

EVALUATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES AND STANDARDIZATION OF *Centella asiatica* L. Urb HERBS FROM VARIOUS REGIONS IN WEST JAVA

Kania Fajarwati^{1*}, Wempi Budiana¹, R. Herni Kusriani¹, Neng Dian Mardiana¹, Taufik Muhammad Fakh²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana, Jl Soekarno-Hatta No 754, Cipadung Kidul, Kec. Panyileukan, Kota Bandung, Jawa Barat 40614, Indonesia

²Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl Ranggagading No 8, Tamansari, Kec. Bandung Wetan, Kota Bandung, Jawa Barat 40116, Indonesia

Corresponding author: Kania Fajarwati (kania.fajarwati@bku.ac.id)

ARTICLE HISTORY

| Received: 13 March 2023

| Revised: 11 July 2024

| Accepted: 27 July 2024

Abstract

Centella asiatica L. Urb, commonly known as gotu kola, is a plant renowned for its beneficial properties, particularly as an antioxidant that aids in neutralizing free radicals and preventing associated cellular damage. Free radicals are implicated in various diseases. The active compounds in gotu kola responsible for its antioxidant potential include tannins, flavonoids, and terpenoids. This study aims to establish standardization parameters for gotu kola and assess the antioxidant activities of samples sourced from five different regions. The standardization process yielded specific and non-specific parameters that adhere to the requirements outlined in the Indonesian Herbal Pharmacopoeia. Samples were extracted using the maceration method with 96% ethanol, and the antioxidant activity was evaluated qualitatively via thin-layer chromatography and quantitatively using a UV-visible spectrophotometer. The DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method indicated varying IC₅₀ values ranging from 67.61 to 89.32 µg/mL, with the most potent extract originating from the Pangandaran region at 67.61 µg/mL, compared to ascorbic acid at 4.22 µg/mL. These findings underscore the antioxidant potential of all five gotu kola extracts studied.

Keywords: antioxidant activity, *centella asiatica* L. Urb, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), gotu kola, standardization process

PENILAIAN SIFAT ANTIOKSIDAN DAN STANDARISASI HERBA *Centella asiatica* L. Urb DARI BERBAGAI DAERAH DI JAWA BARAT

Abstrak

Centella asiatica L. Urb, yang lebih dikenal sebagai herba pegagan, adalah tumbuhan yang memiliki manfaat yang berharga, salah satunya sebagai antioksidan yang membantu mengimbangi radikal bebas dan mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh mereka. Radikal bebas diketahui memainkan peran dalam berbagai penyakit. Senyawa-senyawa seperti tanin, flavonoid, dan terpenoid yang terdapat dalam herba pegagan memiliki potensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan parameter standar herba pegagan serta mengevaluasi aktivitas antioksidan dari sampel herba pegagan yang berasal dari lima wilayah berbeda. Parameter standarisasi yang spesifik dan non-spesifik yang diperoleh dari proses ini telah memenuhi persyaratan yang ditetapkan dalam Farmakope Herbal Indonesia. Sampel diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, dan aktivitas antioksidan dievaluasi secara kualitatif dengan menggunakan kromatografi lapis tipis dan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-visible. Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) digunakan untuk menilai aktivitas antioksidan, dengan rentang nilai IC_{50} antara 67,61 hingga 89,32 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak yang paling aktif ditemukan berasal dari wilayah Pangandaran dengan nilai IC_{50} sebesar 67,61 $\mu\text{g/mL}$, dibandingkan dengan asam askorbat yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 4,22 $\mu\text{g/mL}$. Kesimpulannya, semua lima ekstrak herba pegagan menunjukkan potensi sebagai sumber antioksidan yang berharga.

Kata kunci: aktivitas antioksidan, *centella asiatica* L. Urb, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), herba pegagan, proses standarisasi

Pendahuluan

Indonesia dikenal sebagai salah satu negara yang memiliki beragam tanaman obat yang belum sepenuhnya dijelajahi mengenai manfaat dan komposisinya. Untuk meningkatkan peran obat tradisional sebagai bentuk pengobatan, perlu dilakukan penelitian terhadap tanaman obat, dan pada akhirnya, penggunaan tanaman-tanaman ini sebagai obat yang aman dan efektif oleh masyarakat Indonesia dapat tercapai.¹

Salah satu kondisi yang dapat dihindari adalah penyakit yang timbul akibat penurunan fungsi organ karena paparan radikal bebas.² Untuk melawan reaktivitas senyawa tersebut, tubuh kita memiliki sebuah sistem yang di dalamnya memiliki antioksidan.³ Antioksidan adalah senyawa yang memiliki kemampuan dalam melawan radikal bebas dalam proses oksidasi.³ Berdasarkan informasi yang ada, antioksidan dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu antioksidan buatan dan alami. Sumber alami antioksidan juga dapat ditemukan dalam berbagai jenis sayuran hijau, termasuk pegagan (*Centella asiatica* L. Urb).⁴

Senyawa-senyawa sekunder yang terdapat dalam tanaman ini meliputi flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, steroid, dan triterpenoid.⁵ Adapun Senyawa lain yang terdapat dalam herba pegagan yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan yaitu tanin, flavonoid, dan terpenoid.⁶ Menurut penelitian sebelumnya, Ekstrak etanol dari herba pegagan menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan dengan nilai IC_{50} sebesar 78,26 ppm.⁷

Mengingat pentingnya peran obat tradisional dan berbagai tumbuhan dalam bidang kesehatan proses standarisasi dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh simplisia dan ekstrak yang lebih baik sesuai aturan yang telah ditetapkan, berdasarkan

parameter mutu spesifik dan non spesifik.⁸ Sebelumnya penelitian tentang standarisasi yang pernah dilakukan seperti yang dilakukan oleh Rahmaniati M, Ulfah dan Mulangsari⁹ terhadap ekstrak etanol daun pegagan pada dua tempat tumbuh yang berbeda yaitu Kabupaten Tawangmangu dan Kabupaten Kediri. Hasil yang diperoleh dari penelitian tersebut belum memenuhi persyaratan yang ditetapkan pada Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan. Sedangkan hasil penelusuran pustaka belum ditemukan penelitian mengenai standarisasi herba pegagan dengan parameter spesifik dan non-spesifik dari beberapa tempat tumbuh yang berbeda dan menurut penelitian Leliqia¹⁰ terdapat perbedaan aktivitas antioksidan pada lengkuas dari tempat yang berbeda.

Oleh karena alasan tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan proses standarisasi herba pegagan dan membandingkan uji aktivitas antioksidan dari beberapa daerah di Jawa Barat, diantaranya daerah Lembang, Sumedang, Pangandaran, Bogor, dan Sukabumi.

Metode

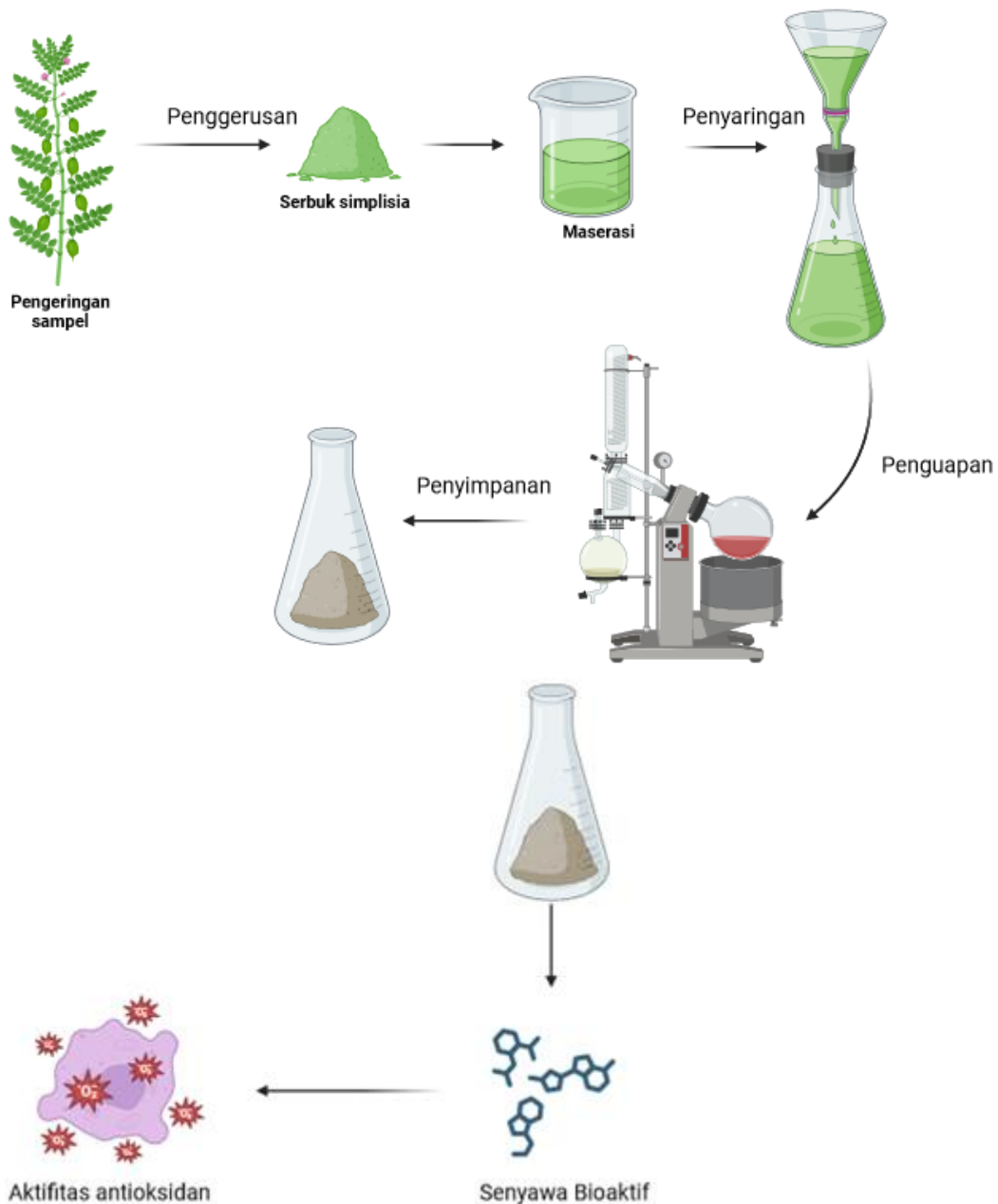
Alat

Alat gelas standard, oven, grinder (makindo), mikroskop, kertas saring, cawan penguap (RRC), hot plate, desikator, tanur, timbangan analitik (Mettler Toledo ME204E), moisture balance, *rotary evaporator*, lampu UV 254 nm dan 366 nm, mikropipet (Thermo Scientific), pipet tetes, spektrofotometri UV-Vis (Shimadzu Uv-1800).

Bahan

Herba pegagan (*Centella asiatica* L. Urb) yang berasal dari daerah Lembang, Sumedang, Bogor, Sukabumi, dan Pangandaran yang dikumpulkan pada bulan Desember 2021 dan telah dideterminasi dibuktikan dengan surat hasil determinasi no 6543/IT1.C11.2/TA.00/2021 pada instansi Sekolah Ilmu Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung (SITH ITB). Kloralhidrat 70%, air jenuh kloroform, etanol p teknis, aquadest, toluene, asam klorida encer LP, etanol 96% p.a, sitroborat, FeCl₃ 10%, H₂SO₄ 10% dalam metanol p.a, DPPH, ammonia 25%, kloroform p, reagen uji fitokimia vitamin C, silica gel F254.

Metode



Gambar 1. Diagram alir penelitian uji aktivitas antioksidan dan standarisasi herba *Centella asiatica* L. Urb.

Penyiapan Bahan

Pengumpulan bahan herba pegagan dari lima daerah yang berbeda yaitu Sumedang, Sukabumi, Pangandaran, Lembang dan Bogor. Setelah herba pegagan didapatkan kemudian dibersihkan dari pengotor atau dari benda-benda asing yang tidak digunakan. Kemudian, lakukan proses pencucian menggunakan air mengalir secara menyeluruh untuk menghapus segala kotoran yang masih menempel pada herba pegagan, kemudian biarkan mengering. Kemudian dirajang agar dapat mempercepat proses pengeringan dengan menggunakan lemari pengering pada suhu 50°C selama 48

jam. Kemudian lakukan sortasi kering untuk memisahkan bahan yang sudah kering dari bahan asing lainnya dan memilih bahan yang layak digunakan yang ditandai dengan herba yang mudah hancur. Selanjutnya simplisia dihaluskan dengan menggunakan alat yaitu mesin grinder kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat.¹¹

Standarisasi dan Skrining Fitokimia

Standarisasi simplisia melibatkan penilaian berdasarkan parameter yang bersifat khusus dan umum. Parameter khusus mencakup identitas, pengamatan mikroskopis, dan pengamatan makroskopis, sedangkan parameter umum mencakup penentuan kadar air, analisis ayak kering, kandungan serat kasar, dan kandungan abu.¹²

Skrining fitokimia dari simplisia dan juga ekstrak, terdiri dari pemeriksaan golongan senyawa menggunakan pereaksi yang sesuai, seperti alkaloid (dragendorff dan mayer), flavonoid (serbuk mg, HCl dan amyl alcohol), tannin (gelatin, FeCl₃, dan steasny), kuinon (NaOH), saponin, dan steroid atau triterpenoid (Liebermann-burchard).^{13,14}

Ekstraksi

Bahan yang digunakan adalah 200 gram serbuk kering herba pegagan yang telah diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Sampel direndam selama 3x24 jam, dan diaduk selama 6 jam pertama setiap setelah penggantian pelarut, maserat yang didapatkan dipisahkan lalu di pindahkan ke tempat lain, sedangkan ampasnya diperlakukan sama sebanyak 3 kali maserasi. Maserat tersebut disatukan kemudian lakukan pemekatan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.¹⁵

Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan teknik KLT GF254 menggunakan pengembang non polar seperti n-heksana:etil asetat (6:4), semipolar kloroform:methanol (8:2), dan polar menggunakan etil asetat:asam format:air (8:1:1) dan secara kuantitatif, aktivitas antioksidan diukur dengan membandingkan dengan vitamin C menggunakan metode 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800).

$$\text{Persentase Inhibisi (\%)} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan regresi linear $y = bx + a$, di mana x adalah konsentrasi larutan uji dan y adalah persentase inhibisi.

Hasil

Standarisasi herba pegagan dilakukan dengan beberapa pengujian. Tabel 1 dan Tabel 2 menunjukkan hasil pemeriksaan standarisasi spesifik herba pegagan secara makroskopis dan mikroskopis.

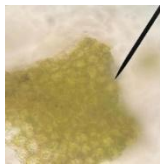
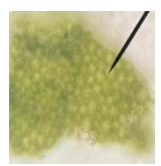
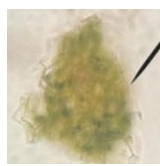
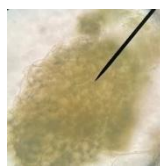
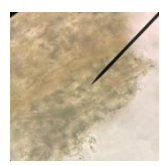
Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Makroskopik Herba Pegagan

No	Pemeriksaan	Lembang	Bogor	Pangandaran	Sumedang	Sukabumi
1.	Bentuk	Kipas dengan tepi bergigi, permukaan dan punggungnya yang licin, tulang daun berpusat di akar.				
2.	Warna	Hijau				

Tabel 1. (Lanjutan)

No	Pemeriksaan	Lembang	Bogor	Pangandaran	Sumedang	Sukabumi
3.	Bau			Tidak berbau		
4.	Rasa			Agak pahit		
5.	Ukuran	Tinggi 19,6 cm	Tinggi 14 cm	Tinggi 19,2 cm	Tinggi 9 cm	Tinggi 20,2 cm

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Mikroskopik Herba Pegagan

Fragmen Pengenal				
Urut daun dengan kristal kalsium oksalat yang memiliki bentuk roset yang khas				
CA-Lembang	CA-Bogor	CA-Pangandaran	CA-Sumedang	CA-Sukabumi
				

Hasil pengujian standarisasi non spesifik herba pegagan terlihat pada Tabel 3 mengenai kadar sari herba pegagan, susut pengeringan dan kadar air herba pegagan pada Tabel 4, dan pengujian kadar abu pada Tabel 5.

Tabel 3. Hasil Penetapan Kadar Sari Herba Pegagan

Parameter Standarisasi	Hasil % b/b				
	Lembang	Bogor	Pangandaran	Sumedang	Sukabumi
Kadar sari larut air	23%	16%	18%	18%	23%
Kadar sari larut etanol	33%	20%	20%	15%	25%

Tabel 4. Hasil Susut Pengeringan dan Kadar Air Herba Pegagan

Parameter Standarisasi	Hasil % b/b				
	Lembang	Bogor	Pangandaran	Sumedang	Sukabumi
Susut pengeringan	5,831	7,076	6,916	5,868	6,477
Kadar air	2,5*	2,5*	5*	5*	5*

Ket * : % v/b

Tabel 5. Hasil Penetapan Kadar Abu Herba Pegagan

Parameter Standarisasi	Hasil % b/b				
	Lembang	Bogor	Pangandaran	Sumedang	Sukabumi
Kadar abu total	11,3	11	11	10,5	10,6
Kadar abu tidak larut asam	0,3	1,3	1,3	0,6	1,6

Setelah dilakukan standarisasi, sampel simplisia dan ekstrak herba pegagan di lakukan pengujian skrining fitokimia untuk melihat ada tidaknya golongan senyawa pada sampel tersebut. Hasil pengujian tersebut terlihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Skrining Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Herba Pegagan

Senyawa Fitokimia	Hasil Skrining Simplisia dan Ekstrak Herba Pegagan										
	Lembang		Bogor		Pangandaran		Sumedang		Sukabumi		
	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	
Alkaloid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saponin	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
Tannin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kuinon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Steroid/ Triterpenoid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Ket : Positif (+) = mengandung senyawa yang diujikan S = Simplisia

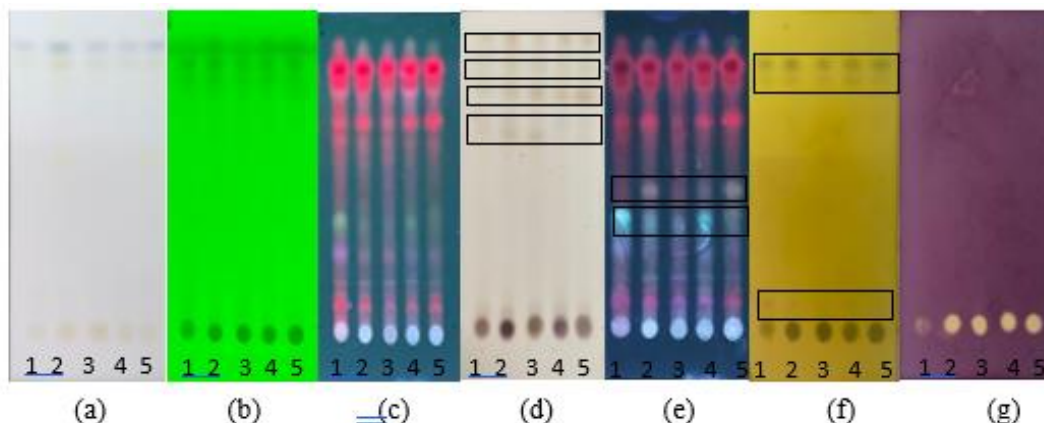
Negatif (-) = tidak mengandung senyawa yang diujikan E = Ekstrak

Setelah dilakukan ekstraksi, dilakukan penghilangan pelarut menggunakan Rotary evaporator sehingga menghasilkan ekstrak kental. Hal ini dilakukan untuk memperkirakan banyaknya senyawa yang tersari dalam ekstrak. Hasil perhitungan rendemen ekstrak terdapat pada Tabel 7.

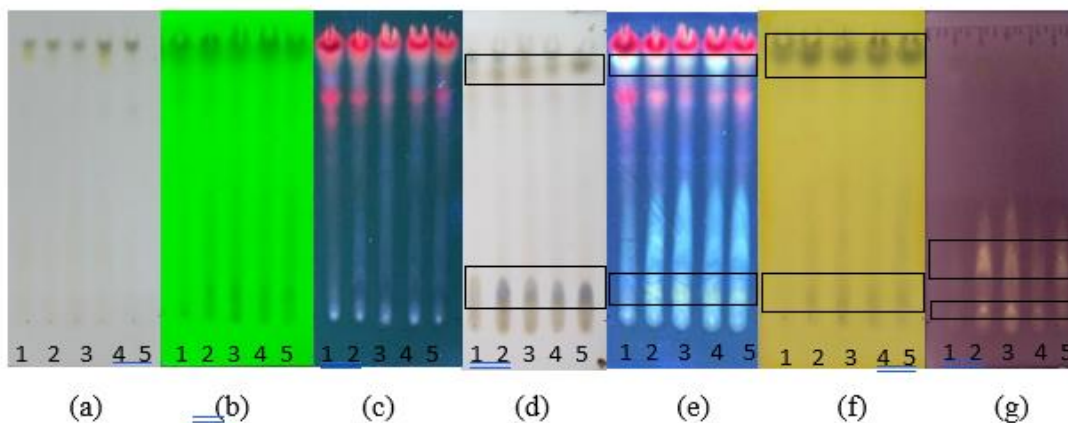
Tabel 7. Hasil Rendemen Ekstrak Etanol Herba Pegagan

No	Sampel Herba Pegagan	Berat Ekstrak (g)	Hasil Rendemen (% b/b)
1.	Lembang	29,85	14,92
2.	Sukabumi	31,55	15,77
3.	Bogor	25,45	12,72
4.	Pangandaran	27,89	13,94
5.	Sumedang	21,15	10,57

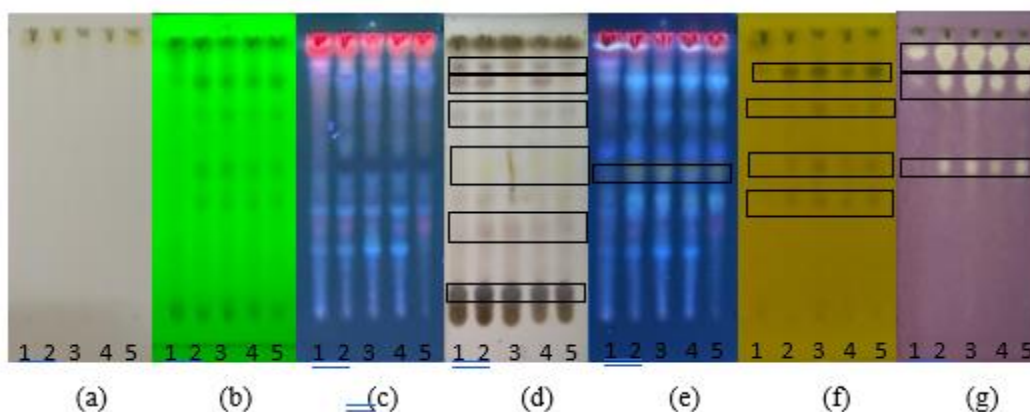
Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan secara kualitatif dan juga kuantitatif. Pengujian antioksidan secara kualitatif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis F254 dengan beberapa penampak bercak yang sesuai, sebagaimana terlihat pada Gambar 2-4. Hasil yang ditandai menunjukkan adanya golongan senyawa yang dimaksud.



Gambar 2. Kromatogram lapis tipis ekstrak etanol herba pegagan, fase diam silika gel F_{254} nm, fase gerak non polar yaitu n-heksana:etil asetat (6:4). (1) herba pegagan daerah Lembang, (2) ekstrak etanol daerah Bogor, (3) ekstrak etanol daerah Pangandaran, (4) ekstrak etanol daerah Sumedang, (5) ekstrak etanol daerah Sukabumi. (a) sinar tampak, (b) sinar UV 254 nm, (c) sinar UV 365 nm, (d) penampak bercak H_2SO_4 10%, (e) penampak bercak $AlCl_3$ 5%, (f) penampak bercak $FeCl_3$ 10%, (g) penampak bercak DPPH 0,2%.

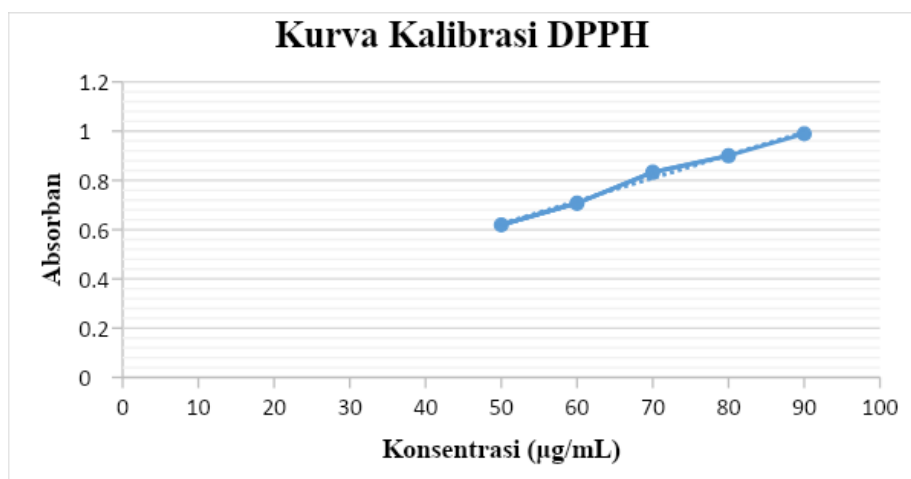


Gambar 3. Kromatogram lapis tipis ekstrak etanol herba pegagan, fase diam silika gel F_{254} nm, fase gerak semi polar yaitu kloroform:methanol (8:2). (1) herba pegagan daerah Lembang, (2) ekstrak etanol daerah Bogor, (3) ekstrak etanol daerah Pangandaran, (4) ekstrak etanol daerah Sumedang, (5) ekstrak etanol daerah Sukabumi. (a) sinar tampak, (b) sinar UV 254 nm, (c) sinar UV 365 nm, (d) penampak bercak H_2SO_4 10%, (e) penampak bercak $AlCl_3$ 5%, (f) penampak bercak $FeCl_3$ 10%, (g) penampak bercak DPPH 0,2%.



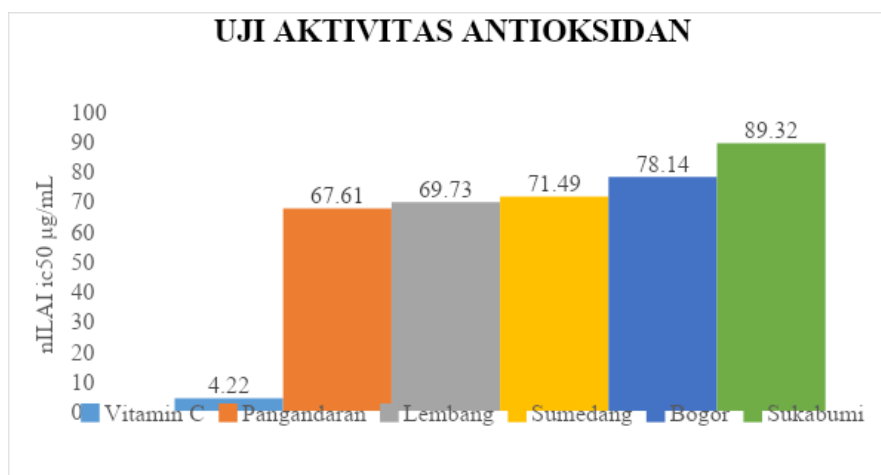
Gambar 4. Kromatogram lapis tipis ekstrak etanol herba pegagan, fase diam silika gel F_{254} nm, fase gerak polar yaitu Etil asetat:Asam format:Air (8:1:1). (1) herba pegagan daerah Lembang, (2) ekstrak etanol daerah Bogor, (3) ekstrak etanol daerah Pangandaran, (4) ekstrak etanol daerah sumedang, (5) ekstrak etanol daerah Sukabumi. (a) sinar tampak, (b) sinar UV 254 nm, (c) sinar UV 366 nm, (d) penampak bercak H_2SO_4 10%, (e) penampak bercak $AlCl_3$ 5%, (f) penampak bercak $FeCl_3$ 10%, (g) penampak bercak DPPH 0,2%.

Pengujian antioksidan secara kuantitatif, menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan sebelumnya membuat terlebih dahulu beberapa konsentrasi DPPH untuk memilih konsentrasi DPPH yang dapat digunakan untuk pengujian, dimana syarat penggunaan DPPH adalah memiliki absorbansi pada rentang 0,8-1,0.



Gambar 5. Kurva kalibrasi DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

Hasil pengujian aktivitas antioksidan dari herba pegagan pada beberapa daerah di Jawa Barat terlihat pada gambar 6, dimana aktivitas antioksidan paling kuat terdapat pada herba pegagan dari Pangandaran dengan nilai IC_{50} sebesar 67,61 µg/mL.



Gambar 6. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak herba pegagan

Pembahasan

Sampel yang digunakan berupa herba pegagan dari daerah yang berbeda di Jawa Barat yaitu Sumedang, Sukabumi, Pangandaran, Lembang dan Bogor. Herba yang sudah dirajang, dilakukan pengeringan dengan menggunakan lemari pengering dengan suhu 50°C. Tujuan dari dilakukan pengeringan adalah untuk menghilangkan atau mengurangi kandungan air dari dalam sampel. Kemudian sampel dilakukan penyerbukkan menggunakan grinder untuk memperkecil ukuran partikel.

Sebagaimana hasil karakterisasi simplisia pada Tabel 1, terlihat ciri khas dari masing-masing sampel herba pegagan, dimana terdapat perbedaan dari ukuran herba tersebut, dan pada Tabel 2 terdapat ciri khas secara mikroskopik dari herba pegagan, dimana herba tersebut memiliki ciri khas kristal kalsium oksalat yang berbentuk roset.

Dari hasil penetapan kadar sari Tabel 3, kadar air dan susut pengeringan Tabel 4 dan kadar abu Tabel 5, semua hasil yang didapatkan memenuhi persyaratan pada Farmakope Herbal Indonesia (FHI), syaratnya adalah bahwa kadar ekstrak harus melebihi 15,4% untuk ekstrak larut air dan lebih dari 4,4% untuk ekstrak larut etanol. Untuk penetapan kadar air semua sampel berada di bawah batas maksimal yang ditetapkan yaitu 10% dan susut pengeringan berada diatas kadar air. Tujuan dari kadar air harus dibawah 10% adalah untuk mencegah terjadinya reaksi enzimatik yang dapat mempercepat pertumbuhan bakteri. Untuk hasil penetapan kadar abu total semua sampel berada dibawah batas yaitu 11,6%, dimana pengujian ini bertujuan untuk melihat kandungan mineral dalam sampel tersebut.

Hasil penapisan fitokimia ditunjukkan oleh Tabel 6, dimana kelima sampel positif mengandung flavonoid, dimana flavonoid adalah senyawa yang diduga memiliki khasiat sebagai antioksidan.¹⁶

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode perendaman dengan pelarut etanol 96% untuk mengurangi kemungkinan kerusakan senyawa yang terdapat dalam sampel herba pegagan akibat panas. Hasil dari ekstraksi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan ekstrak kental ditimbang kemudian dihitung nilai rendemen sesuai pada Tabel 7.

Aktivitas antioksidan dievaluasi secara kualitatif dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk mengidentifikasi kemampuan antioksidan dalam ekstrak menggunakan penampak bercak spesifik DPPH 0,2% dan $AlCl_3$ 5% untuk melihat ada tidaknya kandungan senyawa antioksidan dan flavonoid pada ekstrak.

Bercak H_2SO_4 adalah penampakan universal yang dapat digunakan untuk mendeteksi sebagian besar senyawa, dan $FeCl_3$ untuk melihat golongan fenolat. Pemantauan ini menggunakan pengembang yang berbeda dari masing-masing kepolaran untuk melihat senyawa-senyawa yang aktif sebagai antioksidan sesuai kepolarannya. Bercak yang dilihat adalah bercak yang memiliki fluoresensi ketika dilihat dibawah lampu UV 366 nm seperti yang terlihat pada Gambar 2, Gambar 3, dan Gambar 4.

Pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif pada ekstrak herba pegagan menggunakan metode DPPH melibatkan penggunaan nilai Inhibition Concentration (IC_{50}) sebagai parameter untuk mengukur kemampuan senyawa uji dalam meredam radikal bebas hingga 50%. Senyawa dengan aktivitas antioksidan yang tinggi akan memiliki nilai IC_{50} yang rendah. Pengujian dimulai dengan optimasi panjang gelombang DPPH dalam rentang 200-800 nm. Panjang gelombang optimum yang diperoleh adalah 516 nm dalam pelarut metanol, sesuai dengan literatur yang menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum untuk DPPH terletak antara 515-520 nm.¹⁷ Pengukuran absorbansi selanjutnya akan dilakukan pada Panjang gelombang tersebut. Kemudian, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi larutan DPPH dengan tujuan untuk menunjukkan hubungan linear antara absorbansi larutan dan konsentrasi larutan DPPH. Selain itu kurva kalibrasi bertujuan untuk menentukan konsentrasi larutan stock DPPH yang digunakan. Seri konsentrasi yang dibuat adalah 50, 60, 70, 80, dan 100 $\mu g/mL$ yang dilarutkan dalam metanol. Setiap konsentrasi diambil sebanyak 1 mL dan dicampur dengan 1 mL metanol, kemudian diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap dan pada suhu kamar guna menghindari terjadinya penguraian pada larutan DPPH, kemudian absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer sinar tampak.¹⁸ Kurva kalibrasi larutan DPPH pada gambar 11 menghasilkan regresi linear $y = 0,0093 + 0,014x$ dengan kuadrat koefisien korelasi (R^2) 0,9919 dengan panjang gelombang puncak larutan DPPH adalah 516 nm pada konsentrasi 70 $\mu g/mL$. Kurva kalibrasi yang dihasilkan menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi DPPH, semakin tinggi nilai absorbansinya. Maka dipilih konsentrasi 70 $\mu g/mL$ sebagai larutan stok DPPH untuk melanjutkan pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak herba pegagan dari kelima daerah yang berbeda dan Asam askorbat (Vitamin C). Pada tahap berikutnya, aktivitas antioksidan sampel diukur dengan menginkubasi sampel bersama larutan DPPH (1:1) yang dilakukan di tempat gelap, dilapisi dengan alumunium foil dan tertutup rapat, untuk menghindari terurainya larutan DPPH karena mudah teroksidasi. Setelah sampel direaksikan dengan larutan DPPH, inkubasi dilakukan selama 30 menit, pada saat ini terjadi reaksi pendonoran proton yang berasal dari sampel yang memiliki aktivitas antioksidan. Setiap pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali untuk melihat akurasi dan presisinya. Perubahan warna terjadi karena sampel awalnya berwarna ungu berubah menjadi kuning, kemudian diukur pada panjang gelombang 516 nm. Aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan nilai IC_{50} (konsentrasi inhibisi 50%) berdasarkan persamaan regresi linier ($y = bx + a$), yang menghubungkan konsentrasi sampel ($\mu g/mL$) dengan persentase inhibisi. "y" merupakan nilai perendaman 50% (%inhibisi) sedangkan "x" merupakan hasil IC_{50} yang dimana IC_{50} adalah parameter untuk menunjukan aktivitas antioksidan.¹⁹ Pada pengujian aktivitas antioksidan, kontrol positif menggunakan Asam askorbat (Vitamin C) diuji dengan langkah yang serupa.

Berdasarkan data pada Gambar 6 didapatkan hasil nilai IC_{50} dari kelima sampel setelah dirata-ratakan dari tiga kali pengulangan. Hasil hitungan menunjukan nilai rata-rata IC_{50} dari ketiga percobaan didapatkan nilai rata-rata untuk ekstrak herba pegagan Pangandaran sebesar 67,61 $\mu g/mL$, untuk ekstrak dari Lembang dengan nilai IC_{50} sebesar 69,73 $\mu g/mL$, lalu untuk ekstrak pegagan dari sumedang sebesar 71,49 $\mu g/mL$, untuk ekstrak dari Bogor sebesar 78,14 dan untuk ekstrak dari daerah sukabumi yaitu 89,32 $\mu g/mL$. Hasil vitamin C sebagai kontrol positif memiliki nilai IC_{50} sebesar 4,22

$\mu\text{g/mL}$. Semuanya dilakukan tiga kali pengulangan dengan nilai SD <2%. Antioksidan dianggap sangat kuat jika nilai IC_{50} -nya kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, kuat jika nilai IC_{50} -nya antara 50-100 $\mu\text{g/mL}$, lemah jika nilai IC_{50} -nya antara 100-150 $\mu\text{g/mL}$, dan sangat lemah jika nilai IC_{50} -nya antara 150-200 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil yang diperoleh ekstrak herba pegagan dari kelima daerah termasuk kedalam kategori kuat sebagai penangkal radikal bebas karena nilai IC_{50} yang didapatkan ada dalam rentang 50-100 $\mu\text{g/mL}$. Sementara itu, vitamin C sebagai kontrol positif diklasifikasikan sebagai antioksidan yang sangat kuat karena memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$. Semakin rendah nilai IC_{50} yang diperoleh, semakin besar kemampuan dalam meredam radikal bebas. Dari data tersebut, terlihat bahwa aktivitas antioksidan ekstrak herba pegagan dari Pangandaran lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak pegagan dari daerah lainnya. Hal ini dikarenakan beberapa faktor yang dapat mempengaruhi kualitas dari tanaman pegagan di daerah tersebut, salah satunya yaitu faktor ketinggian tempat tumbuh herba pegagan. Hasil yang didapatkan sama dengan penelitian sebelumnya⁷ menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol herba pegagan masuk dalam kategori yang kuat, dengan nilai IC_{50} sebesar 78,26 ppm.

Kesimpulan

Dari kelima ekstrak herba pegagan nilai IC_{50} dari yang paling rendah yaitu dari daerah Pangandaran sebesar 67,611 $\mu\text{g/mL}$, kemudian Lembang 69,73 $\mu\text{g/mL}$, Sumedang 71,49 $\mu\text{g/mL}$, Bogor 78,14 $\mu\text{g/mL}$ dan Sukabumi yaitu 89,324 $\mu\text{g/mL}$. Penetapan standarisasi dari simplisia herba pegagan (*Centella asiatica* L.Urb) Lembang, Bogor, Pangandaran, Sumedang, dan Sukabumi telah memenuhi persyaratan berdasarkan Farmakope Herbal Indonesia.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Kemendikbud RI yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah Penelitian Dosen Pemula (PDP) tahun 2022 dengan nomor SK 032/E5/PG.02.00/2022 dan terima kasih kepada Universitas Bhakti Kencana yang telah menyediakan sarana untuk melakukan penelitian berupa ruangan laboratorium dan peralatan.

Daftar Pustaka

1. Jabbar A, Wahyuni W, Malaka MH, Apriliani A. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol buah, daun, batang dan rimpang pada tanaman Wualae (*Etilingera elatior* (Jack) R.M Smith). *J Farm Galen (Galenika J Pharmacy)*. 2019;5(2):189–97.
2. Badarinath A V, Rao KM, Madhu C, Chetty S, Ramkanth S, Rajan TVS, et al. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *Int J PharmTech Res*. 2010;2(2):1276–85.
3. Alim N, Jummah N, Pratama AS, Nurdiyanti N. Skirining fitokimia ekstrak etanol kulit buah sirsak (*Annona muricata* Linn) dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. *Sasambo J Pharm*. 2021;2(2):60–4.
4. Tristantini D, Ismawati A, Pradana BT, Jonathan JG. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada daun tanjung (*Mimusops elengi* L). *Semin Nas Tek Kim Kejuangan*". 2016;1–7.
5. Sutardi S. Kandungan bahan aktif tanaman pegagan dan khasiatnya untuk meningkatkan sistem imun tubuh. *J Penelit dan Pengemb Pertan*. 2017;35(3):121–30.
6. Widyani M, Ulfa M, Wirasisya DG. Efek penghambatan radikal bebas infusa dan ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) dengan metode DPPH. *J Pijar Mipa*. 2019;14(1):100–6.

7. Yahya MA, Nurrosyidah IH. Antioxidant activity ethanol extract of gotu kola (*Centella asiatica* (L.) Urban) with DPPH method (2,2-Diphenyl-1-Pikrilhidrazil). *J Halal Prod Res.* 2020;3(2):106–12.
8. Utami YP, Umar AH, Syahrani R, Kadullah I. Standardisasi simplisia dan ekstrak etanol daun leilem (*Clerodendrum*). *J Pharm Med Sci.* 2017;2(1):32–9.
9. Rahmaniati M A, Ulfah M, Mulangsari DAK. Standarisasi parameter non spesifik ekstrak etanol daun pegagan (*Centella asiatica* L.) di dua tempat tumbuh. *J Inov Tek Kim.* 2018;3(1):67–71.
10. Leliqia NPE, Harta IKG, Saputra AABY, Sari PMNA, Laksmani NPL. Aktivitas antioksidan kombinasi fraksi metanol virgin coconut oil dan madu kele bali dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). *JPSCR J Pharm Sci Clin Res.* 2020;5(2):84–96.
11. Rakhmawati MD, Marfu'ati N. Pembuatan simplisia dan teknik penyiapan obat tradisional jahe merah dan daun pepaya untuk standardisasi dosis. *Berdikari J Inov dan Penerapan Ipteks.* 2023;11(1):12–24.
12. Depkes RI. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. Edisi IV. Departement Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta; 2000.
13. Kemenkes RI. Farmakope herbal indonesia. Pills and the Public Purse. 2017;
14. Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. Vol. 55, *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1966. p. 245–69.
15. Djoko W, Taurhesia S, Djamil R, Simanjuntak P dkk. Standardisasi ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica*). *Sainstech Farma.* 2020;13(2):59–64.
16. Syawal AN, Laeliocattleya RA. Potensi teh herbal rambut jagung (*Zea mays* L.) sebagai sumber antioksidan: kajian pustaka. *J Ilmu Pangan dan Has Pertan.* 2020;4(1):1–6.
17. Molyneux P. The use of the stable free radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar J Sci Technol.* 2004;26(December 2003):211–9.
18. Kaligis AY, Yudistira A, Rotinsulu H. Uji aktivitas antioksidan alga *Halimeda opuntia* dengan metode DPPH [1,1-difenil-2-pikrilhidrazil]. *PHARMACON.* 2020;9(1):1–7.
19. Parwati NKF, Napitupulu M, Diah AWM. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) dengan 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) menggunakan spektrofotometer Uv-vis. *J Akad Kim.* 2014;3(4):206–13.