

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Hasil determinasi tanaman yang dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada tanggal 5 Maret 2021 dengan nomor surat 014980/S.Tb./III/2021 mengidentifikasi bahwa herba seledri yang digunakan pada penelitian ini benar spesies (*Apium graveolens* L.) dengan hasil yang dapat dilihat di (Lampiran 1).

2. Penyediaan Bahan Uji

Herba seledri (*Apium graveolens* L.) digunakan pada penelitian ini diambil pada bulan Maret 2021 di Pakis, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah sebanyak 9 kg. Herba seledri diambil pada pagi hari dipilih yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berumur ± 2 bulan. Herba seledri disortasi basah yaitu dengan memilih seledri segar, membuang yang tua, kering, busuk, tanah, rumput, dan kerikil untuk mengurangi pengotor. Selanjutnya dicuci herba seledri menggunakan air yang mengalir untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang menempel.

Herba seledri ditiriskan kemudian dipotong kecil-kecil untuk mempercepat pengeringan dan penghalusan. Pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air dan supaya tidak terjadi reaksi enzimatik yang menyebabkan penguraian kandungan kimia herba seledri. Pengeringan dilakukan menggunakan *oven* dengan suhu 50°C selama 3 hari. Menggunakan suhu 50°C karena senyawa antioksidan tidak tahan terhadap panas yang tinggi pengeringan tidak menggunakan matahari dikarenakan senyawa flavonoid sebagai antioksidan menjadi rusak. Jika senyawa rusak, maka tidak dapat berfungsi sebagai antioksidan.

Herba seledri yang telah kering disortasi kering dari kotoran-kotoran yang masih tertinggal saat dilakukan sortasi basah kemudian dihaluskan menggunakan grinder. Herba seledri yang telah dihaluskan diayak menggunakan ayakan 40 mesh untuk memperluas permukaan herba seledri

menjadi besar sehingga kontak herba seledri dan pelarut saat maserasi semakin baik. Ditimbang herba seledri sebanyak 120 gram untuk tiap 3 pelarut. Dilakukan maserasi dengan kepolaran yang bertingkat, polar, semi polar, dan non polar untuk melihat adanya perbedaan senyawa yang ditarik dari masing-masing maserasi berdasarkan prinsip *like dissolve like* yaitu pelarut polar akan melarutkan senyawa-senyawa polar sedangkan pelarut non polar akan melarutkan senyawa non polar. Metode maserasi dipilih karena mudah, sederhana, dan metode ini cocok untuk menarik senyawa-senyawa yang tidak tahan panas seperti flavonoid. Prinsip metode maserasi yaitu konsentrasi rendah penyari akan mendorong konsentrasi tinggi di dalam sel untuk keluar hingga terjadi keseimbangan konsentrasi di luar dan di dalam sel.

Dimasukkan herba seledri ke dalam toples kemudian diberi pelarut, menurut Farmakope Herbal Indonesia (2017) dengan perbandingan (1:10) yaitu 120 gram dalam 1,2 liter pelarut lalu diaduk kemudian ditutup rapat ditutupi kain hitam didiamkan ditempat gelap. Pengadukan dilakukan pada 6 jam pertama kemudian didiamkan selama 18 jam. Didiamkan ditempat gelap agar senyawa antioksidan tidak rusak oleh cahaya. Dilakukan remaserasi dengan menyaring menggunakan kain mori kemudian diberi pelarut 1,2 liter. Dimasukkan ekstrak herba seledri ke dalam *rotary evaporator* menggunakan suhu 50°C agar senyawa antioksidan tidak rusak oleh pemanasan.

Ditimbang ekstrak yang telah dipekatkan dan dihitung rendemen untuk melihat keterkembalian serbuk herba seledri sebelum diekstraksi dan sesudah diekstraksi. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 3 yang mana rendemen ekstrak etanol sebanyak 32,63% sesuai Farmakope Herbal (2017) yang menyatakan bahwa ekstrak kental etanol tidak kurang dari 24,6%. Ekstrak herba seledri yang memiliki rendemen paling tinggi yaitu ekstrak etanol 96% dikarenakan pelarut polar hampir menarik semua senyawa organik yang bersifat polar maupun non polar. Etil asetat memiliki rendemen lebih kecil dari etanol 96% dan lebih besar dari n-heksan, menurut penelitian yang dilakukan oleh Romadanu *et al.*, (2014) hal tersebut terjadi dikarenakan adanya gugus metoksi sehingga terbentuk ikatan hidrogen dengan sampel. Sedangkan n-heksan

memiliki rendemen yang kecil dikarenakan senyawa bioktif non polar pada herba seledri sangat sedikit.

Tabel 3. Data Rendemen Simplisia Herba Seledri (*Apium graveolens* L.)

No	Bahan Tanaman	Bobot herba seledri basah (kg)	Bobot serbuk herba seledri (gram)	Bobot ekstrak (gram)	Rendemen (%)
1	Ekstrak etanol 96% herba seledri			39,156	32,63
2	Ekstrak etil asetat herba seledri	9	360	6,415	5,345
3	Ekstrak n-heksan herba seledri			3,676	3,063

3. Susut Pengerinan

Uji susut pengerinan dilakukan untuk mengetahui batasan maksimal pada banyaknya senyawa yang hilang akibat lamanya proses pemanasan. Susut pengerinan yaitu menguapnya air, lemak, alkohol, dan pelarut saat dilakukan pemanasan. Uji susut pengerinan dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Alat ini terdiri dari penimbangan, pemanasan, dan dapat mengukur serbuk, granul dan cairan. Prinsip kerjanya herba seledri dipanaskan di dalam *moisture balance* dengan suhu tertentu. Massa herba seledri akan berkurang terus menerus dengan adanya penguapan hingga tidak terjadi pengurangan massa sampel. Hasil susut pengerinan yaitu 7,39% yang mana menurut Farmakope Herbal Indonesia (2017) susut pengerinan tidak boleh lebih dari 10% maka pengujian kadar air boleh tidak dilakukan karena susut pengerinan mewakili kandungan air yang menguap. Jika susut pengerinan tinggi maka dapat mempercepat terjadinya reaksi kimia dan pertumbuhan mikroba sehingga dapat memperpendek usia simpan.

4. Uji Organoleptik

Dilakukan uji organoleptik untuk mengidentifikasi bau, warna, rasa, dan tekstur ekstrak dan bersifat subjektif. Fungsi dari uji organoleptik untuk mengetahui suatu ekstrak rusak atau tidak setelah mengalami berbagai proses dan penyimpanan yang dapat mempengaruhi mutu. Bau ekstrak etanol 96% khas seledri berwarna hijau tua pekat, rasa sedikit pahit, memiliki tekstur

sedikit kering dibandingkan ekstrak etil asetat dan n-heksan. Ekstrak etil asetat herba seledri memiliki bau khas seledri dan masih tercium bau etil asetat, memiliki tekstur kental, berwarna hijau pekat dan rasanya pahit. Ekstrak n-heksan memiliki bau khas seledri berwarna hijau pekat, rasa pahit dan teksturnya lebih kental dari ekstrak etil asetat (Tabel 4).

Tabel 4. Data Karakteristik Ekstrak Herba Seledri (*Apium graveolens* L.)

Parameter	Hasil Karakteristik ekstrak herba seledri					
	Etanol 96%	Literatur (Nessa <i>et al.</i> , 2018)	Etil asetat	Literatur (FHI, 2017)	n-heksan	Literatur (Oktaviani, 2018)
Warna	Hijau kehitaman	Hijau pekat	Hijau kehitaman	Hijau tua	Hijau kehitaman	Hijau tua
Tekstur	Padat	Kental	Kental	Kental	Kental sedikit cair	Kental
Bau	Khas aromatik seledri	Khas	Khas aromatik seledri	Khas aromatik seledri	Khas aromatik seledri	Khas aromatik seledri
Rasa	Pahit	Pahit	Pahit	Rasa khas seledri	Pahit	Rasa khas seledri

5. Uji Fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam herba seledri. Pengujian alkaloid diasamkan menggunakan HCL 2 N karena senyawa alkaloid bersifat basa sehingga membentuk garam. Hasil positif jika terdapat endapan yang terbentuk akibat pengompleksan atom nitrogen sampel bereaksi dengan ion logam K^+ pada pereaksi. Uji alkaloid dengan pereaksi mayer dilakukan dengan penambahan merkuri (II) klorida ke dalam kalium iodida menyebabkan terbentuknya kalium tetraiodomerkurat (II) yang bereaksi dengan senyawa alkaloid sehingga terjadi endapan merah merkuri (II) iodida. Pada uji alkaloid dengan pereaksi dragendorff hasil positif jika terjadi endapan jingga akibat ikatan kovalen antara K^+ pada kalium tetraiodobismut pereaksi dan atom nitrogen pada

alkaloid. Pada uji alkaloid dengan pereaksi wagner hasil positif jika terbentuk endapan coklat akibat adanya ikatan kovalen K^+ dan atom nitrogen. Sedangkan warna coklat ditimbulkan I^- kalium iodida bereaksi dengan iodin (I_2) menjadi I_3^- . Hasil pengujian herba seledri tidak mengandung alkaloid.

Pengujian flavonoid dilakukan dengan penambahan serbuk magnesium dan HCL 2 N untuk mereduksi senyawa yang memiliki inti α -benzopiron pada flavonoid. Hasil positif mengandung flavonoid apabila berwarna jingga hingga ungu yang menunjukkan flavonoid golongan flavononol, flavonon, flavonol, dan dihidroflavonol (Hanani, 2015). Sedangkan positif berwarna merah, kuning atau jingga menandakan golongan flavon, kalkon, atau auron. Hasil dari pengujian ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan herba seledri positif mengandung flavonoid berwarna kuning pada ketiga ekstrak.

Pengujian saponin dilakukan dengan pengocokan selama 10 menit. Timbulnya busa disebabkan kombinasi saponin non polar dan rantai samping polar yang larut air yang bersifat aktif permukaan sehingga adanya pengocokan menyebabkan terbentuknya misel. Saponin memiliki sifat polar sehingga lebih larut dalam pelarut yang polar. Hasil pengujian herba seledri positif mengandung saponin dengan adanya busa setinggi 4 cm pada ekstrak etanol 96%, 2 cm pada ekstrak etil asetat, dan 1 cm pada ekstrak n-heksan.

Pengujian tanin dilakukan dengan mendidihkan ekstrak herba seledri kemudian diberi $FeCl_3$. Menggunakan $FeCl_3$ karena untuk mengetahui herba seledri mengandung gugus fenol atau tidak. Tanin termasuk polifenol sehingga apabila direaksikan dengan $FeCl_3$ maka akan terbentuk kompleks tanin (atom O) dan Fe^{3+} menimbulkan warna hijau, ungu, merah, biru atau hitam yang kuat. Hasil pengujian ekstrak etanol 96% positif mengandung tanin ditandai dengan warna hijau pekat yang menandakan golongan tanin galat, sedangkan etil asetat dan n-heksan positif mengandung tanin berwarna merah yang menandakan golongan tanin katekat.

Pengujian steroid dan terpenoid dilakukan dengan menambahkan asam asetat glasial untuk memutus gugus lain dengan gugus steroid dan terpenoid. Asam sulfat pekat ditambahkan untuk memutus ikatan gula sehingga hasil

positif akan berwarna merah. Adanya triterpenoid ditandai dengan warna merah sedangkan steroid terbentuk warna hijau. Hasil pengujian ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan mengandung senyawa steroid berwarna hijau karena steroid bereaksi dengan asam terjadi reaksi asetilasi gugus –OH. Steroid senyawa non polar, penambahan asam asetat glasial agar terbentuk turunan asetil sedangkan asam sulfat pekat untuk menghidrolisis air sehingga membentuk warna karena senyawa steroid teroksidasi melalui ikatan rangkap terkonjugasi.

Tabel 5. Data Uji Fitokimia Herba Seledri (*Apium graveolens* L.)

No	Jenis Uji	Etanol 96%	Literatur (Prema kumari <i>et al.</i> , 2019); Din <i>et al.</i> , (2015)	Etil asetat	Literatur (Prema kumari <i>et al.</i> , 2019); Din <i>et al.</i> , (2015)	n-heksan	Literatur (Prema kumari <i>et al.</i> , 2019); Din <i>et al.</i> , (2015)	Ket
1	Alkaloid							
	a. Drage ndroff	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(++)	Tidak terdapat endapan
	b. Wagner	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(++)	
	c. Mayer	(-)	(++)	(-)	(++)	(-)	(++)	
2	Flavonoid	(+++)	(+++)	(++)	(+++)	(+)	(-)	Sedikit kuning
3	Saponin	(+++)	(++++)	(++)	(++)	(+)	(+)	Berbusa
4	Tanin	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(++)	(-)	Berwarna merah
5	Steroid dan terpenoid	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	Berwarna hijau

Keterangan: (+) menunjukkan tingkat intensitas warna
 (-) menunjukkan tidak mengandung senyawa

6. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji Kromatografi lapis tipis untuk mengetahui secara kualitatif senyawa yang terkandung dalam herba seledri. 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 yang memiliki sifat

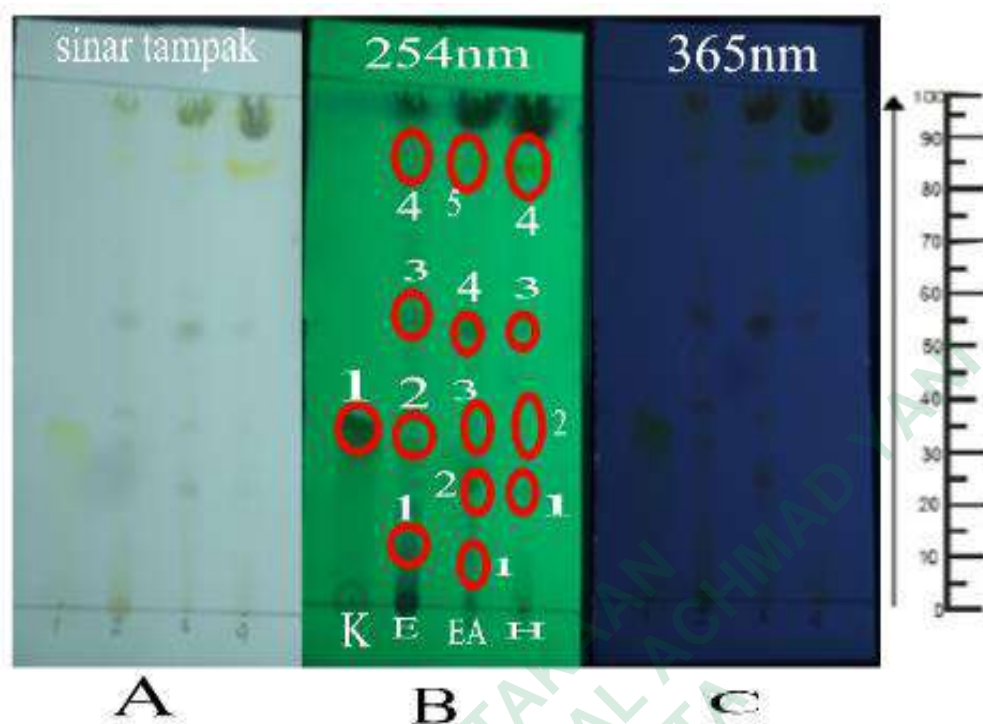
polar, dibuat sepanjang 10 cm lebar 5 cm diberi garis atas bawah 1 cm. Plat silika gel di dalam *oven* selama 1 jam dengan suhu 100°C yang bertujuan untuk menghilangkan air yang terkandung dalam plat.

Dilakukan optimasi fase gerak yang bertujuan untuk mengetahui fase gerak mana atau dengan perbandingan berapa sampel dapat memisah dengan baik dan menimbulkan bercak flavonoid tanpa ada penyebaran spot, dan berekor. Fase gerak yang digunakan pada penelitian ini adalah campuran kloroform : metanol : n-heksan dengan perbandingan (9:1:1) karena pada fase gerak tersebut menghasilkan pemisahan senyawa yang baik, kuersetin naik, dan terlihat noda pada ketiga ekstrak herba seledri. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Gwtidzo *et al.*, (2018) pada tumbuhan *Carissa bispinosa*, *Ficus sycomorus*, dan *Grewia bicolar* penggunaan pelarut tersebut menghasilkan pemisahan noda yang paling baik. Eluen yang baik terdapat noda tidak berekor, jarak noda terlihat jelas. Bejana terlebih dahulu dijenuhkan agar seluruh permukaan berisi uap fase gerak sehingga rambatannya baik dengan memasukkan kertas saring sebagai penanda bejana telah jenuh. Setelah jenuh, dilakukan penotolan menggunakan *white tip* agar penotolan baik. Ditotolkan kuersetin, ekstrak etanol 96%, ekstrak etil asetat, dan ekstrak n heksan sekali lalu dikeringkan menggunakan *hair dryer* kemudian di totolkan lagi dilakukan sebanyak 3 kali untuk memperoleh hasil yang baik.

Dimasukkan plat KLT kedalam bejana kemudian ditutup agar eluen tidak menguap dan proses elusi berjalan. Setelah mencapai batas atas plat KLT diambil dan diangin-anginkan kemudian dilihat bercak di bawah sinar UV 254 nm dan 365 nm. Noda flavonoid ditandai dengan warna kuning, atau hijau lembayung. Digunakan pembanding kuersetin karena herba seledri memiliki kandungan kuersetin, dan senyawa antioksidan yang memiliki gugus -OH fenolat sehingga dapat mendonorkan elektron. Optimasi fase gerak dapat dilihat sebagai berikut :

Tabel 6. Optimasi Fase Gerak Menggunakan Berbagai Macam Fase Gerak

No	Fase Gerak	Hasil
1	Butanol : Asam Asetat : Air (4:1:5)	Sampel 1%, terjadi penyebaran spot sampel dan pembeding, tidak terlihat adanya pemisahan senyawa
2	Butanol : Asam Asetat : Air (4:1:5)	terlihat noda pada ekstrak etanol 96%, n-heksan, etilasetat mencapai batas atas, kuersetin terjadi telling karena terlalu pekat
3	Toluen : Etil Asetat : Asam Format (7:2,5:0,5)	Rf pembeding kuersetin pekat dan naik namun ketiga sampel ekstrak tidak terlihat noda
4	Kloroform : Metanol (8:2)	Kuersetin naik ketiga sampel tidak terlihat noda
5	Kloroform : Metanol (9,5:0,5)	Kuersetin naik sedikit dan pekat, etanol dan etil asetat terlihat noda tidak terlalu jelas
6	Kloroform: Metanol : Asam Asetat Glasial (9:0,5:1)	Terjadi pelebaran spot. terlihat noda pada ekstrak etanol 96%, kuersetin terlalu tinggi
7	Metanol : kloroform : n-heksan (7:2:1)	Sampel konsentrasi 10%, Terlihat noda pada ketiga sampel ekstrak, terjadi sedikit telling pada ekstrak n-heksan, kuersetin terlalu tinggi
8	Metanol : kloroform : n-heksan (1:9:1)	Terjadi pemisahan senyawa, kuersetin naik, terlihat noda pada ketiga ekstrak



Keterangan:

- | | | |
|----------------|---|---------------------|
| A | : | Sinar tampak |
| B | : | Sinar UV 254 nm |
| C | : | Sinar UV 365 nm |
| K | : | Standar Kuersetin |
| E | : | Ekstrak Etanol 96% |
| EA | : | Ekstrak Etil asetat |
| H | : | Ekstrak n-heksan |
| 1,2,3,4, dan 5 | : | Bercak Senyawa |

Gambar 5. Bercak Ekstrak Etanol 96%, Ekstrak Etil Asetat, Ekstrak n-Heksan dan Standar Kuersetin dengan Fase Gerak Kloroform:Metanol:n-heksan (9:1:1).

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan kuersetin sebagai standar yang mana pada ekstrak etanol 96% (spot 2), etil asetat (spot 3), dan n-heksan (spot 2) terlihat bercak senyawa flavonoid yang sejajar dengan kuersetin pada sinar UV 254 nm. Bercak senyawa flavonoid ekstrak n-heksan terlihat kurang jelas pada sinar UV 365 nm sedangkan pada sinar UV 254 nm tidak terlihat bercak yang sejajar dengan kuersetin. Dilakukan penyemprotan plat menggunakan pereaksi AlCl_3 untuk memperjelas noda. Namun, setelah penyemprotan tidak terlihat perbedaan dengan plat sebelum disemprot.

Hasil Rf kuersetin, ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n- heksan adalah 0,437 cm. Nilai Rf yang didapatkan sudah cukup baik karena berdasarkan literatur syarat nilai Rf yang baik adalah 0,2-0,8 (Dewi *et al.*, 2015). Dapat dilihat nilai Rf spot pada (tabel 7).

Tabel 7. Nilai Rf Standar dan Sampel Herba Seledri

Kuersetin			Etanol 96%		Etil Asetat		n-heksan	
Spot	Rf	Teori	Spot	Rf	Spot	Rf	Spot	Rf
1	0,437	0,1-0,8	1	0,275	1	0,275	1	0,35
			2	0,437	2	0,35	2	0,437
			3	0,687	3	0,437	3	0,675
			4	0,9	4	0,675	4	0,875
					5	0,875		

7. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan menggunakan metode DPPH yang mana prinsip reaksi ini DPPH tereduksi oleh adanya proses penyumbangan elektron atau hidrogen. Pada penelitian ini DPPH berperan sebagai radikal bebas dimana senyawa ini elektronnya tidak berpasangan sehingga untuk mencapai kestabilan maka senyawa ini akan berikatan dengan senyawa lain. Pada penelitian ini DPPH akan berikatan dengan senyawa antioksidan yang menyebabkan perubahan warna ungu menjadi kuning yang sebanding dengan jumlah penyumbangan elektron dengan menurunnya absorbansi DPPH. Nilai absorbansi DPPH yang semakin menurun maka aktivitas antioksidan semakin kuat. Metode DPPH dipilih karena tanpa penambahan pereaksi lain, cepat, sampel dalam jumlah kecil, temperatur rendah sehingga sampel yang tidak tahan panas dapat menggunakan metode ini, dan konsentrasi dan penurunan absorbansi hubungannya linear. Kelemahan metode DPPH adalah harus terhindar dari cahaya, dan tidak dapat disimpan dalam waktu yang lama karena senyawa akan rusak dan menyebabkan absorbansi akan menurun. Kelemahan ini dapat diatasi dengan cara membungkus peralatan gelas yang digunakan untuk pengukuran absorbansi menggunakan aluminium foil. Dilarutkan DPPH dalam metanol pro analisis. Metanol pro analisis juga digunakan sebagai blanko untuk kalibrasi alat agar konsentrasi dimulai dari nol.

a. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang dilakukan untuk menentukan panjang gelombang antara DPPH dan senyawa antioksidan yang memberikan absorbansi yang optimum. Pada penelitian ini menggunakan pembanding berupa vitamin C. Dilarutkan menggunakan metanol karena tidak mempengaruhi reaksi DPPH dan absorbansi. Dibuat larutan vitamin C dengan berbagai konsentrasi yaitu 2, 4, 6, dan 8 ppm (lampiran 6) dalam labu ukur 5 mL ditambahkan metanol pro analisis hingga tanda batas. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada saat suatu senyawa yang diukur memberikan absorbansi optimum. Pengukuran memiliki sensitifitas yang tinggi pada absorbansi yang paling optimum. Perbedaan konsentrasi akan memberikan perubahan pula pada absorbansi. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengukur larutan DPPH pada spektrofotometer diatur panjang gelombang 400-600 nm. Didapat panjang gelombang maksimum 515 nm seperti hasil penelitian sebelumnya didapatkan panjang gelombang 515 nm, banyaknya elektron yang didonorkan oleh senyawa antioksidan sebanding dengan jumlah konsentrasi sampel dalam meredam radikal DPPH sehingga nilai absorbansi sebanding dengan elektron yang didonorkan (Wulandari *et al.*, 2015). Berdasarkan teori panjang gelombang maksimum DPPH berada di kisaran 400-600 nm (Souhoka *et al.*, 2021). Hasil *scanning* panjang gelombang dapat dilihat pada (lampiran 7.)

b. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu yang diperlukan pembanding vitamin C dan DPPH untuk bereaksi secara optimal. Fungsi penentuan *operating time* untuk meminimalkan kesalahan pengukuran aktivitas antioksidan. Diukur absorbansi DPPH yang sudah ditambah dengan vitamin C menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 nm. Penentuan *operating time* dapat dilihat dari nilai absorbansi mulai stabil atau jarak nilai absorbansi tiap waktu mulai turun. Penentuan *operating time* dilakukan selama 5-60 menit. Hasil

penentuan *operating time* didapatkan nilai absorbansi stabil pada menit ke-30 yang artinya pada menit ke-30 senyawa antioksidan sudah bereaksi dengan DPPH.

c. Presisi Standar Vitamin C

Dibuat presisi standar vitamin C dengan menimbang sebanyak 6 kali vitamin C 8 ppm diencerkan dalam labu ukur 5 mL kemudian dibaca absorbansinya. Presisi adalah ukuran kedekatan antar hasil penelitian pada sampel homogen dari keterulangan analisis. Tujuan dibuat presisi ini adalah untuk melihat jarak hasil uji antara satu dengan yang lainnya setelah dilakukan secara berulang pada sampel. Nilai presisi dinyatakan dengan RSD (*Relative Standar Deviation*) yang didapat adalah 1,274% tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antar pengulangan menurut literatur sudah baik karena nilai RSD ≤ 2 (Nurul dan Dani, 2020). Jika hasil pengukuran berdekatan (nilai RSD semakin rendah) maka presisi tinggi (semakin baik) dan sebaliknya.

Tabel 8. Data Presisi Standar Vitamin C Konsentrasi 8 ppm

No	Sampel	Absorbansi
1.	Blanko	0,592
2.	Presisi standar (1)	0,465
3.	Presisi standar (2)	0,468
4.	Presisi standar (3)	0,464
5.	Presisi standar (4)	0,462
6.	Presisi standar (5)	0,451
7.	Presisi standar (6)	0,464

d. Pengujian Aktivitas Antioksidan Vitamin C dengan DPPH

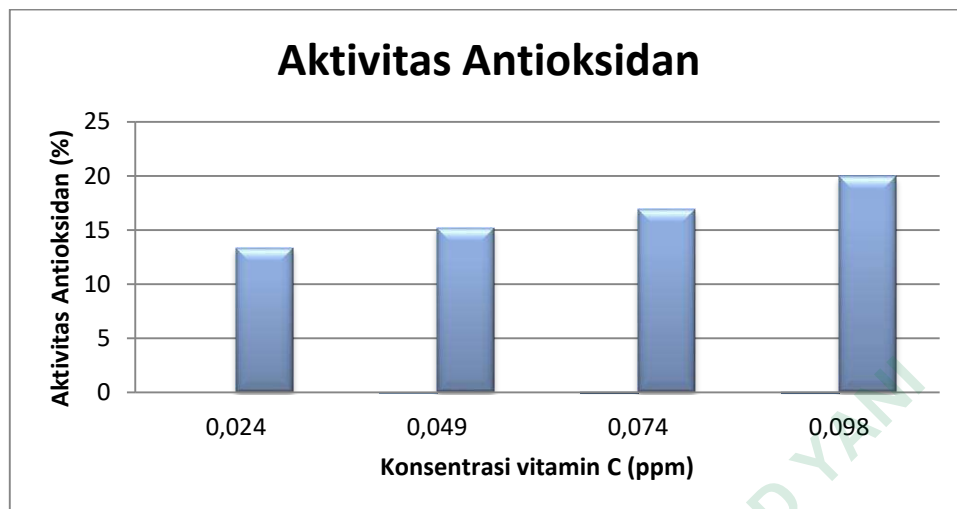
Pengujian DPPH dan vitamin C dilakukan dengan mengambil sebanyak 50 μL vitamin C dan 4000 μL DPPH ditutup aluminium foil agar terhindar dari cahaya didiamkan selama 30 menit kemudian diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer *UV-Vis*. Didiamkan selama 30 menit agar reaksi antara senyawa antioksidan dan radikal bebas bereaksi secara optimal.

Tabel 9. Data Aktivitas Antioksidan Vitamin C dengan DPPH

Konsentrasi Vitamin C (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
0,025	1	0,528	0,513	13,344	0,449
	2	0,506			
	3	0,506			
0,050	1	0,524	0,502	15,202	
	2	0,495			
	3	0,487			
0,075	1	0,500	0,492	16,891	
	2	0,491			
	3	0,486			
0,098	1	0,497	0,474	19,932	
	2	0,466			
	3	0,461			
Absorbansi DPPH					0,592

Hasil data aktivitas antioksidan vitamin C yang dinyatakan dalam % peredaman radikal bebas (tabel 9) kemudian diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linear $y=86,723x + 11,030$. Hasil tersebut digunakan untuk menghitung IC₅₀ dan diperoleh hasil sebesar 0,449 µg/ml yang artinya dengan konsentrasi tersebut dapat meredam radikal bebas DPPH sebanyak 50%, hasil tersebut dikategorikan antioksidan sangat aktif. Hal ini dikarenakan vitamin C merupakan antioksidan sintetik dan murni sehingga peredaman terhadap radikal bebas sangat aktif.

Parameter IC₅₀ digunakan sebagai besarnya kemampuan vitamin C sebagai antioksidan. Nilai ini menunjukkan konsentrasi senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai ini didapatkan dari persamaan regresi linear konsentrasi sebagai sumbu x dan persen inhibisi sebagai sumbu y. Semakin kecil nilai IC₅₀ artinya semakin kuat pula senyawa antioksidan dalam menangkal radikal DPPH.



Gambar 6. Grafik Perbandingan Konsentrasi dan Aktivitas Antioksidan Vitamin C

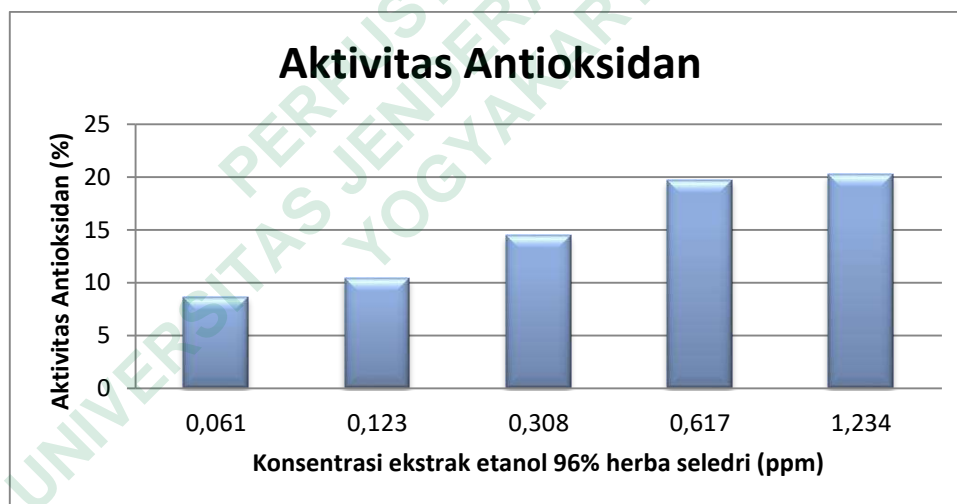
Hubungan linear antara konsentrasi vitamin C dengan absorbansi (Lampiran 9) terjadi pada daerah konsentrasi 0,02 ppm hingga 0,09 ppm yang mana pada konsentrasi tersebut menghasilkan nilai absorbansi yang baik (tabel 9). Absorbansi yang baik berada di rentang 0,2-0,8 karena pembiasan cahaya yang menyebabkan kesalahan fotometrik minimal berada kisaran daerah tersebut. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan menggunakan konsentrasi tersebut.

- e. Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% herba seledri dengan DPPH

Pengujian antioksidan sampel ekstrak herba seledri sebanyak 5 mg ekstrak dilarutkan dalam metanol pro analisis ditambahkan hingga tanda batas 10 mL. Dibuat konsentrasi 5, 10, 25, 50, dan 100 ppm ditambahkan metanol pro analisis hingga tanda batas 5 mL. Pengujian dilakukan dengan memasukkan 50 μ L sampel dan 4000 μ L DPPH kemudian ditunggu selama 30 menit lalu di lihat nilai absorbansinya pada spektrofotometri *UV-Vis*.

Tabel 10. Data Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Herba Seledri dengan DPPH

Konsentrasi herba seledri (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
0,061	1	0,759	0,771	8,649	4,084
	2	0,780			
	3	0,775			
0,123	1	0,758	0,756	10,426	
	2	0,753			
	3	0,758			
0,308	1	0,735	0,722	14,454	
	2	0,697			
	3	0,734			
0,617	1	0,675	0,678	19,668	
	2	0,676			
	3	0,683			
1,234	1	0,688	0,673	20,260	
	2	0,649			
	3	0,683			
Absorbansi DPPH					0,844



Gambar 7. Grafik Perbandingan Konsentrasi Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Herba Seledri

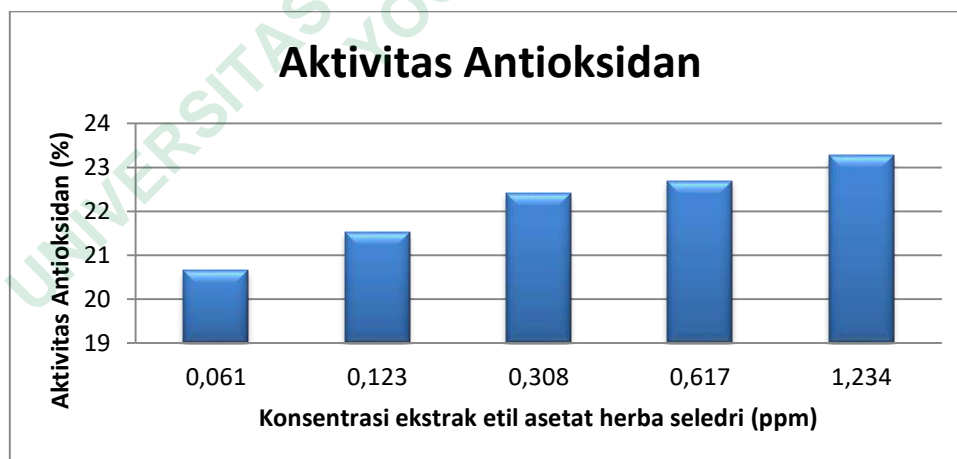
Hasil data aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% yang dinyatakan dalam % peredaman radikal bebas (tabel 10) kemudian diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linear $y = 9,764x + 10,115$. Hasil tersebut digunakan untuk menghitung IC₅₀ dan diperoleh hasil sebesar 4,084 µg/mL yang artinya dengan konsentrasi

tersebut dapat meredam radikal bebas DPPH sebanyak 50%, hasil tersebut dikategorikan antioksidan sangat aktif.

f. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat dengan DPPH

Tabel 11. Data Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Herba Seledri dengan DPPH

Konsentrasi herba seledri (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
0,061	1	0,544	0,542	20,644	15,250
	2	0,544			
	3	0,539			
0,123	1	0,540	0,536	21,522	
	2	0,534			
	3	0,536			
0,308	1	0,529	0,530	22,401	
	2	0,532			
	3	0,530			
0,617	1	0,531	0,528	22,693	
	2	0,529			
	3	0,526			
1,234	1	0,524	0,524	23,279	
	2	0,526			
	3	0,523			
Absorbansi DPPH					0,683



Gambar 8. Grafik Perbandingan Konsentrasi dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Herba Seledri

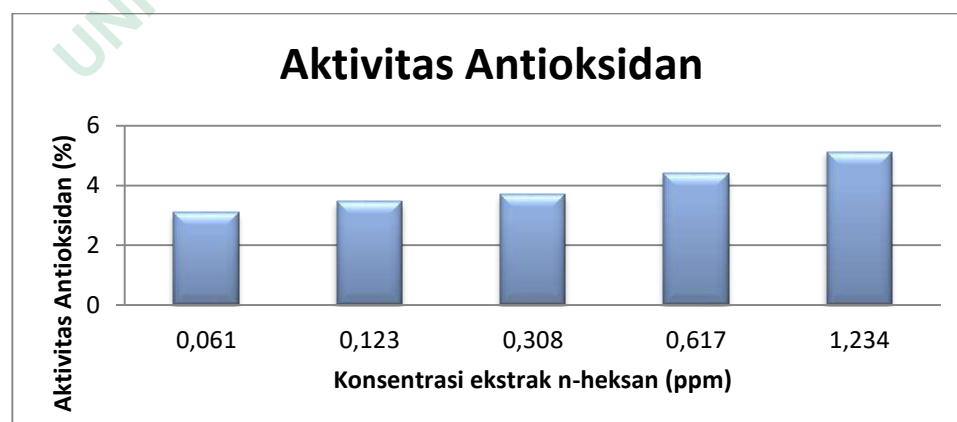
Hasil data aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat yang dinyatakan dalam % peredaman radikal bebas (tabel 11) kemudian diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linear $y=1,887x+21,223$

Hasil tersebut digunakan untuk menghitung IC_{50} dan diperoleh hasil sebesar 15,250 $\mu\text{g/mL}$ yang artinya dengan konsentrasi tersebut dapat meredam radikal bebas DPPH sebanyak 50%, hasil tersebut dikategorikan antioksidan sangat aktif.

- g. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak n- Heksan Herba Seledri dengan DPPH

Tabel 12. Data Aktivitas Antioksidan Ekstrak n-Heksan Herba Seledri dengan DPPH

Konsentrasi herba seledri (ppm)	Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
0,061	1	0,813	0,813	3,098	28,206
	2	0,814			
	3	0,813			
0,123	1	0,812	0,810	3,456	
	2	0,811			
	3	0,809			
0,308	1	0,810	0,808	3,694	
	2	0,809			
	3	0,807			
0,617	1	0,803	0,802	4,410	
	2	0,802			
	3	0,802			
1,234	1	0,791	0,796	5,125	
	2	0,797			
	3	0,800			
Absorbansi DPPH					0,839



Gambar 9. Grafik perbandingan konsentrasi dan aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan herba seledri

Hasil data aktivitas antioksidan ekstrak n-heksan yang dinyatakan dalam % peredaman radikal bebas (tabel 12) kemudian diplotkan terhadap konsentrasi sehingga diperoleh persamaan regresi linear $y = 1,660x + 3,178$. Hasil tersebut digunakan untuk menghitung IC_{50} dan diperoleh hasil sebesar 28,206 $\mu\text{g/mL}$ yang artinya dengan konsentrasi tersebut dapat meredam radikal bebas DPPH sebanyak 50%, hasil tersebut dikategorikan antioksidan sangat aktif.

Tabel 13. Tingkat Kekuatan Antioksidan Vitamin C, Ekstrak Etanol 96%, Etil Asetat, dan n-heksan dengan Metode DPPH

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Kekuatan antioksidan				
		Sangat aktif ($<50\mu\text{g/mL}$)	Aktif (50-100 $\mu\text{g/mL}$)	Sedang (101- 250 $\mu\text{g/mL}$)	Lemah (250- 500 $\mu\text{g/mL}$)	Tidak aktif (>500 $\mu\text{g/mL}$)
Vitamin C	0,449	√				
Ekstrak etanol 96%	4,084	√				
Etil asetat	15,250	√				
n-heksan	28,206	√				

h. Analisis Data

Terdapat perbedaan nilai IC_{50} vitamin C, ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan sehingga untuk memastikan adanya perbedaan maka dilakukan uji statistik menggunakan *software* SPSS *statistic* 25. Pertama, dilakukan uji normalitas data untuk mengetahui data terdistribusi normal atau tidak menggunakan *shapiro wilk* karena data sampel kurang dari 50. Hasil pengujian nilai IC_{50} dari vitamin C, ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan terdistribusi normal karena $p\text{-value} > 0,05$ yaitu vitamin C 0,762 ; etanol 96% 0,621 ; etil asetat 0,983 ; n-heksan 0,768.

Kedua, dilakukan uji homogenitas karena data terdistribusi normal untuk melihat adanya kesamaan atau tidak (homogen atau tidak) dari varian sampel data nilai IC_{50} vitamin C dan ekstrak herba seledri menggunakan *levene* yang mana jika data $> 0,05$ maka dikatakan data

homogen, jika $<0,05$ maka data tidak homogen (terdapat perbedaan). Hasil uji homogenitas didapat 0,032 yang artinya data tidak homogen. Hasil ini tidak memenuhi syarat untuk dilakukan uji *One Way ANOVA* karena uji ini data normalitas harus normal dan homogen. Data yang terdistribusi normal dan tidak homogen dilanjutkan uji *Brown Forsythe* dan uji *Wetch*.

Diperoleh hasil statistik uji *Wetch* 75,826 dengan signifikansi 0,001 dan nilai statistik uji *Brown Forsythe* 22,890 dengan signifikansi 0,035, uji keduanya memiliki signifikansi $>0,05$ maka dapat dinyatakan homogen. Hasil uji normalitas terdistribusi normal dan hasil uji homogenitas data homogen sehingga dilanjutkan uji *One Way ANOVA* karena data > 2 kelompok. Didapatkan hasil 0,000 maka data $<0,05$ menandakan adanya perbedaan yang bermakna. Dilakukan uji lanjutan atau *Post Hoc* menggunakan uji *Games-Howell* yaitu untuk melihat perbandingan antar kelompok rata-rata. Uji *Post Hoc* dilakukan dengan tujuan melihat kelompok mana yang berbeda tapi jika data tidak ada perbedaan maka tidak dilanjutkan uji *Post Hoc*. Hasilnya dapat dilihat di lampiran 9. Pada kolom "*Mean Difference*" jika ada tanda * menunjukkan adanya perbedaan atau signifikan jika tidak ada tanda * maka perbedaan tidak signifikan.

Tabel 14. Hasil Uji Statistik Data Aktivitas Antioksidan

Kelompok	Distribusi Data	Uji Homogenitas	uji <i>Brown Forsythe</i>	Uji <i>Watch</i>	<i>One Way ANOVA</i>
Vitamin C	0,726				
Ekstrak	0,621				
Etanol 96%		0,032	0,001	0,035	0,000
Etil Asetat	0,983				
n-heksan	0,768				

B. Pembahasan

Pada pengujian fitokimia dilakukan uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid. Hasil ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan herba seledri negatif alkaloid dan positif mengandung flavonoid, saponin, dan steroid. Pada uji yang dilakukan oleh Premakumari *et al.*, (2019) hasil uji alkaloid positif

dikarenakan terjadi pengendapan akibat pengompleksan atom nitrogen sampel bereaksi dengan ion logam K^+ pada pereaksi. Pada pengujian alkaloid ketiga ekstrak herba seledri tidak menunjukkan hasil positif dengan menggunakan pereaksi Wagner, Dragendorff, dan Mayer. Alkaloid mempunyai atom nitrogen di dalam jaringan tumbuhan. Alkaloid pada tumbuhan berjumlah sedikit dan untuk mendapatkan senyawa ini perlu memisahkan dari senyawa campuran lain (Ningrum *et al.*, 2016). Pada penelitian yang dilakukan oleh Kollab dan Salma (2017) yang menyatakan bahwa uji kuantitatif pada flavonoid *Apium graveolens* L. Sebanyak 40%, saponin 32%, sedangkan alkaloid hanya berjumlah 8%. Jumlah yang sedikit ini lah yang menyebabkan uji kualitatif menggunakan pereaksi alkaloid negatif. Diperkuat dengan penelitian yang dilakukan Wullur *et al.*, (2012) pada uji alkaloid menghasilkan kekeruhan pada sampel namun tidak terjadi pengendapan dikarenakan tidak semua senyawa alkaloid dapat mengendap dengan ditambahkannya pereaksi. Mengendapnya senyawa alkaloid bergantung pada jenis alkaloid. Hasil ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan positif mengandung flavonoid seperti penelitian yang telah dilakukan oleh Hidayat (2004) yang menyatakan bahwa pada pelarut polar etanol, kloroform, n-heksan dapat menarik senyawa flavonoid dengan hasil positif warna jingga. Menurut Wagner dan Blatt (2001) senyawa flavonoid berfluoresensi, berwarna hijau, biru atau kuning. Pada penelitian yang dilakukan oleh Din *et al.*, (2015) herba seledri memiliki kandungan flavonoid, saponin, tanin dan steroid yang diekstraksi menggunakan pelarut metanol, etanol, dan heksan. Flavonoid dalam jumlah yang banyak disebabkan banyaknya tingkat glikosilasi, alkoksilasi dan hidroksiasi pada strukturnya (Julianto, 2019). Menurut ridho *et al.*, (2013) Reaksi oksidasi dapat dihambat oleh senyawa flavonoid sebagai pereduksi. Flavonoid dapat mendonorkan elektron untuk radikal bebas sehingga dapat dijadikan senyawa antioksidan.

Pada pengujian kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk mempertegas hasil dari uji fitokimia dan dapat menjadi bukti adanya suatu senyawa yang terkandung dalam sampel. Didapat bercak pada ekstrak etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan sebanding dengan kuersetin dengan fase gerak kloroform : metanol :

n-heksan (9:1:1) didapat nilai Rf 0,437 pada kuersetin, etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan dengan menunjukkan pemisahan yang baik dan diduga mempunyai aktivitas antioksidan. Nilai Rf sampel yang sama dengan nilai Rf kuersetin menandakan ketiga ekstrak herba seledri dapat dikatakan mengandung senyawa yang sama dengan kuersetin yaitu senyawa flavonoid. Menurut Gandjar dan Rohman (2007) senyawa tertentu dan fase gerak tertentu mempengaruhi nilai Rf yang didapatkan. Kepolaran rendah akan menghasilkan Rf besar, dan sebaliknya. Fase diam memiliki sifat polar, ketika senyawa lebih polar maka akan semakin tertahan pada fase diam sehingga nilai Rf rendah. Menurut Markham (1988) menyatakan bahwa pemisahan yang baik adalah pemisahan yang memiliki banyak senyawa yang terpisah, tidak berekor dan noda terlihat dengan jelas. Pada ekstrak etanol hanya memiliki 4 spot dikarenakan etanol 96% bersifat polar sehingga banyak yang tertahan di fase diam yang memiliki sifat polar juga. Perbandingan yang digunakan adalah kuersetin karena biasa dipakai pada isolasi flavonoid dengan warna noda kuning. Menurut Chang *et al.*, (2002) kuersetin merupakan aglikon flavonoid sub kelas flavonol. Senyawa flavonol pada atom C-4 terdapat gugus keto dan pada atom C-3 dan C-5 terdapat gugus-gugus hidroksi.

Pada penelitian ini, diperoleh IC_{50} ekstrak etanol 96% herba seledri memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 4,084 $\mu\text{g/mL}$, diikuti etil asetat 15,250 $\mu\text{g/mL}$, dan n-heksan 28,206 $\mu\text{g/mL}$ ketiga ekstrak dapat dikategorikan aktivitas antioksidan sangat aktif. Dari hasil tersebut ekstrak etanol 96% memiliki IC_{50} tertinggi diikuti ekstrak etil asetat dan n-heksan. Hal ini dibuktikan dengan uji fitokimia yang telah dilakukan bahwa pada ekstrak etanol 96% pada setiap uji senyawa memiliki intensitas warna yang lebih kuat diikuti etil asetat dan n-heksan. Dimungkinkan bahwa semakin tinggi intensitas warna maka semakin banyak pula senyawa yang terkandung. Semakin banyak senyawa maka semakin baik dalam meredam radikal DPPH. Senyawa flavonoid mempunyai sifat polar sehingga akan lebih banyak terlarut dalam pelarut polar dan etanol 96% memiliki dua gugus yang kepolarannya berbeda yaitu gugus hidroksil yang bersifat polar dan gugus alkil yang bersifat non polar maka senyawa dengan kepolaran yang berbeda dapat terekstrak seluruhnya. Namun pada pelarut semi

polar (etil asetat) dan non polar (n-heksan) memiliki aktivitas antioksidan yang sangat aktif juga kemungkinan adanya senyawa lain yang memiliki aktivitas antioksidan seperti tanin dan saponin. Menurut Zeuthen dan Sorensen (2003), tanin sebagai antioksidan karena dapat menstabilkan fraksi lipid dan menghambat lipooksigenase. Pada penelitian sebelumnya, jenis pelarut dan tingkat kepolaran yang digunakan saat mengekstraksi mempengaruhi jumlah senyawa yang tertarik dan mempengaruhi aktivitas antioksidan (Lusiana *et al.*, 2014). Flavonoid tergolong polifenol yang memiliki gugus hidroksil (OH) dan dapat mendonorkan atom hidrogen untuk berikatan dengan senyawa radikal bebas sehingga akan menjadi stabil. Alasan penggunaan etanol 96% berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Lusiana *et al.*, (2014) pelarut alkohol 70% digunakan untuk mengekstraksi akar, batang dan kayu, alkohol 50% untuk menghindari klorofil, resin, dan polimer sedangkan etanol 96% dapat menyari lebih banyak senyawa dengan parameter kadar fenolik dan flavonoid.

Pada penelitian ini digunakan pembanding standar vitamin C karena merupakan antioksidan yang dapat menangkap dan menghentikan radikal bebas larut air karena vitamin C bersifat polar (ridho *et al.*, 2013). Mekanisme vitamin C sebagai antioksidan dengan menangkap O_2 (anion superoksida) dan singlet oksigen. Vitamin C dapat memutus reaksi radikal bebas, aktivitas antioksidannya tinggi, dan mudah didapatkan. Vitamin C memiliki gugus hidroksi bebas yang dapat meredam radikal bebas (Isnadar, 2011). Vitamin C digunakan sebagai pembanding aktivitas antioksidan pada sampel herba seledri dengan 3 pelarut. Jika nilai IC_{50} sampel mendekati IC_{50} vitamin C artinya sampel herba seledri memiliki potensi alternatif antioksidan.

Hasil dari pengujian aktivitas antioksidan vitamin C dan herba seledri memiliki perbedaan nilai. Hal ini dikarenakan vitamin C merupakan senyawa murni sedangkan herba seledri tidak murni dan masih banyak senyawa-senyawa lain yang tidak memiliki aktivitas antioksidan. Dari ketiga pelarut yang nilai IC_{50} nya besar adalah n-heksan. Berdasarkan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa etil asetat memiliki nilai IC_{50} 13,084 $\mu\text{g/mL}$ lebih baik dibanding n-heksan dengan nilai IC_{50} 23,737 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak etil asetat herba seledri efektif dalam

meredam radikal bebas berhubungan dengan sifat pelarut etil asetat semi polar sehingga banyak komponen bioaktif yang terlarut dibanding n-heksan yang bersifat non polar (Yosina *et al.*, 2015). Sehingga nilai IC₅₀ etil asetat lebih kuat dibanding n-heksan.

Hasil analisis statistika aktivitas antioksidan menggunakan *one way* ANOVA menunjukkan bahwa semua kelompok antioksidan memberikan nilai signifikan <0,05 yaitu dengan nilai 0,000 yang artinya ada perbedaan yang signifikan antara pelarut etanol 96%, etil asetat, dan n-heksan.

PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS JENDERAL ACHMAD YANI
YOGYAKARTA