

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Identifikasi terhadap kebenaran bahan penelitian dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tanggal 25 Mei 2022 dengan nomor 088/S.Tb./V/2022. Hasil identifikasi tanaman menunjukkan bahwa sampel penelitian yang digunakan adalah daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) varietas putih, hasil dapat dilihat pada Lampiran 2.

Klasifikasi tanaman

Divisi : Tracheophyta
Subdivisi : Spermatophytina
Kelas : Mangnoliopsida
Super Ordo : Rosanae
Ordo : Myrtales
Familia : Myrtaceae
Genus : *Psidium*
Species : *Psidium guajava* L.
Nama lokal : Jambu biji

2. Pembuatan simplisia

Daun jambu biji yang digunakan pada penelitian ini diambil pada bulan Mei 2022 dari Dusun 3 Munggangsari, Grabag, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah sebanyak 5 kg, diambil pada pagi hari. Pemilihan daun yang digunakan adalah bagian pucuk nomor 5 sampai 10. Daun jambu biji disortasi basah yaitu dengan dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel pada daun dengan air mengalir.

Daun jambu biji kemudian dikeringkan dengan tujuan untuk menghindari kerusakan sampel karena adanya pertumbuhan mikroorganisme dan supaya sampel tidak mudah rusak jika disimpan dalam jangka waktu yang cukup lama. Daun jambu biji dikeringkan menggunakan *oven* selama 3 hari pada suhu 50°C, penggunaan suhu 50°C untuk mencegah rusaknya senyawa flavonoid. Daun jambu biji yang telah kering kemudian dilakukan penyerbukan menggunakan grinder, tujuannya untuk memperkecil ukuran partikel simplisia sehingga luas permukaan partikel menjadi besar dan cairan penyari akan mudah melarutkan senyawa aktif dari simplisia tersebut. Penyerbukan selesai kemudian sampel diayak dengan ayakan berukuran 40 mesh untuk mendapatkan ukuran yang seragam. Hasil dari keseluruhan pengayakan didapatkan sebanyak 960 gram serbuk.

Pelarut yang digunakan adalah pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda dimana etanol dengan nilai polaritas 5,2; etil asetat dengan nilai polaritas 4,4 dan *n*-heksan dengan nilai polaritas 0,1. Hasil serbuk daun jambu biji yang dihasilkan kemudian diekstraksi dengan metode maserasi. Mekanisme metode maserasi adalah adanya perbedaan senyawa yang ditarik dari masing-masing pelarut berdasarkan prinsip *like dissolve like* yaitu pelarut polar akan melarutkan senyawa-senyawa polar sedangkan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar (Simorangkir dkk., 2019).

Serbuk daun jambu biji ditimbang masing-masing sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan ke dalam toples untuk direndam, menggunakan perbandingan (1:10) dengan jumlah pelarut 3 liter lalu diaduk, ditutup rapat dan didiamkan pada tempat gelap. Pengadukan dilakukan setiap 6 jam sekali, didiamkan pada tempat gelap selama 3 hari dan terhindar dari cahaya matahari agar senyawa antioksidan tidak rusak terkena sinar. Proses selanjutnya filtrat disaring untuk dipisahkan dengan maseratnya

menggunakan kain mori kemudian dilakukan remaserasi dalam waktu 24 jam dengan jumlah pelarut 1,5 liter, dengan tujuan untuk menarik senyawa aktif lebih maksimal sehingga dapat diperoleh ekstrak yang lebih banyak.

Seluruh hasil dari maserasi dan remaserasi kemudian digabungkan, dan disaring menggunakan kain mori. Hasil tersebut kemudian dipekatkan menggunakan kompor listrik. Selama proses pemekatan dipastikan suhu kurang dari 50°C dengan menggunakan termometer agar senyawa yang terkandung dalam sampel tidak rusak. Hasil ekstraksi daun jambu biji berupa ekstrak kental dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Ekstraksi Ekstrak Etanol, Etil asetat dan n-Heksan Daun Jambu Biji

Ekstrak kental daun jambu biji yang diperoleh sebanyak 142,64 gram pada ekstrak etanol, 18,58 gram pada ekstrak etil asetat dan 8,1 gram pada ekstrak n-heksan. Ekstrak kental tersebut kemudian dihitung nilai rendemennya.

Rendemen ekstrak kental yang diperoleh dihitung sebagai presentase perbandingan antara berat ekstrak kental yang dihasilkan terhadap berat serbuk yang digunakan dalam proses maserasi. Pada penelitian ini, hasil rendemen daun jambu biji ekstrak etanol diperoleh sebesar 47,546%, pada ekstrak etil asetat 6,193% dan pada ekstrak n-heksan 2,7%.

Dari hasil rendemen tersebut hanya ekstrak etanol yang memenuhi syarat yakni nilai rendemennya lebih dari 12,3% (Kemenkes, 2017). Hasil rendemen dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Rendemen Simplisia Daun Jambu Biji

No	Bahan tanaman	Bobot daun jambu biji basah (kg)	Bobot serbuk daun jambu biji (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
1.	Ekstrak etanol	5	300	142,64	47,546 *
2.	Ekstrak etil asetat		300	18,58	6,193 **
3.	Ekstrak n-heksan		300	8,1	2,7 **

Keterangan :

(*) : Rendemen memenuhi syarat lebih dari 12,3%

(**) : Rendemen tidak memenuhi syarat kurang dari 12,3%

3. Penentuan susut pengeringan

Penentuan susut pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*, dengan tujuan untuk mengetahui batas maksimal dari banyaknya senyawa yang telah hilang pada saat proses pemanasan menggunakan suhu tertentu. Hasil susut yang diperoleh telah memenuhi syarat susut pengeringan yaitu tidak boleh lebih dari 10% (Kemenkes, 2017). Hasil dari susut pengeringan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Susut Pengeringan Tiap Ekstrak

No	Bahan tanaman	Susut pengeringan (%)
1.	Ekstrak etanol daun jambu biji	7,3 (memenuhi syarat)
2.	Ekstrak etil asetat daun jambu biji	8,1 (memenuhi syarat)
3.	Ekstrak n-heksan daun jambu biji	7,6 (memenuhi syarat)

4. Uji Organoleptik

Uji organoleptik bertujuan untuk mengidentifikasi secara objektif terhadap ekstrak yang didapat. Pengujian berupa bau, warna, rasa, dan tekstur. Hasil uji organoleptik pada ketiga ekstrak didapatkan bau khas daun jambu biji, rasa kelat, memiliki tekstur kental serta warna coklat kehitaman pada ekstrak etil asetat dan n-heksan sedangkan pada ekstrak etanol dengan warna coklat kehijauan. Hasil uji organoleptik dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Karakteristik Ekstrak Daun Jambu Biji

Parameter	Hasil karakteristik ekstrak daun jambu biji		
	Etanol	Etil asetat	n-heksan
Warna	Coklat kehijauan	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman
Tekstur	kental	kental	kental
Bau	Khas daun jambu biji	Khas daun jambu biji	Khas daun jambu biji
Rasa	kelat	kelat	kelat

5. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui secara kualitatif senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak daun jambu biji. Berdasarkan hasil pengamatan skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 6. Hasil skrining menunjukkan pada ekstrak etanol mengandung flavonoid, alkaloid, fenolik, terpenoid, tanin dan saponin, sedangkan ekstrak etil asetat dan n-heksan tidak mengandung flavonoid dan saponin.

Pada pengujian alkaloid menggunakan 3 pereaksi yaitu Mayer, Wagner dan Dragendroff. Penambahan pereaksi Mayer menunjukkan hasil positif jika terdapat endapan putih. Pada ketiga sampel ekstrak yang diuji tidak terapat endapan putih, maka hasil dikatakan negatif. Penambahan pereaksi Wagner menunjukkan hasil positif jika terjadi perubahan warna menjadi merah bata, pada ketiga ekstrak sampel yang diuji terjadi perubahan warna menjadi merah bata maka hasil dikatakan positif. Penambahan pereaksi Dragendroff menunjukkan hasil positif jika terdapat endapan berwarna jingga, pada ketiga ekstrak sampel hanya terjadi perubahan warna tetapi tidak terdapat endapan jingga, maka hasil dikatakan negatif.

Pada pengujian flavonoid dikatakan positif apabila terjadi perubahan berwarna merah, kuning atau jingga. Hasil dari pengujian ekstrak etanol, positif mengandung flavonoid karena terjadi perubahan berwarna merah. Penambahan serbuk magnesium dan HCl pada pengujian flavonoid akan

menyebabkan tereduksinya senyawa flavonoid yang ada sehingga menimbulkan reaksi warna merah yang merupakan ciri adanya flavonoid. Sedangkan pada ekstrak etil asetat dan *n*-heksan tidak terjadi perubahan warna, maka hasil dikatakan negatif. Hal ini bisa dikarenakan senyawa flavonoid pada ekstrak tidak tereduksi sempurna pada magnesium dan HCl sehingga tidak menghasilkan perubahan warna yang menyatakan mengandung flavonoid.

Pada pengujian saponin dilakukan dengan pengocokan selama 10 detik, hasil positif apabila terdapat adanya buih. Hasil pengujian pada ekstrak etanol terdapat adanya buih setinggi 3 cm maka dikatakan positif. Sedangkan pada ekstrak etil asetat dan *n*-heksan tidak terdapat buih, maka hasil dikatakan negatif.

Pada pengujian tanin dilakukan dengan mendidihkan ekstrak daun jambu biji kemudian diberi FeCl_3 . Hasil pengujian dikatakan positif apabila terjadi perubahan warna menjadi hijau pekat. Pada ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan yang diuji dihasilkan perubahan warna menjadi hijau pekat maka hasil dikatakan positif.

Pada pengujian terpenoid dilakukan dengan menambahkan asam asetat glasial. Hasil pengujian dikatakan positif apabila terjadi perubahan warna menjadi hijau. Pada uji ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan terjadi perubahan warna hijau maka hasil dikatakan positif.

Tabel 6. Hasil Pengamatan Uji Fitokima

No	Senyawa aktif	Hasil ekstrak daun jambu biji			Keterangan
		Etanol	Etil asetat	<i>n</i> -heksan	
	Alkaloid				
1.	-wagner	+	+	+	Terdapat endapan coklat kehitaman
	-Mayer	-	-	-	Tidak terdapat endapan putih
	-Dragendroff	-	-	-	Tidak terdapat endapan merah bata
2.	Flavonoid	+	-	-	Terdapat warna merah pada ekstrak etanol namun tidak pada ekstrak etil asetat dan <i>n</i> -heksan
3.	Fenolik	+	+	+	Terjadi warna hijau kehitaman
4.	Steroid/ Terpenoid	+	+	+	Terdapat warna hijau
5.	Tanin	+	+	+	Terjadi perubahan warna hijau kehitaman pada ekstrak etanol, etil asetat dan <i>n</i> -heksan
6.	Saponin	+	-	-	Pada ekstrak etanol karena terdapat busa ≤ 2 cm dan pada ekstrak etil asetat dan <i>n</i> -heksan karena tidak terjadi perubahan warna dan buih

6. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

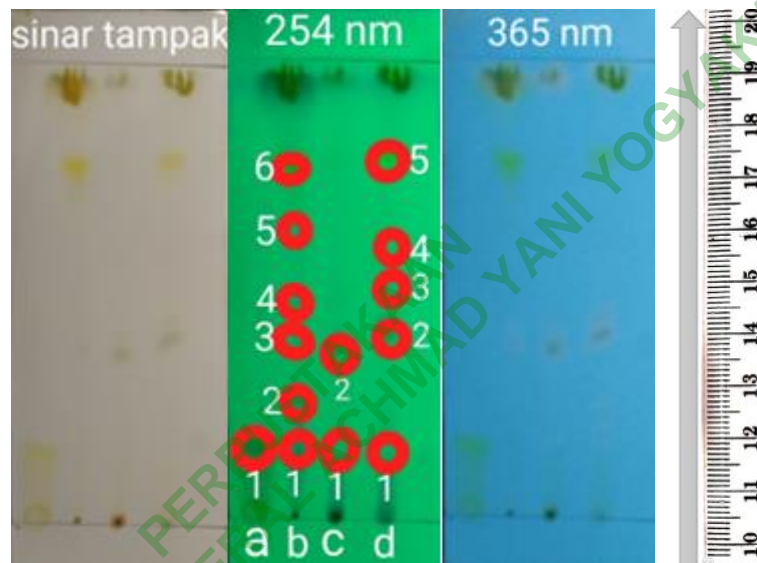
Uji kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mengetahui secara kualitatif senyawa yang terkandung dalam ekstrak (etanol, etil asetat dan *n*-heksan) daun jambu biji. Prinsip kerja KLT yaitu pemisahan komponen kimia yang ditentukan oleh fase gerak dan fase diam. Fase diam yang digunakan pada penelitian ini adalah plat silika gel 60 GF₂₅₄ yang memiliki sifat polar, dibuat sepanjang 10 cm dan lebar 4 cm diberi garis atas dan bawah 1 cm. Plat silika gel dioven selama 3 menit dengan suhu 100°C yang bertujuan untuk menghilangkan air yang terkandung dalam plat.

Proses KLT diawali dengan optimasi fase gerak, hasil optimasi dapat dilihat pada Tabel 7. Optimasi dilakukan untuk mengetahui fase gerak optimal yang dapat memisahkan dengan baik dan menimbulkan bercak. Hasil optimasi yang paling optimal adalah campuran kloroform : metanol : *n*-heksan dengan perbandingan (9:1:1) karena pada fase gerak tersebut menghasilkan pemisahan senyawa yang baik, standar kuersetin naik dan terlihat noda pada ketiga ekstrak daun jambu biji. Penjenuhan fase gerak dilakukan dengan cara mengisi bejana dengan fase gerak, kemudian bejana yang telah terisi fase gerak ditutup rapat agar seluruh permukaan terisi uap fase gerak. Kertas saring dimasukkan ke dalam bejana sebagai indikator kejenuhan. Basahnya kertas saring oleh fase gerak menunjukkan bejana telah jenuh. Dilakukan penotolan sampel dan standar menggunakan *white tip*.

Dimasukkan plat KLT yang telah dilakukan penotolan sampel dan standar menggunakan *white tip* kedalam bejana, kemudian ditutup agar eluen tidak menguap dan proses elusi berjalan baik. Setelah mencapai batas atas plat KLT diambil dan diangin-anginkan kemudian dilihat bercak dibawah sinar UV 254 nm dan 365 nm. Noda flavonoid ditandai dengan warna kuning atau hijau lembayung (Triana, 2017).

Tabel 7. Optimasi Fase Gerak Menggunakan Berbagai Macam Fase Gerak

No	Fase Gerak	Hasil
1.	Metanol : kloroform (9:7)	Sampel konsentrasi 10%, terlihat noda pada ketiga sampel ekstrak, kuersetin tidak ikut naik
2.	Metanol : kloroform : <i>n</i> -heksan (1:9:1)	Terjadi pemisahan senyawa, kuersetin naik, terlihat noda pada ketiga ekstrak



Keterangan:

- a : Standar Kuersetin
 b : Ekstrak Etanol
 c : Ekstrak Etil asetat
 d : Ekstrak *n*-heksan
 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 : Bercak senyawa

Gambar 6. Bercak Ekstrak Etanol, Etil asetat, *n*-Heksan dan Standar Kuersetin dengan Fase Gerak Kloroform:Metanol:*n*-Heksan (9:1:1) Setelah Disemprot AlCl_3

Hasil identifikasi secara kualitatif senyawa flavonoid pada sampel ekstrak (etanol, etil asetat, *n*-heksan) dengan pereaksi semprot AlCl_3 . Perbandingan hasil dari sebelum disemprot pereaksi AlCl_3 bercak terlihat namun masih belum terlihat jelas, sedangkan setelah disemprot pereaksi AlCl_3 hasil bercak terlihat lebih jelas, tajam dan lebih intensif, untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 6. Pada ekstrak etanol terdapat 6

bercak, ekstrak etil asetat 2 bercak, *n*-heksan 5 bercak sedangkan pada perbandingan kuersetin didapatkan 1 bercak yang jelas. Pada ekstrak etanol (bercak 1), etil asetat (bercak 1) dan *n*-heksan (bercak 1) terlihat bercak kuning yang sejajar dengan kuersetin pada sinar UV 254 nm. Hasil ini menunjukkan pada ketiga ekstrak memiliki kandungan yang mirip dengan standar kuersetin.

Hasil perhitungan Rf dapat dilihat pada Tabel 8. Nilai Rf merupakan perbandingan jarak yang ditempuh eluen dan fase gerak pada plat KLT. Dari hasil yang didapat Rf kuersetin, ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan adalah 0,313. Nilai Rf yang didapatkan sudah cukup baik karena berdasarkan literatur syarat nilai Rf yang baik adalah 0,2-0,8. Nilai Rf ketiga sampel juga menunjukkan nilai yang sama dengan standar kuersetin, hal ini mempertegas bahwa didalam ketiga sampel mengandung senyawa yang sama pada standar kuersetin yaitu senyawa flavonoid.

Tabel 8. Nilai Rf yang Didapatkan

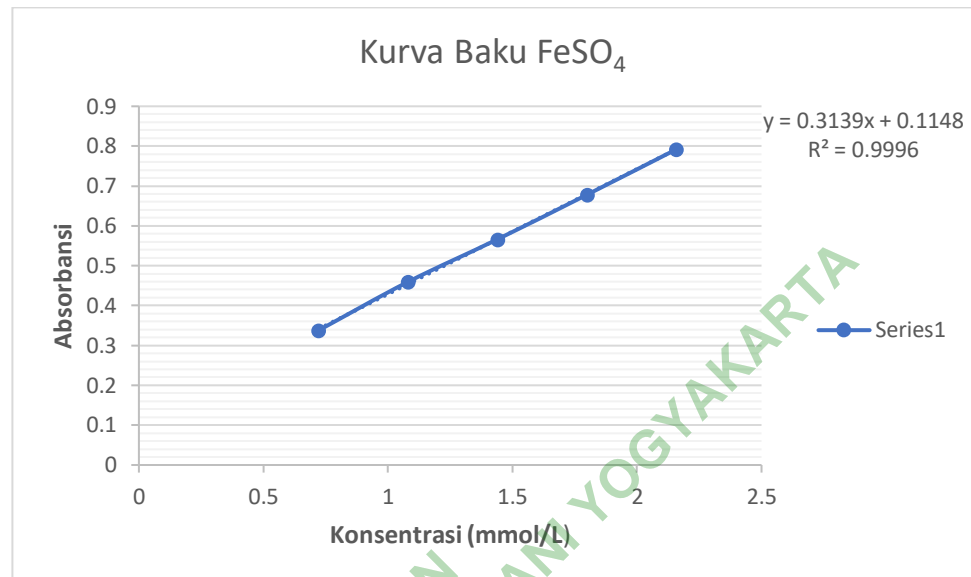
Kuersetin			Etanol		Etil asetat		<i>n</i>-heksan	
Spot	Rf	Teori (Tammy Mulia Dewi, 2015)	Spot	Rf	Spot	Rf	Spot	Rf
1	0.313	0.2-0.8	1	0.313	1	0.313	1	0.313
			2	0.375	2	0.5	2	0.513
			3	0.5			3	0.55
			4	0.625			4	0.637
			5	0.775			5	0.913
			6	0.913				

7. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode FRAP yang mana prinsipnya mengukur kemampuan antioksidan suatu bahan yang dapat menghantarkan elektron, sehingga terjadi reaksi reduksi kompleks Fe (III)- tripiridiltriazin (TPTZ) yang tidak berwarna menjadi kompleks Fe (II)-TPTZ yang berwarna biru yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis (Marraskuranto dkk., 2021). Penentuan aktivitas antioksidan pada penelitian ini terlebih dahulu dilakukan dengan cara penentuan panjang gelombang dan *operating time*.

a. Penentuan kurva kalibrasi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Penentuan aktivitas antioksidan dalam penelitian ini menggunakan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai kurva kalibrasi karena sudah umum digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan dengan metode FRAP. Penetapan aktivitas antioksidan pada sampel dinyatakan dalam ekivalensi Fe (II) yang berarti konsentrasi larutan sampel yang menghasilkan absorbansi setara dengan absorbansi yang dihasilkan 1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Hasil kurva kalibrasi konsentrasi (mmol/L) terhadap absorbansi $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil kurva kalibrasi konsentrasi (mmol/L) terhadap absorbansi FeSO₄.7H₂O

Berdasarkan hasil kurva kalibrasi persamaan regresi linier tersebut diperoleh hasil yaitu $y = 0,3139x + 0,1148$ dengan nilai $r = 0,9996$. Hasil kurva kalibrasi tersebut selanjutnya dihitung konsentrasi sampel dengan cara rata-rata absorbansi dikurangi dengan nilai intersep (a) yaitu 0,1148 dan dibagi dengan nilai slope (b) yaitu 0,3139. Setelah didapatkan nilai konsentrasi sampel selanjutnya dilakukan perhitungan parameter dalam penentuan aktivitas antioksidan yaitu FRAP value. Perhitungan FRAP value dilakukan dengan konsentrasi sampel yang diperoleh dikalikan dengan volume cuplikan yang digunakan serta faktor pengenceran kemudian dibagi dengan berat sampel yang digunakan dalam miligram.

b. Penentuan aktivitas antioksidan pada sampel

Penentuan aktivitas antioksidan pada sampel dilakukan dalam lima seri konsentrasi yang kemudian hasilnya diplotkan juga ke dalam persamaan regresi linear dari larutan standar FeSO₄.7H₂O.

Setelah hasil konsentrasi didapatkan kemudian dimasukkan kedalam rumus perhitungan FRAP *value*. Hasil penentuan konsentrasi sampel dan FRAP *value* dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Penetapan Konsentrasi dan FRAP value Sampel Ekstrak Etanol, Etil asetat dan n-Heksan Daun Jambu Biji

Sampel	Absorbansi/replikasi			Purata±RSD	FRAP value (mmol/g sampel)
	1	2	3		
Kuersetin (12 ppm)	0,429	0,430	0,428	0,429±0,001	166,865
Ekstrak etanol (12 ppm)	0,372	0,371	0,379	0,374±0,004	137,675
Ekstrak etil asetat (12 ppm)	0,341	0,340	0,345	0,342±0,002	120,691
Ekstrak n-heksan (12 ppm)	0,332	0,331	0,335	0,333±0,002	115,737

Berdasarkan hasil pada Tabel 9, dapat dilihat bahwa FRAP *value* yang diperoleh menunjukkan pada ekstrak etanol lebih tinggi dari pada ekstrak etil asetat dan n-heksan. Hasil ini juga dilihat dari warna larutan uji FRAP sampel yang menunjukkan kepekatan warna biru yang berbeda. Semakin pekat warna biru yang dihasilkan pada larutan uji maka konsentrasi sampel dan FRAP *value* akan semakin meningkat sehingga aktivitas antioksidan semakin kuat. Digunakannya konsentrasi yang paling kecil dikarenakan ada pembagian dengan factor pengenceran, dimana F_p yang semakin besar jika konsentrasinya memakai yang terkecil dan pengalinya makin besar maka hasil FRAP *value* juga naik maka semakin bagus.

8. Analisis data

Uji homogenitas data dilakukan dengan menggunakan *Levene's* untuk mengetahui data sampel homogen atau tidaknya, sedangkan uji distribusi data dilakukan dengan menggunakan *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data sampel terdistribusi normal atau tidak. Hasil yang diperoleh pada uji homogenitas dan distribusi data pada keempat sampel (kuersetin, ekstrak

etanol, etil asetat dan n-heksan daun jambu biji) menunjukkan data homogen dengan nilai 0,519 serta terdistribusi normal yang ditandai dengan nilai signifikansi pada kuersetin 0,295; ekstrak etanol 0,457; ekstrak etil asetat 0,241; ekstrak n-heksan 0,820. Selanjutnya dilakukan uji statistik dengan menggunakan *One Way Anova* yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan pada keempat sampel. Dilakukan menggunakan uji *One Way Anova* karena jumlah sampel yang akan diuji lebih dari 2 kelompok sampel. Hasil yang diperoleh pada uji *One Way Anova* untuk keempat sampel (kuersetin, ekstrak etanol, etil asetat dan n-heksan daun jambu biji) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada masing-masing sampel yang ditandai dengan nilai signifikansi 0,048. Uji lanjutan dilakukan dengan *Post Hoc Test* menggunakan *Tukey Test*, untuk membandingkan kelompok manakah yang berbeda atau berpengaruh antara sifat pelarut pada ekstrak daun jambu biji.

Hasil uji *post hoc test* apabila diperoleh nilai yang berada pada kolom subset yang berbeda maka setiap perlakuan diartikan memiliki efek yang berbeda atau berbeda bermakna (signifikan), sedangkan jika hasil yang didapatkan pada kolom subset yang sama maka artinya empat kelompok perlakuan tersebut memiliki efek yang sama. Hasil yang didapatkan pada Lampiran 7 terlihat bahwa sampel terletak pada kolom subset yang sama sehingga dapat dikatakan bahwa memiliki efek yang sama atau artinya tidak berbeda signifikan antar kelompok.

Tabel 10. Hasil Uji Statistik Ekstrak Daun Jambu Biji

Sampel	Uji normalitas data	Uji homogenitas	One Way Anova	Post Hoc Test
Kuersetin	0,294 *			9,31140***
Ekstrak etanol	0,457 *	0,519 **	0,048 ***	8,26260***
Ekstrak etil asetat	0,241 *			8,68140***
Ekstrak n-heksan	0,820 *			7,04680***

Keterangan :

*: Data terdistribusi normal

**: Data homogen

***: Semua kelompok berbeda signifikan

Berdasarkan Tabel 10, hasil uji statistik kuersetin dan ketiga ekstrak daun jambu biji menunjukkan bahwa pada data homogen dan terdistribusi normal serta terdapat perbedaan yang signifikan pada uji *One Way Anova*.

B. Pembahasan

Penelitian pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun jambu biji menggunakan metode FRAP ini termasuk jenis penelitian eksperimental dengan tujuan untuk melihat seperti apa pengaruh perbedaan jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun jambu biji. Tahap awal dilakukannya penelitian adalah dengan melakukan determinasi tanaman. Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran dari sampel yang digunakan (Sentat dkk., 2016). Kesalahan pengumpulan sampel yang akan diteliti dapat dihindari dengan adanya determinasi ini. Berdasarkan hasil determinasi, dapat dibuktikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah tanaman jambu biji (*P. guajava* L.) varietas putih, dan bagian yang digunakan adalah bagian daun. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 2.

Daun jambu biji yang digunakan sebagai bahan penelitian diperoleh dari Dusun 3, Munggangsari, Grabag, Purworejo, Jawa tengah. Daerah tersebut terletak pada ketinggian 99 mdpl. Daun jambu biji diambil pada pagi

hari dengan tujuan untuk mendapatkan kandungan senyawa aktif yang tinggi, karena jika diambil pada waktu siang tanaman sudah mengalami proses fotosintesis sehingga senyawa aktif yang terkandung kurang optimal (Yuliani dkk., 2015). Pencucian dengan air mengalir dilakukan setelah daun jambu biji diambil, hal ini berfungsi untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel pada sampel selama proses pemanenan sampai proses penyortiran (Kasypiah, 2012). Daun jambu yang digunakan dalam penelitian ini dikeringkan dengan *oven* selama 3 hari pada suhu 50°C, penggunaan suhu 50°C untuk mencegah rusaknya kandungan senyawa yang terdapat didalam sampel (Puspitasari, 2018). Pengeringan sampel juga tidak dilakukan menggunakan sinar matahari langsung agar terhindar dari suhu yang tidak terkontrol, debu dan kotoran lain di udara terbuka. Pengeringan sampel bertujuan untuk menghindari kerusakan sampel karena adanya pertumbuhan mikroorganisme dan supaya sampel tidak mudah rusak jika disimpan dalam waktu yang lama. Sampel dapat dikatakan kering apabila ketika diremas dengan tangan sampel dapat hancur, atau bisa juga dengan mengecek susut pengeringan. Susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batas maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan, menggunakan alat *moisturizer balance* yang dimana nilai susut pengeringan suatu simplisia tidak melebihi dari 10% (Yuniuswoyo dkk., 2021). Dimana hasil yang diuji sebesar 8,10% sudah memenuhi syarat nilai pada susut pengeringan.

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi ini adalah etanol, etil asetat dan *n*-heksan. Secara teori pemilihan pelarut etanol karena perolehan senyawa didasari oleh kesamaan sifat kepolaran, dimana pada pelarut etanol yang bersifat polar mampu mengekstrak senyawa lebih baik. Pada pelarut etil asetat yang memiliki sifat semi polar diharapkan mampu menyari senyawa *xanton* yaitu *α -mangostin* (Pratiwi dkk., 2016), sedangkan pada pelarut *n*-heksan yang memiliki sifat non polar dapat mengekstrak senyawa kimia

seperti lilin, lipid dan minyak yang mudah menguap. Pelarut polar akan menarik senyawa yang bersifat polar, sedangkan pelarut non polar akan menarik senyawa non polar dan pelarut semi polar akan menarik senyawa polar. Penggunaan ketiga pelarut yang berbeda pada proses ekstraksi diharapkan dapat menunjukkan kemampuan dari pelarut dalam menyari kandungan senyawa aktif di dalam sampel yang paling optimal. Hasil ekstraksi yang diperoleh kemudian dihitung dalam nilai rendemen ekstrak. Nilai rendemen tertinggi ditunjukkan pada ekstrak etanol. Hal ini berarti sampel daun jambu biji lebih banyak mengandung senyawa polar, sedangkan ekstrak etil asetat dan *n*-heksan menunjukkan nilai yang lebih rendah. Hal ini menunjukkan senyawa aktif pada ekstrak daun jambu biji relatif larut dalam pelarut polar, yang mana jenis pelarut dan tingkat kepolaran yang digunakan saat mengekstraksi mempengaruhi jumlah senyawa yang tertarik dan mempengaruhi aktivitas antioksidan.

Masing-masing ekstrak dilakukan uji organoleptik untuk mengidentifikasi ciri khas dari ekstrak. Ekstrak daun jambu biji yang dibuat sesuai dengan teori yaitu memiliki bentuk berupa ekstrak kental, warna coklat tua, bau khas dan memiliki rasa kelat (Kemenkes, 2017). Ekstrak yang diperoleh selanjutnya di skrining fitokimia untuk mengetahui adanya kandungan senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, steroid (terpenoid) dan saponin. Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang telah diperoleh menunjukkan pada ekstrak etanol mengandung flavonoid, alkaloid, fenolik, terpenoid, tanin dan saponin. Sedangkan ekstrak etil asetat dan *n*-heksan tidak mengandung flavonoid dan saponin. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh sifat kepolaran dari pelarut yang digunakan. Senyawa metabolit sekunder akan tertarik sempurna jika sifat kepolaran pelarut sama dengan sifat dari golongan senyawa. Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang telah diperoleh pada ketiga ekstrak menunjukan adanya perbedaan kandungan senyawa.

Analisis kualitatif dilanjutkan dengan metode KLT. Pengujian ini untuk mempertegas adanya kandungan flavonoid pada sampel dengan senyawa pembanding kuersetin. Fase diam yang digunakan dalam penelitian ini adalah silika gel 60 GF₂₅₄ yang bersifat polar. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah fase gerak paling optimal dalam proses optimasi yaitu kloroform : metanol : *n*-heksan dengan perbandingan (9:1:1).

Hasil pengamatan pada Gambar 5 dapat dilihat bahwa perolehan beberapa bercak atau noda dari setiap sampel yang menggunakan eluen kloroform : metanol : *n*-heksan (9:1:1) dengan pereaksi penyemprotan AlCl₃ untuk dideteksi dibawah UV 254 nm dan 365 nm. Penggunaan pereaksi AlCl₃ bertujuan untuk menampakkan bercak senyawa flavonoid yang lebih jelas atau intensif ditandai dengan diperolehnya bercak atau noda dengan warna kuning kehijauan, hal ini terjadi karena adanya pembentukan senyawa kompleks (Asmorowati dkk., 2019). Pada ekstrak etanol terdapat 6 bercak, ekstrak etil asetat 2 bercak, *n*-heksan 5 bercak sedangkan pada pembanding kuersetin didapatkan 1 noda yang jelas karena kuersetin merupakan senyawa tunggal.

Menurut (Purniati N dkk., 2015) nilai Rf dari sampel dapat dijadikan sebagai bukti dari hasil identifikasi suatu senyawa. Senyawa dengan nilai Rf yang sama atau mirip dengan standar kuersetin maka menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama. Hasil Rf kuersetin adalah 0,313 sedangkan pada ketiga sampel juga menunjukkan nilai yang sama yaitu 0,313 pada salah satu bercak. Hal ini menunjukkan bahwa pada ketiga sampel mengandung senyawa yang karakteristiknya hampir sama dengan kuersetin.

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang memiliki peran untuk menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh, sehingga dapat menghindari terjadinya kerusakan oksidatif. Pada penelitian ini uji aktivitas antioksidan yang akan dilakukan adalah dengan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Pengukuran aktivitas antioksidan metode FRAP

dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Prinsip penetapan aktivitas antioksidan dengan metode pengujian FRAP yaitu kemampuan antioksidan dalam mereduksi kompleks ferri (Fe_{3+}) dari *ferri-tripyridyl-triazine* (TPTZ) menjadi kompleks *ferro* (Fe^{2+}) yang ditandai dengan perubahan warna menjadi biru (Aryanti Risma dkk., 2021)

Pada penelitian ini digunakan larutan buffer asetat pH 3,6 yang berfungsi untuk melarutkan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ selain itu sebagai pemberi suasana asam. Pengujian dilakukan pada suasana asam (pH 3,6) dengan tujuan untuk menjaga kelarutan dari ion besi yang dapat meningkatkan transfer elektron sehingga mekanisme reaksi akan lebih stabil (Munteanu, 2021). Adanya penambahan TPTZ (*2,4,6-tripyridyl-triazine*) berfungsi untuk mengendapkan kompleks dari kalium ferrosianida, sedangkan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ berfungsi untuk membentuk kompleks warna hijau sampai warna biru (biru berlin). Digunakan larutan $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai larutan standar sehingga hasil yang diperoleh dalam penentuan aktivitas antioksidan dinyatakan dalam mmol/L Fe^{2+} (Selawa dkk., 2013).

Penentuan aktivitas antioksidan pada penelitian ini terlebih dahulu dilakukan dengan cara penentuan panjang gelombang dan *operating time*. Penentuan panjang gelombang dilakukan untuk menentukan hasil absorbansi maksimal pada panjang gelombang tertentu yang nantinya akan digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan dalam penelitian ini. Penentuan panjang gelombang dilakukan pada range 580-610 nm dan diperoleh hasil pada 595 nm. Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengetahui seberapa lama waktu yang dibutuhkan untuk sampel dan reagen FRAP bereaksi dengan maksimal yang ditandai dengan hasil absorbansi tetap atau stabil. Penentuan *operating time* yang dilakukan dengan interval waktu 5 menit, dari menit ke 1 sampai menit ke 45 dan diperoleh hasil *operating time* yaitu pada 30 menit

Penetapan aktivitas antioksidan pada kuersetin dan sampel ekstrak etanol, etil asetat dan n-heksan daun jambu biji dilakukan dengan pengukuran

absorbansi sampel pada lima seri konsentrasi dan tiga kali pembacaan absorbansi untuk setiap satu konsentrasinya. Penentuan aktivitas antioksidan dalam penelitian ini menggunakan standar pembanding kuersetin karena kuersetin merupakan senyawa flavonoid tunggal yang mana sejalan dengan (Amelia dkk., 2012), bahwa didalam daun jambu biji banyak mengandung flavonoid yang memiliki peran sebagai antioksidan. Penentuan aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan FRAP *value* sebagai parameter. FRAP *value* merupakan kemampuan suatu ekstrak yang dianalogikan untuk mereduksi ion besi (Fe^{3+}) menjadi bentuk (Fe^{2+}), sehingga semakin tinggi konsentrasi maka FRAP *value* akan semakin meningkat (Fernandes dkk., 2016). Semakin tinggi FRAP *value* yang dihasilkan menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan daun jambu biji semakin kuat. Kemampuan ketiga ekstrak daun jambu biji dalam mereduksi besi pada reagen FRAP menunjukkan bahwa ekstrak mempunyai kandungan senyawa yang bersifat donor elektron yang dapat bereaksi dengan radikal bebas sehingga dapat menghentikan reaksi berantai dan membuat produk lebih stabil. Berdasarkan hasil yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa adanya kandungan flavonoid dalam daun jambu biji ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan serta pada senyawa fitokimia.

Hasil dari FRAP *value* pada ketiga ekstrak diperoleh nilai paling tinggi pada ekstrak etanol kemudian ekstrak etil asetat dan *n*-heksan. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan oleh sifat kepolaran dari pelarut yang digunakan, dimana etanol merupakan senyawa polar dan menghasilkan nilai FRAP *value* paling tinggi. Senyawa metabolit sekunder akan tertarik sempurna jika sifat kepolaran pelarut sama dengan sifat dari golongan senyawa. Hasil ini juga dilihat dari warna larutan uji FRAP sampel yang menunjukkan kepekatan warna biru yang berbeda. Semakin pekat warna biru yang dihasilkan pada larutan uji maka konsentrasi sampel dan FRAP *value*

akan semakin meningkat sehingga aktivitas antioksidan semakin kuat (Syarif dkk., 2015).

Data yang didapatkan dari hasil analisis menggunakan uji *One Way ANOVA* bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang signifikan antara sifat pelarut pada standar kuersetin, ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan. Hasil analisis statistika aktivitas antioksidan menggunakan *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa pada standar kuersetin, ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan semuanya memberikan nilai signifikan $<0,05$ yaitu dengan nilai 0,000 yang artinya ada perbedaan yang signifikan antar pelarut. Hasil uji *Post Hoc Test* yang didapatkan pada Lampiran 7 terlihat bahwa sampel terletak pada kolom subset yang sama sehingga dapat dikatakan bahwa memiliki efek yang sama atau artinya tidak berbeda signifikan.

UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANINGGARTHA
PERPUSTAKAAN