

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Metode penyesuaian dengan Pendekatan Literature Review**

##### **1. Deskripsi Metode Pendekatan Literature Review**

Literature review adalah uraian tentang teori, temuan, dan bahan penelitian lainnya yang diperoleh dari bahan acuan yang bersumber dari artikel dan dijadikan landasan kegiatan penelitian untuk menyusun kerangka pemikiran yang jelas dari perumusan masalah yang ingin diteliti. Peneliti mencari jurnal melalui *Google Scholar* dan *Science Direct* menggunakan kata kunci “Radikal bebas, Antioksidan, Metode DPPH dan Daun Pegagan”. Untuk identifikasi status artikel dapat menggunakan *scimago* untuk jurnal internasional dan *sinta ristekditi* untuk jurnal nasional, serta dilakukan status jurnal termasuk kedalam jurnal *predatory* atau tidak dengan menggunakan laman *Beall's list*.

Review artikel yang digunakan berupa desain deskriptif dimana mengambil dari 5 jurnal yang akan dijabarkan secara detail di bab ini, selanjutnya dihubungkan antara metode yang digunakan setiap jurnal.

Metode penelitian artikel yang diambil merupakan penelitian eksperimental. Penelitian berupa aktivitas antioksidan *Centella asiatica* (L.) metode DPPH dari ekstrak *Centella asiatica* (L.) dengan pelarut yang berbeda-beda dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Selanjutnya diringkas dan dilakukan perbandingan antar artikel seperti mencari persamaan

dan perbedaannya. Hasil yang didapat digabungkan untuk ditarik kesimpulan potensi aktivitas antioksidannya

## 2. Informasi Jumlah dan Jenis Artikel

Pada review artikel ini, Jenis artikel yang diambil yaitu *original research* dari jurnal internasional dan nasional. Artikel yang digunakan berupa 2 artikel internasional yang terindeks *scopus* dan 3 artikel nasional yang sudah terakreditasi Sinta. Status artikel yang dijadikan jurnal penelitian dapat dilihat pada tabel 3.1.

<b>Tabel 3. 1 Informasi dan Status Artikel</b>	
<b>Biomedicine &amp; Pharmacotherapy (Jurnal International)</b>	
Judul	Comparison of Three Different Extracts of <i>Centella asiatica</i> for Anti-amnesic, Antioxidant and Anticholinergic Activities: Invitro and Invivo Study
Tahun	2018
H-Index	92
<i>Impact Factor</i>	3.147
Quartil	Q1
SJR	2020 1.32
ISSN	07533322
DOI	<a href="https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.156">https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.156</a>
Keterangan	Bukan Jurnal predator (berdasarkan <i>beall's list</i> )
<b>Oriental Journal of Chemistry (Jurnal Internasional)</b>	
Judul	The Development of <i>Centella asiatica</i> Extract-Loaded BSA Nanoparticles Production to Improve Bioavailability
Tahun	2016

H-Index	20
<i>Impact Factor</i>	3.221
Quartil	-
SJR	-
ISSN	0970-020 X
DOI	<a href="http://dx.doi.org/10.13005/ojc/320513">http://dx.doi.org/10.13005/ojc/320513</a>
Keterangan	Bukan Jurnal predator (berdasarkan <i>beall's list</i> )
<b>Indonesian Journal of Halal research (IJHAR) (Jurnal Nasional)</b>	
Judul	Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Herba Pegagan ( <i>centella asiatica</i> (L) urban) Dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)
Tahun	2020
H-Index	5
<i>Impact Factor</i>	3.127
Sinta	S2
ISSN	2654-9409
Keterangan	Bukan Jurnal predator (berdasarkan <i>beall's list</i> )
<b>Jurnal Fitofarmaka Indonesia (Jurnal Nasional)</b>	
Judul	Aktivitas Antioksidan Fraksi Metanol Daun Pegagan ( <i>centella asiatica</i> (L) urban)
Tahun	2020
H-Index	11
<i>Impact Factor</i>	3.241
Sinta	S3
ISSN	2087-9164
Keterangan	Bukan jurnal predator (berdasarkan <i>beall's list</i> )
<b>Jurnal Pijar Mipa (Jurnal Nasional)</b>	

Judul	Efek Penghambatan Radikal Bebas Infusa dan Ekstrak Etanol Herba Pegagan ( <i>centella asiatica</i> (L.) urb) dengan Metode DPPH
Tahun	2019
H-Index	14
<i>Impact Factor</i>	3,126
Sinta	S4
ISSN	1907-1744/ 2460-1500
Keterangan	Bukan Jurnal predator (berdasarkan <i>beall's list</i> )

### 3. Isi Artikel

#### 1) Artikel Pertama

Judul Artikel : Comparison of three different extracts of *Centella asiatica* for anti-amnesic, antioxidant and anticholinergic activities: in vitro and in vivo study

Nama Jurnal : **Biomedicine & Pharmacotherapy**

Penerbit : ELSEVIER

Volume & Halaman : 105 & 1344-1352

Tahun Terbit : 2018

Penulis Artikel : Renu Arora, Ritesh Kumar, Amit Agarwal, K.H Reeta, Y.K. Gupta

Isi Artikel :

a. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini untuk mencari tahu kegunaan dari kandungan triterpen pada ekstrak *Centella asiatica* untuk antioksidan, modulasi kolinesterase dan anti-amnesia properti.

b. Metode Penelitian

1) Desain Penelitian

Desain penelitian eksperimental dengan menggunakan ekstrak *Centella asiatica* (L.) urban.

2) Sampel Penelitian

- Pembuatan ekstrak methanol *Centella asiatica* (CAE)

Serbuk kering kasar *Centella asiatica* ditimbang sebanyak 2 kg, kemudian direfluks tiga kali dengan menggunakan metanol sebanyak 8 L, pada suhu 70°C selama 1 jam kemudian disaring. Ketiga filtrat tersebut dicampur dan diuapkan sampai kering di bawah vakum (500-550 mm Hg) pada suhu tidak lebih dari 70°C, untuk menghasilkan serbuk hijau (CAE).

- Pembuatan *Triterpenes enriched fraction* (CAE-EF)

Serbuk kering kasar *Centella asiatica* ditimbang sebanyak 2 kg dan direfluks tiga kali dengan metanol (8 L), pada 70 °C selama 1 jam dan disaring. Ketiga filtrat dipekatkan menjadi pasta kental berwarna hijau tua di bawah vakum (500-550 mm Hg), pada suhu tidak lebih dari 70 °C. Ekstrak pasta kental

(CAE) kemudian dipartisi tiga kali dengan n-butanol: air (1:1). Lapisan berair dan organik yang diperoleh dipisahkan di bawah vakum pada suhu tidak lebih dari 80 °C. Residu selanjutnya dilarutkan dalam metanol, direfluks dengan arang aktif dan disaring. Filtrat dipekatkan dan diuapkan sampai kering di bawah vakum (500-550 mm Hg), pada suhu tidak lebih dari 70°C, untuk mendapatkan serbuk coklat.

- Pembuatan *Triterpenes free fraction* (CAE-FF).

Fraksi air yang telah diperoleh diuapkan di bawah vakum (500-550 mm Hg) pada suhu tidak lebih dari 80 °C, untuk menghasilkan pasta coklat higroskopis coklat tua.

### 3) Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan berupa Spektrofotometer UV-Vis

### 4) Metode Analisis

- Analisis fitokimia ekstrak CA dilakukan melalui HPLC di Natural Remedies Private Limited, Bangalore, India. Total triterpen yaitu (asiaticoside, maddecassoside, madecassic acid, dan asiatic acid) asam) sitentukan dengan cara kolom

fase terbalik (Lichrospher, C18-5 $\mu$  (Merck)) digunakan dan suhu kolom dipertahankan pada  $27 \pm 1$  °C. HPLC fase empedu, Solusi A: kalium dihidrogen ortofosfat (0,136 g) dilarutkan dalam 900 ml air kadar HPLC yang ditambahkan 0,5 ml asam fosfat dan volume dibuat hingga 1000 ml dengan air. Solusinya disaring melalui filter membran 0,45 mm dan dihilangkan gasnya dalam sonikator selama 3 menit; Solusi B: asetonitril. Seluler fase dijalankan menggunakan elusi gradien: 0 menit, 15% B; dalam 5 menit ke depan untuk 25% B; dalam 10 menit berikutnya hingga 45% B; dalam 5 menit ke depan hingga 60% B dan dipertahankan pada 60% B selama 5 menit; dalam 5 menit ke depan hingga 50% B; dalam 5 menit ke depan hingga 45% B; di dalam 5 menit berikutnya hingga 15% B diikuti dengan periode ekuilibrisasi 5 menit. NS laju alir adalah 1,8 ml/menit dan volume injeksi adalah 20  $\mu$ l. NS eluen dideteksi dan dianalisis pada 210 nm.

- Uji penghambatan radikal DPPH

Uji DPPH dilakukan seperti yang dijelaskan oleh Vani *et al*, dengan menggunakan sedikit modifikasi, untuk kontrol positif digunakan Asam galat dan persentase penghambatan dihitung dengan menggunakan rumus (%) = [(Abs control–Abs

sample)/Abs control] X 100; dimana kontrol Abs adalah absorbansi radikal DPPH; Sampel abs adalah absorbansi radikal DPPH beserta ekstrak/kontrol positif. Nilai IC50 dari ekstrak dihitung menggunakan perangkat lunak Graph pad prisma.

#### 5) Hasil Penelitian

Hasil Fitokimia dari berbagai perbandingan fraksi *Centella asiatica*

- *Centella asiatica extract* (CAE)

CAE mengandung b/b 33,8% dari triterpen total seperti yang ditentukan oleh kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) (No batch: BWCEX/2012 Lot 004). Pada analisis lebih lanjut, ditemukan mengandung senyawa fito seperti asiaticoside 10,9%, maddecassoside 13,8%, asam madecassic 6,1%, asam asiatik 3,0%.

- *Triterpenes enriched fraction* (CAE-EF)

CAE-EF (No. Batch: RD 3014) mengandung b/b 76,20% dari total triterpen dan pada analisis lebih lanjut diidentifikasi mengandung maddecasso 40,86%; asiatikosida 22,99%; madecassic acid 4.24% dan asam asiatika 3.08%.

- *Triterpenes free fraction* (CAE-FF)



CAE-FF (Batch no: RD 3013) ditemukan mengandung b/b 0,94% dari total triterpene, dan mengandung maddecassoside 0,76% dan asiatikosida hanya 0,18%.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, ekstrak metanol (CAE) dan fraksi bebas triterpen (CAE-FF) menunjukkan aktivitas antiradikal yang lebih baik sementara fraksi yang diperkaya triterpen (CAE-EF) ditemukan paling tidak aktif dalam ABTS, DPPH, NO, NORAC dan ORAC. Aktivitas penangkal radikal bebas CAE ditemukan paling tinggi yang ditunjukkan oleh nilai  $IC_{50}$  terendah yaitu 65,71  $\mu\text{g/ml}$ . CAE-EF ditemukan paling tidak aktif meskipun kandungan triterpenya tinggi, sedangkan fraksi bebas (CAE-FF) juga menunjukkan aktivitas antiradikal dengan nilai  $IC_{50}$  yaitu 115,91  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil ini menunjukkan pengayaan ekstrak CA dengan triterpen tidak meningkatkan aktivitas antiradikal in vitro.

Aktivitas anti-radikal CAE-FF yang ditunjukkan dalam penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh komponen selain triterpen. Temuan di atas menunjukkan bahwa triterpen di CA mungkin tidak secara langsung bertanggung jawab untuk potensi antiradikal, tetapi ketika hadir dengan komponen lain dari CAE telah meningkatkan potensi antiradikal.

**Tabel 3.2 Aktivitas penghambatan radikal DPPH dengan berbagai perbandingan ekstrak**

<b>Ekstrak</b>	<b>DPPH Nilai IC50 (µg/ml)</b>
Asam Galat (Kontrol Positif)	1,64
Ekstrak <i>Centella asiatica</i> (CAE)	65,71
<i>Triterpenes enriched fraction</i> (CAE-EF)	Tidak Aktif
<i>Triterpenes free fraction</i> (CAE-FF)	115,91

#### 6) Kesimpulan dan Saran

CAE menunjukkan aktivitas penghambatan radikal terbaik dan termasuk dalam kategori antioksidan kuat, diikuti oleh CAE-FF sebagai antioksidan lemah dan CAE-EF tidak ditemukan aktif dalam penghambatan radikal DPPH.

## 2) Artikel Kedua

Judul Artikel : The Development of *Centella asiatica* Extract-Loaded BSA Nanoparticles Production to Improve Bioavailability

Nama Jurnal : **Oriental Journal of Chemistry**

Penerbit : Biotechnology Faculty, Assumption University, Bangkok, 10240, Thailand.

Volume & Halaman : 32 & 5

Tahun Terbit : 2016

Penulis Artikel : Kittiya Kesornbuakao, and Patchanee Yasurin

Isi Artikel :

a. Tujuan Penelitian

untuk mengembangkan *Centella asiatica* ekstrak-loaded BSA nanopartikel (CBNP) untuk meningkatkan bioavailabilitas.

b. Metode Penelitian

1) Desain Penelitian

Desain penelitian eksperimental dengan menggunakan ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* L.).

2) Sampel Penelitian

- Pembuatan ekstrak kloroform kasar *Centella asiatica* (L)

*Centella asiatica* diekstraksi dengan kloroform dengan perbandingan 1:10 (g/ml). lalu dimaserasi pada suhu kamar, 120 rpm, selama 48 jam kemudian disaring menggunakan kertas saring whatman no.4. Ekstrak kasar dipekatkan menggunakan rotary evaporator (BUCHI Rotavapor R-205) pada suhu 45°C, kemudian disimpan pada suhu 20°C sebelum digunakan. Ekstrak kloroform kasar *Centella asiatica* digunakan untuk pembuatan CBNP.

- Pembuatan nanopartikel BSA yang mengandung ekstrak *Centella asiatica*

CBNP disiapkan dengan metode desolvasi. 100 mg BSA dilarutkan dalam 1 ml larutan natrium klorida (10 mM). Kemudian, tambahkan etanol 8 ml tetes demi tetes ke dalam larutan BSA dengan pengadukan magnetik (400 rpm) pada suhu kamar. Selanjutnya, nanopartikel BSA yang telah disiapkan dihubungkan silang dengan 0,2% glutaraldehid (GA). Kemudian, ekstrak kloroform kasar *Centella asiatica* ditambahkan ke dalam larutan selama 24 jam dengan perbandingan *Centella asiatica* terhadap BSA yang berbeda (1:2, 1:3, dan 1:4) dalam preparasi CBNP. Partikel disentrifugasi dan dicuci dengan air suling. Partikel yang disentrifugasi disuspensikan kembali dan didispersikan dalam manitol 2%, kemudian dibekukan sampai kering selama 24 jam. Serbuk Nano kering disimpan pada suhu kamar sebelum digunakan.

### 3) Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan berupa Spektrofotometer UV-Vis

### 4) Metode Analisis

Pengujian aktivitas antioksidan dengan kandungan total fenolik menggunakan Metode Folin-Ciocalteu yang dimodifikasi. 20 µl dalam 10 mg/ml ekstrak kloroform kasar *C. asiatica* dan CBNP ditambahkan ke dalam 1,58 ml air suling dan 100 µl reagen Folin-Ciocalteu fenol. Campuran kemudian didiamkan selama 8 menit 30 detik dan 300 µl larutan jenuh natrium karbonat ditambahkan ke dalam campuran. Kemudian campuran diinkubasi tanpa cahaya pada suhu kamar selama 30 menit dan densitas optik yang diamati (OD) pada 765 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai setara dengan mikrogram asam bawang putih (µgGAE/ml). Percobaan dilakukan dalam rangkap tiga dan tiga ulangan secara mandiri.

Aktivitas penghambatan radikal DPPH yang telah dimodifikasi digunakan untuk penentuan persentase penangkapan radikal DPPH yaitu dengan cara mengambil ekstrak kloroform kasar *Centella asiatica* dan CBNP dengan 100 µl dalam 1 mg/ml lalu dicampur dengan 3,9 ml reagen DPPH (50 M). Campuran dikocok kuat-kuat dan didiamkan pada suhu kamar di tempat gelap selama 30 menit. Kerapatan optik (OD) diukur pada 517 nm. Hasilnya kemudian dihitung dalam persentase inhibisi dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi } 0 - \text{Absorbansi } c}{\text{Absorbansi } 0} \times 100\%$$

Dimana A0 adalah absorbansi awal dan Ac adalah nilai konsentrasi sampel yang telah ditambahkan. Semua pengukuran dilakukan dalam rangkap tiga dan tiga ulangan secara independen.

#### 5) Hasil Penelitian

Berdasarkan uji yang telah dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (% reduksi DPPH) hasil yang diperoleh yaitu ekstrak kloroform kasar menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dengan nilai  $29,44 \pm 8,20 \%$ , kemudian diikuti dengan CBNP dengan perbandingan 1:3 dengan nilai  $13,57 \pm 8,99 \%$ , CBNP 1:2 dengan nilai  $11,55 \pm 4,70$  dan yang terendah yaitu CBNP 1:4 dengan nilai  $5,76 \pm 10,44$ .

Rendahnya aktivitas antioksidan pada CBNP diduga karena *Centella Asiatica* kehilangan aktivitas antioksidan setelah melakukan proses nanopartikel, dan kemungkinan senyawa aktif sudah berikatan dengan protein dan mengubah strukturnya menjadi bentuk tidak aktif.

**Tabel 3.3 Nilai Penghambatan radikal DPPH antara CBNP dan ekstrak kloroform kasar**

Ekstrak	Kandungan Total fenolik ( $\mu\text{g GAE/mg}$ berat kering)	% reduksi DPPH
CBNP 1:2	$14,59 \pm 6,74$	$11,55 \pm 4,70$

CBNP 1:3	13,15 ± 5,94	13,57 ± 8,99
CBNP 1:4	13,15 ± 7,13	5,76 ± 10,44
Ekstrak kloroform kasar <i>Centella asiatica</i>	13,15 ± 1,62	29,44 ± 8,20

c. Kesimpulan dan Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan dengan % pereduksi DPPH, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kloroform kasar *Centella asiatica* memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan CBNP karena prinsip % pereduksi, semakin tinggi nilai persentasenya maka akan semakin tinggi aktivitas antioksidan.

**3) Artikel Ketiga**

Judul Artikel : Aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba pegagan (*centella asiatica* (L.) urban) dengan metode dpph (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Nama Jurnal : **Indonesian Journal of Halal research (IJHAR)**

Penerbit : Universitas Airlangga

Volume & Halaman : 3 & 2

Tahun Terbit : 2020

Penulis Artikel : Muhammad Ainul Yahya, Iif Hanifah Nurrosyidah

Isi Artikel :

a. Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba (*Centella asiatica* (L.) Urban) dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yang dinyatakan dengan nilai IC<sub>50</sub>

b. Metode Penelitian

1) Desain Penelitian

Desain penelitian eksperimental dengan menggunakan ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* L.).

2) Sampel Penelitian

Pegagan di ekstraksi dengan menggunakan metode Soxhlet. Caranya yaitu dengan menimbang Serbuk pegagan sebanyak 400 gram dibagi menjadi 4 bagian yang sama rata kemudian di sokletasi sebanyak 4 kali lalu diekstraksi dengan etanol 96% menggunakan alat Soxhlet pada suhu 60-80°C, tunggu hingga jernihnya cairan yang lewat tabung sifon, hal ini menandakan zat aktif dalam simplisia sudah tersari seluruhnya. Cairan yang telah didapat diuapkan pada rotary evaporator dengan menggunakan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak kental.

3) Instrumen Penelitian



Instrumen penelitian yang digunakan berupa Spektrofotometer UV-Vis.

#### 4) Metode Analisis

- Skrining Fitokimia

- a) Identifikasi Sterol dan Triterpenoid. Ekstrak kental dilarutkan dalam kloroform sebanyak 0,5 gram, kemudian disaring dan filtrat diuji dengan uji Salkowski yaitu filtrat ditambahkan beberapa tetes asam sulfat pekat dan lakukan pengamatan terhadap perubahan warna yang terjadi. Warna merah di lapisan bawah positif sterol dan warna kuning keemasan menunjukkan adanya triterpenoid.
- b) Identifikasi Alkaloid. Ekstrak kental dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi kemudian ditetesi: (a) HCl 0,5 N dan pereaksi Mayer, jika mengandung alkaloid maka akan menghasilkan endapan kuning. (b) HCl 0,5 N dan pereaksi Bauchardat, jika mengandung alkaloid maka akan menghasilkan endapan coklat.
- c) Identifikasi Flavonoid. Ekstrak kental ditambahkan amonia 25%. Jika mengandung flavonoid akan berwarna kuning kehijauan.

- d) Identifikasi Saponin. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dilarutkan dalam 5 ml air suling lalu dikocok dan diamati terbentuknya buih stabil.
- e) Identifikasi tanin. Ekstrak kental ditambahkan beberapa tetes FeCl<sub>3</sub>, jika mengandung tanin akan berwarna hijau, biru sampai hitam.
- Pembuatan Larutan DPPH 100 ppm.  
DPPH ditimbang sebanyak 5 mg lalu ditambahkan metanol p.a hingga 50 mL.
  - Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH.  
Larutan DPPH 100 ppm diukur sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan metanol p.a sebanyak 3 ml dan dihomogenkan. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan ditentukan panjang gelombang optimumnya dengan absorbansi pada panjang gelombang 510-525 nm
  - Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Pegagan.  
Estrak pegagan ditimbang sebanyak 25 mg, kemudian larutkan dengan methanol p.a sebanyak 25 mL, masukkan dalam labu ukur sehingga diperoleh larutan induk 1000 ppm.

Dari larutan induk dibuat seri konsentrasi menjadi 4, 8, 12, 16, 20 dan 100 ppm.

- Pembuatan Larutan Vitamin C sebagai Pembanding.

Vitamin C ditimbang sebanyak 5 mg dan larutkan dengan menggunakan metanol p.a secukupnya, masukkan ke dalam labu ukur 50 ml lalu ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas 50 ml, sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 100 ppm. Hasil larutan induk dibuat seri konsentrasi menjadi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm.

- Pengukuran Serapan dengan spektrofotometer UV-Vis.

Larutan sampel dan larutan pembanding, dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan 1 mL DPPH 100 ppm dan tambahkan methanol p.a sebanyak 2 mL, dikocok hingga homogen. Lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang optimum DPPH yang diperoleh. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali.

- Penentuan % Inhibisi dan Nilai IC50

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Kemudian, masukkan ke dalam persamaan regresi linier dengan menggunakan persamaan  $y = ax + b$  untuk mencari nilai  $IC_{50}$  dengan konsentrasi ppm (mg/L).

c. Hasil Penelitian

**Tabel 3.4 Skrining Fitokimia Ekstrak Pegagan**

No	Metabolit sekunder	Hasil	Ket
1	Triterpenoid	-	Tidak berbentuk warna kuning keemasasn
2	Sterol	+	Terbentuk warna merah
3	Alkaloid	+	Terbentuk endapan kuning (Mayer) Terbentuk endapan coklat ( <i>Et al</i> )
4	Flavonoid	+	Terbentuk warna kuning kehijauan
5	Saponin	+	Terbentuk busa yang stabil
6	Et al.,	+	Terbentuk warna biru kehitaman

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan Vitamin C lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak pegagan. Rendahnya aktivitas antioksidan ekstrak pegagan diduga disebabkan oleh berbagai faktor, seperti dikarenakan metode ekstraksi yang digunakan diduga tidak cukup menarik komponen kimia yang bersifat antioksidan, sedangkan tingginya aktivitas vitamin C diduga karena vitamin C merupakan zat atau

senyawa tunggal yang memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat sedangkan pada ekstrak senyawa masih dalam bentuk gabungan antara komponen-komponen senyawa lain.

**Tabel 3.5 Nilai IC50 Ekstrak Etanol Herba Pegagan dan Vitamin C**

<b>Sampel</b>	<b>Nilai IC50</b>
Ekstrak Pegagan	78,26 ppm
Vitamin C	17,45 ppm

d. Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol herba pegagan memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC50 sebesar 78,26 ppm yang tergolong dalam antioksidan kuat dan vitamin C dengan nilai 17,45 ppm tergolong dalam antioksidan sangat kuat.

**4) Artikel Keempat**

Judul Artikel : Aktivitas antioksidan fraksi metanol daun pegagan  
(*Centella asiatica* (L.) Urban)

Nama Jurnal : Jurnal Fitofarmaka

Penerbit : Laboratorium Farmasi Departemen Klinik,  
Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran  
Hewan IPB

Volume & Halaman : 3 & 2

Tahun Terbit : 2020

Penulis Artikel : Ietje Wientarsih, Sulistyantie Hr. Sjarif, Irma  
Maulani Hamzah

Isi Artikel :

a. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui antioksidan fraksi metanol dari ekstrak metanol daun pegagan.

b. Metode Penelitian

1) Desain Penelitian

Desain penelitian eksperimental dengan menggunakan ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* (L.)Urban).

2) Sampel Penelitian

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Proses pembuatannya yaitu dengan mengiris daun pegagan kering dan dihaluskan, gunakan ayakan 100 mesh untuk pengayakannya, daun pegagan yang sudah diayak dimasukkan ke dalam maserator, dan ditambahkan metanol p.a sampai terendam, diamkan selama 24 jam sambil sesekali diaduk. Kemudian disaring, maserat yang telah disaring dimasukkan kedalam wadah penampung, dan untuk ampas dimasukkan kembali ke dalam maserator untuk dimaserasi

ulang. Lakukan maserasi sebanyak 3 kali ulangan, maserat hasil dari 3 kali ulangan disatukan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C kemudian ekstrak kental ditimbang.

### 3) Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan berupa Kromatografi Lapis Tipis (Komatografi kolom) dan Spektrofotometer UV-Vis.

### 4) Metode Analisis

Untuk mengidentifikasi terpenoid, steroid, alkaloid, flavonoid dan fenolik menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak untuk elusi sampel yaitu campuran toluena:etil asetat (9,3:0,7) heksana:methanol:aseton (9:0,5:0,5), toluene:etil asetat (1:1), kloroform:benzene (4:1) dan etil asetat:methanol:air (8,1:1:1,25:0,65) dan sampel dilarutkan dengan menggunakan alkohol. Noda yang muncul diamati menggunakan bantuan sinar UV dan diamati secara langsung. Kemudian, noda disemprotkan dengan asam sulfat pekat. Komponen yang paling besar ditentukan dan dilanjutkan ke tahap pemurnian dengan kromatografi kolom.

Tahap pemurnian yang dilakukan yaitu dengan menimbang silica gel G60 sebanyak 100 gram dan dilarutkan dengan fase gerak, kemudian dimasukkan kedalam kolom dengan menggunakan batang pengaduk sampai kolom terisi padat dan rata

dengan silica dan untuk sampelnya dilarutkan dengan alkohol dan dimasukkan kedalam kolom dan dielusi menggunakan fase gerak. Fraksi yang didapat ditampung sebanyak 50 fraksi masing-masing 10 ml menggunakan botol vial kemudian ditutup rapat dan setiap fraksi diuji menggunakan KLT dan fraksi yang mengandung komponen yang sama digabung dan diletakkan dalam satu wadah. Fraksi yang paling banyak kandungan metabolitnya kemudian dipisahkan. Sampel yang telah murni digunakan untuk uji antioksidan.

Uji aktivitas antioksidan menggunakan larutan DPPH  $1,0 \times 10^{-3}$  dalam methanol. Cara pembuatannya yaitu dengan mengambil larutan DPPH sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam botol vial dengan konsentrasi sampel yaitu 50 ppm; 100 ppm; 200 ppm; dan 400 ppm. Masing-masing konsentrasi dimasukkan kedalam botol vial yang telah ada larutan DPPH dan lakukan pengenceran dengan menggunakan methanol sampai batas 5 mL. Sampel diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm dengan waktu 30 menit.



Aktivitas antioksidan dapat diketahui dengan adanya penurunan serapan larutan DPPH. Nilai serapan larutan DPPH terhadap sampel disebut sebagai %inhibisi, dengan persamaan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Absorbansi kontrol merupakan absorbansi awal 0 menit dan absorbansi sampel merupakan absorbansi awal pada saat t menit. Kemudian, masukkan ke dalam persamaan regresi linier dengan menggunakan persamaan  $y = ax + b$  untuk mencari nilai  $IC_{50}$  dengan konsentrasi ppm (mg/L).

c. Hasil Penelitian

Hasil analisis secara kualitatif terhadap fraksi metanol yang diperoleh yaitu :

**Tabel 3.6 Hasil Penapisan Fitokimia Fraksi Metanol**

<b>Parameter Uji</b>	<b>Hasil (Adanya endapan dan perubahan warna)</b>
Terpen	+
Alkaloid	+
Flavonoid	+

Terdapat penurunan warna larutan DPPH yang menjadi pudar dan untuk pengukuran nilai absorbansi sampel terjadi penurunan. Hal ini menandakan adanya penangkapan radikal DPPH oleh senyawa

metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi metanol daun pegagan.

Nilai IC<sub>50</sub> fraksi metanol yang diperoleh sebesar 481,64 ppm dan tergolong dalam antioksidan lemah. Lemahnya aktivitas antioksidan yang diperoleh kemungkinan karena pada saat pengambilan senyawa menggunakan kromatografi kolom senyawa yang dihasilkan kurang murni.

**Tabel 3.7 Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Metanol**

<b>Sampel Uji</b>	<b>Konsentrasi (ppm) X</b>	<b>Inhibisi (%) Y</b>	<b>IC<sub>50</sub> (ppm)</b>
Kontrol	0	0,00	Persamaan : $r = 0,998$ $Y = 0,104x - 0,091$ $X = \frac{(50+0,091)}{0,104}$ $X = 481,64$
Pegagan	50	4,34	
	100	11,01	
	200	21,13	
	400	41,38	

d. Kesimpulan dan Saran

Aktivitas penghambatan radikal DPPH yang diperoleh dari fraksi methanol daun pegagan yaitu 481,64 µg/mL dan tergolong kedalam antioksidan lemah dan penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk melakukan pengembangan metode kromatografi kolom terutama pada komposisi fase geraknya agar senyawa yang diperoleh lebih murni untuk dapat dilakukan uji UV/IR dan NMR.

## 5) Artikel Kelima

Judul Artikel : Efek Penghambatan Radikal Bebas Infusa dan Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) Dengan Metode DPPH

Nama Jurnal : Jurnal Pijar MIPA

Penerbit : Universitas Mataram

Volume & Halaman : 14 & 1

Tahun Terbit : 2019

Penulis Artikel : Melisa Widyani, Maria Ulfa, Dyke Gita Wirasisya

Isi Artikel :

### a. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan pengaruh metode ekstraksi terhadap aktivitas penghambatan radikal bebas herba pegagan menggunakan metode DPPH dengan Spektrofotometri UV-Vis

### b. Metode Penelitian

#### 1) Desain Penelitian

Desain penelitian eksperimental dengan menggunakan ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb)

#### 2) Sampel Penelitian

- Pembuatan Ekstrak Etanol Herba Pegagan

Pembuatan ekstrak etanol herba pegagan dengan menggunakan metode maserasi. Cara pembuatannya yaitu timbang serbuk pegagan sebanyak 100 gram dan masukkan kedalam botol kaca kemudian tuangi etanol 70% sebanyak 750 mL ditutup dan didiamkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Lakukan remaserasi sebanyak 2 kali agar hasil ekstraksi lebih maksimal. Hasil ekstraksi kemudian dipisahkan menggunakan *rotary evaporator* sampai menghasilkan ekstrak kental.

- Pembuatan Infusa Herba Pegagan

Pembuatan infusa herba pegagan dengan menggunakan metode infundasi. Caranya yaitu dengan memanaskan herba pegagan segar pada suhu 90°C dengan waktu 15 menit dengan menggunakan perbandingan (1:10). Infusa kemudian diserkai. Setelah dingin, ekstrak dikeringkan menggunakan *freeze drying* hingga diperoleh ekstrak kering.

### 3) Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang digunakan berupa KLT dan Spektrofotometer UV-Vis.

### 4) Metode Analisis

Penentuan kandungan fenolik total pada ekstrak etanol dan infusa herba pegagan menggunakan metode Follin-Ciocalteu. Kandungan fenolik total dalam ekstrak etanol dan infusa herba pegagan dinyatakan sebagai mg/100 mL ekuivalen asam galat (EAG). Larutan ekstrak etanol dan infusa herba pegagan (1000 µg/mL) dan larutan asam galat (10; 20; 30; 40 dan 50 µg/mL) masing-masing sebanyak 300 µL dipipet kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 1,5 mL reagen Follin-Ciocalteu (1:10) dan digojog, kemudian diinkubasi selama 3 menit lalu ditambahkan 1,2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7,5% dan digojog hingga homogen. Campuran kemudian didiamkan selama 15 menit. Serapan kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 754 nm.

Antioksidan ekstrak etanol dan infusa herba pegagan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH yang digunakan Molyneux (2004) dan dengan sedikit modifikasi. Tambahkan ekstrak etanol dan infusa herba pegagan dengan konsentrasi 10; 20; 40; 60; dan 80 µg/mL sebanyak 2 mL kedalam 2 mL DPPH 0,1 mM. Campuran digojog dan diinkubasi selama 30 menit ditempat gelap. Kemudian diukur absorbansinya pada λmaks 517 nm. lakukan hal yang sama pada larutan blanko DPPH (2 mL DPPH

0,1 mM dan 1 mL etanol p.a) dan kontrol positif vitamin C dengan konsentrasi 1;2;4;6 dan 8 µg/mL. Data hasil pengukuran absorbansi dianalisa menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan:

A0 = Absorbansi blanko

A1 = Absorbansi sampel

c. Hasil Penelitian

**Tabel 3.8 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol dan Infusa Herba Pegagan (Uji Tabung)**

No	Golongan senyawa	Pereaksi	Ekstrak Etanol	Infusa
1	Flavonoid	$H_2SO_4$	++	+
2	Terpenoid	$CHCl_3$ + $H_2SO_4$	++	+
3	Tanin	$FeCl_3$ 10%	++	+

**Tabel 3.9 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol dan Infusa Herba Pegagan (KLT)**

No	Golongan senyawa	Eluen	Pereaksi	Ekstrak Etanol	Infusa
1	Flavonoid	BAW (4: 1: 5)	$AlCl_3$ 10%	+	-
2	Terpenoid	Kloroform : methanol (3:1)	$H_2SO_4$ 10%	+	-
3	Tanin	$FeCl_3$ 10%	$FeCl_3$	+	-

**Tabel 3.10 Kandungan Fenolik Total Ekstrak Etanol dan Infusa Herba Pegagan**

<b>Ekstrak Herba Pegagan</b>	<b>Kandungan Fenolik Total (mg(EAG)/g ekstrak)</b>
Ekstrak Etanol	1,73 ± 0,38
Infusa	0,93 ± 0,04

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan infusa herba pegagan menunjukkan bahwa ekstrak etanol herba pegagan mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dengan nilai  $IC_{50}$  20,43  $\mu\text{g/mL}$  sedangkan untuk infusa herba pegagan dengan nilai  $IC_{50}$  64,61  $\mu\text{g/mL}$ . Tetapi bila dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  pada vitamin C (3,45  $\mu\text{g/mL}$ ) aktivitasnya masih jauh lebih rendah.

**Tabel 3.11 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dan Infusa Herba Pegagan Terhadap Radikal DPPH**

<b>Sampel</b>	<b>Konsentrasi (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Inhibisi (%)</b>	<b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
Ekstrak Etanol	10	44,87	20,43
	20	49,15	
	40	61,57	
	60	74,94	
	80	92,31	
Infusa	10	8,27	64,61
	20	15,41	
	40	33,27	
	60	47,80	
	80	60,12	

---

	1	28,16	
	2	36,18	
Vitamin C	4	55,01	3,45
	6	75,02	
	8	88,84	

---

d. Kesimpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol dan vitamin C merupakan antioksidan sangat kuat, dan infusa herba pegagan termasuk kedalam antioksidan kuat.



