BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tumbuhan

Identifikasi tumbuhan yang akan digunakan sebagai sampel penelitian dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tanggal 18 Mei 2022 dengan nomor pendaftaran 085/S.Tb./V/2022. Tujuan dilakukan determinasi tumbuhan adalah untuk menghindari terjadinya kesalahan dalam melakukan pengambilan sampel. Hasil dari identifikasi tumbuhan yang digunakan sebagai sampel penelitian adalah sebagai berikut :

Divisi	: Tracheophyta
Sub Divisi	: Spermatophytina
Kelas	: Magnoliopsida
Super Ordo	: Asteranae
Ordo	: Apiales
Familia	: Apiaceae
Genus	: Centella
Species	: *Centella asiatica* (L.) Urb.
Nama lokal	: Pegagan

2. Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah herba pegagan (*C. asiatica*) yang diambil pada bulan Mei 2022 di Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang dengan titik koordinat -7,4826153, 110,3281828 pada ketinggian 841 mdpl. Sampel dibuat dari 3 kg herba pegagan segar yang dikeringkan menggunakan oven bersuhu 50℃ hingga kering. Tujuan dilakukannya pengeringan adalah untuk mengurangi kadar air di dalam simplisia supaya memperoleh simplisia yang tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Setelah dilakukan pengeringan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

simplisia dihaluskan serta diayak dengan ayakan mesh no. 40. Hasil serbuk yang diperoleh sebanyak 500,341 gram.

3. Optimasi Proses Ekstraksi Herba Pegagan

Optimasi proses ekstraksi herba pegagan dilakukan menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) dengan rancangan *Central Composite Design* (CCD). Faktor yang digunakan yaitu suhu (X_1) antara 40℃ sampai 50℃ dan waktu ekstraksi (X_2) yaitu 10 sampai 30 menit. Pada metode RSM ini terdapat 2 level yaitu rendah (-1) dan tinggi (+1). Pada faktor suhu digunakan level -1 suhu 40℃ dan level +1 suhu 50℃. Sedangkan untuk faktor waktu digunakan level -1 waktu 10 menit dan level 1 dengan waktu 30 menit. Titik pusat (*center point*) pada penelitian dapat diketahui setelah dilakukan pengolahan menggunakan aplikasi *Minitab 17*. Respon yang dioptimasi yaitu rendemen, total kandungan fenolik, dan total kandungan flavonoid. Rancangan optimasi dan hasil dari respon optimasi ekstraksi herba pegagan dengan menggunakan rancangan *Central Composite Design* (CCD) pada metode *Response Surface Methodology* (RSM) dapat dilihat pada (**Tabel 5.**) dan (**Tabel 6.**) berikut :

Tabel 5. Rancangan Optimasi Proses Ekstraksi Herba Pegagan

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

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Tabel 6. Hasil Respon Optimasi Proses Ekstraksi Herba Pegagan terhadap Suhu dan Waktu Ekstraksi

StdOrder	*RunOrder*	*PtType*	*Blocks*	Suhu (℃)	Waktu (menit)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	Rendemen (%)
1	1	1	1	40.0000	10.0000	44.340	4.979	9.322
2	2	1	1	50.0000	10.0000	45.114	5.671	9.517
3	3	1	1	40.0000	30.0000	41.992	4.796	10.987
4	4	1	1	50.0000	30.0000	40.392	4.690	11.781
5	5	0	1	45.0000	20.0000	48.674	6.722	11.747
6	6	0	1	45.0000	20.0000	47.900	6.759	11.969
7	7	0	1	45.0000	20.0000	49.577	6.631	11.839
8	8	-1	2	37.9289	20.0000	37.632	4.414	10.785
9	9	-1	2	52.0711	20.0000	38.921	4.589	11.023
10	10	-1	2	45.0000	5.8579	40.882	4.777	9.191
11	11	-1	2	45.0000	34.1421	46.275	5.889	12.247
12	12	0	2	45.0000	20.0000	50.970	6.796	11.899
13	13	0	2	45.0000	20.0000	47.178	6.244	11.988
14	14	0	2	45.0000	20.0000	50.093	6.984	12.120

Berdasarkan dari rancangan optimasi proses ekstraksi herba pegagan dengan variasi suhu dan waktu diperoleh 14 kombinasi perlakuan yang dilihat hasilnya berdasarkan nilai rendemen, total kandungan fenolik, dan total kandungan flavonoid. Titik tengah (*center point*) pada penelitian ini adalah pada suhu 45℃ dan waktu 20 menit. Hasil rendemen, total kandungan fenolik, dan total kandungan flavonoid yang diperoleh pada suhu dan waktu tersebut cenderung tinggi, yaitu dengan nilai rendemen sebesar 12,120%, total kandungan fenolik sebesar 50,970 mg GAE/g, dan total kandungan flavonoid sebesar 6,984 mg QE/g. Nilai rendemen tertinggi diperoleh pada ekstraksi dengan suhu 45℃ dan waktu 34 menit yaitu sebesar 12,247%. Ekstrak kental hasil dari ekstraksi dengan pelarut etil-asetat dan metode ultrasonik dapat dilihat pada (**Gambar 4.**).

Gambar 4. Ekstrak Etil-asetat Herba Pegagan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

4. Skrining Fitokimia

Hasil dari skrining fitokimia ekstrak etil-asetat herba pegagan diperoleh hasil bahwa ekstrak etil-asetat herba pegagan mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid, terpenid dan steroid, saponin, serta tannin. Hasil skrining fitokimia ekstrak etil-asetat herba pegagan dapat dilihat pada (**Tabel 7.**).

Tabel 7. Hasil Skrining Fitokimia

Sampel	**Alkaloid**			**Fe**	**F**	**TS**	**S**	**T**
	Mayer	Wagner	Dragendorff					
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan :

Fe = Fenolik

F = Flavonoid

TS = Terpenoid dan Steroid

S = Saponin

T = Tannin

(+) = Mengandung golongan senyawa uji

Pada pengujian senyawa alkaloid digunakan 3 pereaksi yaitu mayer, wagner, dragendorff. Adanya senyawa alkaloid dalam sampel ditandai dengan adanya endapan berwarna jingga pada sampel yang ditambah dengan pereaksi dragendorff, endapan berwarna putih atau kuning pada sampel yang ditambah dengan pereaksi mayer, dan endapan berwarna coklat pada sampel yang ditmbah dengan pereaksi wagner. Hasil dari pengujian senyawa alkaloid dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan menandakan bahwa dengan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

penambahan ketiga pereaksi tersebut menunjukkan hasil yang positif (+), sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etil-asetat herba pegagan mengandung senyawa alkaloid.

Pada pengujian senyawa fenolik digunakan pereaksi $FeCl_3$. Adanya senyawa fenolik dalam sampel ditandai dengan terbentuknya larutan berwarna merah, ungu, hijau, biru, atau hitam pekat. Sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan setelah direaksikan dengan pereaksi $FeCl_3$ terbentuk larutan berwarna hijau. Hal ini menunjukkan bahwa sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan mengandung senyawa fenolik.

Pada pengujian senyawa flavonoid dilakukan dengan penambahan asam klorida dan logam magnesium. Adanya senyawa flavon dalam sampel ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah hingga jingga pada larutan, senyawa flavonol atau flavonon ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah tua, dan adanya senyawa aglikon atau glikosida ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau hingga biru pada larutan. Sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan ketika ditambahkan dengan asam klorida dan logam magnesium terbentuk larutan berwarna hijau. Hal ini menunjukkan bahwa sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan mengandung senyawa flavonoid aglikon atau glikosida.

Pada pengujian senyawa terpenoid dan steroid digunakan pereaksi *Liebermann-Burchard*. Menurut Malec & Pamilio dalam Siadi, (2012) pereaksi *Liebermann-Burchard* dibuat dengan cara mereaksikan antara asam asetat anhidrida p.a (3 bagian) dengan asam sulfat p.a (1 bagian). Adanya senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, merah muda atau ungu pada larutan, dan adanya senyawa steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehijauan pada larutan. Sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan ketika ditambahkan dengan pereaksi *Liebermann-Burchard* terbentuk warna biru kehijauan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kandungan senyawa steroid dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan.

Pada pengujian senyawa saponin dilakukan dengan penambahan air panas dan dilakukan penggojogan. Adanya senyawa saponin dalam sampel

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil dengan tinggi 1 hingga 10 cm. Hasil dari pengujian senyawa saponin dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan menunjukkan hasil yang positif (+). Hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel tersebut terdapat kandungan senyawa saponin.

Pada pengujian senyawa tannin dilakukan dengan penambahan pereaksi $FeCl_3$. Adanya senyawa tannin dalam sampel ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru kehitaman pada larutan. Hasil dari pengujian senyawa tannin dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan menunjukkan hasil yang positif (+). Hal ini menunjukkan bahwa dalam sampel ekstrak etil-asetat tersebut mengandung senyawa tannin.

5. Rendemen Ekstrak Herba Pegagan

Dari hasil ekstraksi dengan menggunakan ultrasonik filtrat yang diperoleh kemudian disaring menggunakan corong *buchner* lalu dilakukan penguapan dengan menggunakan penangas air yang bersuhu 60℃. Alasan menggunakan penangas air yaitu supaya suhu tetap terkontrol dan senyawa dalam sampel tidak rusak. Hasil rendemen dari ekstrak etil-asetat herba pegagan yang diperoleh dapat dilihat pada (**Tabel 6.**) dimana hasil rendemen ekstrak etil-asetat herba pegagan yang diperoleh telah memenuhi syarat yang terdapat dalam Farmakope Herbal Indonesia (FHI) tahun 2017 yaitu tidak kurang dari 7,3% (Kementerian Kesehatan RI, 2017).

6. Total Kandungan Fenolik Ekstrak Herba Pegagan

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Asam Galat

Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang bertujuan untuk menentukan panjang gelombang pengukuran dimana kompleks antara asam galat dengan pereaksi *Folin-ciocalteu* memberikan nilai absorbansi yang optimal. Pengukuran suatu sampel pada panjang gelombang maksimum akan memberikan perubahan absorbansi yang paling besar untuk setiap satuan kadar. Sehingga jika dilakukan pengukuran ulang dan replikasi akan meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran. Pada penelitian yang telah dilakukan ini diperoleh nilai panjang gelombang maksimum

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

725 nm, artinya pada panjang gelombang tersebut nilai absorbansi dari kompleks antara asam galat dengan pereaksi *Folin-ciocalteu* terbaca secara maksimal.

b. Penentuan *Operating Time* Asam Galat

Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu pengukuran dari suatu senyawa yang diperoleh saat absorbansi paling stabil. *Operating time* ini perlu dilakukan karena senyawa yang akan diukur adalah senyawa kompleks yang terbentuk antara senyawa fenol dengan pereaksi *Folin-ciocalteu*. Apabila pengukuran absorbansi larutan dilakukan sebelum waktunya, maka kemungkinan reaksi yang terjadi belum sempurna. Penentuan *operating time* asam galat diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum 725 nm dan interval waktu pengukuran setiap 5 menit selama 2 jam. Hasil *operating time* diperoleh nilai absorbansi yang stabil pada menit ke 40 dengan nilai absorbansi 0,855. Hasil nilai absorbansi larutan asam galat pada saat dilakukan operating time dapat dilihat pada (**Tabel 8.**).

Tabel 8. Hasil Nilai Absorbansi dari *Operating Time*

Waktu (menit)	Absorbansi	Waktu (menit)	Absorbansi
0	0.762	65	0.855
5	0.821	70	0.854
10	0.835	75	0.855
15	0.838	80	0.854
20	0.847	85	0.854
25	0.853	90	0.854
30	0.853	95	0.854
35	0.854	100	0.855
40	0.855	105	0.855
45	0.855	110	0.855
50	0.855	115	0.854
55	0.855	120	0.854
60	0.855		

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

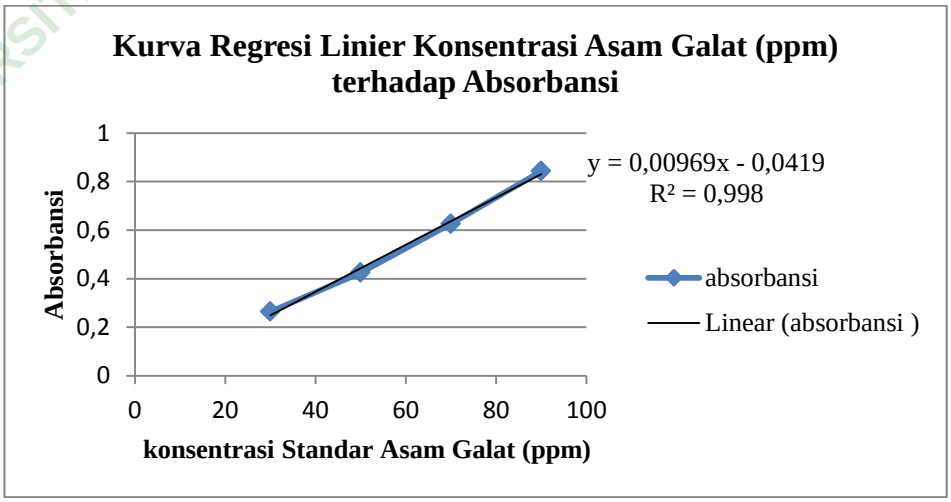
c. Penentuan Kurva Baku Asam Galat

Penentuan kurva baku asam galat dilakukan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai serapannya. Dimana hasil persamaan regresi linier dari kurva baku asam galat ini digunakan untuk memperhitungkan konsentrasi dari sampel. Hukum *lambert-beer* terpenuhi jika kurva baku yang diperoleh berbentuk garis lurus (Suharyanto & Prima, 2020).

Pada penelitian ini, konsentrasi asam galat yang digunakan untuk penentuan kurrva baku adalah 30 ppm, 50 ppm, 70 ppm, dan 90 ppm. Hal ini dilakukan supaya hasil dari nilai absorbansi memenuhi syarat pada hukum *lambert-beer* yaitu berkisar 0,2 hingga 0,8. Penentuan kurva baku larutan asam galat dilakukan dengan cara mengambil larutan dari berbagai seri konsentrasi tersebut kemudian direaksikan dengan enceran pereaksi *Folin-ciocalteu* dan NaOH 1% dan ditunggu selama 40 menit. Hasil nilai absorbansi kurva baku asam galat dengan menggunakan spektrofotometer dan panjang gelombang 725 nm dapat dilihat pada (**Tabel 9.**).

Tabel 9. Hasil Absorbansi Kurva Baku Asam Galat

Konsentrasi Standar Asam Galat (ppm)	Rata-rata Nilai Absorbansi ± SD
30	0,264 ± 0,016
50	0,425 ± 0,019
70	0,626 ± 0,014
90	0,843 ± 0,025



Gambar 5. Kurva Baku Konsentrasi Standar Asam Galat terhadap Absobansi

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Berdasarkan (**Gambar 5.**) tersebut dapat diketahui bahwa grafik yang terbentuk adalah garis lurus. Hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi dari larutan maka semakin tinggi pula nilai absorbansinya. Dari penentuan kurva baku asam galat diperoleh persamaan y = 0,009695x – 0,0419 dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,998. Nilai r ini menunjukkan hubungan yang linier antara dua variabel. Hasil dari penetapan kurva baku ini menunjukkan hasil yang linier antara konsentrasi dengan absorbansinya, karena nilai r yang diperoleh mendekati 1. Persamaan yang diperoleh tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar fenolik dalam sampel. Dimana y menyatakan nilai absorbansi dan x menyatakan kadar fenolik dalam sampel.

d. Penetapan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenolik total dilakukan dengan metode spektrofotometri. Prinsip dari penetapan kadar fenolik total ini adalah terjadinya reaksi oksidasi senyawa fenol dalam suasana basa oleh pereaksi *Folin-ciocalteu*, dimana dari reaksi tersebut akan menghasilkan kompleks fosfotungstat fosfomolibdenum yang berwarna biru. Hasil absorbansi dan kadar fenolik total ekstrak etil-asetat herba pegagan dapat dilihat pada (**Tabel 10.**).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN

Tabel 10. Hasil Absorbansi Sampel pada Penetapan Total Kandungan Fenolik

Sampel	Replikasi	Absorbansi	Sampel	Replikasi	Absorbansi
1	1	0.385	8	1	0.317
	2	0.391		2	0.326
	3	0.378		3	0.323
	4	0.397		4	0.325
2	1	0.395	9	1	0.333
	2	0.401		2	0.337
	3	0.396		3	0.328
	4	0.389		4	0.343
3	1	0.365	10	1	0.358
	2	0.358		2	0.353
	3	0.371		3	0.351
	4	0.366		4	0.355
4	1	0.351	11	1	0.408
	2	0.348		2	0.411
	3	0.346		3	0.402
	4	0.353		4	0.405
5	1	0.430	12	1	0.454
	2	0.425		2	0.447
	3	0.434		3	0.456
	4	0.430		4	0.451
6	1	0.425	13	1	0.420
	2	0.419		2	0.411
	3	0.432		3	0.416
	4	0.413		4	0.414
7	1	0.442	14	1	0.445
	2	0.435		2	0.439
	3	0.439		3	0.442
	4	0.438		4	0.448

7. Total Kandungan Flavonoid Ekstrak Herba Pegagan

   a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang bertujuan untuk menentukan panjang gelombang pengukuran dimana kompleks antara kuersetin dengan $AlCl_3$ memberikan nilai absorbansi yang optimal. Pengukuran suatu sampel pada panjang gelombang maksimum akan memberikan perubahan absorbansi yang paling besar untuk setiap satuan kadar, sehingga jika dilakukan pengukuran ulang dan replikasi akan meminimalkan terjadinya kesalahan pengukuran.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Pada penelitian yang telah dilakukan ini diperoleh nilai panjang gelombang maksimum 440 nm, artinya pada panjang gelombang tersebut nilai absorbansi dari kompleks antara kuersetin dengan $AlCl_3$ terbaca secara maksimal. Hasil tersebut telah sesuai dengan teori dimana panjang gelombang maksimum kuersetin berada pada rentang 400 hingga 500 nm (Sukmawati, 2018).

b. Penentuan Kurva Baku Kuersetin

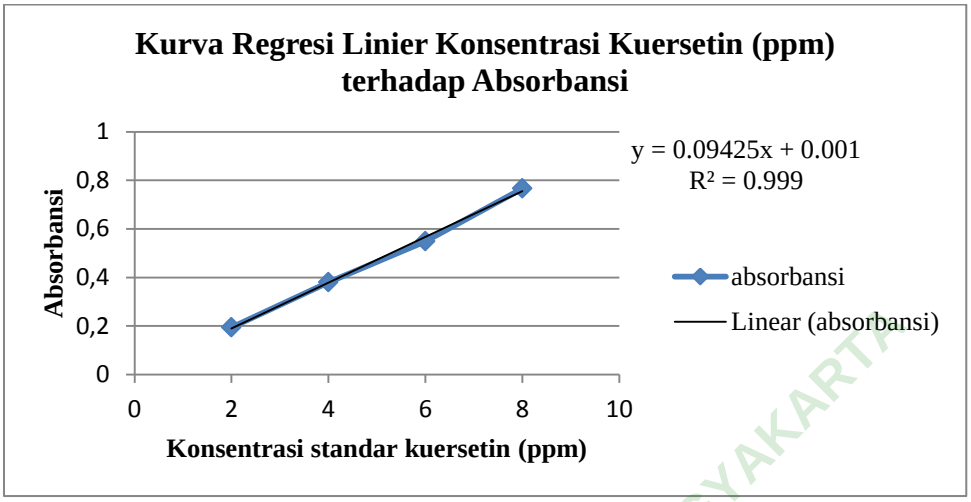
Penentuan kurva baku dari kuersetin dilakukan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai serapannya. Sehingga konsentrasi dari sampel dapat diketahui. Hukum *lambert-beer* terpenuhi jika kurva baku yang diperoleh berbentuk garis lurus (Suharyanto & Prima, 2020).

Pada penelitian ini, konsentrasi kuersetin yang digunakan untuk penentuan kurrva baku adalah 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 8 ppm. Hal ini dilakukan supaya hasil dari nilai absorbansi memenuhi syarat pada hukum *lambert-beer* yaitu berkisar 0,2 hingga 0,8. Penentuan kurva baku larutan kuersetin dilakukan dengan cara mengambil larutan dari berbagai seri konsentrasi tersebut kemudian direaksikan dengan larutan $AlCl_3$ 10%, Natrium asetat 1 M, dan akuades kemudian didiamkan selama 30 menit. Hasil nilai absorbansi kurva baku kuersetin dengan menggunakan spektrofotometer dan panjang gelombang 440 nm dapat dilihat pada (**Tabel 11.**).

Tabel 11. Hasil Absorbansi Kurva Baku Kuersetin

Konsentrasi Standar Kuersetin (ppm)	Rata-rata Nilai Absorbansi ± SD
2	0.194 ± 0.0037
4	0.380 ± 0.0104
6	0.549 ± 0.0213
8	0.766 ± 0.0191

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN



Gambar 6. Kurva Baku Konsentrasi Standar Kuersetin terhadap Absorbansi

Berdasarkan (**Gambar 6.**) tersebut dapat diketahui bahwa grafik yang terbentuk adalah garis lurus. Hal ini menunjukkan semakin tinggi konsentrasi dari larutan maka semakin tinggi pula nilai absorbansinya. Dari penentuan kurva baku kuersetin ini diperoleh persamaan y = 0,09425x + 0,001 dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,999. Nilai r ini menunjukkan hubungan yang linier antara dua variabel. Hasil dari penetapan kurva baku ini menunjukkan hasil yang linier antara konsentrasi dengan absorbansinya, karena nilai r yang diperoleh mendekati 1. Persamaan yang diperoleh tersebut selanjutnya digunakan untuk menghitung kadar flavonoid dalam sampel. Dimana y menyatakan nilai absorbansi dan x menyatakan kadar flavonoid dalam sampel.

c. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan dengan metode spektrofotometri. Prinsip dari penetapan kadar flavonoid total ini adalah terbentuknya suatu senyawa kompleks yang stabil antara alumunium klorida dengan gugus keto yang terdapat pada atom C4 dan gugus hidroksil pada atom C5 pada senyawa flavonol. Pembentukan senyawa kompleks ini menyebabkan terjadinya pergeseran panjang gelombang ke arah visibel dan ditandai dengan terbentuknya warna kuning pada larutan (Suharyanto & Prima, 2020). Penambahan natrium asetat pada sampel

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

berfungsi untuk menstabilkan senyawa kompleks yang terbentuk. Hasil absorbansi pada penetapan kadar flavonoid total ekstrak etil-asetat herba pegagan dapat dilihat pada (**Tabel 12.**).

Tabel 12. Hasil Absorbansi Sampel pada Penetapan Total Kandungan Flavonoid

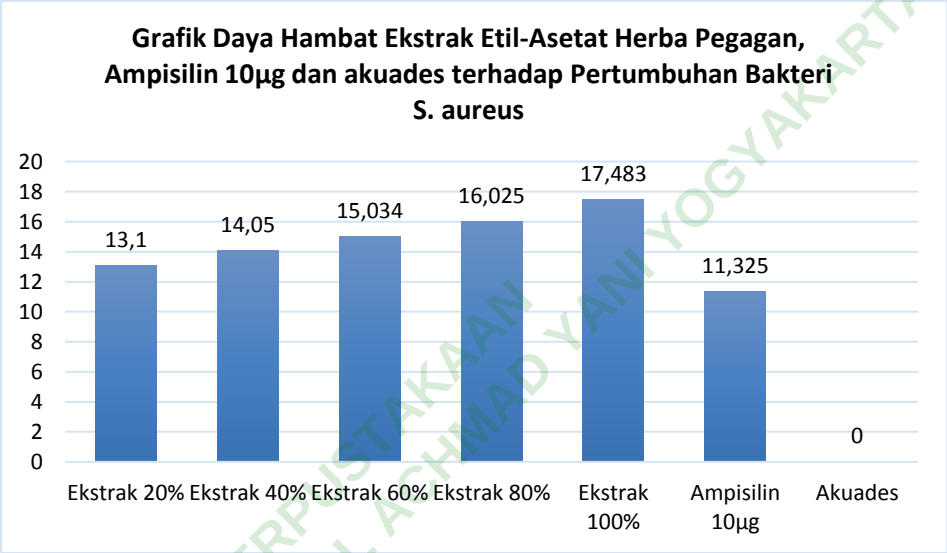
Sampel	Replikasi	Absorbansi	Sampel	Replikasi	Absorbansi
1	1	0.471	8	1	0.419
	2	0.475		2	0.416
	3	0.469		3	0.421
	4	0.466		4	0.412
2	1	0.534	9	1	0.438
	2	0.531		2	0.430
	3	0.537		3	0.435
	4	0.540		4	0.431
3	1	0.453	10	1	0.449
	2	0.458		2	0.456
	3	0.449		3	0.453
	4	0.452		4	0.447
4	1	0.443	11	1	0.561
	2	0.448		2	0.558
	3	0.444		3	0.554
	4	0.439		4	0.551
5	1	0.635	12	1	0.640
	2	0.629		2	0.645
	3	0.638		3	0.638
	4	0.636		4	0.643
6	1	0.640	13	1	0.588
	2	0.637		2	0.595
	3	0.643		3	0.591
	4	0.632		4	0.584
7	1	0.629	14	1	0.663
	2	0.618		2	0.657
	3	0.632		3	0.665
	4	0.625		4	0.652

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA
PERPUSTAKAAN

8. Uji Aktivitas Antibakteri

Pada uji aktivitas antibakteri dihitung diameter zona hambat cakram yang berisi antibiotik ampisilin 10 mikrogram (kontrol positif), cakram berisi akuades (kontrol negatif) dan cakram yang berisi sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Hasil rata-rata diameter zona hambat kemudian diklasifikasikan dengan respon hambatan pertumbuhan bakteri

menurut Davis dan Stout dalam Pangouw *et al*., (2020) yaitu jika diameter zona terang >20 mm maka respon hambatan pertumbuhan sangat kuat, jika diameter zona terang 11-20 mm maka respon hambatan pertumbuhan kuat, jika diameter zona terang 5-10 mm maka respon hambatan pertumbuhan sedang, dan jika diameter zona terang <5 mm maka respon hambatan pertumbuhan kurang.



Gambar 7. Grafik Hasil Rata-rata Uji Daya Hambat Bakteri dari Ekstrak Etil-asetat Herba Pegagan, Ampisilin 10 mikrogram, dan Akuades

Tabel 13. Hasil Uji Zona Hambat Ekstrak Etil-asetat Herba Pegagan dengan Konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, Ampisilin 10 mikrogram, dan Akuades

Konsentrasi	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
20%	13.100	Kuat
40%	14.050	Kuat
60%	15.034	Kuat
80%	16.025	Kuat
100%	17.483	Kuat
Ampisilin 10 µg	11.325	Kuat
Akuades	0	Kurang

Berdasarkan hasil uji zona hambat ekstrak etil-asetat herba pegagan dengan berbagai konsentrasi tersebut dapat dilihat bahwa ekstrak etil-asetat herba pegagan memiliki respon hambatan pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang kuat.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

9. Analisis Data

a. Rendemen

Analisis uji ANOVA dilakukan untuk mengetahui bahwa rendemen yang diperoleh dapat merespon perlakuan yang telah diberikan yaitu dengan menggunakan variasi suhu dan waktu ekstraksi. Hasil dari analisis uji ANOVA dapat dilihat pada (**Gambar 8.**)

Response Surface Regression: % Rendemen versus Blocks, Suhu (C), Waktu (menit)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	15.1428	2.52379	98.34	0.000
Blocks	1	0.3123	0.31231	12.17	0.010
Linear	2	8.7292	4.36459	170.07	0.000
Suhu (C)	1	0.2196	0.21965	8.56	0.022
Waktu (menit)	1	8.5095	8.50954	331.59	0.000
Square	2	6.0116	3.00578	117.12	0.000
Suhu (C)*Suhu (C)	1	2.7834	2.78340	108.46	0.000
Waktu (menit)*Waktu (menit)	1	3.6853	3.68532	143.60	0.000
2-Way Interaction	1	0.0897	0.08970	3.50	0.104
Suhu (C)*Waktu (menit)	1	0.0897	0.08970	3.50	0.104
Error	7	0.1796	0.02566		
Lack-of-Fit	3	0.1300	0.04334	3.49	0.129
Pure Error	4	0.0496	0.01240		
Total	13	15.3224			

Gambar 8. Hasil Analisis ANOVA Rendemen Herba Pegagan

Berdasarkan hasil analisis ANOVA tersebut menunjukkan bahwa nilai *p-value* model adalah sebesar 0,000, dimana nilai *p-value* ini lebih kecil dari nilai signifikansi yaitu 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa jumlah rendemen yang didapatkan dari hasil ekstraksi terdapat perbedaan yang signifikan. Perbedaan hasil rendemen yang diperoleh ini merupakan respon terhadap perlakuan yang diberikan selama proses ekstraksi berlangsung, yaitu adanya perbedaan suhu dan waktu yang digunakan.

Kesesuaian model yang digunakan dapat dilihat dari nilai *Lack-of-Fit* berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan. Menurut Aulia dalam Shofa, (2019) model yang digunakan dianggap sesuai jika nilai *p-value* pada uji simpangan dari model menunjukkan hasil yang tidak nyata atau tidak signifkan (*p-value* > 0,05). Nilai *p-value Lack-of-Fit* yang diperoleh yaitu 0,129, dimana hasil ini lebih besar dari nilai signifikansi. Hal ini menunjukkan bahwa model yang dipilih telah sesuai dan menunjukkan adanya kesesuaian antara data respon dengan model.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

```
Model Summary

        S    R-sq  R-sq(adj)  R-sq(pred)
0.160197  98.83%     97.82%      92.19%
```

Gambar 9. ***Output Model Summary*** **Rendemen Herba Pegagan**

Berdasarkan (**Gambar 9.**) tersebut dapat diketahui bahwa nilai koefisien determinasi (*R-squared*) dikategorikan baik yaitu sebesar 98,83% atau 0,9883. Nilai *R-squared* ini menunjukkan bahwa 98,83% keragaman dari rendemen yang diperoleh ini dipengaruhi oleh suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi. Sisa nilai *R-squared* yaitu 1,17% yang menunjukkan bahwa keragaman rendemen kemungkinan dipengaruhi oleh faktor lain di luar perlakuan yang diamati dalam penelitian. Nilai *R-squared* (*adj*) menunjukkan keeratan antara dua faktor yaitu faktor suhu dan waktu dengan respon yang dihasilkan. Berdasarkan percobaan diperoleh nilai *R-squared* (*adj*) sebesar 97,82%. Dimana hal ini menyatakan bahwa faktor suhu dan waktu berkaitan erat dengan respon rendemen yang dihasilkan.

Berdasarkan analisis data pada *software Minitab* 17 dengan program *Design Expert* diperoleh persamaan regresi dalam bentuk variabel sebenarnya yang menggambarkan pengaruh dari suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi herba pegagan dengan pelarut etil-asetat terhadap respon rendemen, yaitu sebagai berikut :

$Y = -41.49 + 2.183\ X1 + 0.2509\ X2 - 0.02456\ X1^2 - 0.007064\ X2^2 + 0.00299\ X1X2$

Keterangan:

Y = rendemen ekstrak etil-asetat herba pegagan yang dihasilkan

X_1 = suhu (˚C)

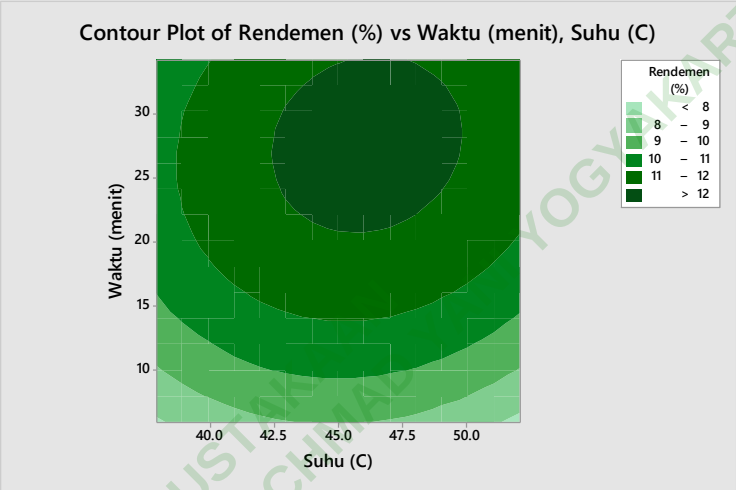
X_2 = waktu (menit)

Persamaan regresi tersebut menunjukkan bahwa suhu (X_1) dan waktu (X_2) yang digunakan pada proses ekstraksi memiliki pengaruh yang nyata terhadap hasil rendemen (Y) yang diperoleh. Hal ini dapat

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

dilihat dari nilai koefisien X_1 dan nilai koefisien X_2 yang memiliki nilai koefisien lebih besar serta tanda positif (+) pada nilai kedua variabel tersebut.

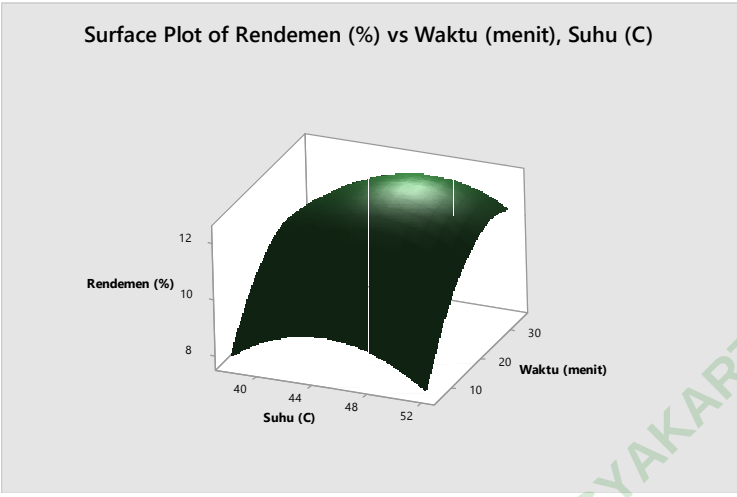
Hubungan antara faktor suhu dan waktu ekstraksi dengan rendemen ekstrak etil-asetat herba pegagan digambarkan dengan grafik *contour plot* dan *surface plot* pada (**Gambar 10.**) dan (**Gambar 11.**).



Gambar 10. Grafik *Contour Plot* dari Rendemen (%) dengan waktu (menit) dan suhu (℃)

Berdasarkan (**Gambar 10.**) grafik *contour plot* menghasilkan warna daerah yang berbeda, hal ini menunjukkan adanya perbedaan nilai rendemen yang dihasilkan dengan adanya kombinasi suhu dan waktu ekstraksi yang berbeda. Semakin gelap warna hijau pada daerah tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi persentase rendemen yang dihasilkan. Sebaliknya semakin terang warna hijau pada daerah tersebut maka akan semakin rendah persentase rendemen yang dihasilkan. Tercapainya titik optimum pada penelitian ini ditunjukkan dengan warna daerah hijau gelap dan diperoleh nilai rendemen yang maksimal yaitu >12%.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN



Gambar 11. Grafik *Surface Plot* dari Rendemen (%) dengan waktu (menit) dan suhu (℃)

Grafik *surface plot* pada (**Gambar 11.**) membentuk permukaan kurva parabola terbuka ke bawah yang menunjukkan bahwa peningkatan nilai rendemen ekstrak etil-asetat herba pegagan yang diperoleh berbanding lurus dengan peningkatan suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi hingga mencapai titik yang optimal. Perbedaan ketinggian yang terbentuk pada permukaan kurva terjadi karena nilai respon rendemen yang dihasilkan berbeda pada setiap kombinasi perlakuan yang dilakukan. Semakin tinggi bentuk permukaan yang dihasilkan maka semakin besar persentase rendemen yang dihasilkan, sebaliknya semakin rendah bentuk daerah permukaan maka semakin kecil nilai rendemen yang dihasilkan. Hal ini menunjukkan bahwa suhu dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap hasil rendemen yang diperoleh.

b. Total Kandungan Fenolik

Analisis uji ANOVA dilakukan untuk mengetahui bahwa total kandungan fenolik yang diperoleh dapat merespon perlakuan yang telah diberikan yaitu dengan menggunakan variasi suhu dan waktu ekstraksi. Hasil dari analisis uji ANOVA dapat dilihat pada (**Gambar 12.**).

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Response Surface Regression: TPC (mgGAE/g) versus Blocks, Suhu (C), Waktu (menit)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	206.186	34.364	5.52	0.021
Blocks	1	2.604	2.604	0.42	0.538
Linear	2	0.163	0.081	0.01	0.987
Suhu (C)	1	0.124	0.124	0.02	0.892
Waktu (menit)	1	0.039	0.039	0.01	0.939
Square	2	202.010	101.005	16.24	0.002
Suhu (C)*Suhu (C)	1	176.323	176.323	28.34	0.001
Waktu (menit)*Waktu (menit)	1	36.902	36.902	5.93	0.045
2-Way Interaction	1	1.409	1.409	0.23	0.649
Suhu (C)*Waktu (menit)	1	1.409	1.409	0.23	0.649
Error	7	43.550	6.221		
Lack-of-Fit	3	34.259	11.420	4.92	0.079
Pure Error	4	9.291	2.323		
Total	13	249.736			

Gambar 12. Hasil Analisis ANOVA Total Kandungan Fenolik

Berdasarkan hasil analisis ANOVA tersebut menunjukkan bahwa nilai *p-value* model pada respon total kandungan fenolik adalah sebesar 0,021, dimana nila *p-value* ini lebih kecil dari nilai signifikansi yaitu 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa total kandungan fenolik yang diperoleh dari hasil ekstraksi terdapat perbedaan yang signifikan. Perbedaan hasil total kandungan fenolik yang diperoleh ini merupakan respon terhadap perlakuan yang diberikan selama proses ekstraksi berlangsung, yaitu adanya perbedaan suhu dan waktu yang digunakan.

Kesesuaian model yang digunakan dapat dilihat dari nilai *Lack-of-Fit* berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan. Menurut Aulia dalam Shofa, (2019) model yang digunakan dianggap sesuai jika nilai *p-value* pada uji simpangan dari model menunjukkan hasil yang tidak nyata atau tidak signifkan (*p-value* > 0.05). Nilai *p-value Lack-of-Fit* yang diperoleh yaitu 0,079, dimana hasil ini lebih besar dari nilai signifikansi. Hal ini menunjukkan bahwa model yang dipilih telah sesuai dan menunjukkan adanya kesesuaian antara data respon dengan model.

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
2.49427	82.56%	67.61%	0.00%

Gambar 13. *Output Model Summary* Total Kandungan Fenolik

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Berdasarkan (**Gambar 13.**) tersebut dapat diketahui bahwa nilai koefisien determinasi (*R-squared*) dikategorikan baik yaitu sebesar 82,56% atau 0,8256. Nilai *R-squared* ini menunjukkan bahwa 82,56% keragaman dari hasil total kandungan fenolik yang diperoleh dipengaruhi oleh suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi. Sisa dari nilai *R-squared* yaitu 17,44% yang menunjukkan bahwa keragaman hasil total kandungan fenolik kemungkinan dipengaruhi oleh faktor lain di luar perlakuan yang diamati dalam penelitian. Nilai *R-squared* (*adj*) menunjukkan keeratan antara dua faktor yaitu faktor suhu dan waktu dengan respon. Berdasarkan percobaan diperoleh nilai *R-squared* (*adj*) sebesar 67,61%. Dimana hal ini menyatakan bahwa faktor suhu dan waktu berkaitan erat dengan respon nilai total kandungan fenolik yang dihasilkan.

Berdasarkan analisis data pada *software Minitab* 17 dengan program *Design Expert* diperoleh persamaan regresi dalam bentuk variabel sebenarnya yang menggambarkan pengaruh dari suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi herba pegagan dengan pelarut etil-asetat terhadap total kandungan senyawa fenolik dalam sampel, yaitu sebagai berikut :

$$Y = -367.6 + 17.85\ X1 + 1.44\ X2 - 0.1955\ X1^2 - 0.02235\ X2^2 - 0.0119\ X1X2$$

Keterangan:

Y = kadar fenolik total ekstrak etil-asetat herba pegagan yang dihasilkan

X_1 = suhu (˚C)

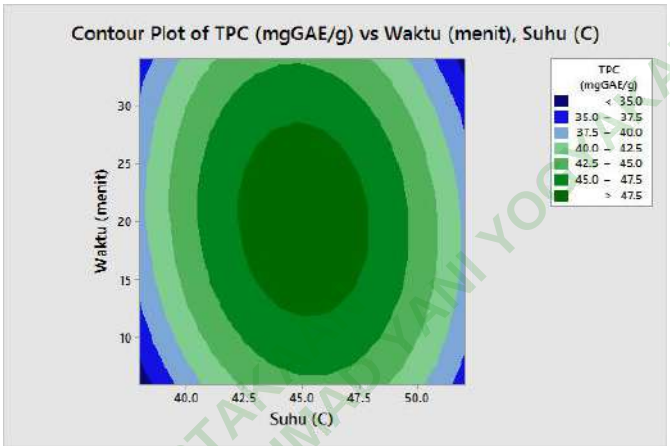
X_2 = waktu (menit)

Persamaan regresi tersebut menunjukkan bahwa suhu (X_1) dan waktu (X_2) yang digunakan pada proses ekstraksi memiliki pengaruh yang nyata terhadap hasil total kandungan fenolik (Y) yang didapatkan. Hal ini dapat dilihat dari nilai koefisien X_1 dan nilai koefisien X_2 yang

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

memiliki nilai koefisien lebih besar serta tanda positif (+) pada nilai kedua variabel tersebut.

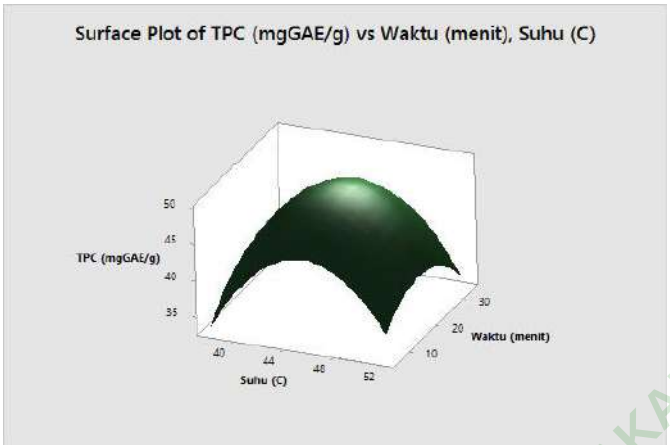
Hubungan antara faktor suhu (℃) dan waktu ekstraksi (menit) dengan total kandungan fenolik dalam ekstrak etil-asetat herba pegagan digambarkan dengan grafik *contour plot* dan *surface plot* pada (**Gambar 14.**) dan (**Gambar 15.**).



Gambar 14. Grafik *Contour Plot* dari Total Kandungan Fenolik (mgGAE/g) dengan waktu (menit) dan suhu (℃)

Berdasarkan (**Gambar 14.**) grafik *contour plot* menghasilkan warna daerah yang berbeda, hal ini menunjukkan adanya perbedaan nilai total kandungan senyawa fenolik dalam sampel yang dihasilkan dengan adanya kombinasi suhu dan waktu ekstraksi yang berbeda. Warna biru yang terbentuk pada *contour plot* tersebut menunjukkan bahwa nilai total kandungan fenolik dalam sampel rendah dan warna hijau yang terbentuk pada *contour plot* menunjukkan bahwa nilai total kandungan fenolik dalam sampel tinggi. Semakin gelap warna hijau pada daerah tersebut menunjukkan bahwa nilai total kandungan fenolik dalam sampel semakin besar dan semakin gelap warna biru yang dihasilkan maka semakin rendah pula total kandungan fenolik dalam sampel. Tercapainya titik optimal pada penelitian ini ditunjukkan dengan daerah yang berwarna hijau gelap dan diperoleh nilai total kandungan fenolik yang maksimal yaitu >47,5 mgGAE/g.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN



Gambar 15. Grafik *Surface Plot* dari Total Kandungan Fenolik (mgGAE/g) dengan waktu (menit) dan suhu (C)

Grafik *surface plot* pada (**Gambar 15.**) membentuk permukaan kurva parabola yang terbuka ke bawah. Gambar tersebut menunjukkan bahwa nilai total kandungan senyawa fenolik yang maksimal dihasilkan pada kombinasi suhu dan waktu optimal yang telah ditetapkan. Peningkatan nilai total kandungan fenolik dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan yang diperoleh berbanding lurus dengan peningkatan suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi hingga mencapai titik yang optimal. Ketinggian bentuk permukaan kurva berbeda karena nilai total kandungan senyawa fenolik yang dihasilkan juga berbeda pada setiap kombinasi faktor suhu dan waktu ekstraksi yang dilakukan. Semakin tinggi bentuk permukaan yang dihasilkan maka semakin besar total kandungan fenolik dalam sampel, sebaliknya semakin rendah bentuk daerah permukaan maka semakin kecil pula nilai total kandungan fenolik dalam sampel. Hal ini menunjukkan bahwa suhu dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap hasil total kandungan fenolik yang dihasilkan.

c. Total Kandungan Flavonoid

Analisis uji ANOVA dilakukan untuk mengetahui bahwa total kandungan flavonoid yang diperoleh dapat merespon perlakuan yang telah diberikan yaitu dengan menggunakan variasi suhu dan waktu

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

ekstraksi. Hasil dari analisis uji ANOVA dapat dilihat pada (**Gambar 16.**).

Response Surface Regression: TFC (mgQE/g) versus Blocks, Suhu (C), Waktu (menit)

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	10.9987	1.83312	10.23	0.004
Blocks	1	0.0242	0.02419	0.14	0.724
Linear	2	0.1077	0.05385	0.30	0.749
Suhu (C)	1	0.0868	0.08684	0.48	0.509
Waktu (menit)	1	0.0209	0.02087	0.12	0.743
Square	2	10.7076	5.35380	29.88	0.000
Suhu (C)*Suhu (C)	1	8.3362	8.33621	46.53	0.000
Waktu (menit)*Waktu (menit)	1	3.0887	3.08868	17.24	0.004
2-Way Interaction	1	0.1592	0.15920	0.89	0.377
Suhu (C)*Waktu (menit)	1	0.1592	0.15920	0.89	0.377
Error	7	1.2542	0.17917		
Lack-of-Fit	3	0.9557	0.31857	4.27	0.097
Pure Error	4	0.2985	0.07462		
Total	13	12.2529			

Gambar 16. Hasil Analisis ANOVA Total Kandungan Flavonoid

Berdasarkan hasil analisis ANOVA tersebut menunjukkan bahwa nilai *p-value* pada respon total kandungan flavonoid adalah sebesar 0,004, dimana nilai *p-value* ini lebih kecil dari nilai signifikansi yaitu 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa total kandungan flavonoid dalam sampel yang diperoleh dari hasil ekstraksi terdapat perbedaan yang signifikan. Perbedaan hasil total kandungan flavonoid yang diperoleh ini merupakan respon terhadap perlakuan yang diberikan selama proses ekstraksi berlangsung, yaitu adanya perbedaan suhu dan waktu yang digunakan.

Kesesuaian model yang digunakan dapat dilihat dari nilai *Lack-of-Fit* berdasarkan hasil analisis yang telah dilakukan. Menurut Aulia dalam Shofa, (2019) model yang digunakan dianggap sesuai jika nilai *p-value* pada uji simpangan dari model menunjukkan hasil yang tidak nyata atau tidak signifkan (*p-value* > 0,05). Nilai *p-value Lack-of-Fit* yang diperoleh yaitu 0,097, dimana hasil ini lebih besar dari nilai signifikansi. Hal ini menunjukkan bahwa model yang dipilih telah sesuai dan menunjukkan adanya kesesuaian antara data respon dengan model.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

```
Model Summary

        S    R-sq  R-sq(adj)  R-sq(pred)
0.423289  89.76%     80.99%      11.39%
```

Gambar 17. *Output Model Summary* Total Kandungan Flavonoid

Berdasarkan gambar tersebut dapat diketahui bahwa nilai koefisien determinasi (*R-squared*) dikategorikan baik yaitu sebesar 89,76% atau 0,8976. Nilai *R-squared* ini menunjukkan bahwa 89,76% keragaman dari hasil total kandungan flavonoid yang diperoleh dipengaruhi oleh suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi. Sisa dari nilai *R-squared* yaitu 10,24% yang menunjukkan bahwa keragaman hasil total kandungan flavonoid kemungkinan dipengaruhi oleh faktor lain di luar perlakuan yang diamati dalam penelitian. Nilai *R-squared* (*adj*) menunjukkan keeratan antara dua faktor yaitu faktor suhu dan waktu dengan respon. Berdasarkan percobaan diperoleh nilai *R-squared* (*adj*) sebesar 80,99%. Dimana hal ini menyatakan bahwa faktor suhu dan waktu berkaitan erat dengan respon nilai total kandungan flavonoid yang dihasilkan.

Berdasarkan analisis data pada *software Minitab* 17 dengan program *Design Expert* diperoleh persamaan regresi dalam bentuk variabel sebenarnya yang menggambarkan pengaruh dari suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi herba pegagan dengan pelarut etil-asetat terhadap total kandungan senyawa flavonoid dalam sampel, yaitu sebagai berikut :

$$Y = -86.6 + 3.926\ X1 + 0.443\ X2 - 0.04250\ X1^2 - 0.00647\ X2^2 - 0.00399\ X1X2$$

Keterangan:

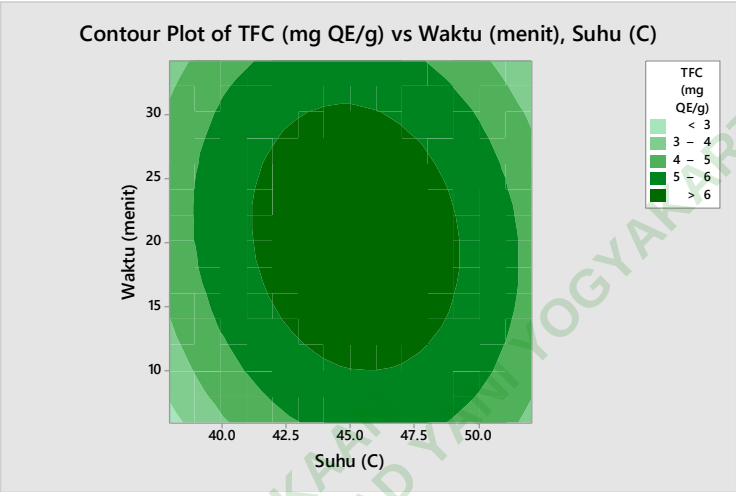
Y = kadar flavonoid total ekstrak etil-asetat herba pegagan yang dihasilkan

X_1 = suhu (˚C)

X_2 = waktu (menit)

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

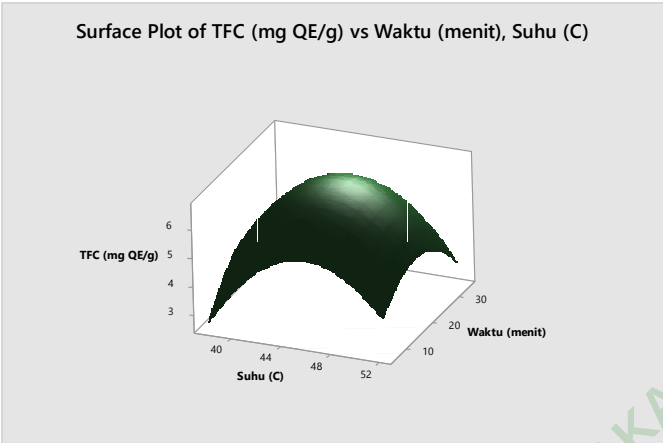
Hubungan antara faktor suhu (℃) dan waktu ekstraksi (menit) dengan total kandungan flavonoid dalam ekstrak etil-asetat herba pegagan digambarkan dengan grafik *contour plot* dan *surface plot* pada (**Gambar 18.**) dan (**Gambar 19.**).



Gambar 18. Grafik *Contour Plot* dari Total Kandungan Flavonoid (mgQE/g) dengan waktu (menit) dan suhu (℃)

Berdasarkan (**Gambar 18.**) grafik *contour plot* menghasilkan warna daerah yang berbeda, hal ini menunjukkan adanya perbedaan nilai total kandungan senyawa flavonoid dalam sampel yang dihasilkan dengan adanya kombinasi suhu dan waktu ekstraksi yang berbeda. Warna hijau muda yang terbentuk pada *contour plot* tersebut menunjukkan bahwa nilai total kandungan flavonoid dalam sampel rendah dan warna hijau tua yang terbentuk pada *contour plot* menunjukkan bahwa nilai total kandungan flavonoid dalam sampel tinggi. Titik optimal pada penelitian ini ditunjukkan dengan daerah *contour plot* yang berwarna hijau tua dan diperoleh nilai total kandungan flavonoid yang maksimal yaitu >6 mgQE/g.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN



Gambar 19. Grafik *Surface Plot* dari Total Kandungan Flavonoid (mgQE/g) dengan waktu (menit) dan suhu (℃)

Grafik *surface plot* pada (**Gambar 19.**) membentuk permukaan kurva parabola yang terbuka ke bawah. Gambar tersebut menunjukkan bahwa nilai total kandungan senyawa flavonoid yang maksimal dihasilkan pada kombinasi suhu dan waktu optimal yang telah ditetapkan. Peningkatan nilai total kandungan flavonoid dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan yang diperoleh berbanding lurus dengan peningkatan suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi hingga mencapai titik yang optimal. Ketinggian bentuk permukaan kurva berbeda karena nilai total kandungan senyawa flavonoid yang dihasilkan juga berbeda pada setiap kombinasi faktor suhu dan waktu ekstraksi yang dilakukan. Semakin tinggi bentuk permukaan yang dihasilkan maka semakin besar total kandungan flavonoid dalam sampel, sebaliknya semakin rendah bentuk daerah permukaan maka semakin kecil pula nilai total kandungan flavonoid dalam sampel. Hal ini menunjukkan bahwa suhu dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap hasil total kandungan flavonoid yang dihasilkan.

d. Solusi Optimasi Ekstraksi Terhadap Respon Rendemen, Total Kandungan Fenolik, dan Total Kandungan Flavonoid

Solusi optimasi ekstraksi herba pegagan terhadap respon rendemen, total kandungan fenolik (TPC), dan total kandungan flavonoid (TFC) didapatkan dengan cara menentukan kriteria dari respon yang

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

ditetapkan tersebut. Kriteria dari masing-masing respon yang dipilih yaitu respon dengan nilai yang tertinggi (maksimal). Karena diharapkan nilai dari respon rendemen, TPC, dan TFC memperoleh nilai yang tertinggi yang mendekati batas atas pada setiap respon.

Solution

Solution	Suhu (C)	Waktu (menit)	TFC (mgQE/g) Fit	TPC (mgGAE/g) Fit	% Rendemen Fit	Composite Desirability
1	45.2143	22.7141	6.65125	48.9090	12.1626	0.894486

Gambar 20. Solusi Titik Optimal Ekstraksi Herba Pegagan Terhadap Respon Rendemen, Total Kandungan Fenolik, dan Total Kandungan Flavonoid

Berdasarkan (**Gambar 20.**) tersebut dapat diketahui bahwa suhu yang disarankan untuk ekstraksi adalah 45,2143℃ dan waktu yang disarankan untuk ekstraksi adalah 22,7141 menit. Dari kombinasi suhu dan waktu tersebut akan mendapatkan hasil rendemen sebesar 12,1626%, nilai total kandungan fenolik sebesar 48,9090 mg GAE/g, dan nilai total kandungan flavonoid sebesar 6,65125 dengan nilai *desirability* 0,894486 atau tingkat ketepatan 89,4486%. Menurut Raissi dan Farzani dalam Shofa, (2019) nilai *desirability* merupakan nilai fungsi dari tujuan optimasi yang menunjukkan kemampuan program untuk memenuhi keinginan berdasarkan kriteria yang telah ditetapkan pada produk akhir. Nilai desirability yang diperoleh yaitu 0,894486 dan nilai ini mendekati 1 artinya pengaruh suhu dan waktu yang diberikan pada proses ekstraksi terhadap respon telah mendekati nilai target sesuai optimasi.

e. Validasi Model RSM

Validasi model RSM dilakukan dengan cara dilakukan kembali ekstraksi dengan suhu dan waktu yang disarankan pada saat optimasi RSM. Hasil dari ekstraksi sesuai dengan solusi optimasi yang disarankan dapat dilihat pada (**Tabel 14.**) berikut :

Optimal					
Suhu	Waktu	Rendemen (%)	TFC (mg QE/g)	TPC (mg GAE/g)	Uji T
45.2143	22.7141	12.173	6.745	49.500	0.991

Tabel 14. Hasil Ekstraksi Herba Pegagan Sesuai dengan Solusi Optimasi

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Berdasarkan (**Tabel 14.**) tersebut didapatkan nila rendemen sebesar 12,173%, total kandungan fenolik (TPC) sebesar 49,500 mgGAE/g, dan total kandungan flavonoid (TFC) sebesarr 6,745 mgQE/g. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan prediksi RSM, dan diperkuat dengan hasil dari uji statistika *Two-Sample T-test*. Dimana nilai *p-value* dari uji *T-test* tersebut adalah 0,991. Hasil *p-value* ini lebih besar dari nilai signifikansi (0,05), artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil prediksi optimasi pada metode RSM dengan hasil validasi metode.

B. Pembahasan

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari variasi suhu dan waktu ekstraksi dengan menggunakan metode ultrasonik terhadap respon rendemen, total kandungan fenolik (TPC), dan total kandungan flavonoid (TFC) dalam sampel. Untuk mendapatkan hasil rendemen, total kandungan fenolik, dan total kandungan flavonoid yang maksimal maka perlu dilakukan optimasi proses ekstraksi dengan mendesain 2 faktor yaitu faktor suhu dan waktu menggunakan metode *Respon Surface Methodology* (RSM) dengan rancangan *Central Composite Design* (CCD). Metode RSM digunakan untuk mencari kondisi ekstraksi dengan variasi suhu dan waktu yang optimal. Hasil dari rancangan proses ekstraksi dengan mendesain faktor suhu dan waktu tersebut diperoleh 14 kombinasi perlakuan, dimana dari 14 kombinasi perlakuan tersebut terdapat titik pusat (*center point*) yang nantinya akan menghasilkan rendemen, total kandungan fenolik, dan total kandungan flavonoid yang maksimal.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil rendemen tertinggi diperoleh pada ekstraksi dengan suhu 45℃ dan waktu 34 menit yaitu sebesar 12,247% dan rendemen dengan nilai terendah diperoleh pada suhu 45℃ dan waktu 6 menit yaitu sebesar 9,191%. Dengan naiknya suhu yang digunakan untuk ekstraksi maka dapat mengakibatkan molekul dari pelarut untuk bergerak dengan cepat dan acak, sehingga memudahkan pelarut untuk berdifusi masuk ke dalam pori-pori bahan yang diekstraksi dan bahan dapat larut dengan sempurna. Semakin lamanya waktu yang digunakan untuk ekstraksi juga mengakibatkan kontak antara pelarut dengan bahan akan semakin lama dan proses difusi akan semakin optimal,

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

sehingga rendemen yang dihasilkan juga akan semakin banyak (Shofa, 2019). Nilai rendemen yang rendah diakibatkan karena suhu yang digunakan terlalu rendah dan waktu kontak antara pelarut dengan bahan singkat, sehingga proses difusi pelarut ke dalam bahan kurang maksimal dan mengakibatkan hasil yang diperoleh juga kurang maksimal (Yuliantari *et al*., 2017). Hubungan antara faktor suhu dan waktu ekstraksi dengan rendemen ekstrak etil-asetat herba pegagan digambarkan dengan grafik *contour plot* dan *surface plot*. Tujuan digambarkan dengan grafik *contour plot* adalah untuk menggambarkan pengaruh dari variasi suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi terhadap besarnya rendemen melalui warna yang berbeda (Anwar *et al*., 2021). Pada grafik *contour plot* dihasilkan warna daerah yang berbeda-beda. Adanya perbedaan warna daerah menunjukkan persentase rendemen yang berbeda pada setiap perlakuan yang disebabkan karena suhu dan waktu ekstraksi yang berbeda. Semakin gelap warna hijau yang dihasilkan pada daerah tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi persentase rendemen yang dihasilkan. Sebaliknya semakin terang warna hijau yang dihasilkan pada daerah tersebut maka akan semakin rendah persentase rendemen yang dihasilkan. Tercapainya titik optimum pada penelitian ditunjukkan oleh daerah yang berwarna hijau gelap dan diperoleh nilai rendemen yang maksimal yaitu >12%. Grafik *surface plot* memiliki tujuan untuk membantu visualisasi besarnya respon pada setiap perlakuan dengan variasi suhu dan waktu yang berbeda melalui kelengkungan pada plot 3 dimensi (Anwar *et al*., 2021). Berdasarkan grafik *surface plot* dapat diketahui bahwa meningkatnya nilai rendemen ekstrak etil-asetat herba pegagan yang diperoleh berbanding lurus dengan meningkatnya waktu dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi. Hal ini menunjukkan bahwa suhu dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap hasil rendemen yang diperoleh.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil total kandungan senyawa fenolik tertinggi diperoleh pada ekstraksi dengan suhu 45℃ dan waktu 20 menit yaitu 50,970 mgGAE/g, dimana suhu dan waktu tersebut merupakan titik optimal dari kombinasi perlakuan pada penelitian ini. Hasil nilai total kandungan fenolik terendah diperoleh pada suhu 38℃ dan waktu 20 menit yaitu

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

sebesar 37,632 mgGAE/g. Hubungan antara faktor suhu dan waktu ekstraksi dengan total kandungan senyawa fenolik dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan digambarkan dengan grafik *contour plot* dan *surface plot*. Tujuan digambarkan dengan grafik *contour plot* adalah untuk menggambarkan pengaruh dari variasi suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi terhadap besarnya total kandungan senyawa fenolik dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan melalui perbedaan warna yang terbentuk (Anwar *et al*., 2021). Warna yang terbentuk pada grafik *contour plot* berbeda-beda, karena nilai total kandungan senyawa fenolik dalam sampel yang dihasilkan dengan adanya kombinasi suhu dan waktu ekstraksi juga berbeda. Warna yang terbentuk pada grafik *contour plot* yaitu biru yang menunjukkan bahwa nilai total kandungan fenolik dalam sampel rendah dan hijau menunjukkan bahwa nilai total kandungan fenolik dalam sampel tinggi. Semakin gelap warna hijau yang terbentuk menunjukkan bahwa nilai total kandungan fenolik dalam sampel semakin besar dan semakin gelap warna biru yang dihasilkan maka semakin rendah pula total kandungan fenolik dalam sampel. Titik optimal pada penelitian ini ditunjukkan pada daerah dengan warna hijau gelap yaitu pada suhu 45℃ dan waktu 20 menit, dimana diperoleh nilai total kandungan fenolik yang maksimal yaitu >47,5 mgGAE/g. Tujuan digambarkan grafik *surface plot* adalah untuk membantu visualisasi besarnya respon pada setiap perlakuan dengan variasi suhu dan waktu yang berbeda melalui kelengkungan pada plot 3 dimensi (Anwar *et al*., 2021). Grafik *surface plot* menunjukkan perbedaan ketinggian bentuk permukaan kurva karena nilai total kandungan senyawa fenolik yang diperoleh dari setiap kombinasi perlakuan berbeda. Semakin tinggi bentuk permukaan kurva yang dihasilkan maka semakin besar total kandungan fenolik dalam sampel, sebaliknya jika semakin rendah bentuk daerah permukaan kurva yang terbentuk maka semakin kecil pula nilai total kandungan fenolik dalam sampel. Peningkatan nilai total kandungan fenolik dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan yang diperoleh berbanding lurus dengan peningkatan suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi hingga mencapai titik yang optimal. Semakin tinggi suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi maka pelarut akan semakin mudah untuk melakukan penyarian

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

senyawa fenolik dalam ekstrak. Sehingga senyawa fenolik yang diperoleh juga akan semakin banyak. Akan tetapi jika ekstraksi dilakukan pada suhu dan waktu yang melebihi batas optimal, maka akan menyebabkan rendahnya total kandungan senyawa fenolik dalam sampel karena senyawa fenolik dalam sampel mengalami kerusakan (Sekarsari *et al*., 2019). Menurut Grafianita dalam Shofa, (2019), senyawa fenolik bersifat asam, mudah menguap, mudah dioksidasi, sensitif terhadap oksigen dan cahaya, serta memiliki sifat sebagai antiseptik. Kadar senyawa fenolik dalam sampel dapat menurun karena senyawa fenolik dapat terdegradasi secara termal jika terpapar suhu yang tinggi dengan waktu yang lama. Hal ini menunjukkan bahwa suhu dan waktu ekstraksi berpengaruh terhadap hasil total kandungan fenolik yang dihasilkan.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil total kandungan senyawa flavonoid tertinggi diperoleh pada ekstraksi dengan suhu 45℃ dan waktu 20 menit yaitu 6,984 mgQE/g. Dimana suhu tesebut merupakan titik yang optimal pada penelitian. Hasil nilai total kandungan flavonoid terendah diperoleh pada suhu 38℃ dan waktu 20 menit yaitu sebesar 4,414 mgQE/g. Hubungan antara faktor suhu dan waktu ekstraksi dengan total kandungan senyawa flavonoid dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan digambarkan dengan grafik *contour plot* dan *surface plot*. Tujuan digambarkan dengan grafik *contour plot* adalah untuk menggambarkan pengaruh dari variasi suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi terhadap besarnya total kandungan senyawa flavonoid dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan melalui perbedaan warna yang terbentuk (Anwar *et al*., 2021). Grafik *contour plot* menghasilkan warna daerah yang berbeda, hal ini menunjukkan adanya perbedaan nilai total kandungan senyawa flavonoid dalam sampel yang dihasilkan dengan adanya kombinasi suhu dan waktu ekstraksi yang berbeda. Warna yang terbentuk pada grafik *contour plot* tersebut yaitu hijau muda hingga hijau tua. Warna hijau muda pada *contour plot* menunjukkan bahwa nilai total kandungan flavonoid dalam sampel rendah dan warna hijau tua yang terbentuk pada *contour plot* menunjukkan bahwa nilai total kandungan flavonoid dalam sampel tinggi. Titik optimal pada penelitian ditunjukkan dengan daerah *contour plot* yang berwarna hijau tua yaitu pada suhu 45℃ dan waktu 20 menit

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

dan nilai total kandungan flavonoid yang dipeoleh adalah >6 mgQE/g. Tujuan digambarkan grafik *surface plot* adalah untuk membantu visualisasi besarnya respon pada setiap perlakuan dengan variasi suhu dan waktu yang berbeda melalui kelengkungan pada plot 3 dimensi (Anwar *et al*., 2021). Grafik *surface plot* terbentuk permukaan kurva parabola yang terbuka ke bawah. Grafik tersebut menunjukkan adanya perbedaan ketinggian bentuk permukaan kurva karena nilai total kandungan senyawa flavonoid yang diperoleh dari setiap kombinasi perlakuan berbeda. Semakin tinggi bentuk permukaan kurva yang dihasilkan maka semakin besar total kandungan flavonoid dalam sampel, sebaliknya jika semakin rendah bentuk permukaan kurva yang maka semakin kecil pula nilai total kandungan flavonoid dalam sampel. Peningkatan nilai total kandungan flavonoid dalam sampel ekstrak etil-asetat herba pegagan yang diperoleh berbanding lurus dengan peningkatan suhu dan waktu yang digunakan untuk ekstraksi hingga mencapai titik optimalnya. Jika ekstraksi dilakukan pada suhu dan waktu yang melebihi batas optimalnya maka dapat menurunkan kadar kandungan senyawa flavonoid dalam sampel. Karena senyawa flavonoid merupakan senyawa fenol yang mempunyai sistem aromatik terkonjugasi yang mudah rusak pada suhu tinggi. Beberapa golongan dari senyawa flavonoid juga mempunyai ikatan glikosida yang jika terkena suhu tinggi ikatannya dapat terputus atau mudah rusak. Menurut Sekarsari *et al*., (2019) suhu dan waktu ekstraksi yang terbaik yaitu suhu 45℃ dan waktu 20 menit. Hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Yuliantari *et al*., (2015) yang menyatakan bahwa total kandungan senyawa flavonoid yang paling tinggi pada sampel daun sirsak diperoleh pada suhu 45℃ dan waktu 20 menit, dimana suhu dan waktu tersebut merupakan suhu dan waktu yang optimal.

Hasil persentase rendemen, nilai total kandungan fenolik, dan nilai total kandungan flavonoid yang diperoleh dari penelitian kemudian dilakukan pengolahan data dengan menggunakan aplikasi *Minitab* 17 untuk melihat suhu dan waktu ekstraksi yang optimal. Solusi optimasi ekstraksi herba pegagan terhadap respon rendemen, total kandungan fenolik (TPC), dan total kandungan flavonoid (TFC) dapat diperoleh dengan cara menentukan kriteria dari masing-

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

masing respon yang ditetapkan. Kriteria respon yang dipilih yaitu respon yang memiliki nilai tertinggi (maksimal). Karena diharapkan nilai dari respon rendemen, TPC, dan TFC memperoleh nilai yang tertinggi yang mendekati batas atas pada setiap respon. Berdasarkan optimasi tersebut dapat diketahui bahwa suhu yang disarankan untuk ekstraksi adalah 45,2143℃ dengan waktu 22,7141 menit, dan akan diperoleh hasil rendemen sebesar 12,1626%, nilai total kandungan fenolik sebesar 48,9090 mgGAE/g, dan nilai total kandungan flavonoid sebesar 6,65125 mgQE/g. setelah diperoleh titik yang optimal tersebut maka dilakukan validasi model RSM dengan cara dilakukan kembali ekstraksi dengan suhu dan waktu yang telah disarankan pada saat optimasi RSM tersebut. Hasil dari ekstraksi sesuai dengan solusi optimasi yang disarankan yaitu diperoleh nilai rendemen sebesar 12,173%, total kandungan fenolik (TPC) sebesar 49,500 mgGAE/g, dan total kandungan flavonoid (TFC) sebesarr 6,745 mgQE/g. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan prediksi RSM. Untuk memperkuat prediksi tersebut, maka hasil rendemen, total kandungan fenolik, dan total kandungan flavonoid tersebut kemudian dilakukan uji statistika *Two-Sample T-test*. Dimana nilai *p-value* dari uji *T-test* tersebut adalah 0,991. Hasil *p-value* ini lebih besar dari nilai signifikansi (0,05), artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil prediksi optimasi pada metode RSM dengan hasil validasi metode.

Hasil ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi dengan suhu dan waktu yang paling optimal ini kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri. Hasil ekstrak yang diperoleh dari ekstraksi dengan suhu dan waktu yang paling optimal ini kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri, karena ekstrak yang dihasilkan pada kondisi yang optimal mengandung senyawa fenolik dan senyawa flavonoid yang maksimal. Menurut Novianti dalam Ngazizah *et al*., (2017) senyawa fenolik dapat digunakan sebagai antibakteri karena senyawa fenolik ini dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri dengan cara koagulasi protein dan lisis membran sel bakteri. Ketika membran sel dari bakteri lisis dan terjadi kebocoran sel, senyawa fenolik akan masuk ke dalam sel dan merusak sistem kerja dari sel bakteri, membran sitoplasma, menghambat pembentukan asam nukleat dan protein, serta dapat mendenaturasikan protein dan asam nukleat.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

Senyawa fenolik memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif dengan spektrum yang luas (Ngazizah *et al*., 2017). Senyawa flavonoid memiliki efek antibakteri karena senyawa flavonoid dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler yang terlarut, sehingga dapat menyebabkan terjadinya kerusakan membran sel dari bakteri dan keluarnya senyawa intraseluler. Selain itu senyawa flavonoid juga dapat menghambat proses metabolisme energi (Murdiyansah *et al*., 2020). Pada uji aktivitas antibakteri parameter yang dihitung yaitu diameter zona hambat dari cakram yang berisi ekstrak etil-asetat herba pegagan dengan berbagai variasi konsetrasi, kontrol positif yang berisi antibiotik ampisilin $10\mu g$, dan kontrol negatif yang berisi akuades terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Konsentrasi ekstrak etil-asetat herba pegagan yang digunakan yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Hasil uji zona hambat pada kontrol negatif yang mengandung akuades sebesar 0 mm, pada kontrol positif antibiotik ampisilin $10\mu g$ sebesar 11,325 mm, ekstrak etil-asetat herba pegagan pada konsentrasi 20% sebesar 13,100 mm, konsentrasi 40% sebesar 14,050 mm, konsentrasi 60% sebesar 15,034 mm, konsentrasi 80% sebesar 16,025 mm, dan konsentrasi 100% sebesar 17,483 mm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil-asetat herba pegagan memiliki respon hambatan pertumbuhan terhadap bakteri *S. aureus* yang kuat. Hasil diameter zona hambat dari ekstrak etil-asetat herba pegagan dengan berbagai variasi konsentrasi lebih besar jika dibandingkan dengan kontrol positif antibiotik ampisilin $10\mu g$. Hal ini terjadi karena di dalam ekstrak etil-asetat herba pegagan terdapat kandungan senyawa lain yang dapat memberikan efek antibakteri. Menurut Murdiyansah *et al*., (2020) pelarut etil-asetat dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun non polar. Senyawa yang dapat memberikan efek antibakteri yang dapat tersari dalam pelarut etil-asetat adalah senyawa flavonoid, polihidroksi, fenol, tannin, alkaloid, steroid, dan saponin. Selain itu menurut Septiana dalam Murdiyansah *et al*., (2020) ekstrak dengan pelarut etil-asetat memiliki kandungan fenolik total paling tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak dalam pelarut heksan, air, metanol, dan etanol. Hasil ini didukung dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Murdiyansah *et al*., (2020), dimana berdasarkan penelitian tersebut menyatakan

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA PERPUSTAKAAN

bahwa ekstrak etil-asetat daun pegagan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan kategori sensitif.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI YOGYAKARTA