

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan yaitu dengan model penelitian eksperimental. Penelitian dimulai dengan pengumpulan simplisia, determinasi tanaman, pembuatan ekstrak etanol 96% herba pegagan menggunakan variasi suhu dan waktu, skrining fitokimia, penetapan kandungan total fenolik dan flavonoid menggunakan Spektrofotometer UV-Vis, serta pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram (*Kirby bauer*).

B. Lokasi dan Waktu

1. Tempat pengambilan sampel dilakukan di Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang.
2. Tempat penelitian yaitu Laboratorium Farmasi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan April sampai Juni tahun 2022.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

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

2. Sampel

Sampel pada penelitian ini yaitu sebanyak 1 kg herba pegagan (*C. asiatica*) dimana teknik pengambilannya menggunakan teknik sampling acak (*random sampling*). Herba pegagan dipilih yang berwarna hijau, segar, dengan daun bulat yang dicabut pada pagi hari saat herba pegagan masih segar.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Variasi suhu dan waktu ekstraksi teknik ultrasonik
2. Variabel terikat : Kandungan total fenolik dan total flavonoid, serta aktivitas antibakteri

E. Definisi Operasional Variabel

1. Waktu ekstraksi, merupakan waktu yang diperlukan untuk melakukan ekstraksi. Pada penelitian ini digunakan rentang waktu ekstraksi yaitu 10 sampai 30 menit.
2. Suhu ekstraksi, merupakan suhu yang digunakan selama proses ekstraksi. Pada penelitian ini digunakan rentang suhu yaitu 40⁰C sampai 50⁰C.
3. Kandungan total fenolik, adalah konsentrasi senyawa fenolik yang terkandung pada sampel dan dinyatakan dalam ekuivalen asam galat. Kandungan asam galat dihitung menggunakan rumus *Total Phenolic Content* (TPC).
4. Kandungan total flavonoid, adalah kandungan senyawa flavonoid yang terkandung pada sampel dan dinyatakan dalam ekuivalen kuersetin. Kandungan kuersetin dihitung menggunakan rumus *Total Flavonoid Content* (TFC).
5. Zona hambat, merupakan diameter yang diukur pada daerah bening yang terbentuk disekitar kertas cakram yang telah ditambahkan dengan ekstrak pegagan yang diukur dari tiga sisi yaitu sisi vertikal, horizontal, dan diagonal menggunakan jangka sorong.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
Blender simplisia, *ultrasonic waterbath*, cawan petri, pinset, gelas ukur (Iwaki), labu ukur (Iwaki), tabung reaksi (Pyrex Iwaki), pipet tetes, pipet ukur (Iwaki), *micropipette*, jarum ose, batang L, bunsen, batang pengaduk, spatula besi, timbangan analitik (Ohaus), inkubator, oven, autoklaf, BSC, *waterbath* (Mommert WNB10FC), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis Spectrophotometer), jangka sorong, ayakan 40 mesh, kaca arloji, *beaker glass* (Iwaki), cawan porselin, erlenmeyer (Iwaki), *hotplate*, *stirrer*, vakum buchner (Rocker).

2. Bahan

Biakan bakteri *S. aureus*, antibiotik ampisilin dalam bentuk cakram, ekstrak pegagan, akuades, kuersetin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), asam galat (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), $AlCl_3$ 10%, natrium asetat 1 M, alkohol 70%, etanol 96% (teknis), etanol (*p.a*), NaOH, NaCl 0,9% (fisiologis), reagen *Folin Ciocalteu*, pereaksi *mayer*, *dragendorf*, *Liebermen-Buchard*, besi (III) klorida, logam Mg, HCl 2N, asam encer, H_2SO_4 , $BaCl_2$ 1%, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Brooth* (NB), *Mueller-Hinton agar* (MHA), kertas cakram kosong, *bluetipe*, kapas, kertas saring, kertas *whatman* no.1, benang, kertas payung.

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan

a. Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan pegagan (*C. asiatica*) dilakukan di Laboratorium Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

b. Persiapan sampel

Dilakukan pemanenan pegagan dengan cara dicabut herba pegagan (*C. asiatica*) yang segar lalu dilakukan proses sortasi basah untuk memisahkan sampel yang rusak. Sampel yang digunakan yaitu sampel yang lolos uji. Sampel tersebut kemudian dicuci menggunakan air bersih dan mengalir. Setelah itu dilakukan proses pengeringan dengan cara sampel di keringkan menggunakan oven pada suhu $50^{\circ}C$ selama 4 jam, kemudian dilakukan proses sortasi kering. Selanjutnya sampel herba pegagan yang kering dilakukan proses penyerbukan dengan blander. Serbuk yang sudah dihaluskan kemudian diayak menggunakan ayakan ukuran 40 mesh (Puspita *et al.*, 2021)

c. Desain faktorial

Rancangan penelitian ini menggunakan metode *Response Surface Methodology* (Rsm) dengan mendesain variabel yang sudah ditentukan meliputi suhu dan waktu, maka akan didapatkan hasil ekstraksi yang optimal. Metode Rsm ini juga terdiri dari 2 level yaitu level tinggi (+1) dan level

rendah (-1). Banyak pengulangan titik optimal sebanyak 3 kali dengan total percobaan 14 kali. Metode ini menggunakan aplikasi *Minitab* 17 sehingga akan didapatkan rancangan faktor dan level dalam penelitian pada **Tabel 3** dan kombinasi perlakuan pada **Tabel 4** sebagai berikut:

Tabel 3. Faktor dan Level dalam Penelitian

Faktor	Level (-1)	Level (+1)
Suhu (A)	40 ⁰ C	50 ⁰ 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 Pegagan (*C. asiatica*)

Dilakukan serbuk herba pegagan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1:10) dalam erlenmeyer, selanjutnya dilakukan proses ekstraksi dengan variasi suhu dan waktu sesuai pada **Tabel 4** dengan frekuensi 20 kHz (kilohertz) menggunakan alat *ultrasonic bath*. Lalu dilakukan proses penyaringan hasil ekstraksi memakai kertas *whatman* no.1. Dilakukan proses penguapan filtrat yang didapatkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60⁰C. Kemudian akan didapatkan hasil berupa ekstrak kental

yang kemudian ditimbang lalu dilakukan perhitungan rendemen ekstrak dan dimasukkan ke botol kaca. Ekstrak kental yang didapat kemudian dilakukan penentuan total fenolik dan flavonoid, serta aktivitas antibakterinya (Sekarsari *et al.*, 2019).

Berikut rumus perhitungan % rendemen:

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

b. Skrinning Fitokimia

1) Identifikasi Alkaloid

Sampel uji sebanyak 100 mg ditimbang dan ditambah 1 mL etanol 96%, 1 mL HCL 2N, dan 9 mL air kemudian dipanaskan, kemudian didinginkan. Larutan sampel disaring menggunakan kertas saring. Residu yang dihasilkan ditempatkan dalam 3 tabung reaksi. Tiga tetes *reagen wagner* ditambahkan pada tabung pertama. Tiga tetes *reagen dragendrof* ditambahkan pada tabung kedua, dan *reagen mayer* ditambahkan ke tabung ketiga. Jika tabung pertama terbentuk endapan warna coklat, tabung kedua terbentuk endapan jingga dan tabung ketiga terbentuk endapan putih atau kuning maka ekstrak positif mengandung alkaloid (Rifkia & Imam., 2020).

2) Identifikasi Saponin

Sebanyak 100 mg sampel uji ditimbang kemudian dilarutkan menggunakan etanol 96% sebanyak 1 mL, setelah itu ditambah dengan air panas sebanyak 10 mL dan ditunggu hingga dingin. Selanjutnya digojog dalam waktu 10 detik. Terbentuknya buih yang stabil dengan tinggi 1-10 cm dalam waktu 10 menit serta dengan ditambahkan HCl 2N sebanyak 1 tetes buih yang dihasilkan tidak hilang maka ekstrak positif mengandung saponin (Rifkia & Imam., 2020).

3) Identifikasi Tanin

Sebanyak 100 mg ekstrak kental herba pegagan lalu dilarutkan menggunakan etanol 96% sebanyak 20 mL. Diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi 2 mL larutan uji dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan menggunakan larutan besi (III) klorida 1% beberapa tetes. Jika terbentuk perubahan warna menjadi warna hijau-hitam atau biru-hitam maka ekstrak mengandung tanin (Rifkia & Imam., 2020).

4) Identifikasi Fenol

Sejumlah 100 mg sampel uji ditambah dengan etanol 96% sebanyak 20 mL kemudian disaring. Dimasukkan filtrat sebanyak 2 mL pada tabung reaksi dan ditambahkan reagen besi (III) klorida 1%. Apabila terjadi perubahan warna menjadi ungu, hijau, hitam, biru, atau merah maka ekstrak mengandung fenolik (Wientarsih *et al.*, 2013).

5) Identifikasi Flavonoid

Sejumlah 100 mg sampel uji ditambah 1 mL etanol 96% untuk melarutkan, kemudian dilakukan penyaringan. Filtrat yang dihasilkan ditambah dengan 0,5 mL HCl dan logam Mg. Apabila terbentuk warna merah hingga jingga maka menandakan adanya senyawa flavon, jika warna merah tua maka menandakan adanya senyawa flavonon dan flavonol, jika warna hijau sampai biru maka menandakan adanya senyawa aglikon dan glikosida (Rifkia & Imam., 2020).

6) Identifikasi Triterpen dan Steroid

Sejumlah 100 mg sampel uji ditambah 1 mL etanol 96%. Kemudian ditambahkan dengan reagen *Liebermen-Buchard*. Apabila menghasilkan biru sampai kehijauan maka ekstrak positif mengandung steroid. Apabila menghasilkan merah, merah muda, atau ungu maka ekstrak positif mengandung triterpen (Rifkia & Imam., 2020).

c. Penentuan Kandungan Fenolik Total (Depkes RI, 2017)

Pembuatan larutan uji ekstrak dengan cara ditimbang ekstrak etanol 96% herba pegagan lebih kurang 0,2 g, dimasukkan dalam erlenmeyer dan ditambah metanol p.a sebanyak 25 mL, dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* selama 30 menit. Kemudian dilakukan penyaringan, dimasukkan dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan metanol p.a melalui penyaringan hingga tanda batas.

Pembuatan larutan pembanding dengan cara ditimbang pembanding asam galat lebih kurang 10 mg dan dimasukkan dalam labu ukur volume 25 mL. Dilarutkan menggunakan metanol p.a, dan ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas. Dibuat seri kadar larutan pembanding dengan kadar 30, 50, 70, dan 90 ppm.

Dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dengan cara larutan pembanding sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* yang sudah diencerkan sebanyak 5,0 mL (7,5% dalam air). diamkan dalam waktu 8 menit, kemudian ditambah dengan NaOH 1% sebanyak 4,0 mL dan digojog. Selanjutnya dibaca larutan dengan rentang panjang gelombang 600 – 800 nm.

Dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dengan cara larutan pembanding sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* yang sudah diencerkan sebanyak 5,0 mL (7,5% dalam air). diamkan dalam waktu 8 menit, kemudian ditambah dengan NaOH 1% sebanyak 4,0 mL dan digojog. Setelah itu dibaca larutan pada panjang gelombang 725 nm dengan rentang waktu 0 – 120 menit.

Prosedur penetapan kadar fenolik yaitu dengan cara dipipet sebanyak 1 mL dari masing-masing larutan uji dan larutan pembanding ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* yang sudah diencerkan sebanyak 5,0 mL (7,5% dalam air). diamkan dalam waktu 8 menit, kemudian ditambah dengan NaOH 1% sebanyak 4,0 mL dan diinkubasi selama 40

menit. Dibaca absorbansi dari setiap larutan pada panjang gelombang 725 nm. Dilakukan pengukuran larutan blangko (tanpa penambahan larutan uji) dengan cara yang sama. Dibuat kurva kalibrasi dan dihitung kadar fenolik dari larutan uji.

d. Penentuan Kandungan Flavonoid Total (Depkes RI, 2017)

Pembuatan larutan uji ekstrak yaitu dengan cara ditimbang ekstrak etanol 96% herba pegagan sebanyak 0,2 g lalu dimasukkan dalam Erlenmeyer, lalu ditambah dengan etanol p.a sebanyak 25 mL dan dilakukan pengadungan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit. Disaring larutan tersebut dan masukan dalam labu ukur, dan ditambahkan etanol p.a melalui penyaringan hingga tanda batas.

Pembuatan larutan perbandingan kuersetin dengan cara, ditimbang sebanyak 10 mg perbandingan kuersetin lalu dimasukkan dalam labu ukur volume 25 mL, dan ditambahkan dengan etanol p.a hingga tanda batas. Dibuat seri kadar larutan perbandingan dengan kadar 2, 4, 6, dan 8 ppm.

Dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dengan cara larutan perbandingan sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan etanol p.a sebanyak 1,5 mL, aluminium klorida p.a 10% sebanyak 0,1 mL, natrium asetat 1M sebanyak 0,1 mL, dan akuades sebanyak 2,8 mL dan digojok. Dibaca larutan tersebut dengan rentang panjang gelombang 350 – 550 nm.

Prosedur penetapan kadar flavonoid yaitu dengan cara, dipipet secara terpisah masing-masing larutan uji dan larutan perbandingan sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Pada setiap larutan ditambahkan etanol p.a sebanyak 1,5 mL, aluminium klorida p.a 10% sebanyak 0,1 mL, natrium asetat 1M sebanyak 0,1 mL, dan akuades sebanyak 2,8 mL. Digojog dan diinkubasi dalam waktu 30 menit pada suhu ruang. Dibaca absorbansi pada panjang gelombang 440 nm. Dilakukan pengukuran larutan blangko (tanpa

penambahan aluminium klorida) dengan prosedur yang sama. Dibuat kurva kalibrasi dan dihitung kadar flavonoid dari larutan uji.

e. Pengujian Daya Hambat Antibakteri

1) Sterilisasi Alat dan Media

Dicuci terlebih dahulu semua alat dan media yang dipakai kemudian dibungkus dengan kertas. Untuk bahan dan alat yang tidak tahan panas maka disterilisasi memakai autoklaf dengan suhu 121°C dengan waktu 15 menit. Sterilisasi menggunakan oven dengan suhu 160 sampai 170°C dalam waktu 1 jam untuk alat-alat gelas. Alat yang dipergunakan untuk ekstrak sampel disterilisasi dengan cara di rendam pada cairan alkohol 70% setelah itu dilakukan pembilasan menggunakan akuades steril (Putri *et al.*, 2019).

2) Pembuatan Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA)

Sejumlah 3,4 gram media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) ditimbang, setelah itu ditambahkan 100 mL akuades untuk melarutkan media, kemudian dilakukan proses pemanasan menggunakan *hotplate* hingga melarut dan homogen. Kemudian disterilisasi media menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C pada tekanan 15 lbs dalam waktu 15 menit. Media ini digunakan untuk media tanam bakteri (Putri *et al.*, 2019).

3) Pembuatan Standar kekeruhan Mc-Farland 0,5 unit

Standar kekeruhan Mc-Farland 0,5 unit yaitu dibuat dengan cara dicampurkan 9,5 mL H_2SO_4 dan larutan BaCl_2 1% sejumlah 0,5 mL, lalu digojog hingga homogen (Putri *et al.*, 2019).

4) Peremajaan Bakteri

Dibuat terlebih dahulu media *Nutrient Agar* miring dengan cara ditimbang sejumlah 0,46 gram media *Nutrient agar* lalu ditambahkan akuades sebanyak 20 mL untuk melarutkan media dalam erlenmayer. Lalu dilakukan pemanasan menggunakan *hotplate* hingga larut dan homogen. Setelah larut ditutup bagian mulut erlenmayer menggunakan

kapas serta diikat dengan benang kemudian dilakukan sterilisasi media menggunakan autoklaf dalam suhu 121°C dalam waktu 15 menit.

Kemudian diambil sebanyak satu ose koloni dari biakan murni bakteri *S. aureus* lalu diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* miring. Dilakukan proses inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Putri *et al.*, 2019).

5) Penyiapan Inokulum Bakteri

Dibuat suspensi bakteri dengan cara diambil sebanyak 1 ose bakteri kemudian dimasukkan kedalam tabung yang berisi 5 mL NaCl 0,9% steril hingga kekeruhannya sama seperti standar kekeruhan Mc-Farland 0,5 unit (Siahaan, 2013).

6) Penyiapan Larutan Uji

Dibuat larutan stok ekstrak dengan cara dilarutkan 4 gram ekstrak etanol 96% herba pegagan dengan 4 mL akuades lalu dilakukan pengenceran dengan kadar 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%.

7) Uji Aktivitas Antibakteri

Media MHA yang telah dibuat kemudian dimasukkan kedalam cawan petri sebanyak 15 mL dan ditunggu hingga memadat. Setelah itu diambil 0,1 mL inokulum bakteri lalu dimasukkan diatas media yang sudah memadat dan diratakan menggunakan batang L dengan teknik *spread plate*. Selanjutnya direndam terlebih dahulu kertas cakram kosong pada larutan uji masing-masing ekstrak herba pegagan hasil validasi hingga larutan uji berdifusi sempurna pada cakram, lalu diletakkan kertas cakram tersebut pada permukaan media yang sudah diinokulasikan bakteri uji. Digunakan kontrol positif yaitu antibiotik ampisilin dalam bentuk cakram, sedangkan kontrol negatif menggunakan akuades yang sebelumnya sudah didifusikan dalam kertas cakram. Setelah itu dilakukan proses inkubasi menggunakan inkubator dalam waktu 24 jam dengan suhu 37°C . Kemudian diukur diameter zona hambat yaitu pada daerah bening yang terbentuk di area cakram memakai jangka sorong dengan pengukuran tiga

sisi yaitu sisi vertikal, horizontal, dan diagonal. Pengujian antibakteri dilakukan perlakuan sebanyak 3 kali (Putri *et al.*, 2019).

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Hasil yang didapatkan berupa nilai absorbansi kemudian dimasukkan dalam persamaan garis linear $y = bx + a$. Kemudian akan diperoleh nilai x (konsentrasi/C).

2. Penentuan total senyawa fenolik

Total senyawa fenolik dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{TPC} = \frac{C.V.f_p}{g}$$

Keterangan:

TPC = *Total Phenolic Content*

C = Konsentrasi fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

F_p = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

3. Penentuan total senyawa flavonoid

Total senyawa flavonoid dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{TFC} = \frac{C.V.f_p}{g}$$

Keterangan:

TFC = *Total Flavonoid Content*

C = Konsentrasi flavonoid (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

F_p = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan (g)

4. Penentuan aktivitas antibakteri

Aktivitas antibakteri dilakukan perhitungan rata-rata diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dengan tiga sisi pengukuran yaitu sisi vertikal, horizontal, dan diagonal.

5. Analisis data

Hasil pada penelitian ini dilakukan analisis statistik menggunakan rancangan *Response Surface Methodology* (Rsm) tipe *Central Composite Design* (CCD) dengan aplikasi Minitab 17. Pada rancangan penelitian ini dimana digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya pengaruh dari variasi suhu dan waktu ekstraksi herba pegagan terhadap total fenolik dan total flavonoid, dimana pada total kadar fenolik dan flavonoid yang paling optimal akan dilanjutkan uji aktivitas antibakteri. Dilanjutkan dengan T-test untuk membandingkan nilai hasil prediksi dengan nilai aktual dengan nilai signifikansi $P < 0,05$.