

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil**

##### **1. Pengambilan Bahan dan Determinasi Tanaman**

Tanaman herba pegagan yang diperoleh secara liar dari Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang dideterminasi di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta dengan nomor pendaftaran 085/5.Tb/V/2022 pada tanggal 18 Mei 2022. Kriteria herba pegagan yang diambil untuk dilakukan determinasi yaitu bagian tanaman utuh yang terdiri dari daun, batang, dan akar. Berdasarkan hasil determinasi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah herba pegagan (*Centella asiatica* L.) (Lampiran 1).

##### **2. Persiapan Sampel**

Pada penelitian ini digunakan sampel herba pegagan (*Centella asiatica* L.) yang didapatkan secara liar dan bukan merupakan budidaya dari Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang pada bulan April 2022. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari pukul 07.00-08.00 WIB yaitu agar zat aktif yang terkandung pada herba pegagan masih tinggi karena belum mengalami metabolisme akibat fotosintesis (Yuliani, 2015). Sampel yang sudah dikumpulkan sebanyak  $\pm 3,5$  kg kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan sampel yang tidak lulus uji karena adanya kotoran/benda asing dan juga bagian yang tidak bagus. Kemudian sampel yang sudah lulus uji dilakukan pencucian dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada herba pegagan. Kemudian dilakukan pengeringan dengan oven selama 6 jam pada suhu  $50^{\circ}\text{C}$ , pengeringan dilakukan untuk membuat kadar air pada simplisia turun agar tidak mudah ditumbuhi oleh mikroba. Sampel yang sudah kering kemudian dilakukan pengecekan kadar air dengan menghitung selisih bobot sebelum dan sesudah pengeringan. Berdasarkan Tabel 4 dapat dilihat bahwa kadar air yang didapatkan setelah pengeringan selama 6 jam yaitu sebesar 6,269%. Berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia syarat kadar air yang baik

pada herba pegagan yaitu tidak lebih dari 10% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Hal ini menunjukkan bahwa herba pegagan yang digunakan sudah mengandung kadar air yang sesuai dengan syarat yang ditetapkan. Pengecekan kadar ini dilakukan untuk memberikan hasil yang maksimal pada kandungan air yang terkandung oleh simplisia, karena kadar air yang tinggi pada simplisia dapat menyebabkan terjadinya pertumbuhan mikroba yang dapat merusak senyawa pada simplisia. Hasil pengecekan kadar air pada simplisia pegagan dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Hasil Pengecekan Kadar Air**

Waktu (jam)	% Kadar Air	Literatur (FHI, 2017)	Keterangan
4	10,636	< 10%	-
6	6,269		✓

Keterangan: (✓) Memenuhi persyaratan; (-) Tidak memenuhi persyaratan

Herba yang sudah kering biasanya akan ditandai dengan ciri fisik seperti warnanya sudah berubah menjadi hijau kehitaman dan daun akan mudah hancur saat diremas (Ulandari et al., 2019). Setelah dikeringkan, herba pegagan dihaluskan/diserbuk. Penyerbukan ini dilakukan untuk memperluas kontak antara serbuk dengan pelarut. Kemudian diayak menggunakan ayakan 40 mesh. Pengayakan ini dilakukan agar serbuk yang dihasilkan memiliki keseragaman ukuran yang sama. Serbuk herba pegagan yang didapatkan kemudian ditimbang dan didapatkan serbuk sebesar 504,36 gram.

### 3. Ekstraksi

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi herba pegagan dengan menggunakan metode ultrasonikasi dengan variasi konsentrasi pelarut etanol. Hal pertama yang dilakukan yaitu menimbang serbuk herba pegagan (15 gram) kemudian dilarutkan dalam (150 ml) etanol dengan berbagai variasi konsentrasi pelarut 50%, 60%, 70%, 80%, 90% (perbandingan 1:10). Tujuan dilakukannya pembuatan variasi konsentrasi yaitu agar setiap pelarut memiliki kepolaran yang berbeda-beda karena dapat mempengaruhi senyawa aktif yang akan tertarik. Setelah itu dilakukan ekstraksi dengan *ultrasonic bath* pada suhu 45<sup>0</sup>C selama 20 menit. Pada penelitian ini tidak ada pengaruh dari suhu dan juga waktu, tetapi yang berpengaruh hanya konsentrasi pelarut saja. Metode ultrasonik ini

digunakan karena waktu ekstraksi yang singkat, energi yang digunakan rendah, dan pelarut yang digunakan sedikit. Penggunaan suhu yang digunakan yaitu 45<sup>0</sup>C karena untuk menghindari terjadinya kerusakan senyawa yang terkandung pada simplisia. Menurut Yuliantari et al., (2017) tingginya suhu yang digunakan pada saat ekstraksi dapat menyebabkan senyawa yang terkandung dalam simplisia mengalami kerusakan atau kehilangan terutama pada senyawa flavonoid yang dapat mengalami kerusakan pada suhu tinggi (di atas 50<sup>0</sup>C). Kemudian dilakukan penyaringan dan penguapan dengan *waterbath* pada suhu 50<sup>0</sup>C sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental dari masing-masing variasi konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 8. Ekstrak Kental Herba Pegagan Dengan Variasi Konsentrasi Pelarut**

Keterangan: (A) Ekstrak etanol konsentrasi 50% (B) Ekstrak etanol konsentrasi 60% (C) Ekstrak etanol konsentrasi 70% (D) Ekstrak etanol konsentrasi 80% (E) Ekstrak etanol konsentrasi 90%

Sumber: Foto Dokumen Pribadi Peneliti

Pada penelitian ini ekstrak kental yang didapatkan yaitu dalam jumlah yang kecil, sehingga dilakukan ekstraksi sebanyak 2x untuk menghindari terjadinya kekurangan ekstrak pada saat proses percobaan lainnya. Ekstrak kental yang diperoleh dari masing-masing variasi konsentrasi pelarut kemudian dilakukan perhitungan rendemen (Lampiran 6). Tujuan dilakukannya perhitungan rendemen ini yaitu untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung pada herba pegagan yang berhasil terekstraksi (Utami et al., 2020). Hasil bobot dan rendemen ekstrak dari masing-masing variasi konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 5. dan Tabel 6.

**Tabel 5. Hasil Rendemen Ekstraksi Pertama**

Sampel	Berat Sampel (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen (%)	Literatur (FHI, 2017)	Keterangan
Herba pegagan (konsentrasi 50%)	15	2,124	14,16	Hasil rendemen tidak kurang dari 7,3%	✓

Sampel	Berat Sampel (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen (%)	Literatur (FHI, 2017)	Keterangan
Herba pegagan (konsentrasi 60%)	15	1,737	11,58		✓
Herba pegagan (konsentrasi 70%)	15	1,534	10,227		✓
Herba pegagan (konsentrasi 80%)	15	0,835	5,567		-
Herba pegagan (konsentrasi 90%)	15	0,508	3,387		-

Keterangan: (✓) Memenuhi persyaratan; (-) Tidak memenuhi persyaratan

**Tabel 6. Hasil Rendemen Ekstraksi Kedua**

Sampel	Berat Sampel (gram)	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen (%)	Literatur (FHI, 2017)	Keterangan
Herba pegagan (konsentrasi 50%)	15	2,197	14,467	Hasil rendemen tidak kurang dari 7,3%	✓
Herba pegagan (konsentrasi 60%)	15	1,903	12,687		✓
Herba pegagan (konsentrasi 70%)	15	1,616	10,773		✓
Herba pegagan (konsentrasi 80%)	15	0,901	6,007		-
Herba pegagan (konsentrasi 90%)	15	0,597	3,980		-

Keterangan: (✓) Memenuhi persyaratan; (-) Tidak memenuhi persyaratan

Menurut Farmakope Herbal Indonesia tahun 2017, menyatakan bahwa hasil rendemen yang baik pada ekstrak kental pegagan yaitu tidak kurang dari 7,3% (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 50%, 60%, dan 70% telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan sedangkan pada konsentrasi 80% dan 90% tidak memenuhi persyaratan yang ditetapkan. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Hartanti et al., (2021) dimana pada konsentrasi 80% dan 90% memiliki hasil rendemen yang rendah, hal ini menunjukkan bahwa variasi konsentrasi memberikan pengaruh yang nyata terhadap hasil rendemen dan semakin rendah konsentrasi pelarut maka semakin besar kadar yang terekstrak/tersari.

Untuk mengetahui kualitas ekstrak yang dihasilkan maka dilakukan uji organoleptik meliputi konsistensi, warna, bau, dan rasa dari ekstrak. Hasil uji organoleptik dari ekstrak yang didapatkan dapat dilihat pada Tabel 7.

**Tabel 7. Hasil Uji Organoleptik**

Konsentrasi Pelarut Etanol	Konsistensi Ekstrak	Warna Ekstrak	Bau Ekstrak	Rasa Ekstrak	Literatur (FHI, 2017)	Keterangan
50%	Kental	Coklat pekat kehitaman	Khas	Sedikit pahit	Ekstrak kental, warna coklat, bau khas, rasa agak pahit	✓
60%	Kental	Coklat pekat kehitaman	Khas	Sedikit pahit		✓
70%	Kental	Coklat pekat kehitaman	Khas	Sedikit pahit		✓
80%	Kental	Coklat kehijauan	Khas	Sedikit pahit		✓
90%	Kental	Coklat kehijauan	Khas	Sedikit pahit		✓

Keterangan: (✓): Memenuhi persyaratan

#### 4. Pengujian Fitokimia

Hasil pada uji pendahuluan skrinning fitokimia dari variasi konsentrasi etanol ekstrak pegagan didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol herba pegagan pada konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% mengandung alkaloid, saponin, tanin, fenol, flavonoid, terpenoid/steroid. Hasil uji skrinning fitokimia dari masing-masing variasi konsentrasi pelarut dapat dilihat pada Tabel 8. dan Lampiran 7.

**Tabel 8. Hasil Uji Skrinning Fitokimia**

Golongan	Variasi Konsentrasi Etanol Ekstrak Pegagan					Literatur (Djoko et al., 2020)
	50%	60%	70%	80%	90%	
<b>Alkaloid</b>						Herba pegagan positif mengandung alkaloid, saponin, tanin, fenol, flavonoid terpenoid / steroid
Dragendorf	+	+	+	+	+	
Bouchardat	+	+	+	+	+	
Mayer	+	+	+	+	+	
<b>Saponin</b>	+	+	+	+	+	
<b>Tanin</b>	+	+	+	+	+	
<b>Fenol</b>	+	+	+	+	+	
<b>Flavonoid</b>	+	+	+	+	+	
<b>Terpenoid / Steroid</b>	+	+	+	+	+	

Keterangan: (+): Mengandung kandungan senyawa

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

KLT merupakan analisis kualitatif yang digunakan untuk mendeteksi ada atau tidak adanya senyawa penanda pada sampel. Penggunaan metode KLT

ini dipilih karena merupakan metode yang mudah dilakukan, cepat, biaya yang dibutuhkan tidak terlalu mahal, sederhana, dan tidak memerlukan alat khusus. Pada penelitian ini, senyawa yang akan dideteksi adalah flavonoid. Pada percobaan KLT biasanya diperoleh data berupa bercak/noda dan nilai Rf (*Retardation factor*).

Pada penelitian ini digunakan kuersetin sebagai pembanding. Digunakan konsentrasi sampel sebesar 1% (100 mg/10 ml). Untuk fase diam digunakan plat silika gel GF<sub>254</sub>. Sebelum dilakukan penotolan sampel dan pembanding pada plat, perlu dilakukan terlebih dahulu pengaktifan pada lempeng dengan cara dioven pada suhu 100°C (30 menit). Tujuan dilakukan pengaktifan ini agar kadar air yang terkandung dalam plat menjadi hilang sehingga daya serap yang dihasilkan akan meningkat (Mawarda et al., 2020). Setelah plat selesai diaktifkan, kemudian dilakukan penotolan dengan volume penotolan  $\pm 2 \mu\text{l}$  dengan *white tip*, setelah itu dimasukkan ke dalam bejana yang sudah jenuh.

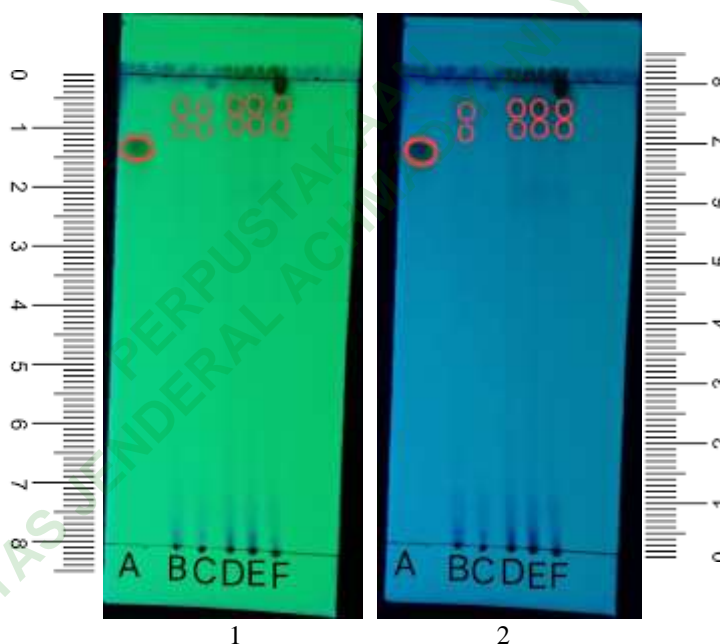
Hal yang pertama dilakukan saat melakukan pengujian KLT yaitu adalah penjenuhan bejana dengan fase gerak (eluen). Penjenuhan ini dilakukan dengan menggunakan kertas saring. Tujuan dilakukannya penjenuhan yaitu agar tekanan uap pelarut (fase gerak) memiliki kesamarataan sehingga nantinya pelarut dapat berjalan dalam waktu yang sama sehingga hasil yang didapatkan akan lebih baik dan akurat. Fase gerak yang digunakan diperoleh dari hasil orientasi yang dapat dilihat pada Tabel 9.

**Tabel 9. Optimasi Fase Gerak**

No.	Fase Gerak	Hasil Kromatografi Lapis Tipis
1.	Kloroform : Etil Asetat : Butanol (5:1:4)	Sampel (1%) terelusi tetapi bercak kuersetin (0,1%) tidak terlihat.
2.	Kloroform : Etil Asetat : Butanol (5:1:4)	Sampel (1%) terelusi tetapi bercak kuersetin (0,2%) tidak terlihat.
3.	Kloroform : Asam Asetat Glisial : Butanol (5:1:4)	Sampel (1%) terelusi tetapi terjadi tailing pada sampel, kuersetin (0,4%) terlihat samar.
4.	Heksana : Metanol : Aseton (9:0,5:0,5)	Sampel (1%) dan kuersetin (1%) tidak terlihat.
5.	Kloroform : Metanol : Asam Asetat (5:4:1)	Sampel (1%) dan kuersetin (1%) terlihat samar.
6.	Kloroform : Metanol (9 : 1)	Sampel konsentrasi 50%, 60%, 70% terlihat samar dan kuersetin (1%) melebar (2x totalan pada kuersetin).

No.	Fase Gerak	Hasil Kromatografi Lapis Tipis
7.	Kloroform : Etil Asetat : Asam Asetat Glisial (5:4:1)	Sampel (1%) terelusi tetapi kuersetin (1%) melebar (2x totalan pada kuersetin).
8.	Kloroform : Etil Asetat : Asam Asetat Glisial (5:4:1)	Sampel (1%) terelusi tetapi kuersetin (0,1%) sedikit melebar (2 x totalan pada kuersetin).

Dari hasil orientasi berbagai fase gerak, yang memberikan hasil paling baik (optimal) yaitu kombinasi fase gerak kloroform: etil asetat: asam asetat glisial (5:4:1) (Ihsan et al., 2019). Fase gerak tersebut dapat memisahkan komponen senyawa kuersetin pada ekstrak etanol herba pegagan. Hasil identifikasi KLT senyawa flavonoid terhadap ekstrak etanol herba pegagan dengan variasi konsentrasi (50%, 60%, 70%, 80%, 90%) dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Profil KLT Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica L.*)

Keterangan: 1. Deteksi dengan UV 254 nm; 2. Deteksi dengan UV 366 nm. (A) Kuersetin; (B) Ekstrak konsentrasi 50%; (C) Ekstrak konsentrasi 60%; (D) Ekstrak konsentrasi 70%; (E) Ekstrak konsentrasi 80%; (F) Ekstrak konsentrasi 90%. Fase diam = silika gel GF<sub>254</sub>. Fase gerak = Kloroform: Etil Asetat: Asam Asetat Glisial (5: 4: 1 v/v/v).

Dari hasil perhitungan (Lampiran 7) nilai Rf (*retardation factor*) dapat dilihat pada Tabel 10. Nilai Rf dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa. Jika nilai Rf suatu sampel memiliki nilai yang hampir mirip dengan standar maka dapat dikatakan bahwa sampel mempunyai karakteristik yang sama dengan standar, sebaliknya jika memiliki nilai Rf berbeda maka senyawa

tersebut dapat dikatakan tidak mirip atau berbeda (Sopiah et al., 2019). Menurut Lero, (2021) selisih nilai Rf dikatakan positif apabila  $\leq 5\%$  dan dikatakan negatif jika  $> 5\%$ .

**Tabel 10. Hasil Nilai Rf Ekstrak Etanol Herba Pegagan**

Sampel	Spot (noda)	Rf
Kuersetin	1	0,862
Ekstrak etanol herba pegagan konsentrasi 50%	1	0,887
	2	0,937
Ekstrak etanol herba pegagan konsentrasi 60%	1	0,887
	2	0,937
Ekstrak etanol herba pegagan konsentrasi 70%	1	0,900
	2	0,950
Ekstrak etanol herba pegagan konsentrasi 80%	1	0,900
	2	0,950
Ekstrak etanol herba pegagan konsentrasi 90%	1	0,900
	2	0,950

Hasil pengamatan di bawah sinar UV 254 nm (Gambar 9.1) menunjukkan bercak jelas dengan warna kuning kehijauan pada ekstrak konsentrasi 70%, 80%, dan 90%, sedangkan pada konsentrasi 50% dan 60% warna kuning kehijauan terlihat tipis atau sedikit samar. Pada sinar UV 366 nm (Gambar 9.2) menunjukkan bercak jelas dengan warna kuning kehijauan pada ekstrak konsentrasi 70%, 80, dan 90%. Standar kuersetin berwarna kuning kecoklatan. Bercak berwarna kuning kehijauan yang terdeteksi ini diduga merupakan senyawa flavonoid. Menurut Ayu et al., (2019) hasil positif mengandung flavonoid ditandai dengan terbentuknya noda berwarna kuning kehijauan. Berdasarkan hasil pengamatan KLT yang dibandingkan dengan standar kuersetin, diduga ekstrak herba pegagan yang digunakan dalam uji ini memiliki kandungan flavonoid yaitu kuersetin.

#### 6. Pengujian Peredaman Radikal Bebas (Metode DPPH)

Analisis pengujian antioksidan pada penelitian ini dilakukan dengan cara kuantitatif yaitu dengan menentukan nilai  $IC_{50}$  pada variasi konsentrasi etanol ekstrak pegagan dan vitamin C (pembeding) menggunakan metode DPPH. Sebelum dilakukan pengukuran menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dilakukan penentuan panjang gelombang dan *operating time* terlebih dahulu untuk mengetahui daerah serapan yang optimum dan mengetahui waktu pengukuran senyawa dalam keadaan stabil. Pada penelitian ini setelah dilakukan



pengukuran panjang gelombang pada rentang 400-600 nm didapatkan panjang gelombang maksimal yaitu 515 nm (Lampiran 8). Setelah itu dilakukan *operating time* untuk mengetahui waktu pengukuran senyawa dalam keadaan stabil pada rentang 0-40 menit dan didapatkan waktu inkubasi yang stabil pada waktu 30 menit (Lampiran 8).

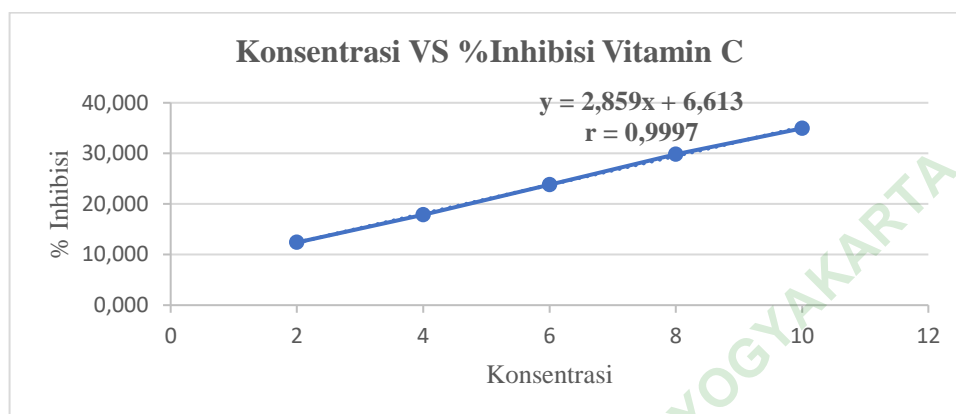
Hal yang pertama dilakukan yaitu melakukan penentuan kurva standar pembanding (vitamin C). Penggunaan vitamin C sering digunakan sebagai pembanding karena merupakan senyawa antioksidan sintetis. Vitamin C juga dapat bertindak untuk menangkap radikal bebas, relatif aman, dan tidak menimbulkan kerusakan (toksisitas) (Purwanti et al., 2019). Menurut Gayatri, 2021) penggunaan Vitamin C lebih dipilih sebagai pembanding dibandingkan dengan kuersetin karena vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan kuersetin.

Pada pengujian ini digunakan reagen DPPH (konsentrasi 0,1 mM). Pengujian aktivitas peredaman radikal bebas standar vitamin C dibuat dari stok induk 100 ppm (5 mg/50 ml), lalu dibuat seri konsentrasi (2, 4, 6, 8, 10) ppm (Lampiran 9). Setelah itu didapatkan nilai absorbansi dari masing-masing konsentrasi (Tabel 11). Nilai absorbansi tersebut kemudian dapat digunakan untuk menentukan nilai %inhibisi untuk mendapatkan nilai regresi linier yang digunakan untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>. Dari hasil penelitian yang dilakukan didapatkan nilai regresi linier  $y = 2,859x + 6,613$  (Gambar 10) dan nilai IC<sub>50</sub> = 15,176 ppm (sangat kuat).

**Tabel 11. Hasil Analisis Peredaman Radikal Bebas DPPH**

Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
2	1	0,780	0,775	12,329	15,176
	2	0,771			
	3	0,775			
4	1	0,731	0,727	17,891	
	2	0,726			
	3	0,723			
6	1	0,677	0,674	23,842	
	2	0,670			
	3	0,675			
8	1	0,625	0,621	29,831	
	2	0,618			
	3	0,620			

10	1	0,581	0,576	34,953	
	2	0,575			
	3	0,571			
Absorbansi DPPH: 0,885					



Gambar 10. Kurva Standar Vitamin C

Pada pengujian variasi konsentrasi etanol ekstrak pegagan dilakukan dengan pembuatan stok induk 1000 ppm (25 mg/25 ml), lalu dibuat seri konsentrasi (10, 20, 40, 60, 80) ppm (Lampiran 9). Setelah itu didapatkan nilai absorbansi dari masing-masing konsentrasi (Tabel 12). Nilai absorbansi tersebut kemudian dapat digunakan untuk menentukan nilai %inhibisi untuk mendapatkan regresi linier yang digunakan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$ . Dari hasil penelitian yang dilakukan dari masing-masing variasi konsentrasi etanol ekstrak pegagan yang digunakan dapat dikategorikan dalam antioksidan sangat kuat, dapat dilihat pada Tabel 12 menunjukkan nilai  $IC_{50}$  yang didapatkan dari masing-masing variasi konsentrasi < 50 ppm.

Tabel 12. Hasil Analisis Peredaman Radikal Bebas DPPH Variasi Konsentrasi Etanol

	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	$IC_{50}$ (ppm)
Ekstrak Pegagan (50%)	10	1	0,448	0,447	45,488	16,321
		2	0,445			
		3	0,447			
		4	0,448			
	20	1	0,378	0,376	54,116	
		2	0,375			
		3	0,377			
		4	0,375			
	40	1	0,355	0,355	56,738	
		2	0,353			
		3	0,355			
		4	0,356			
	60	1	0,301	0,301	63,293	
		2	0,301			

	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		3	0,300			
		4	0,302			
	80	1	0,262	0,263	67,896	
		2	0,264			
		3	0,264			
		4	0,263			
Absorbansi DPPH: 0,820						

	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
<b>Ekstrak Pegagan (60%)</b>	10	1	0,425	0,424	46,667	20,758
		2	0,420			
		3	0,426			
		4	0,425			
	20	1	0,388	0,387	51,352	
		2	0,385			
		3	0,388			
		4	0,386			
	40	1	0,369	0,369	53,616	
		2	0,370			
		3	0,368			
		4	0,368			
	60	1	0,306	0,305	61,635	
		2	0,305			
		3	0,305			
		4	0,304			
	80	1	0,251	0,252	68,302	
		2	0,254			
		3	0,252			
		4	0,251			
Absorbansi DPPH: 0,795						

	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
<b>Ekstrak Pegagan (70%)</b>	10	1	0,418	0,418	44,775	23,015
		2	0,416			
		3	0,419			
		4	0,417			
	20	1	0,378	0,375	50,397	
		2	0,373			
		3	0,374			
		4	0,375			
	40	1	0,330	0,333	55,952	
		2	0,331			
		3	0,335			
		4	0,336			
	60	1	0,304	0,305	59,722	
		2	0,303			
		3	0,305			
		4	0,306			
	80	1	0,265	0,264	65,046	

	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
		2	0,261			
		3	0,265			
		4	0,266			
Absorbansi DPPH: 0,756						

	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
<b>Ekstrak Pegagan (80%)</b>	10	1	0,410	0,410	45,800	28,477
		2	0,408			
		3	0,411			
		4	0,410			
	20	1	0,387	0,386	48,942	
		2	0,385			
		3	0,386			
		4	0,386			
	40	1	0,368	0,368	51,389	
		2	0,368			
		3	0,366			
		4	0,368			
	60	1	0,324	0,324	57,176	
		2	0,322			
		3	0,324			
		4	0,325			
	80	1	0,292	0,291	61,475	
		2	0,290			
		3	0,291			
		4	0,292			
Absorbansi DPPH: 0,756						

	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
<b>Ekstrak Pegagan (90%)</b>	10	1	0,432	0,432	47,378	31,833
		2	0,433			
		3	0,430			
		4	0,431			
	20	1	0,418	0,418	49,085	
		2	0,418			
		3	0,417			
		4	0,417			
	40	1	0,401	0,401	51,098	
		2	0,400			
		3	0,402			
		4	0,401			
	60	1	0,387	0,388	52,744	
		2	0,388			
		3	0,388			
		4	0,387			
	80	1	0,372	0,371	54,787	
		2	0,370			
		3	0,371			
		4	0,370			

	Konsentrasi (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-Rata Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
	Absorbansi DPPH: 0,820					

Setelah itu dilakukan perhitungan analisis statistik dengan program SPSS dari nilai IC<sub>50</sub> vitamin C dan variasi konsentrasi ekstrak pegagan. Hal pertama yang dilakukan yaitu uji normalitas, tujuannya untuk melihat data yang didapatkan telah terdistribusi normal atau tidak. Setelah itu dilakukan uji homogenitas, tujuannya untuk melihat data yang didapatkan memiliki keseragaman. Selanjutnya dilakukan dengan pengujian menggunakan *One Way Anova* karena data yang digunakan dalam penelitian ini lebih dari dua dan juga untuk mengetahui adanya perbedaan pada sampel dan standar.

**Tabel 13. Hasil Uji Statistik Data Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH**

Sampel	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>Kruskal Wallis</i>
Vitamin C	0,908	0,264	< 0,001*
Ekstrak konsentrasi 50%	0,470		
Ekstrak konsentrasi 60%	0,394		
Ekstrak konsentrasi 70%	0,024		
Ekstrak konsentrasi 80%	0,061		
Ekstrak konsentrasi 90%	0,616		

Keterangan: (\*) Ada perbedaan

**Tabel 14. Hasil Uji Statistik Data Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH Tiap Konsentrasi**

Sampel	Uji Normalitas	Uji Homogenitas	Uji <i>Kruskal Wallis</i>
Ekstrak konsentrasi 50%	0,470	0,659	0,001*
Ekstrak konsentrasi 60%	0,394		
Ekstrak konsentrasi 70%	0,024		
Ekstrak konsentrasi 80%	0,061		
Ekstrak konsentrasi 90%	0,616		

Keterangan: (\*) Ada perbedaan

Pengujian pertama yang dilakukan yaitu uji normalitas. Pada uji normalitas dilakukan dengan uji *shapiro-wilk* karena sampel yang digunakan pada penelitian ini kurang dari 50. Berdasarkan (Tabel 13) pada uji normalitas pada ekstrak konsentrasi 70% didapatkan nilai signifikan ( $p < 0,05$ ), sehingga dapat dikatakan bahwa data tersebut tidak terdistribusi dengan normal. Kemudian dilakukan pengujian berikutnya yaitu uji homogenitas dengan uji *levene* ragam. Berdasarkan (Tabel 13) pada uji homogenitas didapatkan nilai signifikan ( $p > 0,05$ ), sehingga dapat dikatakan bahwa data tersebut homogen. Untuk mengetahui adanya perbedaan pada sampel dan standar maka dilakukan uji *One Way Anova*. Uji *One Way Anova* dapat dilakukan apabila pada uji

normalitas dan homogenitas sudah memenuhi persyaratan yaitu data harus terdistribusi normal dan homogen. Tetapi dari hasil yang didapatkan pada uji normalitas terdapat satu data (ekstrak konsentrasi 70%) yang tidak memenuhi persyaratan, sehingga tidak dapat dilakukan pengujian menggunakan uji *One Way Anova*. Jika data sampel tidak terdistribusi normal, maka untuk melihat adanya perbedaan antara sampel dan standar maka dilakukan pengujian dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis*. Berdasarkan (Tabel 13) pada uji *Kruskal Wallis* diperoleh hasil  $<0,001$  yang mana  $< 0,05$ , sehingga menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara vitamin C dengan variasi konsentrasi etanol herba pegagan. Kemudian, untuk tiap konsentrasi dapat dilihat pada (Tabel 14) pada uji *Kruskal Wallis* dimana diperoleh hasil  $0,001$  yang mana  $< 0,05$ , sehingga dari hasil tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan tiap konsentrasi ekstrak.

### **B. Pembahasan**

Hal pertama yang dilakukan pada penelitian ini yaitu proses pembuatan ekstrak dengan berbagai variasi konsentrasi pelarut etanol dengan menggunakan metode ekstraksi ultrasonikasi. Ekstrak kental yang didapatkan kemudian dilakukan pengujian fitokimia. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, ekstrak etanol herba pegagan dari berbagai variasi konsentrasi mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin, fenol, flavonoid, dan terpenoid/steroid. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Djoko et al., (2020) bahwa ekstrak pegagan mengandung senyawa alkaloid, saponin, tanin, fenol, flavonoid, dan terpenoid/steroid. Pada pengujian alkaloid dilakukan pelarutan ekstrak menggunakan HCl 2N. Tujuannya yaitu karena alkaloid memiliki sifat basa sehingga perlu adanya penambahan suatu asam yang nantinya akan membentuk garam, dimana pembentukan garam tersebut akan memisahkan alkaloid yang bersifat basa dengan komponen lain (Wullur et al., 2013). Setelah itu dibagi menjadi 3 bagian dan ditambahkan pereaksi mayer, wagner, dan dragendorf. Pada pereaksi mayer adanya suatu kandungan nitrogen yang terdapat pada senyawa alkaloid akan bereaksi dengan ion logam  $K^+$  (kalium tetraiodomercurat (II)) sehingga akan membentuk endapan kompleks kalium-alkaloid berwarna putih atau kuning. Pada

pereaksi wagner suatu iodine akan bereaksi dengan ion  $I^-$  dari kalium iodide menghasilkan ion  $I_3^-$  yang akan membentuk endapan kalium-iodida berwarna coklat. Pada pereaksi dragendorff suatu nitrogen akan membentuk ikatan dengan  $K^+$  (ion logam) sehingga membentuk endapan kalium-alkaloid berwarna merah atau jingga (Fajrin & Susila, 2019). Pada pengujian saponin hal pertama yang dilakukan yaitu penambahan akuadest. Tujuan dilakukannya penambahan akuadest yaitu karena sebagian senyawa saponin akan larut dalam air. Senyawa yang larut air tersebut akan berikatan dengan air dan senyawa yang tidak larut air akan berikatan dengan udara yang akan membentuk busa. Penambahan HCl 2N juga dilakukan untuk membuat busa yang terbentuk lebih stabil (Sulistyarini et al., 2019). Pada pengujian fenol dan tanin penambahan pereaksi  $FeCl_3$  akan menyebabkan terjadinya perubahan warna menjadi biru atau hijau kehitaman. Hal ini dapat terjadi karena terdapat reaksi antara senyawa hidroksil dengan  $FeCl_3$  yang akan membentuk kompleks. Terjadinya perubahan warna biru atau hijau kehitaman menandakan bahwa sampel mengandung gugus fenol dimana jika adanya senyawa fenol maka dimungkinkan terdapat senyawa tanin, karena tanin adalah senyawa polifenol (Ikalinus et al., 2015). Pada pengujian flavonoid dilakukan penambahan serbuk magnesium (Mg) dan HCl pekat. HCl pekat berfungsi menghidrolisis o-glikosil (aglikon dari flavonoid), karena glikosil memiliki sifat elektrofilik maka akan berubah menjadi  $H^+$  dari HCl pekat. Reduksi antara Mg dengan HCl pekat akan membentuk senyawa kompleks dengan terbentuknya warna merah atau jingga (adanya flavon), merah tua (adanya flavonon atau flavonol), hijau sampai biru (adanya glikosida atau aglikon) (Ikalinus et al., 2015). Pada pengujian terpenoid/steroid dilakukan penambahan asam asetat anhidrat dan  $H_2SO_4$  pekat. Penambahan asam asetat anhidrat ini dilakukan untuk membentuk turunan asetil. Penambahan  $H_2SO_4$  ini dilakukan untuk menghidrolisis air yang bereaksi dengan turunan asetil, sehingga akan terbentuk terjadinya perubahan warna. Perubahan warna ini akan terjadi karena adanya oksidasi dari senyawa terpenoid/steroid yang membentuk ikatan rangkap terkonjugasi. Hasil positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna biru sampai kehijauan (positif steroid), orange atau merah atau kuning (positif triterpenoid) (Sulistyarini et al., 2019).

Hal kedua dilakukan identifikasi senyawa flavonoid dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metode KLT dipilih karena merupakan metode yang mudah dilakukan, cepat, biaya yang dibutuhkan tidak terlalu mahal, sederhana, dan tidak memerlukan alat khusus. Tujuan dilakukannya identifikasi senyawa flavonoid karena flavonoid merupakan antioksidan sekunder yang bekerja sebagai pro-oksidan untuk meredam reaksi oksidasi dari radikal bebas (Sparringa, 2016). Pada percobaan ini dilakukan dengan menggunakan pembanding kuersetin. Kuersetin merupakan pembanding yang biasanya digunakan karena kuersetin merupakan senyawa flavonoid golongan flavonol (Nurmila et al., 2019). Pada percobaan ini juga digunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> (*Gypsum fluoresens* 254) yang dapat berfluoresensi dengan baik pada sinar UV 254 nm (Oktaviantari et al., 2019).

Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya noda berwarna kuning kehijauan yang diamati pada sinar UV (Ayu et al., 2019). Noda berwarna kuning kehijauan ini dapat timbul karena adanya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi dan lempeng KLT (Forestryana & Arnida, 2020). Pada penelitian ini terlihat jika noda yang terbentuk pada kuersetin berwarna kuning kecoklatan, sedangkan pada sampel ekstrak etanol herba pegagan dari berbagai variasi konsentrasi menunjukkan terbentuknya warna kuning kehijauan. Dari hasil yang telah dilakukan didapatkan nilai R<sub>f</sub> pada sampel konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, dan 90% tidak memiliki nilai yang sama persis dengan standar kuersetin. Hal ini mungkin dapat terjadi karena adanya senyawa lain yang ikut terelusi (senyawa bukan kuersetin). Menurut Saputri & Damayanthi, (2015) biomarker senyawa penanda utama pada herba pegagan yaitu asiatikosida (golongan triterpenoid dan steroid). Senyawa asiatikosida merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dimana senyawa ini merupakan unsur utama dan paling aktif pada herba pegagan yang dapat memberikan efek neuropektif pada kerusakan oksidatif akibat radikal bebas (Saputri & Damayanthi, 2015).

Pada percobaan ini, pengujian peredaman radikal bebas pada ekstrak etanol herba pegagan dengan berbagai variasi konsentrasi dilakukan menggunakan metode DPPH dengan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis.



Metode DPPH bekerja karena adanya suatu interaksi antioksidan dari senyawa yang ada pada sampel dengan DPPH. Adanya transfer elektron radikal hidrogen nantinya akan menetralkan radikal bebas pada DPPH tersebut (Pridatama, 2021).

Pada pengujian antioksidan ini, hal pertama yang dilakukan yaitu pembuatan larutan induk DPPH 0,1 mM. Larutan DPPH ini berperan sebagai radikal bebas yang nantinya akan bereaksi dengan suatu antioksidan (ekstrak etanol herba pegagan dan vitamin C). Larutan induk DPPH 0,1 mM ini dibuat dengan melarutkan 4 mg serbuk DPPH dengan metanol 100 ml. Penggunaan metanol ini dipilih karena DPPH dapat larut pada pelarut polar seperti metanol. Larutan induk dibuat dalam keadaan gelap (labu takar dilapisi dengan aluminium foil). Tujuannya yaitu agar larutan DPPH tidak terkena sinar atau cahaya secara langsung karena hal tersebut dapat membuat larutan menjadi tidak stabil. Setelah itu larutan DPPH dilakukan penentuan panjang gelombang pada rentang 400-600 nm. Pada percobaan yang telah dilakukan didapatkan panjang gelombang maksimum DPPH 515 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wulandari et al., (2015) bahwa panjang gelombang maksimum dari DPPH yaitu 515 nm. Tujuan dilakukannya penentuan panjang gelombang ini yaitu untuk mengetahui daerah serapan yang optimum agar nantinya dapat meningkatkan sensitivitas pada nilai analisis yang didapatkan. Setelah mendapatkan nilai panjang gelombang yang maksimum lalu dilakukan *operating time*. Penentuan *operating time* ini dilakukan pembacaan setiap 2 menit sekali selama 40 menit. Pembacaan dilakukan setiap 2 menit agar dapat melihat secara spesifik waktu yang didapatkan dalam keadaan stabil. Pada percobaan yang telah dilakukan didapatkan nilai DPPH yang stabil pada menit 30. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wulandari et al., (2015) dimana *operating time* dari DPPH yaitu 30 menit. Tujuan dilakukannya *operating time* yaitu untuk mengetahui waktu pengukuran senyawa dalam keadaan stabil dan sudah terjadi reaksi yang optimal antara sampel yang memiliki aktivitas penangkal radikal bebas (vitamin C) dan radikal bebas (DPPH).

Dari hasil percobaan yang sudah dilakukan, diperoleh IC<sub>50</sub> ekstrak etanol herba pegagan yang memiliki aktivitas peredaman radikal bebas tertinggi sampai terendah yaitu konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dengan nilai IC<sub>50</sub> secara

berturut-turut 16,321 ppm, 20,758 ppm, 23,015 ppm, 28,477 ppm, 31, 833 ppm. Dari kelima sampel masuk ke dalam kategori antioksidan sangat kuat, dimana nilai antioksidan yang didapatkan  $< 50$  ppm. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa adanya pengaruh pada variasi konsentrasi. Semakin rendah konsentrasi maka semakin baik kemampuan antioksidannya. Menurut Suhendra et al., (2019) adanya perbedaan konsentrasi etanol dapat memberikan pengaruh pada tingkat polaritas dari suatu pelarut. Polaritas ini akan semakin meningkat bersamaan dengan penurunan konsentrasinya di dalam air. Sehingga hal ini juga berpengaruh pada penarikan senyawa aktif yang berpotensi memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Prasetyorini et al., (2012) rendemen pada ekstrak berkolerasi dengan aktivitas antioksidan, semakin tinggi nilai rendemen ekstrak maka aktivitas antioksidan suatu ekstrak akan semakin tinggi. Hal ini sesuai dengan percobaan yang telah dilakukan, dimana nilai rendemen ekstrak yang paling tinggi yaitu pada konsentrasi 50%.

Pada percobaan ini digunakan vitamin C sebagai pembanding. Vitamin C digunakan sebagai pembanding karena vitamin C merupakan antioksidan sintesis yang dapat menangkal suatu radikal bebas dan mencegah terbentuknya reaksi berantai (Sayuti & Yenrina, 2015). Vitamin C digunakan sebagai pembanding suatu aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol herba pegagan dengan variasi 5 konsentrasi. Jika didapatkan hasil  $IC_{50}$  pada ekstrak mendekati nilai  $IC_{50}$  dari pembanding (vitamin C) maka menunjukkan bahwa ekstrak etanol herba pegagan memiliki potensi alternatif sebagai antioksidan.

Berdasarkan hasil percobaan yang didapatkan, nilai  $IC_{50}$  vitamin C dan ekstrak etanol herba pegagan konsentrasi 50%; 60%; 70%; 80%; dan 90% menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini dapat terjadi karena vitamin C yang digunakan merupakan senyawa sintesis yang murni, sedangkan herba pegagan bukan merupakan senyawa yang murni atau mengandung senyawa campuran. dimana herba pegagan merupakan tumbuhan yang memiliki bermacam-macam metabolit sekunder (Rahardjo et al., 2020).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Salamah & Farahana, (2014) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol herba pegagan secara

maserasi dengan metode fosfomolibdat yang didapatkan masuk dalam kategori antioksidan kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 43,198 QE/g ekstrak. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yahya & Nurrosyidah, (2020) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol herba pegagan secara soxhletasi dengan metode DPPH yang didapatkan masuk dalam kategori antioksidan kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 78,26 ppm. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wientarsih et al., (2013) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan pada fraksi methanol ekstrak pegagan secara maserasi dengan metode DPPH yang didapatkan masuk dalam kategori antioksidan sedang dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 481,64 ppm. Berdasarkan hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan metode ekstraksi yang dilakukan secara non-konvensional memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan metode ekstraksi yang dilakukan secara konvensional. Hal ini dapat terjadi karena metode ultrasonik menggunakan bantuan gelombang untuk membantu penetrasi pelarut sehingga akan lebih efektif dalam mengeluarkan senyawa organik dan anorganik dari tanaman (Endarini, 2016).