BAB III
METODELOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain dari penelitian yang yang akan dilakukan yaitu desain eksperimental laboratorium. Tahap penelitian dimulai dari pengumpulan, pengolahan, identifikasi dan karakterisasi simplisia. Kemudian dilakukan ekstraksi herba pegagan (*C. asiatica*) dengan metode ultrasonik menggunakan pelarut etil-asetat serta dengan variasi suhu dan waktu ekstraksi. Setelah itu dilakukan skrining fitokimia, penentuan total kandungan senyawa fenolik dan total senyawa flavonoid dengan metode spektrofotometri UV-Vis, serta dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dengan menggunakan metode difusi cakram (*Kirby bauer*).

B. Lokasi dan Waktu

1. Lokasi untuk pengambilan sampel herba pegagan (*C. asiatica*) dilakukan di Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang.
2. Lokasi penelitian ini yaitu Laboratorium Bahan Alam Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta dan diperkirakan dimulai pada Mei-Juli 2022.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

   Populasi pada penelitian ini yaitu seluruh bagian dari herba pegagan (*C. asiatica*) yang diperoleh dari Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang dengan titik koordinat -7,4826153, 110,3281828 pada ketinggian 841 mdpl.
2. Sampel

   Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu herba pegagan sebanyak 3 kg dikumpulkan dengan teknik sampling acak (*random sampling*). Herba pegagan yang dipilih untuk digunakan sebagai sampel yaitu herba pegagan yang masih segar, memiliki warna hijau, memiliki daun yang lebar dan

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

berbentuk bulat seperti ginjal. Herba pegagan ini diambil pada pagi hari saat masih segar.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : variasi suhu dan waktu ekstraksi herba pegagan (*C. asiatica*) dengan menggunakan metode ultrasonik dan pelarut etil-asetat.
2. Variabel terikat : total kandungan senyawa fenolik dan total kandungan senyawa flavonoid serta aktivitas antibakteri ekstrak etil-asetat herba pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *S. aureus*.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Suhu ekstraksi adalah suhu yang digunakan untuk melakukan proses ekstraksi. Pada penelitian ini suhu yang digunakan yaitu kombinasi dari suhu 40°C hingga 50°C.
2. Waktu ekstraksi adalah lama proses ekstraksi dilakukan. Variasi waktu yang dipakai dalam penelitian ini adalah kombinasi dari 10 menit hingga 30 menit.
3. Total kandungan senyawa fenolik adalah konsentrasi dari senyawa fenolik dalam suatu sampel dan dinyatakan dalam ekivalen asam galat. Asam galat dapat dihitung juga menggunakan rumus TPC.
4. Total kandungan senyawa flavonoid adalah konsentrasi dari senyawa flavonoid yang terdapat dalam sampel dan dinyatakan dengan ekivalen senyawa kuersetin. Senyawa kuersetin dapat dihitung dengan menggunakan rumus TFC.
5. Diameter zona hambat adalah daerah bening disekeliling kertas cakram yang telah ditambahkan dengan sampel dan dilakukan pengukuran menggunakan penggaris atau jangka sorong dengan skala mm pada tiga sisi dari daerah zona hambat yang berbeda.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

   Autoklaf, ayakan no. 40, batang pengaduk, *beakerglass* (Iwaki), blender simplisia, bunsen, BSC, cawan petri, cawan porselin, corong, erlenmeyer (Iwaki), gelas ukur (Iwaki), *hotplate*, inkubator, jarum ose, kaca arloji, labu takar (Iwaki), mikropipet, oven, penggaris, pinset, pipet tetes, pipet ukur,

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

sendok tanduk, spatula besi, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer), *stirrer*, tabung reaksi (Pyrex Iwaki), timbangan analitik (Ohaus), *ultrasonic waterbath*, vakum buchner (Rocker), *waterbath* (Memmert WNB10FC).

2. Bahan

Akuades, $AlCl_3$ 10%, alkohol 70%, alumunium foil, antibiotik ampisilin dalam bentuk cakram, asam galat (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), asam sulfat, $BaCl_2$ 1%, besi (III) klorida, benang, biakan bakteri *S. aureus*, *bluetip*, etanol (*p.a*), etil-asetat (teknis dan *p.a*), HCl 2N, kapas atau kassa, kertas cakram kosong, kertasa payung, kertas saring, kertas *whatmann* no.1, kuersetin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), logam Mg, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), media *Nutrient Agar* (NA), metanol (*p.a*), NaCl 0,9% (fisiologis), NaOH, natrium asetat 1 M, pereaksi *Dragendorf*, pereaksi Mayer, pereaksi *Lieberman-Buchard*, pereaksi Wagner, reagen *Folin Ciocalteu*, serbuk herba pegagan.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan

a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi dari herba pegagan (*C. asiatica*) dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

b. Persiapan Sampel

Sampel disiapkan dengan cara dipilih herba pegagan yang segar kemudian dicabut dan dilakukan proses sortasi basah. Setelah itu herba pegagan yang telah dipetik dicuci menggunakan air yang mengalir dan dilakukan pengeringan dengan cara dioven dengan suhu 50°C hingga kering kemudian dilakukan sortasi kering. Setelah diperoleh simplisia herba pegagan yang kering dilakukan proses penyerbukan dengan cara diblender kemudian hasil dari proses penyerbukan diayak dengan ayakan mesh no. 40 (Puspita & Susilowati, 2021), yang telah dimodifikasi.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

c. Desain Faktorial

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu *Response Surface Methodology* (RSM) dengan mendesain variabel yang telah ditetapkan yaitu waktu dan suhu. Dengan rancangan penelitian ini maka akan diperoleh hasil ekstraksi yang optimal. Metode RSM ini terdiri dari dua level yaitu rendah (-1) dan tinggi (+1). Total percobaan dari metode ini yaitu 14 percobaan dengan 3 kali pengulangan titik optimal. Metode RSM ini menggunakan aplikasi *Minitab* 17 dan diperoleh rancangan penelitian sebagai berikut :

Tabel 3. Faktor dan Level dalam Penelitian

Faktor	Level (-1)	Level (+1)
Suhu (A)	40°C	50°C
Waktu (B)	10 menit	30 menit

Tabel 4. Kombinasi Perlakuan

StdOrder	*RunOrder*	*PtType*	*Blocks*	Suhu (^{0}C)	Waktu (menit)	TPC (%)	TFC (%)	*Yield* (%)
1	1	1	1	40.0000	10.0000			
2	2	1	1	50.0000	10.0000			
3	3	1	1	40.0000	30.0000			
4	4	1	1	50.0000	30.0000			
5	5	0	1	45.0000	20.0000			
6	6	0	1	45.0000	20.0000			
7	7	0	1	45.0000	20.0000			
8	8	-1	2	37.9289	20.0000			
9	9	-1	2	52.0711	20.0000			
10	10	-1	2	45.0000	5.8579			
11	11	-1	2	45.0000	34.1421			
12	12	0	2	45.0000	20.0000			
13	13	0	2	45.0000	20.0000			
14	14	0	2	45.0000	20.0000			

2. Pelaksanaan

a. Pembuatan Ekstrak Herba Pegagan

Ditimbang serbuk herba pegagan lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Dilarutkan dengan cara menambahkan pelarut etil-asetat dengan perbandingan 1:10. Setelah itu sampel diekstraksi dengan teknik ultrasonik menggunakan *ultrasonic waterbath* yang berfrekuensi 40 kHz (kilohertz) sesuai dengan kombinasi perlakuan pada (**Tabel 4.)** yang diperoleh dari variasi suhu antara 40°C sampai 50°C serta waktu antara

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

10 sampai 30 menit sesuai dengan yang tertera pada (**Tabel 3**.) Hasil dari ekstraksi tersebut disaring dengan memakai kertas *whatman* no.1. Dilakukan proses penguapan sampel hasil ekstraksi dengan *waterbath* sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapatkan dari proses pemekatan tersebut dimasukkan dalam wadah yang telah ditara lalu ditimbang menggunakan timbangan analitik dan kemudian dihitung rendemen dari ekstraknya (Sekarsari *et al*., 2019), yang telah dimodifikasi.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{bobot\ ekstrak\ kental\ (gram)}{bobot\ awal\ simplisia\ (gram)} \times 100\%$$

b. Skrining Fitokimia

1) Alkaloid

Ditimbang ekstrak kental herba pegagan menggunakan timbangan analitik sebanyak 100 mg. Dilarutkan dalam pelarut metanol 1 mL dan ditambahkan dengan HCl 2N 1 mL serta akuades 9 mL. Dilakukan pemanasan dengan menggunakan *waterbath* kemudian didinginkan. Larutan disaring dengan menggunakan kertas saring. Larutan hasil dari penyaringan dibagi menjadi 3 tabung, masing-masing tabung ditambahkan dengan pereaksi yang berbeda. Tabung pertama ditambahkan reagen Wagner 3 tetes, pada tabung yang kedua ditambah dengan reagen Dragendorf 3 tetes, dan pada tabung ketiga ditambah dengan reagen Mayer 3 tetes. Adanya senyawa alkaloid dalam sampel ditunjukkan dengan timbulnya endapan berwarna cokelat pada tabung reaksi pertama, endapan berwarna jingga pada tabung reaksi kedua serta timbul endapan berwarna putih atau kuning dan larut dalam methanol pada tabung yang ketiga (Rifkia & Prabowo, 2020).

2) Senyawa Fenolik

Ditimbang ekstrak kental herba pegagan sebanyak 100 mg dan ditambahkan dengan 20 mL pelarut metanol. Dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring. Diambil 2 mL dari hasil penyaringan dan ditambahkan dengan reagen besi (III) klorida 1%

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

secukupnya. Adanya kandungan senyawa fenol dalam sampel ditunjukkan dengan berubahnya warna larutan menjadi merah, ungu, hijau, biru atau hitam pekat (Wientarsih *et al*., 2013).

3) Flavonoid

Ditimbang ekstrak kental herba pegagan 100 mg lalu ditambahkan 1 mL pelarut metanol, 0,5 mL HCl, dan logam magnesium (Mg) dan diamati adanya perubahan warna pada larutan. Adanya senyawa flavon dalam sampel ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah sampai jingga, senyawa flavonol atau flavonon ditunjukkan oleh terbentuknya warna merah tua, senyawa aglikon atau glikosida ditunjukkan oleh terbentuknya warna hijau hingga biru pada larutan (Rifkia & Prabowo, 2020).

4) Terpenoid dan Steroid

Ditimbang sejumlah 100 mg ekstrak kental herba pegagan kemudian dilarutkan dalam pelarut metanol sejumlah 1 mL dan ditambahkan dengan pereaksi *Liebermann-Burchard*. Adanya senyawa steroid dalam sampel ditandai dengan timbulnya warna biru kehijauan dan adanya senyawa triterpenoid dalam sampel ditandai dengan timbulnya warna merah, merah muda, atau ungu (Rifkia & Prabowo, 2020).

5) Saponin

Ditimbang ekstrak kental herba pegagan sejumlah 100 mg dan dilarutkan dalam 1 mL pelarut metanol. Ditambahkan 10 mL akuades yang telah dipanaskan lalu didinginkan. Setelah itu dikocok selama 10 detik secara vertikal. Terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 10 menit serta tidak hilang saat ditambah dengan 1 tetes larutan HCl 2N maka sampel dinyatakan mengandung senyawa saponin (Rifkia & Prabowo, 2020).

6) Tannin

Ditimbang 100 mg ekstrak kental herba pegagan dan dilarutkan menggunakan 20 mL pelarut metanol. Sampel disaring dan hasil dari

PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA

penyaringan diambil 2 mL lalu dituang dalam tabung reaksi. Ditambah dengan akuades 2 mL dan larutan besi (III) klorida beberapa tetes lalu dilakukan pengocokan. Adanya senyawa tannin dalam sampel ditandai dengan terjadinya perubahan warna larutan menjadi hijau agak kehitaman atau biru kehitaman (Wientarsih *et al*., 2013).

c. Total Kandungan Fenolik

Larutan uji dibuat dengan cara ditimbang sejumlah 0,2 gram sampel ekstrak hasil ekstraksi dari setiap variasi suhu dan waktu dimasukkan ke dalam erlenmeyer, lalu dilarutkan menggunakan pelarut methanol P sebanyak 25 mL dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga sampel tercampur sempurna. Larutan sampel disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL, tambahkan methanol P melalui kertas saring sampai tanda batas. Setelah itu sampel diencerkan dengan cara diambil larutan ekstrak sebanyak 3,125 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan ditambahkan dengan pelarut methanol P sampai tanda batas.

Larutan pembanding dibuat dengan cara ditimbang 250 mg asam galat, dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan dilarutkan menggunakan methanol P sampai tanda batas. Larutan pembanding dibuat menjadi beberapa seri konsentrasi yaitu 30, 50, 70, dan 90 ppm.

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara diambil 1 mL larutan dari seri konsentrasi tertinggi. Setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 5 mL enceran larutan pereaksi *Folin Ciocalteu* (7,5 % dalam air) lalu digojog hingga tercampur sempurna dan didiamkan selama 8 menit. Ditambahkan 4 mL larutan NaOH 1% kemudian digojog hingga tercampur sempurna. Diukur absorbansi dari larutan tersebut pada panjang gelombang 600-800 nm.

Penentuan *Operating Time* (OT) dilakukan dengan cara diambil 1 mL larutan dari seri konsentrasi tertinggi. Setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 5 mL enceran larutan pereaksi *Folin Ciocalteu* (7,5 % dalam air) lalu digojog hingga tercampur

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

sempurna dan didiamkan selama 8 menit. Ditambahkan 4 mL larutan NaOH 1% kemudian digojog hingga tercampur sempurna. Diukur absorbansi dari larutan tersebut dengan rentang waktu 0-120 menit dan interval 5 menit pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan.

Diambil larutan sampel dan larutan pembanding dari setiap seri konsentrasi masing-masing 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan enceran pereaksi *Folin Ciocalteu LP* (7,5% dalam air) sebanyak 5 mL. Setelah itu larutan dicampur atau digojog sampai tercampur sempurna dan ditunggu dalam waktu 8 menit. Ditambahkan larutan NaOH 1% 4 mL kemudian dikocok sampai tercampur sempurna dan dilakukan inkubasi selama 40 menit. Setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi dari larutan tersebut dengan panjang gelombang maksimal yang telah ditentukan yaitu 725 nm dan percobaan diulangi sebanyak 3 kali. Larutan blanko diukur absorbansinya dengan cara yang sama tanpa penambahan larutan uji. Hasil dari pengukuran absorbansi dibuat kurva kalibrasi dan dihitung kadar larutan uji (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

d. Total Kandungan Flavonoid

Dibuat larutan uji ekstrak etil-asetat herba pegagan dengan cara ditimbang sebanyak 0,2 gram dari masing-masing sampel ekstrak yang didapatkan. Dilarutkan menggunakan etanol P di dalam erlenmeyer sebanyak 25 mL dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit. Larutan disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL, ditambahkan etanol P sampai tanda batas melalui kertas saring. Setelah itu larutan sampel diencerkan dengan cara diambil larutan sebanyak 3,125 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan ditambahkan dengan pelarut etanol P hingga tanda batas.

Larutan pembanding dibuat dengan cara ditimbang 100 mg kuersetin, dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan dilarutkan menggunakan etanol P sampai tanda batas. Larutan pembanding kuersetin dibuat menjadi berbagai seri konsentrasi yaitu 2, 4, 6, dan 8 ppm.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan cara diambil larutan kuersetin dari seri konsentrasi tertinggi sebanyak 0,5 mL. Setelah itu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan etanol P sejumlah 1,5 mL, $AlCl_3$ P 10% sejumlah 0,1 mL, larutan natrium asetat 1 M sejumlah 0,1 mL dan akuades sejumlah 2,8 mL. Setelah itu dikocok dan diamkan di suhu kamar selama 30 menit. Diukur absorbansi dari larutan tersebut pada panjang gelombang 400-500 nm.

Dipipet 0,5 mL dari setiap larutan uji dan setiap seri konsentrasi larutan pembanding kuersetin dimasukkan dalam tabung reaksi. Pada masing-masing tabung reaksi ditambah etanol P sejumlah 1,5 mL, $AlCl_3$ P 10% sejumlah 0,1 mL, larutan natrium asetat 1 M sejumlah 0,1 mL dan akuades sejumlah 2,8 mL. Setelah itu dikocok dan diamkan di suhu kamar selama 30 menit. Dibaca serapan dari setiap sampel dan seri konsentrasi larutan pembanding kuersetin dengan panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan yaitu 440 nm menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis dan pengujian dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan blanko diukur serapannya dengan cara yang sama tanpa dilakukan penambahan $AlCl_3$. Hasil dari pengukuran absorbansi dibuat kurva kalibrasi dan dihitung kadar dari larutan uji (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

e. Pengujian Aktivitas Antibakteri

1) Pembuatan Larutan Uji Ekstrak

Larutan uji yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri dibuat dengan cara ditimbang 4 gram ekstrak etil-asetat herba pegagan yang dihasilkan. Setelah itu dilarutkan dalam pelarut etil-asetat sampai volume 4 mL dan didapatkan larutan stok dengan konsentrasi 100%. Setelah itu larutan stok diencerkan menjadi berbagai seri kadar yaitu 20%, 40%, 60%, 80% serta 100% (Widiastuti *et al*., 2014).

2) Sterilisasi Alat dan Media

Alat yang dipakai dicuci terlebih dahulu dan dibungkus menggunakan kertas. Peralatan serta bahan yang tidak tahan dengan panas, dilakukan sterilisasi dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

waktu 15 menit. Seperangkat alat gelas dilakukan sterilisasi dengan oven suhu 160°C dalam waktu 1 jam. Kemudian alat yang digunakan untuk ekstrak sampel, sebelumnya disterilisasi terlebih dahulu dengan cara direndam menggunakan alkohol 70% kemudian dibilas dengan menggunakan akuades steril (Putri *et al*., 2019).

3) Peremajaan Kultur Murni Bakteri Uji

Ditimbang 0,46 gram media *Nutrient Agar* (NA) dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Setelah itu dilarutkan menggunakan akuades sebanyak 20 mL dan dipanaskan menggunakan *hotplate* sampai media NA larut sempurna. Setelah semua bahan larut, lubang pada erlenmeyer ditutup menggunakan kapas lalu diikat dengan benang dan dilakukan sterilisasi media menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan waktu 15 menit. Media NA tersebut dituang dalam tabung reaksi sejumlah 10 mL. Tabung yang digunakan untuk pembuatan media ini diletakkan dengan posisi miring 45° dan diamkan selama 30 menit pada suhu kamar sampai media agar menjadi padat. Media agar yang dibuat harus diperhatikan dan jangan sampai menyentuh pada bagian mulut tabung. Diambil satu koloni bakteri menggunakan ose yang steril dari biakan murni bakteri *S.aureus*. Kemudian koloni bakteri yang telah diambil ini ditanam pada media agar miring yang telah dibuat. Setelah itu dilakukan proses inkubasi selama 1 hari (24 jam) pada inkubator yang bersuhu 37°C (Putri *et al*., 2019).

4) Pembuatan Larutan Standar Kekeruhan (Larutan *Mc. Farland*)

Dicampur larutan H_2SO_4 sejumlah 9,5 mL dengan larutan $BaCl_2$ 1% sejumlah 0,5 mL di dalam erlenmeyer. Setelah itu larutan dikocok sampai tercampur dengan sempurna dan terbentuk larutan keruh (Putri *et al*., 2019).

5) Penyiapan Inokulum Bakteri

Diambil 1 ose koloni biakan bakteri *S.aureus* dari kultur bakteri murni dengan ose yang steril. Setelah itu disuspensikan dengan NaCl 0,9% sebanyak 5 mL di dalam tabung reaksi sehingga tingkat

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

kekeruhannya sebanding dengan larutan standar *Mc Farland* yang telah dibuat atau dapat dikatakan bahwa konsentrasi dari bakteri tersebut adalah 10^8 CFU/mL. Setelah itu dilakukan pengenceran suspensi bakteri sampai memiliki konsentrasi 10^6 CFU/mL. Caranya yaitu diambil inokulum bakteri sebanyak 0,1 mL menggunakan mikropipet. Kemudian larutan suspensi bakteri tersebut dituang ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9% sejumlah 9,9 mL (Siahaan, 2013).

6) Uji Aktivitas Antibakteri

Ditimbang 3,4 gram media *Mueller Hinton Agar* (MHA) lalu dimasukkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan menggunakan akuades sejumlah 100 mL. Media dipanaskan di atas *hotplate* hingga media MHA tersebut mendidih. Setelah media MHA mendidih kemudian dilakukan sterilisasi media dalam autoklaf yang bersuhu 121°C, dengan waktu 15 menit.

Dituang media MHA sebanyak 15 mL ke dalam cawan petri dan didiamkan hingga media menjadi padat. Diambil suspensi bakteri *S. aureus* sejumlah 0,1 mL dengan menggunakan mikropipet dan dituang ke dalam cawan petri, kemudian diratakan dengan menggunakan batang L yang telah disterilkan. Kertas cakram yang akan digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri sebelumnya direndam terlebih dahulu menggunakan larutan sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan yang memiliki total kandungan fenolik dan flavonoid paling optimal yang dibuat dengan berbagai seri konsentrasi. Proses perendaman dilakukan sampai larutan tersebut berdifusi ke dalam kertas cakram dengan sempurna. Kontrol positif pada pengujian ini yaitu antibiotik ampisilin 10µg dan sebagai kontrol negatifnya digunakan akuades. Setelah itu kertas cakram yang berisi larutan sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan, antibiotik ampisilin, dan larutan akuades ditaruh pada permukaan media yang sudah diinokulasikan dengan bakteri uji. Kemudian dilakukan proses inkubasi menggunakan inkubator dengan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

temperature 37°C dan waktu 24 jam. Diamati dan diukur diameter zona hambat dari kertas cakram tersebut menggunakan penggaris atau jangka sorong dengan skala mm. Kemudian hasil dari pengukuran tersebut dihitung nilai rata-ratanya (Putri *et al*., 2019).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam rumus persamaan linear y = bx + a, dan diperoleh nilai x atau konsentrasi dari larutan (C) yang digunakan untuk perhitungan selanjutnya.
2. Total Kandungan Fenolik

   $$TPC = \frac{C.V.fp}{g}$$

   Dengan keterangan :

   TPC : *Total Phenolic Content*

   C : konsentrasi fenolik (nilai x)

   V : volume ekstrak yang digunakan (mL)

   Fp : faktor pengenceran

   g : berat sampel yang digunakan
3. Total Kandungan Flavonoid

   $$TFC = \frac{C.V.fp}{g}$$

   Dengan keterangan :

   TFC : *Total Flavonoid Content*

   C : konsentrasi fenolik (nilai x)

   V : volume ekstrak yang digunakan (mL)

   Fp : faktor pengenceran

   g : berat sampel yang digunakan (gram)
4. Aktivitas Antibakteri

   Pengukuran diameter zona hambat dari sampel dihitung menggunakan penggaris atau jangka sorong dari tiga sisi, kemudian dihitung rata-rata diameter zona hambatnya.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

5. Analisis Data

Data hasil dari penelitian ini dilakukan analisis statistik menggunakan rancangan *Central Composite Design* (CCD) *Response Surface Methodology* (RSM) dengan aplikasi *Minitab* 17. Pada rancangan penelitian ini digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh variasi suhu dan waktu ekstraksi terhadap total kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, dimana ekstrak yang memiliki total kandungan senyawa fenolik dan flavonoid paling optimal akan dilanjutkan diuji aktivitas antibakterinya. Hasil data yang diperoleh dari optimasi diuji dengan uji T untuk melihat adanya perbedaan yang signifikan atau tidak signifikan antara hasil prediksi dengan nilai aktual (nilai signifikansi $p<0,05$).

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA