya dan bukan dikarenakan ketidakmampuan sampel untuk berpenetrasi ke tempat infeksi *P. acnes* dan menghasilkan efek *antiacne*

DAFTAR PUSTAKA

- Afriyanti, R.N., 2015, *Acne Vulgaris* Pada Remaja, Medical Jurnal of Lampung University,4(6), 102– 109.
- Aida, A.N., Enny, S., dan Misnawi., 2016,*Uji In Vitro Efek Ekstrak Etanol Biji Kakao (Theobroma cacao) sebagai Antibakteri terhadap Propionibacterium acnes*,*e-Jurnal Pustaka Kesehatan*, 4(1) : 127-131.
- Aminah., Tomayahu, N., Abidin, Z., 2017, Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana Mill.*) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis, Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia, Makasar, *Jurnal Fitofarmaka Indonesia Vol. 4 No.2*
- Angraini, L., Rostamailis., dan Minerva, P., 2015, Pengaruh Pemanfaatan Lulur Pepaya (*Carica papaya L*) Terhadap Pencerahan Kulit Badan, Fakultas Teknik Jurusan Kesejahteraan Keluarga Program Studi Pendidikan Tata Rias Dan Kecantikan Universitas Negeri Padang, Padang Sumatera Barat, hal.7
- Backer, C.A., dan Brink, B.V.D., 1963, *Flora of Java* Vol.1, Noordhoff Groningen, Netherlands, hal. 1-7
- Bo-ping, W., Yong-mei, Z., Zhi-Zhong, C., dan Yong-zhil, T., 2010, *Study on Extraction of Flavonoids in Alfalfa Assisted With Ultrasonic Wave*, *Acta Agrestia Sinica*, 6.
- Bruggemann, H., 2009, *Skin : Acne and Propionibacterium Acnes Genomics, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, DIO 10, hal. 3216-3223
- Brzuszkiewicz, E., January, W., Antje, W., Andrea, T., Jennifer, H., Hans, B. L., Mogens, K., Gerhard, G., Rolf, D., Hans, J. M., Thomas, F. M., dan Holger, B., 2011, Comparative Genomics and Transcriptomics of *Propionibacterium acnes*,*Plos One*, 6(6), 1-13
- Chavan, S.S., Jadhav, R.S., Khemar, K.S., dan Tambe, V.B., 2015, Evaluation of Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of *Medicago sativa* Leaves, *International Juornal of Current Research and Academic Review*, Volume 3 Number 5, 308 – 313.
- Cuppett, S., Schrepf, M., dan Hall, C., 1954, Natural Antioxidant – Are They Reality, dalam Foreidoon Sahidi: *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effect and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illionis: 12-24
- Cushnie, T. P dan Lamb, A. J., 2005, Antimicrobial Activity of Flavonoids,*International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 343-356.
- Depkes RI., 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 2, 5, 10-11, 80

- Dewi, D. N. S., 2015 Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Batang Sereh (*Cymbopogon citratus*) terhadap *Propionibacterium acnes* Secara *In vitro*, Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Jawa Timur., 1-54
- Doss, A., Parivuguna, V., Vijayasanthi, M dan Sruthi Surendran., 2011, Antibacterial Evaluation and Phytochemical Analysis of *Medicago sativa* L. Against Some Microbial Pathogens, *Indian Journal of Science and Technology*, Vol. 4 No. 5, hal. 550-552
- Federer, W. T., 1997, Experimental Design Theory and Application, Third Edition, Oxford and IBH Publishing Co, New Delhi Bombay Calcuta
- Gafur, M.A., Isa, I., dan Bialangi, N., 2013, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Daun Jamblang (*Syzygium cumini*), Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Negeri Gorontalo, Gorontalo., 1-11
- Gandjar, I.G., dan Rohman, A., 2016, Kimia Farmasi Analisis, Pustaka Pelajar, Yogyakarta
- Hanin, N.N.F., Pratiwi, R., 2017, Kandungan Fenolik, Flavonoid dan Antioksidan Ekstrak dan Daun Paku Laut (*Acrostichum aureum* L.) Fertil dan Steril, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology.*, Vol.2, 51-56
- Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Edisi kedua ITB, Bandung., Halaman 5; 234.
- Harahap, M., 2000, *Ilmu Penyakit Kulit*, Hipokrates, Jakarta.
- Huda, C., Putri, A.M., dan Sari, D.W., 2019, Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi dari Maserat *Zibenthinus folium* Terhadap *Escherichia coli*, Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Karya Putra Bangsa, Tulungagung, Jawa Timur, 7-14
- Khan, Z.Z., Assi, M., dan Moore, T.A., 2009, *Recurrent Epidural Abscess Caused by Propionibacterium acnes*, *Khansas Journal of Medicine.*, Hal. 92-95
- Kusmita L., Puspitaningrum I. dan Setyani W., 2014, *Uji Efek Antiinflamasi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Alfalfa (Medicago sativa) pada Tikus Putih Jantan yang Diinduksi Karagenin*, *Proseding, Seminar Nasional "Perkembangan Terbaru Pemanfaatan Herbal sebagai Agen Kemopreventif pada Terapi Kanker"*, Universitas Wahid Hasyim, Semarang
- Lacefield, G.D., J.C. Henning., M. Rasnake dan M. collins., 2011, *Alfalfa the Queen of Forage Crops, Cooperative Extention Service*, University Kentucky, <http://www.ca.uky.edu> diakses tanggal.
- Laksmowati, E., 2005, Uji Efek Antidiabetik Ekstrak Etanolik Daun dan Batang Alfalfa (*Medicago sativa* L.) pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang

Dibebani Glukosa dan Identifikasi Senyawa Aktifnya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

- Levinson, W., 2004, *Medical Microbiology & Immunology, Examination & Board review*, 8th edition, McGraw-Hill, New York.
- Madeswaran, A., Umamaheswari, M., Asokkumar, K., Sivashanmugam, T., Subhadradevi, V., Jagannath, P., 2011, Discovery of Potential Cyclooxygenase Inhibitors Using in Silico Docking Studies, *Bangladesh J.Pharmacol.*, 7, 21–27.
- Mannetje, L., dan R.M. Jones., 2000. Sumber Daya Nabati Asia Tenggara. PT Balai Pustaka. Bogor
- McDowell, A., Sheila P., Yoshiobu E., Peter L., dan Anne E, 2013, Propionibacterium acnes in Human Health and Disease, *BioMed Research International.*, Hal. 1-3.
- Mierziak, J., Kostyn, K., danKulma, A., 2014, Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment, *Mol. BaselSwitz*,19,16240–16265.
- Miratunnisa, Mulqie, L., dan Hajar, S., 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Kentang (*Solanum tuberosum* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*. Fakultas Farmasi Unisba, Bandung
- Mulyani, Y.W.T., Dadan, H., Isbiyantoro., dan Yeny, F., 2017, Ekstrak Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L) Merr) sebagai Antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*,*Jurnal Farmasi Lampung.*, 6 (2), 46-54.
- Mursyidi, A., 1990, Analisis Metabolit Sekunder, editor Achmad Mursyidi, Proyek Pengembangan Pusat Fasilitas Bersama Antar Universitas (Bank Dunia XVII)-PAU Bioteknologi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 172.
- Newall, A.P., 1996, *Herbal Medicines*, The Pharmaceutical Press, London, 23-24.
- Panche, A.N., Diwan, A.D., dan Chandra, S.R., 2016, Flavonoids: an overview, *Journal of Nutritional Science.*, 5,47.
- Parubak, A. S., 2013, Senyawa flavonoid yang bersifat antibakteri dari *Akway* (*Drimys beccariana* Gibbs), Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Papua, Papua,34-37
- Pleczar, M.J., dan Chan, E.C.S.,1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, UI Press, Jakarta., 997
- Puspitasari, A.D., dan Wulandari, R.L., 2017, Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kersen *Muntingia calabura*, Universitas Wahid Hasyim Semarang, Semarang. *Jurnal Pharmascience*, Vol. 04, No. 02, 167-175

- Rahmayanti, E., dan M. Sitanggang., 2006, Taklukan Penyakit dengan Klorofil Alfalfa, Agromedia, Jakarta.
- Sajimin, 2011, *Medicago sativa* L. (Alfafa) Sebagai Tanaman Pakan Ternak Harapan Di Indonesia, Balai Penelitian Ternak, WARTAZOA, Vol. 21 No. 2, 91-98
- Sangeetha, S.K., Umamaheswari, S., Reddy, M., Kalkura, N.S., 2016, *Flavonoids Therapeutic Potential of Natural of Pharmacological Agnts*, Departemen of Pharmacology, Faculty of Pharmacy Sri Ramachandra University, Porur, Chennai, Tamilnadu, India, International Journal of Pharmaceutical Science and Research., Vol. 7 (10), 3924-3930
- Sa'diah, S., Darusman, L.K., Triwahyuni, W., dan Batubara, I., 2013, Efektivitas Krim Anti Jerawat Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan*) Terhadap *Propionibacterium acnes* pada Kulit Kelinci, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, Vol.11 No.2, 175-181
- Science Photo Library (SPL), 2020 *Propionibacterium acnes*, Harrow Road, United Kingdom, Data diperoleh melalui situs internet <https://www.sciencephoto.com/media/798632/view/propionibacterium-acnes-prokaryote-sem>, diunduh pada tanggal 2 maret 2020
- Sukanto, H., Martodihardjo, S., dan Zulkarnain I., 2005, *Ilmu Penyakit Kulit Ed.3*. Surabaya. RSUD Dokter Soetomo, Surabaya., 35
- Susilowati, S., Nuria, M.C., dan Budiarti., A., 2014, Identifikasi Kandungan Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Herba Alfalfa (*Medicago Sativa* L.), *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 9 (2), 7, 738-741.
- Strauss, J. S., Krowchuk, D. P., Leyden, J. J., Lucky, A. W., Shalita, A. R., dan Siegfried AC., 2007, Guidelines of Care for *Acne vulgaris* Management, *Journal of American Academy of Dermatology*, 56, 651-63.
- Tian-yang., Wang., Qing Li., Kai-shun Bi., 2018, Bioactive flavonoids In Medicinal Plants: Structure, Activity And Biological Fateasian, *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 13, 12–23
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur G.& Kaur H., 2011, Phytochemical Screening And Extraction: A Review, *International Pharmaceutica Scientia*, 1, 1,98-106.
- USDA., 2011, *Germplasm Resources Information Network (GRIN)*, United State Department of Agriculture, Agriculture Research Service, Bellsville Area.
- Winarsi, H., 2005, *Isoflavon*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 50,81, 106