

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi tanaman

Daun jambu biji yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari tempat budidaya di Kecamatan Grabag, Kabupaten Purworejo, Jawa Tengah pada bulan Juni 2022. Determinasi tanaman dilakukan di Fakultas Biologi Laboratorium Sistematika Tumbuhan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pada tanggal 25 Mei 2022 dengan nomor 088/S.Tb./V/2022. Tujuan dilakukan determinasi adalah untuk mendapatkan kebenaran identitas dari tanaman yang diteliti dan menghindari adanya kesalahan dalam pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian. Hasil determinasi dapat dilihat pada **Lampiran 2**.

2. Ekstraksi dan fraksinasi

a. Ekstraksi

Serbuk halus daun jambu biji yang diperoleh kemudian diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol 50% dan 100% dengan perbandingan 1:10. Pada proses maserasi ini, pelarut metanol 50% dan 100% akan masuk melewati dinding sel, kemudian daun jambu biji akan mengalami pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel, sehingga zat aktif akan terdesak keluar. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia daun jambu biji masing- masing sebanyak 250 g menggunakan 2,5 L metanol teknis 50% dan 100% selama 5 hari disimpan ditempat gelap tidak terkena cahaya matahari dan diaduk tiap 8 jam. Tujuan dilakukan pengadukan yang berulang agar dapat mempercepat waktu larutan penyari dalam mengekstraksi sampel (Melani *et al.*, 2022). Kemudian di remaserasi sebanyak 6 kali selama 6 hari dengan jumlah pelarut metanol 50% dan 100% setengah dari volume maserasi, yaitu masing-masing sebanyak 1,250 mL dan disimpan kembali. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan

menjadi satu kemudian diuapkan menggunakan penangas air dengan suhu dibawah 50°C agar senyawa yang terkandung dalam sampel tidak rusak.

Nilai rendemen ekstrak daun jambu biji dengan dua konsentrasi yaitu metanol 100% dan metanol 50%. Data hasil penelitian (**Tabel 4**) menunjukkan bahwa konsentrasi metanol 50% mampu menghasilkan rendemen ekstrak daun jambu biji tertinggi dibandingkan dengan metanol konsentrasi 100%. Hal ini sesuai dengan penelitian Permatasari *et al.*, (2020), bahwa semakin tinggi konsentrasi metanol yang digunakan tidak meningkatkan rendemen ekstrak yang dihasilkan. Semakin tinggi konsentrasi metanol maka semakin rendah tingkat kepolaran pelarutnya. Suatu zat dapat tertarik dan terlarut, apabila pelarut yang digunakan mempunyai tingkat kepolaran yang sama (Putra *et al.*, 2021). Rendemen ekstrak yang didapatkan dihitung sebagai persentase perbandingan berat ekstrak kental yang diperoleh terhadap berat serbuk daun jambu biji yang dipakai saat maserasi dikali seratus persen.

Tabel 4. Hasil Rendemen 2 Konsentrasi Ekstrak Kental Daun Jambu Biji

Sampel	Berat Simplisia (g)	Berat Wadah + Ekstrak (g)	Berat Wadah Kosong (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)
Daun jambu biji metanol 100%	250	302,64	157,65	144,99	57,996
Daun jambu biji metanol 50%	250	367,7	164,66	230,04	81,216

b. Fraksinasi

Ekstrak metanol 50% dan 100% daun jambu biji yang diperoleh dari hasil maserasi masih mengandung banyak senyawa. Fraksinasi dapat menarik senyawa yang lebih spesifik atau murni. Prinsip dari metode fraksinasi ini yaitu penarikan senyawa pada suatu ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya menggunakan dua pelarut yang tidak saling

bercampur sehingga akan membentuk dua lapisan. Tujuan dilakukan fraksinasi yaitu untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya (Anjaswati *et al.*, 2021).

Fraksinasi dilakukan secara bertingkat menggunakan corong pisah dengan menggunakan tiga pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu *n*-heksan bersifat non polar untuk menarik senyawa yang bersifat non polar, etil asetat bersifat semi polar untuk menarik senyawa yang bersifat semi polar, dan air bersifat polar untuk menarik senyawa yang bersifat polar. Fraksinasi dilakukan hingga pelarut *n*-heksan dan etil asetat tidak berwarna pekat lagi, yang menandakan bahwa tidak ada lagi senyawa yang tersari dalam pelarut. Dari hasil yang didapatkan kemudian dihitung rendemen masing-masing fraksi yang ditunjukkan pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Hasil Rendemen 3 Fraksi 2 Konsentrasi

Fraksi	Berat Simplisia (g)	Berat Wadah + Fraksi (g)	Berat Wadah Kosong (g)	Berat Fraksi (g)	Rendemen (%)
Daun Jambu Biji Konsentrasi 100%					
Air	250	16,254	12,334	3,919	1,568
Etil Asetat	250	16,031	13,524	2,507	1,003
<i>n</i> -Heksan	250	13,539	12,265	1,274	0,510
Daun Jambu Biji Konsentrasi 50%					
Air	250	16,180	12,428	3,752	1,501
Etil Asetat	250	18,362	13,334	5,028	2,011
<i>n</i> -Heksan	250	133,922	96,440	37,482	14,993

Persentase rendemen yang didapatkan dari masing-masing fraksi berbeda-beda, hal ini disebabkan karena adanya perbedaan kemampuan menarik senyawa masing-masing pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi.

3. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan yang bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia dalam suatu sampel uji.

Tabel 6. Hasil Skrining Fitokimia

No	Golongan	Fraksi dan Konsentrasi						Keterangan
		Air 100 %	Etil Asetat 100%	<i>n</i> - Heksa n 100%	Air 50 %	Etil Asetat 50%	<i>n</i> - Heksa n 50%	
1	Alkaloid (Mayer)	+	-	-	+	+	+	Endapan putih hingga kekuningan
	Alkaloid (Bouchard at)	+	+	+	+	+	+	Endapan coklat kehitaman
	Alkaloid (Dragendor ff)	+	+	+	+	+	+	Endapan kuning jingga Warna merah /kuning
2	Flavonoid	+	-	-	+	+	-	Warna merah /kuning
3	Fenolik	+	+	+	+	+	-	Warna biru
4	Saponin	+	-	-	+	-	-	Terbentuk buih
5	Tanin	+	+	+	+	+	-	Warna hijau kehitaman
6	Steroid	-	+	-	-	-	-	Warna biru/ungu
	Terpenoid	+	-	+	-	-	-	Warna merah/kuning

Pada pengujian alkaloid, tujuan penambahan asam klorida adalah untuk mengekstrak alkaloid yang bersifat basa dengan menggunakan larutan asam. Pengujian alkaloid dilakukan dengan menggunakan 3 pereaksi yaitu Mayer, Dragendorf, dan Bouchardat. Hasil positif senyawa alkaloid pada pereaksi Mayer ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih hingga kekuningan. Senyawa alkaloid akan berinteraksi dengan ion tetraiodomercurat (II) sehingga membentuk senyawa kompleks dan mengendap. Hal ini dikarenakan ion merkuri merupakan ion logam berat yang mampu mengendapkan senyawa alkaloid yang bersifat basa (Sulistyarini *et al.*, 2020).

Pada pereaksi Dragendorf, senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuk endapan berwarna kuning atau jingga, karena senyawa alkaloid akan berinteraksi dengan ion tetraiodobismutat (III) (Sulistyarini *et al.*, 2020). Hasil positif pada Bouchardat ditandai dengan terbentuknya endapan coklat kehitaman. Endapan yang terbentuk terjadi karena adanya ikatan kovalen koordinasi antara ion logam K^+ dengan alkaloid sehingga terbentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Sulistyarini *et al.*, 2020). Berdasarkan hasil terdapat senyawa alkaloid pada seluruh sampel, sedangkan pada fraksi etil asetat 100% dan *n*-heksan 100% didapatkan hasil positif pada dua pereaksi yaitu Bouchardat dan Dragendorf.

Pada pengujian flavonoid, keenam fraksi ditambahkan dengan serbuk magnesium dan asam klorida pekat. Penambahan Mg dan HCl pekat menunjukkan senyawa flavonoid akan tereduksi dengan Mg dan HCl pekat sehingga menghasilkan warna merah atau kuning (Sulistyarini *et al.*, 2020). Hasil menunjukkan bahwa fraksi air 100%, fraksi air 50% dan etil asetat 50% positif mengandung flavonoid, sedangkan fraksi *n*-heksan 100%, etil asetat 100% dan *n*-heksan 50% negatif.

Pada pengujian fenolik, keenam fraksi ditambahkan dengan reagen Folin-Ciocalteu bertujuan untuk mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat dalam pereaksi Folin-Ciocalteu menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten. Senyawa fenolik bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu hanya dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat. Untuk membuat kondisi basa digunakan Na_2CO_3 7,5% (natrium karbonat) (Alfian *et al.* 2012). Hasil menunjukkan bahwa fraksi air 100%, fraksi etil asetat 100%, fraksi *n*-heksan 100%, fraksi air 50%, dan fraksi etil asetat 50% positif mengandung fenolik dengan ditandai adanya warna biru, sedangkan fraksi *n*-heksan 50% menunjukkan hasil negatif.

Pada pengujian saponin, keenam fraksi ditambahkan aquades lalu dikocok selama 1 menit dan didiamkan \pm 3 menit. Hasil positif menunjukkan bahwa fraksi air 100% dan fraksi air 50% positif mengandung saponin karena

terbentuk bucha yang stabil setinggi 2-3 cm, sedangkan pada fraksi *n*-heksan 100%, fraksi etil asetat 100%, fraksi etil asetat 50% dan fraksi *n*-heksan 50% hasilnya negatif karena tidak terbentuk busa yang stabil. Timbul buih yang stabil disebabkan karena glikosida memiliki kemampuan memperoleh buih pada air lalu mengalami hidrolisis menjadi glukosa serta senyawa lainnya (Sulistyarini *et al.*, 2020).

Pada pengujian tanin, keenam fraksi ditambahkan dengan besi (III) klorida. Senyawa tanin bersifat polar karena adanya gugus OH, oleh karena itu ketika sampel ditambahkan besi (III) klorida akan terjadi perubahan warna seperti hijau kehitaman yang menandakan adanya senyawa tanin (Sulistyarini *et al.*, 2020). Hasil menunjukkan bahwa fraksi air 100%, fraksi etil asetat 100%, fraksi *n*-heksan 100%, fraksi air 50%, dan fraksi etil asetat 50% positif mengandung senyawa tanin, sedangkan fraksi *n*-heksan 50% negatif.

Pada pengujian steroid, keenam fraksi ditambahkan asam asetat glasial untuk membentuk turunan asetil, sedangkan penambahan H₂SO₄ bertujuan untuk menghidrolisis air yang bereaksi dengan turunan asetil membentuk larutan warna. Perubahan warna terbentuk karena terjadinya oksidasi pada senyawa steroid/triterpenoid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (Sulistyarini *et al.*, 2020). Hasil menunjukkan bahwa fraksi air 100% dan *n*-heksan 100% positif mengandung senyawa triterpenoid karena adanya perubahan warna seperti merah atau kuning, pada fraksi etil asetat 100% positif mengandung steroid karena adanya perubahan warna seperti biru atau ungu, sedangkan pada fraksi air 50%, fraksi etil asetat 50% dan *n*-heksan 50% menunjukkan hasil negatif.

4. Perbandingan pelarut uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH
 - a. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang yang akan digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yang menghasilkan absorbansi maksimum. Panjang gelombang ditentukan dengan mengukur larutan DPPH yang direaksikan

dengan kuersetin pada rentang panjang gelombang 450-550 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 516 nm.

b. Penentuan *operating time* DPPH

Penentuan *operating time* bertujuan untuk mengetahui waktu pengukuran DPPH yang memberikan absorbansi stabil. Penentuan *operating time* dilakukan dengan mereaksikan 2 mL DPPH dengan 1 mL kuersetin 2 ppm yang kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm tiap 1 menit selama 45 menit. *Operating time* DPPH yang diperoleh adalah 26 menit.

c. Pengujian aktivitas antioksidan kuersetin dengan DPPH

Standar pembanding antioksidan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuersetin karena sudah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Pengujian aktivitas antioksidan kuersetin dilakukan dengan mereaksikan 1 mL seri konsentrasi kuersetin dengan 2 mL DPPH kemudian didiamkan selama 26 menit, kemudian 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.

Persen peredaman radikal menyatakan besarnya kemampuan peredaman radikal bebas oleh suatu sampel. Sedangkan *Inhibitor 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 nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} kuersetin yang diperoleh adalah $2,931 \pm 0,041$ 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 jambu biji metanol 50% dan 100% dengan DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan pada fraksi air metanol 50% dan 100%, menggunakan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm, fraksi etil asetat metanol 50% dan 100% menggunakan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm, sedangkan fraksi *n*-heksan 50% menggunakan konsentrasi 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, dan 500.000 ppm, dan fraksi *n*-heksan 100% menggunakan konsentrasi 1000, 2500, 4000, 5500, dan 7000 ppm. Tiap seri konsentrasi diambil 1 mL ditambah 2 mL DPPH kemudian didiamkan selama 26 menit. Dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm. Pengujian diulangi sebanyak 3x. Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang didapatkan dari hubungan antara konsentrasi sampel dengan persen peredaman radikal bebas. Hasil penelitian ditunjukkan pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Hasil Nilai IC₅₀ pada Sampel Fraksi Daun Jambu Biji

No.	Fraksi	Nilai IC ₅₀ ±SEM	Kategori Antioksidan
	Kuersetin	2,931±0,041	Sangat Kuat
Daun Jambu Biji Metanol 100%			
1	Air	131,167±1,039	Sedang
2	Etil Asetat	129,911±1,204	Sedang
3	<i>n</i> -Heksan	5044,408±9,100	Sangat Lemah
Daun Jambu Biji Metanol 50%			
1	Air	263,636±1,305	Sangat Lemah
2	Etil Asetat	201,384±3,518	Sangat Lemah
3	<i>n</i> -Heksan	374133,333±3933,757	Sangat Lemah

Data **Tabel 7** menunjukkan nilai IC₅₀ paling kecil secara berurutan yaitu fraksi etil asetat konsentrasi 100%, air konsentrasi 100%, fraksi etil asetat konsentrasi 50%, air konsentrasi 50%, fraksi *n*-heksan konsentrasi 100% dan fraksi *n*-heksan fraksi 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀, maka fraksi tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang paling besar.

5. 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 yang diperoleh

berdistribusi normal atau tidak yaitu menggunakan uji Shapiro-Wilk karena jumlah data yang diperoleh kurang dari 50. Hasil analisis antioksidan fraksi air 100%, fraksi etil asetat 100%, fraksi *n*-heksan 100%, fraksi air 50%, fraksi etil asetat 50%, dan fraksi *n*-heksan 50% daun jambu biji yang diperoleh (**Tabel 8**).

Tabel 8. Hasil Uji Statistik Antioksidan (IC₅₀)

Sampel	Antioksidan (IC ₅₀)		
	Normalitas	Homogenitas	Kruskal-Wallis
Kuersetin	0,997*		
Fraksi Air Metanol 100%	0,213*		
Fraksi Etil Asetat Metanol 100%	0,210*		
Fraksi <i>n</i> -Heksan metanol 100%	0,013**	<0,001**	<0,001 ^a
Fraksi Air Metanol 50%	0,633*		
Fraksi Etil Asetat Metanol 50%	0,249*		
Fraksi <i>n</i> -Heksan metanol 50%	0,467*		

Keterangan : Sig. >0,05 (* Data berdistribusi normal), Sig. <0,05 (**Data tidak homogen dan tidak berdistribusi normal), Sig. <0,05 (^a Terdapat perbedaan yang signifikan).

Didapatkan beberapa hasil analisis yang berdistribusi normal dengan nilai signifikan >0,05. Sedangkan uji homogenitas dan salah satu data normalitas, hasil uji yang didapatkan tidak homogen dan tidak berdistribusi normal dengan nilai signifikan <0,05. Sehingga dilanjutkan dengan metode uji *Kruskal-Wallis* dan *Post Hoc Pairwise Comparisons*. Untuk perolehan uji *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai signifikan <0,001. Sehingga nilai <0,05 yang mana menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada semua sampel daun jambu biji. Dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Pairwise Comparisons* untuk mengetahui sampel mana yang berbeda signifikansinya (Lampiran 13). Hasil menunjukkan bahwa terdapat sampel yang berbeda signifikansinya tiap fraksi dan konsentrasi yaitu antara kuersetin dan fraksi *n*-heksan metanol 50%, sedangkan yang lainnya tidak berbeda signifikan.

B. Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan metode ekstraksi maserasi karena metode ini tidak menggunakan pemanasan dalam prosesnya sehingga mencegah terjadinya kerusakan pada senyawa yang tidak tahan panas (Ngibad *et al.* 2020). Dimana simplisia daun jambu biji yang sudah diserbukkan ditimbang sebanyak masing-masing 250 gram dan di maserasi menggunakan pelarut metanol 50% dan 100%. Setiap pelarut memiliki karakter berbeda dalam mengambil senyawa metabolit suatu sampel yang berbeda kepolarannya. Dalam penelitian penggunaan metanol sebagai pelarut dikarenakan pelarut ini dapat melarutkan senyawa polar sehingga sangat baik mengekstrak senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar. Hasil ekstrak kental daun jambu biji metanol 50% dan 100% kemudian difraksinasi. Tujuan dilakukannya fraksinasi yaitu untuk memisahkan komponen-komponen senyawa aktif dari ekstrak yang telah dihasilkan. Fraksinasi dilakukan dengan partisi cair-cair, dimana pelarut yang digunakan memiliki perbedaan kelarutan antara pelarut dan zat terlarut serta kedua pelarut yang digunakan tidak saling bercampur. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut *n*-heksan (non-polar), etil asetat (semi polar), dan yang tersisa pada pelarut air (polar). Hasil fraksinasi dari masing-masing fraksi kemudian dipekatkan dengan menggunakan waterbath sehingga didapatkan fraksi cair dari masing-masing fraksi.

Dari hasil yang didapatkan kemudian dihitung rendemen masing-masing fraksi yang ditunjukkan pada **Tabel 5**. Persentase rendemen yang didapatkan dari masing-masing fraksi berbeda-beda, hal ini disebabkan karena adanya perbedaan kemampuan menarik senyawa masing-masing pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi. Persentase rendemen fraksi *n*-heksan pada metanol konsentrasi 50% memiliki hasil rendemen yang tinggi dibandingkan dengan fraksi yang lain karena pada fraksi *n*-heksan tidak menarik terlalu banyak senyawa sehingga hasil yang didapatkan masih banyak larutan *n*-heksan, selain itu pada penelitian digunakan suhu 50°C untuk menguapkan fraksi *n*-heksan dimana itu belum mencapai titik didih *n*-heksan yaitu 69°C sehingga untuk penguapannya membutuhkan waktu yang lama, selain itu karena pada metanol konsentrasi 50% memiliki campuran air lebih banyak dari pada metanol konsentrasi 100% dimana

titik didih air yaitu 100°C, sehingga untuk penguapannya membutuhkan waktu yang lama dan hal tersebut dapat mempengaruhi berat rendemen *n*-heksan yang didapatkan.

Setelah dihitung nilai rendemen dari masing-masing fraksi, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun jambu biji metanol 100% dan 50% dilakukan uji skrining fitokimia. Uji skrining fitokimia ini dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder apa saja yang terkandung di dalam fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun jambu biji metanol 100% dan 50% tersebut. Golongan metabolit sekunder ditentukan dengan melihat perubahan warna sesuai pereaksi yang digunakan, pengendapan dan pembentukan busa. Hasil skrining fitokimia fraksi etil asetat, air dan *n*-heksan daun jambu biji konsentrasi 100% dan 50% dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa masing-masing fraksi secara kualitatif positif mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid pada fraksi air 100%, fraksi air 50%, fraksi etil asetat 50%, dan fraksi *n*-heksan 50%. Fraksi etil asetat 100% dan fraksi *n*-heksan 100% positif mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid (Bouchardat dan Dragendorf). Fraksi yang positif mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid yaitu fraksi air 100%, fraksi air dan fraksi etil asetat 50%. Fraksi yang positif mengandung senyawa metabolit sekunder golongan fenolik dan tanin yaitu fraksi air 100%, fraksi etil asetat 100%, fraksi *n*-heksan 100%, fraksi air 50%, dan fraksi etil asetat 50%. Fraksi yang positif mengandung senyawa metabolit sekunder golongan saponin yaitu fraksi air 100% dan fraksi air 50%. Fraksi yang positif mengandung senyawa metabolit sekunder golongan steroid yaitu fraksi etil asetat 100%. Fraksi yang positif mengandung senyawa metabolit sekunder golongan terpenoid yaitu fraksi air 100% dan fraksi *n*-heksan 100%. Fraksi yang berpotensi mengandung senyawa antioksidan seperti fenolik dan flavonoid adalah fraksi etil asetat dan air. Sedangkan *n*-heksan tidak positif terhadap flavonoid dan fenolik karena termasuk senyawa non-polar.

Setelah dilakukan uji fitokimia, selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH, metode ini digunakan karena

prosedur pengukuran antioksidan yang mudah, dapat dilakukan dalam waktu yang cukup singkat dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit. Prinsip uji DPPH adalah pengukuran dari resonansi elektron yang ditangkap dengan spektrometer selama bereaksi dengan senyawa antioksidan. Metode ini didasarkan pada reaksi penangkapan atom hidrogen oleh DPPH dari senyawa antioksidan. Dalam metode ini larutan DPPH berperan sebagai radikal bebas akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga DPPH akan berubah menjadi senyawa *diphenyl picryl hydrazine* (DPPH-H). Reduksi DPPH menjadi DPPH-H menyebabkan perubahan warna pada reagen DPPH, dari ungu menjadi kuning. Pengukuran yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH yaitu spektrofotometri Uv-Vis. Aktivitas antioksidan metode DPPH ditunjukkan oleh hambatan serapan radikal DPPH pada panjang gelombang serapan maksimum 516 nm. Pengujian aktivitas antioksidan metode DPPH ini dilakukan setelah dibiarkan selama 26 menit dan dilakukan ditempat gelap karena DPPH sangat peka terhadap cahaya.

Pengukuran aktivitas antioksidan dari masing-masing fraksi dibuat beberapa konsentrasi yaitu 100, 200, 300, 400, dan 500 ppm untuk fraksi air metanol 100% dan 50%, dan fraksi etil asetat metanol 100% dan 50%. Fraksi *n*-heksan 50% menggunakan konsentrasi 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, dan 500.000 ppm, dan fraksi *n*-heksan 100% menggunakan konsentrasi 1000, 2500, 4000, 5500, dan 7000 ppm. Setelah didapatkan nilai absorbansi dari masing-masing fraksi dilakukan perhitungan persen inhibisi dan dilanjutkan dengan menghitung nilai IC_{50} . Nilai tersebut merupakan suatu konsentrasi yang dibutuhkan untuk menangkap radikal DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} dari masing-masing fraksi diperoleh dari suatu perhitungan persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara sampel dengan persen penghambatan. Semakin kecil nilai IC_{50} , semakin aktif suatu sampel yang diuji untuk menjadi senyawa antioksidan (Romadanu *et al.*, 2014).

Penelitian ini menunjukkan hasil pelarut metanol dengan konsentrasi 100% memiliki nilai IC_{50} lebih baik dari pada metanol konsentrasi 50%, karena pelarut metanol konsentrasi 50% mengandung air lebih banyak dibandingkan dengan pelarut metanol konsentrasi 100%. Dalam penelitian Alfauzi *et al.*, (2022)

menunjukkan bahwa penggunaan pelarut metanol dengan konsentrasi 96% merupakan pelarut yang optimal dalam menarik senyawa flavonoid, sementara penggunaan pelarut aquades tidak efisien dalam menarik senyawa flavonoid. Berdasarkan hasil SPSS, pelarut konsentrasi 100% lebih baik dari pada pelarut konsentrasi 50% meskipun tingkat polaritas yang mirip nilai tersebut tidak signifikan ($\text{sig} > 0,05$).

Hasil perhitungan IC_{50} masing-masing fraksi dapat dilihat pada **Tabel 7**. Dimana hasil pemeriksaan aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki aktivitas penghambatan terhadap radikal bebas lebih tinggi daripada *n*-heksan. Hal ini terjadi baik pada metanol konsentrasi 100% maupun 50%, dapat dilihat berdasarkan nilai IC_{50} yang terkecil. Pada fraksinasi digunakan 3 pelarut dengan polaritas yang berbeda, yaitu air bersifat polar, etil asetat semi polar dan *n*-heksan bersifat non polar. Perbedaan polaritas ini yang akan berpengaruh terhadap senyawa yang akan terlarut. Berdasarkan prinsip *like dissolve like*, senyawa akan larut pada pelarut yang sifatnya mirip. Sehingga senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan seperti fenolik dan flavonoid yang bersifat cenderung polar-semi polar dapat terlarut pada pelarut air dan etil asetat. Hal inilah yang menyebabkan fraksi air dan etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik daripada *n*-heksan. *n*-heksan merupakan pelarut non polar, sehingga senyawa seperti fenolik dan flavonoid tidak dapat terlarut ke dalam. Hal ini dibuktikan dengan hasil uji skrining fitokimia bahwa pada fraksi *n*-heksan negatif terhadap fenolik dan flavonoid.

Pada hasil analisis data statistik nilai IC_{50} menunjukkan fraksi metanol 100% lebih baik dari pada fraksi metanol 50%, karena fraksi metanol 100% memiliki IC_{50} yang lebih kecil, nilai statistik $\text{sig} > 0,05$ tidak relevan. Hasil menunjukkan terdapat sampel yang berbeda signifikan ($\text{sig} < 0,05$) yaitu antara kuersetin dan fraksi *n*-heksan konsentrasi 50%, sedangkan yang lain tidak berbeda signifikan.