

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tumbuhan

Identifikasi yang dilakukan terhadap sampel pada penelitian ini ditujukan untuk mendapatkan keaslian identitas dari tanaman yang akan digunakan untuk penelitian dengan jelas dan untuk menghindari terjadinya kesalahan pada tahap pengumpulan sampel tanaman. Determinasi tumbuhan pegagan dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tanggal 18 Mei 2022 dengan nomor pendaftaran 085/S.Tb./V/2022. Hasil dari determinasi tumbuhan yang akan digunakan pada penelitian ini yaitu 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 dan ekstraksi

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu herba pegagan yang diperoleh dari Desa Petung, Kecamatan Pakis, Kabupaten Magelang pada ketinggian 841 mdpl dengan titik koordinat -7,4826153,110,3281828. Herba pegagan yang didapat kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C

selama 4 jam. Tujuan dari pengeringan yaitu agar simplisia yang digunakan tidak mudah rusak serta tidak mudah ditumbuhi oleh jamur, dimana tumbuhnya jamur pada simplisia akan menyebabkan pembusukan pada saat waktu penyimpanan. Simplisia kering yang didapatkan kemudian dilakukan pengecilan ukuran partikel menggunakan blender dan akan didapatkan serbuk herba pegagan. Serbuk tersebut kemudian dilakukan pengayakan menggunakan ayakan 40 mesh yang bertujuan untuk menyeragamkan ukuran partikel serbuk. Dimana jika ukuran partikel semakin kecil maka akan semakin luas permukaan partikel, sehingga akan lebih mudah untuk pelarut kontak dengan serbuk saat proses ekstraksi. Dari 3 kg herba pegagan basah didapatkan serbuk herba pegagan sebanyak 500 gram.

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa pada suatu bagian tumbuhan menggunakan pelatut tertentu. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode ultrasonik. Dimana pelarut yang dipilih untuk ekstraksi herba pegagan pada penelitian ini yaitu etanol 96%. Sebanyak 15 gram serbuk herba pegagan dilarutkan menggunakan 150 mL etanol 96%, kemudian dilakukan proses ekstraksi menggunakan alat *ultrasonic bath* dengan kombinasi suhu dan waktu yang telah ditentukan. Setelah itu dilakukan penyaringan menggunakan *Buchner* untuk memisahkan ekstrak cair dengan ampas. Kemudian ekstrak cair yang didapatkan dilakukan penguapan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C, dimana akan dihasilkan ekstrak kental.

3. Optimasi Proses Ekstraksi Senyawa Fenol dan Flavonoid dari Herba Pegagan

Rancangan optimasi dari penelitian ini menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) dengan rancangan *Central Composite Design* (CCD). Pada penelitian ini menggunakan 2 faktor yaitu suhu dan waktu. Faktor yang pertama yaitu suhu menggunakan rentang 40°C – 50°C, untuk faktor yang kedua yaitu waktu menggunakan rentang 10 menit – 30 menit. Respon yang dioptimasi pada penelitian ini yaitu total fenolik, total flavonoid, dan rendemen.

Rancangan dan hasil optimasi proses ekstraksi herba pegagan dapat dilihat pada **Tabel 5** dan **Tabel 6**.

Tabel 5. Rancangan Optimasi Proses Ekstraksi

	Faktor	Level (-1)	Level (+1)
X1	Suhu (A)	40 ⁰ C	50 ⁰ C
X2	Waktu (B)	10 menit	30 menit

Tabel 6. Hasil Respon Optimasi Proses Ekstraksi

<i>StdOrder</i>	<i>RunOrder</i>	<i>PtType</i>	<i>Blocks</i>	Suhu (°C)	Waktu (menit)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	Rendemen (%)
1	1	1	1	40.0000	10.0000	43.153	3.997	8.980
2	2	1	1	50.0000	10.0000	44.025	4.552	8.853
3	3	1	1	40.0000	30.0000	40.908	3.697	9.470
4	4	1	1	50.0000	30.0000	39.174	3.588	8.793
5	5	0	1	45.0000	20.0000	47.484	5.615	10.280
6	6	0	1	45.0000	20.0000	46.803	5.047	10.593
7	7	0	1	45.0000	20.0000	48.441	5.358	11.540
8	8	-1	2	37.9289	20.0000	36.341	3.392	10.047
9	9	-1	2	52.0711	20.0000	37.727	3.557	11.707
10	10	-1	2	45.0000	5.8579	39.902	3.740	10.127
11	11	-1	2	45.0000	34.1421	45.114	4.756	10.693
12	12	0	2	45.0000	20.0000	49.731	5.437	10.227
13	13	0	2	45.0000	20.0000	45.939	5.212	11.620
14	14	0	2	45.0000	20.0000	49.009	5.597	10.133

Berdasarkan **Tabel 5** yang merupakan rancangan optimasi proses ekstraksi total fenolik, total flavonoid, dan rendemen dari herba pegagan dimana menggunakan dua faktor yaitu faktor suhu (X1) dan faktor waktu (X2). Faktor terkode yang digunakan yaitu bertujuan untuk mempermudah proses perhitungan dan faktor sebenarnya akan dikodekan berdasarkan interval yang biasa digunakan yaitu -1 dan +1, nilai titik tengah dari rancangan tersebut akan dikodekan dengan 0. Pada **Tabel 6** yang mana merupakan hasil dari respon optimasi proses ekstraksi herba pegagan terhadap suhu dan waktu ekstraksi, dimana dari optimasi tersebut didapatkan sebanyak 14 kombinasi perlakuan terhadap respon total fenolik, flavonoid, dan rendemen. Ekstraksi herba pegagan dengan perlakuan suhu 45°C dan waktu 20 menit dapat menghasilkan kadar total fenolik dan flavonoid

tertinggi, namun untuk respon rendemen yang tertinggi diperoleh dari hasil perlakuan suhu 52 dan waktu 20 menit. Dapat diartikan bahwa ekstraksi dengan suhu yang semakin tinggi dapat menghasilkan rendemen yang lebih tinggi, dan untuk mendapatkan kadar fenolik total dan flavonoid total yang paling optimal harus dilakukan ekstraksi pada kisaran suhu dan waktu optimal yaitu 45°C dan waktu 20 menit.

4. Skrining fitokimia

Hasil dari skrining fitokimia ekstrak etanol 96% herba pegagan didapatkan hasil bahwa masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan mengandung alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, tanin, dan steroid.

Tabel 7. Hasil Skrining Fitokimia

Ekstrak	Uji						Terpenoid & Steroid	
	Alkaloid			Fenol	Flavonoid	Saponin		Tanin
	Wagner	Mayer	Dragendrof					
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan:

(+) = mengandung golongan senyawa uji

Berdasarkan **Tabel 7** maka pada masing-masing uji skrining fitokimia diperoleh hasil sebagai berikut. Pada uji senyawa alkaloid menggunakan 3 pereaksi yaitu wagner, mayer, dan dragendrof. Pada masing-masing ekstrak dengan penambahan pereaksi wagner hasil positif akan membentuk larutan

dengan endapan berwarna coklat. Pada masing-masing ekstrak dengan penambahan pereaksi Mayer hasil positif menunjukkan larutan dengan endapan putih. Pada masing-masing ekstrak dengan penambahan pereaksi Dragendorff hasil positif menunjukkan larutan dengan endapan berwarna jingga. Dari masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan menunjukkan hasil positif pada setiap penambahan pereaksi.

Pada uji senyawa fenol dengan penambahan pereaksi besi (III) klorida 1% akan terbentuk warna ungu, hijau, hitam, biru, atau merah. Dari masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan membentuk warna hijau setelah penambahan pereaksi besi (III) klorida (1%), sehingga dapat diartikan bahwa masing-masing ekstrak mengandung senyawa fenol.

Pada uji senyawa flavonoid dengan penambahan larutan asam klorida 2N dan logam Mg menunjukkan hasil positif mengandung flavon jika terbentuk warna merah jingga, mengandung senyawa flavanon dan flavonol jika terbentuk warna merah tua, mengandung senyawa aglikon dan glikosida apabila terbentuk warna hijau sampai biru. Pada masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan membentuk warna hijau dari penambahan asam klorida 2N dan logam Mg, sehingga dapat diartikan bahwa masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan mengandung senyawa aglikon dan glikosida.

Pada uji senyawa saponin dengan penambahan air akan timbul buih atau busa yang tidak cepat hilang berarti sampel positif mengandung senyawa saponin. Dari masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan pada pengujian timbul buih atau busa, sehingga dapat diartikan bahwa masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan mengandung senyawa saponin.

Pada uji senyawa tanin dengan penambahan akuades dan larutan besi (III) klorida 1% akan timbul larutan berwarna hijau-hitam atau biru-hitam maka sampel ekstrak mengandung senyawa tanin. Dari masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan dengan penambahan akuades dan larutan besi (III) klorida 1%

terjadinya perubahan warna larutan menjadi warna hijau-hitam, sehingga masing-masing ekstrak positif mengandung senyawa tanin.

Pada uji senyawa terpenoid dan steroid dengan penambahan pereaksi *Liebermen-Buchard* akan terbentuk larutan dengan warna biru-kehijauan berarti ekstrak mengandung senyawa steroid, apabila terbentuk warna merah, merah muda, atau ungu maka ekstrak positif mengandung senyawa triterpen. Dari masing-masing ekstrak etanol 96% herba peagan dengan adanya penambahan pereaksi *Liebermen-Buchard* membentuk larutan dengan warna biru-kehijauan, sehingga masing-masing ekstrak mengandung senyawa steroid.

5. Penentuan kandungan fenolik total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang dihasilkan oleh suatu senyawa pada serapan maksimum. Penentuan panjang gelombang ini bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang saat mencapai serapan maksimal, dimana serapan yang dihasilkan sudah relatif stabil. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan baku asam galat dilakukan dengan membaca larutan baku asam galat pada rentang panjang gelombang 600 nm sampai 800 nm. Diperoleh hasil pengukuran panjang gelombang maksimum untuk larutan baku asam galat yaitu pada panjang gelombang 725 nm. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (Barki *et al.*, 2017) bahwa panjang gelombang maksimum untuk pengukuran larutan baku asam galat yaitu 725 nm, karena pada panjang gelombang tersebut dapat menghasilkan nilai serapan yang tinggi dibandingkan dengan panjang gelombang yang lain

b. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu inkubasi yang stabil dimana ketika senyawa-senyawa dalam sampel bereaksi secara sempurna dan membentuk senyawa kompleks. *Operating time* diukur menggunakan larutan baku asam galat yang dibaca dengan panjang

gelombang maksimum yaitu 725 nm dengan interval waktu 5 menit selama 2 jam. Diperoleh hasil pengukuran *operating time* larutan baku asam galat yaitu pada waktu 40 menit.

c. Penentuan kurva baku asam galat

Penentuan kurva baku asam galat pada penelitian ini yaitu menggunakan konsentrasi 30, 50, 70, dan 90 ppm. Penentuan seri konsentrasi didasarkan pada ketentuan hukum *Lambert-Beert*, dimana menyatakan bahwa syarat dari absorbansi yaitu pada rentang 0,2 – 0,8 dimana hal tersebut bertujuan untuk menghindari adanya kesalahan fotometrik sehingga kesalahan pada suatu analisis masih dapat diterima yaitu 0,5 – 1% (Asmorowati & Lindawati, 2019). Adapun prinsip dari penentuan kadar fenolik total menggunakan pereaksi *Folin-Ciocalteu* yaitu berdasarkan kekuatan dalam mereduksi dari gugus hidroksi fenol yang mana akan ditandai dengan terbentuknya senyawa kompleks dengan warna biru. Pada penentuan kadar fenolik total digunakan standar asam galat dikarenakan asam galat merupakan turunan dari asam hidrosibenzoat yang tergolong dalam asam fenol sederhana dan asam galat memiliki sifat yang stabil (Septiani *et al.*, 2018).

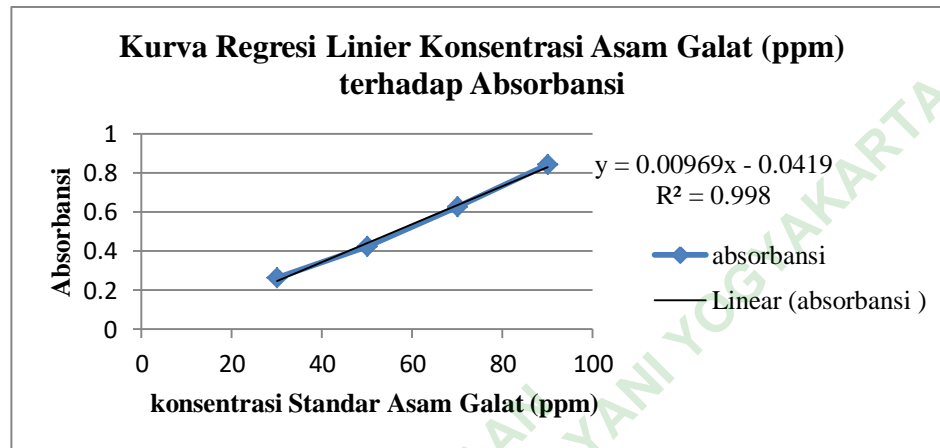
Diambil sebanyak 1 mL dari masing-masing seri kadar kemudian direaksikan dengan larutan pereaksi *Folin-Ciocalteu* sebanyak 5 mL dan diamkan selama 8 menit. Setelah itu ditambahkan dengan larutan basa yaitu NaOH sebanyak 4 mL dan diamkan selama *operating time* yaitu 40 menit, setelah itu diukur pada panjang gelombang 725 nm. Berikut hasil serapan larutan baku asam galat setelah dibaca pada panjang gelombang 725 nm:

Tabel 8. Hasil Absorbansi Kurva Baku Asam Galat

Konsentrasi Stnadar Asam Galat	Rata-rata Nilai Absorbansi
30	0,264 ± 0,016
50	0,425 ± 0,019
70	0,626 ± 0,014
90	0,843 ± 0,025

Nilai absorbansi dari larutan baku asam galat mempunyai hubungan yang linier dimana jika semakin tinggi konsentrasi maka akan semakin

meningkat pula nilai absorbansi pada sampel larutan baku. Data dari absorbansi didapatkan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi sampel larutan baku asam galat.



Gambar 4. Kurva Baku Kuersetin terhadap Absorbansi

Berdasarkan **Gambar 4** pada penelitian ini didapatkan nilai r sebesar 0,00969, dimana dapat diartikan linier atau baik karena nilai r mendekati satu. Dari kurva regresi linier tersebut didapatkan persamaan regresi yaitu $y = 0,00969x - 0,0419$. Dimana persamaan tersebut nantinya akan digunakan dalam perhitungan kadar fenolik total dari masing-masing sampel uji.

d. Penetapan kadar fenolik total

Penetapan kadar fenolik total dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Pada penetapan kadar fenolik total masing-masing dari ekstrak etanol 96% herba pegagan direaksikan dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu* sebanyak 5 mL dan diinkubasi selama 8 menit. Pereaksi *Folin-Ciocalteu* memiliki warna kuning dimana pereaksi tersebut merupakan pereaksi pengoksidasi dimana jika direaksikan dengan larutan yang mengandung senyawa fenolik akan membentuk warna biru, reaksi tersebut dipengaruhi oleh molibdat tungstat yang merupakan komponen dari *Folin-Ciocalteu*. Kemudian ditambahkan NaOH sebanyak 4 mL untuk merubah larutan menjadi suasana basa dan diinkubasi selama *operating time* (40

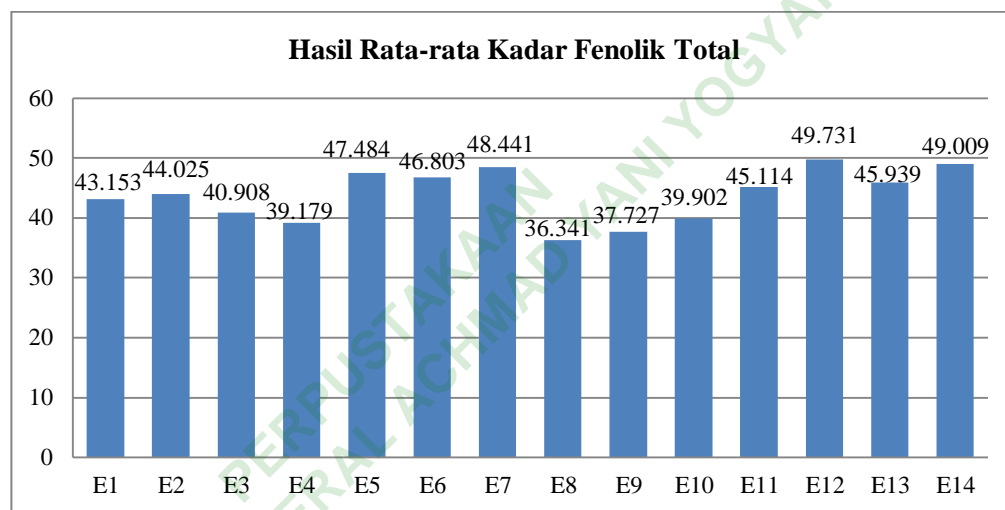
menit). Dalam suasana basa folin akan mengalami batokrom atau disebut juga dengan pergeseran ke panjang gelombang yang lebih maksimal (Sam *et al.*, 2016). Hasil absorbansi penentuan kadar fenolik total dengan dibaca pada panjang gelombang 725 nm dapat dilihat pada **Tabel 9**:

Tabel 9. Nilai Absorbansi Sampel

Sampel	Replikasi	Absorbansi	Sampel	Replikasi	Absorbansi
1	1	0,378	8	1	0,316
	2	0,380		2	0,305
	3	0,375		3	0,308
	4	0,372		4	0,312
2	1	0,383	9	1	0,325
	2	0,387		2	0,327
	3	0,381		3	0,322
	4	0,388		4	0,321
3	1	0,353	10	1	0,346
	2	0,357		2	0,348
	3	0,350		3	0,341
	4	0,358		4	0,344
4	1	0,342	11	1	0,397
	2	0,337		2	0,394
	3	0,334		3	0,392
	4	0,338		4	0,398
5	1	0,417	12	1	0,439
	2	0,423		2	0,441
	3	0,418		3	0,437
	4	0,415		4	0,443
6	1	0,412	13	1	0,397
	2	0,414		2	0,402
	3	0,416		3	0,408
	4	0,408		4	0,406
7	1	0,430	14	1	0,435
	2	0,428		2	0,438
	3	0,425		3	0,427
	4	0,427		4	0,432

Setelah didapatkan nilai absorbansi dari masing-masing ekstrak maka akan dilanjutkan dengan perhitungan kadar fenolik total. Untuk menghitung kadar fenolik total dari masing-masing ekstrak dengan cara, dimasukkan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan garis linier $y = 0,00969x - 0,0419$,

dengan koefisien korelasi (r) 0,998, kemudian dimasukkan kedalam rumus kadar terhitung (mg/mL) dikali dengan volume (mL) dibagi dengan berat sampel (gram). Setelah itu hasil dari kadar terhitung dimasukkan kedalam rumus TPC (*Total Phenolic Content*) (mg GAE/g) dikali dengan volume (mL) dikali dengan faktor pengenceran dan dibagi dengan berat sampel (gram). Sehingga diperoleh kadar fenolik total dari masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan sebagai berikut pada **Gambar 5**:



Gambar 5. Grafik Nilai Rata-rata Kadar Fenolik Total

Keterangan:

E1	= Ekstrak 1	E8	= Ekstrak 8
E2	= Ekstrak 2	E9	= Ekstrak 9
E3	= Ekstrak 3	E10	= Ekstrak 10
E4	= Ekstrak 4	E11	= Ekstrak 11
E5	= Ekstrak 5	E12	= Ekstrak 12
E6	= Ekstrak 6	E13	= Ekstrak 13
E7	= Ekstrak 7	E14	= Ekstrak 14

6. Penentuan kandungan flavonoid total

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang yang dihasilkan oleh suatu senyawa pada serapan maksimum. Penentuan panjang gelombang ini bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang saat mencapai serapan maksimal, dimana serapan yang dihasilkan sudah relatif stabil.

Penentuan panjang gelombang maksimum larutan baku kuersetin dilakukan dengan membaca larutan baku kuersetin pada rentang panjang gelombang 350 nm sampai 550 nm. Diperoleh hasil pengukuran panjang gelombang maksimum untuk larutan baku kuersetin yaitu pada panjang gelombang 440 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh (R, Rizki Yulianti *et al.*, 2014) dimana dalam penelitian tersebut juga hasil dari pengukuran panjang gelombang maksimum pada 440 nm.

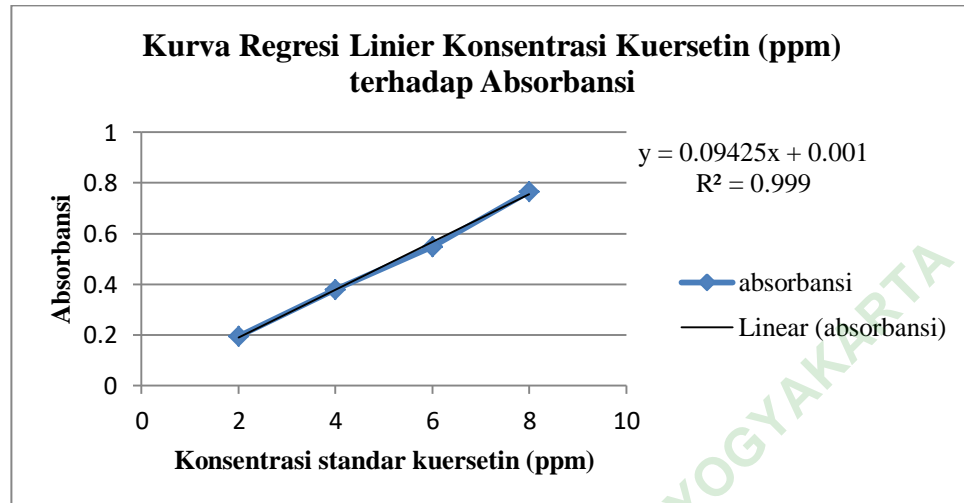
b. Penentuan kurva baku kuersetin

Penentuan kurva baku kuersetin pada penelitian ini menggunakan konsentrasi 2, 4, 6, dan 8 ppm. Penentuan seri konsentrasi didasarkan pada ketentuan hukum *Lambert-Beert*, dimana menyatakan bahwa syarat dari absorbansi yaitu pada rentang 0,2 – 0,8 dimana hal tersebut bertujuan untuk menghindari adanya kesalahan fotometrik sehingga kesalahan pada suatu analisis masih dapat diterima yaitu 0,5 – 1% (Asmorowati & Lindawati, 2019). Pengukuran absorbansi larutan baku kuersetin dilakukan pada panjang gelombang maksimum yaitu 440 nm, sedangkan untuk waktu inkubasi atau *operating time* selama 30 menit. Berikut hasil serapan larutan baku kuersetin setelah dibaca pada panjang gelombang 440 nm:

Tabel 10. Hasil Nilai Absorbansi Kurva Baku Kuersetin

Konsentrasi Stnadar Asam Galat	Rata-rata Nilai Absorbansi
2	0,194 ± 0,003
4	0,380 ± 0,010
6	0,549 ± 0,021
8	0,766 ± 0,019

Nilai absorbansi dari larutan baku kuersetin mempunyai hubungan yang linier dimana jika semakin tinggi konsentrasi maka akan semakin meningkat pula nilai absorbansi pada sampel larutanbaku. Data dari absorbansi didapatkan hubungan antara konsentrasi sengan absorbansi sampel larutan baku kuersetin.



Gambar 6. Kurva Baku Konsentrasi Kuersetin Terhadap Absorbansi

Berdasarkan **Gambar 6** pada penelitian ini didapatkan nilai r sebesar 0,009425, dimana dapat diartikan linier atau baik karena nilai r mendekati satu. Dari kurva regresi linier tersebut didapatkan persamaan regresi yaitu $y = 0,009425x + 0,001$. Dimana persamaan tersebut nantinya akan digunakan dalam perhitungan kadar flavonoid total dari masing-masing sampel uji.

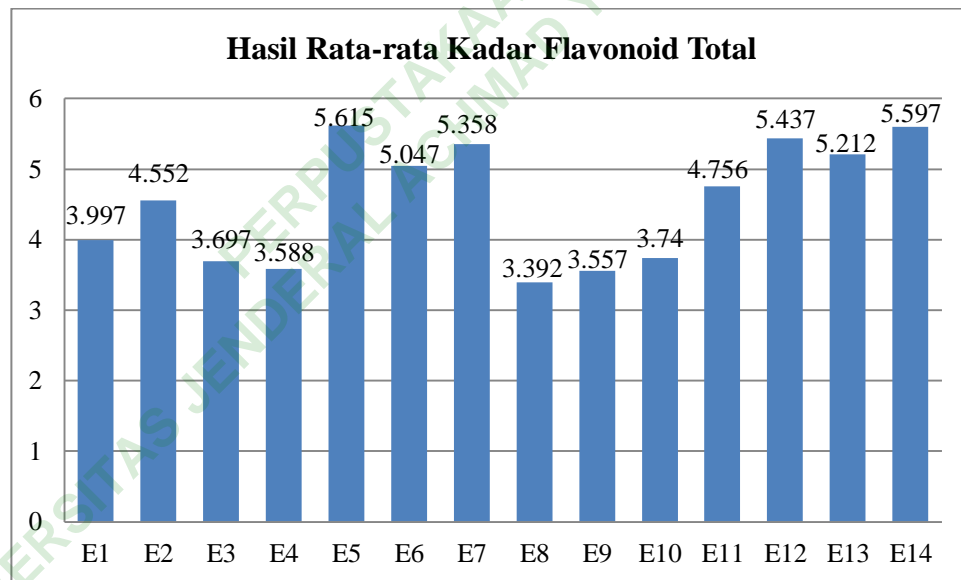
c. Penetapan kadar flavonoid total

Penetapan kadar flavonoid total dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Pada penetapan kadar flavonoid total masing-masing 0,5 mL dari ekstrak etanol 96% herba pegagan direaksikan dengan 1,5 mL etanol p.a, 0,1 mL $AlCl_3$, 0,1 mL natrium asetat 1M, dan 2,8 mL akuades. Kandungan flavonoid dapat ditentukan berdasarkan reaksi kolorimetri setelah larutan ditambahkan dengan larutan $AlCl_3$. Penambahan larutan $AlCl_3$ dalam sampel dapat membentuk kompleks antara aluminium klorida dengan kuersetin, sehingga akan terjadi pergeseran ke panjang gelombang ke arah visibel (tampak) dimana ditandai dengan larutan yang berubah warna menjadi warna yang lebih kuning (Asmorowati & Lindawati, 2019).

Tabel 11. Nilai Absorbansi Sampel

Sampel	Replikasi	Absorbansi	Sampel	Replikasi	Absorbansi
1	1	0,388	8	1	0,302
	2	0,373		2	0,315
	3	0,370		3	0,334
	4	0,380		4	0,332
2	1	0,416	9	1	0,331
	2	0,443		2	0,341
	3	0,435		3	0,334
	4	0,426		4	0,339
3	1	0,334	10	1	0,346
	2	0,343		2	0,358
	3	0,365		3	0,361
	4	0,356		4	0,349
4	1	0,345	11	1	0,438
	2	0,333		2	0,451
	3	0,351		3	0,456
	4	0,327		4	0,452
5	1	0,505	12	1	0,505
	2	0,556		2	0,532
	3	0,539		3	0,520
	4	0,521		4	0,497
6	1	0,465	13	1	0,476
	2	0,498		2	0,486
	3	0,436		3	0,498
	4	0,508		4	0,509
7	1	0,511	14	1	0,527
	2	0,483		2	0,540
	3	0,509		3	0,538
	4	0,521		4	0,509

Setelah didapatkan nilai absorbansi dari masing-masing ekstrak maka akan dilanjutkan dengan perhitungan kadar flavonoid total. Untuk menghitung kadar flavonoid total dari masing-masing ekstrak dengan cara, dimasukkan nilai absorbansi sampel kedalam persamaan garis linier $y = 0,009425x + 0,001$, dengan koefisien korelasi (r) 0,999, kemudian dimasukkan kedalam rumus kadar terhitung (mg/mL) dikali dengan volume (mL) dibagi dengan berat sampel (gram). Setelah itu hasil dari kadar terhitung dimasukkan kedalam rumus TFC (*Total Flavonoid Content*) (mg GAE/g) dikali dengan volume (mL) dikali dengan faktor pengenceran dan dibagi dengan berat sampel (gram). Sehingga diperoleh kadar flavonoid total dari masing-masing ekstrak etanol 96% herba pegagan sebagai berikut pada **Gambar 7**:



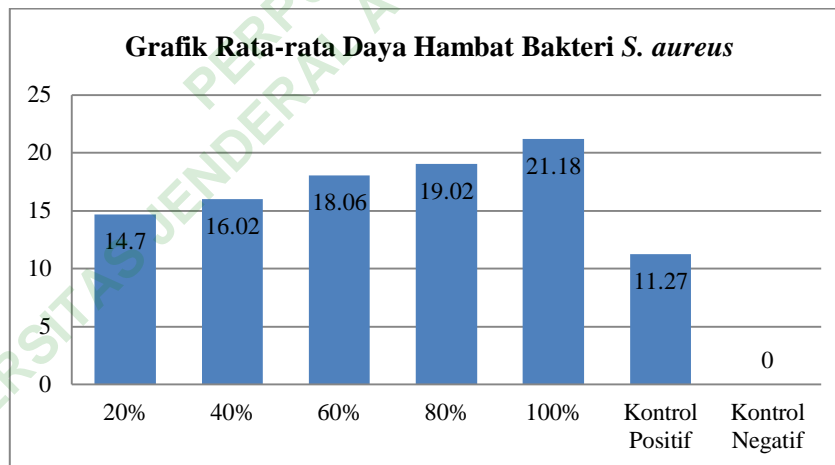
Gambar 7. Grafik Nilai Rata-rata Kadar Flavonoid Total

Keterangan:

E1	= Ekstrak 1	E8	= Ekstrak 8
E2	= Ekstrak 2	E9	= Ekstrak 9
E3	= Ekstrak 3	E10	= Ekstrak 10
E4	= Ekstrak 4	E11	= Ekstrak 11
E5	= Ekstrak 5	E12	= Ekstrak 12
E6	= Ekstrak 6	E13	= Ekstrak 13
E7	= Ekstrak 7	E14	= Ekstrak 14

7. Hasil uji daya hambat antibakteri

Ekstrak hasil proses validasi metode RSM dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri. Pada uji aktivitas antibakteri dilakukan perhitungan rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk pada sekitar cakram. Pada uji daya hambat antibakteri ekstrak etanol 96% herba pegagan menggunakan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%, dengan menggunakan kontrol negatif (akuades) dan kontrol positif (ampisilin 10 μg). Data hasil pengukuran rata-rata diameter zona hambat kemudian diklasifikasikan dengan respon hambatan pertumbuhan menurut Davis dan Stout dalam Pangouw *et al* (2020) yaitu jika zona hambat kurang dari 5 mm dikategorikan respon hambatan kurang, zona hambat 5 – 10 mm dikategorikan respon hambatan sedang, zona hambat 11 – 20 mm dikategorikan respon hambatan kuat, zona hambat lebih dari 20 mm dikategorikan respon hambatan sangat kuat. Berikut grafik rata-rata zona hambat bakteri dapat dilihat pada **Gambar 8**:



Gambar 8. Grafik hasil rata-rata uji daya hambat bakteri dari ekstrak etanol 96% herba pegagan, kontrol positif, dan kontrol negatif

Tabel 12. Hasil Uji Zona Hambat Ekstrak Etanol 96% Herba Pegagan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%

Konsentrasi	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
20%	14,7	Kuat
40%	16,02	Kuat
60%	18,06	Kuat
80%	19,02	Kuat
100%	21,18	Sangat kuat

Hasil klasifikasi zona hambat ekstrak etanol 96% herba pegagan dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dapat dilihat pada **Tabel 12**. Apabila dilihat dari kategori respon hambatan ekstrak etanol 96% herba pegagan terhadap bakteri *S. aureus* memiliki respon hambatan kuat dan sangat kuat. Hal ini dapat diartikan bahwa ekstrak etanol 96% herba pegagan mempunyai aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus*. Menurut data yang sudah didapatkan dan dikategorikan, semakin besar konsentrasi maka zona hambat yang dihasilkan akan semakin besar.

8. Analisis Data

a. Total Phenolic Content (TPC)

Hasil analisis data respon *Total Phenolic Content* (TPC) yang diperoleh dari hasil pengukuran fenolik total pada aplikasi *Minitab* 17 yaitu ditunjukkan pada **Gambar 9**:

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	207.823	34.637	5.66	0.019
Blocks	1	2.768	2.768	0.45	0.523
Linear	2	0.160	0.080	0.01	0.987
Suhu (*C)	1	0.151	0.151	0.02	0.880
Waktu (menit)	1	0.009	0.009	0.00	0.970
Square	2	203.197	101.598	16.60	0.002
Suhu (*C)*Suhu (*C)	1	178.943	178.943	29.24	0.001
Waktu (menit)*Waktu (menit)	1	35.275	35.275	5.76	0.047
2-Way Interaction	1	1.698	1.698	0.28	0.615
Suhu (*C)*Waktu (menit)	1	1.698	1.698	0.28	0.615
Error	7	42.842	6.120		
Lack-of-Fit	3	33.379	11.126	4.70	0.084
Pure Error	4	9.463	2.366		
Total	13	250.665			

Model Summary			
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
2.47392	82.91%	68.26%	0.00%

Gambar 9. Regresi Respon Surface antara TPC vs Suhu dan Waktu Ekstraksi

Berdasarkan **Gambar 9** telah dilakukan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dari kadar fenolik total vs suhu dan waktu ekstraksi dengan diperoleh hasil *p-value* pada model sebesar 0,019, nilai tersebut dapat diartikan bahwa model tersebut valid dan signifikan karena nilai *p-value* lebih kecil dari nilai signifikansi 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa hasil kadar fenolik total yang dihasilkan terdapat perbedaan. Dari tabel uji kesesuaian model didapat nilai R^2 (*R-squared*) yaitu sebesar 82,91%. Hasil tersebut menunjukkan keragaman kadar fenolik total ekstrak etanol 96% herba pegagan dipengaruhi oleh suhu dan lama waktu ekstraksi, untuk 17,09% lainnya dipengaruhi oleh faktor lain diluar dari perlakuan. Nilai R^2 *adjusted* menyatakan keeratan antara kedua faktor terhadap respon *Total Phenolic Content* (TPC), dimana nilai R^2 *adjusted* sebesar 68,26%. *Lack of fit* merupakan penyimpangan atau ketidaktepatan terhadap model, model akan dianggap tepat apabila nilai hasil uji simpangan dari model bersifat tidak nyata atau tidak signifikan. Nilai *Lack of fit* dari data respon *Total Phenolic Content* (TPC) memiliki hasil *p-value* sebesar 0,084 dimana dapat diartikan bahwa nilai tersebut tidak signifikan karena lebih besar dari nilai signifikansi 0,05. Sehingga model tersebut dapat dinyatakan tepat karena hasilnya tidak signifikan. Dari program tersebut diperoleh persamaan regresi sebagai berikut:

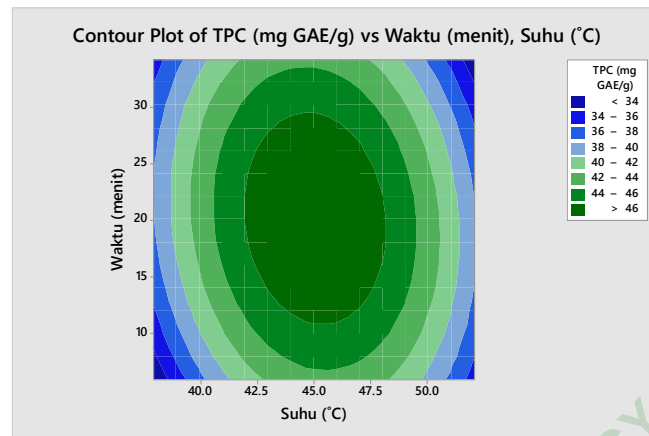
$$Y = -372.6 + 18.01 X_1 + 1.46 X_2 - 0.1969 X_1^2 - 0.02186 X_2^2 - 0.0130 X_1 X_2$$

Keterangan:

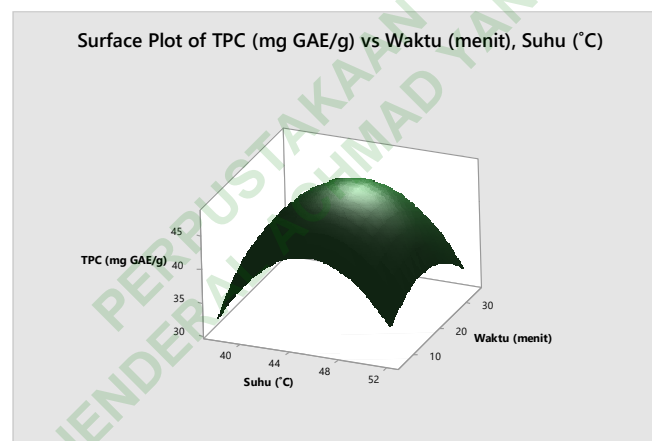
Y = kadar fenolik total ekstrak etanol 96% herba pegagan yang dihasilkan

X_1 = suhu ($^{\circ}\text{C}$)

X_2 = waktu (menit)



Gambar 10. Countour Plot 2D Respon TPC terhadap Suhu dan Waktu Ekstraksi



Gambar 11. Surface Plot Respon TPC terhadap Suhu dan Waktu Ekstraksi

Gambar 10 merupakan *countour plot* dimana menunjukkan pengaruh dari faktor suhu dan lama waktu ekstraksi herba pegagan terhadap respon *Total Phenolic Content* (TPC). Gambar tersebut memiliki warna yang berbeda-beda, hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan nilai respon TPC. Dimana warna biru menunjukkan nilai TPC rendah dan warna hijau menunjukkan nilai TPC yang tinggi. **Gambar 11** merupakan gambar *surface plot* dimana pada gambar tersebut menyerupai bentuk parabola terbuka kebawah. Perbedaan dari ketinggian permukaan disebabkan oleh nilai yang berbeda dari tiap kombinasi faktor yang telah dilakukan. Bentuk dari

permukaan yang tinggi menunjukkan jika nilai TPC yang diperoleh tinggi dan jika daerah permukaan *surface plot* rendah menunjukkan bahwa nilai TPC yang diperoleh juga rendah. Dari gambar tersebut menunjukkan bahwa nilai TPC tertinggi dihasilkan dari suhu dan waktu ekstraksi yang berkisar pada titik optimal.

b. Total Flavonoid Content (TFC)

Hasil analisis data respon *Total Flavonoid Content* (TFC) yang diperoleh dari hasil pengukuran flavonoid total pada aplikasi *Minitab 17* yaitu ditunjukkan pada gambar berikut:

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	8.15840	1.35973	8.07	0.007
Blocks	1	0.00190	0.00190	0.01	0.918
Linear	2	0.06142	0.03071	0.18	0.837
Suhu (°C)	1	0.05769	0.05769	0.34	0.577
Waktu (menit)	1	0.00373	0.00373	0.02	0.886
Square	2	7.98486	3.99243	23.69	0.001
Suhu (°C)*Suhu (°C)	1	6.34952	6.34952	37.68	0.000
Waktu (menit)*Waktu (menit)	1	2.15751	2.15751	12.80	0.009
2-Way Interaction	1	0.11022	0.11022	0.65	0.445
Suhu (°C)*Waktu (menit)	1	0.11022	0.11022	0.65	0.445
Error	7	1.17962	0.16852		
Lack-of-Fit	3	0.94300	0.31433	5.31	0.070
Pure Error	4	0.23661	0.05915		
Total	13	9.33802			

Model Summary				
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)	
0.410508	87.37%	76.54%	0.00%	

Gambar 12. Regresi Respon *Surface* antara TFC vs Suhu dan Waktu Ekstraksi

Berdasarkan **Gambar 12** telah dilakukan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dari kadar flavonoid total vs suhu dan waktu ekstraksi dengan diperoleh hasil *p-value* pada model sebesar 0,007, nilai tersebut dapat diartikan bahwa model tersebut valid dan signifikan karena nilai *p-value* lebih kecil dari nilai signifikansi 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa hasil kadar flavonoid total yang dihasilkan terdapat perbedaan. Dari tabel uji kesesuaian model didapat nilai R^2 (*R-squared*) yaitu sebesar 87,37% . Hasil tersebut menunjukkan keragaman kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% herba pegagan dipengaruhi oleh suhu dan lama waktu ekstraksi, untuk 12,63%

lainnya dipengaruhi oleh faktor lain diluar dari perlakuan. Nilai R^2 *adjusted* menyatakan keeratan antara kedua faktor terhadap respon *Total Flavonoid Content* (TFC), dimana nilai R^2 *adjusted* sebesar 76,54%. *Lack of fit* merupakan penyimpangan atau ketidaktepatan terhadap model, model akan dianggap tepat apabila nilai hasil uji simpangan dari model bersifat tidak nyata atau tidak signifikan. Nilai *Lack of fit* dari data respon *Total Flavonoid Content* (TFC) memiliki hasil *p-value* sebesar 0,070 dimana dapat diartikan bahwa nilai tersebut tidak signifikan karena lebih besar dari nilai signifikansi 0,05. Sehingga model tersebut dapat dinyatakan tepat karena hasilnya tidak signifikan. Dari program tersebut diperoleh persamaan regresi sebagai berikut:

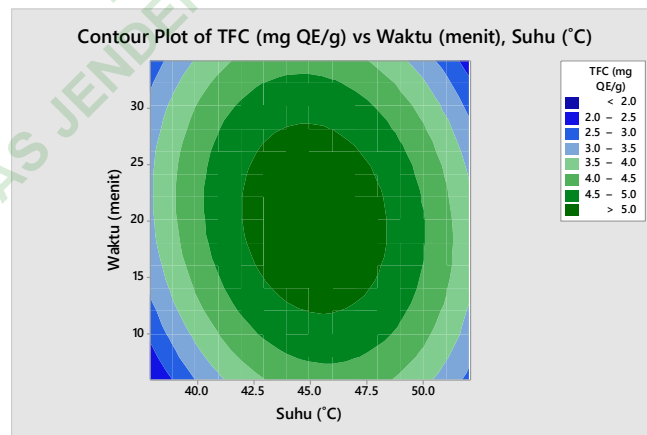
$$Y = -75.7 + 3.422 X_1 + 0.368 X_2 - 0.03709 X_1^2 - 0.00541 X_2^2 - 0.00332 X_1 X_2$$

Keterangan:

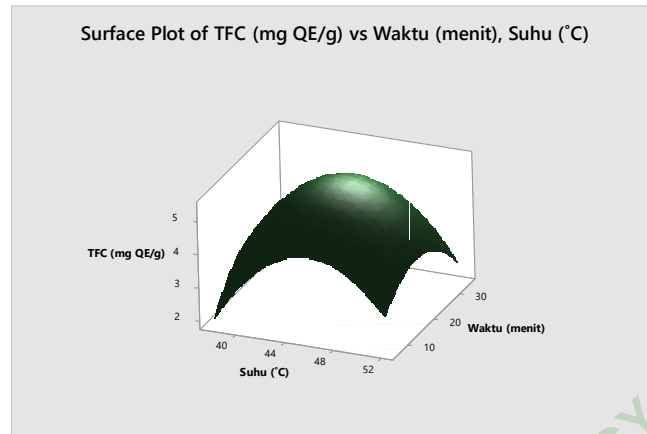
Y = kadar flavonoid total ekstrak etanol 96% herba pegagan yang dihasilkan

X_1 = suhu ($^{\circ}\text{C}$)

X_2 = waktu (menit)



Gambar 13. *Countour Plot* 2D TFC terhadap Suhu dan Waktu Ekstraksi



Gambar 14. *Surface Plot* Respon TFC terhadap Suhu dan Waktu Ekstraksi

Gambar 13 merupakan *countour plot* dimana menunjukkan pengaruh dari faktor suhu dan lama waktu ekstraksi herba pegagan terhadap respon *Total Flavonoid Content* (TFC). Gambar tersebut memiliki warna yang berbeda-beda, hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan nilai respon TFC. Dimana warna biru menunjukkan nilai TFC rendah dan warna hijau menunjukkan nilai TFC yang tinggi. **Gambar 14** merupakan gambar *surface plot* dimana pada gambar tersebut menyerupai bentuk parabola terbuka kebawah. Perbedaan dari ketinggian permukaan disebabkan oleh nilai yang berbeda dari tiap kombinasi faktor yang telah dilakukan. Bentuk dari permukaan yang tinggi menunjukkan jika nilai TFC yang diperoleh tinggi dan jika daerah permukaan *surface plot* rendah menunjukkan bahwa nilai TFC yang diperoleh juga rendah. Dari gambar tersebut menunjukkan bahwa nilai TFC tertinggi dihasilkan dari suhu dan waktu ekstraksi yang berkisar pada titik optimal.

c. Rendemen

Hasil analisis data respon rendemen yang diperoleh dari hasil pengukuran rendemen pada aplikasi *Minitab* 17 yaitu ditunjukkan pada gambar berikut:

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	6	6.1583	1.02639	1.16	0.418
Blocks	1	2.6101	2.61014	2.96	0.129
Linear	2	0.4871	0.24354	0.28	0.767
Suhu (°C)	1	0.2978	0.29784	0.34	0.579
Waktu (menit)	1	0.1892	0.18925	0.21	0.657
Square	2	2.9855	1.49273	1.69	0.251
Suhu (°C)*Suhu (°C)	1	0.8162	0.81621	0.93	0.368
Waktu (menit)*Waktu (menit)	1	2.3654	2.36536	2.68	0.145
2-Way Interaction	1	0.0756	0.07563	0.09	0.778
Suhu (°C)*Waktu (menit)	1	0.0756	0.07563	0.09	0.778
Error	7	6.1730	0.88186		
Lack-of-Fit	3	3.9254	1.30846	2.33	0.216
Pure Error	4	2.2476	0.56190		
Total	13	12.3313			

Model Summary			
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.939072	49.94%	7.03%	0.00%

Gambar 15. Regresi Respon *Surface* antara Rendemen vs Suhu dan Waktu Ekstraksi

Berdasarkan **Gambar 15** telah dilakukan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) dari rendemen vs suhu dan waktu ekstraksi dengan diperoleh hasil *p-value* pada model sebesar 0,415, nilai tersebut dapat diartikan bahwa model tersebut tidak signifikan karena nilai *p-value* lebih besar dari nilai signifikansi 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa rendemen yang dihasilkan tidak terdapat perbedaan. Dari tabel uji kesesuaian model didapat nilai R^2 (*R-squared*) yaitu sebesar 49,94% . Hasil tersebut menunjukkan keragaman rendemen ekstrak etanol 96% herba pegagan dipengaruhi oleh suhu dan lama waktu ekstraksi, untuk 50,05% lainnya dipengaruhi oleh faktor lain diluar dari perlakuan. Nilai R^2 *adjusted* menyatakan keeratan antara kedua faktor terhadap respon rendemen, dimana nilai R^2 *adjusted* sebesar 7,03%. *Lack of fit* merupakan penyimpangan atau ketidaktepatan terhadap model, model akan dianggap

tepat apabila nilai hasil uji simpangan dari model bersifat tidak nyata atau tidak signifikan. Nilai *Lack of fit* dari data respon rendemen memiliki hasil *p-value* sebesar 0,216 dimana dapat diartikan bahwa nilai tersebut tidak signifikan karena lebih besar dari nilai signifikansi 0,05. Sehingga model tersebut dapat dinyatakan tepat karena hasilnya tidak signifikan. Dari program tersebut diperoleh persamaan regresi sebagai berikut:

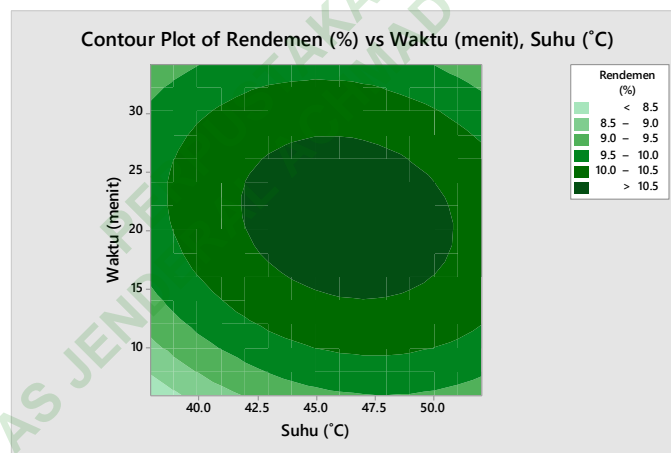
$$Y = -23.0 + 1.29 X_1 + 0.366 X_2 - 0.0133 X_1^2 - 0.00566 X_2^2 - 0.00275 X_1 X_2$$

Keterangan:

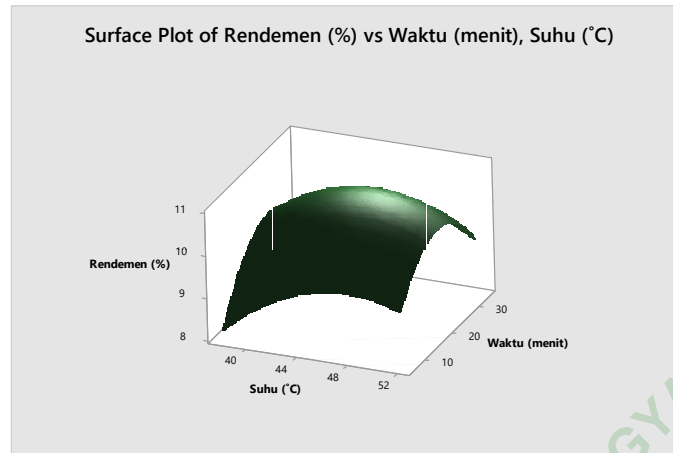
Y = rendemen ekstrak etanol 96% herba pegagan yang dihasilkan

X_1 = suhu ($^{\circ}\text{C}$)

X_2 = waktu (menit)



Gambar 16. *Countour Plot* 2D Respon Rendemen terhadap Suhu dan Waktu Ekstraksi



Gambar 17. *Surface Plot* Respon Rendemen terhadap Suhu dan Waktu Ekstraksi

Gambar 16 merupakan *countour plot* dimana menunjukkan pengaruh dari faktor suhu dan lama waktu ekstraksi herba pegagan terhadap respon rendemen. Gambar tersebut memiliki warna yang berbeda-beda, hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan nilai respon rendemen. Dimana semakin gelap warna menunjukkan nilai rendemen yang semakin tinggi. **Gambar 17** merupakan gambar *surface plot* dimana pada gambar tersebut menyerupai bentuk parabola terbuka kebawah. Perbedaan dari ketinggian permukaan disebabkan oleh nilai yang berbeda dari tiap kombinasi faktor yang telah dilakukan. Bentuk dari permukaan yang tinggi menunjukkan jika nilai rendemen yang diperoleh tinggi dan jika daerah permukaan *surface plot* rendah menunjukkan bahwa nilai rendemen yang diperoleh juga rendah. Dari gambar tersebut menunjukkan bahwa nilai rendemen tertinggi dihasilkan dari suhu dan waktu ekstraksi yang berkisar pada titik optimal.

d. Optimasi desain RSM

Data hasil penelitian yang telah diperoleh kemudian dianalisis menggunakan aplikasi *Minitab* 17 dimana akan diperoleh hasil optimasi *Response Surface Methodology* (RSM) seperti pada **Tabel 13**:

Tabel 13. Optimasi *Response Surface Methodology* (RSM) Ekstraksi Herba Pegagan menggunakan MINITAB

<i>Solution</i>						
<i>Solution</i>	Suhu	Waktu	TPC	TFC	Rendemen	<i>Composite Desirability</i>
1	45,3571	20,4285	47,8813	5,37843	10,7494	0,802623

Berdasarkan **Tabel 13** didapat hasil nilai optimal dari setiap respon hasil ekstraksi herba pegagan yaitu TPC 47,8813 mg GAE/g, TFC 5,37843 mg QE/g, dan rendemen 10,7494%. Dimana hasil tersebut dapat diperoleh dari suhu 45,3571°C, waktu 20,4285 menit dan nilai *Composite Desirability* yaitu 0,802623 atau tingkat ketepatan 80%. Nilai *desirability* dikatakan mendekati sempurna yaitu apabila semakin mendekati 1. *Composite Desirability* merupakan nilai fungsi dari tujuan optimasi yang menunjukkan kemampuan program untuk memenuhi keinginan berdasarkan kriteria yang telah ditetapkan pada produk akhir (Shofa, 2019).

e. Validasi Model RSM

Setelah didapatkan perkiraan suhu dan waktu yang optimal maka dilakukan validasi dengan cara ekstraksi ulang, dimana hasilnya dapat dilihat pada **Tabel 14**:

Tabel 14. Hasil Ekstraksi Herba Pegagan untuk Validasi Metode RSM

Optimal					
Suhu	Waktu	TPC	TFC	Rendemen	Uji T
45,3571	20,4285	49,035	5,607	10,951	0,979

Berdasarkan **Tabel 14** didapatkan hasil ekstraksi dari setiap respon yaitu TPC 49,035 mg GAE/g, TFC 5,607 mg QE/g, dan rendemen 10,951%. Dimana hasil tersebut tidak jauh berbeda dari hasil prediksi RSM. Hal tersebut juga dibuktikan dengan hasil dari uji statistika (*Two Sample T-test*) dengan hasil *p-value* 0,979. Dimana hasil *p-value* tersebut lebih besar dari nilai signifikansi 0,05 yang mana dapat diartikan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara hasil prediksi dan validasi.

B. Pembahasan

Pada penelitian ini didapatkan hasil penetapan kadar fenolik total seperti yang tertera pada **Gambar 5** dimana dari setiap perlakuan dengan adanya variasi suhu dan waktu sesuai dengan rancangan optimasi mendapatkan hasil kadar fenolik yang berbeda-beda. Berdasarkan hasil yang diperoleh ekstrak yang memiliki kandungan fenolik total paling tinggi diperoleh dari ekstrak dengan suhu 45°C dan waktu 20 menit yaitu sebesar 49,731 mg GAE/g, dan ekstrak dengan kandungan fenolik total terendah diperoleh dari ekstrak dengan suhu 52,0711°C dan waktu 20 menit yaitu sebesar 37,727 mg GAE/g. Hal tersebut dapat diartikan bahwa kadar fenolik total tertinggi diperoleh berkisar pada titik optimal yang telah ditentukan. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa adanya perbedaan suhu dan waktu ekstraksi dapat berpengaruh pada hasil kadar senyawa yang diperoleh. Dimana semakin tinggi suhu dan lama waktu ekstraksi yang digunakan maka akan semakin tinggi juga kadar fenol total. Akan tetapi, aktivitas fenolik akan berada pada kondisi yang optimal ketika mencapai titik tertentu, sehingga akan menyebabkan terjadinya penurunan kadar fenolik pada sampel. Hal tersebut dikarenakan bahwa senyawa fenol akan mengalami kerusakan seiring dengan meningkatnya suhu dan waktu ekstraksi. Dengan adanya penambahan suhu dan waktu ekstraksi akan menyebabkan senyawa fenol lebih lama terpapar oleh panas, sehingga senyawa fenolik akan mengalami kerusakan (Grafianita, 2011).

Hal ini sesuai dengan hasil pada penelitian Sekarsari *et al.*, (2019). Dimana semakin meningkatnya suhu 45°C dan semakin lama waktu 20 menit akan menimbulkan pelarut semakin mudah untuk menarik senyawa-senyawa pada sampel sehingga akan menimbulkan terjadinya peningkatan kadar fenol total. Namun, jika suhu dan waktu yang digunakan dalam ekstraksi melebihi dari suhu optimum (suhu 45°C dan waktu 20 menit) akan menimbulkan menurunnya kadar fenol total. Hal tersebut terjadi karena pada proses ekstraksi sudah mencapai titik keseimbangan, sehingga senyawa fenolik yang terdapat dalam sampel sudah tidak dapat diekstrak lagi. Menurut Ibrahim *et al.*, (2015) bahwa suhu ekstraksi yang terlalu tinggi dan

lama waktu ekstraksi terlalu lama hingga melebihi titik optimal akan menyebabkan hilangnya senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak karena mengapami penguapan.

Hasil pada penetapan kadar flavonoid dapat dilihat pada **Gambar 7** dimana dari setiap perlakuan dengan adanya variasi suhu dan waktu sesuai dengan rancangan optimasi mendapatkan hasil kadar flavonoid total yang berbeda-beda. Berdasarkan hasil yang diperoleh ekstrak yang memiliki kandungan flavonoid total paling tinggi diperoleh dari ekstrak dengan suhu 45°C dan waktu 20 menit yaitu sebesar 5,615 mg QE/g, dan ekstrak yang memiliki kandungan flavonoid total paling rendah diperoleh pada ekstrak dengan suhu $37,9289^{\circ}\text{C}$ dan waktu 20 menit yaitu sebesar 3,392 mg QE/g. Hal tersebut dapat diartikan bahwa kadar flavonoid total tertinggi diperoleh berkisar pada titik optimal yang telah ditentukan. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa adanya perbedaan suhu dan waktu ekstraksi dapat berpengaruh pada hasil kadar senyawa yang diperoleh. Peningkatan suhu dan waktu saat proses ekstraksi perlu diperhatikan, apabila suhu ekstraksi yang digunakan terlalu tinggi dan lama waktu ekstraksi yang digunakan semakin lama atau hingga melebihi titik optimal dapat mengakibatkan berkurangnya senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Namun, apabila suhu terlalu rendah akan mengakibatkan senyawa aktif dalam ekstrak tidak dapat ditarik secara keseluruhan (Yuliantari *et al.*, 2017). Hal ini sesuai dengan hasil dari penelitian ini dimana pada suhu yang paling rendah didapatkan hasil kadar flavonoid total terendah.

Menurut Sekarsari *et.al.*, (2019) hasil penetapan kadar flavonoid daun jambu biji tertinggi diperoleh pada suhu 45°C dan waktu 20 menit. Dimana semakin tinggi suhu saat proses ekstraksi hingga suhu 45°C dan semakin lama waktu ekstraksi hingga 20 menit akan didapatkan kadar flavonoid total yang tinggi. Apabila suhu dan waktu saat proses ekstraksi melebihi dari titik optimal maka akan mengakibatkan kadar flavonoid total menurun, hal tersebut disebabkan oleh adanya proses oksidasi terhadap senyawa flavonoid. Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang

dilakukan, dimana kadar flavonoid total tertinggi diperoleh pada suhu ekstraksi 45°C dan waktu ekstraksi 20 menit.

Hasil penentuan nilai rendemen dapat dilihat pada **Tabel 6** dimana dari setiap perlakuan dengan adanya variasi suhu dan waktu sesuai dengan rancangan optimasi mendapatkan hasil nilai rendemen yang berbeda-beda. Berdasarkan hasil yang diperoleh ekstrak yang memiliki rendemen paling tinggi diperoleh dari ekstrak dengan suhu 52,0711°C dan waktu 20 menit yaitu sebesar 11,707% dan ekstrak yang memiliki rendemen paling rendah diperoleh dari ekstrak dengan suhu 50°C dan waktu 30 menit yaitu sebesar 8,793%. Hal tersebut dapat diartikan bahwa nilai rendemen tertinggi melebihi suhu perkiraan yang optimum (45°C) tetapi masih pada waktu optimum yaitu 20 menit. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa adanya perbedaan suhu dan waktu ekstraksi dapat berpengaruh pada hasil rendemen yang diperoleh. Menurut Sekarsari *et al.*, (2019) rendemen ekstrak yang diperoleh dapat dipengaruhi oleh suhu dan waktu yang digunakan selama proses ekstraksi. Suhu dan waktu proses ekstraksi yang tepat dapat menghasilkan rendemen yang tinggi pada ekstrak. Apabila suhu dan waktu yang digunakan selama proses ekstraksi terlalu tinggi dan lama maka akan menyebabkan rendemen pada ekstrak menurun. Waktu ekstraksi yang digunakan terlalu lama dan melebihi batas optimum akan menyebabkan berkurangnya senyawa yang tidak tahan oleh pemanasan karena terjadinya proses oksidasi (Ibrahim *et al.*, 2015).

Dimana jika pada ekstraksi yang menggunakan suhu terlalu rendah dan waktu terlalu cepat akan menyebabkan komponen senyawa bioaktif yang terkandung dalam sampel tidak dapat terekstrak dengan maksimal dikarenakan proses difusi larutan tidak berlangsung dengan optimal sehingga menyebabkan senyawa bioaktif yang terkandung dalam sampel masih banyak tertinggal (Sekarsari *et al.*, 2019). Hal tersebut juga dibuktikan dengan penelitian oleh Yuliantari *et al.*, (2017) dimana hasil penelitian rendemen ekstrak pada daun sirsak semakin meningkat diikuti oleh meningkatnya suhu dan waktu ekstraksi. Hal tersebut juga sesuai dengan hasil pada penelitian ini bahwa dengan waktu ekstraksi yang terlalu singkat yaitu 10 menit

mendapatkan hasil rendemen ekstrak yang tergolong rendah. Hasil rendemen terendah diperoleh pada ekstraksi dengan waktu yang melebihi dari batas optimal yaitu pada waktu 30 menit.

Setelah dilakukan perhitungan kadar fenolik total, flavonoid total dan rendemen kemudian data tersebut dianalisis menggunakan aplikasi *Minitab* 17. Dimana hasil optimasi dapat dilihat pada **Tabel 13**. Hasil optimasi didapatkan bahwa suhu ekstraksi yang optimal pada $45,3571^{\circ}\text{C}$ dan waktu 20,4285 menit, dengan kadar TPC 47,8813 mg GAE/g, TFC 5,37843 mg QE/g, dan rendemen 10,7494%. Hasil optimasi yang didapatkan yaitu suhu dan waktu yang didapatkan tidak jauh berbeda dengan suhu dan waktu perkiraan awal (45°C dan waktu 20 menit). Kemudian dilakukan validasi dari titik optimal dengan melakukan ekstraksi ulang dan ditetapkan kembali kadar fenolik total, flavonoid total, dan rendemen. Tujuan dari validasi titik optimal yaitu untuk membuktikan terhadap nilai prediksi dengan nilai respon solusi kondisi optimal yang telah disarankan oleh aplikasi *Minitab* 17 desain *Response Surface Methodology* (RSM). Dimana dari hasil validasi didapatkan hasil dari setiap respon yaitu TPC 49,035 mg GAE/g, TFC 5,607 mg QE/g, dan rendemen 10,951%, hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan nilai prediksi. Dapat dilihat pada **Tabel 14**. Untuk mendukung data tersebut juga dilakukan uji statistika (*Two Sample T-test*) dan diperoleh hasil *p-value* 0,979. Hasil *p-value* dari uji *Two Sample T-test* lebih besar dari nilai signifikansi 0,05 dimana dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna dari hasil prediksi dan validasi.

Selanjutnya ekstrak yang didapatkan dari hasil validasi dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S.aureus*. Tujuan dilakukannya uji aktivitas antibakteri yaitu untuk mengetahui apakah ekstrak etanol 96% herba pegagan memiliki aktivitas antibakteri atau tidak. Pada uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi cakram (*Kirby Bauer Test*) dengan teknik penanaman *spread plate*. Metode difusi cakram ini dilakukan dengan cara merendam kertas cakram kosong pada sampel uji dan ditunggu hingga sampel uji berdifusi pada cakram

kemudian cakram tersebut ditempelkan pada media agar yang telah diinokulasikan bakteri uji, lalu dilakukan inkubasi menggunakan inkubator pada suhu 37°C dalam waktu 24 jam. Pada saat proses inkubasi peletakan cawan petri dalam posisi terbalik, tujuannya untuk menghindari adanya kontaminasi dari uap air yang dihasilkan selama proses inkubasi. Kontrol positif yang digunakan yaitu antibiotik ampisilin 10 µg dalam bentuk cakram, dan kontrol negatif yaitu akuades. Digunakan antibiotik ampisilin sebagai kontrol positif karena ampisilin merupakan golongan antibiotik penisilin I yang dapat digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri gram positif dan gram negatif (Akbar *et al.*, 2016). Seri konsentrasi dari sampel uji yaitu 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%

Hasil daya hambat bakteri ditandai dengan terbentuknya daerah bening pada sekitar cakram. Zona bening tersebut menandakan adanya aktivitas penghambatan dari sampel terhadap bakteri uji. Zona hambat yang terbentuk pada sekitar cakram diukur menggunakan jangka sorong (skala mm) dengan 3 arah pengukuran (vertikal, horizontal, dan diagonal). Diukur dengan 3 arah dikarenakan zona hambat yang terbentuk pada sekitar cakram tidak berbentuk lingkaran sempurna. Hasil rata-rata zona hambat yang terbentuk dari uji aktivitas antibakteri dapat dilihat pada **Gambar 8** dan **Tabel 12**. Berdasarkan **Tabel 12** hasil respon hambatan pertumbuhan, untuk konsentrasi 20% memiliki zona hambat 14,7 mm dengan respon hambatan kuat, konsentrasi 40% memiliki zona hambat 16,02 mm dengan respon hambatan kuat, konsentrasi 60% memiliki zona hambat 18,06 mm dengan respon hambatan kuat, konsentrasi 80% memiliki zona hambat 19,02 mm dengan respon hambatan kuat, dan konsentrasi 100% memiliki zona hambat 21,18 mm dengan respon hambatan sangat kuat. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96% herba pegagan dengan teknik ekstraksi ultrasonik memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Kontrol negatif (akuades) tidak memiliki respon hambatan terhadap bakteri, sedangkan kontrol positif (ampisilin 10 µg) memiliki zona hambat 11,27 mm dengan respon hambatan kuat. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Akbar *et*

al., (2016) bahwa zona hambat yang diperoleh dari ampisilin sebesar 11 mm dimana hal tersebut menunjukkan bahwa antibiotik ampisilin resisten berdasarkan standart CLSI 2013 (*Clinical Laboratorium Standart Internasional*).

Senyawa aktif alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, steroid, dan tanin yang terkandung dalam ekstrak etanol 96% herba pegagan mempunyai fungsi sebagai antibakteri dengan mekanisme kerja yang berbeda-beda. Saponin bekerja dengan cara mengganggu stabilitas membrane sel pada bakteri sehingga dapat menyebabkan sel bakteri lisis. Mekanisme kerja dari senyawa fenolik yaitu dengan cara mengganggu dinding sel bakteri dan mempresipitasi protein dalam sel bakteri. Mekanisme kerja dari senyawa flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan cara menghambat sintesis protein bakteri. Mekanisme dari senyawa tanin sebagai antibakteri yaitu melalui reaksi dengan membrane sel, aktivitas enzim, dan inaktivasi fungsi materi genetik, dengan cara menghambat enzim *reverse transcriptase* dan DNA *topoisomerase* hingga akan menyebabkan tidak terbentuknya sel bakteri (Adiningsih *et al.*, 2021). Mekanisme kerja dari senyawa alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga akan menyebabkan terbentuknya sel bakteri tidak utuh serta menyebabkan kematian sel tersebut. Mekanisme kerja steroid sebagai antibakteri yaitu dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri yang berhubungan dengan membrane lipid dan sensitivitas terhadap steroid yang dapat menyebabkan kebocoran pada liposom (Anggraini *et al.*, 2019). Mekanisme kerja ampisilin sebagai antibakteri yaitu dengan cara menghambat sintesis dinding sel bakteri dan menghambat enzim *transpeptidase* dan menyebabkan tidak terjadinya biosintesis sel (Akbar *et al.*, 2016). Adanya perbedaan cara kerja dari ampisilin dengan senyawa-senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol 96% herba pegagan menyebabkan ekstrak etanol 96% herba pegagan memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dari pada ampisilin.