

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan secara percobaan atau eksperimental di Laboratorium Biofarmakologi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta. Pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (2,2 *diphenyl-1-pikrilhidrazil*) untuk menguji aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak herba pegagan. Penelitian ini dilakukan dengan proses pembuatan ekstrak etanol herba pegagan dengan berbagai variasi konsentrasi etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%) menggunakan metode ultrasonikasi, yaitu metode ekstraksi dengan menggunakan bantuan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 16-20 kHz. Filtrat yang didapatkan kemudian dilakukan penguapan menggunakan *waterbath* suhu 50°C sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapatkan kemudian dilakukan uji kualitatif seperti uji organoleptik, skrining fitokimia, dan KLT. Kemudian dilakukan uji kuantitatif berupa uji antioksidan dengan metode DPPH untuk menentukan nilai IC₅₀.

B. Lokasi dan Waktu

1. Pengambilan sampel dilakukan di Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang pada bulan April 2022.
2. Pengujian dilakukan di Laboratorium Biofarmakologi Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan Mei 2022 sampai dengan bulan Juni 2022.

C. Populasi/Sampel/Objek Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu herba pegagan (*Centella asiatica* L.) yang tumbuh secara liar di perkebunan dari Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang.

2. Sampel/Objek penelitian

Sampel penelitian digunakan sebanyak 3,5 kg herba pegagan, dengan teknik sampling acak (*random sampling*), pegagan dipilih yang masih segar,

berwarna hijau dengan daun lebar berbentuk bulat seperti ginjal, dipetik pada pagi hari saat daun masih segar.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas: Variasi konsentrasi pelarut etanol ekstrak pegagan (*Centella asiatica* L.).
2. Variabel Terikat: Nilai % inhibisi atau nilai IC₅₀ penangkal radikal bebas.

E. Definisi Operasional Variabel

1. Variabel Bebas

Variabel bebas memberikan perubahan atau pengaruh pada variabel terikat (Sugiyono, 2016). Dimana pada uji digunakan pelarut etanol dengan konsentrasi yang berbeda-beda.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat akan berpengaruh karena variabel bebas (Sugiyono, 2016). Dimana pada uji ini dilakukan uji antioksidan. Uji antioksidan dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan proses terjadinya reaksi oksidasi pada suatu senyawa (Wientarsih et al., 2013). Uji ini, dilakukan untuk menentukan nilai IC₅₀ yang merupakan konsentrasi yang meredam 50% radikal bebas.

F. Alat dan Bahan

1. Alat: ayakan 40 mesh, batang pengaduk, blender / grinder simplisia (*fomac*), botol ekstrak (*vial*), cawan porselin, gelas ukur (*iwaki*), *glass beaker* (*iwaki*), kaca arloji, labu takar (*iwaki*), mikropipet (*socorex*), oven, pipet tetes, pipet ukur, plat tetes, propipet, sendok kaca, spatula/sendok besi, spektrofotometri UV-Vis *double beam* (*thermo scientific genesis 10S*), tabung reaksi (*iwaki*), timbangan analitik (*ohaus*), ultrasonik *bath* (*cole-parmer*), *waterbath* (*memmert*), vortex (*dlab mx-s*).
2. Bahan: akuadest (teknis), aluminium foil, asam anhidrat (pro analisis), asam asetat glasial (pro analisis) asam klorida 2N (teknis), asam klorida pekat (pro analisis), asam sulfat pekat (pro analisis), aseton (pro analisis), besi (III) klorida (teknis), *bluetip*, butanol (pro analisis), DPPH, etanol (pro analisis), etanol 96% (teknis), etil asetat (pro analisis), kertas saring, kloroform (pro analisis),

kuersetin (pro analisis), n-heksan (pro analisis), logam magnesium, metanol pro analisis), pereaksi dragendorff (reagen), pereaksi mayer (reagen), pereaksi wagner (reagen), simplisia herba pegagan (*Centella asiatica* L.), vitamin C, *whitetip*, *yellowtip*.

G. Pelaksanaan Penelitian

Tabel 2. Pelaksanaan Penelitian

No.	Penelitian	Bulan						
		Januari	Februari	Maret	April	Mei	Juni	Juli
1.	Pembuatan proposal							
2.	Ujian proposal							
3.	Pengurusan surat							
4.	Ekstraksi herba pegagan							
5.	Skrinning fitokimia							
6.	Uji KLT							
7.	Uji antioksidan							
8.	Pengolahan data							
9.	Penyusunan laporan hasil							
10.	Ujian hasil penelitian							

H. Metode Pengumpulan Data

1. Pengambilan Bahan dan Determinasi Tanaman

Herba pegagan ini yang digunakan pada penelitian ini berupa tanaman liar yang diperoleh dari Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang. Herba pegagan diambil pada bulan April 2022, berupa seluruh bagian tanaman seperti daun muda dan segar, batang, dan akar. Herba pegagan dideterminasi di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

2. Persiapan Sampel

Diambil herba pegagan (*Centella asiatica*) segar pada pagi hari. Tujuan dilakukan pada pagi hari yaitu zat aktif yang terkandung masih tinggi karena belum mengalami metabolisme akibat fotosintesis (Yuliani, 2015). Kemudian,

dilakukan sortasi basah untuk memisahkan sampel yang tidak lolos uji. Sampel yang lolos uji dicuci dengan air. Dikeringkan pada oven dengan suhu 50°C selama 6 jam agar kadar airnya turun sehingga membuat mikroba tidak mudah untuk tumbuh. Daun kering yang didapatkan kemudian dilakukan pengujian kadar air dengan metode oven dengan prinsip perhitungan selisih bobot sampel sebelum dan sesudah pengeringan sampai didapatkan berat yang konstan.

$$\% \text{ Kadar air} = \frac{(\text{Berat awal} - \text{Berat akhir})}{\text{Berat Simplisia}} \times 100\%$$

Dimana syarat kadar air pada simplisia yaitu < 10% (Sunartaty & Yulia, 2017). Daun kering yang didapatkan lalu diserbukkan dengan cara diblender. Penyerbukan dilakukan untuk memperluas kontak antara serbuk dengan pelarut. Serbuk yang didapatkan kemudian diayak (ayakan 40 mesh) agar serbuk memiliki keseragaman (Puspita & Susilowati, 2021).

3. Ekstraksi

Pada percobaan ini dilakukan ekstraksi dengan metode ultrasonikasi. Ekstraksi ini dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Hartanti et al., (2021) yang dimodifikasi yaitu dengan cara ditimbang 15 gram serbuk herba lalu dimasukkan dalam erlenmeyer. Ditambah masing-masing pelarut 150 ml dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% (perbandingan 1:10). Diekstraksi pada suhu 45°C selama 20 menit dengan *ultrasonic bath*. Disaring dengan kertas whatman no. 1. Dipekatkan filtrat dengan *waterbath* pada suhu 50°C. Ditimbang dan dihitung rendemen ekstrak yang diperoleh. Setelah itu, untuk mengetahui kualitas suatu ekstrak, maka dilakukan pengamatan organoleptis meliputi konsistensi, warna, bau, dan rasa dari ekstrak (Gangga et al., 2017).

4. Pengujian Fitokimia

Pengujian skrinning fitokimia ini dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada herba pegagan. Uji skrinning kimia ini dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Sadik & Rifqah Amalia Anwar, (2022) yang dimodifikasi. Pengujian ini meliputi pengujian alkaloid, saponin, tanin, fenol, flavonoid, dan terpenoid/steroid.

Hal pertama yang dilakukan sebelum melakukan pengujian yaitu pembuatan larutan stok 3%. Pembuatan larutan stok ini dilakukan dengan cara menimbang 300 mg ekstrak kental kemudian dilarutkan dalam 10 ml etanol pro analisis. Setelah dilakukan pembuatan larutan stok, kemudian dapat dilakukan pengujian.

a. Identifikasi Alkaloid

Larutan stok (2 ml) diambil, ditambahkan asam klorida 2N (5 ml). Dipanaskan 2 menit pada penangas air, setelah itu disaring. Filtrat yang diperoleh lalu dibagi dalam 3 lubang *drop plate* yang berbeda. Tiap lubang ditetesi (2 tetes) pereaksi yang berbeda (Mayer, Wagner, dan Dragendorf). Terbentuknya endapan warna putih atau kuning (Mayer), endapan coklat (Wagner), dan endapan warna merah atau jingga (Dragendorf) menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid. Dikatakan sampel positif mengandung alkaloid jika dari 2 hasil uji menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya suatu endapan yaitu pada pereaksi Mayer dan Wagner (Fajrin & Susila, 2019).

b. Identifikasi Saponin.

Larutan stok (2 ml) diambil, tambahkan 5 ml air panas. Setelah itu dikocok kuat lalu didiamkan selama 15-20 menit. Kemudian diamati busa yang terbentuk. Terbentuknya busa menunjukkan adanya kandungan saponin, jika busa tidak terbentuk maka dikatakan jika ekstrak tidak mengandung saponin.

c. Identifikasi Tanin

Larutan stok (2 ml) diambil, kemudian dikocok dengan air panas hingga homogen, lalu tambahkan FeCl_3 (3 tetes), kemudian diamati hasilnya. Terbentuknya warna biru, biru kehitaman, hijau, hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin.

d. Identifikasi Fenol

Larutan stok (2 ml) diambil, lalu ditambahkan pereaksi FeCl_3 . Terbentuknya warna merah, hijau, biru, atau hitam menunjukkan adanya kandungan fenol.

e. Identifikasi Flavonoid

Larutan stok (2 ml) diambil, lalu ditambahkan serbuk magnesium (0,5 g), setelah itu ditetesi HCl pekat (3 tetes). Diamkan sampai logam magnesium habis lalu diamati perubahan warna yang terbentuk. Terbentuknya warna merah sampai jingga menunjukkan adanya kandungan senyawa flavon, warna merah tua menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonol atau flavonon, dan terbentuknya warna hijau menunjukkan adanya kandungan senyawa aglikon atau glikosida.

f. Identifikasi Terpenoid/Steroid

Larutan stok (2 ml) diambil, lalu tambahkan kloroform (1 ml) dan asam asetat anhidrat (1 ml) kemudian didinginkan. Setelah sudah dingin kemudian ditambahkan H₂SO₄ pekat. Terbentuknya warna merah, kuning, orange menunjukkan adanya kandungan senyawa terpenoid, sedangkan terbentuknya warna hijau menunjukkan adanya kandungan steroid.

5. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

a. Penjenuhan *Chamber*

Dibuat fase gerak kloroform: etil asetat: asam asetat glasial (5:4:1) dalam *chamber* (Ihsan et al., 2019). Masukkan kertas saring (20 cm) ke dalam *chamber*. Tutup rapat *chamber* dan tunggu sampai *chamber* jenuh (kertas saring yang terbasahi oleh fase gerak).

b. Pembuatan larutan uji

Ekstrak etanol herba pegagan dibuat dalam konsentrasi 1% yaitu ditimbang sebanyak 30 mg kemudian dilarutkan dalam 3 ml metanol. Kemudian untuk pembanding digunakan kuersetin dengan konsentrasi 0,1% yaitu ditimbang sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan dalam 1 ml (Zulkarnaen et al., 2016).

c. Prosedur KLT

Plat KLT dioven (30 menit) pada suhu 100⁰C untuk menghilangkan kandungan air pada plat. Lalu diberi penanda atas dan bawah (1 cm) pada plat. Ditotolkan ekstrak pegagan dengan konsentrasi 1% dan standar kuersetin dengan konsentrasi 0,1% pada garis bawah. Dimasukkan plat KLT dalam

chamber yang sudah jenuh lalu ditunggu sampai eluen naik. Ambil dan keringkan plat. Diamati noda pada sinar UV (254 nm dan 365 nm). Dihitung nilai Rf (*Retardation Factor*) (Mawarda et al., 2020).

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh analit}}{\text{Jarak tempuh pelarut}}$$

d. Orientasi Penggunaan Berbagai Macam Fase Gerak

Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini:

- 1) Kloroform: Etil asetat: Butanol (5: 1: 4)
- 2) Kloroform: Asam asetat glasial: Butanol (5: 1: 4)
- 3) Heksana: Metanol: Aseton (9: 0,5: 0,5)
- 4) Kloroform: Metanol: Asam asetat glasial (5: 4: 1)
- 5) Kloroform: Metanol (9: 1)
- 6) Kloroform: Etil asetat: Asam asetat glasial (5: 4: 1)

6. Uji Aktivitas Peredaman Radikal Bebas (Metode DPPH)

a. Pembuatan Larutan Stok DPPH (0,1 mM)

Ditimbang DPPH (4 mg) kemudian dilarutkan dalam metanol pro analisis sampai 100 ml. Lalu digojog sampai homogen dan disimpan dalam tempat yang tertutup rapat dan gelap (Fauzi & Santoso, 2021).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH dan *Operating Time*

Diambil (4 ml) larutan DPPH lalu masukkan pada tabung. Kemudian dilakukan skrinning panjang gelombang dengan rentang (400-600 nm). Dilakukan *scanning* sampai didapatkan panjang gelombang DPPH yang optimum yaitu 515 nm. Kemudian dilakukan *operating time* dengan mereaksikan baku pembanding vitamin C dengan DPPH. Setelah itu dilakukan *scanning* dengan panjang gelombang 515 nm pada rentang 0-40 menit untuk menentukan waktu yang stabil reaksi DPPH sebagai radikal bebas, diamati sampai didapatkan waktu inkubasi selama 30 menit (Fauzi & Santoso, 2021).

c. Pembuatan dan Pengujian Larutan Pembanding (Vitamin C)

Vitamin C (5 mg) ditimbang, larutkan dengan metanol p.a ad kan sampai 50 ml (konsentrasi 100 ppm). Dibuat larutan uji dalam 5 konsentrasi

(2, 4, 6, 8, 10) ppm. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml dan diadkan dengan metanol pro analisis sampai 10 ml, lalu dihomogenkan. Kemudian larutan uji dipipet (2 ml) lalu ditambahkan DPPH (2 ml) kemudian divortek selama 5 detik. Setelah itu dilakukan inkubasi selama 30 menit. Kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 515 nm (Yahya & Nurrosyidah, 2020a).

d. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak

Pembuatan larutan stok dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan oleh Yahya & Nurrosyidah, (2020) dengan modifikasi. Hal yang pertama dilakukan yaitu ditimbang 25 mg ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) dan larutkan dengan metanol, adkan hingga 25 ml (konsentrasi 1000 ppm). Kemudian dilakukan orientasi dalam 5 konsentrasi yaitu 4, 8, 12, 16, 20. Tetapi pada konsentrasi tersebut didapatkan nilai absorbansi yang rendah sekitar 0,1. Sehingga larutan uji yang dibuat dalam penelitian ini yaitu dengan konsentrasi 10, 20, 40, 60, 80. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml dan diadkan dengan metanol pro analisis sampai 5 ml, lalu dihomogenkan.

e. Pengujian Aktivitas Peredaman Radikal Bebas Ekstrak (Metode DPPH)

Diambil larutan uji (1 ml) dan masing-masing dimasukkan dalam tabung yang berbeda. Tambahkan DPPH (2 ml) lalu divorteks (5 detik) kemudian dilakukan inkubasi selama 30 menit. Setelah itu diukur serapannya dengan spektrofotometri uv-vis pada panjang gelombang 515 nm. Terjadinya efisiensi penangkal radikal bebas adanya perubahan warna larutan ungu menjadi kuning. Dilakukan perhitungan aktivitas penangkal radikal bebas untuk menentukan nilai serapan DPPH terhadap sampel (persen inhibisi) (Damanis et al., 2020).

I. Metode Pengolahan Dan Analisis Data

Uji peredaman radikal bebas dengan metode DPPH ditentukan dengan nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam 50% radikal bebas.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Setelah diperoleh nilai presentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi kemudian dilakukan perhitungan dengan regresi linier (x, y). Dimana konsentrasi (ppm) untuk sumbu x dan %inhibisi untuk sumbu y. Dari perhitungan tersebut akan didapatkan rumus $y = bx + a$. Untuk nilai y diubah dengan 50, maka akan didapatkan nilai x (Wientarsih et al., 2013). Menurut (Fauziah et al., 2021) berdasarkan nilai IC_{50} antioksidan diklasifikasikan:

Tabel 3. Klasifikasi Antioksidan

Nilai IC_{50}	Antioksidan
< 50 ppm	Sangat kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
150-200 ppm	Lemah

Setelah itu dilakukan perhitungan analisis ekstrak pegagan dengan program SPSS. Lalu, data yang pertama dimasukkan yaitu nilai persen penangkap radikal bebas ekstrak pegagan dari berbagai variasi konsentrasi dan vitamin C. Sebagai uji prasyarat dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Pada uji normalitas digunakan *Shapiro-Wilk* (signifikan $p > 5\%$) dan untuk homogenitas digunakan *levene* ragam. Untuk membandingkan suatu data dengan data yang lain lebih dari dua sampel dapat dilakukan *One Way ANOVA*, tetapi jika asumsi pada uji normalitas dan homogenitas tidak terpenuhi maka dapat digunakan uji *Kruskal-Wallis*.