

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil**

1. Determinasi tanaman

Daun kayu bulan yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Desa Nyemengan RT 04, Kelurahan Tirtonirmolo, Kecamatan Kasihan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan Juni 2022. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada tanggal 16 Juni 2022 dengan nomor 0106/S.Tb./VI/2022. Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 2.

2. Preparasi sampel

Daun kayu bulan sebanyak 2,5 kg dicuci dengan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan kotoran, kemudian dirajang menjadi bagian yang lebih kecil untuk memudahkan proses pengeringan. Selanjutnya daun dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 40°C selama 2 hari. Tujuan pengeringan adalah untuk mengurangi kandungan air pada daun. Sampel yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan grinder dengan tujuan untuk memperbesar luas permukaan sampel sehingga memudahkan proses penarikan zat aktif oleh pelarut dan selanjutnya diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh.

3. Ekstraksi dan Fraksinasi

a. Ekstraksi

Serbuk halus daun kayu bulan yang diperoleh kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Adapun proses yang terjadi dalam maserasi adalah dinding sel tanaman akan ditembus oleh pelarut etanol 70%. Kemudian pelarut masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif tersebut akan larut karena adanya konsentrasi yang berbeda antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel sehingga larutan yang terdesak

keluar adalah larutan yang terpekat. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk daun kayu bulan sebanyak 356,30 g menggunakan 3,5 L etanol teknis 70% selama 3 hari disimpan di tempat yang gelap, tidak terkena cahaya matahari dan diaduk 1x24 jam. Tujuan dilakukan pengadukan adalah untuk mempercepat melarutnya senyawa zat aktif dari daun kayu bulan ke pelarut. Kemudian diremaserasi 2 hari dengan jumlah pelarut etanol teknis 70% setengah dari volume maserasi, yaitu sebanyak 1,75 L dan disimpan kembali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan menjadi satu kemudian diuapkan menggunakan penangas air dengan suhu di bawah 50°C agar senyawa yang terkandung dalam sampel tidak rusak.

Pada penelitian ini, ekstrak kental yang diperoleh adalah 92 gram. Dari hasil yang didapatkan, kemudian dihitung rendemen ekstrak yang ditunjukkan pada Tabel 4. Rendemen ekstrak daun kayu bulan yang diperoleh adalah sebesar 25,821%. Rendemen ekstrak yang didapatkan dihitung sebagai persentase perbandingan bobot ekstrak yang didapat terhadap bobot serbuk daun kayu bulan yang dipakai saat maserasi. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun kayu bulan memenuhi syarat Farmakope Herbal Indonesia yaitu tidak kurang dari 7,2% (Depkes RI, 2008).

**Tabel 4. Hasil Rendemen Ekstrak Kental Daun Kayu Bulan**

Sampel	Berat simplisia (g)	Berat wadah + ekstrak (g)	Berat wadah kosong (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Daun kayu bulan ( <i>Pisonia alba</i> Span.)	356,30	267,57	175,57	92	25,821

Ekstrak kental daun kayu bulan yang diperoleh selanjutnya dihitung kadar airnya menggunakan alat *moisture content balance*. Kadar air ekstrak yang diperoleh adalah sebesar 7,36%. Hasil kadar air dari ekstrak daun kayu bulan telah memenuhi syarat standar Farmakope Herbal Indonesia yaitu tidak lebih dari 10% (Depkes RI, 2008).

## b. Fraksinasi

Ekstrak etanol daun kayu bulan yang diperoleh dari hasil maserasi masih mengandung seluruh senyawa kimia baik yang polar, semi polar, maupun non polar. Untuk menarik senyawa kimia yang lebih spesifik dilakukan dengan fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan corong pisah. Prinsip dari metode ini adalah pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya menggunakan pelarut yang tidak saling campur sehingga akan terbentuk dua lapisan.

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu n-heksan bersifat non polar, etil asetat bersifat semi polar, dan air bersifat polar. Pada penelitian ini, fraksi air yang diperoleh sebanyak 20,21 gram, fraksi etil asetat sebanyak 3,2044 gram, dan fraksi n-heksan sebanyak 2,2038 gram. Dari hasil yang didapatkan kemudian dihitung rendemen masing-masing fraksi yang ditunjukkan pada Tabel 5. Persentase rendemen fraksi yang diperoleh berbeda-beda karena adanya perbedaan kemampuan menarik senyawa dari masing-masing pelarut. Persentase rendemen fraksi air lebih besar dibandingkan dengan etil asetat dan n-heksan. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa dalam daun kayu bulan lebih banyak mengandung senyawa yang bersifat polar.

**Tabel 5. Hasil Rendemen 3 Fraksi**

<b>Sampel</b>	<b>Berat wadah + fraksi (g)</b>	<b>Berat wadah kosong (g)</b>	<b>Berat fraksi (g)</b>	<b>Berat simplisia (g)</b>	<b>Rendemen (%)</b>
Fraksi Air	95,139	74,929	20,21	356,30	5,672
Fraksi Etil Asetat	75,5271	72,3227	3,2044	356,30	0,899
Fraksi n-Heksan	36,0188	33,815	2,2038	356,30	0,619

#### 4. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia dalam suatu sampel uji. Skrining fitokimia dari fraksi air, etil asetat, dan n-heksan diperoleh hasil bahwa pada fraksi etil asetat diketahui tidak mengandung saponin, dan fraksi n-heksan tidak mengandung flavonoid.

**Tabel 6. Hasil Skrining Fitokimia**

No.	Golongan	Fraksi			Keterangan
		Air	Etil Asetat	n-Heksan	
1	Alkaloid	-	-	-	Tidak terbentuk endapan putih/kuning
2	Flavonoid	+	+	-	Terdapat warna orange, orange coklat
3	Saponin	+	-	+	Terdapat busa stabil $\pm 3$ cm
4	Tanin	+	+	+	Terdapat warna hijau/kuning
5	Steroid	+	+	+	Terdapat warna hijau

Keterangan: (+) = mengandung senyawa uji; (-) = tidak mengandung senyawa uji

Pada pengujian alkaloid, tujuan penambahan asam sulfat untuk membentuk garam alkaloid. Kemudian penambahan pereaksi *Mayer* akan menyebabkan nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion logam  $K^+$  dari kalium tetraiodomercurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Dewi dkk., 2021). Uji alkaloid dengan pereaksi *Mayer* dikatakan positif apabila terbentuk endapan putih atau kuning. Hasil menunjukkan bahwa ketiga fraksi negatif tidak mengandung alkaloid karena tidak terbentuk endapan putih/kuning.

Pada pengujian flavonoid, ketiga fraksi ditambahkan dengan serbuk magnesium dan asam klorida pekat untuk memutus ikatan glikosida dan digantikan oleh ion  $H^+$  yang berasal dari HCl, serta mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terbentuk garam flavilium berwarna merah, orange, atau kuning. Hasil menunjukkan bahwa fraksi air dan etil asetat positif mengandung flavonoid, sedangkan fraksi n-heksan negatif.

Pada pengujian saponin, ketiga fraksi ditambahkan akuades lalu dikocok selama 1 menit dan didiamkan selama 10 menit. Hasil menunjukkan bahwa

fraksi air dan n-heksan positif mengandung saponin karena terbentuk busa yang stabil setinggi 3 cm, sedangkan pada fraksi etil asetat hasilnya negatif karena busa yang terbentuk tidak stabil. Terbentuknya busa pada uji saponin dikarenakan adanya glikosida yang larut dalam air dan terhidrolisis menjadi glukosa.

Pada pengujian tanin, ketiga fraksi ditambahkan dengan  $\text{FeCl}_3$ . Adanya penambahan  $\text{FeCl}_3$  akan terjadi reaksi dengan salah satu gugus hidroksil pada senyawa tanin, serta ion  $\text{Fe}^{3+}$  akan bereaksi dengan tanin membentuk kompleks warna. Hasil menunjukkan bahwa ketiga fraksi positif mengandung tanin yang ditandai dengan perubahan menjadi hijau kehitaman.

Pada pengujian steroid, ketiga fraksi ditambahkan dengan kloroform, asam asetat glasial dan asam sulfat pekat. Penetesan asam sulfat pekat membuat asam asetat glasial bereaksi sehingga atom C pada asam asetat membentuk karbokation. Selanjutnya karbokation bereaksi dengan atom O pada gugus -OH yang ada pada senyawa steroid. Hasil menunjukkan bahwa ketiga fraksi positif mengandung steroid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau.

## 5. Penentuan kadar total fenolik

### a. Penentuan panjang gelombang maksimum asam galat

Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang yang memberikan hasil serapan maksimal berupa nilai absorbansi dari asam galat yang telah direaksikan dengan reagen Folin-Ciocalteu dan natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 7%. *Scanning* panjang gelombang asam galat menggunakan konsentrasi 500 ppm yang dilakukan setelah mereaksikan dengan reagen Folin-Ciocalteu dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7% dengan rentang panjang gelombang 600-800 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 738 nm.

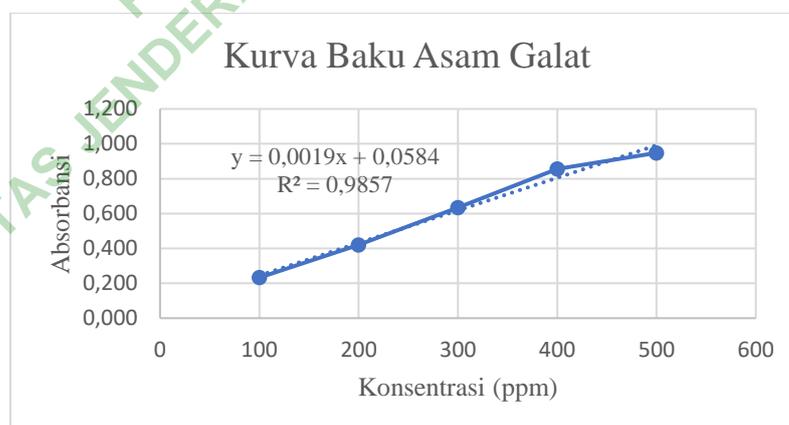
### b. Penentuan *operating time* asam galat

*Operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu pengukuran suatu senyawa untuk bereaksi secara sempurna. Reaksi tersebut ditandai dengan stabilnya nilai absorbansi. Pengukuran *operating time* dengan cara

mereaksikan 0,1 mL asam galat 500 ppm dengan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu, lalu inkubasi selama 4 menit. Kemudian tambahkan 1 mL natrium karbonat 7%, dicukupkan dengan *Water for Injection* sebatas 5 mL. Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi dengan panjang gelombang 738 nm selama 2 jam dengan interval waktu 5 menit. *Operating time* asam galat yang diperoleh yaitu 1 jam 30 menit.

c. Penentuan kurva baku asam galat

Penentuan kurva baku standar bertujuan mengetahui hubungan antara konsentrasi dari larutan dengan nilai absorbansinya. Kurva baku yang baik memiliki nilai linieritas  $r \geq 0,98$  (Depkes RI, 2013). Penentuan kurva baku pada penelitian ini menggunakan asam galat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm yang diambil dari konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm. Setiap seri kadar diambil 0,1 mL lalu tambahkan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu dan diamkan 4 menit. Setelah itu, tambahkan 1 mL natrium karbonat 7% dan dicukupkan dengan *Water for Injection* hingga 5 mL lalu diinkubasi selama 1 jam 30 menit. Hasil kurva baku asam galat dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4. Kurva Baku Asam Galat**

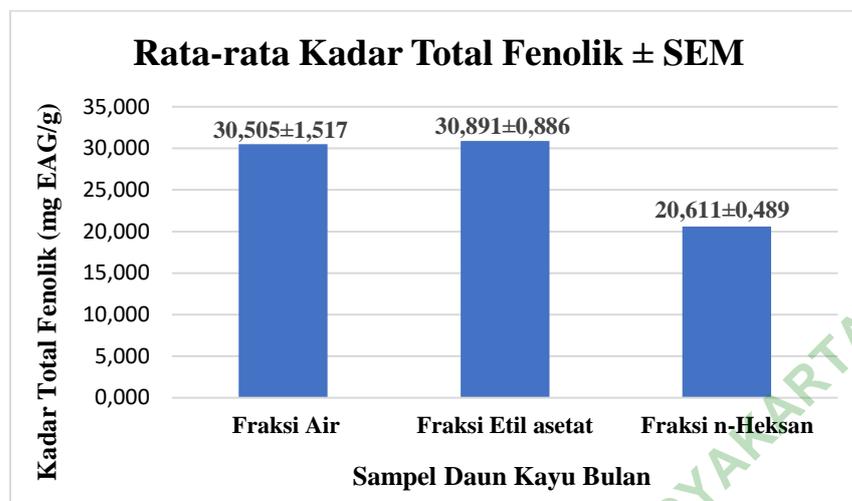
Nilai koefisien korelasi ( $r$ ) yang telah memenuhi syarat menunjukkan bahwa perubahan konsentrasi akan mempengaruhi absorbansi secara linier (Fatimah dkk., 2018). Berdasarkan kurva baku asam galat tersebut diperoleh persamaan regresi linier  $y = 0,0019x + 0,0584$  dengan nilai  $r$  sebesar 0,993 yang menunjukkan bahwa data tersebut linier karena nilai  $r$  mendekati 1.

Persamaan regresi kurva baku tersebut akan digunakan untuk menghitung nilai kadar total fenolik dalam fraksi air, etil asetat, dan n-heksan daun kayu bulan.

d. Penetapan kadar total fenolik

Penentuan kandungan total fenolik dilakukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Prinsip dari metode tersebut adalah inti aromatis senyawa fenolik mereduksi fosfomolibdat-fosfotungstat menjadi kompleks molybdenum tungsten warna biru (Senet dkk., 2017). Reaksi antara senyawa fenolik dengan pereaksi Folin-Ciocalteu hanya terjadi pada suasana basa. Untuk membuat suasana basa digunakan natrium karbonat agar proton pada senyawa fenolik terdisosiasi menjadi ion fenolat (Ukieyanna, 2012). Reaksi fenol dengan Folin-Ciocalteu terlihat dari adanya warna kuning dan penambahan natrium karbonat akan mengubah warna menjadi biru. Semakin pekat warna biru pada larutan menunjukkan bahwa absorbansi semakin tinggi (Senet dkk., 2017).

Pengujian kandungan total fenolik dilakukan dengan mengambil 0,1 mL sampel tambahkan 0,1 mL pereaksi Folin-Ciocalteu lalu diamkan 4 menit. Setelah itu, tambahkan 1 mL natrium karbonat 7% dan gojog homogen kemudian tambahkan *Water for Injection* hingga 5 mL dan diinkubasi selama 1 jam 30 menit agar reaksi berjalan dengan sempurna. Hasil penetapan kadar total fenolik yang terkandung dalam fraksi air adalah  $30,505 \pm 1,517$  mg EAG/g, fraksi etil asetat  $30,891 \pm 0,886$  mg EAG/g, dan fraksi n-heksan  $20,611 \pm 0,489$  mg EAG/g.



Gambar 5. Grafik Perbandingan Rata-rata Kadar Total Fenolik Masing-masing Sampel Daun Kayu Bulan (*Pisonia alba* Span.)

6. Penentuan kadar total flavonoid
  - a. Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

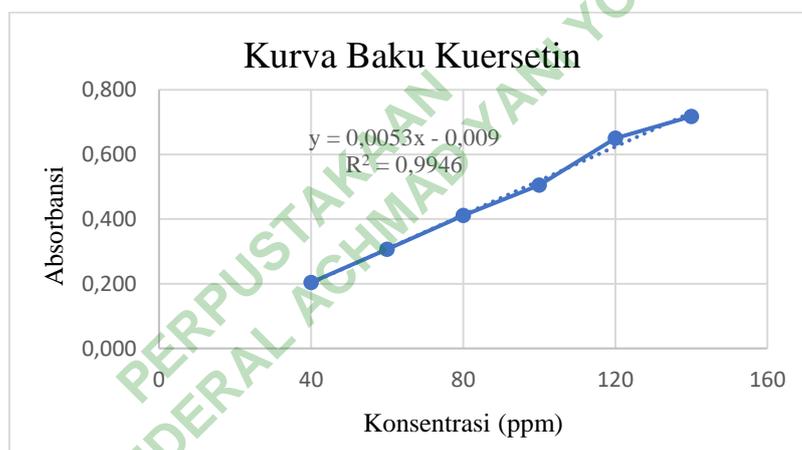
Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang yang memberikan hasil serapan maksimal berupa nilai absorbansi. Panjang gelombang tersebut selanjutnya digunakan untuk pengukuran kompleks antara kuersetin dengan  $\text{AlCl}_3$ . *Scanning* dilakukan menggunakan kuersetin konsentrasi 80 ppm yang telah ditambahkan dengan aluminium klorida 2% dan asam asetat 5% pada spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 350-550 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 413 nm. Hasil tersebut memiliki selisih 2 nm dengan panjang gelombang maksimum yang didapat oleh peneliti sebelumnya yaitu 415 nm (Ipandi dkk., 2016).

- b. Penentuan *operating time* kuersetin

*Operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu pengukuran optimal antara kuersetin dan  $\text{AlCl}_3$  untuk bereaksi membentuk kompleks secara sempurna. Reaksi tersebut ditandai dengan stabilnya nilai absorbansi. Diambil 1 mL larutan stok kuersetin 80 ppm tambahkan 1 mL aluminium klorida 2% dan 8 mL asam asetat 5% lalu diukur setiap 5 menit selama 1 jam pada panjang gelombang 413 nm. *Operating time* kuersetin yang diperoleh yaitu 30 menit.

c. Penentuan kurva baku kuersetin

Penetapan kurva baku kuersetin dilakukan untuk mencari persamaan regresi linier yang selanjutnya digunakan untuk mengukur suatu kadar dengan nilai absorbansi yang sudah diukur. Persamaan regresi linier ini merupakan hubungan antara konsentrasi kuersetin dengan absorbansinya. Menurut Depkes RI (2013) kurva baku yang baik memiliki nilai linieritas  $r \geq 0,98$ . Penetapan kurva baku menggunakan kuersetin konsentrasi 40, 60, 80, 100, 120, dan 140 ppm. Diambil 1 mL tiap seri konsentrasi tambahkan 1 mL aluminium klorida 2% dan 8 mL asam asetat 5%, lalu diinkubasi 30 menit. Hasil kurva baku kuersetin dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6. Kurva Baku Kuersetin**

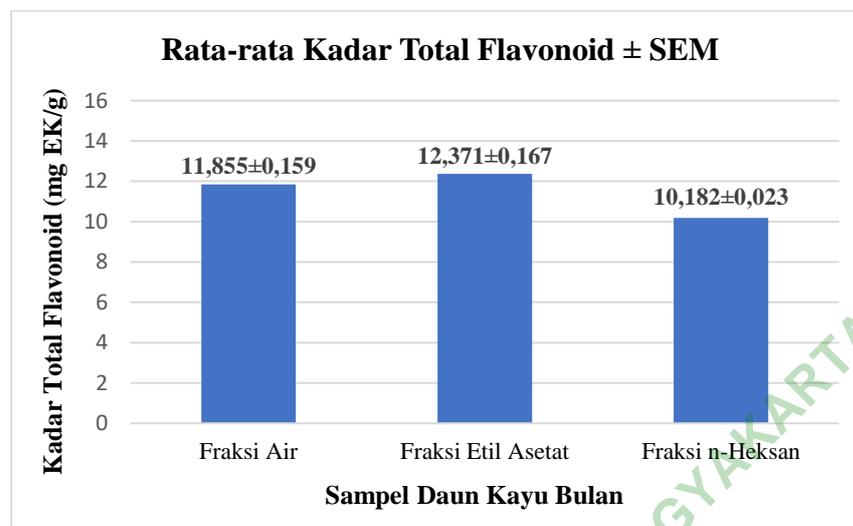
Berdasarkan kurva baku kuersetin tersebut diperoleh persamaan regresi linier  $y = 0,0053x - 0,009$  dengan nilai  $r$  sebesar 0,997 yang menunjukkan bahwa data linier karena nilai  $r$  mendekati 1. Selain itu, terdapat korelasi yang kuat antara kedua variabel. Persamaan regresi kurva baku tersebut akan digunakan untuk menghitung kandungan total flavonoid pada sampel uji.

d. Penetapan kadar total flavonoid

Penentuan kandungan total flavonoid dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui seberapa besar kadar total flavonoid yang terkandung pada fraksi air, etil asetat, dan n-heksan daun kayu bulan. Pada penelitian ini menggunakan metode kolorimetri

aluminium klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) dengan pembanding baku standar kuersetin sehingga flavonoid total yang diperoleh dihitung sebagai kuersetin. Prinsip penentuan kandungan total flavonoid dengan metode kolorimetri  $\text{AlCl}_3$  adalah berdasarkan pembentukan warna dan kompleks antara  $\text{AlCl}_3$  dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 dari golongan flavon dan flavonol. Kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada atom C-4 dan mempunyai gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol sehingga dijadikan sebagai baku standar (Azizah dkk., 2018).

Penentuan kandungan total flavonoid dilakukan dengan mengambil 1 mL sampel lalu tambahkan 1 mL aluminium klorida 2% dan 8 mL asam asetat 5%, kemudian diinkubasi 30 menit. Penambahan aluminium klorida untuk memberikan efek batokromatik dengan menggeser ke arah panjang gelombang yang lebih panjang sehingga panjang gelombang kuersetin bergeser ke rentang panjang gelombang *visible* dan juga menghasilkan efek hiperkromik atau peningkatan intensitas larutan standar kuersetin menjadi warna yang lebih kuning dengan penambahan asam asetat agar tetap stabil atau untuk mempertahankan panjang gelombang (Chang dkk., 2002). Hasil pengujian kadar total flavonoid yang terkandung pada fraksi air adalah  $11,855 \pm 0,159$  mg EK/g, fraksi etil asetat  $12,371 \pm 0,167$  mg EK/g, dan fraksi n-heksan  $10,182 \pm 0,023$  mg EK/g.



**Gambar 7. Grafik Perbandingan Rata-rata Kadar Total Flavonoid Masing-masing Sampel Daun Kayu Bulan (*Pisonia alba* Span.)**

#### 7. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH dengan prinsip tereduksinya DPPH karena adanya proses transfer elektron atau hidrogen dari senyawa antioksidan. Pada penelitian ini DPPH bertindak sebagai radikal bebas yang memiliki elektron tidak berpasangan sehingga untuk menetralkan senyawa tersebut maka DPPH akan berikatan dengan hidrogen yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning. Metode DPPH dipilih sebagai uji antioksidan karena sampel daun kayu bulan mengandung senyawa fenolik dan flavonoid sehingga aktivitas antioksidannya sangat tinggi melalui uji DPPH (Saritha dkk., 2014). Selain itu, metode DPPH merupakan metode pengujian aktivitas antioksidan yang mudah, cepat, sederhana, dan sampel yang dibutuhkan sedikit. Kelemahan metode DPPH adalah peka terhadap cahaya dan tidak dapat disimpan waktu lama karena akan rusak sehingga absorbansi menurun. Untuk mengatasi kelemahan tersebut dengan membungkus peralatan gelas menggunakan *aluminium foil* yang digunakan untuk pembacaan absorbansi. Pada penelitian ini DPPH dilarutkan menggunakan metanol p.a sehingga metanol p.a digunakan sebagai blanko.

a. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang yang akan digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan yang memberikan absorbansi maksimal. Penentuan panjang gelombang dilakukan dengan mengukur larutan DPPH yang sudah direaksikan dengan vitamin C pada rentang panjang gelombang 500-600 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh adalah 516 nm.

b. Penentuan *operating time* DPPH

Penetapan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu pengukuran DPPH yang memberikan absorbansi stabil. Penentuan *operating time* dilakukan dengan mengambil 2 mL DPPH yang kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm tiap 5 menit selama 40 menit. *Operating time* DPPH yang diperoleh adalah 25 menit.

c. Pengujian aktivitas antioksidan vitamin C dengan DPPH

Standar pembanding antioksidan yang digunakan pada penelitian ini adalah vitamin C karena sudah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Selain itu, proses oksidasi di dalam tubuh dapat dicegah oleh vitamin C. Pengujian aktivitas antioksidan vitamin C dilakukan dengan mereaksikan 1 mL seri konsentrasi vitamin C dengan 2 mL DPPH kemudian diinkubasi 25 menit dan dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. Pengujian diulangi sebanyak 3x untuk mendapatkan kurva baku dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) paling bagus yang nilainya mendekati 1. Hasil penentuan aktivitas antioksidan vitamin C dapat dilihat pada (Lampiran 6).

Persen peredaman radikal menyatakan besarnya kemampuan peredaman radikal bebas oleh suatu sampel. Sedangkan *Inhibition Concentration* ( $IC_{50}$ ) adalah parameter nilai yang menunjukkan konsentrasi sampel yang paling efektif untuk meredam radikal bebas sebesar 50%. Nilai persen peredaman radikal yang telah diperoleh diplotkan terhadap konsentrasi sehingga didapatkan persamaan regresi linier. Persamaan regresi linier tersebut digunakan untuk menghitung  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  vitamin C yang diperoleh adalah  $4,563 \pm 0,042$  ppm, artinya konsentrasi tersebut

dapat meredam radikal bebas DPPH sebesar 50% dan dikategorikan sebagai antioksidan yang sangat kuat.

d. Pengujian aktivitas antioksidan sampel fraksi ekstrak daun kayu bulan dengan DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan pada fraksi air dan etil asetat menggunakan konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm, sedangkan fraksi n-heksan menggunakan konsentrasi 50, 150, 250, 350, dan 450 ppm. Tiap seri konsentrasi diambil 1 mL tambahkan 2 mL DPPH kemudian diinkubasi 25 menit. Dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. Pengujian diulangi 3x. Nilai  $IC_{50}$  dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang didapatkan dari hubungan antara konsentrasi sampel dengan persen peredaman radikal bebas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi air, etil asetat, dan n-heksan memiliki nilai  $IC_{50}$  berturut-turut adalah sebesar  $175,503 \pm 2,013$  ppm,  $107,286 \pm 0,464$  ppm, dan  $254,971 \pm 4,299$  ppm. Dari hasil tersebut fraksi etil asetat dan air mempunyai aktivitas antioksidan yang sedang dan fraksi n-heksan mempunyai aktivitas antioksidan yang lemah.

**Tabel 7. Hasil Nilai  $IC_{50}$  pada Sampel Fraksi Daun Kayu Bulan**

No	Fraksi	Nilai $IC_{50} \pm SEM$	Kategori Antioksidan
1	Air	$175,503 \pm 2,013$	Sedang
2	Etil Asetat	$107,286 \pm 0,464$	Sedang
3	n-Heksan	$254,971 \pm 4,299$	Lemah

8. Analisis data

Seluruh data yang diperoleh dianalisis secara statistik menggunakan bantuan *software* SPSS. Uji untuk mengetahui data sampel homogen atau tidak yaitu menggunakan uji Levene's dan uji untuk mengetahui data berdistribusi normal menggunakan uji Shapiro-Wilk karena jumlah data yang diperoleh kurang dari 50. Hasil analisis kadar total flavonoid fraksi air, etil asetat, dan n-heksan daun kayu bulan yang diperoleh (Tabel 8) menunjukkan bahwa data homogen serta berdistribusi normal yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $>0,05$ . Selanjutnya dilakukan uji ANOVA untuk mengetahui perbedaan pada

ketiga sampel. Uji ANOVA dilakukan karena jumlah sampel yang akan dianalisis lebih dari 2 kelompok. Hasil pada uji ANOVA menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antar sampel dengan nilai signifikansi  $<0,05$ . Selanjutnya masing-masing parameter uji dilanjutkan uji Post Hoc Test dengan uji LSD untuk mengetahui sampel mana yang berbeda signifikan.

**Tabel 8. Hasil Uji Statistik Kadar Total Flavonoid**

Sampel	Kadar Total Flavonoid			
	Homogenitas	Normalitas	ANOVA	LSD
Fraksi Air		0,734**		0,034 <sup>b</sup>
Fraksi Etil Asetat	0,114*	0,376**	$<0,001^a$	0,034 <sup>b</sup>
Fraksi n-Heksan		0,470**		$<0,001^a$

Keterangan: Sig.  $>0,05$ : Data homogen\*, Sig.  $>0,05$ : Data terdistribusi normal\*\*, Sig.  $<0,001$ : Terdapat perbedaan yang signifikan<sup>a</sup>, Sig.  $>0,05$ : Tidak terdapat perbedaan yang signifikan<sup>b</sup>

Hasil analisis kadar total fenolik fraksi air, etil asetat, dan n-heksan daun kayu bulan yang diperoleh menunjukkan bahwa data homogen dengan nilai signifikansi 0,108 tetapi data tidak berdistribusi normal karena ada salah satu sampel yaitu fraksi etil asetat yang nilai signifikansinya  $<0,05$  sehingga dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis. Diperoleh nilai signifikansinya 0,061 sehingga tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar sampel.

**Tabel 9. Hasil Uji Statistik Kadar Total Fenolik**

Sampel	Kadar Total Fenolik			
	Homogenitas	Normalitas	Kruskal Wallis	LSD
Fraksi Air		0,288**		0,804 <sup>b</sup>
Fraksi Etil Asetat	0,108*	0,033***	0,061 <sup>b</sup>	0,804 <sup>b</sup>
Fraksi n-Heksan		0,794**		$<0,001^a$

Keterangan: Sig.  $>0,05$ : Data homogen\*, Sig.  $>0,05$ : Data terdistribusi normal\*\*, Sig.  $<0,05$ : Data tidak terdistribusi normal\*\*\*, Sig.  $<0,001$ : Terdapat perbedaan yang signifikan<sup>a</sup>, Sig.  $>0,05$ : Tidak terdapat perbedaan yang signifikan<sup>b</sup>

Hasil analisis antioksidan pada sampel vitamin C, fraksi air, etil asetat, dan n-heksan daun kayu bulan menunjukkan bahwa data homogen dan berdistribusi normal dengan nilai signifikansi  $>0,05$ . Selanjutnya dilakukan uji ANOVA dan diperoleh hasil bahwa antar sampel terdapat perbedaan yang bermakna yang ditunjukkan dengan nilai signifikansi  $<0,05$ . Selanjutnya

masing-masing parameter uji dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* menggunakan uji LSD untuk mengetahui sampel mana yang berbeda signifikan.

**Tabel 10. Hasil Uji Statistik Antioksidan Sampel dengan Metode DPPH**

Sampel	Antioksidan (IC <sub>50</sub> )			
	Homogenitas	Normalitas	ANOVA	LSD
Vitamin C		0,856**		<0,001 <sup>a</sup>
Fraksi Air	0,074*	0,213**	<0,001 <sup>a</sup>	<0,001 <sup>a</sup>
Fraksi Etil Asetat		0,441**		<0,001 <sup>a</sup>
Fraksi n-Heksan		0,923**		<0,001 <sup>a</sup>

Keterangan: Sig. >0,05: Data homogen\*, Sig. >0,05: Data terdistribusi normal\*\*, Sig. <0,001: Terdapat perbedaan yang signifikan<sup>a</sup>

## B. Pembahasan

Pada penetapan kadar total fenolik fraksi air, etil asetat, dan n-heksan diperoleh hasil secara berturut-turut adalah 30,505±1,517 mg EAG/g, 30,891±0,886 mg EAG/g, dan 20,611±0,489 mg EAG/g. Pada penelitian ini menggunakan metode Folin-Ciocalteu dengan larutan standar asam galat. Asam galat merupakan salah satu senyawa fenolik alami yang dapat bereaksi dengan Folin-Ciocalteu menghasilkan warna kuning. Penambahan natrium karbonat untuk menciptakan kondisi basa dan menghasilkan warna biru. Hal ini terjadi karena adanya reaksi antara senyawa fenolik dengan pereaksi Folin-Ciocalteu dengan mereduksi fosfomolibdat-fosfotungstat menjadi molybdenum tungsten berwarna biru. Intensitas warna biru yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi ion fenolat yang terbentuk. Semakin pekat warna biru pada larutan maka semakin tinggi kandungan senyawa fenolik (Senet dkk., 2017). Pengujian kadar total fenolik merupakan dasar dilakukannya pengujian aktivitas antioksidan, karena senyawa fenolik berperan dalam mencegah proses oksidasi (Matheos dkk., 2014). Berdasarkan hasil penetapan total fenolik fraksi etil asetat menunjukkan hasil yang lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi yang lainnya. Hal ini dikarenakan pelarut etil asetat lebih banyak menarik senyawa fenolik yang bersifat polar sehingga fraksi etil asetat warnanya lebih pekat daripada fraksi lainnya.

Pada penetapan kadar total flavonoid fraksi air, etil asetat, dan n-heksan diperoleh hasil berturut-turut adalah 11,855±0,159 mg EK/g, 12,371±0,167 mg

EK/g, dan  $10,182 \pm 0,023$  mg EK/ g. Berdasarkan hasil tersebut fraksi etil asetat menunjukkan hasil yang lebih tinggi daripada fraksi yang lainnya. Secara teori, flavonoid yang dapat bereaksi dengan  $AlCl_3$  adalah flavonoid yang terhidrolisis dengan sifat semipolar (Manik dkk., 2014). Selain itu, pada uji kualitatif flavonoid fraksi etil asetat menghasilkan warna hitam yang pekat. Hal ini menandakan bahwa fraksi etil asetat lebih banyak mengandung senyawa flavonoid. Pada penelitian ini menggunakan metode kolorimetri aluminium klorida ( $AlCl_3$ ) dengan prinsip berdasarkan pembentukan warna dan kompleks  $AlCl_3$  dengan gugus keto C-4 dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 dari flavon atau flavonol. Kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga (Azizah dkk., 2018) sehingga digunakan sebagai larutan standar. Kompleks berwarna kuning terbentuk karena adanya reaksi reduksi oksidasi antara flavonoid dengan  $AlCl_3$ , dimana flavonoid bersifat reduktor dan  $AlCl_3$  bersifat oksidator (Azizah dkk., 2014).  $AlCl_3$  berfungsi memberikan efek batokromatik dengan melakukan pergeseran ke arah panjang gelombang yang lebih panjang sehingga panjang gelombang standar kuersetin mengalami pergeseran ke rentang panjang gelombang *visible* dan juga menghasilkan efek hiperkromik atau peningkatan intensitas larutan standar kuersetin menjadi warna yang lebih kuning dengan penambahan asam asetat agar tetap stabil atau untuk mempertahankan panjang gelombang (Chang et al., 2002).

Pada pengujian aktivitas antioksidan diperoleh hasil nilai  $IC_{50}$  pada fraksi air sebesar  $175,503 \pm 2,013$  ppm, fraksi etil asetat  $107,286 \pm 0,464$  ppm, dan fraksi n-heksan  $254,971 \pm 4,299$  ppm. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa nilai  $IC_{50}$  fraksi etil asetat lebih kecil daripada fraksi air dan n-heksan, sehingga fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan tertinggi diikuti dengan fraksi air dan n-heksan. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Lung & Destiani, 2017; Magfira, 2018). Fraksi air dan etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang sedang karena nilai  $IC_{50}$  masuk pada rentang 101-250 ppm, sedangkan fraksi n-heksan memiliki aktivitas antioksidan yang lemah karena nilai  $IC_{50}$  masuk pada rentang 250-500 ppm. Hasil ini sejalan dengan kandungan total fenolik dan flavonoid yang menunjukkan fraksi etil asetat memiliki kandungan

yang lebih tinggi daripada fraksi lainnya. Kadar total fenolik dan flavonoid berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan, dimana semakin tinggi kadar total fenolik dan flavonoid dalam sampel maka aktivitas antioksidan semakin tinggi.

Pada penelitian ini digunakan standar pembanding vitamin C karena memiliki 2 gugus hidroksil yang menyebabkan lebih mudah dalam pendonoran hidrogen sehingga aktivitas antioksidannya tinggi (Matheos dkk., 2014). Selain itu, vitamin C merupakan golongan antioksidan sekunder yang dapat menghambat radikal bebas. Gugus hidroksil pada vitamin C berfungsi untuk menangkap radikal bebas dan gugus polihidroksil untuk meningkatkan aktivitas antioksidan. Hasil pengujian aktivitas antioksidan vitamin C memiliki nilai  $IC_{50}$  yang kecil yaitu  $4,563 \pm 0,042$  ppm sehingga vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Hasil pengujian aktivitas antioksidan vitamin C dengan ketiga fraksi memiliki perbedaan nilai. Hal ini karena vitamin C merupakan senyawa murni dibandingkan dengan ketiga fraksi yang kemungkinan masih banyak senyawa lain yang tidak memiliki aktivitas antioksidan. Dari ketiga fraksi yang memiliki nilai  $IC_{50}$  paling besar adalah fraksi n-heksan. Jika dibandingkan dengan  $IC_{50}$  vitamin C, fraksi air, etil asetat, dan n-heksan daun kayu bulan cukup berpotensi sebagai antioksidan.

Pada hasil analisis statistika penentuan kadar total fenolik menggunakan uji ANOVA diperoleh hasil bahwa pada fraksi air, etil asetat, dan n-heksan daun kayu bulan tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Tetapi, pada hasil analisis statistika penentuan kadar total flavonoid diperoleh hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antar sampel fraksi. Pada uji LSD menunjukkan bahwa pada fraksi air dengan fraksi etil asetat tidak berbeda signifikan. Hal ini dikarenakan sifat kepolaran air dengan etil asetat yang tidak jauh berbeda, dimana air bersifat polar dan etil asetat bersifat non polar sehingga banyak menarik senyawa fenolik dan flavonoid untuk masuk ke pelarut tersebut dan hasil kandungan total fenolik dan flavonoid pada fraksi air dan etil asetat yang diperoleh lebih tinggi.

Pada hasil analisis statistika aktivitas antioksidan menggunakan uji ANOVA diperoleh hasil bahwa pada sampel vitamin C, fraksi air, etil asetat, dan n-heksan daun kayu bulan terdapat perbedaan yang bermakna. Pada uji LSD juga menunjukkan bahwa  $IC_{50}$  vitamin C berbeda signifikan dengan  $IC_{50}$  pada ketiga

fraksi. Hal ini dikarenakan vitamin C merupakan senyawa murni hasil isolasi yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, sedangkan fraksi air, etil asetat, dan n-heksan masih dalam bentuk campuran senyawa sehingga aktivitas antioksidannya belum sebaik antioksidan vitamin C. Jika dibandingkan dari segi nilai  $IC_{50}$ , vitamin C dikategorikan sebagai antioksidan yang sangat kuat, sedangkan fraksi air dan etil asetat sebagai antioksidan yang sedang, serta fraksi n-heksan sebagai antioksidan yang lemah. Selain itu, uji LSD nilai  $IC_{50}$  antar sampel fraksi juga menunjukkan hasil yang berbeda signifikan. Hal ini dikarenakan dengan adanya fraksinasi dapat memisahkan senyawa untuk masuk ke pelarut air, etil asetat, dan n-heksan berdasarkan tingkat polaritasnya sehingga hasil yang didapatkan akan berpengaruh ke aktivitas antioksidannya. Berdasarkan hasil yang telah diperoleh menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi, diikuti dengan fraksi air, dan fraksi n-heksan yang dilihat dari nilai  $IC_{50}$ .