

## Antibacterial Activity of Ethyl Asetate Fraction of *Centella asiatica* Against Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Fitri Naziliny<sup>1</sup>, Lina Permatasari<sup>2</sup>, Nurmi Hasbi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

<sup>2</sup>Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

<sup>3</sup>Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

### Article History

Received : July 26<sup>th</sup>, 2024

Revised : August 10<sup>th</sup>, 2024

Accepted : August 24<sup>th</sup>, 2024

\*Corresponding Author:

**Lina Permatasari**, Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Mataram, Nusa Tenggara Barat, Indonesia;

Email:

[Lina.permatasari09@gmail.com](mailto:Lina.permatasari09@gmail.com)

**Abstract:** *Pseudomonas aeruginosa* is one of the major worldwide medical conditions causing nosocomial contaminations with high mortality and grimness. *P. aeruginosa* infection treatment, on the other hand, has become more difficult due to antibiotic resistance. Therefore, new antibacterial agents are needed that can be an option in controlling and managing cases of bacterial infections. Plants that could potentially become a new antimicrobial agent is pegagan herb (*Centella asiatica*). This study aims to determine the antibacterial activity of ethyl acetate fraction of pegagan herb against clinical isolates of *P. aeruginosa* and its phytochemical profile. Pegagan herb powder was extracted with 96% ethanol, then fractionated using liquid-liquid extraction method with n-hexane, chloroform and ethyl acetate solvents. Ethyl acetate fraction of pegagan herb with 3 treatment groups of 5,000 ppm, 7,500 ppm, and 10,000 ppm were tested for antibacterial activity using disc diffusion method. The positive and negative control groups used *Colistin* and DMSO 10%. The results showed that all concentrations produced different inhibition zones against the growth of *P. aeruginosa*. Based on the mean diameter of inhibition, the concentration series of 7,500 ppm showed the most effective results with a mean of 2.69 mm compared to the other concentrations. Ethyl acetate fraction of pegagan herb contains flavonoid, phenolic and tannin compounds. Ethyl acetate fraction of pegagan herb can inhibit the growth of clinical isolates of *P. aeruginosa* in the weak category with inhibition zone diameter <5 mm.

**Keywords:** Antibacterial, *Centella asiatica*, ethyl acetate, maceration, *Pseudomonas aeruginosa*.

### Pendahuluan

*Pseudomonas aeruginosa* salah satu permasalahan kesehatan dunia yang menjadi penyebab utama infeksi nosokomial yang mengakibatkan tingginya angka mortalitas dan morbiditas. Infeksi nosokomial atau yang disebut *Hospital-Acquired Infections (HAIs)* adalah kontaminasi yang diperoleh pasien selama menjalani terapi di klinik atau tempat pelayanan medis lainnya karena pemanfaatan peralatan medis (Goh *et al.*, 2023). Menurut data dari penelitian Goh *et al.*, (2023) mengenai prevalensi kasus infeksi nosokomial di beberapa negara di

Asia Tenggara, Indonesia memiliki persentase prevalensi kasus tertinggi mencapai 30,4 % kasus dan Singapura merupakan negara dengan prevalensi kasus terendah yakni 8,3%. Resistensi terhadap antibiotik membuat sulit mengobati penyakit menular yang disebabkan oleh *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* merupakan penyebab (*Hospital-Acquired Infections*) HAIs yang memiliki angka resistensi antibiotik tertinggi di Asia Tenggara yaitu, amoxicillin-clavulanic acid 66,7%, linezolid 73,7%, sulfamethoxazole-trimethoprim 95%, ceftriaxone 52,9% dan ticarcillin-clavulanate 67,8% (Suarisavitra *et al.*, 2022). Oleh karena itu, diperlukan penemuan dan

pengembangan agen antibakteri baru yang dapat menjadi pilihan dalam mengendalikan dan mengelola kasus infeksi bakteri. Menurut *World Health Organization* (WHO), tanaman obat adalah target potensial untuk masalah tersebut. Tanaman yang berpotensi menjadi agen antimikroba baru yaitu pegagan (*Centella asiatica*). Jayaprakash dan Nagarajan (*Diniz et al.*, 2023) menyatakan bahwa herba *C. asiatica* memiliki potensi sebagai antimikroba. *C. asiatica* mempunyai kandungan metabolit aktif sebagai antibakteri seperti flavonoid, tannin dan saponin (Azmi & Dwiyantri, 2020).

*C. asiatica* mengandung senyawa bioaktif yang bisa didapatkan dengan ekstraksi salah satunya menggunakan metode maserasi karena dapat menghasilkan banyak senyawa aktif. Banyaknya senyawa aktif yang terekstrak mengakibatkan perlunya dilakukan fraksinasi (Sondari *et al.*, 2016). Senyawa dapat dipisahkan berdasarkan polaritasnya menggunakan fraksinasi. Ada pelarut non-polar, semi-polar, dan polar. Pelarut semi-polar dan polar juga akan menarik senyawa non-polar, sedangkan pelarut non-polar akan menarik senyawa yang sesuai dengan polaritasnya (Aprilianti *et al.*, 2023). Etil Asetat n salah satu contoh pelarut yang bersifat semi-polar, pelarut ini dapat menarik senyawa seperti, alkaloid, flavonoid, saponin (Aprilianti *et al.*, 2023). Hasil kadar total fenol herba pegagan (*C. asiatica* (L) Urban) paling besar dihasilkan melalui fraksinasi dengan pelarut etil asetat dibandingkan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan dan air (Aprilianti *et al.*, 2023). Penelitian Sandy *et al.*, (2021) menyatakan fraksi etil asetat ekstraksi *C. asiatica* menunjukkan hasil aktivitas antibakteri tertinggi dibandingkan fraksinasi menggunakan pelarut etanol, n-heksan dan air, yakni sebesar 12,5%.

Jika dibandingkan dengan penelitian-penelitian terdahulu masih belum ada penelitian yang melakukan uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat *Centella asiatica* terhadap isolat klinis *P. aeruginosa*. Pada penelitian sebelumnya, Azmi & Dwiyantri, 2020 menggunakan ekstrak etanol *C. asiatica* (L.) Urban sebagai senyawa antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* dan *P. aeruginosa*, sama halnya dengan objek penelitian Sandy *et al.*, (2021) menggunakan bakteri *P. aeruginosa* namun senyawa yang diuji adalah ekstrak lidah buaya (*Aloe vera*). Sementara itu, Aprilianti *et al.*, 2023

menggunakan pelarut etil asetat untuk fraksinasi *C. asiatica* tetapi tidak menggunakan bakteri *P. aeruginosa*.

Mengacu pada permasalahan tersebut, peneliti tertarik melakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak herba pegagan (*C. asiatica*) dengan metode ekstraksi maserasi terhadap isolat klinis *P. aeruginosa*. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri fraksi etil asetat herba pegagan (*C. asiatica*) dengan metode maserasi terhadap isolat klinis *P. aeruginosa* dan mengetahui kandungan fitokimianya. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat untuk mengetahui efek fraksi etil asetat ekstrak herba pegagan (*C. asiatica*) sebagai penghambat pertumbuhan isolat klinis *P. aeruginosa* dan pengetahuan mengenai bahan alam sebagai antimikroba alami.

## Bahan dan Metode

### Desain penelitian

Desain penelitian adalah eksperimental laboratorium menggunakan rancangan *true experimental posttest only control group design*.

### Alat dan bahan

Ayakan mesh nomor 40, Timbangan/Neraca analitik, Rotary evaporator, Corong pisah statif, Toples kaca, Kertas saring *Whatmann* No.1, Kain mori, Tabung erlenmeyer, Labu evaporasi, *Waterbath*, Kapas lidi steril, Penggaris/jangka sorong, Autoklaf, Jarum ose, Cawan petri, Rak tabung reaksi, Kotak septis (enkas), Lampu spiritus, Mikropipet, Inkubator, Pinset tabung reaksi dan pipet tetes.

Bahan penelitian ini ialah simplisia kering herba pegagan dari Balai Besar Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Etanol 96%, Ekstrak herba pegagan, Aquades, N-heksan, Etil Asetat, air, HCl 2N, amoniak pekat, NaCl steril, Kontrol Positif (*Colistin*), Kontrol Negatif (DMSO 10%), isolat klinis *P. aeruginosa*, Agar *Meuller Hinton*, Agar *MacConkey*, Kertas cakram (*paper disk*), Pereaksi Dragendroff, Pereaksi Wagner, Pereaksi Mayer, Serbuk Magnesium (Mg), HCl pekat, Amil Alkohol, HCl 2N, FeCl<sub>3</sub>, Gelatin, Kloroform, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, CH<sub>3</sub>COOH 1%, larutan *McFarland* 0,5.

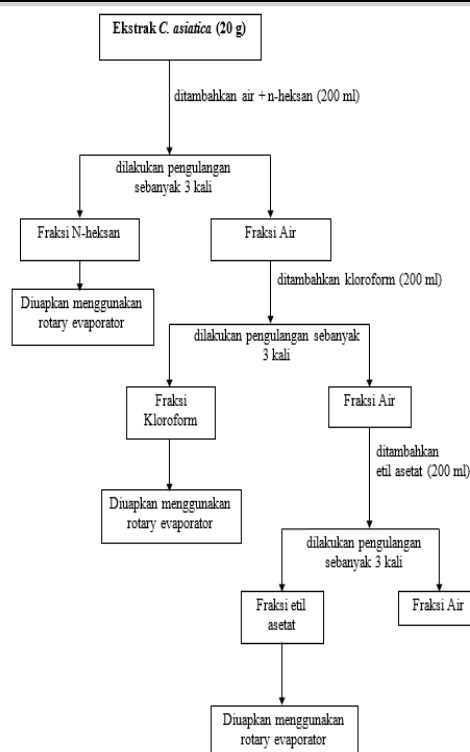
## Ekstraksi dan fraksinasi

Herba pegagan yang telah kering diblender hingga halus dan diayak menggunakan ayakan mesh nomor 40 sehingga terbentuk serbuk. Serbuk kemudian ditampung dan dilakukan proses ekstraksi. Serbuk simplisia 400 g selanjutnya diekstraksi menggunakan metode maserasi. Proses maserasi dengan cara perendaman menggunakan etanol 96% sebanyak 4000 ml dalam bejana tertutup selama 3x24 jam sambil diaduk dengan perbandingan (pelarut:simplisia) 1:10, kemudian disimpan dalam wadah tertutup pada suhu kamar di tempat tidak terkena matahari secara langsung. Residu yang dihasilkan ketika re-maserasi direndam menggunakan etanol 96% sebanyak 2000 ml. Hasil maserasi dan re-maserasi kemudian digabungkan lalu disaring menggunakan kain mori. Filtrat hasil saringan kemudian dimasukkan ke dalam Labu evaporator dan dilakukan evaporasi dengan suhu 40°C sampai terbentuk ekstrak pekat. Filtrat hasil evaporasi kemudian diuapkan di atas *waterbath* sampai menjadi ekstrak kental (Sandy *et al.*, 2021; Aprilianti *et al.*, 2023). Hasil ekstraksi kemudian ditimbang sebanyak 20 g lalu dilakukan fraksinasi. Metode fraksinasi adalah metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan, kloroform dan etil asetat dengan prosedur seperti pada **Gambar 1**.

## Uji Fitokimia

### Identifikasi senyawa alkaloid

Larutan fraksi etil asetat herba pegagan (*C. asiatica*) sebanyak 2 ml dimasukkan pada 3 tabung reaksi, selanjutnya HCl 2N sebanyak 2 mL diteteskan lalu didinginkan. Pereaksi Dragendrof sebanyak 2 tetes ditambahkan dalam tabung pertama. Sampel positif mengandung alkaloid jika terbentuk warna endapan jingga. Pereaksi Mayer sebanyak 2 tetes ditambahkan dalam tabung kedua, sampel positif mengandung alkaloid jika terbentuk endapan berwarna putih atau kuning maka. Pereaksi Wagner sebanyak 2 tetes ditambahkan pada tabung ketiga, sampel positif mengandung alkaloid apabila ada warna endapan coklat (Wientarsih *et al.*, 2013; Salmiwanti *et al.*, 2016; Aryantini *et al.*, 2017; Susetyarini & Nurrohman, 2022).



**Gambar 1.** Prosedur fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair.

### Identifikasi senyawa flavonoid

Larutan fraksi etil asetat herba pegagan (*C. asiatica*) sebanyak 3 ml ditambahkan ditambahkan serbuk Mg 0,3 g, amil alkohol 2 ml, dan 1 ml HCl Pekat, kemudian megocok dengan kuat. Sampel positif mengandung flavonoid, apabila terbentuk warna kuning atau jingga-merah (Widiastuti *et al.*, 2017; Sandy *et al.*, 2021; Yunita & Sari, 2022).

### Identifikasi senyawa saponin

Memasukkan larutan fraksi etil asetat herba pegagan (*C. asiatica*) sebanyak 3 ml dalam tabung reaksi, kemudian menambahkan air panas dan didinginkan. Mengocok selama 30 detik secara vertikal, lalu mendinginkan selama 30 menit. Sampel positif mengandung saponin, jika terdapat buih dari permukaan cairan setinggi 1-10 cm dan jika HCl 2N ditambahkan buih tidak hilang (Widiastuti *et al.*, 2017; Sandy *et al.*, 2021).

### Identifikasi senyawa tanin

Memasukkan larutan fraksi etil asetat herba pegagan sebanyak 3 ml pada tabung reaksi.

Menambahkan sebanyak 5 tetes gelatin lalu dikocok, sampel positif mengandung tanin jika terbentuk endapan putih (Widiastuti *et al.*, 2017; Sandy *et al.*, 2021; Susetyarini & Nurrohman, 2022).

#### Identifikasi senyawa triterpenoid

Memasukkan larutan fraksi etil asetat herba pegagan sebanyak 3 ml pada tabung reaksi kemudian menambahkan kloroform 0,5 ml. Kemudian, menambahkan pereaksi Liebermann-Burchard (2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat) melalui dinding tabung reaksi, kemudian mengocok secara perlahan dan diamati. Sampel positif mengandung triterpenoid jika terbentuk warna merah atau ungu (Rumondang *et al.*, 2013; Khoiriyah *et al.*, 2014; Fitriah *et al.*, 2017; Dewi *et al.*, 2018).

#### Identifikasi senyawa steroid

Memasukkan larutan fraksi etil asetat herba pegagan sebanyak 3 ml dalam tabung reaksi kemudian menambahkan kloroform 0,5 ml. Selanjutnya, menambahkan pereaksi Liebermann-Burchard (2 tetes asam asetat anhidrat dan 2 tetes asam sulfat pekat) melalui dinding tabung reaksi, kemudian mengocok secara perlahan dan diamati. Sampel positif mengandung steroid jika terbentuk warna hijau atau biru (Rumondang *et al.*, 2013; Khoiriyah *et al.*, 2014; Fitriah *et al.*, 2017; Dewi *et al.*, 2018).

#### Identifikasi senyawa fenolik

Memasukkan larutan fraksi etil asetat herba pegagan sebanyak 3 ml dalam tabung reaksi. Menambahkan 3 tetes FeCl<sub>3</sub>. Sampel positif mengandung fenolik, jika terbentuk endapan berwarna hijau maka (Susetyarini & Nurrohman, 2022; Aprilianti *et al.*, 2023; Zambari *et al.*, 2023).

### Uji aktivitas antibakteri

Metode difusi (*Kirby-Bauer*) digunakan untuk uji antibakteri dengan menyelupkan kapas steril pada suspensi bakteri. Selanjutnya, menginokulasi dalam MHA dengan metode perataan (*Spread Plate Method*). Untuk memastikan suspensi kultur terdistribusi secara merata ke seluruh media, media disimpan pada suhu kamar selama 10 menit (Sandy *et al.*, 2021; Nugroho *et al.*, 2022). Kertas cakram direndam selama 15 menit dalam fraksi etil asetat herba

pegagan pada tiga konsentrasi: 5.000 ppm, 7.500 ppm, dan 10.000 ppm. Selain itu, ditambahkan larutan kontrol negatif 10% DMSO dan larutan kontrol positif Colistin. Setelah kertas cakram dan media MHA ditambahkan, pembacaan dilakukan setelah 24 jam pada suhu 37°C (Anggraini *et al.*, 2021; Sandy *et al.*, 2021). Daerah yang tidak ditumbuhi mikroorganisme di sekitar cakram menunjukkan bahwa zat senyawa bagian turunan asam etil asetat rempah pegagan mempunyai daya hambat terhadap *P. aeruginosa*. Penggaris digunakan untuk mengukur diameter zona hambat dalam satuan milimeter. Untuk keperluan replikasi, pengujian ini dilakukan sebanyak lima kali (Aryantini *et al.*, 2017; Sandy *et al.*, 2021; Nugroho *et al.*, 2022).

### Hasil dan Pembahasan

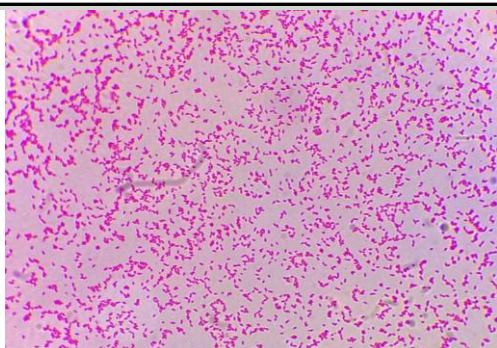
#### Hasil Identifikasi dan Peremajaan Bakteri *P. aeruginosa*

Bakteri dari isolat bakteri yang telah diuji di Balai Laboratorium Kesehatan Pengujian dan Kalibrasi Provinsi Nusa Tenggara Barat. Bakteri tersebut kemudian diremajakan di Laboratorium Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Mataram. Peremajaan pada media *MacConkey* seperti pada **Gambar 2**. Setelah dilakukan peremajaan, bakteri tersebut kemudian diidentifikasi kembali dengan pewarnaan gram seperti pada **Gambar 3**.



**Gambar 2.** Hasil pengamatan secara makroskopis pada media *MacConkey* (Sumber : dokumentasi pribadi)





**Gambar 3.** Hasil pengamatan *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis pada pengecatan gram (Sumber : dokumentasi pribadi)

Hasil uji dari Balai Laboratorium Kesehatan Pengujian dan Kalibrasi sesuai dengan karakteristik strain *P. aeruginosa*.

**Hasil ekstraksi dan fraksinasi herba pegagan (*Centella asiatica*)**

Hasil ekstrak herba pegagan didapatkan setelah ekstraksi dengan metode maserasi sebanyak 85 g dengan presentase rendemennya, yakni 21,25%. Adapun fraksi etil asetat herba pegagan (*C. asiatica*) setelah dilakukan fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair sebanyak 1,386 g dengan presentase rendemennya yakni, 6,93%.

**Hasil determinasi herba pegagan (*Centella asiatica*)**



*C. asiatica* dari hasil determinasi di Balai Besar Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

**Hasil uji fitokimia fraksi herba pegagan (*Centella asiatica*)**

Hasil uji fitokimia memperlihatkan fraksi tersebut mengandung 3 senyawa aktif yaitu flavonoid, fenolik dan tanin seperti pada **Tabel 1**.

**Tabel 1.** Hasil Uji Fitokimia Fraksi Etil Asetat Herba Pegagan

Uji golongan senyawa	Parameter standar	Hasil	Gambar	Keterangan
<b>Saponin</b>	Terbentuk buih	Jernih (tidak terbentuk buih)		Negatif
Dragendrof	Warna jingga	Tidak terbentuk warna jingga		Negatif
<b>Alkaloid</b>	Mayer	Tidak terbentuk endapan putih/kuning		Negatif
	Wagner	Tidak terbentuk endapan coklat		Negatif
<b>Flavonoid</b>	Warna kuning atau jingga hingga merah	Terbentuk Warna kuning		<b>Positif</b>
<b>Fenolik</b>	Endapan berwarna hijau	Terbentuk endapan warna hijau		<b>Positif</b>
<b>Tanin</b>	Endapan putih	Terbentuk endapan putih		<b>Positif</b>

<b>Triterpenoid</b>	Warna merah atau ungu	Tidak terbentuk warna merah atau ungu		Negatif
<b>Steroid</b>	Warna hijau atau biru	Tidak terbentuk warna hijau atau biru		Negatif

### Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi herba pegagan (*Centella asiatica*) terhadap isolat klinis *P. aeruginosa*

Metode difusi cakram (*Kirby-bauer*) digunakan untuk uji aktivitas antibakteri melalui 3

konsentrasi yaitu, 5.000 ppm, 7.500 ppm dan 10.000 ppm. Hasil uji aktivitas antibakteri disajikan pada **Tabel 2**. Zona hambat kategori sedang terbentuk pada konsentrasi KP (+). Sementara itu, konsentrasi KN (-) tidak terbentuk zona hambat.

**Tabel 2.** Hasil Uji Antibakteri Fraksi Etil Asetat Herba Pegagan

Konsentrasi	Daya Hambat (mm)					$\bar{x} \pm SD$	Kategori zona hambat
	I	II	III	IV	V		
<b>5000 ppm</b>	0	0	0	3	4	1,40 ± 1,95	Lemah
<b>7500 ppm</b>	3	6	1	1,3	2,17	2,69 ± 2,01	Lemah
<b>10000 ppm</b>	0	0	0	1,3	3,83	1,03 ± 1,67	Lemah
<b>KP (+)</b>	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3	7,3 ± 0,00	Sedang
<b>KN (-)</b>	0	0	0	0	0	0,00 ± 0,00	Tidak ada zona hambat

Keterangan : (KP) Kontrol Positif; (KN) Kontrol Negatif ; (ppm) part per million ; (SD) Standar Deviasi

## Pembahasan

### Identifikasi dan peremajaan bakteri *P. aeruginosa*

Peremajaan pada media *MacConkey* seperti pada **Gambar 2** memperlihatkan pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi laktosa sehingga tidak berwarna di media *MacConkey* (Malik *et al.*, 2019). Setelah dilakukan peremajaan, bakteri tersebut kemudian diidentifikasi kembali dengan pewarnaan gram. Tujuan dilakukan pewarnaan gram adalah untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan murni bakteri *P. aeruginosa* tanpa terkontaminasi bakteri lain seperti pada **Gambar 3**.

### Determinasi herba pegagan (*Centella asiatica*)

*Centella asiatica* diperoleh dari hasil determinasi di Balai Besar Penelitian Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu. Determinasi adalah interaksi yang bertujuan untuk menentukan kewajaran dan realitas karakter tumbuhan yang akan diteliti.

Determinasi pada saat pengambilan bahan herba pegagan bertujuan untuk mencocokkan ciri morfologi tumbuhan dengan kunci penentuan, menghindari kesalahan pada saat pengambilan bahan, dan menghindari tercampurnya bahan dengan tumbuhan lain (Nugroho *et al.*, 2022).

### Ekstraksi dan Fraksinasi Herba Pegagan (*Centella asiatica*)

Herba pegagan yang telah kering diblender dan diayak menggunakan ayakan mesh nomor 40 hingga terbentuk serbuk halus. Penelitian ini menggunakan ayakan mesh nomor 40 agar memperoleh serbuk halus mempunyai derajat kehalusan sedang dengan ukuran yang homogen (Nur *et al.*, 2023; Utami *et al.*, 2023). Semakin besar ukuran partikel maka pelarut semakin sukar untuk menembus dinding sel untuk menarik senyawa, namun serbuk yang terlalu halus memungkinkan serbuk tersebut lolos dari kertas saring dan menyumbat pori pada kertas saring (Utami *et al.*, 2023). Selain itu, pembuatan serbuk halus bertujuan untuk memperluas partikel material dapat bersentuhan dengan zat terlarut sehingga ekstraksi terjadi secara nyata (Sandy *et al.*, 2021; Nur *et al.*, 2023).

Metode maserasi digunakan untuk pembuatan ekstrak herba pegagan. Metode ini digunakan karena peralatan dan prosedur kerjanya lebih sederhana serta tidak menggunakan suhu yang tinggi pada proses ekstraksinya sehingga zat aktif dalam herba pegagan tidak rusak (Marjoni, 2016) dalam Anjaswati *et al.*, (2021). Menimbang serbuk herba pegagan sebanyak 400 g lalu melarutkan dengan etanol 96% sebanyak 4000 ml. Alasan penggunaan etanol 96% sebagai pelarut pada penelitian ini karena Larutan ini dapat melarutkan hingga semua campuran, baik campuran polar atau non-polar (Anjaswati *et al.*, (2021).

Metode ekstraksi cair-cair digunakan dalam penelitian ini untuk fraksinasi. Tujuan dari fraksinasi adalah untuk membuat fraksi-fraksi yang berbeda dengan memisahkan ekstrak sesuai dengan tingkat polaritasnya. Teknik ini memanfaatkan dua pelarut yang tidak bercampur dan memiliki tingkat polaritas berbeda (Ariwibowo *et al.*, 2021). Fraksinasi menggunakan teknik ekstraksi cair-cair dilakukan secara bertahap dengan menggunakan tiga pelarut secara berurutan yaitu n-heksana, kloroform, dan etil asetat. Zat penguat yang bersifat non polar akan dimusnahkan dalam pelarut non polar, senyawa semi polar akan dimusnahkan dalam pelarut semi polar dan senyawa polar akan dimusnahkan dalam pelarut polar (Harborne, 1987 dalam Marhadianti *et al.*, 2019). Fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair ini dipilih karena cara pengoperasian alat-alatnya sederhana dan alat-alat yang digunakan juga sederhana (Rawa-Adkonis *et al.*, 2006).

#### **Uji fitokimia fraksi herba pegagan (*Centella asiatica*)**

Metode ekstraksi cair-cair digunakan dalam penelitian ini untuk fraksinasi. Tujuan dari fraksinasi adalah untuk membuat fraksi-fraksi yang berbeda dengan memisahkan ekstrak sesuai dengan tingkat polaritasnya. Hasil penelitian Ariwibowo *et al.*, (2021) mengatakan bahwa Kedua pelarut yang digunakan dalam metode ini tidak dicampur dan memiliki tingkat polaritas yang berbeda. Fraksinasi dengan strategi ekstraksi fluida dilakukan secara bertahap dengan menggunakan 3 pelarut, yaitu n-heksana, kloroform, dan derivatif etil asetat secara berurutan. Intensifikasi non-polar, campuran

semi-polar, dan campuran polar semuanya akan hancur oleh pelarut polar, sedangkan intensifikasi dengan sifat non-polar akan hancur oleh pelarut non-polar. Tabel 1 menampilkan hasil uji fitokimia untuk fraksi herba pegagan.

Etil asetat adalah pelarut yang dapat untuk mengekstrak flavonoid karena bersifat semipolar dan dapat menarik flavonoid polar maupun nonpolar (Yani *et al.*, 2023). Terdapat flavonoid bebas yang dapat terurai dalam pelarut semipolar seperti flavon, flavonon, dan flavonol. Sifat etil asetat yang semipolar juga memudahkan ekstraksi senyawa fenol dibandingkan pelarut nonpolar seperti n-heksana (Al Huda *et al.*, 2020). Karena tanin merupakan senyawa yang dapat larut dalam pelarut semipolar, maka pelarut etil asetat dapat digunakan untuk mengekstrak tanin (Fitriani & Lestari, 2022).

Flavonoid memiliki kelebihan sebagai antibakteri karena dapat menghambat pencernaan energi bakteri, kapasitas membran sel, dan reaksi asam nukleat pada sel bakteri (Azmi dan Dwiyaniti, 2020). Flavonoid juga dapat merusak lapisan sel dan mendenaturasi protein sel bakteri sehingga terjadi lisis sel (Rahmawati *et al.*, 2020). Flavonoid mencegah terganggunya integritas membran sel bakteri dengan membentuk senyawa kompleks yang menargetkan protein ekstraseluler. Penambahan Mg dan HCl dilakukan untuk mengetahui adanya flavonoid. Fraksi etil asetat herba pegagan, terjadi warna kuning. Terbentuknya warna kuning menunjukkan bahwa contoh tersebut mengandung flavonoid.

Senyawa flavonoid direduksi Mg dan HCl sehingga menghasilkan warna kuning, merah, atau jingga (Harborne, 1987; Sulistyari *et al.*, 2020). Fenol dapat mendenaturasi protein, merusak lapisan sel, dan menonaktifkan zat kimia lisozim yang menyebabkan berkurangnya tekanan permukaan pada dinding sel bakteri, sehingga mengakibatkan kematian sel (Rahmawati *et al.*, 2020). Ketika 1% FeCl<sub>3</sub> ditambahkan ke fenol, reaksi antara FeCl<sub>3</sub> dan gugus hidroksil pada senyawa fenol menghasilkan pembentukan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam pekat (Putri *et al.*, 2018). Sementara itu, presipitasi dan denaturasi protein bakteri dapat dihambat oleh tanin, senyawa gugus fenol yang aktif. Tanin menargetkan polipeptida dinding sel yang merusak dinding sel bakteri (Azmi & Dwiyaniti, 2020). Uji gelatin,

untuk menguji tanin, melibatkan penambahan gelatin. Endapan putih dengan rona kekuningan terbentuk selama uji gelatin. Karena tanin bereaksi dengan protein untuk membentuk kopolimer stabil yang tidak larut dalam air, adanya warna putih kekuningan menunjukkan bahwa tanin menggumpalkan protein gelatin (Desinta, 2015).

### Uji aktivitas antibakteri fraksi herba pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Isolat Klinis *P. aeruginosa*

Metode difusi cakram (*Kirby-bauer*) untuk melakukan uji aktivitas antibakteri. Metode ini dipilih karena prosedurnya sederhana, tidak membutuhkan biaya mahal, kemampuan untuk menguji mikroorganisme dan agen antibakteri dalam jumlah besar dan kemudahan dalam menginterpretasikan hasil yang diberikan (Balouiri *et al.*, 2016). Faksi etil asetat dapat menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* pada semua seri konsentrasi dengan konsentrasi 7500 ppm paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* dibandingkan konsentrasi yang lain. Adanya daya hambat pada pertumbuhan *P. aeruginosa* ditandai adanya zona bening sekitar cakram. Kemampuan antibakteri menghambat pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh konsentrasi dan jenis bakteri (Sandy *et al.*, 2021). Hasil uji antibakteri disajikan dalam **Tabel 2**.

Semua seri konsentrasi, khususnya 5.000 ppm, 7.500 ppm, dan 10.000 ppm menunjukkan adanya zona penghambatan. Davis dan Bold (1971) dalam Mahmudah dan Atun, (2017) menggolongkan daya hambat normal ke dalam beberapa kelas, yaitu klasifikasi lemah, sedang, kuat, dan sangat kuat. Zona penghambatan rata-rata pada konsentrasi 5.000 ppm, 7.500 ppm, dan 10.000 ppm masuk dalam kategori lemah, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2. Zona penghambatan yang dinyatakan lemah dapat disebabkan karena *P. aeruginosa* memiliki ketahanan yang lebih kuat terhadap iklim dan senyawa kimia dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya. *P. aeruginosa* memiliki banyak resistensi karena merupakan bakteri gram negatif dengan dinding sel yang rumit. Struktur dinding sel yang rumit dapat memengaruhi pengikatan, penetrasi, dan aktivitas senyawa antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri ini. Bakteri gram negatif memiliki banyak fosfolipid,

lipopolisakarida, dan lipoprotein di membran luarnya untuk menghentikan lisis peptidoglikan dan mempersulit agen antibakteri untuk masuk ke dalam sel (Malik *et al.*, 2019).

*Pseudomonas aeruginosa* juga tersusun atas eksopolisakarida berupa alginat yang berbentuk seperti gel kental yang mengelilingi bakteri. Komponen tersebut memungkinkan *P. aeruginosa* untuk membentuk suatu koloni pada suatu permukaan sehingga membentuk suatu biofilm sehingga bakteri ini dapat tahan terhadap suatu senyawa antibakteri (Malik *et al.*, 2019). Hasilnya, senyawa antibakteri dalam fraksi etil asetat herba pegagan dalam penelitian ini tidak mampu menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* secara efektif karena adanya mekanisme pertahanan ganda, sehingga zona hambatnya masuk dalam kategori lemah.

Kontrol positif menggunakan *Colistin* menghasilkan zona hambat kategori sedang. Alasan penggunaan *Colistin* sebagai kontrol positif pada penelitian ini karena penelitian Yayan *et al.*, (2015) tidak ditemukan adanya resistensi *P. aeruginosa* dan *P. aeruginosa* MDR terhadap *Colistin* pada beberapa isolat yang ditemukan dari pasien pneumonia. *Colistin* juga merupakan agen aktif pilihan untuk melawan patogen Gram negatif aerobik yang seringkali menjadi penyebab utama infeksi yang mengancam jiwa seperti *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Enterobacteriaceae* lainnya. Sementara itu, kontrol negatif menggunakan DMSO 10% tidak ada daya hambat. Alasan penggunaan DMSO 10% sebagai kontrol negatif dan pelarut fraksi pada penelitian ini karena DMSO tidak memiliki pengaruh terhadap aktivitas antibakteri (Fransisca *et al.*, 2020; Sandy *et al.*, 2021; Nugroho *et al.*, 2022).

Konsentrasi dengan rerata zona hambat terbesar adalah 7.500 ppm, diikuti oleh konsentrasi 5.000 ppm dan 10.000 ppm. Menurut Anggita & Harris (2018), perbedaan difusi senyawa antibakteri dalam media agar menyebabkan variasi luas zona hambat. Selain itu, fiksasi dan jenis campuran antibakteri yang berbeda juga dapat menghasilkan lebar zona penghambatan yang berbeda. Penelitian Nurainy *et al.*, (2008) dalam Anggita dan Harris, (2018) juga mengemukakan fiksasi konsentrat yang lebih tinggi akan mempengaruhi konsistensi susunan konsentrat. Kemampuan larutan ekstrak



untuk berdifusi ke dalam media agar menurun dengan bertambahnya ketebalan. Oleh karena itu, dalam kajian ini, zona penghambatan pada konsentrasi 10.000 lebih kecil daripada zona penghambatan yang dihasilkan pada konsentrasi 7.500 ppm. Artinya daya hambat yang dihasilkan tidak selalu berkorelasi langsung dengan konsentrasi ekstrak.

## Kesimpulan

Hasil penelitian yang sudah dijabarkan di atas, fraksi etil asetat herba pegagan (*C. asiatica*) dengan metode maserasi memiliki aktivitas antibakteri terhadap isolat klinis *P. aeruginosa*. Konsentrasi optimal fraksi etil asetat herba pegagan dalam menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* adalah pada konsentrasi 7.500 ppm dengan diameter daya hambat sebesar 2,69 mm. Kemampuan fraksi etil asetat herba pegagan dalam menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* karena adanya kandungan flavonoid, fenolik dan tanin pada fraksi tersebut.

## Ucapan Terima Kasih

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat anugerah-Nya penulis bisa menyelesaikan penulisan artikel ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Universitas Mataram yang sudah mendanai penelitian ini.

## Referensi

- Anggita, A. and Harris, A. (2018) 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*', (3), pp. 411–418.
- Al Huda, B.H., Susanti, H. and Sugihartini, N. (2020) 'Purification effect on Organoleptic Profile, Yield, Total Phenol and Total Flavonoids from 96% Ethanol Extract of Moringa (*Moringa oleifera*. L) leaves', *Jurnal Farmasi Indonesia*, 17(2), pp. 188–198.
- Anggraini, P.H., Septiarini, A.D. and Siska W, T. (2021) 'Uji Daya Hambat Ekstrak dan Fraksi N-Hekasan, Fraksi Etil Asetat, Fraksi Air Daun Kersen (*Muntingia calabura* L) Terhadap Bakteri

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923', *Duta Pharma Journal*, 1(2).

- Anjaswati, D., Pratimasari, D. and Nirwana, A.P. (2021) 'Perbandingan Rendemen Ekstrak Etanol, Fraksi n-Heksana, Etil Asetat, dan Air Daun Bit (*Beta vulgaris* L.) Menggunakan Fraksinasi Bertingkat', *Jurnal Farmasi (Journal of Pharmacy)*, 2(1), pp. 32–37.
- Aprilianti, N.M., Purgiyanti and Barlian, A.A. (2023) 'Penentuan Kadar Total Fenol Fraksi N-Heksan, Etil asetat, dan Air Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urban)', *Parapemikir: Jurnal Ilmiah Farmas*, 12(1).
- Ariwibowo, A.I., Lubis, C.F., Urbaningrum, L.M., Rahmawati, N.D. and Anggraini, S. (2021) 'Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Tanaman', *Jurnal Health Sains*, 2(6), pp. 751–757. Available at: <https://doi.org/10.46799/jhs.v2i6.188>.
- Artini, P.E.U.D., Astuti, K.W. and Warditiani, N.K. (2013) 'Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.)', *Jurnal Farmasi Udayana*, 2(4).
- Aryantini, D., Sari, F. and Juleha (2017) 'Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Terstandar Flavonoid dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)', *Jurnal Wiyata*, 4(2), pp. 143–150.
- Azmi, D.A. and Dwiyantri, R.D. (2020) 'Ethanol Extract Of *Centella Asiatica* (L.) Urban Leaves Effectively Inhibit *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* by Invitro Test', *Tropical Health and Medical Research*, 2(2).
- Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibsouda, S.K. (2016) 'Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review', *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), pp. 71–79. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Damanik, D.F., Monica, Lubis, Y.M. and Meldawati (2021) 'Uji Aktivitas Anti bakteri Ekstrak Lidah Buaya (*Aloe vera*) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Streptococcus pyogenes*', *Majalah Kedokteran Andalas*, 44(6), pp. 357–364. Available at: <http://jurnalmka.fk.unand.ac.id>.

- Desinta, T. (2015) 'Penentuan Jenis Tanin secara Kualitatif dan Penetapan Kadar Tanin dari Buah Kulit Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) secara Permanganometri', *Calyptra: Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*, 4(1).
- Dewi, N.L.A., Adnyani, L.P.S., Pratama, R.B.R., Yanti, N.N.D., Manibuy, J.I. and Warditiani N.K (2018) 'Pemisahan, Isolasi, dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Herba Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban)', *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(2), pp. 68–76.
- Diniz, L.R.L., Calado, L.L., Duarte, A.B.S. and de Sousa, D.P. (2023) 'Centella asiatica and Its Metabolite Asiatic Acid: Wound Healing Effects and Therapeutic Potential', *Metabolites*, 13(2). Available at: <https://doi.org/10.3390/metabo13020276>.
- Fitriah, Mappiratu and Prismawiryanti (2017) 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dari Beberapa Tingkat Kepolaran Pelarut', *KOVALEN*, 3(3), pp. 242–251.
- Fitriani, D. and Lestari, D. (2022) 'Uji Karakteristik dan Skrining Fitokimia pada Fraksi Etil Asetat Daun Mangga Kasturi (*Mangifera Casturi* Kostem)', *Borneo Student Research*, 3(2), pp. 2200–2207.
- Fransisca, D., Kahanjak, D.N. and Frethernety, A. (2020) 'Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dengan metode difusi cakram Kirby-Bauer', *Jurnal Pengelolaan Lingkungan Berkelanjutan*, 4(1), pp. 460–470. Available at: <http://www.bkpsl.org/ojswp/index.php/jplbJPLB.4>.
- Goh, L.P.W., Marbawi, H., Goh, S.M., Bin Abdul Asis, A.K. and Gansau, J.A. (2023) 'The prevalence of hospital-acquired infections in Southeast Asia (1990-2022)', *The Journal of Infection in Developing Countries*, 17(02), pp. 139–146. Available at: <https://doi.org/10.3855/jidc.17135>.
- Khoiriyah, S., Hanapi, A. and Fasya, A.G. (2014) 'Uji Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform dan Petroleum Eter Ekstrak Metanol Alga Coklat *Sargassum vulgare* dari Pantai Kapong Pamekasan Madura', *ALCHEMY*, 3(2), pp. 133–144.
- Mahmudah, F.L. and Atun, S. (2017) 'Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Etanol Temukunci (*Boesenbergia pandurata*) terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*', *Jurnal Penelitian Saintek*, 22(1).
- Malik, F., Suryawati, Wilda Mahdani and Hijra Novia Suardi (2019) 'Uji aktivitas Madu Seulawah sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853', *Jurnal Bioleuser*, 3(1), pp. 5–9. Available at: <http://www.jurnal.unsyiah.ac.id/bioleuser>.
- Marhadianti, A., Lukmayani, Y. and Syafnir, L. (2019) 'Prosiding Farmasi Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid yang Berpotensi sebagai Antioksidan dari Ekstrak Metanol Daun Cabe Rawit (*Capsicum frutescens* L.)', *Prosiding Farmasi*, 5(2), pp. 543–550.
- Muthmainnah, B. (2019) 'Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etanol Buah Delima (*Punica granatum* L.) dengan Metode Uji Warna', *Media Farmasi*, 13(2), p. 36. Available at: <https://doi.org/10.32382/mf.v13i2.880>.
- Nugroho, D.A., Siska, T.W. and Dwi, A.S. (2022) 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi N-heksan, Fraksi Etil Asetat, Fraksi Air Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923', *Prosiding Seminar Informasi Kesehatan Nasional (SIKESNas)*, pp. 376–388.
- Nur, R.P., Saptawati, T. and Rachma, F.A. (2023) 'Perbandingan Efektivitas Ekstrak Air Cair Dengan Ekstrak Etanol Kental Daun Selada Hijau Keriting (*Lactuca sativa* L.) Sebagai Hipnotika Pada Mencit (*Mus musculus*)', *Prosiding Seminar Nasional STIKES Telogorejo Semarang*, 2(1).
- Putri, H.D., Sumpono and Nurhamidah (2018) 'Uji Aktivitas Asap Cair Cangkang Buah Karet (*Hevea brassiliensis*) dan Aplikasinya dalam Penghambatan Ketengikan Daging Sapi', *ALOTROP, Jurnal Pendidikan Dan Ilmu Kimia*, 2(2), pp. 97–105.
- Rahmawati, A., Mayasari, D. and Narsa, A.C. (2020) 'Kajian Literatur: Aktivitas

- Antibakteri Ekstrak Herba Suruhan (Peperomia pellucida L.)', Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences, 12, pp. 117–124. Available at:  
<https://doi.org/10.25026/mpc.v12i1.401>.
- Rawa-Adkonis, M., Wolska, L., Przyjazny, A. and Namieśnik, J. (2006) 'Sources of errors associated with the determination of PAH and PCB analytes in water samples', *Analytical Letters*, 39(11), pp. 2317–2331. Available at:  
<https://doi.org/10.1080/00032710600755793>.
- Rumondang, M., Kusriani, D. and Fachriyah, E. (2013) Isolasi, Identifikasi Dan Uji Antibakteri Senyawa Triterpenoid Dari Ekstrak n-Heksana Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) (Isolation, Identification and Antibacterial Test of Triterpenoid Compounds from n-Hexane Extract of Tempuyung Leaves (*Sonchus arvensis* L.)), *Chem Info*.
- Salmiwanti, Ilyas, A. and Saleh, A. (2016) 'Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi N-heksana dari Daun Pegagan (*Centella asiatica* L.) dan Uji Antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis*', *Al-Kimia*, 4(2), pp. 151–162.
- Sandy, M., Siska Wardani, T. and Dwi Septiarini, A. (2021) 'Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak, Fraksi N-Heksan, Fraksi Etil Asetat, Fraksi Air Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922', *Media Farmasi Indonesia*, 16(2), pp. 1683–1692. Available at:  
<https://doi.org/10.53359/mfi.v16i2.184>.
- Sondari, D., Tedja Irawadi, T., Setyaningsih, D. and Tursiloadi, D.S. (2016). Studi Awal Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Dan Kadar Asiaticoside Dari *Centella Asiatica* (L) URB, *Jurnal Sains Materi Indonesia*.
- Suarisavitra, I.A.D., Budayanti, N.N.S., Fatmawati, N.N.D. and Hendrayana, M.A. (2022) 'Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* pada Intensive Care Unit di Asia Tenggara : A Systematic Review', *Jurnal Medika Udayana*, 11(2), pp. 78–84. Available at:  
<https://doi.org/10.24843.MU.2022.V11.i2.P14>.
- Sulistyarini, I., Sari, A.D. and Wicaksono, T.A. (2020) 'Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Batang Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*)', *Cendekia Eksakta*, 5(1).
- Susetyarini, E. and Nurrohman, E. (2022) 'Fitokimia Ekstrak dan Rebusan Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Langkah Awal Mencari Senyawa Potensial Kandidat Imunomodulator', *Jurnal Sains Riset* |, 12(1), p. 51. Available at: <https://doi.org/10.47647/jsr.v10i12>.
- Utami, N., Susilowati, Angelia, P.T. and Paramesti, N.A. (2023) 'Profil Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Landep (*Barleria prionitis* L.) sebagai Kandidat Antidiabetes dengan Variasi Metode Ekstraksi', *Jurnal Farmasetis*, 12(4), pp. 431–440.
- Widiastuti, R., Nurhaeni, F., Luluk Marfuah, D. and Setyo Wibowo, G. (2017) 'Potensi Antibakteri dan Anticandida Ekstrak Etanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L) Urb.)', *Jurnal Ilmu Kesehatan Bhakti Setya Medika*, 1.
- Wientarsih, I., Sjarif, S.Hr. and Hamzah, I.M. (2013) 'Aktivitas Antioksidan Fraksi Metanol Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban)', *Fitofarmaka*, 3(2).
- Yani, N.K.L.P., Nastiti, K. and Noval (2023) 'Pengaruh Perbedaan Jenis Pelarut Terhadap Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)', *Jurnal Surya Medika*, 9(1), pp. 34–44. Available at:  
<https://doi.org/10.33084/jsm.v9i1.5131>.
- Yayan, J., Ghebremedhin, B. and Rasche, K. (2015) 'Antibiotic resistance of *pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-Year Period', *PLoS ONE*, 10(10). Available at:  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139836>.
- Yunita, E. and Sari, D.R.A.P. (2022) 'Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Fraksi Etil Asetat dan Fraksi N-Heksan Daun Pegagan (*Centella Asiatica* L.)', *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*, 8(1), pp.

58–66. Available at:  
<https://doi.org/10.35311/jmpi.v8i1.167>.  
Zambari, I.F., Muhamad, N.A. and Hafid, S.R.A.  
(2023) ‘A Comparative Study of Anti-  
Inflammatory Properties and Activities of

Green and Red *Christia vespertilionis*  
Leaves’, *Sains Malaysiana*, 52(1), pp.  
211–222. Available at:  
<https://doi.org/10.17576/jsm-2023-5201-17>.